



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA

**INTERACCIÓN NANOPARTÍCULAS
DE HIDROXIAPATITA-BACTERIAS
SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO EN
PLANTA DE LECHUGA**

ROSALBA MONROY MIGUEL

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2019

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Rosalba Monroy Miguel, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Rogelio Carrillo González, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis "Interacción nanopartículas de hidroxiapatita-bacterias solubilizadoras de fosfato en planta de lechuga"

y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 14 de Junio de 2019



Firma del
Alumno (a)



Rogelio Carrillo González

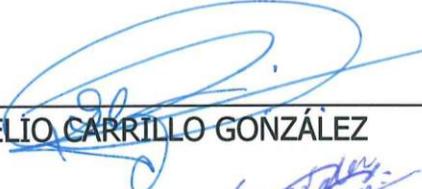
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **INTERACCIÓN NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA-BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO EN PLANTA DE LECHUGA** realizada por la alumna: **ROSALBA MONROY MIGUEL** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS
EDAFOLOGÍA**

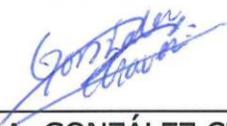
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



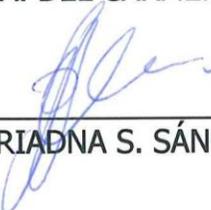
DR. ROGELIO CARRILLO GONZÁLEZ

ASESORA



DRA. MA. DEL CARMEN A. GONZÁLEZ CHÁVEZ

ASESORA



DRA. ARIADNA S. SÁNCHEZ LÓPEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, agosto de 2019

INTERACCIÓN NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA-BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO EN PLANTA DE LECHUGA

Monroy-Miguel, Rosalba, M en C.
Colegio de Postgraduados, 2019

RESUMEN

El fósforo es el macronutriente más importante para las plantas después del nitrógeno, sin embargo, es un recurso no renovable que al aplicarse como fertilizante fosfatado solo se aprovecha el 1 % debido a su facilidad para formar compuestos con otros elementos, por lo que el 90 % se vuelve inaccesible para los cultivos. Se prevé que para 2050 las reservas mundiales de fósforo habrán llegado a su tope máximo de producción, por lo que su deficiencia comprometerá la producción alimentaria mundial y elevará los costos de los fertilizantes fosfatados. El objetivo de esta investigación fue evaluar la interacción NPHA-BSP *in vitro* y posteriormente en lechuga en condiciones de invernadero, para evaluar la absorción de fósforo, como una alternativa de fertilización fosforada. La investigación se dividió en tres fases. Fase I: se realizó la selección de BSP con capacidad para solubilizar fósforo en medio NBRIP sólido y líquido, de donde se obtuvieron seis cepas bacterianas (*K. oxytoca*-13, *K. oxytoca*-21, *E. cloacae*-26, *C. freundii*-29-1, *E. cloacae*-31 y *S. marcescens*-36) con alta capacidad para solubilizar fósforo. Fase II: se evaluó la capacidad solubilizadora de fósforo de las seis cepas seleccionadas en medio NBRIP modificado con nanopartículas de hidroxiapatita (NPHA) sintetizadas por el método de precipitación química húmeda como fuente de fósforo (caracterizadas mediante TEM, DLS, DRX y FTIR). Como resultado se eligió a *Enterobacter cloacae* por su alta capacidad para solubilizar fósforo de distintas fuentes (64 mg L⁻¹ y 13 mg L⁻¹ equivalentes a 8% y 63% de P solubilizado, en RF y NPHA, respectivamente) y disminuir más el pH (4.0) de su medio. Las NPHA que se sintetizaron midieron menos de 100 nm en cualquiera de sus caras y presentaron forma de hoja, así como diámetro hidrodinámico entre 72.27 nm y 137.5 nm, se confirmó la presencia de hidroxiapatita por DRX y FTIR. Fase III: se probaron 12 tratamientos con tres fuentes diferentes de fósforo (NPHA, KH₂PO₄, RF), con y sin inóculo bacteriano bajo condiciones de invernadero en planta de lechuga cultivada en arena y con solución Steiner. Los resultados mostraron que el tratamiento NPHA3 casi igualó el porcentaje de fósforo total en vástago y raíz con el grupo testigo (KH₂PO₄) y los tratamientos con NPHA1 y NPHA2 también fueron semejantes. El inóculo bacteriano (*E. cloacae*-31) solo tuvo efecto significativo para volumen radical a los 95 dgd. Para estudios posteriores se recomienda cambiar las condiciones (diferente cultivo, sustrato, solución nutritiva, inoculante bacteriano, dosis y concentraciones de NPHA e inoculante bacteriano) a fin de obtener un efecto sinérgico de la interacción NPHA-BSP y optimizar los resultados.

Palabras clave: Fósforo, BSP, nanopartículas, hidroxiapatita, RF, *E. cloacae*.

INTERACTION HYDROXYAPATITE NANOPARTICLES-PHOSPHORUS SOLUBILIZING BACTERIA IN LETTUCE PLANT.

Monroy-Miguel Rosalba, M in C.
Colegio de Postgraduados, 2019

ABSTRACT

Phosphorus is the most important macronutrient for plants after nitrogen, however, it is a non-renewable resource that when applied as a phosphated fertilizer only 1% is used due to its ease in forming compounds with other elements, so that 90 % becomes inaccessible for crops. It is expected that by 2050 world phosphorus reserves will have reached their maximum production limit, so their deficiency will compromise world food production and raise the costs of phosphate fertilizers. The objective of this research was to evaluate the HANP-PSB interaction *in vitro* and later in lettuce under greenhouse conditions, to evaluate phosphorus absorption, as an alternative of phosphorus fertilization. The investigation was divided into three phases. Phase I: the selection of PSB was performed with the ability to solubilize phosphorus in solid and liquid NBRIP medium, from which six bacterial strains were obtained (*K. oxytoca*-13, *K. oxytoca*-21, *E. cloacae*-26, *C. freundii*-29-1, *E. cloacae*-31 and *S. marcescens*-36) with high capacity to solubilize phosphorus. Phase II: the phosphorus solubilizing capacity of the six strains selected in NBRIP medium modified with hydroxyapatite nanoparticles (HANP) synthesized by the wet chemical precipitation method as a source of phosphorus (characterized by TEM, DLS, DRX and FTIR) was evaluated. As a result, *Enterobacter cloacae* was chosen because of its high capacity to solubilize phosphorus from different sources (64 mg L⁻¹ and 13 mg L⁻¹ equivalent to 8% and 63% of solubilized P, in PR and HANP, respectively) and decrease further the pH (4.0) of its medium. The HANP that were synthesized measured less than 100 nm on any of their faces and had a leaf shape, as well as hydrodynamic diameter between 72.27 nm and 137.5 nm, the presence of hydroxyapatite was confirmed by DRX and FTIR. Phase III: 12 treatments were tested with three different sources of phosphorus (HANP, KH₂PO₄, PR), with and without bacterial inoculum under greenhouse conditions in a lettuce plant grown in sand and with Steiner solution. The results showed that the NPHA3 treatment almost equalized the percentage of total phosphorus in the stem and root with the control group (KH₂PO₄) and the treatments with NPHA1 and NPHA2 were also similar. The bacterial inoculum (*E. cloacae*-31) only had a significant effect for radical volume at 95 ddg. For subsequent studies it is recommended to change the conditions (different culture, substrate, nutrient solution, bacterial inoculant, doses and concentrations of HANP and bacterial inoculant) in order to obtain a synergistic effect of the HANP-PSB interaction and optimize the results.

Keywords: Phosphorus, PSB, nanoparticles, hydroxyapatite, PR, *E. cloacae*.



DEDICATORIA

Dedico esta obra a mis personas favoritas, que son mi inspiración y razón de existir:

A mis amados padres:

Bertha Miguel Peláez y Pascual Monroy Cruz

A mi querida hermana:

Pat

al dúo dinámico:

mi hermana Lily e Iván, mi cuñado

A mi adorado sobrino:

Dany

Y especialmente, a la memoria de mi amado hermano:

Daniel Rubén Monroy Miguel

Quien fue y será siempre mi cómplice y mejor amigo

“Fuiste para mí una luz cálida en medio de la tormenta...”

Vivirás siempre en mi mente y en mi corazón...”



AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al CONACYT por financiar mis estudios de maestría, ya que sin su apoyo este sueño no se hubiese materializado. También quiero agradecer al Colegio de Postgraduados por darme la oportunidad de cursar una maestría en sus instalaciones. Así mismo agradezco a mi consejo: al Dr. Rogelio Carrillo González por su asesoría, a la Dra. Ma. del Carmen A. González Chávez por apoyarme con el manuscrito, a la Dra. Ariadna S. Sánchez López, por su apoyo y enseñanzas en el laboratorio. También quiero agradecer al Dr. Galvis por su paciencia y disposición como sinodal.

Quiero agradecer al Dr. Javier Suárez del área de Estadística por su valiosa asesoría en el procesamiento de datos y su disposición cada vez que necesité de su ayuda en la resolución de dudas y retos estadísticos, muchas gracias. También quiero agradecer a todos mis profesores y académicos que me formaron, asesoraron y brindaron un poco de su tiempo durante mi estancia en el Colegio de Postgraduados, en especial a la Dra. Libia I. Trejo Téllez y al Dr. Prometeo Sánchez García.

Quiero agradecer al M. en C. Patricio Guzmán del área de Génesis de suelos del posgrado en Edafología, por su asesoría y apoyo técnico en el procesamiento de muestras para difracción de rayos X. Gracias, a la Dra. Claudia Hidalgo del área de Fertilidad de suelos del posgrado en Edafología, por darme acceso al equipo Z-sizer para el procesamiento de muestras. Al Dr. Trejo del área de Botánica por permitirme usar el integrador de área foliar.

Al Dr. Etchevers del área de Fertilidad de suelos, al Dr. Conde del área de Botánica y a Don Pedro del área de Génesis de suelos, por brindarme agua destilada durante semanas para la fase tres de esta investigación.

Al personal técnico del laboratorio de Química de suelos del Posgrado en Edafología: a Don Juanito por su apoyo durante la última etapa experimental, a Don Bibiano, en paz descansa, por ayudarme con las dificultades técnicas y en especial al M. en C. Jaime Cruz Díaz, en paz descansa, por su asesoría técnica y sobre todo su calidez humana desde que trabajé por primera vez, hasta la última vez que convivimos en este laboratorio.

A Don Pedro, por todo el apoyo técnico y su amistad durante mi estancia en la maestría, a Don Lino y mis compañeros y amigos del área de Génesis de suelos.

Gracias a la Dra. Bibiana Chávez Munguía y a la Biol. Lizbeth Salazar Villatoro del CINVESTAV, Unidad Zacatenco por su invaluable apoyo técnico en el procesamiento de las muestras para microscopía electrónica de transmisión.

Al Dr. Miguel Ángel Aguilar Méndez del laboratorio CICATA-IPN, Unidad Legaria, por su apoyo y facilidades brindadas para la medición del potencial Z y tamaño de diámetro hidrodinámico de partícula.

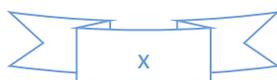
Por último quiero agradecer a las siguientes personas: Yuly, Ary, Orjuz, Alex, Tanys, Lupita, Karlys, Nefer, Bety, Rosa, Rafy, Mariana, Gio, Ale, Flor, Sigrid, Bety, Angy, Robert, Fer, Chamú, Ernesto, Emmanuel, Moni, Víctor Sombra, Eulises, Bogar, George, Erwin, Paco, Lili, Hagg, Jaqueline, Miriam, Beto, Simón, Ivancito, Luz, Claus, gracias a todos!!!!.

Por su grata compañía, sincera amistad, abrazos, palabras de aliento, gentiles atenciones, así como la ayuda y tiempo que me brindaron todas aquellas amables personas que tuve la dicha de conocer e intercambiar lazos durante mi estancia en la maestría, ya sea como compañeros, amigos, vecinos, muchas gracias!!!

CONTENIDO

RESUMEN	¡Error! Marcador no definido.
ABSTRACT	v
LISTA DE CUADROS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Importancia del fósforo en la producción vegetal y problemática	4
2.2. Bacterias solubilizadoras de fosfatos	9
2.3. Nanotecnología	13
2.4. Nanofertilizantes	14
III. OBJETIVO GENERAL.....	18
IV. HIPÓTESIS GENERAL.....	18
REFERENCIAS CITADAS.....	19
CAPÍTULO I. SELECCIÓN DE BACTERIAS CON CAPACIDAD PARA SOLUBILIZAR FOSFATOS	29
1.1. INTRODUCCIÓN	29
1.2. OBJETIVO ESPECÍFICO	31
1.3. HIPÓTESIS ESPECÍFICA.....	32
1.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
1.4.1. Cepas bacterianas	32
1.4.2. Prueba cualitativa de solubilización de fósforo	32
1.4.3. Prueba cuantitativa de solubilización de fósforo	33
1.4.4. Diseño experimental y análisis estadístico.....	35
6.5. RESULTADOS.....	35
6.5.1. Prueba cualitativa de solubilización de fósforo	35
6.5.2. Prueba cuantitativa de solubilización de fósforo	37
6.5.3. Biomasa bacteriana	37
6.5.4. Concentración de fósforo soluble	39
6.5.5. Concentración de calcio soluble	42

6.5.6. pH.....	45
6.5.7. Conductividad eléctrica (CE)	47
6.5.8 Correlación entre las variables que se evaluaron	49
6.6. DISCUSIÓN	51
6.7. CONCLUSIONES	58
6.8. LITERATURA CITADA	59
CAPÍTULO II. INTERACCIÓN BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATOS	
(BSP) -NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA (NPHA).....	65
2.1. INTRODUCCIÓN	65
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	68
2.3. HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	69
2.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	69
2.4.1. Síntesis de NPHA.....	69
2.4.2. Caracterización de NPHA.....	69
2.4.2.1 Tamaño de diámetro hidrodinámico y potencial Z	69
2.4.2.2. Tamaño y forma de partícula.....	70
2.4.2.3. Caracterización mediante FTIR.....	70
2.4.2.4. Caracterización mediante difracción de rayos X (DRX)	71
2.4.2.5. Concentración de fósforo extractable en NPHA y roca fosfórica (RF)	71
2.4.3. Concentración de NPHA y RF en el medio de cultivo	72
2.4.4. Inóculo bacteriano	73
2.4.5. Evaluación de la interacción BSP-NPHA y BSP-RF.....	74
2.4.6. Diseño experimental y análisis estadístico.....	74
2.5. RESULTADOS.....	75
2.5.1. Caracterización de tamaño de diámetro hidrodinámico y potencial Z	75
2.5.2. Caracterización de tamaño y forma de partícula	76
2.5.3. Caracterización mediante FTIR.....	79
2.5.4. Caracterización mediante difracción de rayos X (DRX)	80
2.5.5. Biomasa bacteriana	81



2.5.6. Concentración de fósforo soluble	84
2.5.7. Concentración porcentual de fósforo soluble	86
2.5.8. Calcio soluble	88
2.5.9. pH.....	91
2.6.0. CE	93
2.6. DISCUSIÓN	97
2.7. CONCLUSIONES	104
2.8. LITERATURA CITADA	105
CAPÍTULO III. INTERACCIÓN NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA (NPHA)- BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO (BSP) EN PLANTA DE LECHUGA	112
3.1. INTRODUCCIÓN	112
3.2. OBJETIVO GENERAL.....	114
3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	115
3.4. HIPÓTESIS GENERAL.....	115
3.5. HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	115
3.6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	115
3.6.1. Tratamientos	115
3.6.1.2. Germinación de semillas de lechuga	116
3.6.1.3. Fertilización y riego	117
3.6.1.4. Inoculación bacteriana y adición de NPHA.....	117
3.6.2. Muestras y variables analizadas.....	118
3.6.2.1. Longitud de hoja y raíz más largas	119
3.6.2.2. Peso fresco y peso seco de vástago y raíz.....	119
3.6.2.3. Área foliar	119
3.6.2.4. Volumen de raíz.....	119
3.6.2.5. Pigmentos fotosintéticos	120
3.6.2.6. Concentración de fósforo, calcio y micronutrientes en tejido vegetal	120
3.6.3. Diseño experimental y análisis estadístico.....	121
3.7. RESULTADOS	122

3.7.1. Longitud de hoja y raíz más largas	122
3.7.2. Peso fresco de vástago y raíz	125
3.7.3. Peso seco de vástago y raíz	127
3.7.4. Área foliar	129
3.7.5. Volumen radical	129
3.7.6. Concentración de macro y micronutrientes en tejido vegetal	132
3.7.6.1. Concentración de fósforo total en vástago y raíz	132
3.7.6.2. Concentración de calcio total en vástago y raíz	134
3.7.6.3. Concentración de Mn total en tejido vegetal	138
3.7.6.4. Concentración de Zn total en tejido vegetal	139
3.7.6.5. Concentración total de Cu en tejido vegetal	141
3.7.6.6. Concentración total de Fe en tejido vegetal	143
3.7.7. Pigmentos fotosintéticos	145
3.7.7.1. Clorofila a	145
3.7.7.2. Clorofila b	145
3.7.7.3. Clorofila total	145
3.7.7.4. Carotenoides	146
3.7.8. Correlaciones de Pearson	147
3.8. DISCUSIÓN	149
3.9. CONCLUSIONES	157
4.0. CONCLUSIONES GENERALES	159
4.1. LITERATURA CITADA	160

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Solubilidad y fórmula empírica de apatitas en algunas rocas fosfóricas sedimentarias8
Cuadro 2. Listado de bacterias que mostraron presencia o ausencia de halo de solubilización de fósforo.27
Cuadro 3. Coeficientes de correlación de Pearson por fecha de evaluación.41
Cuadro 4. Cepas bacterianas seleccionadas con base en la mayor solubilización de fósforo y disminución de pH en el medio de cultivo a los 20 di.42
Cuadro 5. Cálculos para sustituir la fuente de fósforo (fosfato tricálcico = FTC) por NPHA en el medio NBRIP para la selección de BSP.62
Cuadro 6. Cálculos para sustituir la fuente de fósforo: FTC por RF, en el medio NBRIP para la selección de BSP. 63
Cuadro 7. Coeficientes de correlación de Pearson entre variables de respuesta que se evaluaron en la interacción BSP-RF como fuente de fósforo.87
Cuadro 8. Coeficientes de correlación de Pearson entre variables de respuesta que se evaluaron en la interacción BSP-NPHA como fuente de fósforo.88
Cuadro 9. Tratamientos para evaluar la interacción NPHA- <i>E. cloacae</i> -31 en plantas de lechuga bajo condiciones de hidroponía (solución Steiner).106
Cuadro 10. Especificaciones de cada muestreo que se realizó durante la Fase III.....	109

Cuadro 11. Concentración acumulada promedio (mg) de fósforo por cada maceta y por cada tiempo de muestreo130
Cuadro 12. Concentración de pigmentos fotosintéticos expresada en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	142
Cuadro 13. Coeficientes de correlación de Pearson de los micronutrientes (Cu, Fe, Zn) presentes en vástago y en raíz de lechuga.143
Cuadro 14. Coeficientes de correlación de Pearson de las variables morfológicas que se evaluaron en vástago y raíz de lechuga.144
Cuadro 16. Coeficientes de correlación de Pearson de fósforo y calcio porcentual presentes en vástago y raíz de lechuga.145

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema de las fases en que se divide el proyecto de investigación.	19
Figura 2. Absorbancia de cultivo de 12 cepas bacterianas a los 5 días de incubación (di) (a), 10 di (b) y 20 di (c).	28
Figura 3. Absorbancia de cultivo de 12 cepas bacterianas en tres fechas de evaluación durante la cinética de solubilización de fósforo.	29
Figura 4. Concentración de fósforo soluble por 12 bacterias en la cinética de solubilización bacteriana.	31
Figura 5. Concentración de fósforo soluble de 12 bacterias en tres fechas de evaluación.	33
Figura 6. Concentración de calcio soluble en medio de cultivo de 12 cepas bacterianas a los 5 (a), 10 (b) y 20 (c) di.	34
Figura 7. Concentración de calcio soluble en el medio de cultivo de 12 cepas bacterianas a los 5, 10 y 20 di.	35
Figura 8. pH del medio de cultivo de 12 cepas bacterianas durante la cinética de solubilización de fósforo.	37
Figura 9. pH del medio de cultivo de 12 cepas bacterianas en tres fechas de evaluación.	38
Figura 10. Conductividad eléctrica en el medio cultivo de 12 cepas bacterianas	

durante la cinética de solubilización de fósforo 5 di (a), 10 di (b) y 20 di (c).39
Figura 11. Conductividad eléctrica del medio de cultivo de 12 cepas bacterianas en diferentes tiempos de evaluación.40
Figura 12. Tamaño hidrodinámico de las NPHA medido con el nano zeta se observan, tres picos a los 1.4 nm, 14.47 nm y 33.37 nm, respectivamente.67
Figura 13. Potencial Z representativo de las NPHA. Muestra los límites del intervalo de valores de potencial Z, entre -10.8 mV y -33 mV.68
Figura 14. Micrografía de NPHA con microscopio electrónico de transmisión (TEM) a 12X. En amarillo se resalta el ancho de dos NPHA.68
Figura 15. Micrografía de NPHA por medio de TEM a 12X. Se aprecia la forma definida de hoja que poseen las NPHA.69
Figura 16. Micrografía tomada con TEM a 12X. Se observa tamaño y forma de las NPHA y en amarillo se muestran la longitud de dos NPHA.69
Figura 17. Espectro infrarrojo con transformada de Fourier perteneciente a una muestra de NPHA (1600-300nm). Los rombos oscuros muestran la presencia de grupos fosfato.70
Figura 18. Espectro de difracción de rayos X de una muestra de NPHA. La hidroxiapatita exhibe tres picos característicos en rojo. Compuestos distintos aparecen en otros colores.71
Figura 19. Biomasa (expresada como absorbancia) comparativa entre cepas bacterianas	

con fertilizaciones distintas (BSP-NPHA y BSP-RF) y en diferentes fechas de evaluación.72
Figura 20. Biomasa bacteriana comparativa entre fechas de muestreo de seis bacterias y diferente fuente de fósforo.73
Figura 21. Comparación de fósforo soluble entre tratamientos (BSP-NPHA y BSP-RF), por cada cepa bacteriana y tiempo de evaluación.75
Figura 22. Concentración de fósforo soluble comparativo en tres fechas de evaluación por cada cepa y fuente de fósforo.76
Figura 23. Porcentaje de fósforo solubilizado por cepa bacteriana, a los 5 (a), 10 (b) y 20 (c) días de incubación en medio NBRIP.77
Figura 24. Fósforo soluble (en porcentaje) analizado entre fechas de muestreo y por cada cepa bacteriana.78
Figura 25. Concentración comparativa de calcio soluble de tres evaluaciones en seis cepas bacterianas con dos fuentes de fósforo.80
Figura 26. Concentración de calcio soluble de seis cepas entre fechas de evaluación y diferentes fuentes de fósforo.81
Figura 27. pH comparativo de seis cepas bacterianas con dos fuentes de fósforo en tres muestreos.82
Figura 28. Reacción en el medio de crecimiento de seis cepas bacterianas a los 5, 10 y 20 días de incubación con distinta fuente de fósforo.83
Figura 29. Conductividad eléctrica (dS m ⁻¹) de seis cepas con dos tratamientos de fertilización en tres muestreos.85
Figura 30. Conductividad eléctrica por cada cepa bacteriana y fuente de fósforo entre las diferentes fechas de muestreo.86

Figura 31. Longitud de hoja y raíz más larga. a) Muestreo 1 (M1), b) muestreo 2 (M2), c) muestreo 3 (M3).114
Figura 32. Peso fresco. a) Muestreo 1 (M1), b) muestreo 2 (M2), c) muestreo 3 (M3).	117
Figura 33. Peso seco. a) Muestreo 1 (M1), b) muestreo 2 (M2), c) muestreo 3 (M3)...	120
Figura 34. Área foliar. a) Muestreo 1 (M1), b) muestreo 2 (M2), c) muestreo 3 (M3)....	122
Figura 35. Volumen de radical. a) Muestreo 1 (M1), b) muestreo 2 (M2), c) muestreo 3 (M3).125
Figura 36. Concentración porcentual de fósforo total en vástago y raíz. a) Muestreo 1 (M1), b) muestreo 2 (M2), c) muestreo 3 (M3).127
Figura 37. Concentración porcentual de calcio total en vástago y raíz. a) Muestreo 1 (M1), b) muestreo 2 (M2), c) muestreo 3 (M3).129
Figura 38. Mn total en vástago y raíz. a) Muestreo 1 (M1), b) muestreo 2 (M2), c) muestreo 3 (M3).132
Figura 39. Zn total en vástago y raíz. a) Muestreo 1 (M1), b) muestreo 2 (M2), c) muestreo 3 (M3).136
Figura 40. Concentración de Cu total en vástago y raíz. a) Muestreo 1 (M1), b) muestreo 2 (M2), c) muestreo 3 (M3).138
Figura 41. Concentración de Fe total en vástago y raíz. a) Muestreo 1 (M1), b) muestreo 2 (M2), c) muestreo 3 (M3).141

I. INTRODUCCIÓN

El fósforo es el elemento más importante en la nutrición vegetal después del nitrógeno. Es un nutrimento esencial para las funciones metabólicas de las plantas: producción de energía, respiración, glucólisis, fotosíntesis, síntesis de ácidos grasos, síntesis de ADN, reproducción, división celular, desarrollo del sistema radical óptimo, floración, formación de semillas, entre otras funciones (Wendling *et al.* 2013; Sharma *et al.* 2011; Corrales *et al.* 2014). Las plantas con deficiencia de fósforo se caracterizan por crecimiento lento, la presencia de hojas de tamaño reducido, moradas o marrón, tallos débiles (Sharma *et al.* 2011), así como desarrollo limitado de brotes y raíces (Khan *et al.* 2006; Adhikari *et al.*, 2014).

En general, la disponibilidad de fósforo en el suelo para las plantas es escasa debido a que tiende a formar fuertes uniones con diversas sustancias en el suelo, como la materia orgánica e hidróxidos de Fe, Al y Mn (Behera, *et al.* 2014). Aun cuando se administra suficiente cantidad de fertilizante fosfatado en el suelo, éste solo se encuentra disponible para las plantas poco tiempo posterior a su aplicación. Por lo que gran parte de estos fertilizantes no se aprovecha.

Se estima que para el año 2050 el incremento poblacional será de 9.6 billones de personas (UN 2013), con lo que se prevé un aumento en la demanda de cultivos alimenticios y, en consecuencia, en el incremento del uso de fertilizantes. En el caso específico de fertilizantes fosfatados, será necesario aumentar la producción en 70% (FAO 2009). Por lo que el acceso y suministro de los fertilizantes mencionados deberá garantizarse, pues de esto dependerá la seguridad alimentaria.

La materia prima para los fertilizantes fosfatados es un recurso finito y de difícil acceso, y su escasez puede provocar el alza en los precios de los fertilizantes, como sucedió en 2007 y 2008 cuando la demanda de fertilizantes fosfatados y roca fosfórica (RF) superó a los suministros y en consecuencia el precio de los fertilizantes aumentó hasta 700% (Minemakers limited 2008). El tope máximo de producción de fertilizantes fosfatados se calcula será en 2030 y posteriormente la producción disminuirá paulatinamente hasta agotar las principales fuentes de fósforo (Cordell *et al.* 2009), como lo es la RF.

La RF es una fuente no renovable de fósforo; tan solo en 2010, el Centro de Desarrollo Internacional de Fertilizantes (IFDC por sus siglas en inglés) estimó que las reservas mundiales de RF eran de 60,000 Mt (Van Kauwenberg 2010), suficientes para abastecer fertilizantes fosfatados los próximos 50 a 120 años (Cordell *et al.* 2009; Fixen 2009; Smit, *et al.* 2009).

Cabe destacar que a pesar de pudiera existir un suministro suficiente de fertilizantes fosfatados, la disponibilidad del nutriente para las plantas no está garantizada (Thompson y Troeh, 2002). Esto debido a que diversos factores ambientales y del suelo disminuyen la disponibilidad de fósforo, lo que frecuentemente conlleva a realizar aplicaciones excesivas de fertilizantes.

Por lo expuesto anteriormente y dado el crecimiento poblacional y el ritmo de consumo de los fertilizantes fosfatados es indispensable trabajar en la búsqueda de alternativas de fertilizantes fosfatados, más eficientes, económicos y de bajo impacto en el ambiente.

Un ejemplo de estas alternativas es la aplicación de microorganismos solubilizadores de fosfatos (MSP). Los MSP incluyen bacterias, hongos, protozoos y algunos nematodos, que tienen una función central en el ciclo natural del fósforo y poseen la capacidad de solubilizar fósforos a partir de fuentes insolubles (Oberson y Joner 2005; Awasthi *et al.* 2011; Büneman *et al.* 2011; Jones y Oburguer 2011; Behera *et al.* 2014). Por su abundancia, ciclo de vida corto y fácil cultivo, las bacterias solubilizadoras de fosfato (BSP) resultan de gran interés.

Las BSP forman asociaciones simbióticas con las plantas, quienes brindan hospedaje y fuentes de carbono para las bacterias, mientras estas incrementan la absorción de agua y nutrimentos como el fósforo en la planta. Las bacterias asociadas protegen a las plantas contra agentes patógenos (Duponnois *et al.* 2005). Por tal motivo, este tipo de microorganismos se encuentran actualmente disponibles en inóculos comerciales con o sin la adición de fertilizantes (Estrada *et al.* 2012; Konietzny y Greiner 2004).

Por otra parte, la escasa disponibilidad del fósforo también podría abordarse desde una perspectiva más novedosa: la nanotecnología. Los nanomateriales se caracterizan por tener al menos una cara con tamaño de 1-100 nm y elevada superficie específica, haciéndolos sumamente reactivos (Raim e Ingle 2012; Liu y Lal 2015). Los nanofertilizantes constituyen una tecnología atractiva para las ciencias agrícolas, ya que pueden proveer uno o más nutrimentos (Madusanka *et al.* 2017; Gunaratne *et al.* 2016) y así mejorar el crecimiento y rendimiento de cultivos agrícolas. La alta reactividad de los nanomateriales, incluyendo los nanofertilizantes, se puede aprovechar para la aplicación de nutrimentos de una forma más eficiente que los fertilizantes a granel.

Lo que además evitaría la sobredosificación y desperdicio de fertilizantes, reduciendo así el impacto ambiental del uso excesivo de estos. Es por esto que los fertilizantes en forma de nanopartículas podrían contribuir significativamente en el incremento de la producción de cultivos agrícolas y a su vez asistir en la protección ambiental al reducir la pérdida de nutrientes por lixiviación y emisión (Liu y Lal 2014; De Rosa *et al.* 2010; Karunaratne *et al.* 2012; Kottegoda *et al.*, 2011).

Considerando la información presentada resulta indudable que la aplicación conjunta de BSP y nanofertilizantes puede ser una alternativa para contribuir en la solución de la problemática del fósforo en la producción de alimentos. Sin embargo, la información existente al respecto es escasa. Por lo que en este trabajo se propone el estudio de la interacción de BSP y nanomateriales fosfatados como medio para incrementar la absorción de fósforo en las plantas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Importancia del fósforo en la producción vegetal y problemática

El fósforo es un elemento esencial para la formación de moléculas orgánicas y el desarrollo de las plantas. Más de 90% del fósforo total en el sistema suelo-planta-animal está en los suelos y menos de 10% en el resto de los sistemas biológicos. El contenido de fósforo promedio en el suelo es cercano a 0.05% (p/p) pero solo 0.1% del fósforo total está disponible para las plantas debido a la deficiente solubilidad de éste y su fijación en el suelo (Illmer y Schinner 1995).

Se distinguen tres formas principales de fósforo en el suelo con relación a la nutrición vegetal: fósforo en solución (P_{sol}), fósforo orgánico (P_o) y fósforo inorgánico (P_i) asociado a partículas minerales.

El P_{sol} también llamado ortofosfato se considera disponible para las plantas (Arai y Sparks 2007). Su concentración en el suelo se determina por procesos de mineralización e inmovilización del P_o , así como por el equilibrio entre adsorción-desorción y precipitación-disolución del P_i . Cuando la concentración del P_{sol} es mayor que la que soporta la solubilidad de los minerales predominantes, el P_{sol} se precipita con los cationes metálicos (Al^{3+} , Ca^{2+} , Fe^{3+}) y forman minerales de fósforo. Cuando el P_{sol} es menor, los minerales de fósforo se disuelven en la solución del suelo y la solubilidad de los precipitados metálicos del fósforo sigue el orden siguiente: $Ca-P > Al-P > Fe-P$ (Chuang *et al.*, 2007).

La materia orgánica que constituye hasta 50% del suelo es un importante reservorio de fósforo inmovilizado y no disponible para las plantas. Tres grupos de compuestos en el suelo forman la reserva de P_o : los inositolfosfatos (ésteres de inositol fosfato), los ácidos nucleicos y los fosfolípidos.

Debido a su gran estabilidad, el inositol fosfato (también se le denomina ácido fítico o fitato) almacena más de 50% del P_o , mientras que el contenido de fosfolípidos comprende entre 0.5% y 7% del P_o total. Los ácidos nucleicos, que se originan a partir de la descomposición de microorganismos, animales y restos vegetales constituyen la fracción más pequeña (< 3% del P_o total).

El fitato es el mayor componente de fósforo orgánico en el suelo (Rodríguez *et al.* 2006). Se calcula que, de 12 Mt de fósforo cosechado, 5 Mt de fósforo (40%) regresa a la tierra como residuo de los cultivos (Smil 2000). Así, el contenido de P_o depende de varios factores: clima, vegetación, textura, prácticas de fertilización, riego y drenaje y uso del suelo. Por lo que el tiempo de residencia media del P_o en el suelo se ha estimado entre 350 y 2000 años (Nannipieri y Smalla 2006).

El cambio de P_o a P_i se conoce como mineralización. En este proceso participan tres grupos de enzimas: las enzimas fosfatasas ácidas no específicas, que llevan a cabo la desfosforilación de los enlaces fosfodiéster o fosfoanhidro de la materia orgánica; las fitasas, actúan específicamente provocando la liberación de fósforo del ácido fítico; las fosfonatasas y carbono-fósforo liasas que pueden romper las uniones C-P presentes en los organofosforados. La principal actividad enzimática corresponde a las fosfatasas ácidas y a las fitasas, dependiendo de la presencia en el suelo de los sustratos sobre los que actúan (Rodríguez *et al.*, 2006).

El P_i forma parte de los minerales primarios como la apatita $Ca_{10}(PO_4)_6X_2$ (X_2 puede ser F-, OH- o Cl-) y de los minerales secundarios (precipitación del fósforo con Al, Ca y Fe). El fósforo también se adsorbe sobre las superficies de los minerales de arcilla, oxihidróxidos de Fe y Al (Fe-P y Al-P), como carbonatos de Ca y P (Ca-P), físicamente ocluido dentro de los minerales secundarios. Como parte de estos últimos, los Ca-P [$Ca_3(PO_4)_2$] dominan en suelos neutrales y alcalinos (White y Hammond 2008). Mientras los Fe-P (strengita: $FePO_4 \cdot 2H_2O$) y Al-P (Variscita: $AlPO_4 \cdot 2H_2O$) predominan en los suelos ácidos (Rajkumar *et al.* 2009; Rodríguez y Fraga 1999).

Las formas iónicas de P_i son dependientes del pH. Cuando la reacción del suelo oscila entre 4.0 y 6.0, la mayor parte del P_i está presente como ion $H_2PO_4^-$, que puede ser absorbido por las plantas debido a su solubilidad en agua. A pH entre 6.5 y 7.5, el P_i en la solución del suelo está presente como $H_2PO_4^-$ y HPO_4^{2-} , esta última forma también puede ser absorbida por las raíces de las plantas, pero en menor proporción que la primera.

A pH entre 8.0 y 10.0, el ion HPO_4^{2-} es dominante. A pH > 10.0, la forma iónica dominante es el PO_4^{3-} , y solo el fosfato de sodio es disponible para las plantas. En el otro extremo, a valores de pH inferiores a 3.0, el fósforo está presente como H_3PO_4 , una forma química extremadamente reactiva, por lo que, en suelos muy ácidos la fijación o reversión del fósforo ocurre rápidamente (Arai y Sparks 2007).

Se estima que las reservas actuales de fósforo a nivel mundial disminuirán a la mitad entre 2040 y 2060 (Lambers *et al.* 2006), provocando el incremento del precio de los fertilizantes fosfatados debido a su escasez. Por esta razón, la búsqueda de alternativas sustentables de fertilización se vuelve imperante.

Las mayores reservas de fósforo en el suelo son las rocas y los depósitos minerales, como los de apatita, hidroxiapatitas y las oxiapatitas cuya principal característica es la insolubilidad (Bashan *et al.* 2013). Por ejemplo, la roca fosfórica (RF) la principal fuente de fósforo, está constituida principalmente por apatita (hidroxi y fluorapatita). En el Cuadro 1 se muestra la fórmula química de algunas RFs representativas (Chien *et al.* 2004).

La RF sin procesar se recomienda como alternativa ante la infertilidad de los suelos con bajo contenido de fósforo disponible y una alta capacidad de fijación de fósforo. Sin embargo, la RF puede variar en sus propiedades físicas, químicas y cristalográficas de acuerdo a su composición específica, afectando así su solubilidad.

Cuadro 1. Solubilidad y fórmula empírica de apatitas en algunas rocas fosfóricas sedimentarias.

Procedencia	P ₂ O ₅ % (extraído con CAN) *	Fórmula empírica
Carolina del Norte, USA	9.7	Ca _{9.53} Na _{0.34} Mg _{0.13} (PO ₄) _{4.77} (CO ₃) _{1.23} F _{2.49}
Gasa, Túnez	8.7	Ca _{9.54} Na _{0.32} Mg _{0.12} (PO ₄) _{4.84} (CO ₃) _{1.16} F _{2.46}
Bahía Inglesa, Chile	6.9	Ca _{9.59} Na _{0.30} Mg _{0.12} (PO ₄) _{4.90} (CO ₃) _{1.10} F _{2.44}
Florida Central, USA	5.3	Ca _{9.74} Na _{0.19} Mg _{0.07} (PO ₄) _{5.26} (CO ₃) _{0.74} F _{2.30}
Tennessee, USA	3.7	Ca _{9.85} Na _{0.11} Mg _{0.04} (PO ₄) _{5.54} (CO ₃) _{0.46} F _{2.18}
Patos de minas, Brasil	2.5	Ca _{9.96} Na _{0.03} Mg _{0.01} (PO ₄) _{5.88} (CO ₃) _{0.12} F _{2.05}

*Citrato de amonio neutro (CAN) Fuente: Chien *et al.* (2004).

Los suelos agrícolas contienen grandes cantidades de fósforo en formas no asimilables por las plantas. Se calcula que 70% del P_i proveniente de la aplicación de fertilizantes se convierte rápidamente en complejos insolubles, como ion fosfato de Ca y aluminio (Chuang *et al.* 2007). Estos fosfatos insolubles solo se pueden volver solubles por acción microbiana. Se ha observado que, a mayor actividad microbiana, la biodisponibilidad de fósforo en el suelo aumenta (Estrada *et al.* 2012). Los mecanismos microbianos involucrados en el proceso de solubilización de fósforo incluyen acidificación, quelatación, reacciones de intercambio, producción de ácidos y actividad enzimática (Sánchez *et al.* 2014). Las bacterias solubilizadoras de fosfato (BSP) se destacan por su eficiencia en este proceso (Restrepo-Franco *et al.*, 2015).

2.2. Bacterias solubilizadoras de fosfatos

En respuesta a la baja disponibilidad de fósforo en el suelo, las plantas han desarrollado diversas estrategias morfológicas, bioquímicas y simbióticas para aumentar la obtención de fósforo y para mejorar su aprovechamiento interno (Vance *et al.* 2003; Lambers *et al.* 2006). Entre estas últimas, los microorganismos del suelo o de la rizósfera, que son participantes activos del ciclo del fósforo a través de procesos de mineralización, inmovilización y solubilización, vinculados con su metabolismo.

Entre los microorganismos más relevantes se encuentran las bacterias, específicamente las conocidas como bacterias solubilizadoras de fosfato (BSP). Sin embargo, también existen hongos, protozoos y algunos nemátodos que participan en el ciclo de P (Awasthi *et al.* 2011; Oberson y Joner 2005; Büneman *et al.* 2011; Jones y Oburguer 2011).

La capacidad de solubilizar fosfatos está ampliamente distribuida dentro de la taxonomía bacteriana (Patiño-Torres *et al.* 2014). De acuerdo con Loredó-Osti (2004) y Sánchez-López *et al.* (2014), las BSP que más se estudian pertenecen a los géneros: *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Beijerinckia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Erwinia*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter* y *Flavobacterium*.

Se ha reportado la presencia natural de BSP en diferentes condiciones ambientales, tipos de suelo, ecosistemas naturales, así como en sistemas de producción agrícola (Khan *et al.* 2009).

La solubilización del fosfato en el suelo es un proceso en que se revierten las reacciones de precipitación, liberando fósforo en la solución del suelo (Khan *et al.* 2009), la solubilización es mediada por acción metabólica de las BSP, así como por las raíces de las plantas (Paredes-Mendoza y Espinosa-Victoria 2010; Patel *et al.* 2008; Sashidar y Podile 2010; Hatfield *et al.* 2005; Yi *et al.* 2008; Esmaeli *et al.* 2008).

Entre los principales mecanismos que explican la solubilización microbiana de fosfato mineral destacan: la producción de ácidos orgánicos (resultado de la respiración oxidativa o de procesos fermentativos microbianos), la producción de protones (asociada a la asimilación de NH_4^+ y a procesos respiratorios), y la producción de ácidos inorgánicos y CO_2 .

Así, la acción de los ácidos orgánicos en la solubilización de fosfatos deriva en tres procesos (Antoun 2012; Chuang *et al.* 2007; Paredes-Mendoza y Espinosa-Victoria 2010; Archana *et al.*, 2012):

- I. La disociación de los ácidos orgánicos libera protones que contribuyen a reducir el pH del suelo y favorecen la disolución de los minerales de fosforo.
- II. Las reacciones de quelatación en las cuales los componentes aniónicos de los ácidos orgánicos se intercambian por el grupo ortofosfato de los fosfatos de Ca^{2+} , Fe^{3+} y Al^{3+} , liberándolo en la solución del suelo.
- III. El desplazamiento de los fosfatos adsorbidos no específicamente sobre las partículas sólidas del suelo, por los aniones de los ácidos orgánicos.

El número de grupos carboxilo de los ácidos orgánicos guarda relación directa con la capacidad solubilizadora, debido a que mayor número de grupos carboxilo significa mayor poder de quelatación o mayor número de protones liberados en la disociación. De esta forma el orden de efectividad solubilizadora es: ácidos tricarbónicos> dicarbónicos> monocarbónicos.

El ácido glucónico es uno de los ácidos orgánicos reportados con mayor frecuencia en estudios de solubilización. En 1986 Goldstein propuso la oxidación de la glucosa a ácido glucónico como mecanismo principal en la solubilización del fosfato mineral en bacterias gram negativas, lo cual fue confirmado en estudios posteriores (Sashidhar y Podile 2010). Otros ácidos orgánicos que se reportan como mediadores del proceso de solubilización son: ácido oxálico, cítrico, butírico, malónico, láctico, succínico, málico, glucónico, acético, glicólico, fumárico, adípico, indolacético y 2-cetoglucónico (Paredes-Mendoza y Espinosa-Victoria 2010).

Algunos microorganismos pueden solubilizar fosfatos insolubles sin producir ácidos orgánicos. Por lo que se ha propuesto que el mecanismo responsable de la solubilización es la producción de protones durante la asimilación del NH_4^+ o resultantes de las actividades respiratorias (Mullen 2005). Otro mecanismo propuesto para la solubilización de fosfato es la producción de exopolisacáridos; Yi *et al.* (2008) demostraron que la producción de estas sustancias por los aislados *Enterobacter* sp. EnHy-401, *Arthrobacter* sp. ArHy505 y *Azotobacter* sp. AzHy-510, confería a estos microorganismos mayor capacidad de solubilización de fosfatos en relación en la cepa *Enterobacter* sp. EnHy-402, la cual no produce exopolisacáridos.

La producción de ácidos inorgánicos también se menciona como mecanismo de solubilización de fosfato por microorganismos. Por ejemplo, se observó la producción de ácido nítrico y sulfúrico por *Thiobacillus* sp. durante la oxidación de compuestos nitrogenados o del azufre inorgánico, los cuales reaccionan con los fosfatos insolubles tornándolos biodisponibles (Yi *et al.*, 2008).

Se menciona que una introducción exitosa de BSP en sistemas productivos depende del establecimiento y persistencia de dichos microorganismos a lo largo del ciclo del cultivo. Para incrementar las posibilidades de una aplicación exitosa de BSP en campo, las cepas seleccionadas deben de presentar ciertas características como: motilidad, alta tasa de crecimiento, habilidad para sintetizar aminoácidos, capacidad de utilizar ácidos orgánicos y ciertas proteínas de superficie celular y gran adaptabilidad a las condiciones cambiantes del ambiente edáfico (Marschner 2007).

Las características del suelo también pueden afectar los resultados de la aplicación de BSP, entre los factores más importantes se encuentran el pH, salinidad y temperatura, especialmente en condiciones de estrés, determinan la estabilidad y el adecuado desempeño de las BSP (Sharan *et al.*, 2008). Así mismo, se debe considerar la ecología de la rizósfera en la que interactuarán BSP y las raíces de las plantas, ya que la efectividad de la inoculación también es afectada por la capacidad de las BSP para colonizar la rizósfera o raíz y mantener una actividad elevada (Patiño-Torres *et al.*, 2014). Es por esto que los estudios relacionados con la interacción de BSP-plantas son de gran importancia para lograr un mejor entendimiento de dicha interacción y eventualmente llegar a una aplicación exitosa en campo.

2.3. Nanotecnología

La Nanociencia es la disciplina que se ocupa del estudio de los materiales a escala nanométrica, es decir a una mil millonésima parte del metro. La nanotecnología son las técnicas que usan y aplican materiales a escala nano. Los nanomateriales (NMs) poseen al menos una cara con tamaño de 1 a 100 nm (Liu y Lal 2015).

Las características principales de los NMs son: elevada área superficial por volumen y alta reactividad, comparados con sus equivalentes materiales en masa (Zuverza-Mena *et al.* 2017). Estas características permiten la aplicación de NMs en diversas áreas y actualmente a nivel mundial más de 200 compañías investigan y desarrollan NMs. Por ejemplo, en biomedicina, donde los nano fármacos son de liberación controlada y de acción directa sobre el órgano objetivo. Así mismo, los NMs se encuentran presentes en la fabricación de nanosensores utilizados para monitorear los niveles de glucosa, hemoglobina o reconocimiento antígeno anticuerpo, por mencionar algunos ejemplos.

