

Universidad de San Carlos de Guatemala
Dirección General de Investigación
Programa Universitario de Investigación en Ciencias Básicas

INFORME FINAL

Evaluación de la eficiencia de solubilización de fósforo de siete especies de microorganismos provenientes de suelos andisoles de Guatemala.

Equipo de investigación

Ph.D. Gregorio Amílcar Sánchez Pérez¹

M.Sc. José Alejandro Ruiz Chután^{1,2}

Ing. Agr. Julio Ernesto Berdúo Sandoval¹

Lic. Isabel Cristina Gaitán Fernández³

Dr. Aníbal Ovidio Sacbajá Galindo¹

Guatemala febrero de 2020

Facultad de Agronomía, Instituto de Investigaciones Agronómicas y Ambientales¹
Department of Crop Sciences and Agroforestry, Czech University of Life Sciences²
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia³

Dr. Félix Aguilar Carrera
Director General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar
Coordinador General de Programas

Ing. Agr. Julio Rufino Salazar
Coordinador del Programa de Ciencias Básicas

Ph.D. Gregorio Amílcar Sánchez Pérez¹
Coordinador del Proyecto

M.Sc. José Alejandro Ruiz Chután^{1,2}
Investigador

Ing. Agr. Julio Ernesto Berdúo Sandoval¹
Investigador

Lic. Isabel Cristina Gaitán Fernández³
Investigadora

Dr. Aníbal Ovidio Sacbajá Galindo¹
Investigador

Facultad de Agronomía, Instituto de Investigaciones Agronómicas y Ambientales¹
Department of Crop Sciences and Agroforestry, Czech University of Life Sciences²
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia³

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, 2019. El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores. Esta investigación fue cofinanciada por la Dirección General de Investigación de la Universidad de San Carlos de Guatemala a través de la Partida Presupuestaria 4.8.63.4.45. durante el año 2019 en el Programa Universitario de Investigación de Ciencias Básicas. Financiamiento aprobado por Digi: Q. 249,019.1 Financiamiento ejecutado: Q. 211,353.71

Índice

1	Resumen.....	1
2	Palabras clave.....	1
3	Abstract.....	2
4	Introducción.....	2
5	Planteamiento del problema.....	4
6	Preguntas de investigación.....	5
7	Delimitación en tiempo y espacio.....	6
8	Marco teórico.....	8
8.1	Importancia del fósforo.....	8
8.2	Formas de fosfatos disponibles en el suelo.....	8
8.3	Dinámica del fósforo.....	9
8.4	Fijación del fósforo inorgánico en el suelo.....	10
8.5	Mecanismos de fijación.....	11
8.6	La acción de los microorganismos en la solubilización del fósforo en el suelo... 11	
8.7	Mecanismos empleados por los microorganismos para la solubilización de fósforo.....	13
9	Estado del arte.....	14
10	Objetivos.....	16
11	Hipótesis.....	17
12	Materiales y métodos.....	17
12.1	Enfoque y tipo de investigación.....	17
12.2	Recolección de información.....	18
12.3	Técnicas e instrumentos.....	20
12.4	Procesamiento y análisis de la información.....	24
13	Vinculación, difusión y divulgación.....	25

14	Productos, hallazgos, conocimientos o resultados.....	25
14.1	Identificación de <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Paecilomyces lilacinus</i> , <i>Penicillium oxalicum</i> y <i>Aspergillus niger</i> , en las zonas con suelos andisoles de la región central y occidental de Guatemala	25
14.2	Diversidad genética de los microorganismos identificados	31
14.3	Capacidad de solubilización de fósforo de las especies de microorganismos.....	35
14.4	Estabilidad de solubilización de fósforo de las especies de microorganismos.....	37
15	Análisis y discusión de resultados	43
15.1	Identificación de <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Paecilomyces lilacinus</i> , <i>Penicillium oxalicum</i> y <i>Aspergillus niger</i> , en las zonas con suelos andisoles de la región central y occidental de Guatemala	43
15.2	Diversidad genética de los microorganismos identificados	44
15.3	Capacidad de solubilización de fósforo de las especies de microorganismos.....	44
15.4	Estabilización de solubilización de fósforo de las especies de microorganismos	45
16	Conclusiones	46
17	Impacto esperado.....	47
18	Referencias.....	47
19	Apéndices.....	53

Índice de tabla

Tabla 1. Identificación y distribución de <i>Trichoderma harzianum</i>	26
Tabla 2. Identificación y distribución de <i>Trichoderma sp.</i>	27
Tabla 3. Identificación y distribución de <i>Paecilomyces lilacinus</i>	27
Tabla 4. Identificación y distribución de <i>Penicillium oxalicum</i>	28
Tabla 5. Identificación y distribución de <i>Aspergillus niger</i>	29
Tabla 6. Identificación y distribución de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	29
Tabla 7. Valores de índice de solubilización de tres resiembras consecutivas de los diferentes aislados de <i>Trichoderma harzianum</i>	38
Tabla 8. Valores de índice de solubilización de tres resiembras consecutivas de los diferentes aislados de <i>Trichoderma sp.</i>	39
Tabla 9. Valores de índice de solubilización de tres resiembras consecutivas de los diferentes aislados de <i>Penicillium oxalicum</i>	39
Tabla 10. Valores de índice de solubilización de tres resiembras consecutivas de los diferentes aislados de <i>Paecilomyces lilacinus</i>	40
Tabla 11. Valores de índice de solubilización de tres resiembras consecutivas de los diferentes aislados de <i>Aspergillus niger</i>	41
Tabla 12. Valores de índice de solubilización de tres resiembras consecutivas de los diferentes aislados de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	41

Índice de figuras

Figura 1. Mapa de clasificación taxonómica de suelos de Guatemala (Maga, 2000).....	7
Figura 2. Ciclo del fósforo en el ambiente (Prabhu, Borkar & Garg, 2019).	10
Figura 3. Halo de solubilización sobre medio NBRIP producido por la cepa CR318 de <i>B. Cenocepacia</i> (You et al., 2020).....	12
Figura 4. Mecanismos de solubilización de fósforo inorgánico y orgánico por los microorganismos