Los NMs y las Nanopartículas (NPs) poseen aplicaciones diversas, en el campo de la electrónica se han logrado avances tecnológicos trascendentales como el grafeno, un NM superconductor que posee resistencia y ligereza; en el área ambiental se han inventado nano filtros para la depuración de agua contaminada; en la industria alimenticia como: empaques que previenen daños por deterioro microbiano en alimentos, mejoradores de color y sabor, modificadores de la textura y sabor de los alimentos, detectores de alérgenos, mejoradores de la biodisponibilidad de vitaminas y minerales, entre otros (Chaudhry *et al.* 2008; Chen *et al.* 2006; Weiss *et al.* 2006; Klaine *et al.* 2008; Tiede *et al.* 2008; Gruere *et al.*, 2011).

Weiss *et al.* (2006) mencionan la trascendencia de la Nanotecnología en la agricultura para optimizar y mejorar la producción alimenticia. Con la introducción de NMs se pueden probar nuevas rutas en el desarrollo de plaguicidas (Scott and Chen 2003; Chaudhry *et al.* 2008), así como para la búsqueda y desarrollo de fuentes alternas de nutrientes en forma de nanopartículas de fósforo para los cultivos, como la hidroxiapatita (HAp).

Las nanopartículas de hidroxiapatita (NPHA) existen en formas que incluyen: nanoagujas, nanoalambres, nanobigotes y nanobarras de HAp. La HAp ha sido sintetizada en laboratorio por diversas metodologías: precipitación por hidrólisis (Kandori *et al.* 1997), el método gel (Kumar y Kalainathan 2008), método sol-gel (Kamiya *et al.* 1989), método hidrotermal (Liu *et al.* 1997) y mediante el uso homogéneo de soluciones de Ca/citrato/fosfato en la síntesis por el método de irradiación con microondas (López-Macipe *et al.* 1998; Liu *et al.* 2004; Kumar *et al.* 2010).

Las NPHA se aplican en la industria y la biomedicina, como catalizador, iones intercambiadores, sensores y biocerámicas (Ducheyne 1987; Mortier *et al.* 1989). Pero dada su composición ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$) y características las NPHA también son de interés en el campo agrícola, como posible sustituto de fertilizantes fosfatados a escala nanométrica o nanofertilizantes, haciendo más eficiente la fertilización, disminuyendo el desperdicio de insumos agrícolas y la consecuente eutrofización de los cuerpos de agua.

2.4. Nanofertilizantes

Las herramientas y técnicas modernas de la nanotecnología poseen el potencial para solucionar diversos problemas de la agricultura convencional y puede revolucionar este sector.

Por ejemplo, los fertilizantes encapsulados proveen de una lenta y sostenida liberación de nutrientes como una forma precisa de dosificación para las plantas (Duhan et al., 2017). A la fecha se han sintetizado NPs en diversos materiales (plata, óxido de zinc, dióxido de titanio, dióxido de manganeso, entre otros) que pueden ser usadas en la agricultura de precisión (Bansal et al., 2014).

En dosis apropiadas las NPs de plata mejoran el potencial, tiempo e índice de germinación de las semillas; así como el índice de vigor, el peso fresco y seco de plántulas (Duhan et al. 2017). Lo anterior debido al efecto antiséptico que provoca en algunos microorganismos que afectan la germinación.

Los nanorecubrimientos protegen la superficie de los fertilizantes, alargando su duración en el suelo (Santoso et al. 1995), la estabilidad de los nanorecubrimientos reduce la tasa de disolución de los fertilizantes y permite una lenta y sostenida liberación que se absorbe más eficientemente por las raíces de las plantas (Wu and Liu 2008). Los nanorecubrimientos pueden ser de azufre (Santoso et al. 1995), urea, fósforo, polímeros naturales o sintéticos y polímeros biodegradables (Subramanian and Tarafdar 2011), que protegen los compuestos y permiten controlar su disolución.

Algunos nanofertilizantes de nitrógeno de liberación prolongada se fabrican a partir de nano arcillas como las zeolitas, halositas, montmorillonitas y bentonitas (Sharmila 2010). Otro nano recubrimiento es el quitosano con ácido metacrílico (CS-PMAA por sus siglas en inglés) que forma NPs cargadas con N, P, K y que se caracterizan por ser estables en suspensión coloidal (Hasaneen *et al.*, 2014).

Los inoculantes son microorganismos benéficos como bacterias promotoras del crecimiento, bacterias solubilizadoras de fosfatos (*Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas* y *Bacillus*), algas verde azules y hongos arbusculares. Estos inoculantes suelen acompañarse de un recubrimiento polimérico, así como emulsiones agua-aceite, NPs de sílica hidrofóbica para preservar a los organismos de la desecación, cambios de temperatura y luz. Además, se ha probado el uso conjunto de NPs de oro o plata en combinación con inoculantes para promover el crecimiento de cultivos hortícolas del género *Fabaceae* (Wu *et al.* 2005; Jha and Prasad 2006; Vandergheynst *et al.* 2006, 2007; Dikshit *et al.* 2013; Shukla *et al.*, 2015).

También hay formulaciones de micronutrientes en tamaño nano que pueden ser aplicadas en forma de spray foliar o suministradas en el suelo para que las plantas los absorban por la raíz. Ejemplos de esto son NPs de: óxido de hierro, magnesio, manganeso y óxido de zinc (Alloway 2008; Peteu *et al.* 2010; Bakhtiari *et al.* 2015; Ghafariyan *et al.* 2013; Delfani *et al.* 2014; Pradhan *et al.* 2013; Mahajan *et al.* 2011). Estudios referentes a nanofertilizantes, son diversos no obstante, trabajos enfocados al estudio de NPHA como fuente de fósforo son escasos.

Kottegoda *et al.* (2011) sintetizaron NPHA por el método de síntesis húmeda, recubrieron la superficie con urea para después colocarlas a presión en las micro/nano cavidades del tallo joven de una planta *Glyricidia sepium* (Jacq.). Finalmente se secó y se le dio forma de esfera. El procedimiento mostró baja y sostenida liberación de N a tres valores de pH y redujo los efectos adversos sobre el ambiente debido a que incrementó el uso eficiente del N y previno el desperdicio y pérdida por lixiviación comparado con fertilizantes solubles convencionales.

Liu y Lal (2014) aplicaron NPHA como fertilizante fosfatado a plantas de soya (*Glycine max*) en condiciones de invernadero. Los autores reportaron incrementos significativos en la tasa de crecimiento (32.6%) y rendimiento (20.4%) de cultivo en comparación con fertilizantes solubles como el SFT ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$).

Adicionalmente, la aplicación de las NPHA presentó mayor estabilidad y duración en la liberación de fósforo en comparación con fertilizantes solubles. Esto se debe a que las NPHA se retuvieron por un largo periodo en los poros medios del suelo, liberando cantidades pequeñas pero constantes de fósforo.

Gunaratne *et al.* (2016) compararon los patrones de consumo de fósforo por plantas de *Festuca arundinacea*, demostrando que la solubilidad del fósforo es mayor cuando es aplicado en forma de NPHA. Entre mayor cantidad de NPHA se aplicó mayor fue la solubilización de fósforo y por ende mayor la cantidad que se absorbió de este elemento. El incremento en la solubilización de fósforo, se explicó por la elevada área superficial que tienen las NPHA.

Montalvo y McLaughlin (2015) realizaron dos experimentos, en el primero se evaluó el transporte en columna y en el segundo el consumo de fósforo en trigo (*Triticum aestivum*) a partir de NPHA, HAp a granel y fertilizante comercial (superfosfato triple, SFT) en diferentes tipos de suelo (Andosol y Oxisol). Se basaron en la hipótesis de que las NPs pueden moverse en el suelo y alcanzar las raíces de las plantas mediante el flujo de masas de la solución del suelo a las raíces, causado por la succión que hace la raíz. Evaluaron la disponibilidad del fósforo mediante dilución del isótopo ^{33}P en invernadero.

La aplicación de las NPHA a suelos con alta capacidad de retención tuvo mayor efecto sobre la producción de materia seca de vástago y consumo de fósforo que la HAp a granel, aunque menos que el SFT. Encontraron que la contribución al consumo de fósforo fue proporcional a la magnitud de su disolución. Estudios previos (Klain *et al.* 2008; Jang *et al.* 2003) probaron que las plantas son capaces de absorber NPs a través del sistema de raíces; sin embargo, el mecanismo exacto de absorción de fosfatos no se comprende del todo (De Rosa *et al.* 2010).

Con base en lo anteriormente mencionado, apremia encontrar una solución a la creciente deficiencia de fósforo disponible para la agricultura, base del sustento de la humanidad. Por lo que se sugiere abordar este reto mediante el aprovechamiento de las ventajas de las BSP (capacidad para solubilizar fosfatos) y los Nanofertilizantes (elevada superficie específica por unidad de volumen).

Así, el propósito de este trabajo es estudiar la interacción BSP-NPHA en planta de lechuga, como alternativa para incrementar la disponibilidad y absorción de fósforo en lechuga. Esta planta posee un ciclo de vida corto y en consecuencia, los efectos de los tratamientos que se apliquen podrán verificarse al término de su ciclo de vida.

III. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la interacción BSP-NPHA como medio para incrementar la absorción de fósforo en lechuga

IV. HIPÓTESIS GENERAL

La interacción BSP-NPHA incrementa la absorción de fósforo en lechuga.

V. FASES DE LA INVESTIGACIÓN

La investigación se dividió en tres fases experimentales que se enfocaron a lograr los objetivos particulares que se mencionan más adelante.

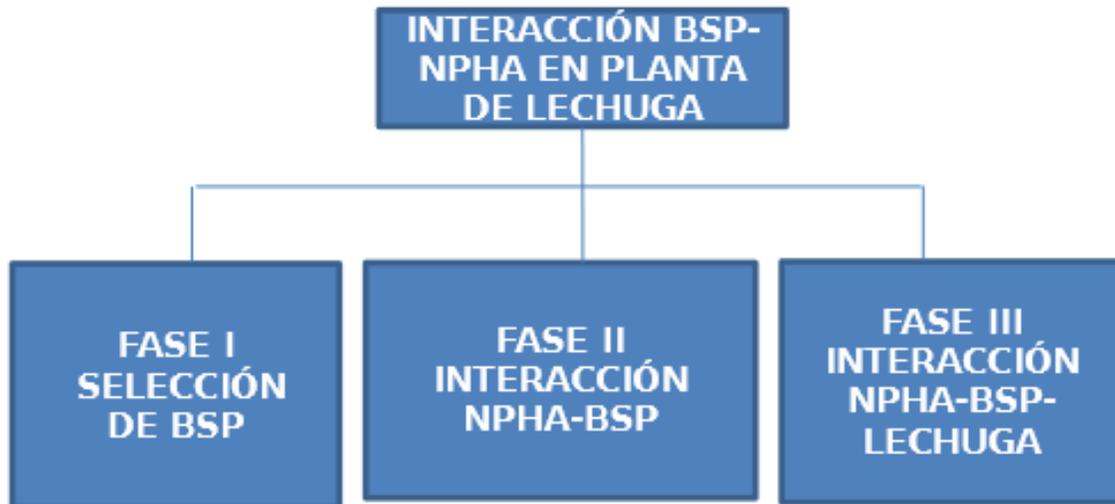


Figura 1. Esquema de las fases experimentales en las que se divide el proyecto de investigación

REFERENCIAS CITADAS

Adhikari, A.R., Adhikari, K.R., Regmi, A.P., McDonald, A. 2014. Estimation of Native Nutrient Supplying Capacity of Soil for Improving Wheat (*Triticum Aestivum* L.) Productivity in Chitwan Valley, Nepal. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*. 2(4): 478-482.

Alloway B.J. 2008. Micronutrients and crop production: an introduction. In: Alloway B.J., editor. *Micronutrient Deficiencies in Global Crop Production*. Springer. 1–39.

- Antoun, H. 2012. Beneficial microorganisms for the sustainable use of phosphates in agriculture. In: *Procedia Engineering*. 46: 62 – 67.
- Arai, Y., Sparks, D. 2007. Phosphate reaction dynamics in soils and soil components: a multiscale approach. In: *Advances in Agronomy*. 94: 135-179.
- Archana, G.; Buch, A., Kumar, N. 2012. Pivotal Role of Organic Acid Secretion by Rhizobacteria in Plant Growth Promotion. In: *Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology*. 35-53.
- Awasthi, R.; Tewari, R., Nayyar, H. 2011. Synergy between plants and P-solubilizing microbes in soils: effects on growth and physiology of crops. In: Bakhtiari *et al.* 2015. *International Research Journal of Microbiology*. 2(12): 484-503.
- Bakhtiari, M., Moaveni, P., Sani, B. 2015. The effect of iron nanoparticles spraying time and concentration on wheat. *Biological Forum International Journal of Interpretation And Translation* 7:679–683.
- Bansal, P., Duhan, J.S., Gahlawat, S.K. 2014. Biogenesis of nanoparticles: a review. *African Journal of Biotechnology*. 13: 2778–2785.
- Bashan, Y., Kamnev, A.A., De Bashan, L.E. 2013. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biology and Fertility soils*. 49(4): 465-479.
- Behera, B.C., Singdevsachan, S.K., Mishra, R.R., Dutta, S.K., Thatoi, H.N. 2014. Diversity, mechanism, and biotechnology of solubilizing microorganism in mangrove. A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 3: 97-110.

- Bünemann, Else; Prusisz, B., Ehlers, K. 2011. Characterization of phosphorus forms in soil microorganisms. In: Phosphorus in Action. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 37-57.
- Chen, Y.P., Rekha, P.D., Arunshen, A.B., Lai, W.A., Young, C.C. 2006 Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Applied Soil Ecology 34:33–41.
- Chuang, C.C., Kuo, Y.L.; Chao, C.C., Chao, W.L. 2007 Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. In: Biology Fertility Soils. 43: 575-584.
- Cordell, D. 2009. The story of phosphorus: missing global governance of a critical resource. Sense Earth Systems Governance. 1-25.
- Delfani, M., Firouzabadi, M.B., Farrokhi, N., Makarian, H. 2014. Some physiological responses of black-eyed pea to iron and magnesium nanofertilizers. Communications Soil Science Plant Analysis. 45:530–540.
- Dikshit, A., Shukla, S.K., Mishra, R.K. 2013. Lap Lambert Academic Publishing; Germany. Exploring Nanomaterials with PGPR in Current Agricultural Scenario.
- Duhan, J.S., Kumar, R., Kumar, N., Kaur, P., Nehra, K., Duhan, S. 2017. Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture. Biotechnology Reports. 15: 11-23.
- Ghafariyan, M.H., Malakouti, M.J., Dadpour, M.R., Stroeve, P., Mahmoudi, M. 2013. Effects of magnetite nanoparticles on soybean chlorophyll. Environmental Science and Technology. 47:10645–10652.
- Gunaratne, G.P., Kottegoda, N., Madusanka, N., Munaweera, I., Sandaruwan, C., Priyadarshana, W.M.G.I., Siriwardhana, A., Madhushanka, B.A.D., Rathnayake, U.A., Karunaratne, V., 2016. Two new plant nutrient nanocomposites based on

urea coated hydroxyapatite: efficacy and plant uptake. *Indian Journal of Agricultural Science*. 86.

Hasaneen, M.N.A., Abdel-Aziz, H.M.M., El-Bialy, D.M.A., Omer, A.M. 2014. Preparation of chitosan nanoparticles for loading with NPK fertilizer. *African Journal of Biotechnology*. 13:3158–3164.

Illmer, P., Schinner, F. 1995. Solubilization of inorganic calcium-phosphates- solubilization mechanisms. *Soil Biology Biochemistry*. 27: 257-263

Jones, D., Oburger, E. 2011. Solubilization of phosphorus by soil microorganism. In: *Phosphorus in Action*. Springer Verlag Berlin Heidelberg. 26: 169–198.

Karunaratne, V., Kottegoda, N., De Alwis, A., 2012. Nanotechnology in a world out of balance. *Journal of the Natural. Science. Foundation of Sri Lanka*. 40(6).

Khan, M.S.; Zaidi, A., Wani, P. 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture – a review. In: *Agronomy for Sustainable Development*. 27: 29-43.

Khan, M.S.; Zaidi, A.; Ahemad, M.; Oves, M., Ahmad, P. 2010. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective. In: *Arch Agron Soil Scien*. 56(1): 73–98.

Klaine, S.J., Alvarez, P.J., Batley, G.E., Fernandes, T.F., Handy, R.D., Lyon, D.Y., Mahendra, S., McLaughlin, M.J., Lead, J.R., 2008. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 27: 1825-1851

- Kottegoda, N., Munaweera, I., Madusanka, N., Karunaratne, V., 2011. A green slow-release fertilizer composition based on urea-modified hydroxyapatite nanoparticles encapsulated wood. *Current Science India*. 101(6).
- Lambers, Hans; Shane, Michael W.; Cramer, Michael D.; Pearse, Stuart J. and Veneklaas, Erik J. 2006. Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits. In: *Annals of Botany*. 98: 693-713.
- Madusanka, N., sandarruwN, C., Kottegoda, N., Sirisena, D., Munaweera, I., De Alwis, A., Kunaratne, V., Amaratunga, G.A.J. 2017. Urea-hydroxyapatite-montmorillonite nanohybrid composites as slow release nitrogen compositions. *Applied Clay Science*. 150: 303-308.
- Mahajan, P., Dhoke, S.K., Khanna, A.S. 2011. Effect of nano-ZnO particle suspension on growth of mung (*Vigna radiata*) and gram (*Cicer arietinum*) seedlings using plant agar method. *Journal of Nanotechnology*. 7:1-7.
- Marschner, P. 2007. Plant-microbe interactions in the rhizosphere and nutrient cycling. In: *Nutrient cycling in terrestrial ecosystems*. Springer-Verlag, Berlin. 159- 181.
- Minemakers Limited. 2008. Rock phosphate price rockets to US\$200/tonne, ASX and Press Release Perth.
- Montalvo, D, McLaughlin, M.J. 2015. Efficacy of Hydroxyapatite nanoparticles as Phosphorus fertilizer in andosols and oxisols. *Soil fertility and plant nutrition*. 551-558.
- Mortier, A., Lemaitre, J., Rodrique, L., Rouxhet, P.G. 1989. Synthesis and thermal behavior of well-crystallized calcium-deficient phosphate apatite. *Journal of Solid State Chemistry*. 78(2): 215-219.

- Mullen, M. 2005. Phosphorus in soils: biological interactions. In: Encyclopedia of Soils in the Environment, Vol.3. Academic Press, Elsevier, Ltd, Oxford. 210-215.
- Nannipieri, P., Smalla, K. 2006. Nucleic acids and proteins in soil. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 468p.
- Oberson, A., Joner, E. 2005. Microbial turnover of phosphorus in soil. In: Organic phosphorus in the environment. CAB International. 133-160.
- Paredes-Mendoza, M., Espinosa, V. 2010. Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. In: Terra Latinoamericana. 28(1): 61-70.
- Patel, D., Archana, G., Kumar, N. 2008. Variation in the nature of organic acid secretion and mineral phosphate solubilization by *Citrobacter* sp. DHRSS in the presence of different sugars. In: Current Microbiology. 56: 168–174.
- Patiño-Torres, C.O., Sanclemente-Reyes, O.E. 2014. Los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF): una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible. Universidad Libre Cali, Colombia. Entramado, 10 (2): 288-297.
- Peteu, S.F., Oancea, F., Siciua, O.A., Constantinescu, F., Dinu, S. 2010. Responsive polymers for crop protection. Polymer. 2: 229–251.
- Pradhan S., Patra P., Das S., Chandra S., Mitra S., Dey K.K. 2013. Photochemical modulation of biosafe manganese nanoparticles on *Vigna radiata*: a detailed molecular biochemical, and biophysical study. Environmental Science and Technology. 47:13122–13131.

- Rai, M., Ingle, A. 2012. Role of nanotechnology in agriculture with special reference to management of insect pests. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 94(2): 287-293.
- Rajkumar, M., Ae, N., Freitas, H. 2009. Endophytic bacteria and their potential to enhance heavy metal phytoextraction. *Chemosphere*. 77(2): 153-160.
- Restrepo-Franco, G.M., Marulanda-Moreno, S., de la Fe-Pérez, Y., Díaz-de la Osa, A., Lucia-Baldani, V., Hernández-Rodríguez, A. 2015. Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*. 46(1):63-76.
- Rodríguez, H.; Fraga, R., Bashan, Y. 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. In: *Plant Soil*. 56(3): 492-504.
- Rodríguez, H., Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. In: *Biotechnol. Adv.* 17: 319–339.
- Sánchez-López, D.B., García-Hoyos, A.M., Romero-Perdomo, F.A., Bonilla-Buitrago, R.R. 2014. Efecto de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal solubilizadoras de fosfato en *Lactuca sativa* cultivar White Boston. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 16(2): 122-128.
- Santoso, D., Lefroy, R.D.B, Blair, G.J. 1995. Sulfur and phosphorus dynamics in acid soil/crop system. *Australian Journal of Soil Research*. 33(1): 113-124.
- Sashidhar, B., Podile, A.R. 2010. Mineral phosphate solubilization by rhizosphere bacteria and scope for manipulation of the direct oxidation pathway involving glucose dehydrogenase. In: *J Appl Microbiol.* 109: 1–12.

- Scott, N.R., Chen, H. 2003 Nanoscale science and engineering or agriculture and food systems. In: Roadmap Report of National Planning Workshop. Washington DC, Nov 2002:18–19.
- Sharan, A., Shikha, D., N.S., Gaur, R. 2008. *Xanthomonas campestris*, a novel stress tolerant, phosphate-solubilizing bacterial strain from saline–alkali soils. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 24(6): 753-759.
- Sharma, N.C., Sahi, S.V. 2011. Enhanced Organic Phosphorus Assimilation Promoting Biomass and Shoot P Hyperaccumulations in *Lolium multiflorum* Grown under Sterile Conditions. Environmental Science and Technology. 45(24): 10531-10537.
- Sharmila, R.C. 2010. Tamil Nadu Agricultural University; Coimbatore, Tamil Nadu, India: Nutrient Release Pattern of Nano-Fertilizer Formulations. (Ph.D. Thesis).
- Shukla, S.K., Kumar, R., Mishra, R.K., Pandey, A., Pathak, A., Zaidi, M., Srivastava, S.K., Dikshit, A. 2015. Prediction and validation of gold nanoparticles (GNPs) on plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A step toward development of nano-biofertilizers. Nano Reviews. 4:439–448.
- Smil, V. 2000. Phosphorus in the environment: Natural flows and human interferences. Annual Review of Energy and the Environment. 25: 53-88.
- Smit, A.L., Bindraban, J.J., Schröder, J.G., Conijn, J.G., van der Meer, H.G. 2009. Phosphorus in agriculture: global resources, trends and developments. Report to the Steering committee technology assessment of the ministry of agriculture, nature and food quality, the Netherlands and in collaboration with the nutrient flow task group (NFTG), supported by DPRN (Development Policy Review Network). 42p.

- Subramanian, K.S., Tarafdar, J.C. 2011. Prospects of nanotechnology in Indian farming. Indian Journal of Agricultural Science. 81:887–893.
- Thompson, L.M. y Troeh, F.R. 2002. Los suelos y su fertilidad. Ed Reverté. S.A. 4ta edición Barcelona. 657p.
- Tiede, K., Boxall, A.B., Tear, S.P., Lewis, J., David, H., Hasselov, M. 2008. Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and environment. Food additives and contaminants. Part A. 25(7): 795-821.
- United Nations. 2013. World population ageing 2013. Department of economic and social affairs population division. New York. 114p.
- Van Kowenberg, S.J. 2010. World phosphate rock reserves and resources. International Fertilizer Development Center (IFDC). 60p.
- Vance, C.; Uhde–Stone, C., Allan, D. 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants securing a nonrenewable resource. In: New Phytologist. 157: p. 423–447.
- Vandergheynst, J.S., Scher, H., Hong-Yun, G. 2006. Design of formulations for improved biological control agent viability and sequestration during storage. Indian Biotechnology. 2: 213–219.
- Vandergheynst, J.S., Scher, H.B., Gou, H.Y., Schultz, D.L. 2007. Water in oil emulsions that improve the storage and delivery of the biolarvacide *Lagenidium giganteum*. Biological Control. 52:207–229.
- Weiss, J., Takhistov, P., McClements, D.J. 2006. Functional materials in food Nanotechnology. Journal of Food Science. 71(9): 107-116.

- Wendling, L.A., Blomberg, P., Sarlin, T., Priha, O., Arnold, M. 2013. Phosphorus sorption and recovery using mineral-based materials: Sorption mechanisms and potential phytoavailability. *Applied Geochemistry*. 37: 157-169.
- Wu, S.C., Cao, Z.H., Li, Z.G., Cheung, K.C., Wong, M.H. 2005. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma*. 125:155–166.
- Yi Y, Huang W and Ge Y. 2008. Exopolysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24:1059-65.
- YI, Y.; Huang, W., Ying, G.E.2008. Exopolysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. In: *World J. Microbiol. Biotechnol.* 1059- 1065.
- Zuverza-Mena, N., Martínez-Fernandez, D., Du, W., Hernandez-Viezcas, J.A., Bonilla-Bird, N., Lopez-Moreno, M.L., Komarek, M, Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L. 2017 *Exposure of engineered nanomaterials to plants: Insights into the physiological and biochemical responses-A review*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 1-29.

CAPÍTULO I. SELECCIÓN DE BACTERIAS CON CAPACIDAD PARA SOLUBILIZAR FOSFATOS

1.1. INTRODUCCIÓN

Las plantas y los organismos del suelo toman el fósforo que necesitan de la solución del suelo en forma de aniones fosfato ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ y HPO_4^{-2} ; Devau *et al.* 2009; Vitousek *et al.* 2010). Por lo que no pueden aprovechar el fósforo que se encuentra en minerales insolubles para nutrirse. Sin embargo, hay numerosos procesos químicos y bioquímicos por los cuales se modifica la disponibilidad de este elemento.

En los ecosistemas hay una amplia gama de microorganismos promotores del crecimiento vegetal (MPCV), que habitan en el suelo y disponen de gran diversidad de adaptaciones metabólicas que les permiten sobrevivir en ambientes adversos y deficientes en nutrientes. Uno de los grupos de microorganismos más importantes son las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), también llamadas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV).

Las RPCV además de solubilizar fosfatos de fuentes insolubles, mejoran la resistencia al estrés de las plantas, dan estabilidad a los agregados del suelo al mejorar su estructura y contenido de materia orgánica. También retienen nitrógeno orgánico del suelo y otros nutrientes en el sistema suelo-planta, lo cual reduce los requerimientos de fertilización de nitrógeno y fósforo, mejorando la liberación de nutrientes (Hayat *et al.*, 2010).

Una aplicación práctica de las RPCV puede ser en el desarrollo de sistemas sustentables (Schippers *et al.* 1995), ya que estos organismos pueden contribuir en tres formas (Glick 1995, 2001): sintetizan compuestos específicos para las plantas (Dobbelaere *et al.* 2003; Zahir *et al.* 2004), facilitan el consumo de ciertos nutrientes del suelo (Lucas *et al.* 2004), disminuyen y previenen enfermedades en las plantas.

Por la relación que mantienen con las plantas las RPCV se dividen en dos grupos:

- 1) bacterias simbióticas que colonizan las raíces de las plantas y forman estructuras llamadas nódulos, ejemplo de estos microorganismos son las bacterias fijadoras de nitrógeno como *Rhizobium* sp.
- 2) bacterias de vida libre no simbióticas que habitan en la rizósfera como las BSP o rizobacterias solubilizadoras de fósforo (RSP), ejemplo de estas son *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Pseudomonas* y probablemente muchas otras que aún no se identifican (Kennedy *et al.* 2004; Khan 2005; Awasthi *et al.* 2011; Oberson y Joner 2005; Büneman *et al.* 2011; Jones y Oburguer 2010).

La solubilización de fósforo es un proceso complejo que las BSP pueden realizar mediante diversos mecanismos, como la acidificación del suelo, por la producción de H^+ que pueden ser producto de la respiración, asimilación de NH_4^+ , por la producción de ácidos orgánicos; producción de sideróforos, entre otros; aunque también puede ser causada por la producción de exopolisacáridos. La solubilización derivada de fuentes insolubles como minerales fosfatados en agua destilada, tiende a decrecer con el incremento de pH y suele disminuir en el siguiente orden: fosfato tetracálcico > fosfato tricálcico > HAp (Klein *et al.*, 1990).

El medio NBRIP (Instituto Nacional de Botánica de investigación del Fósforo, por sus siglas en inglés) es uno de los mejores para la selección de BSP, ya que en un estudio, el ensayo en caldo demostró ser tres veces más eficiente en comparación con el medio Picovskaya (Nautiyal 1999). El medio NBRIP tiene como fuente insoluble de fósforo el fosfato tricálcico (FTC: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), La solubilidad del FTC en agua a pH neutro es baja (2.07×10^{-33}), aunque al disminuirse el pH del medio puede solubilizarse, justo como hacen las BSP para crecer y reproducirse en este medio carente de fósforo soluble.

Dentro de las principales características de una BSP se encuentran la disminución del pH en su medio y la liberación de altas concentraciones de fósforo soluble, por lo que son características indispensables que deberán reunir las cepas que se seleccionen para la fase siguiente. Solo aquellos microorganismos que tengan la capacidad de acidificar el medio (disminuir el pH), podrán solubilizar el FTC e incrementar la concentración de fósforo soluble en el medio de cultivo.

Dada la importancia de las BSP en la disponibilidad del fósforo en la rizósfera, es de primordial importancia realizar una cuidadosa selección de las cepas bacterianas que tengan mayor capacidad de solubilización de compuestos fosforados insolubles, para obtener un inóculo idóneo que pueda evaluarse ante diferentes compuestos y minerales poco solubles como el FTC, la hidroxiapatita (HAP: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), la roca fosfórica (RF) y materiales de nueva generación como las nanopartículas. Con base en lo antes mencionado se realizará la selección de BSP con mayor capacidad de solubilización para su posterior evaluación con NPHA.

1.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

Seleccionar las BSP que solubilicen la mayor concentración de fósforo en el medio de cultivo.

1.3. HIPÓTESIS ESPECÍFICA

Las BSP que solubilizan altas concentraciones de fósforo, disminuyen el pH de su medio de cultivo.

1.4. MATERIALES Y MÉTODOS

1.4.1. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas que se usaron en este proyecto se obtuvieron del banco de germoplasma del laboratorio de Microbiología Ambiental del Programa en Edafología, en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Dichas cepas se aislaron y purificaron de la rizósfera de plantas de vainilla. Cada cepa se reactivó en agar nutritivo a 30 °C en condiciones de oscuridad por una semana.

1.4.2. Prueba cualitativa de solubilización de fósforo

El primer paso de la selección consistió en la evaluación cualitativa (el criterio de selección fue la formación visible del halo de solubilización) de la capacidad de solubilización de fósforo de 43 cepas bacterianas. Para este propósito se usó el medio de cultivo NBRIP con la adición de agar-agar (15 g L⁻¹ de agua destilada).

La composición del medio de cultivo NBRIP por litro de agua destilada fue la siguiente: 10 g de glucosa, 5 g de Ca₃(PO₄)₂, 5 g de MgCl₂ 6H₂O, 0.25 g MgSO₄ 7H₂O,

0.2 g de KCl y 0.1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Tres colonias individuales se tomaron de una placa con cepas activas y se suspendieron en 500 μL de solución NaCl 0.85% estéril. Una alícuota de 10 μL de esta solución se inoculó en medio de cultivo NBRIP. Las placas inoculadas se incubaron por 15 días a 30 °C en oscuridad. Diariamente se determinó la presencia o ausencia de halo de solubilización.

Las cepas bacterianas que solubilizaron fósforo (aquellas en las que fue visible la formación del halo de solubilización) en el medio NBRIP sólido se eligieron para la siguiente etapa de selección que consistió en la evaluación cuantitativa de solubilización de fósforo.

1.4.3. Prueba cuantitativa de solubilización de fósforo

Las 12 cepas bacterianas seleccionadas en la fase cualitativa se cultivaron por 24 h en caldo nutritivo estéril, manteniéndolas a 30 °C en oscuridad con agitación constante (120 rpm). Enseguida, la absorbancia del cultivo bacteriano líquido se ajustó a un valor 1 a 600 nm (equivalente a 1×10^6 UFC) en un espectrofotómetro UV-Visible (Cary 50 marca Varian). Posteriormente se tomaron 50 μL de este cultivo y se inocularon en 10 mL de medio líquido NBRIP. La composición del medio de cultivo es la misma que se menciona en la sección anterior (prueba cualitativa) pero sin la adición de agar. Los cultivos se mantuvieron en oscuridad a 30 °C con agitación constante (120 rpm) durante 20 días.

Para estudiar la cinética de la solubilización de fósforo se realizaron tres evaluaciones: a los 5, 10 y 20 días de incubación (di). Estas evaluaciones fueron hechas en medio de cultivo libre de fósforo (MCLP) y de células (MCLPC).

El MCLP se obtuvo mediante filtración del cultivo con papel Whatman no. 40; mientras que para el MCLPC el cultivo bacteriano se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min y se analizó el sobrenadante. Cada cepa bacteriana se evaluó por triplicado, además se incluyó un testigo (sin adición de inóculo bacteriano). A continuación se detallan las variables que se evaluaron:

Biomasa bacteriana. Esta variable se determinó indirectamente midiendo la absorbancia a 600 nm de una alícuota de 2 mL del MCLP en un espectrofotómetro UV-Visible (Cary 50 marca Varian).

Concentración de fósforo soluble. Se realizó en el MCLPC con el método colorimétrico azul de molibdeno o método del ácido ascórbico, propuesto por Murphy y Riley (1962). En breve, se tomó una alícuota de 2 mL de MCLPC y se preparó de acuerdo a la metodología mencionada para desarrollar color azul; enseguida se determinó la absorbancia de la muestra en un espectrofotómetro UV-Visible a 880 nm. La concentración de fósforo en el MCLPC se calculó con base en el valor de la lectura y en relación a la curva patrón de concentración de fósforo.

pH. El pH se midió en el MCLPC con un potenciómetro digital modelo 701 A marca Orion Research, previamente calibrado y a una temperatura ambiente no menor a 20 °C.

Conductividad eléctrica (CE). La CE del MCLPC se midió en un puente de conductividad modelo CL35 marca Conductronic, que se calibró previamente con solución de KCl 0.1 M a temperatura ambiente no menor a 20 °C.

Concentración de calcio soluble. La concentración de calcio soluble se determinó por absorción atómica (McKean 1993) y con base en la curva patrón de calcio.

Se prepararon diluciones 1 a 10 de MCLPC incluyendo 1 mL de solución de LaCl_3 (5% en HCl 6 M), para eliminar las interferencias químicas. Las muestras se analizaron en un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin Elmer modelo 3110) con una flama de aire-acetileno a una longitud de onda de 422.7 nm.

1.4.4. Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se realizó con base en un diseño experimental factorial completamente al azar (Factorial DECA). Los factores que se evaluaron fueron: cepa de BSP y tiempo de incubación. Las categorías de factor fueron respectivamente: 12 cepas bacterianas y tres tiempos de evaluación: 5, 10 y 20 días de incubación (di). Durante el experimento, la evaluación de cada variable se realizó con tres repeticiones.

Los datos que se obtuvieron del experimento se procesaron en el programa estadístico R (versión 3.4.2). Se verificó el cumplimiento de los supuestos de independencia (se garantizó al aleatorizar las unidades experimentales), normalidad (se aplicó la prueba de Shapiro Wilk) y homogeneidad de varianzas (se verificó con gráfica de residuales contra predichos).

Posteriormente se efectuó un análisis de varianza (ANDEVA) y prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha=0.05$) cuando las diferencias entre tratamientos fueron significativas. Adicionalmente, se realizó la prueba de correlaciones de Pearson.

1.5. RESULTADOS

1.5.1. Prueba cualitativa de solubilización de fósforo

De las 43 cepas bacterianas que se evaluaron en placa sólida, 18 presentaron halo de solubilización de fósforo (Cuadro 2).

Cuadro 2. Listado de bacterias que mostraron presencia o ausencia de halo de solubilización de fósforo.

Presencia de halo de solubilización (diámetro en cm)	Ausencia de halo de solubilización
Cepa CP-8 (2.3)	Cepa CP-4
Cepa CP-11 (1.7)	Cepa CP-2
Cepa CP-13 (0.7)	Cepa CP-3
Cepa CP-14 (2.5)	Cepa CP-4-18
Cepa CP-17 (2.1)	Cepa CP-5'
Cepa CP-21 (0.8)	Cepa CP-10
Cepa CP-24-1 (0.9)	Cepa CP-12
Cepa CP-25 (0.7)	Cepa CP-24
Cepa CP-26 (0.7)	Cepa CP-15
Cepa CP-27 (1.3)	Cepa CP-16
Cepa CP-29-1 (0.7)	Cepa CP-20
Cepa CP-30 (1.3)	Cepa CP-22
Cepa CP-31 (2.5)	Cepa CP-42
Cepa CP-34 (1.1)	Cepa CP-46
Cepa CP-36 (2.1)	Cepa CP-29-1
Cepa CP-38-1 (0.7)	Cepa CP-39
Cepa CP-47 (1.3)	Cepa CP-4J
Cepa CP-50 (1.1)	Cepa CP-18
	Cepa CP-23
	Cepa CP-32'
	Cepa CP-40'
	Cepa CP-41
	Cepa CP-48
	Cepa CP-49
	Cepa CP-37

1.5.2. Prueba cuantitativa de solubilización de fósforo

1.5.3. Biomasa bacteriana

La Figura 2 muestra la biomasa bacteriana de las 12 cepas a los 5, 10 y 20 di. Se observaron diferencias significativas y se distinguieron tres grupos (5di). El primero (CP-11, CP-13, CP-29-1 y CP-47) caracterizado por valores altos ($A = 0.3915 - 0.4301$).

El segundo grupo presentó valores medios de biomasa (0.2693 a 0.3282): CP-17, CP-26, CP-31, CP-36, CP-38-1. Mientras en el tercer grupo, se observaron las bacterias con valores bajos de biomasa (0.2300 a 0.2516): CP-21, CP-27 y CP-30.

En la Figura 2b se muestra la absorbancia, de las cepas bacterianas que se evaluaron, con valores semejantes entre cepas, donde la mayor y menor absorbancia fueron la CP-36 y CP 21 (0.42 y 0.21) respectivamente, en el segundo muestreo (10 di). A los 20 di se observaron diferencias significativas entre cepas bacterianas. La cepa CP-29-1 se caracterizó por tener la absorbancia más alta (0.3297), más del doble de CP-21, la cepa que registró la menor biomasa (0.1573) (Figura 2c).

La Figura 3 muestra la evolución de la biomasa de cada cepa bacteriana durante la cinética de crecimiento. Las cepas CP-11, CP-13, CP-36 y CP-47 mostraron diferencias significativas en la absorbancia, el resto no presentaron diferencias. Las bacterias CP-11, CP-13 y CP-47 tuvieron mayor absorbancia al inicio (5 di), posteriormente disminuyó. La cepa CP-36 tuvo su mayor absorbancia a los 10 di.

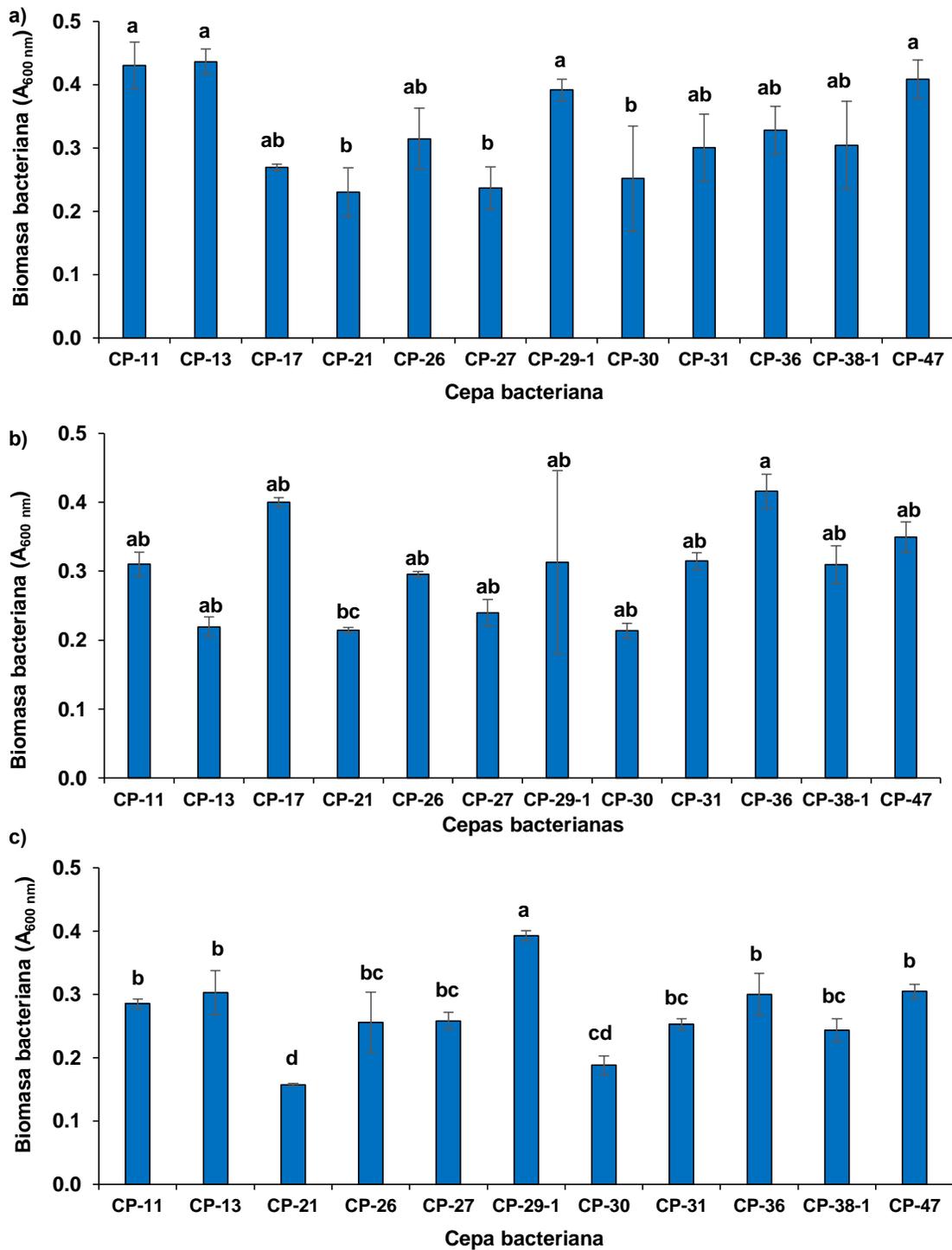


Figura 2. Absorbancia de cultivo de 12 cepas bacterianas a los 5 días de incubación (di) (a), 10 di (b) y 20 di (c). Las barras representan el promedio y la desviación estándar (n=3). Diferentes letras muestran diferencias significativas entre bacterias (Tukey $\alpha = 0.05$).

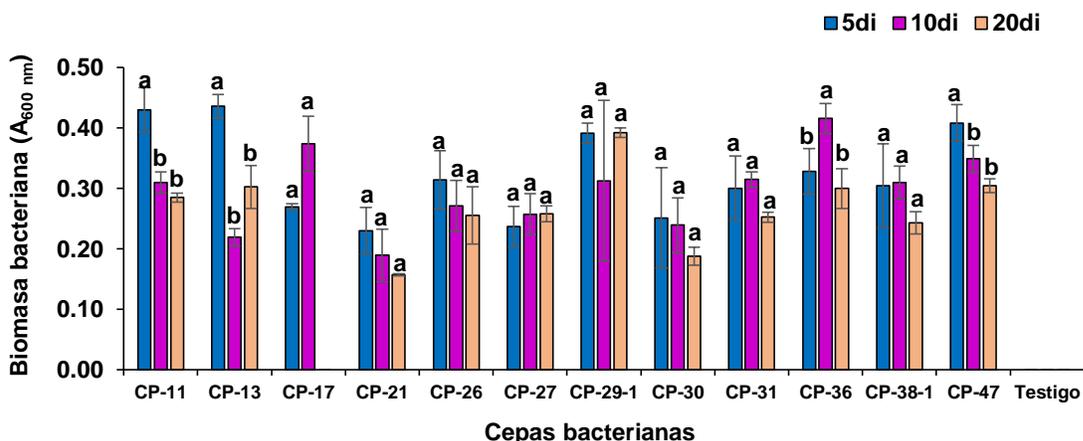


Figura 3. Absorbancia de cultivo de 12 cepas bacterianas en tres fechas de evaluación durante la cinética de solubilización de fósforo.

Las barras representan el promedio y la desviación estándar (n=3). Las letras muestran diferencias significativas en la biomasa que produjo cada bacteria en las tres fechas de evaluación (Tukey $\alpha = 0.05$).

1.5.4. Concentración de fósforo soluble

En la Figura 4 se observa la concentración de fósforo soluble de las cepas que se evaluaron en la etapa cuantitativa. Dicha concentración aumentó desde 103 mg L⁻¹ (CP-29-1) en la concentración más baja a los 5 di hasta 536 mg L⁻¹ a los 20 di, en la cepa que solubilizó la mayor concentración de fósforo soluble (CP-31) durante la cinética.

A los 5 di, la menor y mayor concentración de fósforo soluble fueron respectivamente: 103 mg L⁻¹ (CP-29-1) y 362 mg L⁻¹(CP-31), correspondientes a 10.3 y 36.2% de fósforo inicial (insoluble) del medio de cultivo. La concentración promedio fue de 210 mg L⁻¹ (21%). La cepa CP-31 observó la mayor capacidad de solubilización de fósforo ($\alpha = 0.05$) y las cepas CP-17, CP-21. CP-26, CP-27 y CP-29-1 la menor capacidad de solubilización (Figura 4a).

A los 10 di la concentración de fósforo soluble se incrementó respecto a la evaluación anterior (5 di), se ubicó entre 181 mg L⁻¹ (CP-38-1) y 471 mg L⁻¹(CP-27). Equivalentes a 18.1% y 47.1% de fósforo solubilizado (Figura 4b). Hubo diferencias significativas entre cepas y se apreciaron tendencias semejantes a la evaluación anterior.

En la última evaluación a los 20 di, la concentración de fósforo soluble en el medio de cultivo se incrementó nuevamente y varió entre 244 mg L⁻¹ y 536 mg L⁻¹ (Figura 4c), lo cual correspondió a 24.4% y 53.6% de fósforo solubilizado, respectivamente. La cepa bacteriana que solubilizó más fósforo fue la cepa CP-31 mientras que la cepa CP-11 presentó el valor más bajo de solubilización de fósforo.

La bacteria CP-31 registró las concentraciones más altas de fósforo soluble en al menos dos (5 di y 20 di) de los tres muestreos que se realizaron (362 y 536 mg L⁻¹, respectivamente). Con base en lo anterior, se eligió a esta cepa para la Fase II por su alta capacidad para solubilizar fósforo.

En la Figura 5 se muestra la concentración de fósforo soluble por cada cepa bacteriana a la largo de la cinética de solubilización de fósforo. Todas las cepas bacterianas solubilizaron la mayor concentración de fósforo soluble al final de la evaluación, es decir a los 20 di.

Por lo que se deduce que el proceso de solubilización de fósforo incrementó con forme al tiempo. Sin embargo, en el caso de la cepa CP-11 no se observaron diferencias significativas en la concentración de fósforo soluble a lo largo de la evaluación. Para las cepas CP-31, CP-36 y CP-47 la diferencia fue significativa solamente a los 20 di, los valores de las concentraciones a los 5 y 10 di fueron similares estadísticamente.

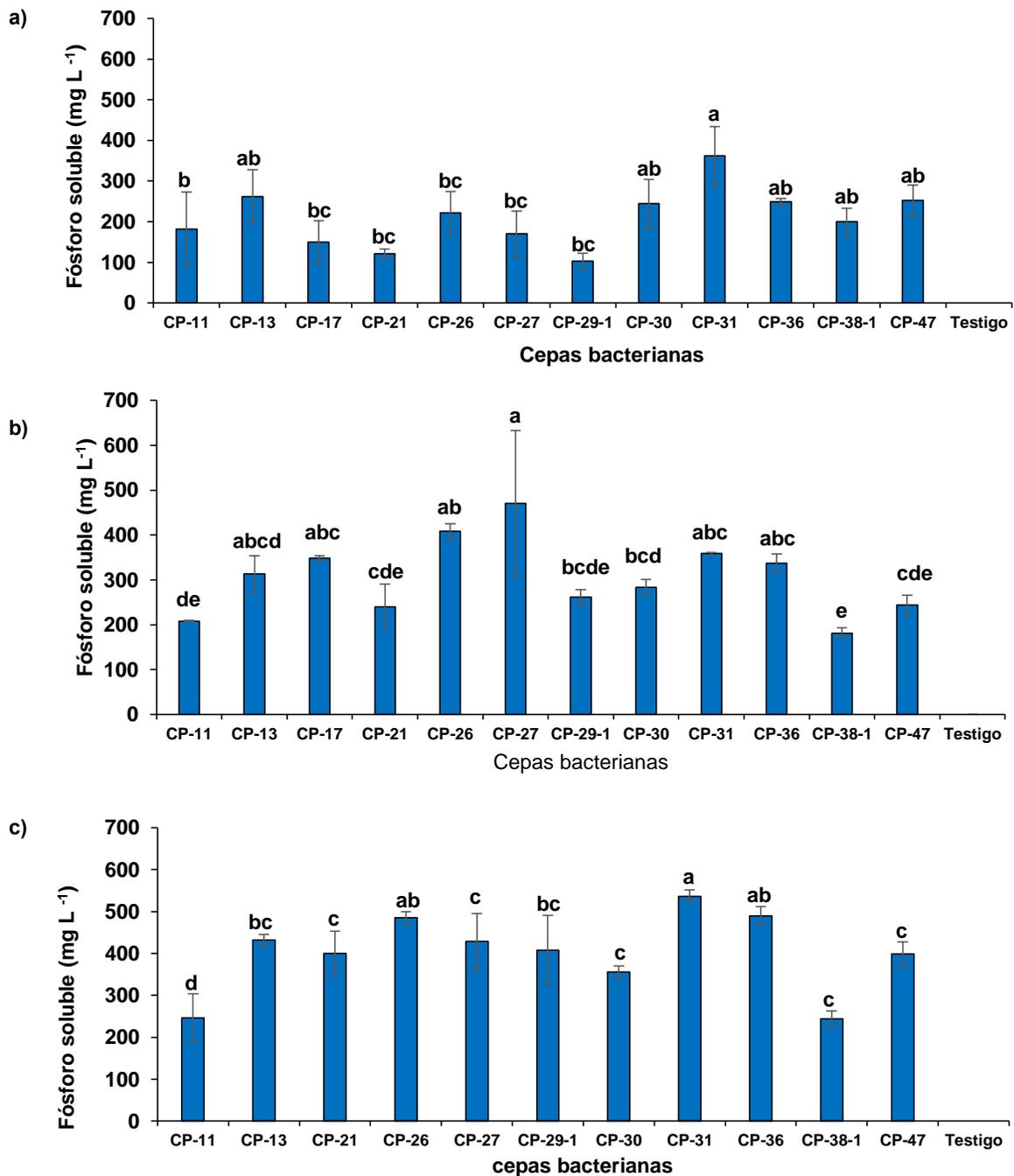


Figura 4. Concentración de fósforo soluble por 12 bacterias en la cinética de solubilización bacteriana. 5 di (a), 10 di (b) y 20 di (c). Las barras representan el promedio y la desviación estándar (n=3). Diferentes letras muestran diferencias significativas entre bacterias en la solubilización de fósforo (Tukey $\alpha = 0.05$).

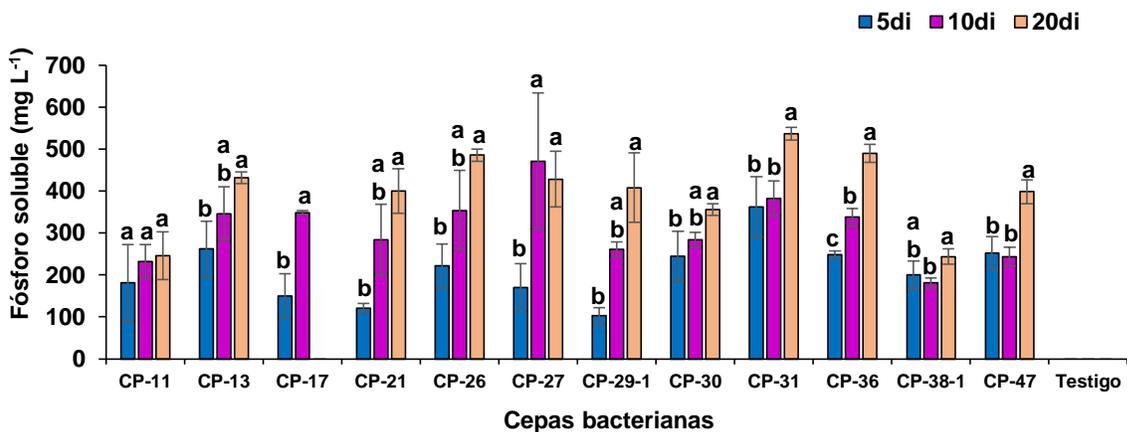


Figura 5. Concentración de fósforo soluble de 12 bacterias en tres fechas de evaluación. Las barras representan el promedio y la desviación estándar (n=3). Diferentes letras muestran diferencias significativas entre fechas de evaluación en cada una de las bacterias (Tukey $\alpha = 0.05$).

En la cepa CP-27 hubo diferencias significativas en la concentración de fósforo soluble entre cada fecha de evaluación, aunque, la mayor solubilización de fósforo se pudo observar tanto a los 10 como a los 20 di.

1.5.5. Concentración de calcio soluble

La Figura 6 presenta la concentración de calcio en el medio de cultivo, como resultado de la solubilización bacteriana de la fuente de fósforo que se empleó ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). En la primera evaluación (5 di), la cepa CP-31 liberó la mayor concentración de calcio (Figura 6a; 436 mg L^{-1}) y las cepas CP-11, CP-21, CP-26 y CP-29-1, la menor concentración (de 78 a 115 mg L^{-1}).

En el segundo muestreo (10 di), la concentración de calcio soluble fue similar en la mayoría de las cepas (Figura 6b). Se observaron tres grupos de acuerdo al análisis estadístico; en el primero las cepas indujeron concentraciones de calcio altas (3300 a 3850 mg L^{-1}): CP-11, CP-13, CP-17, CP-21, CP-27 y CP-30.

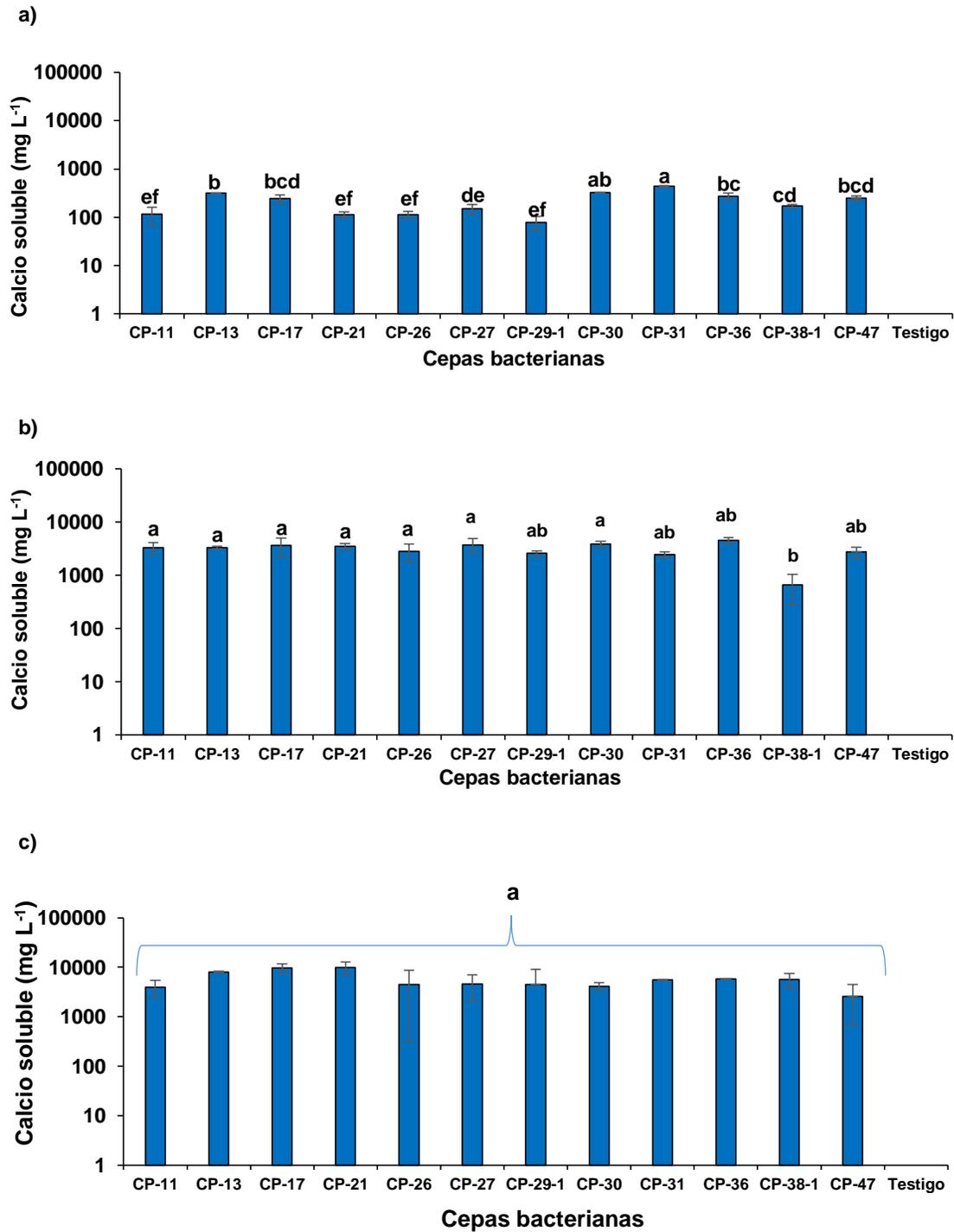


Figura 6. Concentración de calcio soluble en medio de cultivo de 12 cepas bacterianas a los 5 (a), 10 (b) y 20 (c) di. Las barras representan el promedio y la desviación estándar (n=3). Diferentes letras muestran diferencias significativas en la concentración soluble de calcio por bacteria (Tukey $\alpha = 0.05$).

El segundo grupo presentó concentraciones de calcio intermedias, entre 2420 y 4473 mg L⁻¹: CP-26, CP-29-1, CP-31, CP-36 y CP-47. Por último, la cepa CP-38-1 produjo la menor concentración de calcio soluble (660 mg L⁻¹). Al final de la evaluación (20 di), no se observaron diferencias significativas en la concentración de calcio soluble entre tratamientos (Figura 6c).

En la Figura 7 se muestra la concentración de calcio soluble que se obtuvo por cada cepa bacteriana y se hace la comparación de las tres fechas de evaluación. Las cepas CP-13 y CP-31 presentaron la mayor concentración de calcio soluble a los 20 di. El tiempo de incubación no fue relevante para la concentración de calcio soluble en cinco de las cepas que se evaluaron (CP-11, CP-26, CP-27, CP-29-1 y CP-47). Las bacterias CP-30 y CP-36 tuvieron la concentración más alta de calcio soluble a los 10 y 20 di. Las CP-21 y CP-38-1 mostraron su mayor concentración solo a los 20 di.

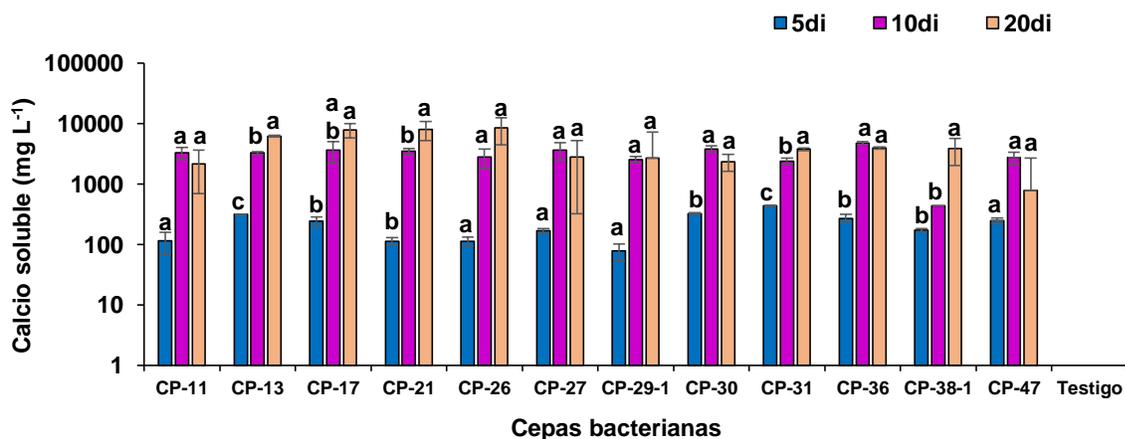


Figura 7. Concentración de calcio soluble en el medio de cultivo de 12 cepas bacterianas a los 5, 10 y 20 di. Las barras representan el promedio y la desviación estándar (n=3). Diferentes letras muestran diferencias significativas en la concentración de calcio soluble comparando las tres evaluaciones en cada bacteria (Tukey $\alpha = 0.05$).

1.5.6. pH

La Figura 8 muestra el comportamiento de pH del MCLPC durante la cinética de solubilización de fósforo. A lo largo del experimento se observó que las bacterias acidificaron el medio de cultivo, debido a que el pH fue más bajo que en el Testigo (pH=6) y estable durante el experimento.

En la primera evaluación (5 di) el pH en MCLPC llegó a disminuir hasta 3.3 (CP-17) y 3.4 (CP-11). A los 10 di, el pH más ácido fue 3.8 en la cepa CP-17, mientras el más alto entre los tratamientos inoculados (5.1) lo presentó la bacteria CP-38-1 (Figura 8b). A los 20 di, seis cepas: CP-13, CP-21, CP-26, CP-29-1, CP-31 y CP-36 presentaron los valores más bajos de pH (4.0 a 5.3), mientras que el valor más alto entre tratamientos inoculados fue 5.1 en la cepa CP-38-1 (Figura 8c).

En la Figura 9 se comparan simultáneamente los valores de pH entre los muestreos en cada cepa bacteriana. Se distinguieron tres tendencias en los valores de pH. En CP-11, CP-17, CP-26 y CP-38-1 se observó una caída drástica de pH a los 5di, que posteriormente aumentó (10 y 20 di). Sin embargo, el pH en el MCLCP de dichas cepas permaneció más ácido que en el Testigo. En tanto que el pH de CP-13 y CP-30 incrementó desde los 5 di hasta los 20 di. En el resto de las cepas bacterianas (CP-21, CP-27, CP-29-1, CP-31, CP-36, CP-47), el pH del medio no se modificó durante el experimento, pero el pH del medio de cultivo fue más bajo que en el medio sin inoculación.

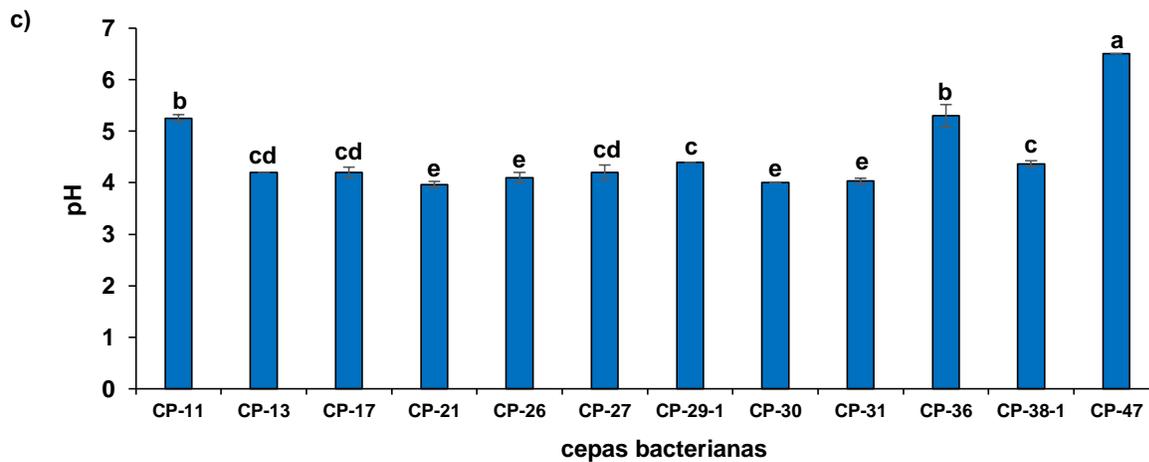
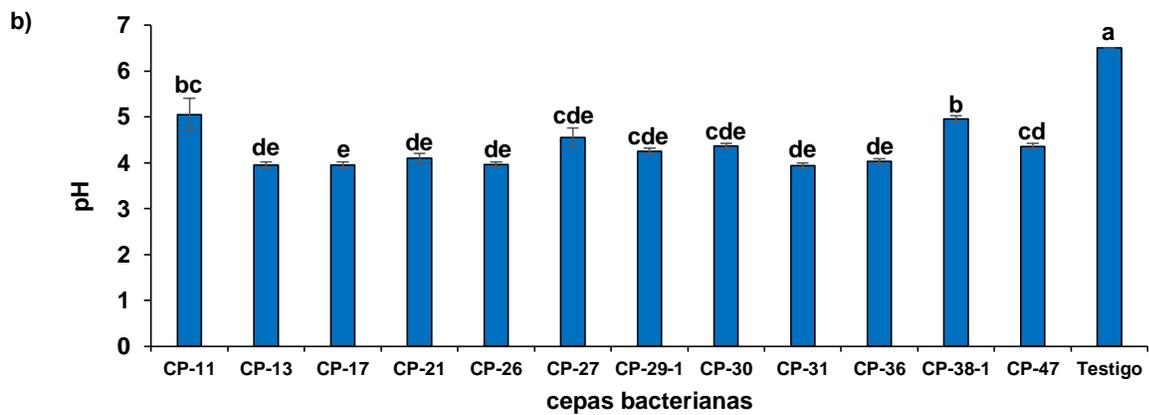
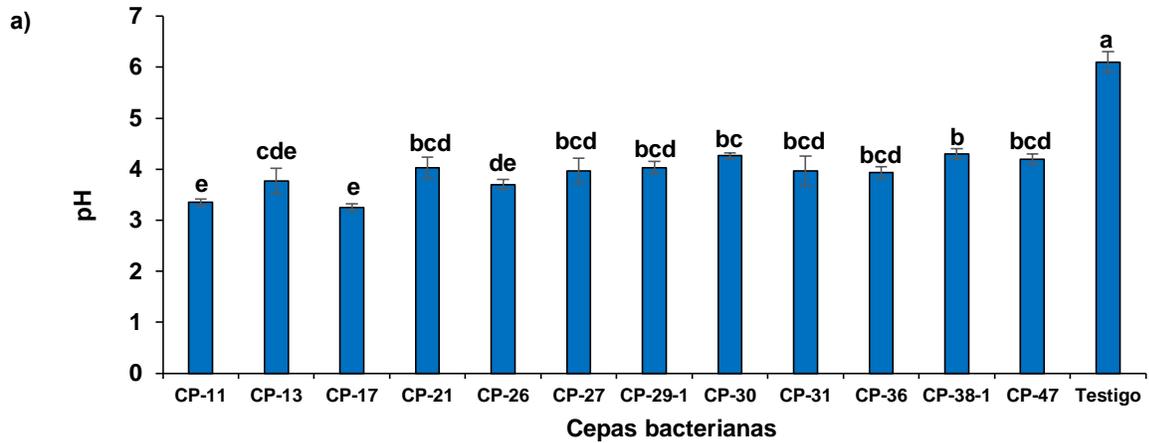


Figura 8. pH del medio de cultivo de 12 cepas bacterianas durante la cinética de solubilización de fósforo. 5 di (a), 10 di (b) y 20 di (c). Las barras representan el promedio y la desviación estándar (n=3). Diferentes letras muestran diferencias significativas entre cepas (Tukey $\alpha = 0.05$).

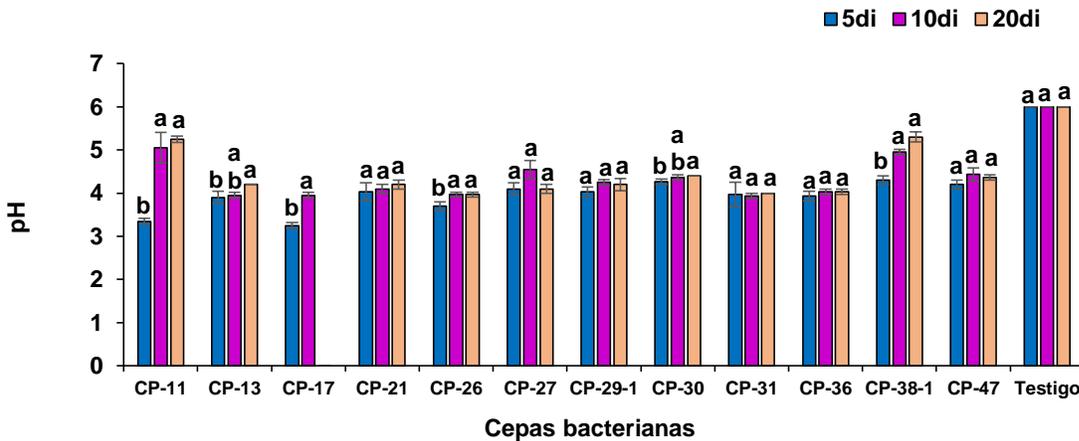


Figura 9. pH del medio de cultivo de 12 cepas bacterianas en tres fechas de evaluación. Las barras representan el promedio y la desviación estándar (n=3). Diferentes letras muestran diferencias significativas de pH (Tukey $\alpha = 0.05$).

1.5.7. Conductividad eléctrica (CE)

En la Figura 10 se muestran los valores de CE que se registraron en las tres evaluaciones de la cinética de solubilización de fósforo. A los 5 y 10 di no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos (Figura 10a y 10b). Sin embargo; a los 10 y 20 di, el testigo tuvo la CE más baja (5 dS m^{-1}), las cepas CP-11 y CP-38-1 (7.0 y 6.0 dS m^{-1} , respectivamente) presentaron valores similares al testigo (Figura 10c). En tanto que el resto de las bacterias mostraron valores más altos de CE ($\alpha = 0.05$; 7.0 dS m^{-1}).

Se realizó la comparación de la CE entre muestreos por cepa bacteriana durante la cinética de solubilización (Figura 11). Solo las cepas: CP-11, CP-21, CP-26, CP-27 y CP-29-1 presentaron diferencias significativas; el valor más bajo fue a los 5 di, luego aumentó a los 10 di y se mantuvo sin diferencias a los 20 di.

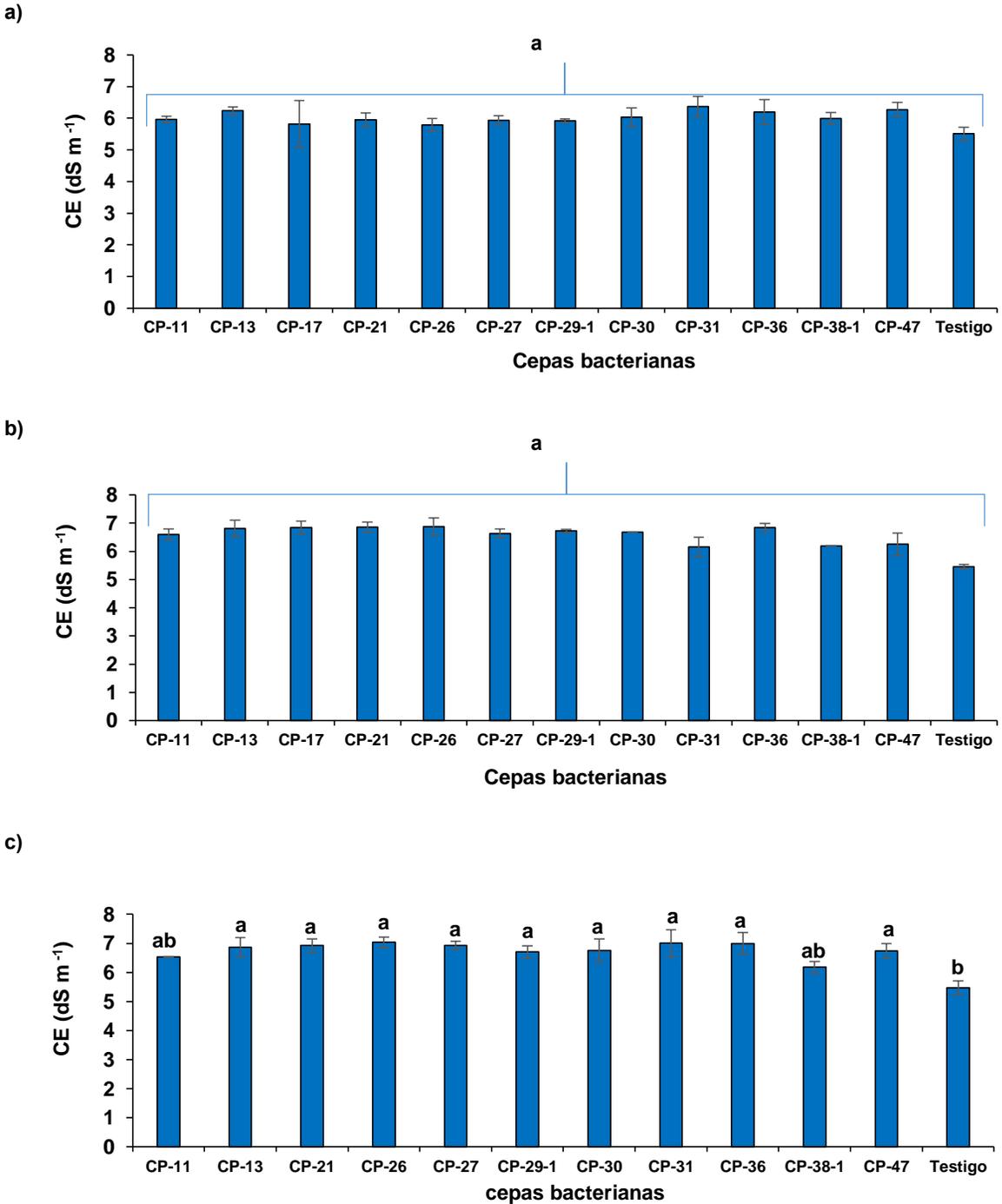


Figura 10. Conductividad eléctrica en el medio cultivo de 12 cepas bacterianas durante la cinética de solubilización de fósforo 5 di (a), 10 di (b) y 20 di (c). Las barras representan el promedio y la desviación estándar (n=3). Diferentes letras muestran diferencias significativas entre la CE de las cepas (Tukey α =0.05).

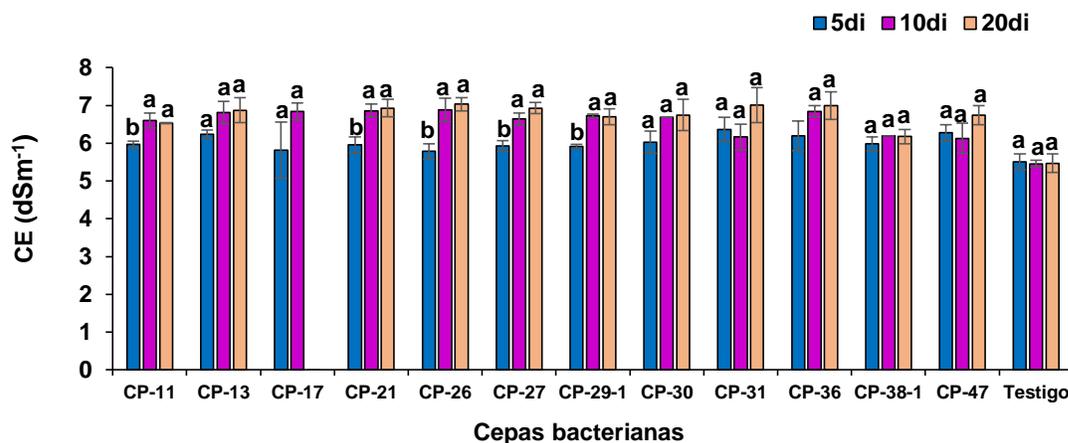


Figura 11. Conductividad eléctrica del medio de cultivo de 12 cepas bacterianas en diferentes tiempos de evaluación.

Las barras representan el promedio y la desviación estándar (n=3). Diferentes letras muestran diferencias significativas entre fechas de evaluación (Tukey $\alpha = 0.05$).

1.5.8 Correlación entre las variables que se evaluaron

El Cuadro 3 muestra los coeficientes de correlación de Pearson más altos y significativos para la cinética de solubilización de fósforo, así como las fechas en que se observaron. Mientras que se observaron interacciones negativas entre fósforo soluble y pH; CE y pH; y entre biomasa y pH.

Esto se debió a que cuando el pH disminuye se solubiliza el fósforo, pues la hidroxiapatita es inestable a pH bajo (Kim et al., 2003). Cabe mencionar que la correlación entre biomasa bacteriana y CE, así como entre calcio y fósforo soluble y CE y fósforo soluble, fue positiva, pues al aumentar la biomasa se generan más exudados y se solubiliza más hidroxiapatita.

Cuadro 3. Coeficientes de correlación de Pearson por fecha de evaluación.

Variable 1	Variable 2	r ($\alpha = 0.05$)	Día de evaluación
Biomasa bacteriana	Conductividad eléctrica	0.98	5, 10 y 20 di.
Fósforo soluble	pH	-0.73 -0.85	10 y 20 di
Calcio soluble	fósforo soluble	0.72 0.73	5 y 10 di
Conductividad eléctrica	fósforo soluble	0.76	20 di
pH	Conductividad eléctrica	-0.75	20 di
Biomasa bacteriana	pH	-0.72	20 di

En el Cuadro 4 aparecen las cepas que se seleccionaron para la Fase II de la investigación. Debido a que el comportamiento de los valores de la concentración de fósforo soluble fue creciente y el pH decreciente, se tomaron los valores más altos del primero y los más bajos del segundo que se observaron a los 20 di. Las cepas bacterianas se eligieron en función de la capacidad de solubilización que consiste en disminuir el pH y liberar concentraciones elevadas de fósforo en el medio de cultivo. Ambas características son primordiales en una BSP. El fósforo disuelto puede ser usado por los organismos o en otras reacciones que ocurren casi a la par de la disolución de la hidroxiapatita.

Cuadro 4. Cepas bacterianas seleccionadas con base en la mayor solubilización de fósforo y disminución de pH en el medio de cultivo a los 20 di.

Fósforo soluble	pH
CP-31- <i>Enterobacter cloacae</i> (536 mg L ⁻¹ 20 di)	CP-31- <i>Enterobacter cloacae</i> (pH 4.0)
CP-36 - <i>Serratia marcescens</i> (490 mg L ⁻¹ 20 di)	CP-36 - <i>Serratia marcescens</i> (pH 4.0)
CP-26 - <i>Enterobacter cloacae</i> (485 mg L ⁻¹ 20 di)	CP-26 - <i>Enterobacter cloacae</i> (pH 4.0)
CP-13 - <i>Klebsiella oxytoca</i> (432 mg L ⁻¹ 20 di)	CP-21 - <i>Klebsiella oxytoca</i> (pH 4.2)
CP-29-1 - <i>Citrobacter freundii</i> (408 mg L ⁻¹ 20 di)	CP-13 - <i>Klebsiella oxytoca</i> (pH 4.2)
CP-21- <i>Klebsiella oxytoca</i> (400 mg L ⁻¹ 20 di)	CP-29-1 - <i>Citrobacter freundii</i> (pH 4.2)

Pese a que algunos autores (Kim et al., 2003) sugieren que la hidroxiapatita puede ser estable incluso a pH de 4, los resultados obtenidos en este experimento muestran que prácticamente se disuelve a pH más elevado.

1.6. DISCUSIÓN

La fase experimental I se dividió en dos etapas de selección de BSP:

1) Selección cualitativa, con base a la presencia o ausencia de halo de solubilización en medio sólido NBRIP durante 15 días (Cuadro 2). Se observaron halos de solubilización de 0.7 a 2.5 cm de diámetro, lo cual concuerda con Paredes-Mendoza (2010), quien aisló bacterias de rizósfera y rizoplano provenientes de diversos cultivos y al probarlos en medio NBRIP en placa sólida, observó halos de solubilización desde 0.2 cm a 2 cm de diámetro.

2) selección cuantitativa en medio líquido NBRIP, en la que se evaluó la capacidad para solubilizar fósforo de las cepas que se seleccionaron de la etapa anterior. Se consideraron seis variables experimentales: biomasa bacteriana (absorbancia en MCLP), concentración de fósforo y concentración de calcio, pH y CE (estas cuatro variables se evaluaron en MCLPC). Los resultados variaron de acuerdo a la cepa y al tiempo de evaluación; sin embargo, se identificaron algunas tendencias.

Respecto a la biomasa bacteriana, se observaron diferencias significativas por fecha de evaluación y cepa bacteriana (Figura 2). Posiblemente se relacione a la fase de crecimiento en la que se encontraban los microorganismos al momento de los muestreos. Entonces las cepas que tendieron a disminuir de biomasa (CP-11, CP-13 y CP-47) posiblemente se hallaban en la fase de declinación o muerte, mientras que las que tendieron a la estabilidad (CP-17, CP-21, CP-26, CP-27, CP-29-1, CP-30, CP-31, CP-38-1), probablemente se encontraban en la fase estacionaria.

La fase de declive se caracteriza por la predominancia de las células muertas sobre las células viables que aún realizan la división celular. La tasa de crecimiento bacteriano está dada en función de la concentración del sustrato, cuando la concentración de los nutrientes en el sustrato es baja, el crecimiento también disminuye (Maier *et al.* 2009). Probablemente este fenómeno explique la disminución paulatina de biomasa a lo largo de la cinética en las cepas CP-11, CP-13 y CP-47 (Figura 3). Por otra parte, la mayoría de las cepas que se evaluaron (CP-17, CP-21, CP-26, CP-27, CP-29-1, CP-30, CP-31, CP-38-1) mantuvieron constante y sin diferencias significativas el incremento de biomasa, por lo que posiblemente este grupo de bacterias se hallara en fase estacionaria.

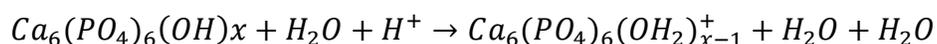
Dicha fase se caracteriza por el equilibrio entre la cantidad de células viables que se reproducen y la cantidad de células que mueren, por lo que no se observa aumento, ni descenso aparente en la biomasa bacteriana (Figura 3) (Maier *et al.*, 2009).

La concentración de calcio soluble generalmente no se evalúa en los experimentos de solubilización bacteriana de fosfato. Sin embargo, en el presente trabajo se consideró relevante esta variable para entender mejor como ocurre la solubilización de una fuente insoluble como lo es el FTC. Illmer y Schinner (1992) observaron que la concentración de calcio se correlaciona positivamente con la cantidad de fósforo que se solubiliza ($r=0.717$, $P<0.001$, $n=26$). Los resultados de la presente investigación mostraron que ambas variables: el calcio soluble y la concentración de fósforo soluble, incrementaron paulatinamente en relación al tiempo (Figura 4 y 6).

Además, el factor de correlación entre calcio soluble y fósforo soluble puede deberse a la composición química del FTC ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), donde teóricamente por cada dos moléculas de fosfato se deben liberar tres moléculas de calcio, es decir hay una relación de proporción estequiométrica. Por tal razón la correlación entre ambas variables fue positiva y se observó en dos de los tres muestreos: 0.73 (5 di) y de 0.72 (10 di).

Respecto a la CE, la literatura disponible en general no considera la CE como una variable que se relacione con la solubilización de fósforo. En el presente trabajo, dicha variable se determinó porque la CE consiste en aplicar un estímulo eléctrico a través del MCLPC, de manera que entre más alta sea la concentración de iones o sólidos disueltos, mayor será el flujo de corriente eléctrica que se registre (Turan *et al.* 2006). Se espera que al incrementar la concentración de fósforo soluble también incremente la CE.

La cepa CP - 31, que liberó la mayor concentración de fósforo soluble en el medio de cultivo (536 mg L⁻¹; Figura 4c), registró también la CE estadísticamente más elevada (7 dS m⁻¹; Figura 10c) en comparación con el resto de los tratamientos inoculados. El tratamiento testigo (sin inoculación bacteriana) mantuvo siempre CE baja (5.5 dS m⁻¹; Figura 11) comparada con los valores observados en los tratamientos inoculados (superiores a 5.8. dS m⁻¹) que tendieron a incrementarla. El valor más alto fue 7 dS m⁻¹ a los 20 di en 9 de las bacterias (Figura 10: CP-13, CP-21, CP-26, CP-27, CP-29-1, CP-30, CP-31, CP-36 y CP-47). Con base en los coeficientes de correlación (Cuadro 3), se infiere que probablemente haya una estrecha relación entre la CE y las siguientes variables: biomasa bacteriana (r=0.98 en todas las evaluaciones), fósforo soluble (r=0.76 20 di) y pH (r=-0.75 20 di). La disolución de la hidroxiapatita en términos de la producción de protones se explica en este modelo



La CE también se relaciona con la cantidad de sólidos disueltos: a mayor cantidad de iones disueltos en el medio, mayor será la conductividad de la electricidad que pasa a través del medio. Por esa razón la biomasa bacteriana y la CE podrían relacionarse, debido a que la primera implica un incremento en la segunda (cantidad de sólidos disueltos) con forme aumenta el crecimiento bacteriano. En relación a la concentración de fósforo solubilizado, éste tuvo su valor más bajo con 10.3% en un inicio y al final de la cinética alcanzó 53.6%, con respecto a la cantidad total de FTC contenido en el medio líquido NBRIP (5000 mg L⁻¹). Es decir, la concentración aumentó desde 103 mg de fósforo L⁻¹ a 536 mg de fósforo L⁻¹ (Figura 4a y 4c). Por lo cual, los incrementos en la concentración de fósforo soluble fue de 64 a 305 mg L⁻¹ entre los 5 di y 20 di por cepa.

Paredes-Mendoza y Espinosa-Victoria (2010) aislaron bacterias de la rizósfera y rizoplano en diversos cultivos, reportaron de 1 a 198.3 mg L⁻¹ de fósforo soluble en medio líquido NBRIP a los 6 di. No obstante, en el presente estudio se observaron concentraciones desde 103 a 362 mg L⁻¹ a los 5 di, que en relación a los valores citados por estos autores, fueron superiores.

Alejo-Iturvide *et al.* (2016) probaron a *Serratia odorífera* (aislada de una carbonera) en medio NBRIP y observaron que solubilizó 12.7 mg de fósforo L⁻¹ a los 15 di y descendió a 4.5 el pH del medio (ajustado a 7). Sin embargo, en el presente trabajo se obtuvieron mayores resultados: CP-36-*Serratia marcescens*, solubilizó 338 mg de fósforo L⁻¹ a los 10 di y disminuyó a 4 el pH (pH ajustado a 7). Por lo que parece ser que el mecanismo más común es la disminución del pH del medio de crecimiento.

Probablemente, las diferencias en la capacidad de solubilización entre *S. odorífera* y *S. marcescens* pudieron ser el resultado de las condiciones ambientales, ya que *S. odorífera* proviene de una carbonera y los suelos sometidos a fuego prolongado sufren cambios en el pH, el cual se eleva por la liberación de cationes cambiabiles de Ca²⁺ y Mg²⁺ (Iglesias, 1993) y fisiológicas en las que se hallaba la primera, por lo que su capacidad de solubilización pudo verse disminuida.

De acuerdo con Illmer y Schinner (1992) las BSP acidifican el medio al liberar H⁺ (provenientes de ácidos orgánicos e inorgánicos, o producto de la respiración y asimilación de NH₄⁺) en el medio en que se encuentran (Kpoblekou y Tabatai, 1994; Stevenson, 2005; Rodríguez y Fraga 1999; Restrepo-Franco *et al.* 2015) por lo que la solubilización de fósforo se acompaña por el descenso en el pH (Figura 8).

Mullen (2005) afirma que la excreción de H^+ aunada a la asimilación de NH_4^+ , es responsable de la disminución de pH en el medio de cultivo y en consecuencia de la solubilización total de fósforo. Los resultados de esta investigación mostraron que a medida que el pH desciende (Figura 8), la concentración de fósforo soluble aumenta (Figura 4), lo cual refleja el factor de correlación entre fósforo soluble y pH ($r=-0.73$ y $r=-0.85$ a los 10 y 20 di respectivamente). La información anterior y los datos obtenidos sugieren que las cepas bacterianas evaluadas acidificaron el medio de cultivo para lograr la liberación de fósforo a partir de fuentes insolubles como lo fue el fosfato tricálcico ($Ca_3(PO_4)_2$). La generación de protones es un mecanismo de la solubilización de la hidroxiapatita, pero a su vez para generar estos protones los organismos producen y excretan ácidos orgánicos. Entre ácidos producidos y liberados se han reportado el ácido glucónico, oxálico, cítrico, láctico, itacónico, isovalerico entre otros (Sharma et al., 2013). Sin embargo también se pueden liberar otras moléculas como los sideróforos.

Illmer y Schinner (1995) también observaron correlación altamente significativa entre la solubilización de fósforo y la producción de biomasa bacteriana. Dichos autores argumentaron que el proceso de solubilización de fósforo depende de factores como el crecimiento bacteriano, el cual se encuentra aunado a la asimilación de NH_4^+ y a la respiración, que en conjunto generan el descenso del pH en el medio de cultivo.

No obstante, en el presente estudio la cepa que solubilizó la mayor cantidad de fósforo soluble (Figura 4c; CP-31) no correspondió con la cepa que desarrolló la mayor cantidad de biomasa (Figura 2a; CP-13). No obstante, Rathore (2014) argumenta que una menor producción de biomasa bacteriana puede ser recomendable para favorecer la producción de metabolitos responsables de la solubilización del fósforo.

Ya que probablemente, la bacteria prefiera invertir recursos en la producción de metabolitos (ácidos orgánicos), que gastar recursos para producir biomasa que no podrá mantener por insuficiencia de nutrimentos.

Por lo anterior, es probable que la capacidad de solubilización de la cepa CP-31 *Enterobacter cloacae*, la de mayor capacidad de solubilización entre las cepas estudiadas, no dependa de la producción de biomasa bacteriana para solubilizar fósforo de fuentes insolubles y en lugar de que la disminución en la producción de biomasa represente una desventaja, podría ser más bien una ventaja o adaptación que le podría conferir mayor probabilidad de éxito al introducirla en la rizósfera de algún cultivo.

Como pudo apreciarse por lo que se mencionó anteriormente, a cepa con la mayor capacidad de solubilización a lo largo de la presente investigación fue la cepa CP-31-*Enterobacter cloacae*, ya que reunió las dos principales características que distinguen a una BSP: liberó la mayor concentración de fósforo soluble al medio de cultivo (Figura 4c; 536 mg L⁻¹ a los 20 di) y fue de las cepas que más disminuyó el pH del medio (Figura 8c; pH 4). Con base en lo anterior, la cepa CP-31-*Enterobacter cloacae* fue seleccionada para continuar con las pruebas experimentales de la fase II de esta investigación.

La segunda cepa con mayor capacidad de solubilización de fósforo en este estudio fue CP-36-1 *Serratia marcescens*. Esta cepa solubilizó 490 mg de fósforo L⁻¹ de MCLPC (Figura 4c), disminuyó el pH del medio de cultivo (ajustado a 7) a 4 (Figura 8c) y alcanzó una CE de 7dS m⁻¹ (Figura 10c). Tales habilidades abren un panorama de posibilidades para la experimentación con diversas fuentes de fósforo insoluble, por lo que se eligió a CP-36-1 *Serratia marcescens* para la fase II de este estudio.

Patiño-Torres y Sanclemente-Reyes (2014) describieron el comportamiento de *Citrobacter sp.* Cepa DHRSS. Estos autores mencionaron que esta cepa tiene la capacidad de utilizar diferentes fuentes de carbono, lo que en el ambiente rizosférico representa una ventaja competitiva respecto a otras cepas. Además fue la quinta cepa con mayor capacidad de solubilización de fósforo al liberar 408 mg L⁻¹ a los 20 di y descendió el pH del medio a 4.2. Por esta razón, CP-29-1-*Citrobacter freundii*, se eligió para la fase II y como inoculante.

Con base en la capacidad de solubilización y los resultados que se obtuvieron en la fase I de esta investigación (Cuadro 4), se seleccionaron las siguientes cepas (por orden de relevancia) para continuar con la experimentación de la fase II: CP-31-*Enterobacter cloacae*, CP-36-*Serratia marcescens*, CP-26-*Enterobacter cloacae*, CP-13 - *Klebsiella oxytoca*, CP-29-1 - *Citrobacter freundii* y CP-21- *Klebsiella oxytoca*. La capacidad de solubilización de estas cepas para solubilizar fósforo a partir de una fuente insoluble como el Fosfato tricálcico, debe comprobarse con otras fuentes de fósforo como por ejemplo, con nanopartículas de hidroxiapatita.

1.7. CONCLUSIONES

La solubilización de fósforo registró como valor más bajo 103 mg de fósforo soluble L⁻¹ al inicio de la cinética (5 di) y al final de la misma (20 di) alcanzó 536 mg de fósforo soluble L⁻¹, equivalentes a un porcentaje entre 10.3% y 53.6% de la concentración inicial de fósforo insoluble (Figura 4).

La cepa CP-31-*E. cloacae* fue la bacteria que mayor concentración de fósforo solubilizó (536 mg L⁻¹), seguida por *Serratia marcescens* en segundo lugar, CP-26-*Enterobacter cloacae* tercer lugar, CP-13-*Klebsiella oxytoca* en cuarto lugar, CP-29-1-*Citrobacter freundii* quinto lugar y CP-21-*Klebsiella oxytoca* en sexto lugar (Cuadro 3).

Se seleccionaron seis BSP *in vitro* para la Fase II. Estas bacterias seleccionadas tuvieron los valores más altos en concentración soluble de fósforo cuando se utilizó Fosfato tricálcico, así mismo presentaron los valores más bajos de pH (Cuadro 4). Estas son dos características esenciales para una BSP.

1.8. LITERATURA CITADA

- Alejo-Iturvide, F., Márquez-Lucio, M. A., Gonzáles-López, C.I., De La Rivadela-Riva, G. A. 2016. Biosolubilizadores de fósforo orgánico e inorgánico del bosque templado de Santa Rosa Guanajuato, México. *Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales*. 2 (3):10-17.
- Awasthi, R., Tewari, R., Nayyar, H. 2011. Synergy between plants and P-solubilizing microbes in soils: effect on growth and physiology of crops. *International Research Journal of Microbiology*. 2(12): 484-503.
- Büneman, E., Prusisz, B., Ehlers, K. 2011. Characterization of Phosphorus Forms in Soil Microorganisms. In: E. Bünemann, A. Oberson, E. Frossard, Eds., *Phosphorus in action: biological processes in soil phosphorus cycling*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. 35-57.

- Devau, N., Le Caadre, E., Hinsinger, P., Jaillerd, B., Gérard, F. 2009. Soil pH controls the environmental availability of phosphorus: Experimental and mechanistic modelling approaches. *Applied Geochemistry*. 24: 2163-2174.
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., Okon, Y. 2003. Plant growth- promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 22:107-149.
- Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 41:109-117.
- Glick, B.R. 2001. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to cleanup the environment. *Biotechnology Advances*. 21(3):83-393.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., Ahmed, I. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*. 60:579-598.
- Iglesias López, M.T. 1993. Efectos de los incendios forestales sobre las propiedades del suelo en un pinar de repoblación (*Pinus pinaster*), en las arenas de San Pedro (Avila). Tesis de doctorado. Universidad Complutense de Madrid. 339p.
- Illmer, P., Schinner, F. 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 24 (4): 389-395.
- Illmer, P., Schinner, F. 1995. Solubilization of inorganic calcium phosphates – solubilization mechanisms. *Soil Biology Biochemistry*. 27 (3):257-263.
- Jones, D., Oburger, E. 2010. Solubilization of Phosphorus by Soil Microorganisms. In: Bünemann, A. Oberson, E. Frossard, Eds. *Phosphorus in action: biological processes in soil phosphorus cycling*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.pp. 169-98.

- Kennedy, I.R., Choudhury, A.I.M.A., KecSkcs, M.L. 2004. Non-Symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biology and Biochemistry*. 36(8):1229-1244.
- Khan, A.G. 2005. Role of soil microbes in the rhizosphere of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 18:355–364.
- Klein, C.P.A.T., de Blicck-Hogervorst, J.M.A., Wolke, J.G.C., de Groot, K. 1990. Studies of the solubility of different calcium phosphate ceramic particles in vitro. *Biomaterials*. 11: 509-512.
- Kpombrekou, K., Tabatabai, M. A. 1994. Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks. *Soil Science*. 158:442-453.
- Lucas, G.J.A., Probanza, A, Ramos, B., Colon Flores, J.J., Gutierrez Mañero, F.J. 2004a. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) on biological nitrogen fixation, nodulation and growth of *Lupinus albus* L. cv. Multolupa. *Engineering in Life Sciences*. 7:1–77.
- Lucas, G.J.A., Probanza, A., Ramos, B., Palomino, M.R., Gutierrez Mañero, F.J. 2004b. Effect of inoculation of *Bacillus licheniformis* on tomato and pepper. *Agronomie* 24:169–17
- Maier, R.M. 2009. Chapter 3. Bacterial Growth. In: R.M., Maier, I.L., Pepper, C.P., Gerba, Eds. *Environmental Microbiology*. Second edition. Academic Press. Elsevier. USA. 38-54.
- McKean, S.J. 1993. *Manual de análisis de suelos y tejido vegetal. Una guía teórica y práctica de metodologías*. Laboratorio de servicios analíticos. Documento de

- trabajo No. 129. Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT. Cali, Colombia. 103p.
- Mullen, M.D. 2005. Phosphorus In Soil. Biological Interactions. In: J.L., Hatfield, K.M., Scow, D.S., Powlson, M.J., Singer, C., Rosenzweig, D.L. Sparks, Eds. Encyclopedia of soils in the environment. Academic Press. London, UK. 210-216.
- Murphy, J.; Riley. J.P. 1962. A modified Single Solution Method for the Determination of Phosphate in Natural Waters. *Analytica. Chimica Acta.* 27: 31-36.
- Nautiyal, C.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology letters.* 170: 265-270.
- Oberson, A., Joner, E. 2005. Microbial Turnover of Phosphorus in Soil. In: B.L., Turner, E., Frossard, D.S., Baldwin, Eds. Organic phosphorus in the environment. Centre for Agricultural Bioscience International. Wallingford, London, U.K. 133-160.
- Paredes-Mendoza, M., Espinosa-Victoria, D. 2010. Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana.* 28(1):61-70.
- Patiño-Torres, C.O., Sanclemente-Reyes, O.E. 2014. Los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF): una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible. *Entramado.* Universidad Libre Cali, Colombia. 10 (2): 288-297.
- Rathore, P. 2014. Role of different carbón sources in phosphate solubilization. *International Journal of scientific research. Microbiology.* 3(2):457-458.

- Restrepo-Franco, G. M., Marulanda-Moreno, S., de la Fe-Pérez, Y., Díaz-de la Osa, A., Lucia-Baldani, V., Hernández-Rodríguez, A. 2015. Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. Centro Nacional de Investigaciones Científicas Ciudad de La Habana, Cuba. Revista CENIC. Ciencias Biológicas. 46 (1): 63-76.
- Rodríguez, H., Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*. 17: 319-39.
- Schippers B., Scheffer R.J., Lugtenberg J.J., Weisbek P.J. 1995. Biocoating of seed with plant growth promoting rhizobacteria to improve plant establishment. *Outlook on Agriculture*. 24:179-185.
- Sharma S. B., Sayyed R. Z., Trivedi M. H. y Trivaharan A. G. 2013 Phosphate solubilization microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springer Plus* 2: 587-600.
- Stevenson, F. J. 2005. *Cycles of Soil: Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients*. John Wiley and Sons, Second edition. New York, NY. 427p.
- Turan, M., Ataoğlu, N., Şahin, F. 2006. Evaluation of the capacity of phosphate solubilizing bacteria and fungi on different forms of phosphorus in liquid culture. *Journal of Sustainable Agriculture*. 28(3): 99–108.
- Vitousek, P.M., Porder, S., Houlton, B.Z., Chadwick, O.A. 2010. Terrestrial phosphorus limitation: mechanisms, implications, and nitrogen-phosphorus interactions. *Ecological Applications*. 20: 5-15.

Zahir, A.Z., Arshad, M., Frankenberger, W.T.Jr. 2004. Plant growth promoting rhizobacteria: application and perspectives in Agriculture. *Advances in Agronomy*. 81:97.

CAPÍTULO II. INTERACCIÓN BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATOS (BSP) -NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA (NPHA)

2.1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) son un grupo muy diverso de microorganismos que se asocian simbióticamente con las raíces de las plantas. Estas bacterias poseen una amplia gama de habilidades fisiológicas: favorecen el crecimiento, desarrollo y rendimiento de los cultivos (Khan *et al.* 2007; Datta *et al.* 2011). Su uso constituye un nuevo enfoque de la agricultura, también se conoce como agricultura sustentable; la cual requiere de prácticas amigables con el medio ambiente y que puedan mantener a largo plazo el balance ecológico del suelo. Por lo que el uso de inoculantes microbianos representa una alternativa amigable a la aplicación de fertilizantes minerales (Khan *et al.*, 2007).

Entre las capacidades que tienen algunas BPCV, se encuentra la habilidad de hacer accesibles nutrimentos que no se encuentran disponibles para las plantas. Las bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSP), son organismos cosmopolitas, su número varía de suelo a suelo y conforman de 1% a 50% de la población respectiva total. Por lo regular las BSP superan en número a los hongos, de 2 a 150 veces (Kucey 1983).

La alta proporción de BSP se concentran en la rizósfera, donde son mucho más activos metabólicamente que los aislados de lugares diversos (Vazquez *et al.*, 2000). En las últimas décadas se ha dado un exceso de fertilización fosfatada en la agricultura; sin embargo, la mayor parte del fósforo permanece inmóvil en el suelo.

De este modo se ha propiciado una exacerbada acumulación de dicho elemento en suelos agrícolas. Por tanto, los suelos representan grandes reservas de fósforo insoluble (Beltrán 2014). Inclusive se ha mencionado que la cantidad de fósforo en suelos agrícolas serían suficientes para sostener máximos rendimientos de cultivo a nivel mundial por cien años (Goldstein *et al.*, 1993).

Con base en lo anterior, la aplicación de las BSP en la agricultura representa una opción para facilitar la movilización y absorción de fósforo por las plantas, especialmente en suelos tropicales y subtropicales, que son predominantemente ácidos. En éstos suelos el fósforo se encuentra unido a elementos como el aluminio y el hierro, por lo tanto no se encuentra disponible y las plantas no lo pueden aprovechar (Norrish y Rosser 1983). En suelos alcalinos o calcáreos el fósforo se vuelve inaccesible porque se une al calcio (Lindsay *et al.* 1989). En general, el fósforo se encuentra disponible en la solución del suelo en concentraciones desde <0.01 a 1 mg L^{-1} (Jones y Oburguer, 2011). Estos bajos niveles de fósforo soluble se deben a la elevada reactividad del fósforo que resulta en la fuerte retención en la superficie de minerales y arcillas (Khan *et al.*, 2007).

Las BSP pueden a partir de fuentes insolubles volver disponible al fósforo, mediante la producción de sideróforos, acidificación del medio por la liberación de protones (H^+), producción de ácidos inorgánicos de fácil disociación, liberación de ácidos orgánicos o complejos quelantes (Sharma *et al.* 2013), o como consecuencia de la respiración y asimilación de NH_4^+ . Las BSP también pueden mineralizar fuentes orgánicas de fósforo mediante la actividad redox de los metabolitos secundarios que exudan, la liberación extracelular de enzimas específicas (fosfatasa) y la producción de exopolisacáridos (Sharma *et al.* 2013; Restrepo-Franco *et al.*, 2015).

En la actualidad, la roca fosfórica (RF) ($\text{Ca}_{9.7} \text{Na}_{0.22} \text{Mg}_{0.08} (\text{PO}_4)_{5.2} (\text{CO}_3)_{0.8} \text{F}_{2.32}$), es la principal fuente de fósforo que se emplea para la producción de fertilizantes, sin embargo, es un mineral finito y no renovable (Edixhoven *et al.* 2014). Los costos ambientales y de producción por el uso inmoderado de este recurso son elevados y en algunas décadas la humanidad tendrá que enfrentarse a la crisis por fósforo, ya que la producción de fertilizantes fosforados llegará a su capacidad máxima para 2050 (Cordell *et al.*, 2009).

Actualmente existen nanomateriales y nanoestructuras que se utilizan en la agricultura sustentable y ofrecen múltiples beneficios, como son la disminución en la cantidad de fertilizantes que se aplican a los cultivos, así como la reducción de la pérdida de nutrientes, mejoramiento de algunos procesos vegetales como la germinación, el crecimiento radical, fortaleza de plántulas, crecimiento, floración y adicionalmente están implicados en la protección contra daño oxidativo. Dichas cualidades se explican por la naturaleza y tamaño de los nanomateriales y nanoestructuras, que por definición, al menos una de las caras mide menos de 100 nm, esta característica las hace altamente reactivas y con mayor superficie específica por área (Khan *et al.* 2017).

Por otra parte, la hidroxiapatita (HAp) ($\text{Ca}_{10} (\text{PO}_4)_6 (\text{OH})_2$) es un mineral fosforado natural del que están hechos los huesos y el esmalte de los dientes pero también puede sintetizarse químicamente a escala nanométrica. Las nanopartículas de HAp pueden proporcionar beneficios de una fuente de fósforo aunada a las características antes mencionadas de las nanopartículas, por ende las NPHA tienen el potencial de emplearse como un fertilizante fosfatado más eficiente para la producción agrícola.

El uso combinado de HAp y las BSP tiene el potencial de convertirse en una novedosa alternativa para el mejoramiento de la disponibilidad del fósforo para las plantas. Esto puede proporcionar a los cultivos una fuente accesible y económica para obtener este nutrimento que tan limitante y costoso es para la agricultura. Con ello se favorecerá el uso racional de fertilizantes y evitará el desperdicio de fósforo que contamina y eutrofiza los cuerpos de agua (Carpenter y Bennet 2011).

Edixhoven *et al.* (2014) señalaron que tanto científicos del suelo como microbiólogos tienen la responsabilidad de hacer al fósforo disponible para los cultivos, o en su defecto, sintetizar un eficiente sustituto para la fertilización de los cultivos. También argumentaron que hay necesidad urgente de intensificar los sistemas de producción agrícola sustentables dirigidos hacia el soporte de la productividad de cultivos y la generación de ingresos.

En este trabajo se propone evaluar *in vitro* entre nanopartículas de hidroxiapatita (NPHA) y las BSP con la posibilidad de potenciar el proceso de solubilización, a partir de una fuente insoluble de fósforo.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar el efecto de la interacción NPHA-BSP *in vitro* en la solubilización de fósforo.

Elegir la cepa bacteriana que en al menos uno de los tratamientos libere la mayor concentración de fósforo soluble.

2.3. HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

La interacción NPHA-BSP *in vitro* tiene un efecto positivo sobre la solubilización de fósforo.

La cepa elegida registra la mayor concentración de fósforo soluble y menor valor de pH en el medio.

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1. Síntesis de NPHA

Para la síntesis de NPHA se utilizó el método de precipitación química húmeda modificado por Ortiz-Cazares (2017). Se realizaron algunas modificaciones adicionales para optimizar el método considerando la reducción del tiempo de síntesis, disminuir el tamaño y forma de partícula, así como la cantidad de reactivos que se usados.

La síntesis de NPHA se resume a continuación: 0.925 g de Ca (OH)₂ se depositaron en 125 mL de agua destilada y precalentada a 76 °C en baño María, la mezcla se agitó por 15 min a 200 rpm. Enseguida, se adicionaron 125 mL H₃PO₄ 0.06 M a razón de 1.5 mL min⁻¹ con el uso de una bomba peristáltica, a lo largo del procedimiento la temperatura (80 °C) y pH (11) se mantuvieron constantes. El pH se reguló con una solución de KOH 1M. Por último, se retiró el baño María y permaneció en agitación por 30 min a temperatura ambiente.

2.4.2. Caracterización de NPHA

2.4.2.1 Tamaño de diámetro hidrodinámico y potencial Z

La medición de tamaño de diámetro hidrodinámico de las partículas, así como la determinación de su potencial Z se obtuvieron mediante el uso de un dispersor de luz dinámico (DLS por sus siglas en inglés) Z sizer 500 SZ marca Malvern. Para realizar la medición de ambos parámetros se tomó una muestra de 15 mL de la solución de NPHA, la cual previamente se sonicó por 15 min (Sonicador Ultrasonic Cleaner marca Branson modelo 1510). Enseguida se tomaron alícuotas de 3 mL que se colocaron en una celda especial para su lectura. El diámetro hidrodinámico de partícula se reportó en nm, en tanto el potencial Z se reportó en mV.

2.4.2.2. Tamaño y forma de partícula

La medición de tamaño y la observación de la forma de las NPHA se determinaron mediante un microscopio electrónico de transmisión (TEM) Jeol JEM-1011 (Jeol Ltd. Tokyo, Japan) 80 kV. En primer lugar se tomó una muestra de NPHA en suspensión líquida, la cual se sonicó previamente durante 15 min. De inmediato se tomaron muestras de 5 μ L de homogenizado líquido de NPHA que se colocaron sobre rejillas de cobre 400 mesh cubiertas con resina formvar (formvar 15/95 resin, Electron microscopy sciences). Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente (23 °C) en el laboratorio y se observaron al microscopio a 12X. El tamaño de partícula se reportó en nm y la forma de las NP se determinó al observar las micrografías que se tomaron.

2.4.2.3. Caracterización mediante FTIR

La caracterización de las NPHA mediante un equipo infrarrojo con transformada de Fourier, se realizó para obtener un espectro infrarrojo.

Este análisis confirmará la identidad de los principales grupos funcionales que caracterizan la composición química de la hidroxiapatita.

2.4.2.4. Caracterización mediante difracción de rayos X (DRX)

El análisis de pureza de los cristales que conforman la hidroxiapatita de las nanopartículas, se llevó a cabo con un difractómetro de rayos X marca Spellman modelo DF3. La lectura se realizó en un ángulo $\theta = 23.05$ y $2\theta = 26.82$, en un intervalo de lectura de 3.5° a 60° , a 35 KV y 28.4 mA.

2.4.2.5. Concentración de fósforo extractable en NPHA y roca fosfórica (RF)

La capacidad de solubilización de fósforo se determinó en NPHA y en roca fosfórica (RF; proveniente de Zimapán, Hidalgo). Esto fue con el objetivo de tener un tratamiento comparativo de solubilización de fósforo.

Previo al experimento de interacción con las bacterias, la concentración de fósforo extractable con ácido cítrico al 2% se determinó en NPHA y RF para calcular las dosis de fósforo a aplicar en los experimentos de interacción BSP-NPHA. Además la concentración extractable con ácido cítrico se relaciona con el fósforo que puede ser aprovechado por las plantas.

Para el caso de las NPHA, previamente la muestra se secó hasta peso constante en horno a 70°C . Para determinar la concentración de fósforo extractable se pesaron 100 mg de cada material y se les adicionaron 20 mL ácido cítrico 2%. Las muestras se agitaron durante 2 h (agitador orbital Eberbach 115 V), se filtraron con papel Whatman No. 42 y el filtrado se aforó con agua destilada a 100 mL.

Posteriormente, las muestras se prepararon de acuerdo con la metodología de azul de molibdeno descrita en Materiales y Métodos Fase I (Sección 6.4.3.). En casos necesarios se hicieron diluciones.

2.4.3. Concentración de NPHA y RF en el medio de cultivo

La fórmula original del medio NBRIP (Materiales y Métodos Fase I, Sección 6.4.2) contiene 5 g de fosfato tricálcico (FTC), equivalentes a 1 g de fósforo, por lo que para realizar la modificación del medio con distinta fuente de fósforo, fue necesario ajustar la concentración de RF y NPHA requeridas para sustituir la concentración de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ en la fórmula del medio. Con base en los cálculos que se realizaron, 6.1 g de RF son equivalentes a 1 g de fósforo.

Debido a las características propias de los nanomateriales como la elevada área específica y alta reactividad, para las NPHA, el ajuste que se realizó fue equivalente a 100 veces menos la concentración de fósforo de la fórmula original (0.01 g de fósforo). Se obtuvo que 9.47 mL de NPHA en suspensión contenían 0.054 g de NPHA secas, por lo que fue necesario utilizar 5.6 g de NPHA para obtener el equivalente a 0.01 g de fósforo (Cuadros 5 y 6).

Cuadro 5. Cálculos para sustituir la fuente de fósforo (fosfato tricálcico = FTC) por NPHA en el medio NBRIP para la selección de BSP.

	Compuesto	PM	g de fósforo	% de fósforo	g en NBRIP	g de fósforo
FTC	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	310	62	20	5	1
NPHA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1038	186	17.9	5.6	1

Relación FTC:NPHA	NPHA en suspensión (mL)	NPHA secas (g)	g en medio NBRIP	NPHA en suspensión calculadas (mL)
1:1	50	0.285	5.6	980.5
1:0.01	50	0.285	0.056	9.8

FTC: Fosfato Tricálcico; NPHA: Nanopartículas de hidroxiapatita

Cuadro 6. Cálculos para sustituir la fuente de fósforo: FTC por RF, en el medio NBRIP para la selección de BSP.

Compuesto	PM	g de fósforo	% de fósforo	g para NBRIP	g de fósforo
FTC $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	310	62	20	5	1
RF $\text{Ca}_{9.7}\text{Na}_{0.22}\text{Mg}_{0.08}(\text{PO}_4)_{5.2}(\text{CO}_3)_{0.8}\text{F}_{2.32}$	982	161	16.4	6.1	1

2.4.4. Inóculo bacteriano

Para el inóculo bacteriano se tomaron en cuenta los resultados de la fase anterior, en la que se seleccionaron seis cepas bacterianas con alta capacidad de solubilización de fósforo (*Klebsiella oxytoca*-13, *Klebsiella oxytoca*-21, *Enterobacter cloacae*-26, *Citrobacter freundii*-29-1, *Enterobacter. cloacae* -31 y *Serratia marcescens*-36). Estas cepas se inocularon en caldo nutritivo y se incubaron a 30 °C en oscuridad por 24 h. Pasado ese tiempo, a una longitud de 600 nm se ajustó a uno la absorbancia de la concentración del inóculo. Los ajustes de absorbancia se hicieron con caldo nutritivo.

Los medios líquidos NBRIP modificados con NPHA y RF se prepararon de forma idéntica al medio NBRIP (Materiales y Métodos Fase I, Sección 6.4.2). Éstos se colocaron en forma separada en tubos Falcon de 15 mL con 10 mL de medio de cultivo, enseguida se esterilizaron y posteriormente se les agregó a cada tubo 50 μ L de inóculo bacteriano. Se incubaron a 30 °C en oscuridad, en agitación a 120 rpm y de acuerdo al tiempo de evaluación que les correspondió (5, 10 o 20 días después de la inoculación ddi).

2.4.5. Evaluación de la interacción BSP-NPHA y BSP-RF.

Para analizar la interacción de las BSP-NPHA y BSP-RF se utilizó el medio de cultivo libre de fosfatos insolubles y células (MCLPC). Los medios de los tubos de cultivo se filtraron con papel Wathman No. 42 para eliminar los fosfatos insolubles.

Para la evaluación del MCLPC se usaron 10 mL de muestra contenidos en cada tubo. Las variables que se evaluaron fueron las mismas que en la Fase I: concentración de fósforo soluble, concentración de calcio soluble, biomasa bacteriana (absorbancia), pH y conductividad eléctrica (CE). Las metodologías fueron las mismas descritas anteriormente (Fase I, Materiales y Métodos, Sección 6.4.3).

2.4.6. Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se realizó bajo un diseño experimental factorial completamente al azar (Factorial DECA). Las unidades experimentales consistieron en cada tubo con medio de cultivo modificado NBRIP (RF o NPHA como fuente de fósforo) y con o sin inóculo. Los factores que se evaluaron fueron tres: las cepas bacterianas, fuente de fósforo y los tiempos de evaluación. Los niveles de factor fueron:

las seis cepas bacterianas (*K. oxytoca*-13, *K. oxytoca*-21, *E. cloacae*-26, *C. freundii*-29-1, *E. cloacae* -31 y *S. marcescens*-36); los dos medios modificados (NBRIP-NPHA y NBRIP-RF) y los tres muestreos (5 di, 10 di y 20 di). Las evaluaciones se realizaron por triplicado y en total fueron 126 unidades experimentales (tubos Falcon).

Para el análisis de resultados se utilizó el programa estadístico R (versión 3.4.2). Primero se verificó el cumplimiento de los supuestos: 1) La Independencia de los datos se garantizó al haber realizado la aleatorización de los tratamientos. 2) La Normalidad se comprobó mediante el cálculo de la prueba de Shapiro-Wilk. 3) La Homogeneidad de varianzas se verificó mediante la obtención de la gráfica de distribución de varianzas. Posteriormente, se realizó la prueba de Análisis de Varianza (ANDEVA) y, en caso adecuado, se realizó la comparación de medias de Tukey ($\alpha=0.05$).

2.5. RESULTADOS

2.5.1. Caracterización de tamaño de diámetro hidrodinámico y potencial Z

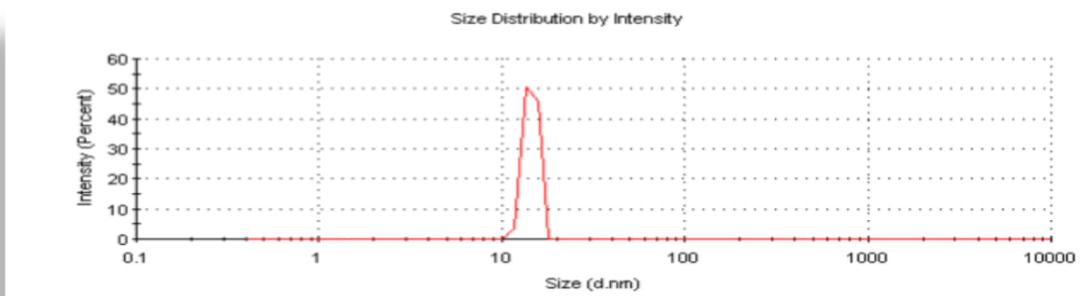
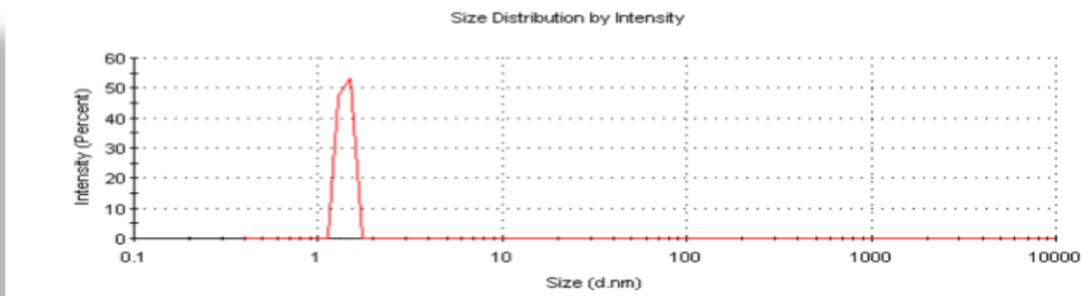
La Figura 12 representa el promedio de los tamaños hidrodinámicos de partícula que se obtuvieron de la muestra de NPHA. El eje de las X muestra el tamaño del diámetro hidrodinámico en nm, en escala logarítmica. En el eje de las Y, se observa la distribución de tamaño por intensidad, expresado en porcentaje.

El tamaño de diámetro hidrodinámico de las NPHA se ubicó en un intervalo de valores de menos de 10 nm a menos de 100 nm. En la imagen se observan tamaños cercanos a 1 nm, 10 nm y 50 nm (Figura 12).

Se obtuvieron diámetros hidrodinámicos de $72.27 \text{ nm} \pm 1.0 \text{ nm}$, $127.6 \text{ nm} \pm 4.0 \text{ nm}$, $137.5 \text{ nm} \pm 18.0 \text{ nm}$, para las soluciones a 5700 mg L^{-1} , 2850 L^{-1} y 1425 L^{-1} respectivamente. En la Figura 13 se observa en el eje X el potencial Z aparente y en el eje Y, el total de mediciones que se efectuaron. También se reporta el intervalo de valores que asumió el potencial Z en las muestras que se midieron: -10 mV a -33 mV (Figura 13).

2.5.2. Caracterización de tamaño y forma de partícula

Las micrografías de la NPHA obtenidas con el TEM mostraron que las partículas tienen forma de hoja y el tamaño de cualquiera de sus lados midió menos de 100 nm (Figura 14-16). Además y el potencial Z se registró en un intervalo entre -10.8 y -33 mV (Figura 12 y 13). Se encontraron valores de potencial Z de -24.4 mV , -21.8 mV y -11.1 mV para las siguientes soluciones: a 5700 mg L^{-1} , 2850 L^{-1} y 1425 L^{-1} respectivamente.



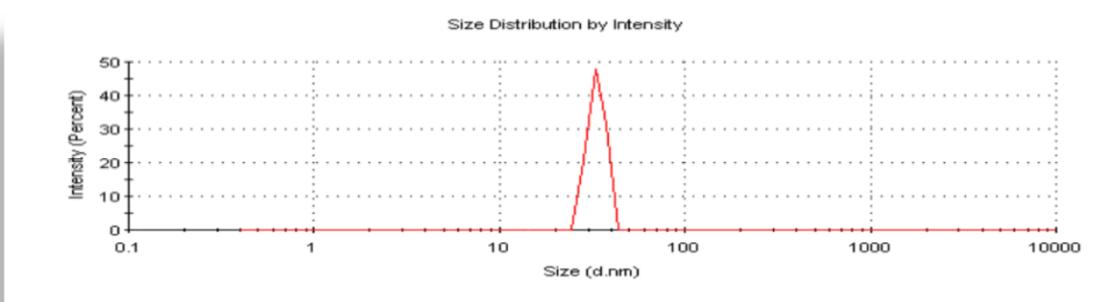


Figura 12. Tamaño hidrodinámico de las NPHA. Se muestran tres picos cuyo tamaños son respectivamente: 1.4 nm, 14.47 nm y 33.37 nm.

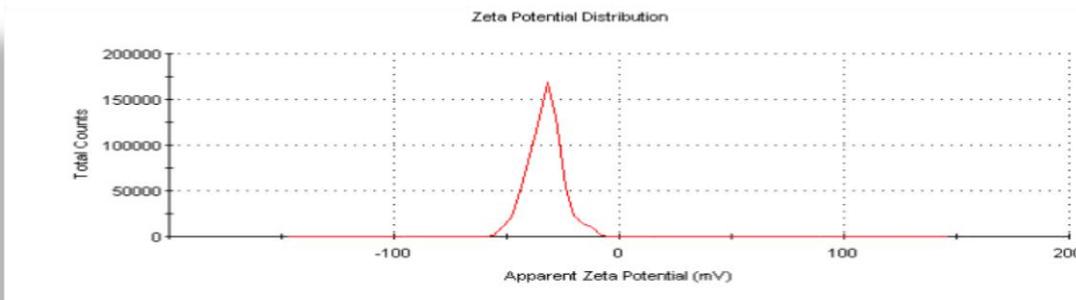
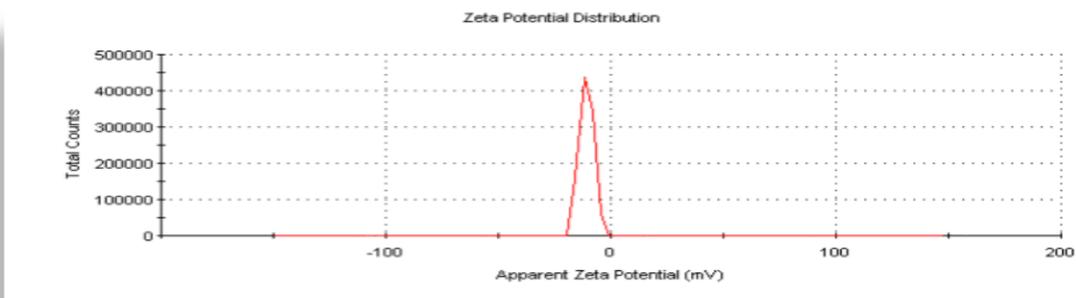


Figura 13. Potencial Z representativo de las NPHA. Muestra los límites del intervalo de valores de potencial Z, entre -10.8 mV y -33 mV.

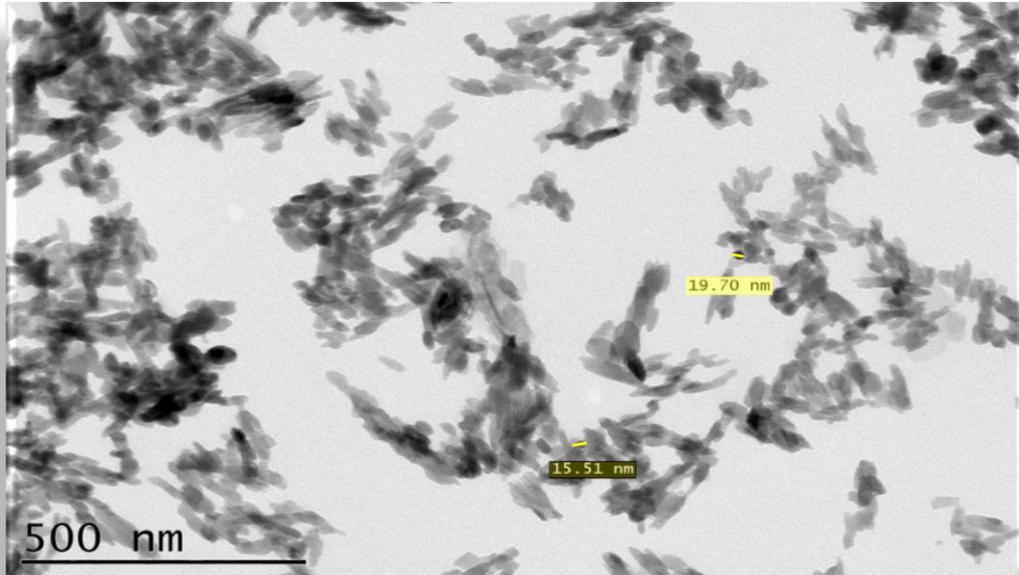


Figura 14. Micrografía de NPHA con microscopio electrónico de transmisión (TEM) a 12X. En amarillo se resalta el ancho de dos NPHA.

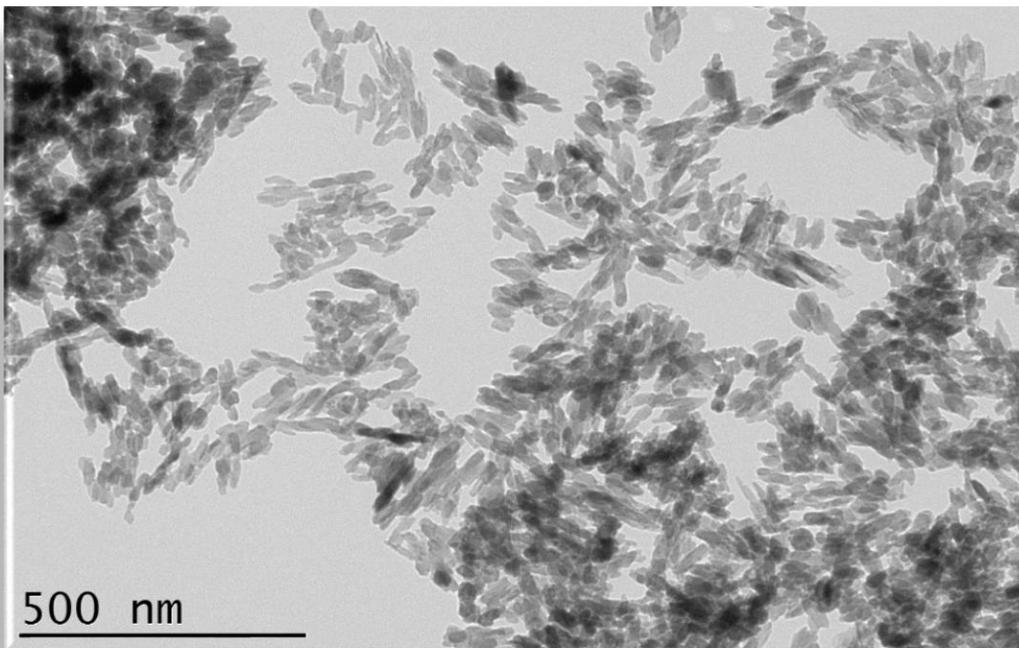


Figura 15. Micrografía de NPHA por medio de TEM a 12X. Se aprecia la forma definida de hoja que poseen las NPHA.

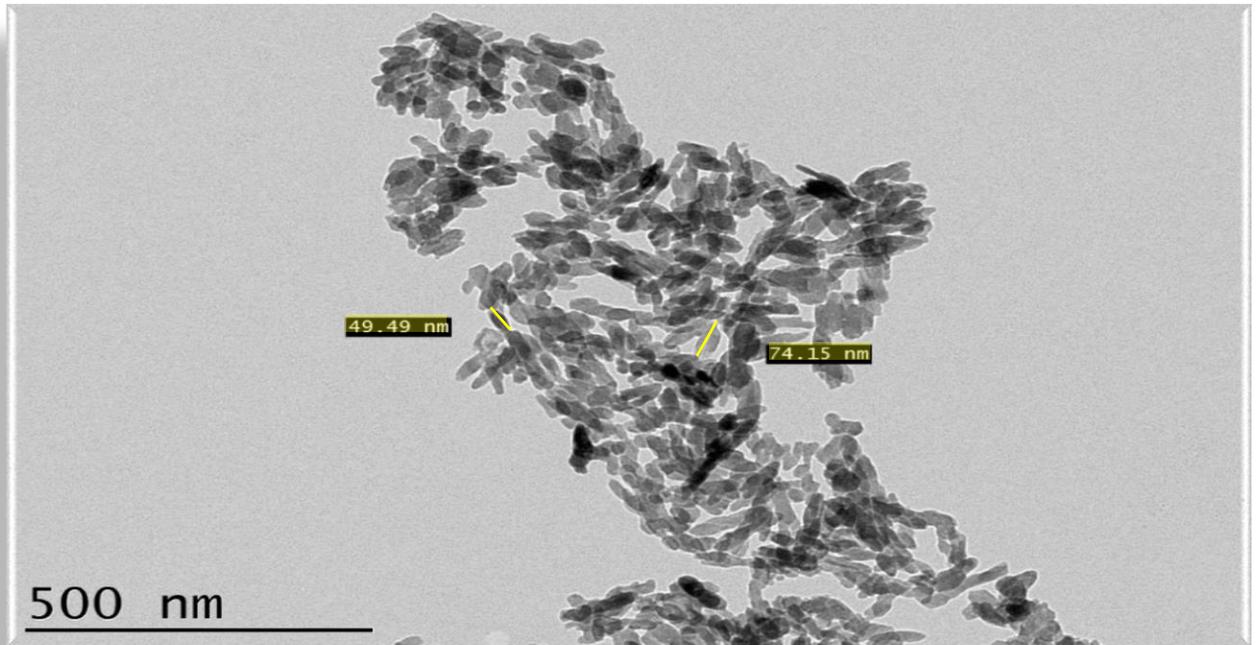


Figura 16. Micrografía tomada con TEM a 12X. Se observa tamaño y forma de las NPHA y en amarillo se muestran la longitud de dos NPHA.

2.5.3. Caracterización mediante FTIR

Se realizó la caracterización mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) para determinar los grupos funcionales presentes en la muestra de las NPHA y corroborar así su composición química ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$). Los resultados se observan en la Figura 17.

Las vibraciones del tipo de flexión del enlace P-O del grupo fosfato se observan a $1087\text{-}1032\text{ cm}^{-1}$ (472.8 , 567.1 , 604.8 , 964.8 y 1028.4 cm^{-1}); y las vibraciones del enlace O-P-O se observan de 602 a 462 cm^{-1} . También se observa la presencia de CO_3^{2-} a 1418.3 y 877.6 cm^{-1} que se forma al reaccionar con el CO_2 atmosférico que se incorpora durante la síntesis de la hidroxiapatita. La flexión del grupo OH en la estructura de la hidroxiapatita se observa a 3275 y 1639.2 cm^{-1} .

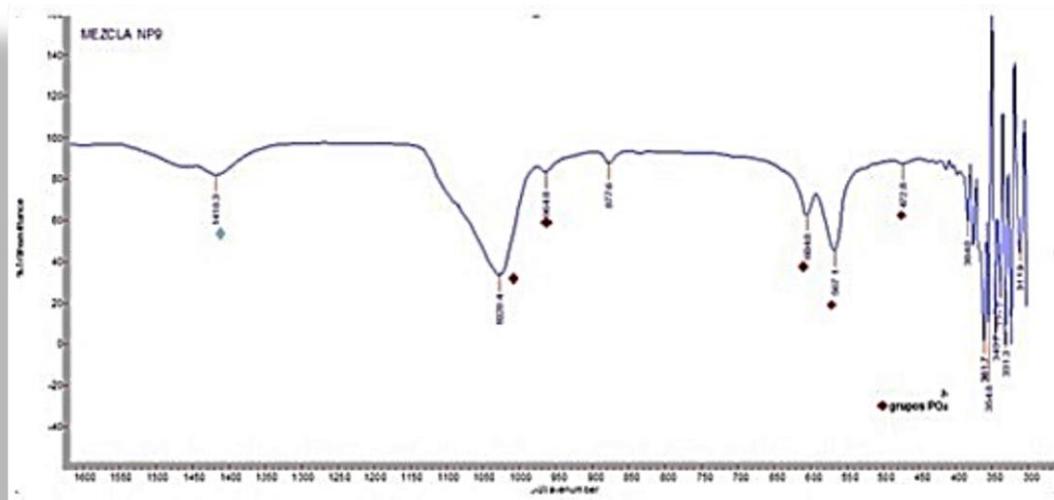


Figura 17. Espectro infrarrojo con transformada de Fourier perteneciente a una muestra de NPHA (1600-300nm). Los rombos oscuros muestran la presencia de grupos fosfato.

2.5.4. Caracterización mediante difracción de rayos X (DRX)

Para comprobar que las partículas son cristalinas y que se sintetizó hidroxiapatita, se hizo un análisis de rayos X. El difractograma muestra un compuesto con estructura cristalina. Se observan tres picos característicos de la hidroxiapatita: 2.79 Å, 3.45 Å y 1.84 Å, así como otros compuestos. A continuación se muestra el espectro de difracción de rayos X que se obtuvo (Figura 18). El tiempo de calentamiento fue suficiente para lograr la cristalización del precursor amorfo de hidroxiapatita.

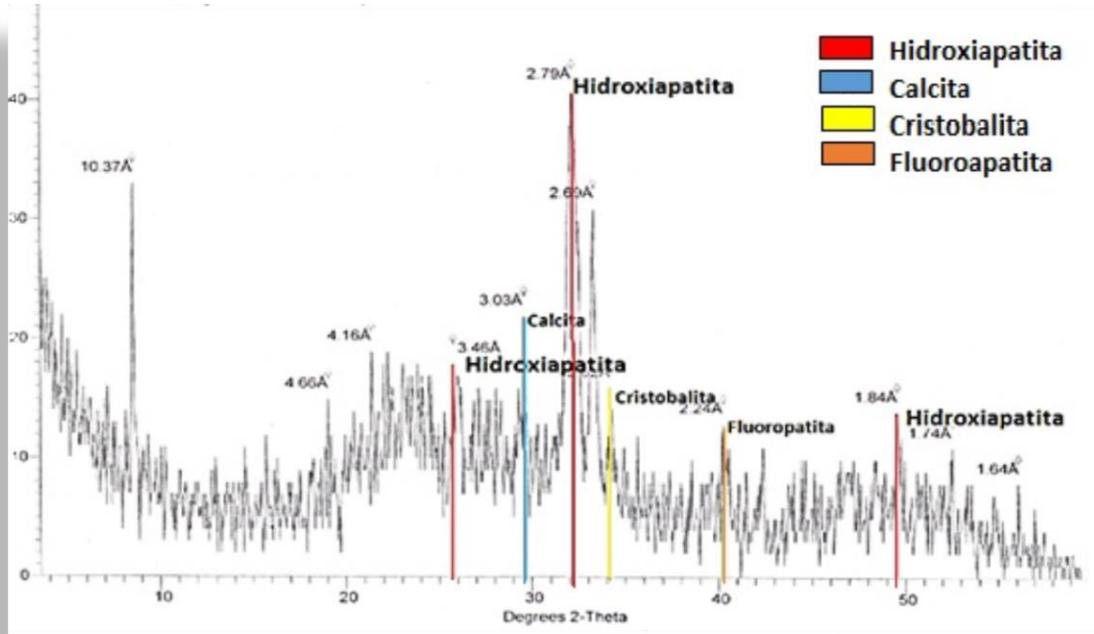


Figura 18. Espectro de difracción de rayos X de una muestra de NPHA. La hidroxiapatita exhibe tres picos característicos en rojo (2.79 Å, 3.45 Å y 1.84 Å). Compuestos distintos aparecen en otros colores.

2.5.5. Biomasa bacteriana

La Figura 19 muestra el crecimiento bacteriano que se midió indirectamente como absorbancia ($A_{600 \text{ nm}}$), de las cepas que se evaluaron durante la cinética de interacción BSP-NPHA. A los 5 días, se observaron diferencias significativas entre la biomasa bacteriana que desarrollaron las cepas con distinta fuente de fósforo. Las bacterias en RF produjeron significativamente mayor biomasa que las que se encontraba en medio con NPHA como fuente de fósforo (Figura 19a).

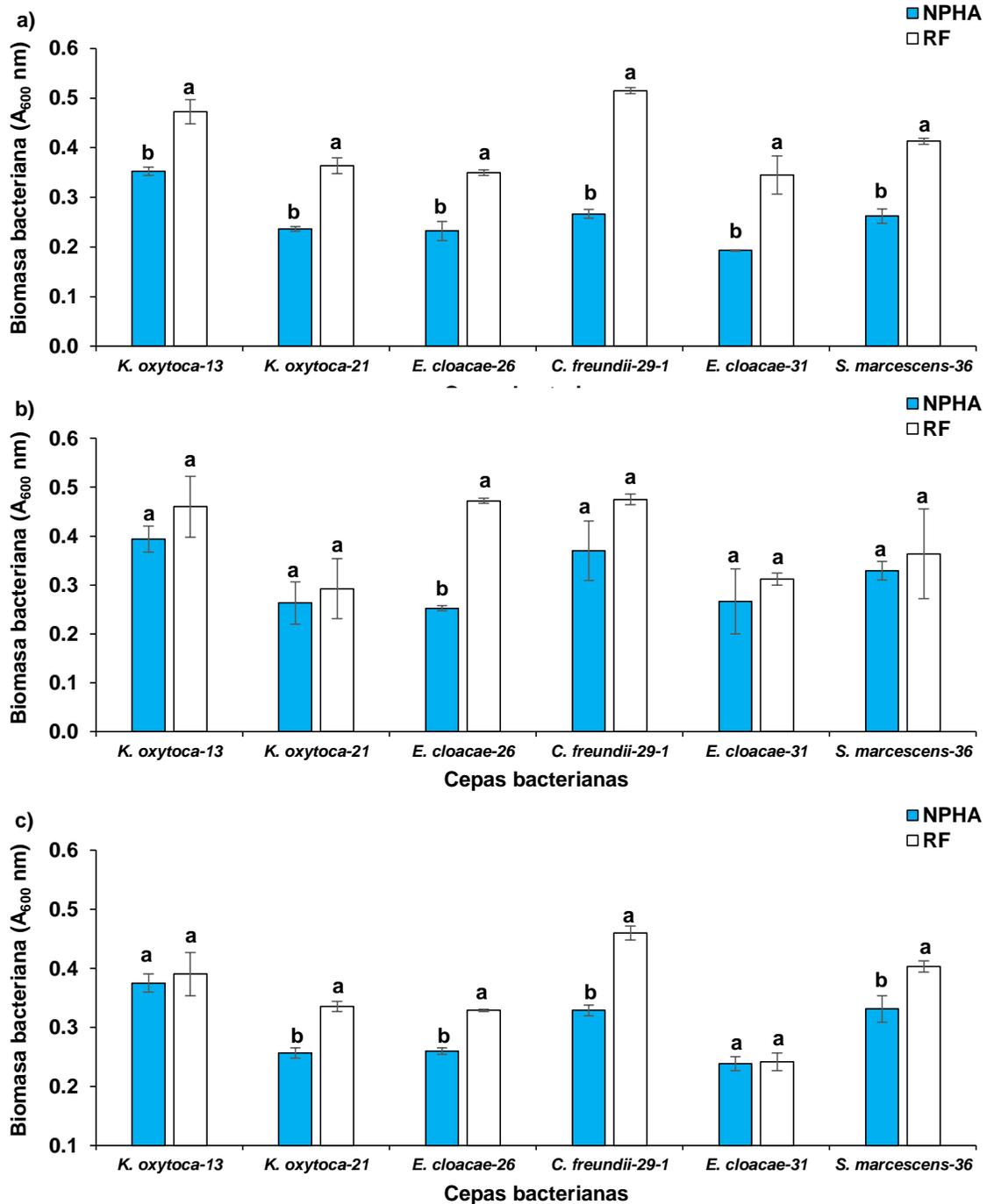


Figura 19. Biomasa (expresada como absorbancia) comparativa entre cepas bacterianas con fertilizaciones distintas (BSP-NPHA y BSP-RF) y en diferentes fechas de evaluación. A los a) 5, b) 10 y c) 20 días de incubación. Las barras representan promedio y la desviación estándar (n=3). Diferentes letras muestran diferencias significativas entre cepas ($\alpha = 0.05$).

En la segunda evaluación (10 di), la mayoría de las cepas presentaron estadísticamente la misma proporción de biomasa bacteriana con NPHA que con RF como fuente de fósforo, excepto *E cloacae*-26, la cual tuvo menor cantidad de biomasa con NPHA que con RF. A los 20 di, la mayoría de las cepas bacterianas, excepto *E. cloacae*-31, que se encontraban en medio de cultivo con RF registraron biomazas mayores que con NPHA (Figura 19c). En la Figura 20 se comparan las biomazas de los tres días que se evaluó la interacción en cada cepa. En el tratamiento con RF, *E. cloacae*-26 registró biomasa significativamente más alta ($\alpha = 0.05$) a los 10 di. En *E. cloacae*-31, se observó un descenso paulatino de biomasa respecto al tiempo. De las bacterias que se trataron con NPHA, solo la cepa *S. marcescens*-36 presentó diferencias significativas con respecto al día de evaluación. A los 5 di se reportó el menor crecimiento bacteriano con respecto al resto de las evaluaciones.

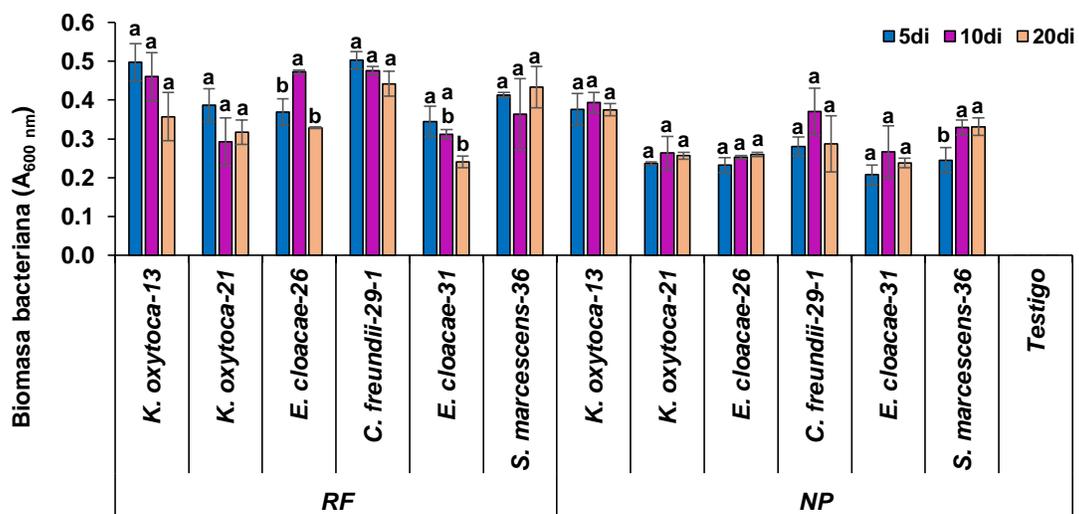


Figura 20. Biomasa bacteriana comparativa entre fechas de muestreo de seis bacterias y diferente fuente de fósforo. Las barras representan el promedio y la desviación estándar (n=3). Diferentes letras muestran diferencias significativas entre fechas de muestreo ($\alpha = 0.05$).

2.5.6. Concentración de fósforo soluble

La Figura 21 muestra las concentraciones de fósforo soluble de las seis cepas que se evaluaron. A los 5 di, tres cepas presentaron diferencias significativas en la solubilización de fósforo con fuentes distintas de este elemento (*K. oxytoca*-21, *C. freundii*-29-1 y *E. cloacae*-31), mientras que las tres restantes (*K. oxytoca*-13, *E. cloacae*-26 y *S. marcescens*-36) produjeron estadísticamente la misma cantidad de fósforo soluble con ambos tratamientos (Figura 21a). A los 10 di se observó que las cepas *K. oxytoca*-13, *E. cloacae*-26, *E. cloacae*-31 y *S. marcescens*-36 obtuvieron significativamente mayor cantidad de fósforo soluble con RF como fuente de fósforo, que con NPHA. En cambio las cepas *K. oxytoca*-21 y *C. freundii*-29-1 obtuvieron valores semejantes en ambos tratamientos (Figura 21b).

A los 20 di, el fósforo soluble generado por la mayoría de las cepas fue superior con el tratamiento de RF sobre el de NPHA, sin embargo *C. freundii*-29, obtuvo concentración similar entre ambos tratamientos (Figura 21c). En la Figura 22 se compara la concentración de fósforo soluble de cada cepa en tres diferentes tiempos de evaluación y bajo diferente fuente de fósforo. Las cepas que se trataron con NPHA no presentaron diferencias significativas en la concentración de fósforo soluble entre las distintas evaluaciones. Sin embargo, casi todas las cepas que recibieron tratamiento con RF presentaron diferencias significativas, excepto la *E. cloacae*-31. Las bacterias que mostraron diferencias significativas del tratamiento con RF tienen en común que la mayor concentración de fósforo soluble la registraron a los 10 di y 20 di (*K. oxytoca*-21 y *E. cloacae*-26), mientras que las bacterias *K. oxytoca*-13, *C. freundii*-29-1 y *E. cloacae*-36 solo a los 20 di.

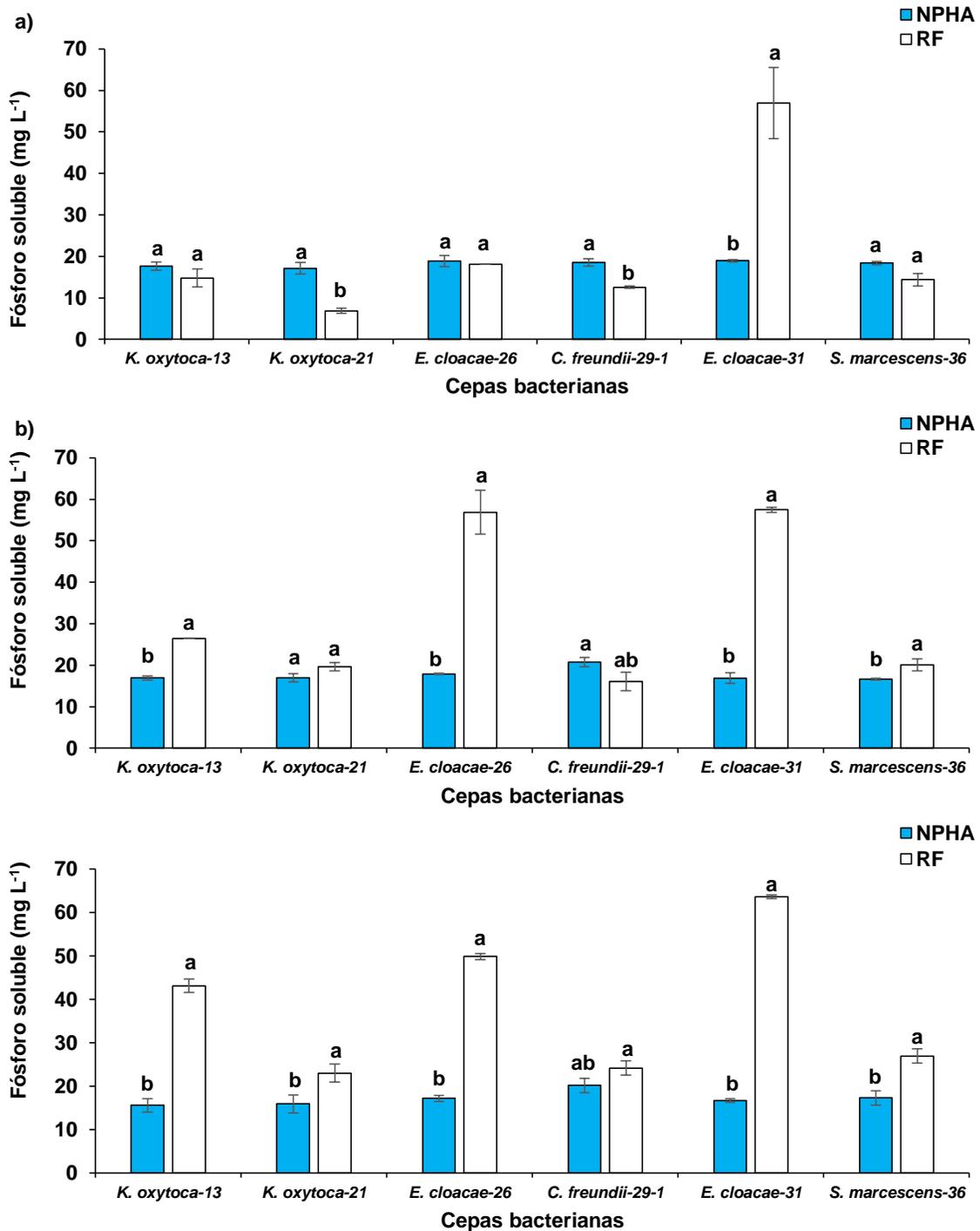


Figura 21. Comparación de fósforo soluble entre tratamientos (BSP-NPHA y BSP-RF), por cada cepa bacteriana y tiempo de evaluación. a) 5, b) 10 y c) 20 días de incubación. Las barras representan promedio y la desviación estándar (n=3). Diferentes letras muestran diferencias significativas entre bacterias ($\alpha = 0.05$).

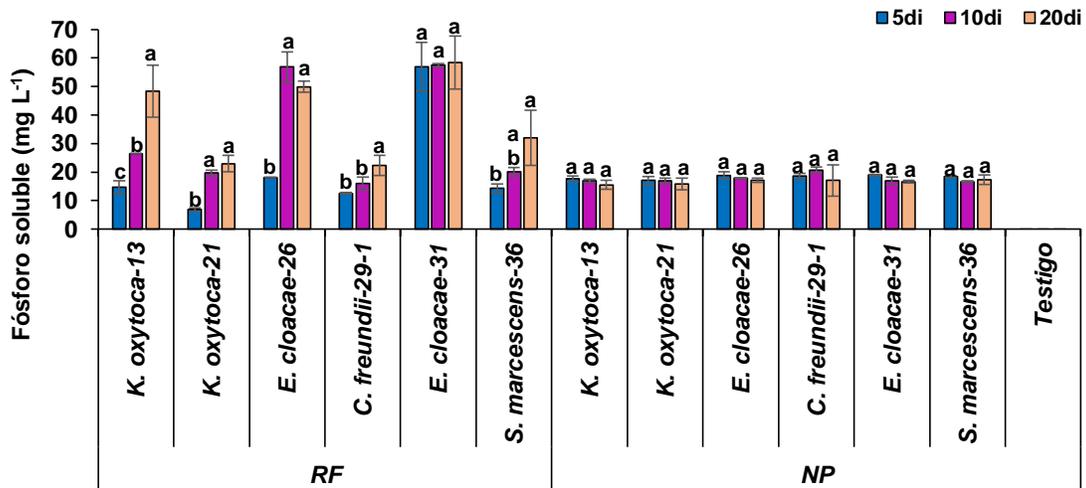


Figura 22. Concentración de fósforo soluble comparativo en las tres fechas de evaluación por cada cepa y fuente de fertilización. Las barras representan el promedio y la desviación estándar (n=3). Diferentes letras muestran diferencias significativas entre fechas de evaluación ($\alpha = 0.05$).

2.5.7. Concentración porcentual de fósforo soluble

En la Figura 23 se muestra el porcentaje de solubilización de fósforo calculado a partir de la concentración de fósforo en solución en cada unidad experimental, medido después de la incubación. Por tal motivo, los porcentajes de fósforo soluble en tratamiento con NPHA se aprecian superiores a los porcentajes del tratamiento con RF. Aunque las concentraciones de fósforo soluble expresado en mg L⁻¹ lucen más elevadas en el tratamiento con RF que con NPHA. Las cepas bacterianas *E. cloacae-31* y *E. cloacae-26* alcanzaron los porcentajes más altos de solubilización de fósforo para el tratamiento con RF en cada evaluación. Los porcentajes de los tratamientos con RF aunque si incrementaron paulatinamente a lo largo de las evaluaciones, solo alcanzaron a solubilizar 8.4% de fósforo mientras que en el caso de las cepas bacterianas que se trataron con NPHA alcanzaron 78% de fósforo solubilizado.

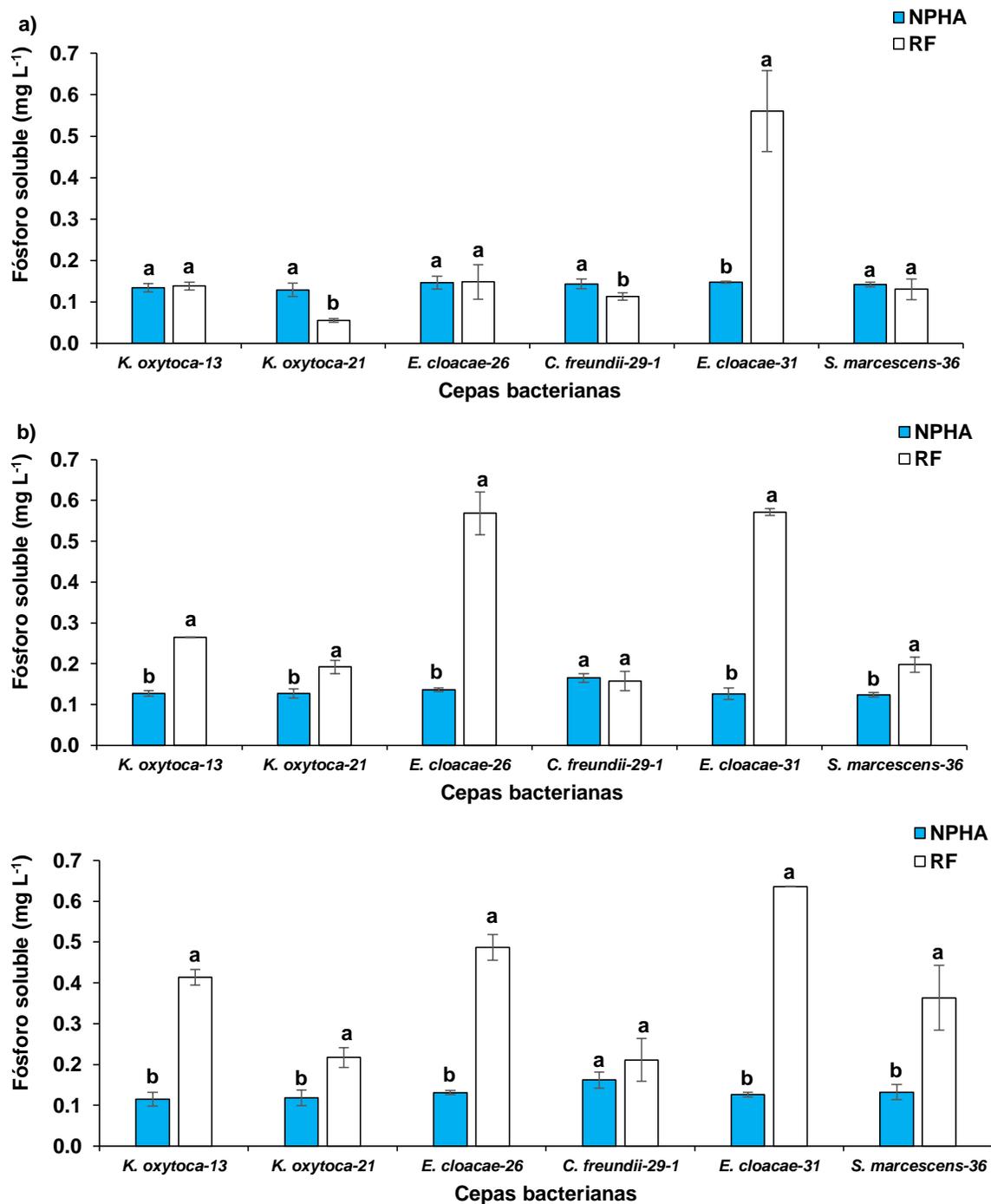


Figura 23. Porcentaje de fósforo solubilizado por cepa bacteriana, a los 5 (a), 10 (b) y 20 (c) días de incubación en medio NBRIP modificado. Las barras representan el promedio y la desviación estándar (n=3). Diferentes letras muestran diferencias significativas entre cepas ($\alpha = 0.05$).

En la Figura 24 se observa la comparación entre porcentajes de solubilización de fósforo por cepa y tratamiento. Las cepas que se trataron con RF mostraron diferencias significativas en la concentración porcentual de fósforo con respecto al día de muestreo, excepto *E. cloacae*-31 y *S. marcescens*-36. Dos de las cuatro cepas tratadas con RF tuvieron mayor porcentaje de solubilización de fósforo a los 10 di y 20 di (*K. oxytoca*-21 y *E. cloacae*-26), en tanto dos de ellas solo lo alcanzaron a los 20 di (*K. oxytoca*-13 y *C. freundii*-29-1). En cambio, en las cepas cuyo tratamiento fueron las NPHA, no observaron diferencias significativas por día de evaluación, excepto la cepa *S. marcescens*-36.

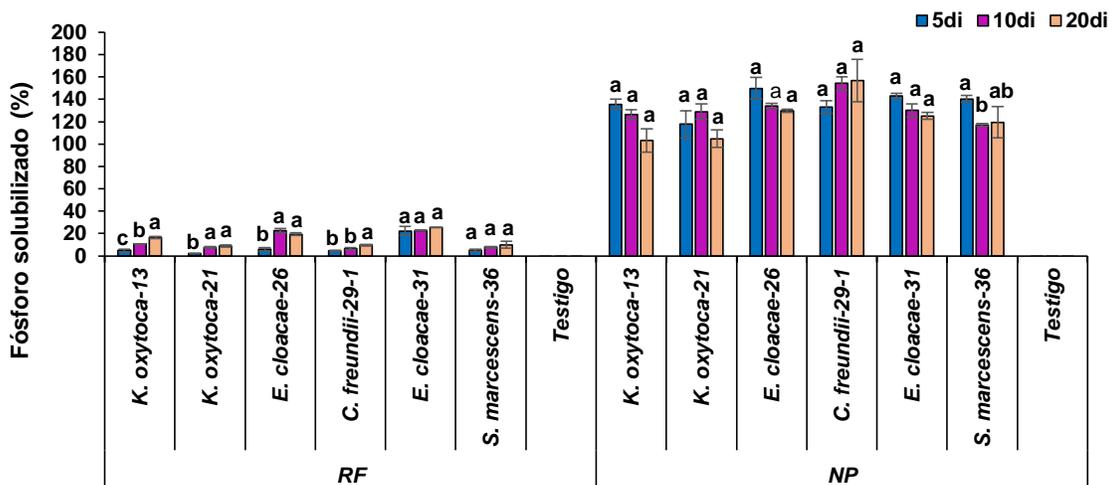


Figura 24. Porcentaje de fósforo solubilizado entre fechas de muestreo y por cada cepa bacteriana. a) 5, b) 10 y c) 20 días de incubación. Las barras representan el promedio y la desviación estándar (n=3). Diferentes letras muestran diferencias significativas entre días de evaluación ($\alpha = 0.05$).

2.5.8. Calcio soluble

Hay una relación aproximada de 1.67 entre la fracción molar de Ca y P en la estructura de la hidroxiapatita, esto hace que ambos elementos estén correlacionados.

La Figura 25 muestra la concentración de calcio soluble que se obtuvo al analizar el MCLPC de cada cepa bacteriana y tiempo de evaluación durante la cinética de interacción BSP-NPHA y BSP-RF. A los 5 di se observó que todas las cepas que se estudiaron mostraron mayor concentración de calcio soluble con el tratamiento de RF que con el de NPHA (Figura 25a).

Sin embargo, a los 10 di, ninguna de las cepas bacterianas presentó diferencias estadísticas en la concentración de calcio entre tratamientos (Figura 25b). A los 20 di cada cepa que se evaluó, volvió a registrar menor concentración de calcio soluble con ambos tratamientos, aunque RF con mayor concentración de calcio soluble que NPHA (Figura 25c).

En la Figura 26 se comparan las concentraciones de calcio solubilizado en cada tratamiento durante los 5, 10 y 20 di. No se observaron diferencias significativas entre el calcio soluble del medio de las cepas *K. oxytoca*-21, *C. freundii*-29-1, *E. cloacae*-31 y *S. marcescens*-36 tratadas con RF, en ninguna de las evaluaciones.

Por otra parte, todas las cepas que se trataron con NPHA presentaron diferencias estadísticas a los 10 días, cuando las NPHA liberaron la mayor cantidad de calcio soluble. Mientras que los días de evaluación 5di y 20 di fueron significativamente similares en concentración de calcio soluble.

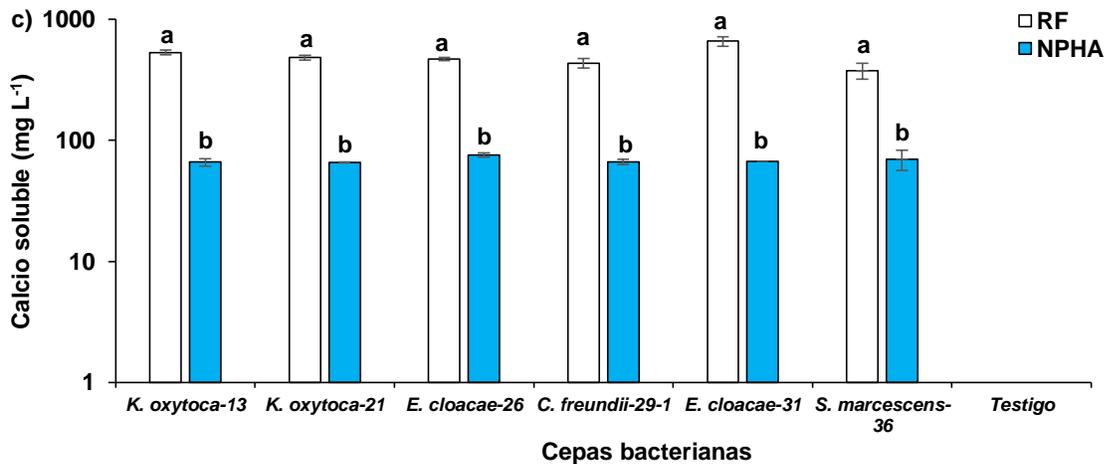
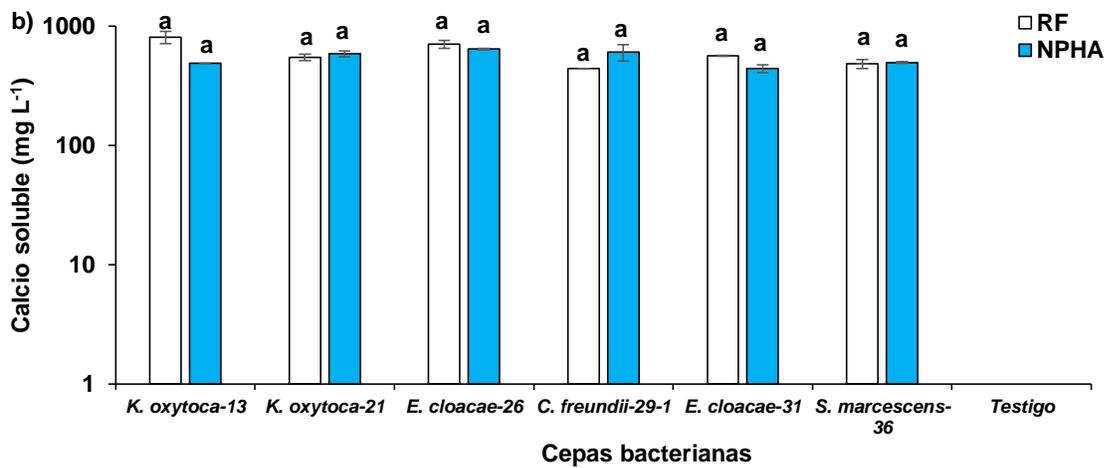
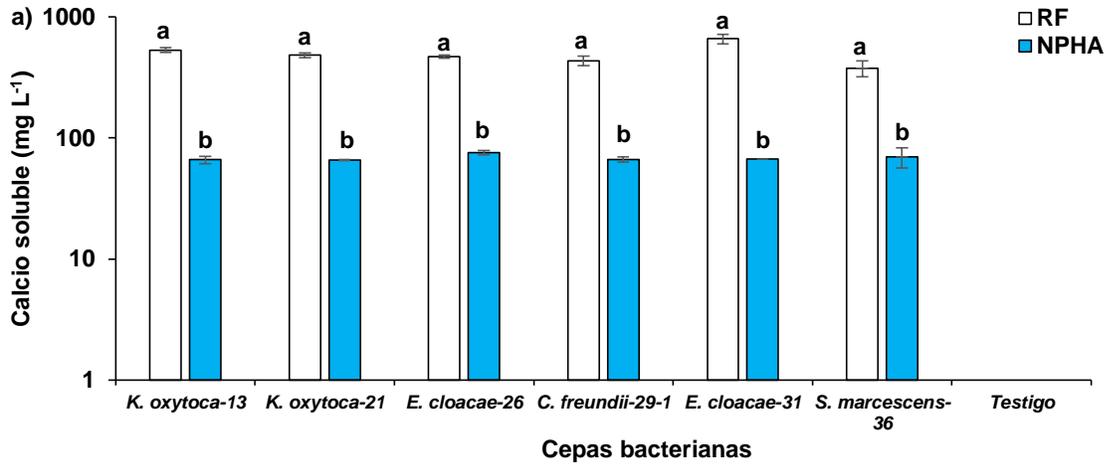


Figura 25. Concentración comparativa de calcio soluble de tres evaluaciones en seis cepas bacterianas con dos fuentes de fósforo. Las barras representan el promedio y la desviación estándar (n=3). Diferentes letras muestran diferencias significativas entre cepas ($\alpha = 0.05$).

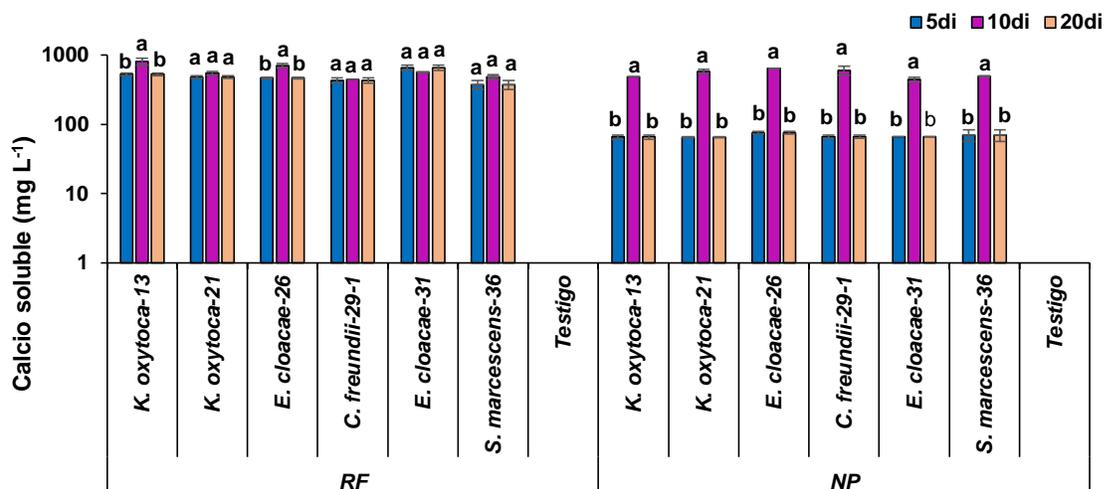


Figura 26. Concentración de calcio soluble de seis cepas entre fechas de evaluación y diferentes fuentes de fósforo. Las barras representan el promedio y la desviación estándar (n=3). Diferentes letras muestran diferencias significativas en el tiempo de incubación ($\alpha = 0.05$).

2.5.9. pH

En la Figura 27 se muestra el pH que se registró en el medio de cultivo durante la interacción BSP-NPHA y BSP-RF, a los 5 di, 10 di y 20 di. Se observaron diferencias significativas respecto al tratamiento desde los 5 días. Los valores de pH fueron más altos en el medio adicionado con RF (pH de 4.1 a 4.6) en comparación con NPHA (pH de 3.7 a 3.9; Figura 27a). Mientras que a los 10 di, no se observaron diferencias significativas de pH entre tratamientos para ninguna de las cepas que se evaluaron (27b). En la última evaluación a los 20 di, solo las cepas *E. cloacae-26* (pH de 4.1) y *C. freundii-29-1* (pH de 4.3) obtuvieron valores de pH estadísticamente semejantes con el tratamiento de RF y el tratamiento con NPHA, el resto de las cepas bacterianas fueron significativamente diferentes entre tratamientos (Figura 27c). Esto implica una fuerte capacidad acidulante del medio por parte de las bacterias, lo que implicaría que el principal mecanismo de solubilización de fósforo es por acidificación.

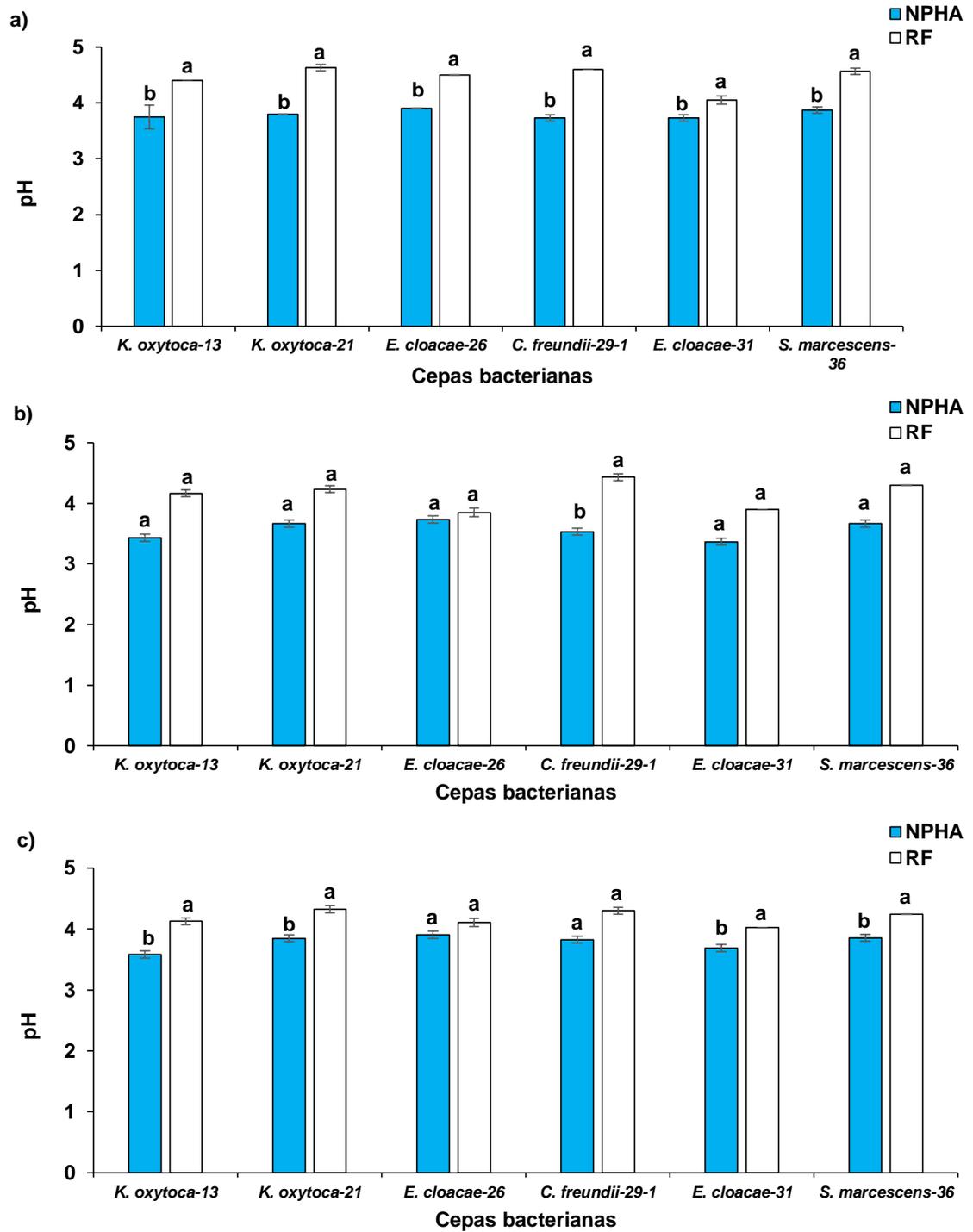


Figura 22. pH comparativo de seis cepas bacterianas con dos fuentes de fósforo en tres muestreos. Las barras representan el promedio y la desviación estándar (n=3). Diferentes letras muestran diferencias significativas entre cepas bacterianas ($\alpha = 0.05$).

El pH que se obtuvo en las tres etapas de evaluación durante la interacción BSP con distintas fuentes de fósforo se muestra en la Figura 28. Bajo el tratamiento con RF todas las cepas bacterianas mostraron diferencias significativas entre los muestreos, aunque todas coincidieron en que a los 5 di presentaron el valor más alto de pH (4.1 a 4.6). De las seis bacterias que se expusieron a NPHA, se observaron diferencias significativas en el pH de los diferentes muestreos y en todas hubo acidificación del medio (entre 3.7 y 3.4) a los 10 di. En tanto que a los 5 di y 20 di presentaron su valor más alto.

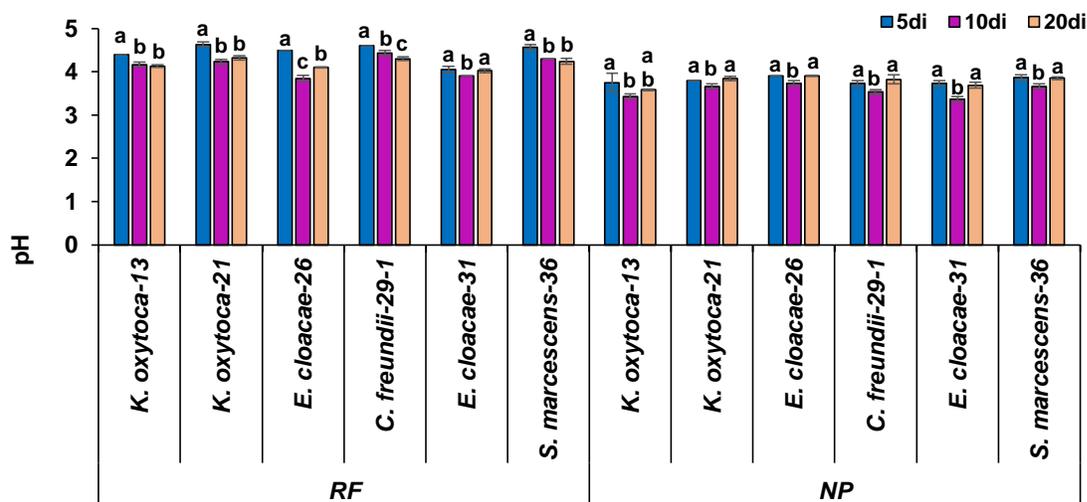


Figura 28. Reacción en el medio de crecimiento de seis cepas bacterianas a los 5, 10 y 20 días de incubación con distinta fuente de fósforo. Las barras representan el promedio y la desviación estándar (n=3). Diferentes letras muestran diferencias significativas entre muestreos con la misma bacteria en cada una de las dos fuentes de fósforo ($\alpha = 0.05$).

2.6.0. CE

En la Figura 29 se presenta la CE que se registró en el MCLPC durante las evaluaciones por bacteria y fuente de fósforo a los 5, 10 y 20 días de incubación. Durante la primera evaluación, el medio de crecimiento de la mitad de las cepas (*K. oxytoca*-13, *E. cloacae*-26 y *S. marcescens*-36) registró diferencias significativas con respecto a la fuente de fósforo.

Los valores de CE fueron mayores en el tratamiento de RF; en tanto que la otra mitad (*K. oxytoca*-21, *C. freundii*- 29-1 y *E. cloacae*-31) de las cepas bacterianas no presentó diferencias estadísticas en relación a la fuente de fósforo adicionada (Figura 29a).

A los 10 di, la CE de las cepas *K. oxytoca*-21, *E. cloacae*-26, *E. cloacae*-31 y *S. marcescens*-36 fue significativamente más altas con el tratamiento con RF; en cambio *C. freundii*-29-1 desarrolló mayor CE con NPHA como fuente de fósforo y solo para *K. oxytoca*-13 el tratamiento no fue relevante para la CE (Figura 29b). A los 20 di, solo *K. oxytoca*-13 y *C. freundii*-29-1 mostraron CE estadísticamente semejantes con RF que con NPHA, ya que el resto de las cepas obtuvieron CE más altas con RF que con NPHA (Figura 29c).

En la Figura 28 compara la CE en las tres fechas de evaluación: 5 di, 10 di y 20 di. Del grupo de bacterias que se trataron con RF, solo la cepa *K. oxytoca*-13 mostró diferencias estadísticas respecto al tiempo de muestreo, ya que a los 5 di, tuvo CE significativamente más alta (5.9 dS m^{-1}) que en el resto de los muestreos. La mitad de las cepas que se evaluaron con NPHA presentaron diferencias significativas en la CE entre los muestreos (*K. oxytoca*-13, *E. cloacae*-31, *S. marcescens*-36). Esto sugiere una fuerte dinámica en el cambio de sales solubles en el medio.

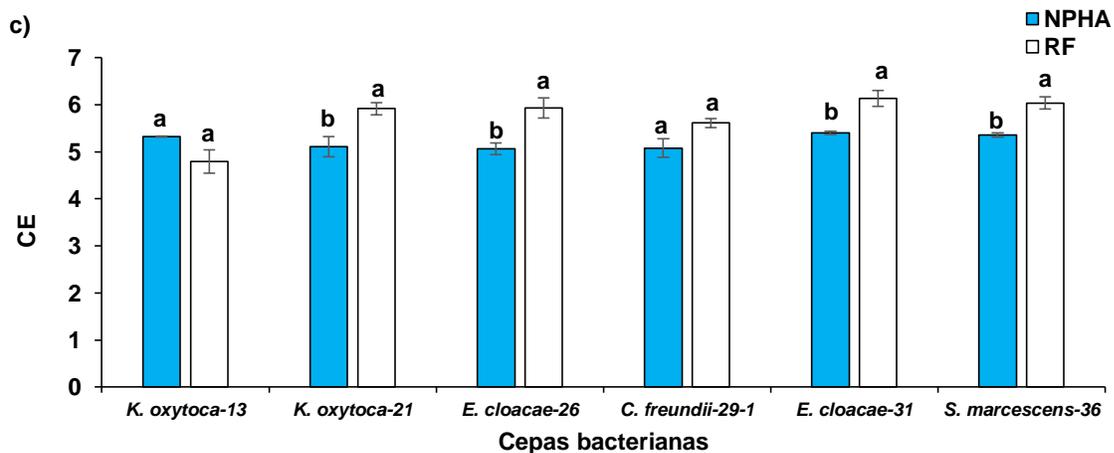
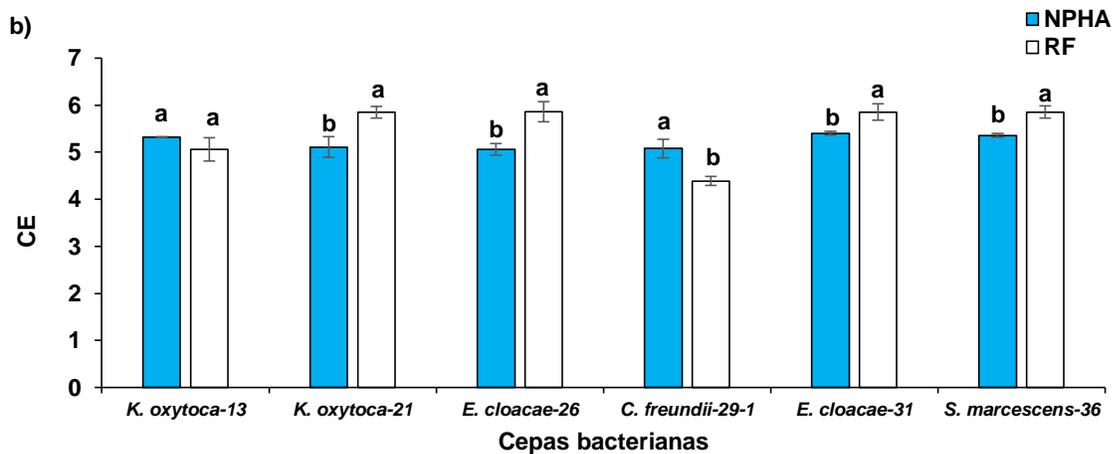
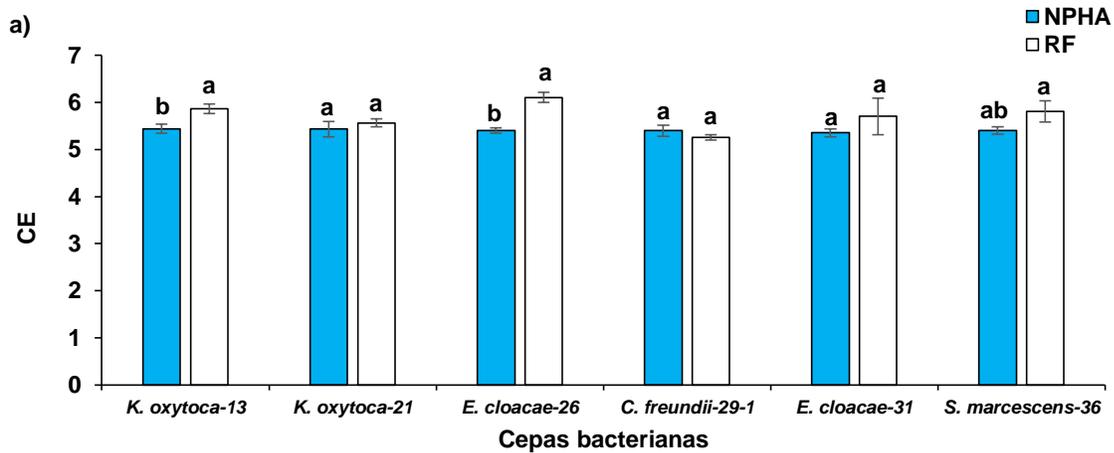


Figura 29. Conductividad eléctrica (dS m^{-1}) de seis cepas con dos tratamientos de fertilización en tres muestreos. Las barras representan el promedio y la desviación estándar ($n=3$). Diferentes letras muestran diferencias significativas entre cepas bacterianas ($\alpha = 0.05$).

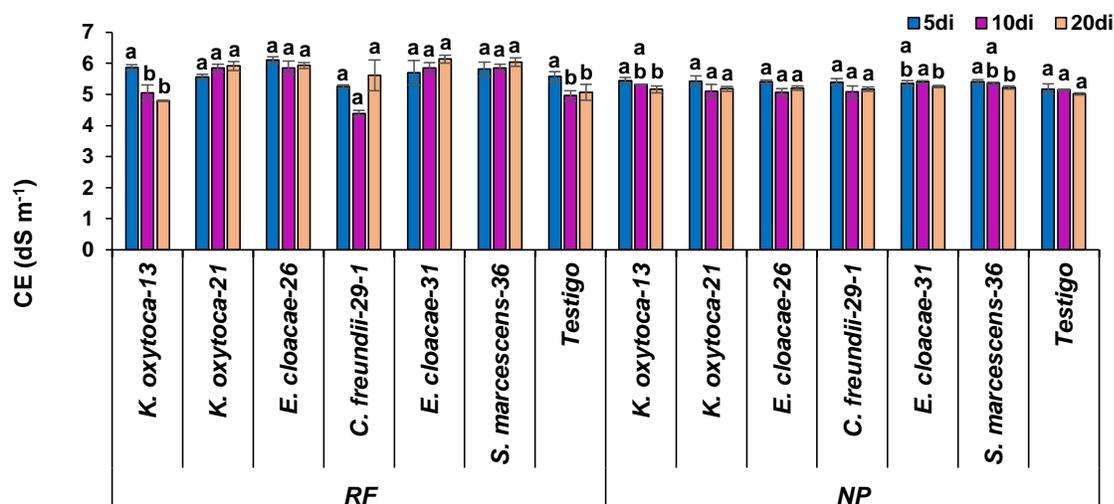


Figura 30. Conductividad eléctrica por cada cepa bacteriana y fuente de fósforo entre las diferentes fechas de muestreo. Las barras representan el promedio y la desviación estándar (n=3). Diferentes letras muestran diferencias significativas entre CE de distintas fechas de muestreo ($\alpha = 0.05$).

A continuación se presentan los Cuadros 7 y 8 que resumen los coeficientes de correlación de Pearson más trascendentales para la fase II de la investigación. La primera columna indica el tratamiento y detalla las fechas de evaluación a las que hacen referencia los coeficientes de correlación de Pearson. Las variables aparecen a partir de la segunda evaluación.

Cuadro 7. Coeficientes de correlación de Pearson entre variables de respuesta que se evaluaron en la interacción BSP-RF como fuente de fósforo.

	5 di	10 di	20 di
P: Ca	0.66	0.58	0.69
Ca: biomasa	0.50	0.85	0.45
pH: biomasa	-0.53		-0.70
CE: biomasa		0.55	
P: CE		0.53	
Ca: CE		0.54	0.58

Cuadro 8. Coeficientes de correlación de Pearson entre variables de respuesta que se evaluaron en la interacción BSP-NPHA como fuente de fósforo.

	5 di	10 di	20 di
P: biomasa	0.83	0.86	0.77
P: Ca	0.56		
P: pH	-0.80	-0.93	
P: CE	0.64	0.52	0.60
pH: biomasa	-0.89	-0.88	-0.52
CE: biomasa	0.56	0.50	
Ca: CE	0.53		
pH: CE			0.73

2.6. DISCUSIÓN

Las NPHA que se sintetizaron específicamente para esta investigación fueron producto de la optimización al método de síntesis por precipitación química que reportó Ortiz (2017). En la presente investigación se logró reducir el tiempo de síntesis, se disminuyó el tamaño y forma de partícula, así como la cantidad de reactivos que se utilizaron. En el presente estudio se obtuvieron diámetros hidrodinámicos de $72.27 \text{ nm} \pm 1.0 \text{ nm}$, $127.6 \text{ nm} \pm 4.0 \text{ nm}$, $137.5 \text{ nm} \pm 18.0 \text{ nm}$, para las soluciones a 5700 mg L^{-1} , 2850 L^{-1} y 1425 L^{-1} respectivamente. Lo cual se asemeja a los tamaños de diámetro hidrodinámico reportados por Marchiol *et al.* (2019) de $94.0 \pm 1.3 \text{ nm}$, $96.4 \pm 1.0 \text{ nm}$, $109.0 \pm 4.2 \text{ nm}$ y $163.3 \pm 25.7 \text{ nm}$ para las soluciones a 2000 mg L^{-1} , 200 mg L^{-1} , 20 mg L^{-1} y 2 mg L^{-1} , respectivamente.

Con respecto a la forma de las NPHA Sadat-Shojai *et al.* (2013) reportaron formas diversas elaboradas por el método de precipitación química, entre ellas: forma de plato, hojuelas y hojas. Los autores también reportaron las medidas que observaron en las NPHA: de 40 nm a 50 μm de longitud, de 20 nm a 35 μm de ancho y de 5 nm a 3 μm de grosor. Además Marchiol *et al.* (2019) también reportaron forma semejante a la observada en el presente estudio: forma de plato y con tamaño de 35-45 nm, en las NPHA que sintetizaron por precipitación química y visualizaron por TEM.

En este trabajo las NPHA que se sintetizaron por el mismo método midieron menos de 100 nm en cualquiera de sus caras y presentaron forma de hoja (Figuras 14, 15 y 16), tal como mencionan Sadat-Shojai *et al.* (2013) y Marchiol *et al.* (2019). El tamaño y la forma de las nanopartículas esta relacionan con el procedimiento de síntesis. Y es afectado por factores como la temperatura de síntesis, la energía cinética y las concentraciones de los reactivos usados (Du *et al.* 2013). La importancia de la homogeneidad del tamaño de partícula es importante ya que repercutirá directamente sobre la uniformidad de la reacción.

En el presente estudio las vibraciones del tipo flexión del enlace P-O del grupo fosfato se observan a 1087-1032 cm^{-1} ; y las vibraciones del enlace O-P-O se observan de 602 a 462 cm^{-1} de acuerdo con Kim *et al.* (2002) y Marchiol *et al.* (2019) quien encontró que los espectros FT-IR de nHA mostraron las bandas de vibración características de la hidroxiapatita, como las bandas de vibración PO_4^{3-} apatéticas en 560–603, 962, 1000–1104 cm^{-1} .

En cuanto a las interacciones y las distintas fuentes de fósforo (RF y NPHA), fue notable que las cepas *C. freundii*-29-1 y *K. oxytoca*-13 produjeran en cada evaluación gran cantidad de biomasa sin importar el tratamiento o el tiempo de incubación. Sin embargo, *E. cloacae*-31 fue el caso contrario, pues su biomasa siempre fue reducida sin importar el tratamiento ni el tiempo de evaluación.

La bacteria *E. cloacae*-31, a pesar de su pequeña producción de biomasa en ambos tratamientos (Figura 19), fue la cepa que presentó la mayor solubilización de fósforo bajo la interacción BSP-RF (Figura 21). Este comportamiento quizá pueda explicarse tomando en cuenta la observación de Rathore (2014a), quien menciona que la menor producción de biomasa bacteriana puede ser más favorable para la producción de los metabolitos responsables de la solubilización de fósforo. Probablemente se refiera a que energéticamente convenga más a la célula invertir en la síntesis de metabolitos que coadyuven en la obtención de recursos (fósforo), que invertir en la síntesis de biomasa que solo implicará mayor costo energético. Además estos metabolitos, que no se pueden separar fácilmente de la fracción soluble de fósforo, pueden interferir durante la determinación del fósforo por colorimetría.

Por lo que sería recomendable explorar otros procedimientos que eliminaran estas interferencias y mejorar la exactitud en este tipo de experimentos. Tal inferencia puede apoyarse en el coeficiente de correlación entre biomasa y concentración de fósforo soluble (Cuadros 7 y 8), el cual fue significativo a los 10 di ($r= 0.5$) para el tratamiento con RF y altamente significativo a lo largo de la interacción ($r= 0.83, 0.86$ y 0.77 a los 5, 10 y 20 di, respectivamente) para las cepas que se trataron con NPHA. Sin embargo, las concentraciones de fósforo soluble no fueron comparables entre los tratamientos.

La razón por la que las concentraciones de fósforo soluble resultantes de ambas fuentes de fósforo no sean semejantes entre sí se debe en parte, a la cantidad de fósforo que incluyó cada tratamiento. Ya que el medio con RF contuvo 1g de fósforo, en tanto el medio con NPHA contenía solo la centésima parte (0.01g de fósforo), por lo que fue más rápido el proceso de solubilización en tratamientos con NPHA, pues contenían menor concentración de fósforo (0.01 g de fósforo en lugar de 1 g) que las cepas que se trataron con RF. Por otra parte, las NPHA poseen alta reactividad por el tamaño que tienen y les confiere características como elevada superficie específica que conlleva al ahorro de fertilizante (fósforo), por lo que las concentraciones entre estas dos fuentes no fueron parecidas.

E. cloacae-31 liberó la más alta concentración de fo solubles en las tres fechas de evaluación en el tratamiento con RF y solo a los 5di en el tratamiento con NPHA (Figura 21). Dado que *E. cloacae*-26 también solubilizó grandes concentraciones de fósforo en ambos tratamientos, se propone a esta cepa como inoculante para la fase experimental III. *E. cloacae*-26 también solubilizó grandes concentraciones de fósforo con RF pero solo en dos de las evaluaciones.

Park *et al.* (2011) reportaron que *E. cloacae* solubilizó 17.5 % del fósforo que se suplementó con RF en el medio de cultivo NBRIP. En contraste, en el presente trabajo *E. cloacae*-31 solubilizó 8% en el medio al que se adicionó con RF y 63% cuando se añadieron NPHA. Los autores también mencionaron que el pH del medio de cultivo descendió de 7 a 3.8 después de 14 di, mientras el testigo conservó pH entre 6.2 y 6.6.

Lo anterior concuerda con el presente trabajo, pues el pH también disminuyó de 7 a 3.9 (RF) y a 3.4 (NPHA) a los 10 di (Figura 27). El pH de las unidades experimentales no inoculadas se mantuvo en 6 durante la cinética de experimentación.

De acuerdo con Kim et al. (2002) la hidroxiapatita sintética y bien cristalizada es estable en un intervalo de pH de 4 a 12, por lo que la acidificación es un mecanismo simple y efectivo para su disolución paulatina. En la solubilización de fósforo, el pH desempeña un papel principal, lo cual se refleja en la relación inversa entre la disminución de pH y mayor concentración de fósforo que se solubiliza. Dicha relación se aprecia en el coeficiente de correlación entre pH y fósforo soluble (Cuadros 7 y 8) en los tratamientos con NPHA. Los coeficientes de correlación fueron altamente significativos en dos muestreos ($r = -0.80$ a los 5 di y -0.93 y 10 di). Sin embargo, en el caso con RF, las correlaciones no fueron significativas en ninguno de los tiempos de evaluación.

En la presente investigación *Klebsiella oxytoca-13* con RF como tratamiento, alcanzó como máxima concentración de fósforo soluble 48 mg L^{-1} a los 20 di (Figura 21c), lo cual difiere de las concentraciones reportadas por otros autores como Walpola et al. (2014), quienes observaron que *Klebsiella oxytoca* (proveniente de suelo contaminado de mina) solubilizó 615 mg mL^{-1} a partir del medio NBRIP a diferentes concentraciones.

Respecto a la concentración de calcio soluble y al tiempo de incubación, las cepas *K. oxytoca-13*, *E. cloaee-26* y *S. marcescens-36* (las dos primeras con ambos tratamientos, la última solo con NPHA) fueron las únicas bacterias que presentaron diferencias significativas. En ambos tratamientos la concentración de calcio soluble se elevó a los 10 di, aunque a los 5 di y 20 di tendió a disminuir.

Por la fluctuación en la concentración, este fenómeno se parece al proceso de solubilización de fósforo que describieron Illmer y Schinner (1992) a partir de FTC. El proceso de solubilización del FTC es cíclico e implica la precipitación y redisolución intermedia de la apatita y brushita. Cuando la brushita se disuelve, el medio alcanza concentraciones elevadas de fósforo, que al llegar a un límite altera la composición del medio y precipita en forma de cristales de apatita. La concentración de fósforo y calcio disminuyen, entonces se produce un cambio en el medio y la apatita se disuelve, la concentración de fósforo y calcio se elevan y el ciclo reinicia.

Los autores comentan que es difícil predecir este fenómeno dado que, el pH y la concentración de fósforo no siguen una curva sigmoideal (Illmer y Schinner 1992). Los mismos autores explican que las células pueden aprovechar como recurso energético la formación y solubilización secundaria de complejos órgano-fosforados, lo cual reduce la concentración de calcio y fósforo en el medio. También señalan que los incrementos y descensos en la concentración de calcio y fósforo soluble se deben a la correlación positiva que existe entre ambas variables.

En la actual investigación para los tratamientos con RF se encontraron coeficientes de correlación significativos entre fósforo y calcio solubles: $r = 0.66$ a los 5 di, $r = 0.58$ a los 10 di y $r = 0.69$ a los 20 di. Mientras que para la interacción de las BSP con NPHA, solo fue significativa la correlación para la primera evaluación ($r = 0.56$ a los 5 di). Se esperaba una relación directa entre el Ca y P solubles, ya que ambos son componentes de la roca fosfórica o de la NPHA. Así que al solubilizarse el fósforo también se libera el Ca, sin embargo el fósforo puede ser usado por los organismos que crecen en el medio para formar carbono estructural y cambiar su concentración como fósforo soluble.

El Ca también es usado por los organismos, pero en menor proporción. Lo que se refleja en las relaciones con la biomasa microbiana estimada con signo positivo. En la Figura 26 se observa que a los 10 di se registraron los valores más altos de calcio soluble para las bacterias que se trataron con NPHA, lo cual coincidió con el tiempo de evaluación en que se registró el mayor descenso de pH (Figura 26). Por lo que la solubilización de calcio y fósforo puede estar relacionada con el descenso de pH en el medio.

La disminución de la reacción en el medio implicó la disolución del fósforo. Y por ello una relación inversa entre el pH y la cantidad del fósforo disuelto, al menos en la fase log del crecimiento de la población bacteriana. La biomasa también aumentó el efecto acidulante del medio, que se reflejó en la relación negativa con el pH.

No se encontraron coeficientes de correlación significativos entre pH y calcio soluble para ninguno de los tratamientos ni tiempos de incubación, aunque, de la relación entre fósforo soluble y pH, solo fueron significativos los coeficientes de correlación de las primeras dos evaluaciones con el tratamiento de NPHA ($r = -0.80$ y -0.93 a los 5 y 10 di respectivamente).

En cuanto a la conductividad eléctrica, ambos iones (Ca^{2-} y PO_4^{3-}) contribuyeron a la conductancia específica ($0.06 \mu\text{mhos/cm}/\mu\text{eq/L}$), Dado que al aumentar los solutos incrementó la conductividad eléctrica.

Lo anterior, aunado a las diferencias significativas en pH respecto al tiempo en cada una de las cepas y tratamientos que se estudiaron (Figura 28), permite deducir que, el tiempo de incubación tuvo efecto sobre el pH del medio de cultivo (NBRIP con RF o NPHA) en presencia de BSP.

2.7. CONCLUSIONES

Pese a que las concentraciones de fósforo soluble (Figura 21) de RF fueron estadísticamente mayores a las concentraciones derivadas de NPHA. El porcentaje de solubilización de fósforo (Figura 23) fue congruente con el contenido de fósforo extractable con ácido cítrico al 2%, que fue mayor (17%) para NPHA y menor (4%) para RF. Así, los resultados mostraron que las NPHA en condiciones *in vitro* como las que se manejaron para la fase II solubilizaron significativamente mayor porcentaje de fósforo (63%) que la RF (8.4%).

La solubilización de NPHA fue más eficiente que la solubilización de RF, debido a que se obtuvo mayor concentración de fósforo soluble a partir de una menor concentración inicial de fósforo. Es decir, el tratamiento con RF partió de 1g de fósforo inicial para obtener el 8.4% de solubilización máxima. En tanto que del tratamiento con NPHA, se partió de 0.01g de fósforo para obtener el 63% de solubilización máxima.

La cepa bacteriana que solubilizó la mayor concentración de fósforo durante las tres evaluaciones fue *Enterobacter cloacae*-31 bajo el tratamiento con RF (entre 57 y 64 mg L⁻¹), además esta cepa también registró el valor más bajo de pH (4). Con base a lo anterior, se eligió a la cepa bacteriana *E. cloacae*-31 como la más eficiente en la solubilización de fósforo y para la preparación del inóculo de la Fase III. Como producto del proceso de solubilización, liberó la mayor concentración de fósforo soluble y fue una de las cepas que más acidificaron su medio de cultivo (pH 3.4 a los 10 di). Por lo tanto, se acepta la hipótesis que afirma que la interacción NPHA-BSP tuvo un efecto positivo en la solubilización de fósforo.

2.8. LITERATURA CITADA

- Adviento-Borbe, M.A.A., Doran, J.W., Drijber, R.A., Dobermann, A. 2006. Soil electrical conductivity and water content affect nitrous oxide and carbon dioxide emissions in intensively managed soils. *Journal of Environmental Quality*. 35: 1999-2010.
- Batra. L., Manna, M.C. 1997. Dehydrogenase activity and microbial biomass carbon in salt affected soils of semiarid and arid regions. *Arid Land Research and Management*. 11: 295-303.
- Beltrán, P.M.E. 2014. La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria*.15: 101-113.
- Carpenter, S.R. y Bennet, E.M. 2011. Reconsideration of the planetary boundary for phosphorus. *Environmental Research Letters*. 6 (1):011001-019502.
- Datta, M., Palit, R., Sengupta, C., Kumar, M., Banerjee, S. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria enhance growth and yield of Chilli (*Capsicum annum L.*) under field conditions. *Australian Journal of Crop Science*. 5: 531-536.
- Deepa, C.K., Dastager, S.G., Pandey, A. 2010. Isolation and characterization of plant growth promoting bacteria from non-rhizospheric soil and their effect on cowpea (*Vigna unguiculata (L.) Walp.*) seedling growth. *World Journal Biotechnology*. 26: 1233-1240.

- Dos Santos, G.S., Solidônio, E.G., Costa, M.C.V.V., Melo, R.O.A., de Souza, I.F.A.C., Silva, G.R., Sena, K.X.F.R. 2015. Study of The *Enterobacteriaceae* Group CESP (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Providencia*, *Morganella* and *Hafnia*): A review In: The battle against microbial pathogens: basic science, technological advances and educational programs. Méndez-Vilas A. Editor. Badajoz, Spain. 794-805.
- Du, L.W., Bian, S., Gou, B.D., Jiang, Y., Huang, J., Gao, Y.X., Zhao, Y.D., Wen, W., Zhang, T.L., and Wang, K. (2013). Structure of clusters and formation of amorphous calcium phosphate and hydroxyapatite: From the perspective of coordination chemistry. *Crystal Growth and Design* 13, 3103–3109.
- Edixhoven, J.D., Gupta, J., Savenije, H.H.G. 2014. Recent revisions of phosphate rock reserves and resources: a critique. *Earth Systems Dynamics*. 5:491-507.
- Goldstein, A.H., Rogers, R.D., Mead, G. 1993. Mining by microbe. *Bio. Technology*. 11: 1250-1254.
- Hameeda, B., Reddy, Y.H.K., Rupela, O.P., Kumar, G.N., Reddy, G. 2006. Effect of carbón substrates on rock phosphate solubilization by bacteria from compost san macrofauna. *Current Microbiology*. 53:298-302.
- Maheshwari, D.K. 2011. *Enterobacter*: Role in Plant Growth Promotion. In: Jha, C.K., Aeron, A., Patel, B.V., Maheshwari, D.K., Saraf, M. Eds. *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. 1-27.
- Kim, J.H., Kim, S.H., Kim, H.K., Akaike, T., and Kim, S.C. (2002). Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods. *Journal of Biomedical Materials Research* 62, 600–612.

- Kennedy, I.R., Choudhury, A.I.M.A., KecSkcs, M.L. 2004. Non-Symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biology and Biochemistry*. 36(8):1229-1244.
- Khan, M.S., Zaidi, A., Wani, P.A. 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture- A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 27:29-43.
- Klein, C.P.A.T., Blicck-Hogervorst, J.M.A., Wolke, J.G.C.; de Groot, K. 1990. Studies of the solubility of different calcium phosphate ceramic particles *in vitro*. *Biomaterials*. 11: 509-512.
- Kucey, R.M.N. 1983. Phosphate solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. *Canadian Journal of Soil Science*. 63: 671-678.
- Kumar, U., Panneerselvam, P., Govindasamy, V., Vithalkumar, L., Senthilkumar, M., Banik, A., Annapurna, K. 2017. Long-term aromatic rice cultivation effect on frequency and diversity of diazotrophs in its rhizosphere. *Ecological Engineering*. 101: 227-236.
- Laura, R.D. 1974. Effects of neutral salts on carbon and nitrogen mineralization of organic matter in soil. *Plant and Soilless*. 41: 113-127.
- Lindsay, W.L., Vlek, P.L.G., Chien, S.H. 1989. Phosphate Minerals. In: Dixon, J.B., Weed, S.B. *Soil environment*. 2nd ed. Soil Science Society of America, Madison, WI. 1089–1130.

- Marchiol, L., Filippi, A., Adamiano, A., Esposti, L.D., Iafisc, M., Mattiello, A., Ptrussa, E., Braidot, E. 2019. Influence of hydroxyapatite nanoparticles on germination and plant metabolism of tomato (*Solanum lycopersicum* L.): Preliminary evidence. *Agronomy*. 9(161):1-17.
- Norrish, K., Rosser, H. 1983. Mineral Phosphate in: CSIRO. Division of Soils Eds. Soils, an Australian viewpoint. Academic press, Melbourne, CSIRO. London, UK, Australia. 335–361.
- Ortiz, C.G., Carrillo-González, R., González-Chávez, M.C.A. 2017. Síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita y su toxicidad en lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Agroproductividad*. 10(12): 98-105.
- Park, J.H., Bolan, N., Megharaj, M., Naidu, R. 2011. Concomitant rock phosphate dissolution and lead immobilization by phosphate solubilizing bacteria (*Enterobacter sp.*). *Journal of Environmental Management*. 92:1115-1120.
- Pathak, H., Rao, D.L.N. 1998. Carbon and nitrogen mineralization from added organic matter in saline and alkali soils. *Soilless Biology Biochemistry*. 30: 695-702.
- Puerta- García, A., Mateos-Rodríguez, F. 2010. Enterobacterias. Unidad de enfermedades infecciosas. Servicio de Medicina Interna. Complejo Hospitalario de Albacete. Albacete. España. *Medicine*. 10 (51): 3426-31.
- Puerta-García, A., Mateos-Rodríguez, F. 2010. Enterobacterias. *Medicine-Programa de formación médica continuada acreditado*. 10 (51): 3426-3431.

- Rathore, P. 2014a. Role of different carbón sources in phosphate solubilization. International Journal of scientific research. Microbiology. 3(2):457-458.
- Rathore, P. 2014b. Chelation effect on phosphate solubilizing activity by *Citrobacter freundii* MTCC 6738. International Journal of Applied and Natural Sciences. 3(4):103-108.
- Restrepo-Franco, G. M., Marulanda-Moreno, S., de la Fe-Pérez, Y., Díaz-de la Osa, A., Lucia-Baldani, V., Hernández-Rodríguez, A. 2015. Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. Centro Nacional de Investigaciones Científicas Ciudad de La Habana, Cuba. Revista CENIC. Ciencias Biológicas. 46 (1): 63-76.
- Rietz, D.N., Hanes, R.J. 2003. Effects of irrigationinduced salinity and sodicity on soil microbial activity. Soilless Biology Biochemistry. 35: 845-854.
- Sadat-Shojai, M., Mohammad-Taghi, K., Dinpanah-Khoshdargi, E., Jamshidi, A. 2013. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. Acta Biomaterialia. 9: 759-7621.
- Sarig, S., Fliessbach, A., Steinberger, Y. 1996. Microbial biomass reflects a nitrogen and phosphorus economy of halophytes grown in salty desert soil. Biology and Fertility of Soils. 21: 128-130.
- Sarig, S., Steinberger, Y. 1994. Microbial biomass response to seasonal fluctuation in soil-salinity under the canopy of desert halophytes, Soilless Biology Biochemistry. 26: 1405-1408.

- Sathiyamival, S., Vasantharaj, S., Lewis Oscar, F., Pugazhendhi, A., Subashkumar, R. 2019. Biosynthesis and characterization of hydroxyapatite and its composite (hydroxyapatite-gelatin-chitosan-fibrin-bone-ash) for bone tissue. International Journal of Biological Macromolecules. 129: 844-852.
- Setia, R., Sharma, K., Marschner, P., Singh, H. 2009. Changes in nitrogen, phosphorus, and potassium in a long-term continuous maize– wheat cropping system in India. Communication in Soil Sciences and Plant Analysis. 40:3348– 3366.
- Setia, R., Marschner, P., Baldock, J., Chittleborough, D. 2010. Is CO₂ evolution in saline soils affected by an osmotic effect and calcium carbonate? Biology and Fertility of soils. 46: 781-792.
- Stella, M., M.S., Halimi. 2015. Gluconic acid production by bacteria to liberate phosphorus from insoluble phosphate complexes. Journal of Tropical Agriculture and Food Science. 43 (1): 41-53.
- Vazquez, P., Holguin, G., Puente M., E Lopez Cortes, A., Bashan, Y. 2000. Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semi-arid coastal lagoon. Biology Fertility Soils. 30: 460-468.
- Walpola, B.C., Arunakumara, K., Yoon, M.H. 2014. Isolation and characterization of phosphates solubilizing bacteria (*Klebsiella oxytoca*) with enhanced tolerance to environmental stress. African Journal of Microbiology Research. 8(31): 2970-2978.

Wong, V.N.L., Dalal, R.C., Greene, R.S.B. 2009. Carbon dynamics of sodic and saline soils following gypsum and organic material additions: a laboratory incubation. *Applied Soilless Ecology*. 41: 29-40.

Yan, N., Marschner, P., Cao, W., Zuo, C., Qin, W. 2015. Influence of salinity and water content on soil microorganisms. *International soil and water conservation research*. 3: 316-323.

Yuan, B.C., Li, Z.Z., Liu, H., Gao, M., Zhang, Y.Y. 2007^a. Microbial biomass and activity in salt affected soils under arid conditions. *Applied Soilless Ecology*. 35: 319-328.

Yuan, B.C., Xu, X.G., Li, Z.Z., Gao, T.P., Gao, M., Fan, X.W., Deng, H.M. 2007. Microbial biomass and activity in alkalized magnesian soils under arid conditions. *Soilless Biology Biochemistry*. 39: 3004-3013.

CAPÍTULO III. INTERACCIÓN NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA (NPHA)- BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO (BSP) EN PLANTA DE LECHUGA

3.1. INTRODUCCIÓN

El fósforo como segundo macronutriente más importante para las plantas, tiene funciones fundamentales: como constituyente estructural de membranas celulares (fosfolípidos), ácidos nucleicos, además de ser constituyente funcional en procesos de síntesis de energía (ATP), actividad enzimática y reacciones redox, por lo que su deficiencia limita el crecimiento y desarrollo vegetal (Cade-Menun *et al.* 2010; Ha y Tran 2014; Laliberté *et al.*, 2012).

La disponibilidad del fósforo para las plantas es limitada, porque éste es un elemento no renovable que tiene baja movilidad en comparación con otros nutrientes, así como enorme adsorción en los suelos (Rubio 2002). Los coeficientes de difusión de fósforo en el suelo son de 0.3 a $3.3 \times 10^{-13} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ y su concentración en la solución del suelo es de 0.02 mg kg^{-1} , por lo que se acostumbra aplicar fertilizantes fosforados en cantidades superiores a las que se requieren para poder abastecer la demanda de fósforo para las plantas. Esta práctica ha generado exceso de fertilización que a su vez es la causa de problemas ambientales como la eutrofización de cuerpos de agua y falta de disponibilidad, ya que se pierde el 90 % del fósforo; al precipitar como Ca-P en suelos alcalinos y como Al-P o Fe-P en suelos ácidos (Alchal *et al.* 2007; Banerjee *et al.*, 2010).

Una alternativa para disminuir la problemática ambiental relacionada con el exceso de fertilización y la escasez de fuentes minerales de fósforo es aumentar la disponibilidad de fósforo en el suelo. Esto se puede lograr mediante la aplicación bacterias solubilizadoras de fosfato (BSP), las cuales se ha demostrado ampliamente aumentan y facilitan el acceso de las plantas al fósforo.

Las BSP constituyen de 1% a 50% del total de la población del suelo, mientras que los hongos solubilizadores representan de 0.1% a 0.5%. Las BSP superan en número a los hongos de 2 a 150 veces (Banik y Day 1983; Kucey *et al.* 1989; Gyaneshwar *et al.* 2002). Dichas bacterias pueden ser de vida libre o establecer relaciones simbióticas con algunas plantas, capaces de colonizar, adaptarse y persistir en la rizósfera de la planta y favorecer su crecimiento al mejorar la disponibilidad de fósforo (Patiño, 2010).

Otra forma de incrementar la disponibilidad de fósforo para las plantas es por medio de la Nanotecnología, que es una disciplina que engloba conocimientos de Biología, Física, Química y otras ciencias. Se define como la manipulación o ensamblaje de átomos individuales o moléculas, para crear dispositivos materiales con nuevas y muy diferentes propiedades. Las bondades de la Nanotecnología radican en la capacidad de compactar herramientas y dispositivos a escala nanométrica y ensamblar átomos y moléculas en estructuras más complejas que conserven tamaños muy pequeños (Kumari *et al.*, 2018).

La Nanotecnología puede ayudar a optimizar el uso eficiente de los nutrientes en la agricultura intensiva, dado que el aprovechamiento de los fertilizantes es bajo (menor al 50 % para los macronutrientes), lo cual resulta en costos financieros y ambientales insostenibles (Baligar y Fageria 2015). Las propiedades novedosas de los nanomateriales, como son reactividad catalítica, elevada área superficial, tamaño y forma, tienen el potencial para solucionar problemas de producción primaria y maximizar la productividad en la agricultura (Liu y Lal 2015).

Los nanofertilizantes son estructuras a escala 1-100 nm que liberan macro o micronutrientes a los cultivos (Duhan *et al.* 2017). Las NPHA son una aportación prometedora de la Nanotecnología para la agricultura ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) son nanomateriales con potencial como nanofertilizantes, por sus características: elevada área superficial por volumen, alta reactividad y biodegradabilidad, pues constituyen huesos y dientes (Gómez-Morales *et al.* 2013; Tampieri *et al.* 2016; Sprio *et al.* 2017), por lo que su aplicación a los cultivos no representa una amenaza para la salud humana o el ambiente (Marchiol *et al.* 2019).

La lechuga es una planta con ciclo de vida corto, ideal para evaluar efectos a corto plazo para un tratamiento determinado, como la inoculación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV), que puedan estimular el crecimiento y rendimiento vegetal, por mecanismos como la fijación de nitrógeno atmosférico, desarrollo de raíz, o la solubilización de fósforo (de Bashan *et al.*, 2007; de Moraes Rego, 2018; Beltrán, 2014; Banerjee *et al.* 2010).

Con base en lo que se argumentó anteriormente, se propone evaluar la interacción de BSP y nanopartículas de hidroxiapatita en planta de lechuga, con la finalidad de comprobar los beneficios que ambas tecnologías ofrecen para la disponibilidad y absorción de fósforo en un modelo vegetal *in vivo*.

3.2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la interacción NPHA-BSP sobre el crecimiento y nutrición de plantas de lechuga.

3.3. OBJETIVO ESPECÍFICO

Evaluar el efecto de la fuente de fósforo, la presencia o ausencia de inóculo y el tiempo de evaluación sobre las variables de respuesta en planta de lechuga

3.4. HIPÓTESIS GENERAL

La interacción NPHA-BSP incrementa el crecimiento y nutrición en plantas de lechuga.

3.5. HIPÓTESIS ESPECÍFICA

Las plantas que se trataron con NPHA e inóculo bacteriano presentaron efectos positivos sobre el crecimiento y nutrición en plantas de lechuga en al menos uno de los tiempos de evaluación.

3.6. MATERIALES Y MÉTODOS

3.6.1. Tratamientos

El experimento consistió en la aplicación de diferentes fuentes de fósforo en combinación con la cepa solubilizadora de fosfato *Enterobacter cloacae*-31 (*E. cloacae*-31) en plantas de lechuga Romana, variedad Parris Island. Las fuentes de fósforo que se evaluaron fueron: NPHA, RF y KH_2PO_4 . Las NPHA y el KH_2PO_4 se adicionaron a las plantas en la solución nutritiva Steiner (Anexo 1); la RF se adicionó en polvo directamente en la base de la planta. .En total se probaron 12 tratamientos descritos en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Tratamientos para evaluar la interacción NPHA-*E. cloacae*-31 en plantas de lechuga bajo condiciones de hidroponía (solución Steiner).

Tratamiento	Fuente de P	Inoculación	mEq P totales	g L ⁻¹ compuesto	% total de P adicionado
1	NPHA ₁	+	2.9	0.129	50
2	NPHA ₂	+	5.8	0.259	100
3	NPHA ₃	+	11.5	0.518	200
4	RF	+	5.8	0.259	100
5	KH ₂ PO ₄	+	5.8	0.259	100
6	Sin P	+	0	0.0000	0
7	NPHA ₁	-	2.9	0.129	50
8	NPHA ₂	-	5.8	0.259	100
9	NPHA ₃	-	11.5	0.518	200
10	RF	-	5.8	0.259	100
11	KH ₂ PO ₄	-	5.8	0.259	100
12	Sin P	-	0	0.0000	0

La concentración de RF (0.0375 g por UE) se calculó para considerar la misma concentración de fósforo presente en la solución nutritiva (1 mEq de fósforo), en cambio, para los tratamientos con NPHA₁, NPHA₂ y NPHA₃ (1.5, 3 y 6 mL de suspensión de NPHA), se utilizaron tres concentraciones (0.5, 1 y 2 mEq, respectivamente) (Cuadro 9). Los tratamientos se adicionaron cada 15 días.

3.6.1.2. Germinación de semillas de lechuga

Las semillas se desinfectaron superficialmente sumergiéndolas cinco minutos en una solución (1:1) de hipoclorito de sodio 5% y etanol 70%, enseguida se enjuagaron con agua destilada estéril (Sánchez-López *et al.*, 2014).

Posteriormente, 20 semillas desinfectadas se colocaron en macetas de 2 kg con arena lavada y esterilizada. Cuando las semillas germinaron se eliminaron las plántulas necesarias para dejar cinco plántulas.

3.6.1.3. Fertilización y riego

El riego se efectuó de forma manual. Durante la germinación a todos los tratamientos se les regó con 10 mL de agua destilada en la siguiente forma para los tratamientos específicos:

NPHA, P⁻, RF: después de la germinación se regó con agua destilada durante tres días continuos y el cuarto se regó con solución nutritiva Steiner sin fósforo. La fertilización se realizó a partir de los 21 días después de la germinación (ddg) y se dosificó en porcentajes crecientes cada 15 días (al 25%, 50 %, 75 % y 100%) con respecto a la concentración de fósforo de la solución nutritiva Steiner. La cantidad de agua o solución nutritiva incrementó de acuerdo a la demanda de la planta. En la preparación de la solución Steiner se emplearon sales grado comercial.

SNC: después de la germinación se regó con agua destilada durante tres días continuos y el cuarto se regó con solución nutritiva Steiner completa.

3.6.1.4. Inoculación bacteriana y adición de NPHA

La preparación del inóculo bacteriano se realizó como se mencionó anteriormente (Fase II Sección 7.3.4.) y la inoculación en macetas de lechuga se realizó en cinco ocasiones en los tratamientos 1 al 6 (Cuadro 9). La primera antes de la germinación y después de eso, las cuatro restantes cada 15 días. En los tratamientos inoculados, la primera inoculación (previo a la germinación), las semillas se embebieron en una solución de inóculo concentrado (absorbancia 1 a 600 nm de longitud de onda = 1×10^6 UFC) de 30 mL de inóculo y se dejaron reposar por una hora.

Posteriormente, las semillas se decantaron y se procedió a la siembra en macetas. De la segunda a la quinta inoculación 0.5 mL de inóculo (misma concentración bacteriana) se adicionaron en la base de la raíz de cada planta de lechuga, cada 15 días.

Las NPHA se adicionaron en forma líquida cada 15 días; siete veces durante el experimento a partir de los 21 ddg. Previo a la aplicación de las NPHA, éstas se sonicaron por 15 min, posteriormente, se mantuvieron en agitación constante (400 rpm) en un agitador magnético, para homogenizar la solución antes de mezclarlas en la solución nutritiva Steiner sin fósforo.

El riego de las plantas con solución nutritiva se realizó cada cuatro días. La cantidad de solución nutritiva en el riego dependió de la edad y requerimientos del cultivo, aunque se dosificó el mismo volumen para cada tratamiento.

3.6.2. Muestras y variables analizadas

A partir de la aparición de las primeras hojas verdaderas se realizaron tres muestreos destructivos: M1 a los 45 días después de la germinación (ddg), M2 a los 65 ddg y M3 a los 95 ddg (Cuadro 10). La coincidencia de estos muestreos con las semanas después de la germinación, el % de fósforo que se añadió en la solución Steiner y las inoculaciones también se observan en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Especificaciones de cada muestreo que se realizó durante la Fase III.

Muestreo	Fecha	ddg	% fósforo en la solución Steiner	# de Inoculaciones
M1	26/Sep/18	45	50	2
M2	17/Oct/18	65	75	4
M3	21/Nov/18	95	100	5

3.6.2.1. Longitud de hoja y raíz más largas

Las plantas de lechuga se cosecharon, se enjuagaron con agua de la llave para eliminar los restos de sustrato y se separó la parte aérea de la raíz. Enseguida se midió la longitud de hoja y raíz más largas de cada planta y se registraron en cm.

3.6.2.2. Peso fresco y peso seco de vástago y raíz

El peso fresco (g) de raíz y vástago se registró por separado. El vástago y la raíz de las lechugas se guardaron por separado en bolsas de papel, para luego secarlos en una estufa a 70 °C hasta obtener peso constante (aproximadamente 72 h). Las muestras se pesaron en una balanza digital y se reportó el peso seco en g.

3.6.2.3. Área foliar

El área foliar de todas las hojas por planta se midió con un integrador de área foliar (modelo LI-3100 LI-COR, inc. Lincoln, Nebraska USA) y se reportó en cm².

3.6.2.4. Volumen de raíz

Previamente cada raíz se lavó con agua de la llave, después se midió el volumen de la raíz con una probeta graduada que contenía un volumen conocido de agua destilada (20 mL) y al sumergir la raíz en ella se registró el desplazamiento del agua con respecto al volumen inicial, las mediciones se reportaron en cm^3 .

3.6.2.5. Pigmentos fotosintéticos

Con un sacabocados de 0.5 cm de diámetro se obtuvieron tres muestras frescas de tejido foliar de lechuga. Éstas se colocaron en tubos de vidrio con acetona al 80% v/v a 4°C. Después, los tubos se almacenaron en la oscuridad y se refrigeraron por 72 h para la liberación de los pigmentos de las hojas. Por último, se realizaron las lecturas de absorbancia a las siguientes longitudes de onda: 663 nm, 647 nm y 470 nm (Lichtenthaler, 1987). El blanco analítico fue la acetona al 80% v/v. La concentración de clorofila a, b total y de carotenoides se reportó en mg de pigmento por cm^2 de material vegetal.

3.6.2.6. Concentración de fósforo, calcio y micronutrientos en tejido vegetal

Las hojas y raíces de las lechugas se secaron a 70 °C en una estufa de laboratorio (Thelco modelo 28 marca Precision Scientific GCA Corporation) hasta peso constante (aproximadamente 72 h). Posteriormente, las muestras se trituraron en un molino eléctrico marca IKA, modelo A11 Basic S1. Luego se pesaron de 0.1 g a 0.25 g de biomasa seca y se colocaron en matraces micro Kheldhal de 50 mL. Se les adicionó 4 mL de solución binaria (1 mL de HClO_4 y 4 mL de H_2SO_4) y se dejaron predigestar una noche. Al día siguiente, las muestras se pusieron en una parrilla de digestión a 180 °C por 2-3 h, hasta obtener una solución traslúcida. Posteriormente, la muestra se filtró con papel Whatman No. 42 y se aforó a 25 mL con agua destilada.

Para la lectura de fósforo antes de realizar la metodología para desarrollo de color fue necesario neutralizar el pH de los digestados a 7. Las lecturas de fósforo se realizaron en un espectrofotómetro UV-Vis (ver metodología Fase I Sección 6.4.3.). Los resultados se reportaron en % de fósforo.

La concentración de calcio en tejido vegetal se determinó por espectrofotometría de absorción atómica. Se procesó la muestra (ver metodología de calcio Sección 6.4.3.) y las concentraciones se determinaron en el espectrofotómetro de absorción atómica y la concentración se reportó en %. En algunos casos fue necesario hacer diluciones (McKean, 1993).

Para la determinación de micronutrientes (Cu, Mn, Fe y Zn) en tejido vegetal, las lecturas se realizaron directamente de la solución digestada en el espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer modelo 3110 con flama de aire-acetileno, calibrado a la longitud de onda correspondiente al elemento que se analizó y con base a curva patrón. Las lecturas se reportaron en mg kg^{-1} de tejido vegetal.

3.6.3. Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se estableció con un diseño factorial completamente al azar (factorial DECA), donde la unidad experimental fue una maceta con cinco plantas de lechuga. Se evaluaron los siguientes factores: inóculo bacteriano, fuentes de fósforo y las fechas de evaluación. Los niveles de factor fueron respectivamente: con (*E. cloacae*-31) y sin inóculo bacteriano (plantas sin inocular); fuentes de fósforo (P -, NPHA en tres dosis, RF y SNC (KH_2PO_4); las tres evaluaciones fueron a los 26 ddg, 67 ddg y 102 ddg.

Todos los tratamientos tuvieron tres repeticiones. En total se establecieron 108 unidades experimentales que resultaron de 12 tratamientos * 3 evaluaciones * 3 repeticiones. El análisis estadístico consistió en ANDEVA y comparación de medias de Tukey con 5% de significancia. Previamente se comprobó que se cumplieran los supuestos para este modelo: 1. Independencia, 2. Distribución normal, 3. Homogeneidad de varianzas (aleatorización de las unidades experimentales, prueba de Normalidad de Shapiro Wilk y gráfica de residuales contra predichos, respectivamente).

3.7. RESULTADOS

Las hojas y las raíces de las lechugas respondieron a los diferentes tratamientos a los que se les sometió, y lo reflejaron en variables morfológicas como longitud de hoja y raíz, área foliar y volumen de raíz. Así como en la acumulación de biomasa (Peso fresco y seco) y la concentración de diversas sustancias como los pigmentos vegetales (clorofilas a, b y total, carotenoides), macro y micro nutrientes que pueden ayudar a evaluar, entender y dilucidar cómo fue la respuesta de las plantas a los diferentes estímulos (tratamientos) que se ejercieron sobre ellas. A continuación se presentan los resultados de cada una de las variables de respuesta que se evaluaron.

3.7.1. Longitud de hoja y raíz más largas

Las plantas de lechuga desarrollaron las hojas más largas bajo el tratamiento con SNC (10.83cm), después de éste las longitudes disminuyeron en orden descendente: NPHA3 (7.86 cm) >NPHA1 (5.28 cm)>NPHA2 (4.69 cm) >RF (2.42cm) >P- (2.24 cm). Con relación al inóculo bacteriano (*E. cloacae*-31), la longitud de hoja más larga se registró en los tratamientos sin inóculo (6.33 cm), mientras que las longitudes de los tratamientos con inóculo fueron las más cortas (4.97 cm).

En relación al tiempo de evaluación, las hojas con longitudes más largas se observaron a los 95 ddg (8.38 cm) durante el tercer muestreo, las hojas de longitudes medias se observaron a los 65 ddg (5.53 cm) en el segundo muestreo y a los 45 ddg se observaron las menores tallas (2.78 cm) de longitud de hoja.

A continuación se enlistan en orden decreciente los tratamientos que más estimularon el crecimiento de las raíces: NPHA3 (10.12 cm) >SNC (8.78 cm) >NPHA1 (8.67 cm) =NPHA2 (7.92 cm) =P- (7.77 cm) >RF (7.51 cm). Por otra parte, los tratamientos que no fueron inoculados desarrollaron mayor longitud de raíz (9.34 cm) que aquellos que si recibieron inóculo bacteriano (7.64 cm). En cuanto al tiempo, las longitudes de raíz más extensas se observaron sin diferencia significativa a los 65 ddg (10 cm) y a los 95 ddg (9.82 cm). Mientras que a los 45 ddg se registraron las longitudes de raíz más cortas (5.05 cm).

En la Figura 31 se observan las longitudes de hoja (barras ascendentes de color verde) y raíz (barras descendentes color marrón) por tiempo de evaluación. En el primer muestreo (Figura 31a) los tratamientos sin inocular alcanzaron longitudes de hoja y raíz significativamente mayores a las plantas inoculadas. En la segunda evaluación (Figura 31b) tres de los cuatro vástagos más largos (5.8 cm NPHA1; 6.3 cm NPHA3 y 13 cm SNC) fueron tratamientos inoculados y cuatro de seis tratamientos con inóculo, alcanzaron las longitudes de raíz estadísticamente más largas que las que no tenían inóculo (11.2cm NPHA1; 11.7cm NPHA3; 10.9 cm RF; 10.8 cm P-).

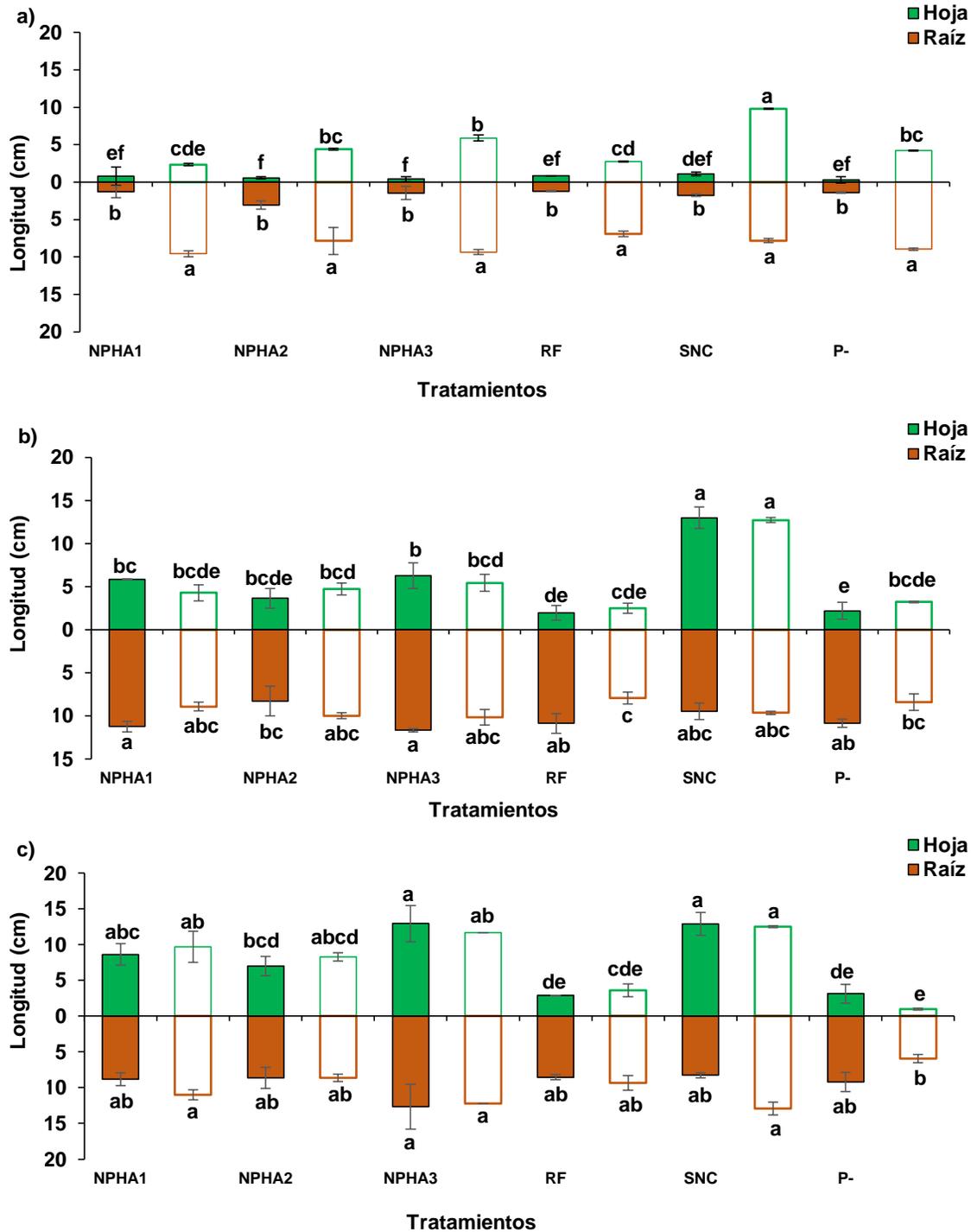


Figura 31. Longitud de hoja (barras verdes) y raíz (barras marrones) más largas. a) 45 ddg (M1), b) 65 ddg (M2), c) 95 ddg (M3). Las barras con y sin relleno representan respectivamente los promedios de los tratamientos con y sin inóculo bacteriano. También se indican las desviaciones estándar (n=3). Diferentes letras muestran diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) al comparar entre tratamientos en forma independiente la longitud en hojas o en raíces.

No hubo diferencias significativas entre las longitudes de hoja inoculadas y sin inocular con el tratamiento SNC a los 65 ddg (Figura 31b) y 95 ddg (Figura 31c). En el último muestreo (Figura 31c), los tres tratamientos que desarrollaron las hojas más largas fueron SNC con y sin inóculo y NPHA3 con inóculo, sin diferencias estadísticas entre ellos. Además tres de las seis raíces más largas fueron estadísticamente semejantes (NPHA2, NPHA1 y RF).

3.7.2. Peso fresco de vástago y raíz

Los tratamientos que beneficiaron más la ganancia de peso fresco en vástago de lechuga quedaron en el siguiente orden descendente: SNC>NPHA3>NPHA1>NPHA2>RF=P-. Respecto al tiempo de evaluación se observaron biomasa fresca más grandes en vástago a los 65 ddg, seguidos por los 95 ddg y por último a los 45 ddg. No hubo diferencias significativas entre los pesos frescos de vástago por la presencia o ausencia de *E. cloacae*-31.

Los tratamientos que originaron raíces con mayor peso fresco fueron los siguientes: SNC>NPHA3>NPHA1=NPHA2>RF>P-. La presencia del inóculo de *E. cloacae*-31 sobre el peso fresco de vástago en plantas de lechuga, no produjo diferencias significativas con la ausencia del inóculo bacteriano. El tiempo de evaluación en el que se registraron pesos frescos de raíz mayores fue a los 45 ddg, a los 95 ddg pesos frescos intermedios y por último a los 65 ddg los pesos frescos más bajos. En la Figura 32, se aprecia que los tratamientos SNC y NPHA3 destacan por sus biomasa fresca más grandes en hojas y raíces de lechuga, a lo largo de las tres evaluaciones.

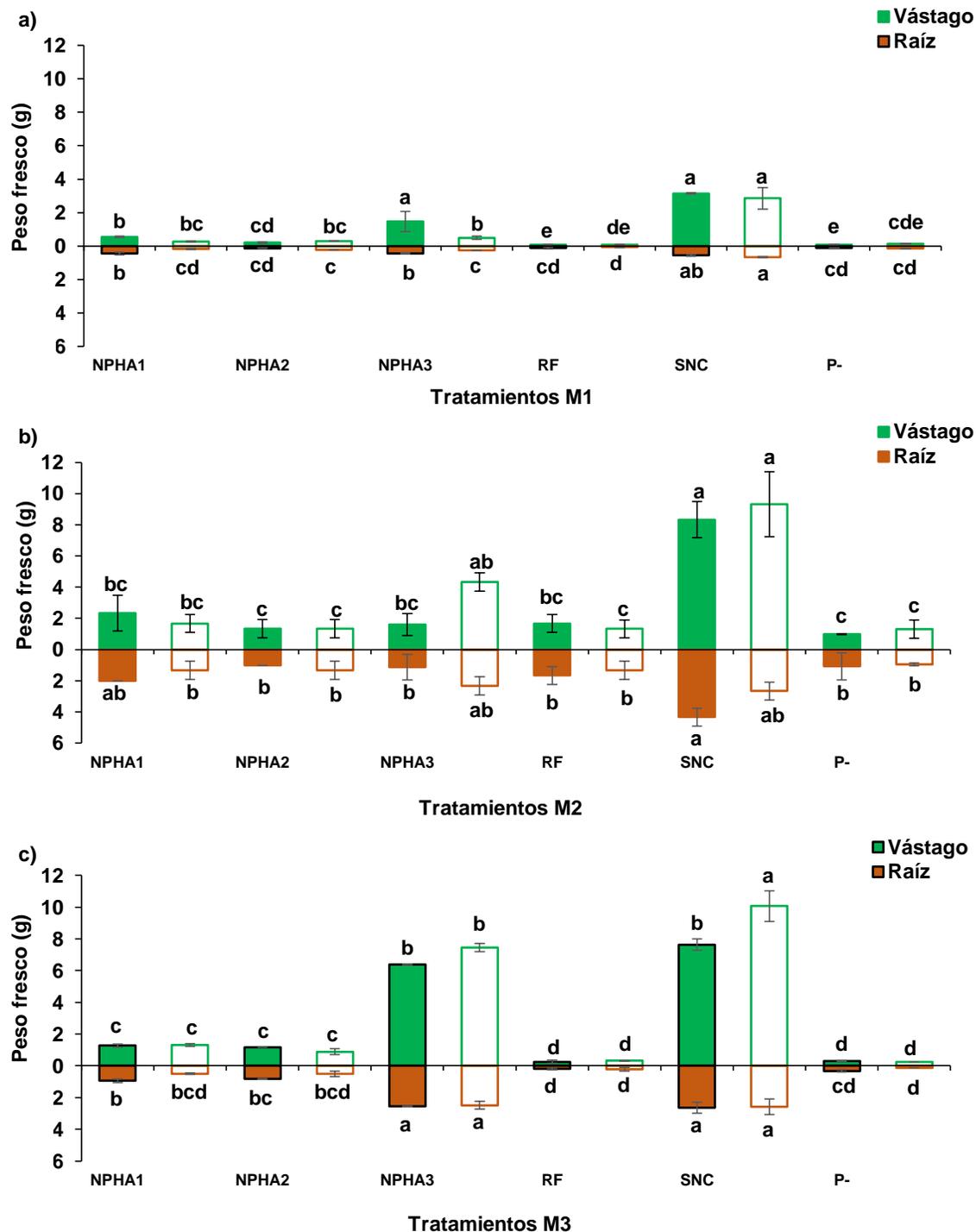


Figura 32. Peso fresco de vástago (barras verdes) y raíz (barras marrones). a) Muestreo 1 (M1), b) muestreo 2 (M2), c) muestreo 3 (M3). Las barras con y sin relleno representan los promedios de los tratamientos con y sin inóculo bacteriano respectivamente. También se indican las desviaciones estándar (n=3). Diferentes letras muestran diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) al comparar entre tratamientos en forma independiente el peso fresco en vástago o en raíces.

3.7.3. Peso seco de vástago y raíz

Los tratamientos que produjeron los pesos secos más grandes en hojas de lechuga fueron los siguientes en orden decreciente: SNC (2 g) >NPHA3 (1.3 g) >NPHA1 (0.23 g) =NPHA2 (0.19 g) =RF (0.11 g) =P- (0.10 g). Respecto a la presencia de *E. cloacae*-31, no hubo diferencias significativas entre su presencia (0.66 g) o ausencia (0.61 g) sobre el peso seco. En cuanto al tiempo de evaluación, a los 95 ddg se registraron los pesos secos más grandes en vástago (1.31 g), mientras que a los 45 y 65 ddg los pesos secos no fueron estadísticamente diferentes (0.28 y 0.2 g, respectivamente).

Los tratamientos que rindieron los pesos secos de raíz de lechuga más grandes, se dieron en el siguiente orden decreciente: SNC>NPHA3>NPHA1>NPHA2>P-=RF. La presencia de inóculo bacteriano (*E. cloacae*-31) en plantas de lechuga no tuvo diferencias estadísticas con la ausencia del mismo, por lo que no hubo efecto del inóculo sobre el peso seco de la raíz. Los pesos secos más grandes de raíz se observaron a los 95 ddg, los pesos secos medios a los 65 ddg y los pesos secos más bajos a los 45 ddg.

En la Figura 33 se observa que los tratamientos que destacan por su tamaño en el segundo y tercer muestreo, tanto para vástago como para raíz son: SNC y NPHA3. El resto de los tratamientos casi no mostraron diferencias estadísticas entre ellos a lo largo de las tres evaluaciones. La mayor biomasa seca de raíz también la alcanzaron las plantas de los tratamientos NPHA3 (con inóculo 1.03 g y sin inóculo 0.97 g) y SNC (1.24 con inóculo y 0.94 g sin inóculo). Las plantas del tratamiento P- sin inóculo presentaron la menor biomasa seca de raíz (0.01 g).

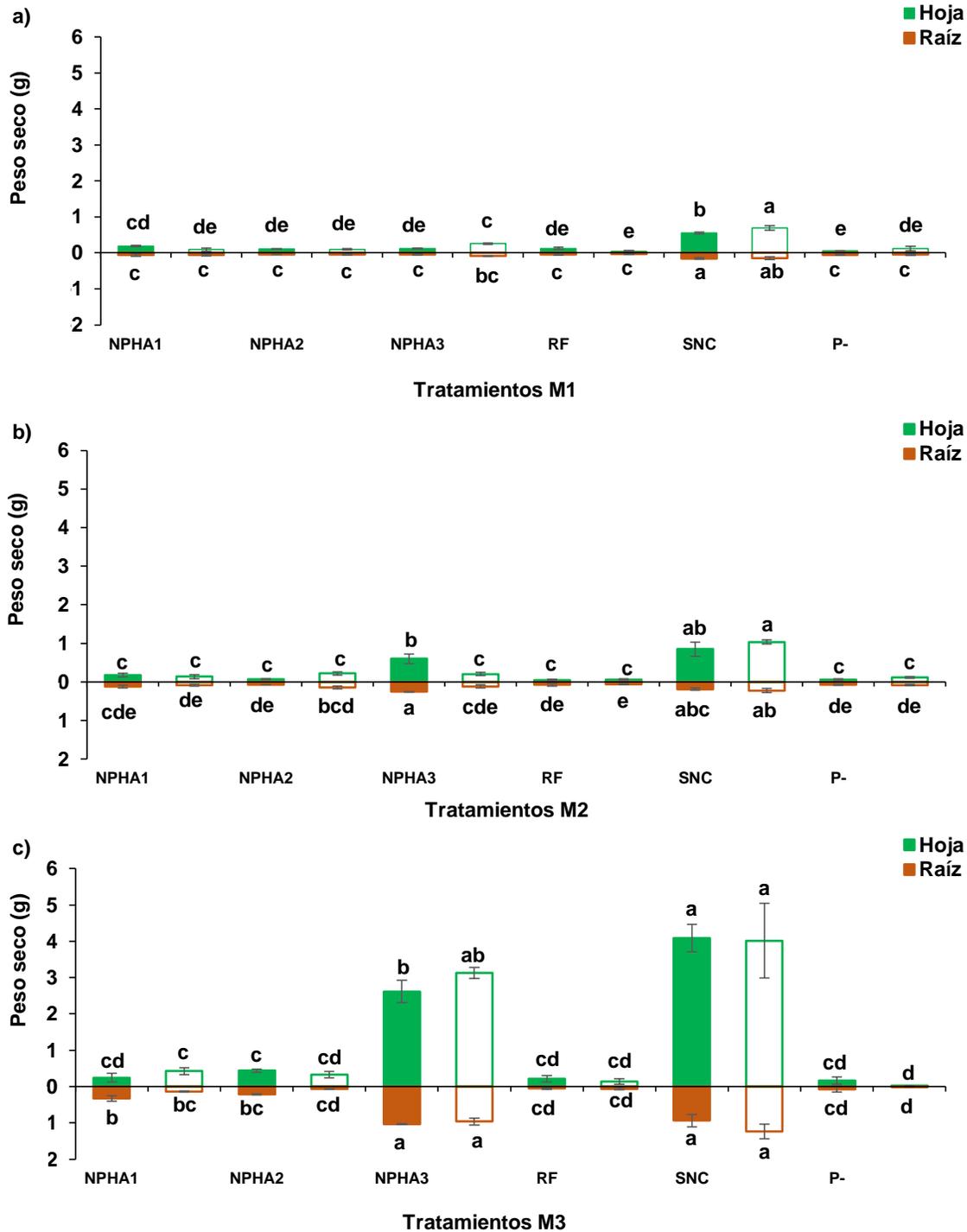


Figura 33. Peso seco de vástago (barras verdes) y raíz (barras marrones). a) Muestreo 1 (M1), b) muestreo 2 (M2), c) muestreo 3 (M3). Las barras con y sin relleno representan los promedios de los tratamientos con y sin inóculo bacteriano respectivamente. También se indican las desviaciones estándar (n=3). Diferentes letras muestran diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) al comparar entre tratamientos en forma independiente el peso seco en vástago o en raíces.

3.7.4. Área foliar

Los tratamientos que estimularon la producción de áreas foliares más extensas en las lechugas se enlistan a continuación en orden descendente: SNC (650.4 cm²)>NPHA3 (387.7 cm²) >NPHA1 (120 cm²) =NPHA2 (97.2 cm²) >RF (22 cm²) =P- (20 cm²). El inóculo de *E. cloacae*-31 no benefició al área foliar, ya que las áreas más grandes correspondieron a los tratamientos sin inóculo bacteriano. En cuanto al tiempo de evaluación, las áreas foliares más extensas se registraron a los 95 ddg (487.6 cm²), seguido por la evaluación a los 65 ddg (94.3 cm²) y al final la evaluación a los 45 ddg (67.8 cm²). En la Figura 34 puede apreciarse el incremento paulatino del área foliar, que se observa más conspicuo en los tratamientos SNC y NPHA3.

3.7.5. Volumen radical

Los tratamientos que beneficiaron más el desarrollo del volumen radical en plantas de lechuga fueron los siguientes, por orden descendente: SNC>NPHA3>NPHA1>NPHA2>P-=RF. El inóculo de *E. cloacae*-31 produjo efecto positivo sobre el volumen de raíz en la última evaluación (95 ddg), en la que no hubo diferencias significativas entre el volumen radical de las lechugas tratadas con NPHA3 y las lechugas tratadas con SNC.

En cuanto al tiempo, fue en el tercer muestreo (95 ddg) donde se registró el volumen radical más grande, seguido por el primer (45 ddg) y segundo muestreos (65 ddg). En la Figura 35 se muestran los volúmenes de raíz a lo largo de los días de evaluación. Sobresalen los tratamientos SNC, NPHA3 y NPHA1, por el incremento en su volumen de raíz.

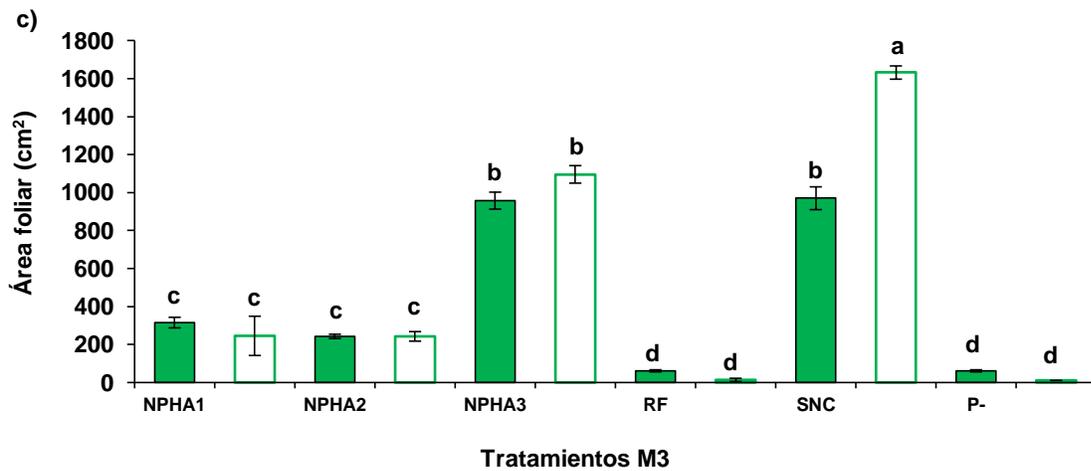
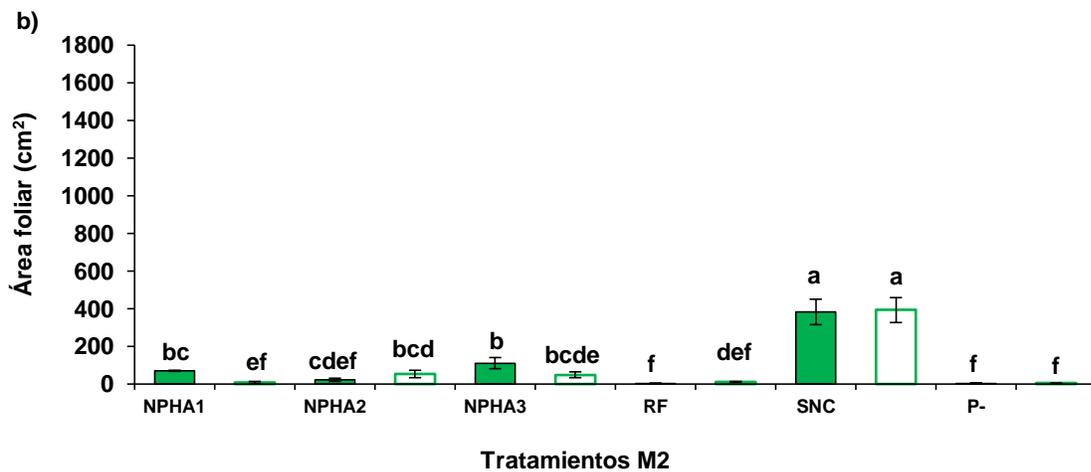
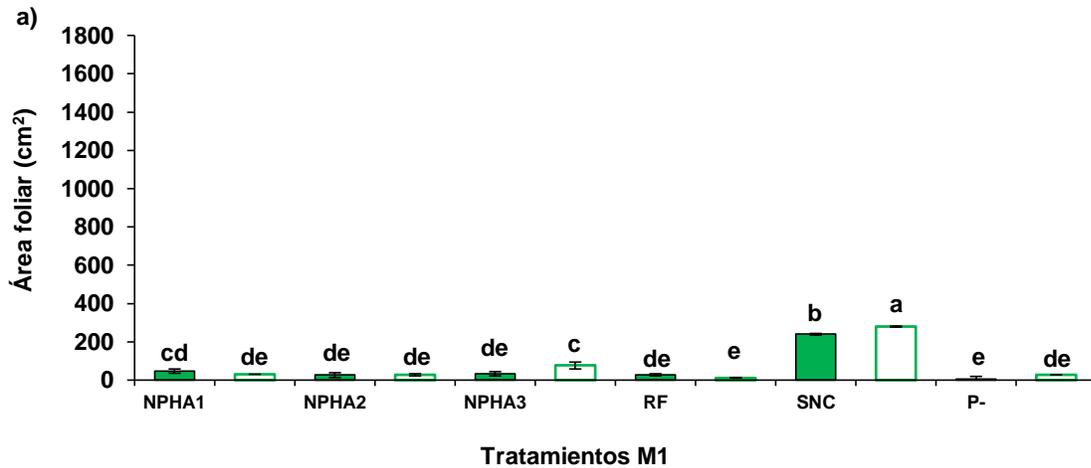


Figura 34. Área foliar. a) Muestreo 1 (M1), b) muestreo 2 (M2), c) muestreo 3 (M3). Las barras con y sin relleno representan los promedios de los tratamientos con y sin inóculo bacteriano respectivamente. También se indican las desviaciones estándar (n=3). Diferentes letras muestran diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) al comparar entre tratamientos en forma independiente el área foliar.

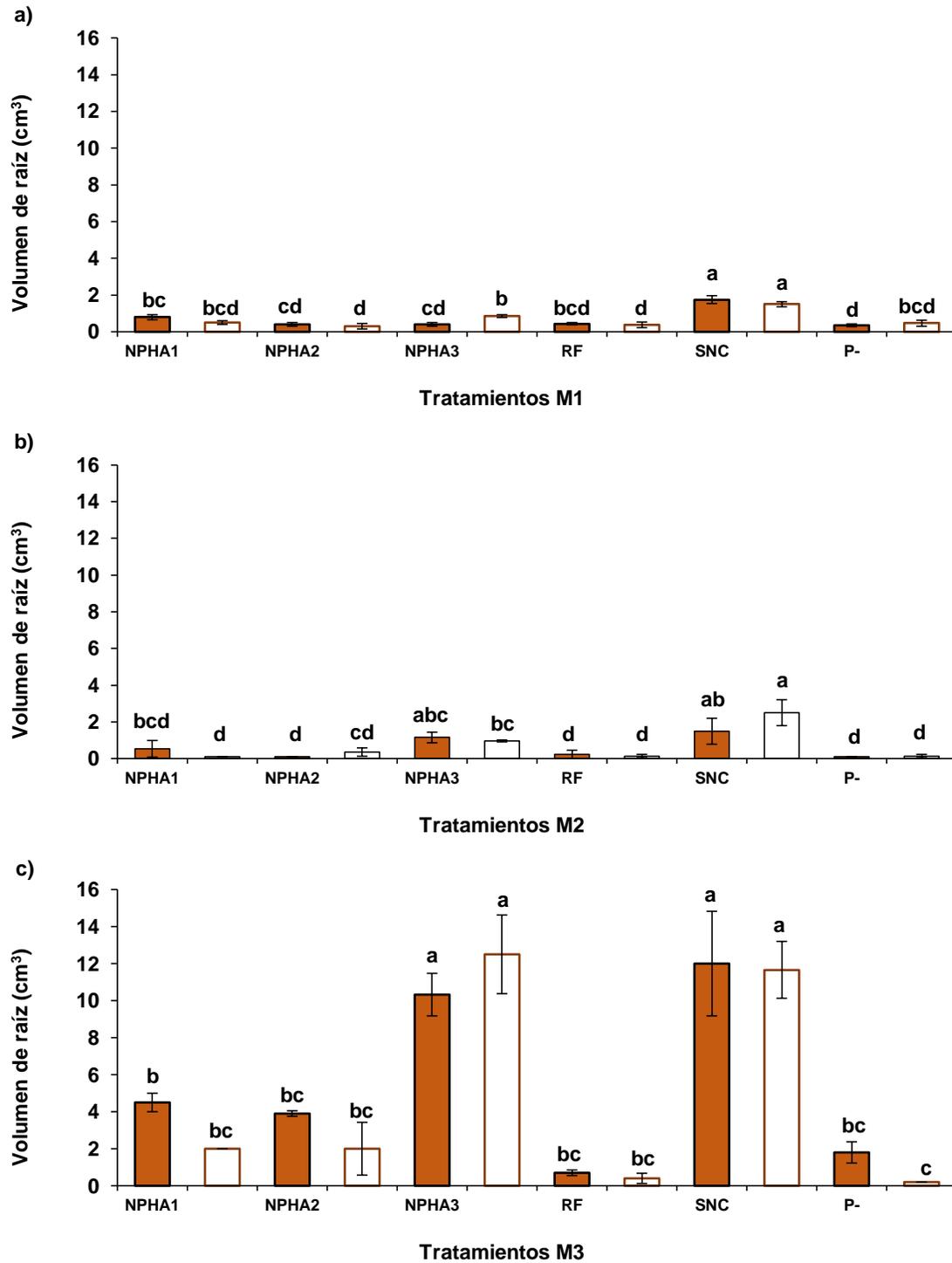


Figura 35. Volumen radical. a) Muestreo 1 (M1), b) muestreo 2 (M2), c) muestreo 3 (M3). Las barras con y sin relleno representan los promedios de los tratamientos con y sin inóculo bacteriano respectivamente. También se indican las desviaciones estándar (n=3). Diferentes letras muestran diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) al comparar entre tratamientos en forma independiente el volumen radical.

3.7.6. Concentración de macro y micronutrientos en tejido vegetal

3.7.6.1. Concentración de fósforo total en vástago y raíz

Los tratamientos que tuvieron un efecto positivo sobre el porcentaje de fósforo total en tejido foliar de lechuga se enlistan en orden decreciente: SNC>NPHA3>NPHA2=NPHA1>RF=P-. El inóculo de *E. cloacae*-31 no tuvo efecto positivo sobre la concentración de fósforo total (%) en vástago, dado que se obtuvieron concentraciones mayores sin la presencia del inóculo. Los tiempos de evaluación en los que se registraron las mayores concentraciones de fósforo total en vástago fueron: el muestreo dos y tres (65 y 95 ddg) sin diferencias estadísticas entre ellos. En el muestreo uno (45 ddg) se observó la menor concentración de fósforo total. En la Figura 36 se aprecia visualmente la magnitud de las concentraciones de fósforo total por cada evaluación. Destacan los tratamientos SNC, NPHA3 y NPHA1 por la magnitud de sus concentraciones de fósforo total.

Los tratamientos que generaron concentraciones más altas de fósforo total en raíz de lechuga se enuncian a continuación en orden descendente: SNC>NPHA2=NPHA3>NPHA1>RF>P-. El inóculo bacteriano de *E. cloacae*-31 no tuvo efecto positivo sobre la concentración de fósforo total en raíz, pues los tratamientos sin inóculo alcanzaron las concentraciones más altas de este elemento. Respecto al tiempo de evaluación, no se observaron diferencias significativas en la concentración de fósforo total que se registró entre cada muestreo. En la Figura 36, en barras marrón se observa la concentración de fósforo total presente en raíz de lechuga.

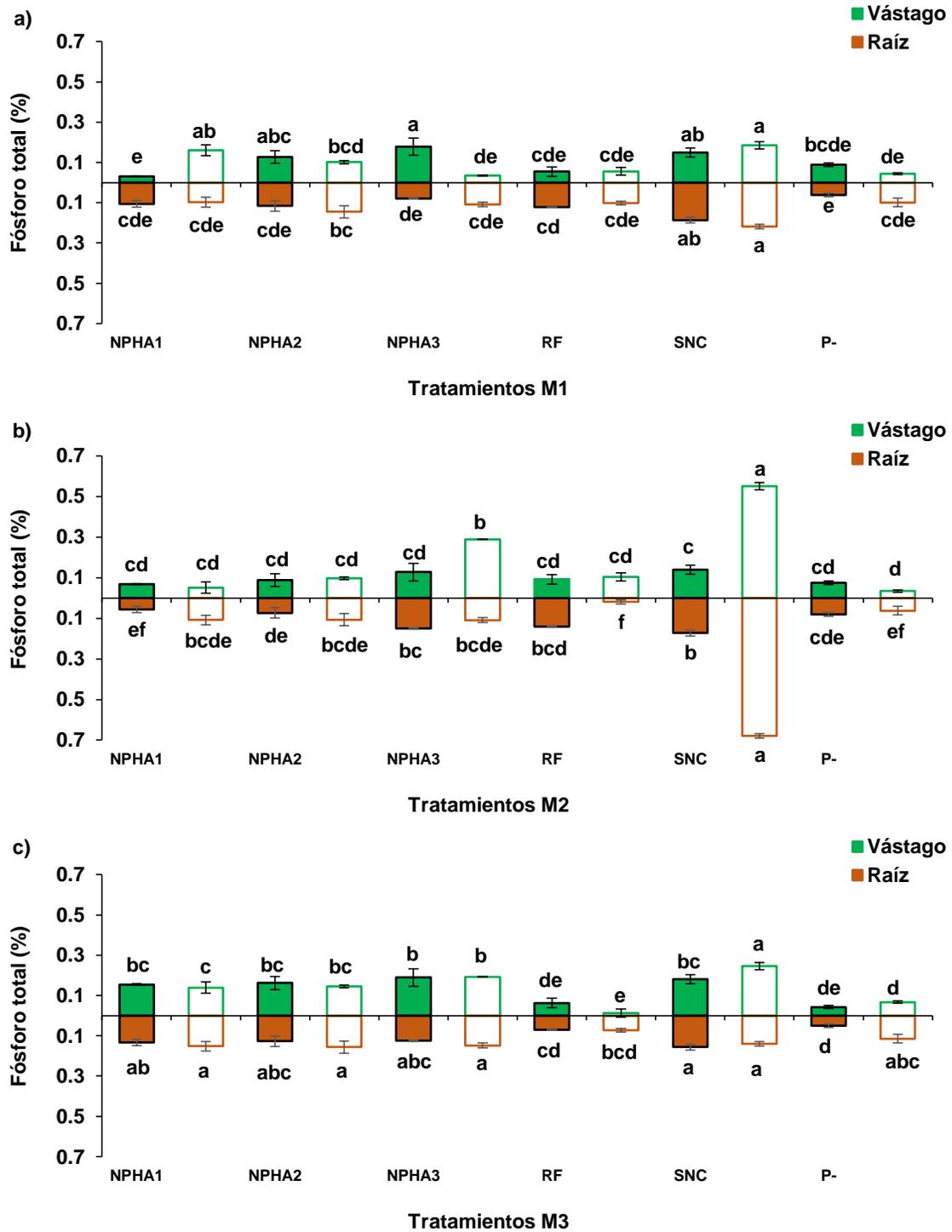


Figura 36. Porcentaje de fósforo total en vástago (barras verdes) y raíz (barras marrones). a) Muestreo 1 (M1), b) muestreo 2 (M2), c) muestreo 3 (M3). Las barras con y sin relleno representan los promedios de los tratamientos con y sin inóculo bacteriano respectivamente. También se indican las desviaciones estándar (n=3). Diferentes letras muestran diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) al comparar entre tratamientos en forma independiente el porcentaje de fósforo total en vástago o en raíces.

Los valores más altos se observan con los tratamientos SNC en cada muestreo, NPHA3 en el segundo y tercer muestreo, NPHA1 y NPHA2 solo en el último muestreo. En la raíz la mayor concentración de fósforo total se obtuvo en cinco de los tratamientos, sin diferencias significativas entre ellos: NPHA1, NPHA2, NPHA3, SNC (0.152%, 0.157%, 0.148% y 0.140% de fósforo en tejido radical, respectivamente), todas sin inóculo y SNC con inóculo (0.157% de fósforo en tejido radical). En contraparte, las menores concentraciones de fósforo se obtuvieron en RF y P- con inóculo bacteriano (0.070% y 0.050% de fósforo en tejido radical). La concentración total de fósforo (mg de fósforo por cada maceta) que se adicionó por cada tratamiento aparece en el Cuadro 11

Cuadro 11. Concentración acumulada promedio (mg) de fósforo por cada maceta y por cada tiempo de muestreo

	SNC	NPHA1	NPHA2	NPHA3	RF
M1	8	10	21	41	225
M2	24	24	48	96	450
M3	53	65	131	261	675

3.7.6.2. Concentración de calcio total en vástago y raíz

El porcentaje de calcio total en tejido foliar de lechuga se vio beneficiado por el efecto de los tratamientos y se enlistan enseguida, por orden de importancia: NPHA1>SNC=NPHA2>NPHA3=RF>P-.

El inóculo bacteriano (*E. cloacae*-31) no tuvo efecto positivo sobre la concentración de calcio total, pues las concentraciones más altas se obtuvieron de plantas que no fueron inoculadas. La concentración de calcio total en vástago fue mayor con forme al tiempo: M3 (95 ddg) >M2 (65 ddg) >M1 (45 ddg).

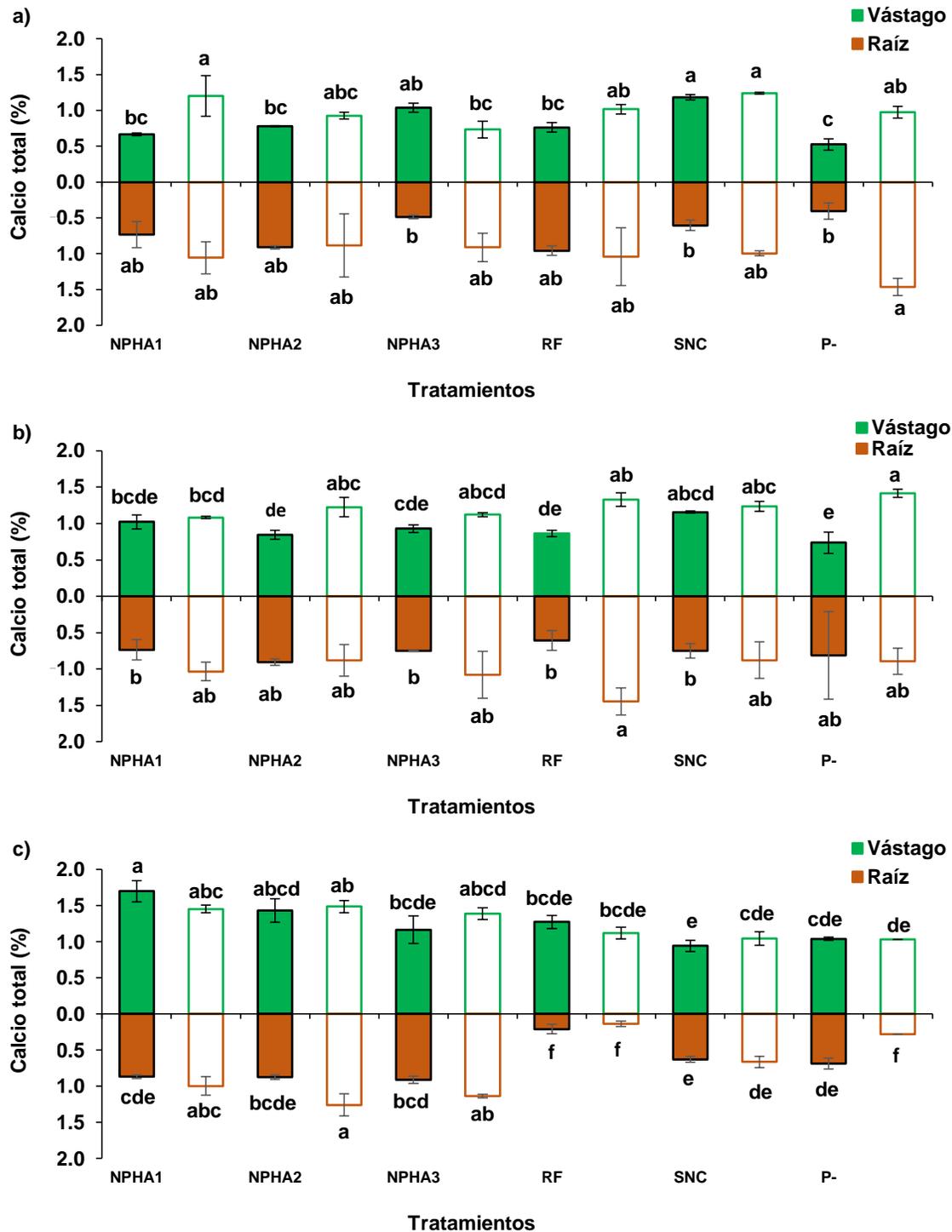


Figura 37. Porcentaje de calcio total en vástago (barras verdes) y raíz (barras marrones). a) Muestreo 1 (M1), b) muestreo 2 (M2), c) muestreo 3 (M3). Las barras con y sin relleno representan los promedios de los tratamientos con y sin inóculo bacteriano respectivamente. También se indican las desviaciones estándar (n=3). Diferentes letras muestran diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) al comparar entre tratamientos en forma independiente el porcentaje de calcio en vástago o en raíces.

En la Figura 37 se indican las concentraciones de calcio total en vástago. A los 45 ddg los tratamientos que sobresalen por su alta concentración de calcio total fueron: NPHA1 y SNC con y sin inóculo respectivamente. A los 65 ddg: P-, SNC y NPHA2, todos sin inóculo. Y a los 95 ddg: NPHA1 con y sin inóculo, NPHA2 y NPHA3, ambas sin inóculo.

Los tratamientos, el inóculo bacteriano y los tiempos de evaluación no presentaron diferencias estadísticas entre ellos, por lo tanto, las variables de respuesta que se evaluaron no tuvieron efecto significativo sobre la concentración de calcio total en tejido radical de lechuga.

En la Figura 37 se aprecian las concentraciones de calcio total en tejido radical como barras de color marrón. Durante la primera evaluación, solo tres tratamientos presentaron diferencias estadísticas con el resto de los tratamientos (NPHA3, SNC y P-, todos con inóculo). En el segundo muestreo cinco de los tratamientos tuvieron diferencias significativas (NPHA1, NPHA3, RF con inóculo y SNC con y sin inóculo). En la última evaluación, las diferencias fueron más evidentes.

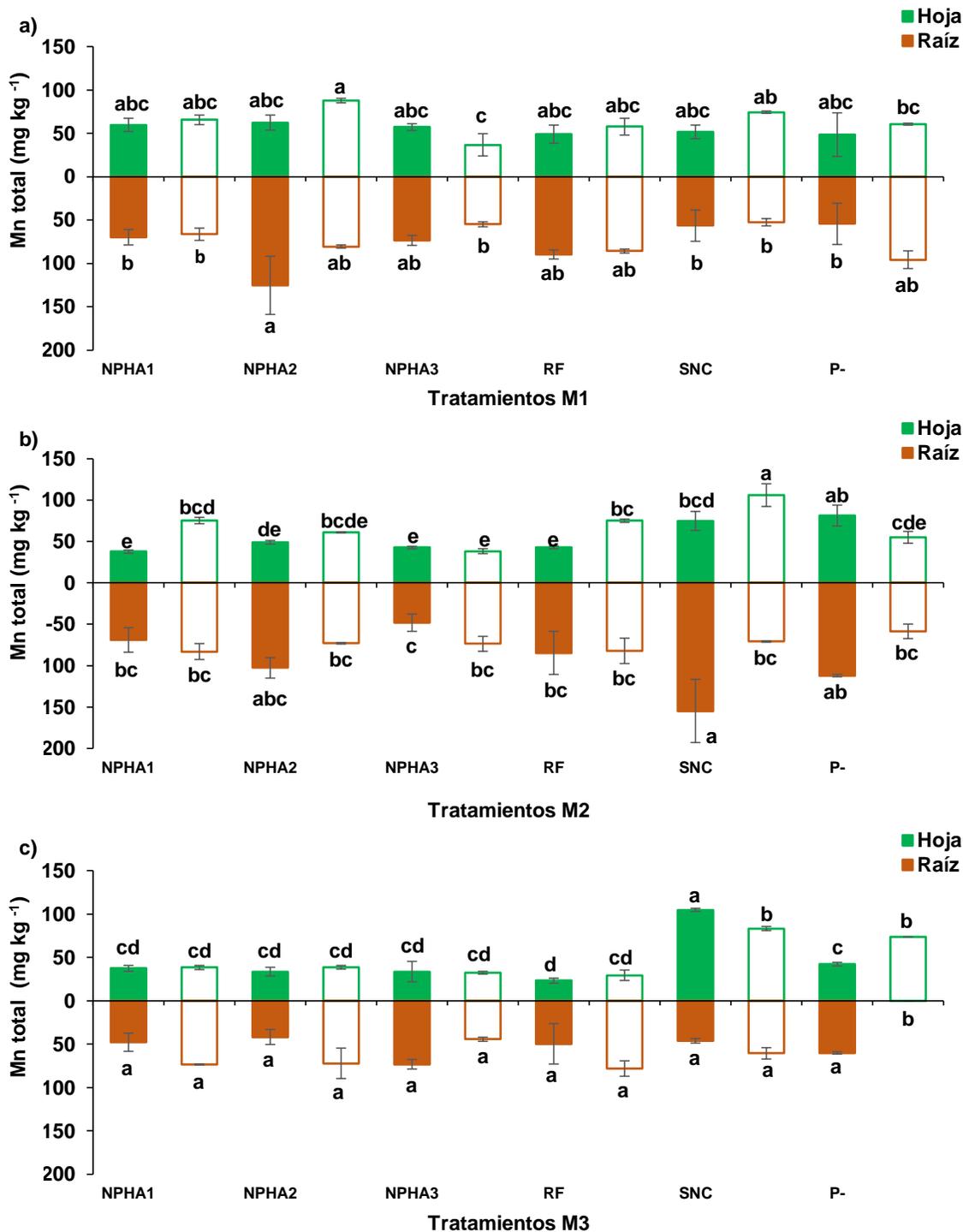


Figura 38. Porcentaje de Mn total en vástago (barras verdes) y raíz (barras marrones). a) Muestreo 1 (M1), b) muestreo 2 (M2), c) muestreo 3 (M3). Las barras con y sin relleno representan respectivamente los promedios de los tratamientos con y sin inóculo bacteriano. También se indican las desviaciones estándar (n=3). Diferentes letras muestran diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) al comparar entre tratamientos en forma independiente el porcentaje de Mn en vástago o en raíces.

3.7.6.3. Concentración de Mn total en tejido vegetal

Los tratamientos que tuvieron efecto positivo sobre la concentración de Mn total en vástago se enlistan a continuación por orden descendente: SNC>P->NPHA2=NPHA1>RF>NPHA3. El inóculo de *E. cloacae*-31 no tuvo efecto positivo en la concentración de Mn total en tejido foliar de lechuga. Los tiempos de evaluación en los que se registró mayor concentración de Mn total en vástago fueron a los 65 y 45 ddg sin diferencias significativas entre ambos, a los 95 ddg la concentración de Mn total descendió. En Figura 38 se muestran las concentraciones de Mn total en tejido foliar que aparecen en barras verdes y por fecha de evaluación. A los 45 ddg las concentraciones más altas las tuvo NPHA2 con inóculo y SNC sin inóculo. A los 65 ddg, SNC sin inóculo y a los 95 ddg, SNC con y sin inóculo.

En tejido radical los tratamientos que ejercieron mayor influencia sobre la concentración total de Mn fueron: NPHA2 (82.6 mg kg⁻¹) =RF (78.1 mg kg⁻¹) >P-(76.1 mg kg⁻¹) =SNC (73.4 mg kg⁻¹) =NPHA1 (68.3 mg kg⁻¹) >NPHA3 (60 mg kg⁻¹).

El efecto del inóculo de *E. cloacae*-31 sobre la concentración de Mn total en tejido radical fue positivo, pues los valores más altos los alcanzaron las lechugas que fueron inoculadas. Respecto al tiempo de evaluación, a los 65 ddg (84.3 mg kg⁻¹) y 45 ddg (75.3 mg kg⁻¹) se obtuvieron las concentraciones más altas de Mn total en raíz, en tanto que a los 95 ddg (58.2 mg kg⁻¹) se observaron las concentraciones más bajas.

En la Figura 38 se aprecian las concentraciones de Mn total en tejido radical. Se observan diferencias significativas entre las concentraciones del primero y segundo muestreos, en el tercero no se observan diferencias estadísticas.

3.7.6.4. Concentración de Zn total en tejido vegetal

Los tratamientos que promovieron el incremento en la concentración de Zn total en tejido foliar fueron: RF=P->NPHA1=NPHA2>NPHA3=SNC. En cuanto al inóculo bacteriano de *E. cloacae*-31, no tuvo efecto positivo sobre el aumento en la concentración de Zn total en vástago. Los tiempos de evaluación en los que se registraron las mayores concentraciones de Zn total en tejido foliar de lechuga fueron a los 65 y 45 ddg, en tanto que a los 95 ddg se obtuvieron las concentraciones menores de Zn total.

En la Figura 39 se muestran en barras verdes las concentraciones de Zn total en vástago. Puede apreciarse a lo largo de las evaluaciones que los tratamientos como P-, RF con y sin inóculo y NPHA1 sin inóculo, son los tratamientos que registraron las concentraciones más altas de Zn total e follaje de lechuga.

A continuación se enlistan en orden descendente los tratamientos que tuvieron efecto positivo sobre la concentración total de Zn en raíz: RF>P->NPHA2>NPHA1>NPHA3>SNC. El efecto del inóculo bacteriano (*E. cloacae*-31) no presentó diferencias estadísticas sobre la concentración en raíz de Zn total.

El tiempo de evaluación en que se observaron las concentraciones más altas de Zn total en raíz fue a los 45 ddg, en tanto que no hubo diferencias significativas entre los 65 y 95 ddg. En la Figura 39 se muestran en barras color marrón, las concentraciones de Zn total en raíz. Las concentraciones más altas de Zn total en tejido radical se ubican en los tratamientos: NPHA2, RF y P-, ya sea con o sin inóculo bacteriano.

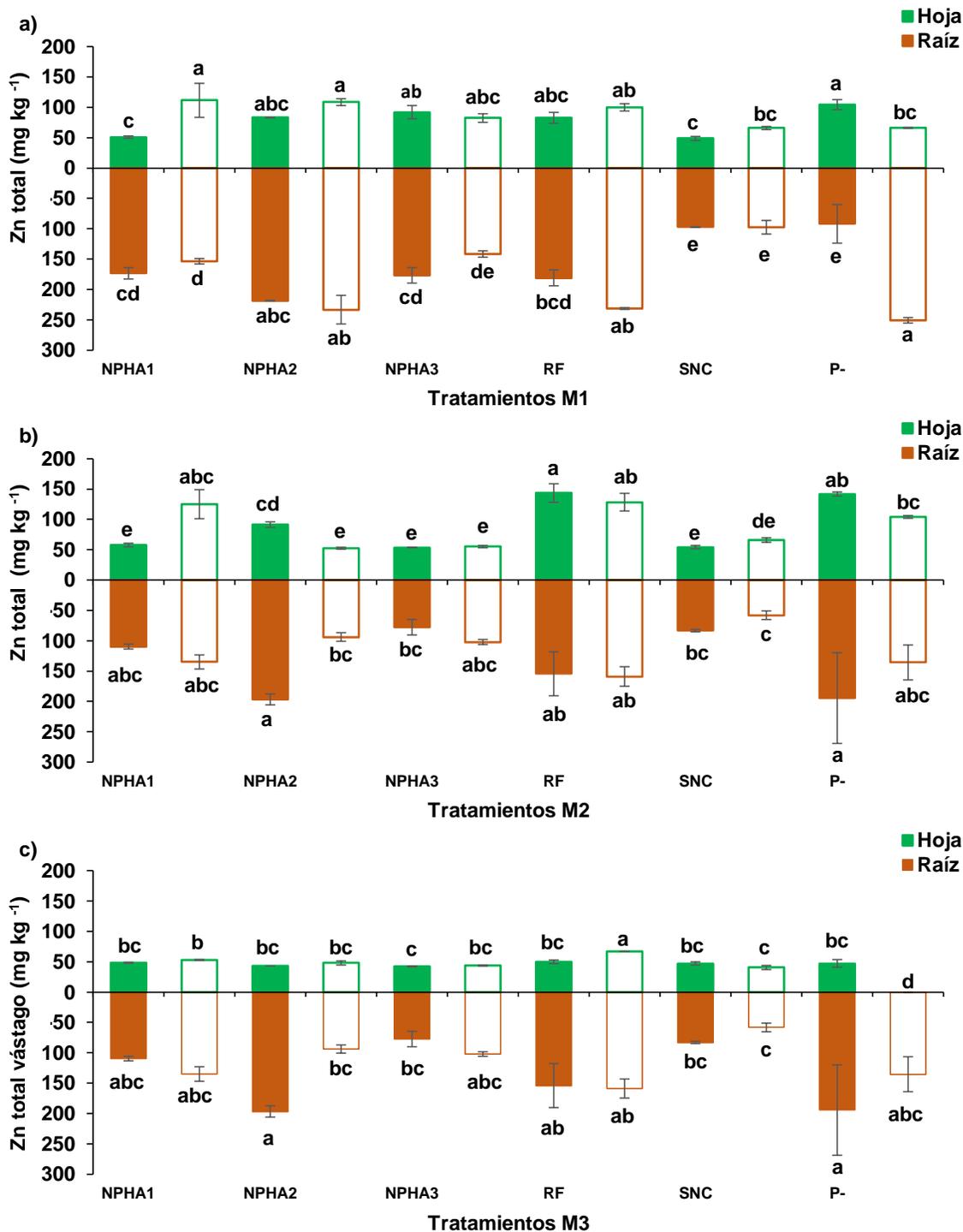


Figura 40. Porcentaje de Zn total en vástago (barras verdes) y raíz (barras marrones). a) Muestreo 1 (M1), b) muestreo 2 (M2), c) muestreo 3 (M3). Las barras con y sin relleno representan respectivamente los promedios de los tratamientos con y sin inóculo bacteriano. También se indican las desviaciones estándar (n=3). Diferentes letras muestran diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) al comparar entre tratamientos en forma independiente el porcentaje de Zn en vástago o en raíces.

3.7.6.5. Concentración total de Cu en tejido vegetal

Los tratamientos que presentaron efecto positivo sobre el Cu total en tejido foliar de lechuga fueron los siguientes: RF=P->NPHA1=NPHA2>SNC=NPHA3. El inoculo bacteriano no tuvo efecto positivo sobre la concentración de Cu total de vástago de lechuga. A los 45 ddg se registró la concentración más alta de Cu total en tejido foliar de lechuga, seguido por el M2 y M3.

En la Figura 40 se muestran en barras verdes la concentración de Cu total por fecha de evaluación. Se aprecia que la concentración de Cu total en vástago decrece con el tiempo, de manera que es más alta la concentración en el primer muestreo y más bajo en el muestreo tres.

Los tratamientos que tuvieron efecto positivo sobre la concentración de Cu total en raíz de lechuga se mencionan a continuación en orden decreciente: RF>NPHA1>NPHA2=NPHA3>P->SNC. El inóculo de *E. cloacae*-31 no ejerció efecto positivo sobre la concentración de Cu total en tejido radical de lechuga.

La concentración de Cu en raíz al igual que en vástago disminuyó con forme pasó el tiempo: M1>M2>M3. En la Figura 40 se muestran las concentraciones de Cu total en tejido radical en barras marrón. Como en vástago, las concentraciones más altas se observan en el primer muestreo.

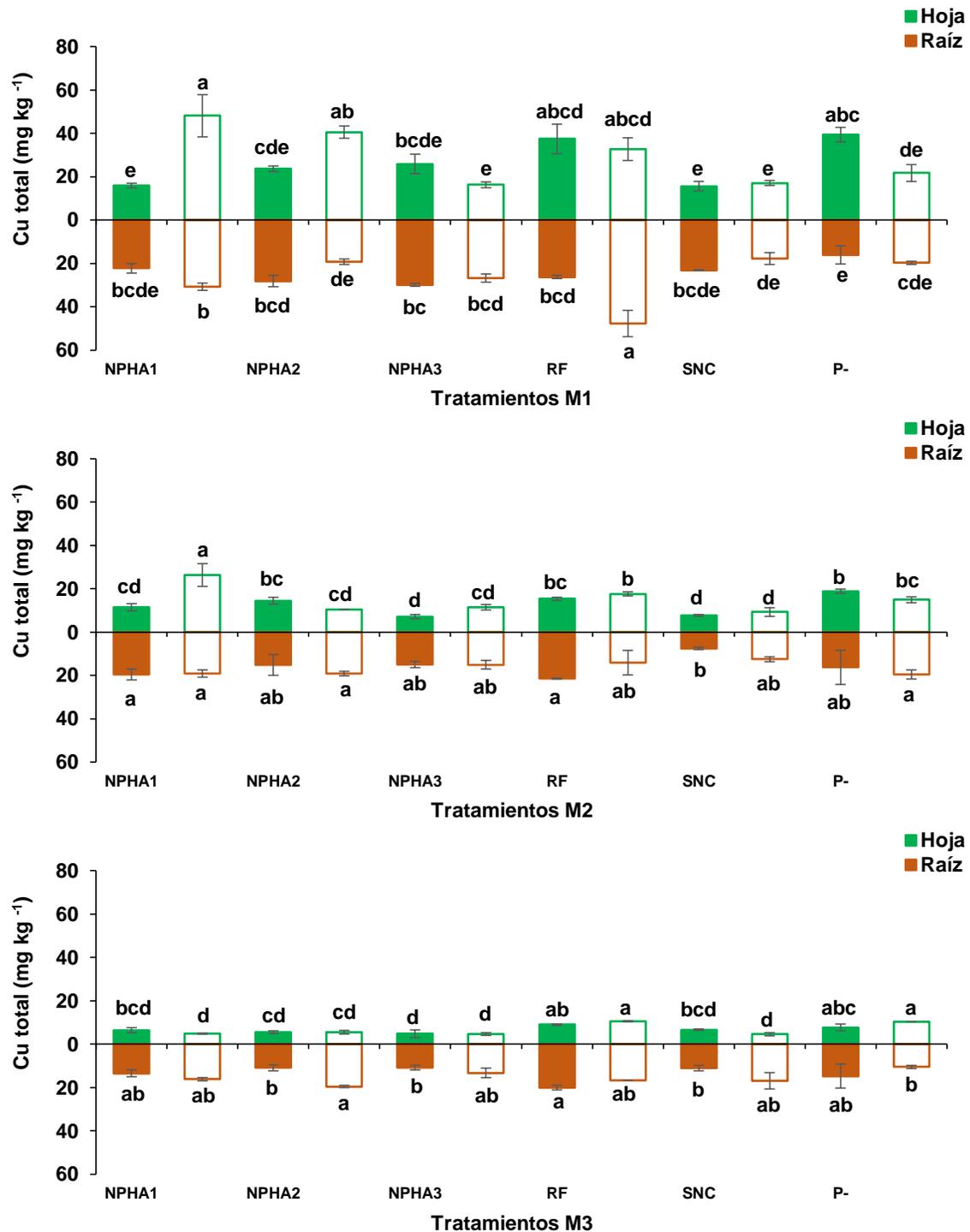


Figura 41. Porcentaje de Cu total en vástago (barras verdes) y raíz (barras marrones). a) Muestreo 1 (M1), b) muestreo 2 (M2), c) muestreo 3 (M3). Las barras con y sin relleno representan los promedios de los tratamientos con y sin inóculo bacteriano respectivamente. También se indican las desviaciones estándar (n=3). Diferentes letras muestran diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) al comparar entre tratamientos en forma independiente el porcentaje de Cu en vástago o en raíces.

3.7.6.6. Concentración total de Fe en tejido vegetal

Los tratamientos que beneficiaron el incremento en la concentración de Zn en vástago fueron los siguientes: P=RF>NPHA1=NPHA2>SNC>NHA3. Por otra parte, el inóculo bacteriano (*E. cloacae*-31) o tuvo efecto significativo sobre la concentración de Fe total de tejido foliar de lechuga. Los tiempos de evaluación tuvieron efecto sobre la concentración de Fe total en follaje de lechuga: M1>M2>M3.

En la Figura 41 se observan las concentraciones de Fe total en hojas de lechuga, (barras verdes). Al igual que en Cu total, se aprecia una disminución en la concentración de Fe total con forme pasa el tiempo.

Casi todos los tratamientos excepto SNC tuvieron un efecto positivo sobre la concentración de Fe en tejido radical: P=NPHA3=RF=NPHA1=NPHA2<SNC. La presencia del inóculo bacteriano no presentó efecto significativo sobre la concentración de Fe en raíz. El tiempo de muestreo en el que se observó la mayor concentración de Fe total en raíz fue a los 45 ddg, en tanto que a medida que transcurrió el tiempo, la concentración de Fe total fue disminuyendo. En la Figura 41 se muestran las concentraciones de Fe total en raíz (barras marrones). Las concentraciones más altas se observan en el siguiente orden: M1>M2>M3.

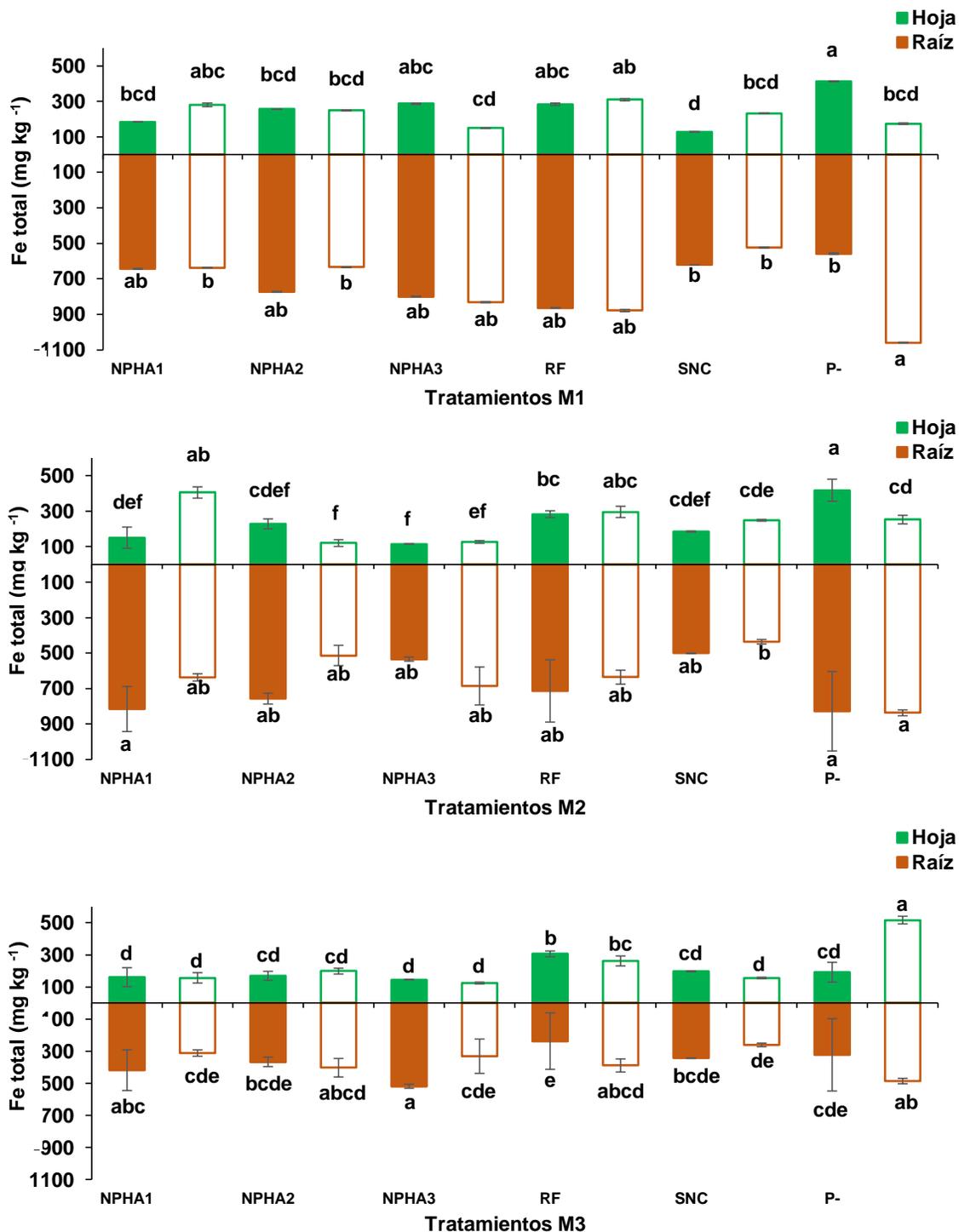


Figura 42. Porcentaje de Fe total en vástago (barras verdes) y raíz (barras marrones). a) Muestreo 1 (M1), b) muestreo 2 (M2), c) muestreo 3 (M3). Las barras con y sin relleno representan los promedios de los tratamientos con y sin inóculo bacteriano respectivamente. También se indican las desviaciones estándar (n=3). Diferentes letras muestran diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) al comparar entre tratamientos en forma independiente el porcentaje de Fe en vástago o en raíces.

3.7.7. Pigmentos fotosintéticos

3.7.7.1. Clorofila a

Los tratamientos que dieron como respuesta altas concentraciones de clorofila a por orden decreciente fueron los siguientes: NPHA3 (6.01 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) =NPHA1 (6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) =RF (5.6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) =SNC (5.4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) >P- (5.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) >NPHA2 (4.3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). No hubo diferencias significativas entre las concentraciones de clorofila a, de las plantas inoculadas (5.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de las no inoculadas (5.3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Los tiempos de evaluación en los que se observaron las mayores concentraciones de clorofila a, fueron: M3 (5.7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) >M1 (5.4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) >M2 (5.1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

3.7.7.2. Clorofila b

La concentración de clorofila b generada como respuesta a los tratamientos con distinta fuente de fósforo se enlista a continuación: NPHA3 (1.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) >NPHA1 (1.6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) >SNC (1.6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) >RF (1.6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) >P- (1.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) >NPHA2 (1.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). La concentración de clorofila b entre plantas inoculadas (1.6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) y no inoculadas (1.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) no tuvo diferencias significativas. A los 45 ddg (1.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) se obtuvieron concentraciones de clorofila b, estadísticamente más altas que a los 65 ddg (1.4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) y 95 ddg (1.4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

3.7.7.3. Clorofila total

Los tratamientos que produjeron de mayor a menor concentración de clorofila total fueron: NPHA3 (7.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) >NPHA1 (7.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) =SNC (7.4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) =RF (7.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) >P- (6.7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) >NPHA2 (5.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Las concentraciones de clorofila total que se obtuvieron de plantas inoculadas (7.1 7.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) y no inoculadas (7 7.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) no tuvieron diferencias estadísticas entre sí. En el día 45 ddg se registró la mayor concentración de clorofila total, seguido por el día 95 ddg y por último a los 65 ddg.

3.7.7.4. Carotenoides

Los tratamientos que originaron las concentraciones más elevadas de carotenoides fueron los siguientes en orden decreciente: NPHA3 (0.56 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) =NPHA1 (0.60 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) >RF (0.54 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) > P- (0.51 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) = SNC (0.51 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) >NPHA2 (0.44 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). No hubo diferencias estadísticas entre las concentraciones de carotenoides con inóculo y sin inóculo. La concentración de carotenoides fue significativamente más alta a los 45 ddg y 95 ddg (0.56 y 0.54 7.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ respectivamente) y más baja a los 65 ddg (0.49 7.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Los coeficientes de correlación más significativos para pigmentos vegetales fueron: clorofila a y b (0.83), clorofila a y T (0.92), clorofila a y carotenoides (0.85), clorofila b y T (0.9), clorofila b y carotenoides (0.9), clorofila T y carotenoides (0.91).

Cuadro 12. Concentración de pigmentos fotosintéticos expresada en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila total	Carotenoides
	Inóculo (+) y(-)	Inóculo (+) y(-)	Inóculo (+) y(-)	Inóculo (+) y(-)
Muestreo 1	5.4 ab	1.8 a	7.4 a	0.6 a
Muestreo 2	5.1 b	1.4 b	6.6 b	0.5 b
Muestreo 3	5.7 a	1.4 b	7.2 ab	0.6 a

3.7.8. Correlaciones de Pearson

Los coeficientes de correlación de Pearson más representativos entre las variables morfológicas, concentración porcentual de calcio y fósforo, así como de los pigmentos vegetales se enlistan en el Cuadro 13:

Cuadro 13. Coeficientes de correlación de Pearson de los micronutrientes (Cu, Fe, Zn) presentes en vástago y en raíz de lechuga.

Trat	CuV	CuR	FeR	ZnV	ZnR
LongH	-0.56				-0.57
PSR					-0.51
AF			-0.50		-0.53
P%V					-0.51
CuV		0.57	0.53	0.61	
CuR	0.57		0.52		
FeR	0.53	0.51		0.52	0.52
ZnV	0.61		0.52		
ZnR			0.52		

*CuV: Cobre en vástago, CuR: cobre en raíz; FeR: Hierro en raíz, ZnV: Zinc en vástago; ZnR: Zinc en raíz.

Cuadro 15. Coeficientes de correlación de Pearson de las variables morfológicas que se evaluaron en vástago y raíz de lechuga.

Trat	Long H	Long R	PFV	PFR	PSV	PSR	AF	VR
Long H		0.64	0.52		0.69	0.69	0.73	0.67
Long R	0.64							
PFV	0.51			0.90	0.73	0.68	0.74	0.68
PFR			0.90		0.56	0.52	0.56	0.56
PSV	0.69		0.73	0.56		0.94	0.95	0.94
PSR	0.69		0.68	0.52	0.94		0.97	0.97
AF	0.73		0.74	0.56	0.94	0.97		0.95
VR	0.70		0.68	0.56	0.94	0.97	0.95	
P%V	0.54							
CuV	-0.56							
FeR							-0.50	
ZnR	-0.58						-0.53	

*Long H/R: Longitud de hoja/raíz; PFV/R: Peso fresco vástago/raíz; PSV/R: Peso seco vástago/raíz; AF: área foliar; VR: volumen radical; P%V/R: fósforo porcentual vástago/raíz.

Cuadro 16. Coeficientes de correlación de Pearson de fósforo y calcio porcentual presentes en vástago y raíz de lechuga.

Trat	P%V	P%R	Ca%R
LongH	0.54		

P%V		0.80
P%R	0.80	
ZnR	-0.51	
Carot		-0.53

3.8. DISCUSIÓN

Los tratamientos SNC, NPHA3, NPHA1 y NPHA2 produjeron mayor crecimiento en tejido foliar y tejido radical que con RF y P-. Probablemente debido a que en los primeros hubo una mayor liberación de fósforo que en los últimos tratamientos. Lo cual concuerda con los resultados experimentales de solubilidad con ácido cítrico al 2%: SNC (100%) > NPHA (17%) > RF (4%).

Además se encontró correlación (0.54) entre la longitud de hoja y el porcentaje de fósforo en vástago. Esto indica que el porcentaje de fósforo en vástago se relaciona con el crecimiento del tejido foliar de lechuga. Finalmente, el fósforo es un elemento indispensable para la formación estructural de la bicapa de fosfolípidos en las células, así como para la síntesis de ATP, que es la molécula energética de las células (Beltrán, 2014; Cade-Menun *et al.* 2010; Ha y Tran 2014; Laliberté *et al.*, 2012).

Por lo que la deficiencia de fósforo provoca disminución en el crecimiento y desarrollo de las plantas, reprime la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas y la expresión de genes implicados en la fotosíntesis. Además provoca un arreglo diferente en los componentes de la pared celular que reemplaza los fosfolípidos por galacto y sulfolípidos (Misson *et al.* 2005).

Las raíces de las lechugas que no fueron inoculadas desarrollaron mayor longitud de raíz (9.34 cm) que aquellos que si recibieron inóculo bacteriano (7.64 cm) Es decir, las raíces de las plantas sin inóculo bacteriano se enfocaron a extenderse: se elongaron. Bajo condiciones deficientes de fósforo, las plantas aumentan el crecimiento de las raíces o los pelos radicales o su densidad, con el objetivo de lograr la exploración de una mayor superficie y volumen de suelo (Gahoonia et al., 2001).

Sin embargo, las raíces de las plantas inoculadas enfocaron su energía y recursos a expandir sus horizontes laterales, dirigidos hacia el incremento de volumen radical. Tal como lo demuestran los resultados de la presente investigación, donde las plantas inoculadas registraron volúmenes radicales más amplios que los alcanzados por tratamientos sin inocular.

Nacry *et al.*,(2005) argumentan que las plantas se valen de diversos mecanismos y producción de sustancias bioquímicas como las auxinas, que regulan la arquitectura de la raíz en respuesta a las deficiencias de fósforo, incluyendo la estimulación de la elongación de raíces laterales como consecuencia de cambios en su distribución dentro de las células de la raíz.

Según Jones (2012) la intercepción y la abundancia de pelos radicales incrementa la oportunidad de absorber fósforo, además las plantas expuestas a deficiencias de este elemento activan diversos mecanismos que les permiten incrementar su absorción de la solución del suelo o realizar un uso interno más eficiente de éste (Vance *et al.* 2003).

Díaz-Vargas *et al.* (2001) reportan que el desarrollo de las raíces que se favorecen por efecto de la inoculación de las bacterias, especialmente R1B *Enterobacter cloacae*

S2-AS. Se manifiesta directamente en mayor crecimiento de la parte aérea del cultivo. Afirma que las variables agronómicas que se evaluaron en la parte aérea y en la raíz del cultivo, registraron correlaciones altamente significativas ($\alpha = 0.05$).

Por ejemplo, los mismos autores observaron una correlación positiva ($r = 0.75$) entre el volumen radical y el área foliar, interpretando con ello que a mayor superficie de exploración existe un mejor abastecimiento de nutrientes a la planta. Lo cual concuerda ampliamente con los resultados que se obtuvieron en la investigación actual, donde se observaron correlaciones altamente significativas entre volumen de raíz y área foliar ($r=0.95$), o peso seco de raíz y peso seco de vástago ($r=0.94$), peso seco de raíz y área foliar ($r=0.97$), peso seco de vástago y volumen de raíz ($r=0.94$), entre otras de las combinaciones entre las variables de vástago y raíz (Cuadro 15).

Con respecto a *E. cloacae*-31, que fue la bacteria que se utilizó como inoculante bacteriano para las plantas de lechuga, se le atribuyen diversas características que la convierten en un inoculante ideal, por ejemplo, se encuentra entre los géneros más frecuentemente aislados de la microbiota endofítica de diversas especies (Kloepper *et al.* 2004; Lacava *et al.* 2006; Wang *et al.* 2009).

Los endófitos estimulan el crecimiento vegetal mediante la producción de fitohormonas, nutrientes minerales, solubilización de fósforo, fijación de nitrógeno (diazótrofas), así como en el incremento en la absorción de las raíces, etc. (Conn *et al.* 1997; Bashan y de Bashan 2005).

Además, junto a géneros como *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Rhizobium*, *Enterobacter* es de las más poderosas BSP (Whitelaw, 2000) y pueden ser referidas como las más

importantes cepas (Subbarao 1988; Kucey *et al.* 1989). Son muy efectivas para incrementar el fósforo disponible en suelos así como el crecimiento y rendimiento de los cultivos principalmente, por lo que la explotación de las BSP para hacer uso del fósforo fijado en los suelos, así como de las reservas naturales de roca fosfórica poseen un enorme potencial (Khan *et al.* 2009).

Enterobacter sp. también puede producir reguladores del crecimiento como etileno, auxinas y citoquininas (Lodewyckx *et al.* 2002) y puede promover el crecimiento debido a la producción de sideróforos (Giongo *et al.* 2010) como respuesta a la baja disponibilidad de Fe^{+3} (tian *et al.* 2009).

No obstante, el bajo o nulo efecto de las cepas en el crecimiento de las plantas puede deberse a la ausencia de un medio adecuado para su desarrollo en la rizósfera. Para que los microorganismos puedan asociarse íntimamente con las raíces, tienen que escapar de los mecanismos de defensa de la planta y encontrar condiciones nutritivas y ambientales adecuadas para su crecimiento (Barea y Azcón-Aguilar, 1982).

Las causas probables de que el inóculo bacteriano no presentara efecto positivo sobre la mayoría de las variables que se evaluaron, pudo deberse a la disminución de la población de las bacterias inoculadas. Este descenso poblacional puede relacionarse con la dificultad de las bacterias para adaptarse al cambio y desplazarse a lo largo de la raíz (Barea y Azcón-Aguilar, 1982).

Además, el efecto benéfico de las cepas bacterianas no es específico del cultivo de donde se aislaron. Las complejas interacciones en la rizósfera, requieren estudios

específicos de las cepas con cultivos específicos, para determinar el mecanismo de promoción de crecimiento. Bashan (1986) y García *et al.* (1995) argumentan que la densidad poblacional de las bacterias disminuye rápidamente después de la inoculación, aunque después de establecerse la asociación, la población microbiana se incrementa.

Por otra parte en relación a los pigmentos fotosintéticos, en el presente estudio se observaron diferencias significativas en las concentraciones de cada uno de los pigmentos que se evaluaron con respecto a los tratamientos aplicados, a diferencia de Marchiol *et al.* (2019), quienes solo observaron efecto significativo en la disminución de la clorofila b con el tratamiento de 2000 mg L⁻¹ de CMC-nHA.

En contraste con los hallazgos de Marchiol *et al.* (2019), en la presente investigación si se encontraron diferencias significativas en la concentración de fósforo y calcio, en comparación con el testigo y entre tratamientos, además las concentraciones de fósforo y calcio en los testigos fueron mayores o iguales a los tratamientos, aunque no superaron más de dos veces la concentración de los tratamientos.

En las variables morfológicas se esperaba que el tiempo de evaluación en el que se observaron mejores resultados fuera en el último muestreo, dado que es lógico pensar que el crecimiento es paulatino y se da en función del tiempo, de manera que a mayor tiempo, mayor crecimiento y consecuente incremento de biomasa. Sin embargo, no siempre se obtuvo ese resultado.

En lo concerniente a la interpretación de las concentraciones de macro y micro elementos, los intervalos de suficiencia para porcentaje de fósforo en tejido foliar de lechuga dependieron del autor. Por ejemplo, de acuerdo a Jones y Mills (1996) el intervalo

de suficiencia para fósforo en tejido foliar de lechuga Cos es de 0.45-0.8%, en tanto que, según Reuter y Robinson (1988), el intervalo adecuado es de 0.4-0.6%. El porcentaje mayor de fósforo alcanzado por SNC fue de 0.2% y el más bajo presentado por P- de 0.05%. Entonces con base a los intervalos de suficiencia, ambos tratamientos se ubican fuera de los criterios de suficiencia.

Los intervalos de suficiencia para calcio son 2-2.8% Cos (Jones y Mills 1996) y 1.4-1.5% adecuado (Reuter y Robinson 1988), que en comparación con los valores más altos y bajos de calcio (1-1.4 % de calcio) son menores. Los criterios de suficiencia para Cu son 5-20 mg kg⁻¹ Cos (Jones y Mills 1996) y 3-7 mg kg⁻¹. En tanto que el intervalo de valores obtenidos en la presente investigación fueron de 4-48 mg kg⁻¹, por lo que se superan los valores máximos.

En cuanto a Mn, los intervalos de suficiencia van de 11-250 mg kg⁻¹ Cos y 63-130 mg kg⁻¹, que comparados con los resultados 40-80 mg kg⁻¹ se encuentran dentro del primer criterio y parte del segundo.

El criterio adecuado de concentración de Fe es 40-100 mg kg⁻¹ Cos y 50-500 mg kg⁻¹, que en comparación a los resultados (134-315 mg kg⁻¹) que se obtuvieron son superiores al primer intervalo y caen dentro del segundo intervalo.

En el caso del Zn, los criterios de interpretación fueron los siguientes: 20-250 mg kg⁻¹ Cos y 25-150 mg kg⁻¹ de Zn, por lo que los resultados 41-112 mg kg⁻¹ de Zn se encontraron dentro de cualquiera de los dos intervalos.

Los intervalos de suficiencia para cada elemento cultivo de lechuga varía de acuerdo al autor y depende de la etapa fenológica del cultivo, del tipo de sustrato utilizado, así como si los valores del intervalo de suficiencia se observaron en campo o fueron valores teóricos calculados para diagnóstico, o incluso depende de la parte de la planta o tejido (foliar o radical), por lo que las interpretaciones a los resultados deben tomarse a reserva y cuidado de los factores ya mencionados.

En la literatura actual aparentemente no existen investigaciones que aborden la interacción entre NPHA como fuente de fósforo y la acción de BSP sobre la nutrición y crecimiento de plantas. Las investigaciones existentes abordan por separado el efecto de los factores mencionados. Por ejemplo, las NPHA se han evaluado en algunas plantas como la soya, el trigo y la lechuga (Liu y Lal 2014; Montalvo y McLaughlin 2014, Taskin *et al.*, 2018).

Montalvo y McLaughlin (2014) probaron la eficiencia de las NPHA como fuente de fósforo en plantas de trigo, utilizaron suelos ácidos (andisoles y oxisoles) altamente adsorbentes a este nutriente, contra el uso de hidroxapatita y fertilizante superfosfato triple (SFT) a razón de 150 mg kg^{-1} , ambos en tamaño a granel.

Dichos autores encontraron que las NPHA tuvieron mejor desempeño en la producción de materia seca de vástago y consumo de fósforo que la hidroxapatita a granel, debido a su elevada tasa de solubilización, aunque el SFT continuó siendo el fertilizante más eficiente.

Liu y Lal (2014) probaron en invernadero los efectos de la fertilización con NPHA en el cultivo de soya (*Glycine max*). Los autores en encontraron que la adición de NPHA

incrementó la tasa de crecimiento y rendimiento de semilla en 32.6% y 20.4%, respectivamente, en comparación con la fertilización convencional (SFT). Obtuvieron incrementos en 18.2% y 41.2% en la producción. Por lo que concluyeron que las NPHA tienen la capacidad de incrementar el rendimiento agronómico y reducir riesgos de eutrofización.

Taskin *et al.* (2018) compararon los efectos de dos fuentes de fósforo: NPHA y una fuente soluble (H_3PO_4) en plantas de lechuga con dos tipos de suelo (alto y levemente calcáreo). Estos autores encontraron efecto positivo en el crecimiento y concentración de fósforo en tejido vegetal, por lo que recomiendan a las NPHA como fuente alternativa de fertilización.

En el presente estudio, la interacción NPHA-BSP no incrementó el crecimiento y concentración de fósforo en las plantas de lechuga, sin embargo, la concentración más alta de NPHA, representada por el tratamiento NPHA3, fue similar a los resultados del testigo positivo (SNC) en la mayoría de las variables que se evaluaron.

Las NPHA siguen siendo una gran opción como fuente alterna de fósforo, pues poseen diversas ventajas que las hacen muy accesibles y la mejor opción ya que pueden sintetizarse por diversas metodologías, el costo por elaborarlas es bajo y además la hidroxiapatita es un material inocuo, que al liberarse en el ambiente no representa una amenaza para el mismo.

Así mismo, el uso de inoculantes bacterianos representa una alternativa natural que facilita la disponibilidad del fosforo para las plantas. Por lo que se recomienda realizar

más experimentos que impliquen el estudio de la interacción BSP y NPHA en concentraciones, condiciones y cultivos diferentes. Además de estudiar la especificidad de los inoculantes bacterianos con determinados cultivos, a fin de comprender con mayor precisión el funcionamiento de las BSP como coadyuvantes en el proceso de solubilización de fósforo. Y el papel las nanopartículas como fuente alterna de fósforo en interacción con las BSP.

3.9. CONCLUSIONES

El mejor tratamiento fue NPHA3, debido a que en la mayoría de las variables que se evaluaron casi igualó al testigo positivo (SNC).

El inóculo bacteriano solo tuvo efecto positivo sobre volumen radical de lechuga.

El tiempo de evaluación a 95 ddg fue el mejor para el desempeño de las variables morfológicas que se evaluaron.

La interacción NPHA-BSP no tuvo efecto positivo sobre el crecimiento y nutrición de plantas de lechuga, debido a que la mayoría de los tratamientos con NPHA como fuente de fósforo e inoculados, no produjo valores superiores al control positivo (SNC).

El efecto de los tratamientos SNC, NPHA3. NPHA1 y NPHA2 tuvieron un efecto positivo sobre las variables morfológicas y la concentración de macro elementos, mientras que el resto de los tratamientos tuvieron efecto negativo sobre las mismas.

Los tratamientos P- y RF tuvieron efecto positivo sobre la concentración de micro elementos (excepto Mn) y negativo para la concentración de macro elementos.

NPHA3 tuvo efecto positivo en todos los pigmentos fotosintéticos, ya que presentó altas concentraciones en cada uno de ellos. En tanto que NPHA1 solo tuvo efecto positivo sobre la concentración de clorofila a y carotenoides.

4.0. CONCLUSIONES GENERALES

Se acepta la hipótesis específica 1 (Fase I): Las BSP que se seleccionaron para la fase II solubilizan altas concentraciones de fósforo (CP-31-*E. cloacae* solubilizó 536 mg L⁻¹; *S. marcescens* 490 mg L⁻¹, CP-26-*E. cloacae* 485 mg L⁻¹, CP-13-*K. oxytoca* 432 mg L⁻¹, CP-29-1-*C. freundii* 408 mg L⁻¹ y CP-21-*K. oxytoca* 400mg L⁻¹) y disminuyen el pH de su medio de cultivo (pH entre 4.0-4.2).

Se acepta la hipótesis específica 2 (Fase II): La interacción NPHA-BSP *in vitro* tiene un efecto positivo sobre la solubilización de fósforo.

Se acepta la hipótesis específica 3 (Fase II): La cepa elegida (*E. cloacae*-31) registra la mayor concentración de fósforo soluble (63 %) y menor valor de pH (4) en el medio.

Se rechaza la hipótesis 4 (Fase III): La interacción NPHA-BSP no incrementa el crecimiento y nutrición en plantas de lechuga.

Las plantas que se trataron con NPHA e inóculo bacteriano no presentaron efectos positivos sobre el crecimiento y nutrición en plantas de lechuga en ninguno de los tiempos de evaluación.

Sin embargo, las plantas que se trataron solo con NPHA tuvieron efecto positivo sobre la mayoría de las variables que se evaluaron en planta de lechuga. El efecto del inóculo bacteriano (*E. cloacae*) fue positivo sobre el volumen radical de las lechugas cuando a los 95 ddg, el tratamiento NPHA3 igualó estadísticamente al testigo positivo (SNC).

Las plantas del tercer muestreo (95 ddg) presentaron valores significativamente más altos que aquellas que se evaluaron durante los otros muestreos, sobre las variables morfológicas que se evaluaron en planta de lechuga.

4.1. LITERATURA CITADA

- Achal V, Savant V, Reddy M. 2007. Phosphate solubilization by a wild type strain and UV-induced mutants of *Aspergillus tubugensis*. *Soil Biology and Biochemistry*. 39: 695-699.
- Baligar, V.C.; Fageria, N.K. Nutrient use efficiency in plants: An overview. In *Nutrient Use Efficiency: From Basics to Advances*; Rakshit, A., Singh, H.B., Sen, A., Eds.; Springer: New Delhi, India, 2015; pp. 1–14. ISBN 978-81-322-2168-5.
- Banerjee S, Palit R, Sengupta C, Standing, D. 2010. Stress induced phosphate solubilization by *Arthrobacter* sp. and *Bacillus* sp. Isolated from tomato rhizosphere. *Australian Journal of crop science*. 4(6):378-383.
- Barker, A.V., Pílbeam, D.J. 2007. *Handbook of Plant Nutrition*. CRC. Taylor and Francis Group. 662p.
- Beltrán, P.M.E. 2014. La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Microbiología del suelo. Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 15 (1): 101-113.
- Berry, W.L., Krizek, D.T.; Ormord, D.P., McFarlane, J.C.; Langhans, R.W.; Tibbits, T.W. 1981. Variation in elemental content of lettuce grown under baseline conditions in five controlled-environment facilities. *Journal of the American Society Horticultural Science*. 106:661–666
- Beverly, R.B. 1984. Nutritional survey of the Everglades vegetable industry. *Proceedings of the Florida State of Horticultural Society*. 97:201–205

Cade-Menun, B.J.; Carter, M.R.; James, D.C.; Liu, C.W. Phosphorus forms and chemistry in the soil profile under long-term conservation tillage: A phosphorus-31 nuclear magnetic resonance study. *J. Environ. Qual.* 2010, 39, 1647–1656.

De Moraes Rego, C.A.R., Costa, B.P., Sampaio, M.C., Kashiwaqui, M.M., Caetano, J.H.S., Guimarães, V.F., de Herrera, J.L., Coutinho, P.W.R., Tsutsumi, C.Y., Cruz, M.S.F.V., Alves, T.N., Oliveira, S.S., Ristau, A.C.P. and Braz, H. 2018. Production of lettuce seedlings with association of diazotrophic bacteria and humic acids. *American Journal of Plant Sciences.* 9: 946-957
<https://doi.org/10.4236/ajps.2018.95072>

De-Bashan, L.E., Holguin, G., Glick, B.R. and Bashan, Y. 2007. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. In: *Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo.* (Eds.) Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A. Capítulo 8. Editorial Trillas, Ciudad de México. 170-224.

Duhan, J.S.; Kumar, R.; Kumar, N.; Kaur, P.; Nehra, K.; Duhan, S. 2017. Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture. *Biotechnology Reports.* 125: 11–23.

Gómez-Morales, J.; Lafisco, M.; Delgado López, J.M.; Stéphanie, S.; Drouet, C. Progress on the preparation of nanocrystalline apatites and surface characterization: Overview of fundamental and applied aspects. *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* 2013, 59, 1–46.

- Ha, S.; Tran, L.-S. Understanding plant responses to phosphorus starvation for improvement of plant tolerance to phosphorus deficiency by biotechnological approaches. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2014, 34, 16–30.
- Jones, J.B.J. 2012. *Plant Nutrition and Soil Fertility Manual*. CRC Press. Taylor and Francis Group. 2nd edition. 299p.
- Jones, J.B.J., Mills, H.A. 1996. *Plant Analysis Handbook II. A practical sampling, preparation, Analysis, and interpretation guide*. Micromacro Publishing Inc..422p.
- Khan, A.A., Jilani, G., Akhtar, M.S., Naqvi, S.M.S., Rasheed, M. 2009. Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *Journal of Agricultural and Biological Science*. 1(1):48-58
- Kucey, R. M. N., H. H. Janzen and M. E. Legget. 1989. Microbial mediated increases in plant available phosphorus. *Adv. Agron.* 42:199 - 228.
- Kumari, P., Swapnil, Ekka, J.P., Tirkey, S.K., Ahmad, E. 2018. Agro-Nanotechnology: An innovate approach for diagnosis of plants. *Journal of Pharmacognosy and Phytchemistry*. Sp4: 352-357.
- Laliberté, E.; Turner, B.L.; Costes, T.; Pearse, S.J.; Wyrwoll, K.-H.; Zemunik, G.; Lambers, H. Experimental assessment of nutrient limitation along a 2-million-year dune chronosequence in the south-western Australia biodiversity hotspot. *J. Ecol.* 2012, 100, 631–642.
- Liu, R., Lal, R. 2014. Synthetic apatite nanoparticles as a phosphorus fertilizer for soybean (*Glycine max*). *Scientific Reports*.4:5686

- Liu, R.; Lal, R. 2015. Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. *Science of the Total Environment*. 514, 131–139
- Marchiol, L., Filippi, A., Adamiano, A., Esposti, L.D., Iafisco, M., Mattiello, A., Petrusa, E., Braidot, E. 2019. Influence of hydroxyapatite nanoparticles on germination and plant metabolism of tomato (*Solanum lycopersicum L.*): Preliminary Evidence. *Journal of Agronomy*. 9: 161. doi:10.3390/agronomy9040161
- Misson, J., Raghothama, K.G., Jain, A., Jouhet, J., Block, M.A., Bligny, R., Ortet, P., Creff, a., Somerville, S., Rolland, N., Doumas, P., Nacry, P., Herrea-Estrella, L., Nussaume, L., Thibaud, M.C. 2005. A genome wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proceedings of the National Academic of Sciences. USA*. 102: 11934-11939.
- Montalvo, D., McLaughlin, M. 2014. Efficacy of Hydroxyapatite nanoparticles as phosphorus fertilizer in andisols and oxisols. *Soil Fertility and Plant Nutrition*. 551-558.
- Patiño C. 2010. Solubilización de fosfatos por poblaciones bacterianas aisladas de un suelo del Valle del Cauca. Estudio de biodiversidad y eficiencia (tesis doctoral en Ciencias Agropecuarias - Manejo de Suelos y Aguas). Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia sede Palmira.
- Rubio G. 2002. Conectando el fósforo del suelo con la planta. *Informaciones agronómicas del cono sur* 16: 19:23.

- Saavedra Del R., G. 2017. Manual de producción de lechuga. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). 9: 1-150.
- Sanchez, C.A. 2007. Phosphorus. Chapter 3. In: Barker, A.V., Píbeam, D.J. Eds. 2007. Handbook of Plant Nutrition. Boca Raton, FL. 51-90
- Sanchez, C.A., Burdine, H.W., Guzman, V.L. 1988. Yield, quality, and leaf nutrient composition of crisphead lettuce as affected by N, P, and K on Histosols. Vegetable Section. Proceedings of the Florida State of Horticultural Society. 101:346–350
- Sánchez-López, D.B., García-Hoyos, A.M., Romero-Perdomo, F.A., Bonilla-Buitrago, R.R. 2014. Efecto de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal solubilizadoras de fosfato en *Lactuca sativa* cultivar White Boston. Revista Colombiana de Biotecnología. 16(2): 122-128.
- Sprio, S.; Sandri, M.; Ruffini, A.; Adamiano, A.; Iafisco, M.; Dapporto, M.; Panseri, S.; Montesi, M.; Tampieri, A. 2017. Tissue Engineering and Biomimetics with Bioceramics. In Advances in Ceramic Biomaterials; Palmero, P., Cambier, F., De Barra, E., Eds.; Woodhead Publishing: Cambridge, UK. 407–432.
- Subbarao, N. S. 1988. Phosphate solubilizing micro-organism. In: Biofertilizer in agriculture and forestry. Regional Biofert. Dev. Centre, Hissar, India. pp. 133-142
- Tampieri, A.; Iafisco, M.; Sprio, S.; Ruffini, A.; Panseri, S.; Montesi, M.; Adamiano, A.; Sandri, M. 2016. Hydroxyapatite: From Nanocrystals to Hybrid Nanocomposites for Regenerative Medicine. In Handbook of Bioceramics and Biocomposites; Antoniac, I., Ed.; Springer: Cham, Switzerland. 119–144.

- Taşkın, M.B., Şahin, O., Taskin, H., Atakol, O., Inal, A., Gunes, A. 2018. Effect of synthetic nano-hydroxyapatite as an alternative phosphorus source on growth and phosphorus nutrition of lettuce (*Lactuca sativa* L.) plant. Journal of Plant Nutrition. 1-7. DOI: 10.1080/01904167.2018.1433836
- Vance, C.P., Uhde-Stone, C., Allan, D.L. 2003. Phosphorus acquisition and use, critical adaptation by plants for securing nonrenewable resource. New Phytologist True. 157: 423-447.
- Wasaki, J., Yonetani, R., Kuroda, S., Shinano, T., Yasaki, J., Fujii, F., Shimbo, K., Yamamoto, K., Sakata, K., Sasaki, T., Kishimoto, N., Kikuchi, S., Yamagishi, M., Osaki, M. 2003. Transcriptomic analysis of metabolic changes phosphorus stress in rice plant roots. Plant, Cell and Environment. 26: 1515-1523.
- Whitelaw, M. A. 2000. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. Advances in Agronomy. 69:99-151

Anexo 1. Formulación de la solución nutritiva Steiner.

SOLUCIÓN STEINER COMPLETA CE 1									
FERTILIZANTES	FORMULA	(g/L) de Sol Madre		SOLUCION MADRE	SN 25% 2.5 mL	SN 50% 5 mL	SN 75% 7.5 mL	SN 100% 10 mL	
Nombre comercial	(mg/L)			Kg					
Nitrato de calcio	1059		105.9	0.1059	26.5	52.9	79.4	105.9	
Nitrato de potasio (NKS)	72		7.2	0.0072	1.8	3.6	5.4	7.2	
Fosfato monopotásico (M)	135		13.5	0.0135	3.4	6.7	10.1	13.5	
Sulfato de magnesio	240		24.0	0.0240	6.0	12.0	18.0	24.0	
Sulfato de potasio	487		48.7	0.0487	12.2	24.3	36.5	48.7	
MIX DE MICROS	14		1.4	0.0014	0.4	0.7	1.1	1.4	
QUELATO DE BORO	3		0.3	0.0003	0.1	0.1	0.2	0.3	
QUELATO DE HIERRO	32		3.2	0.0032	0.8	1.6	2.4	3.2	
TOTALES	2041		204.1	0.2041	51.0	102.1	153.1	204.1	

SOLUCIÓN STEINER SIN KH2PO4									
FERTILIZANTES	FORMULA	(g/L) de Sol Madre		SOLUCION MADRE	SN 25% 2.5 mL	SN 50% 5 mL	SN 75% 7.5 mL	SN 100% 10 mL	
Nombre comercial	(mg/L)			Kg					
Nitrato de calcio	1059		105.9	0.1059	26.5	52.9	79.4	105.9	
Nitrato de potasio (NKS)	72		7.2	0.0072	1.8	3.6	5.4	7.2	
Fosfato monopotásico (M)	135		0.0	0.0000	0.0	0.0	0.0	0.0	
Sulfato de magnesio	240		24.0	0.0240	6.0	12.0	18.0	24.0	
Sulfato de potasio	487		56.0	0.0560	14.0	28.0	42.0	56.0	
MIX DE MICROS	14		1.4	0.0014	1.4	1.4	1.4	1.4	
QUELATO DE BORO	3		0.3	0.0003	0.3	0.3	0.3	0.3	
QUELATO DE HIERRO	32		3.2	0.0032	3.2	3.2	3.2	3.2	
TOTALES	2041		198.0	0.1980	49.5	99.0	148.5	198.0	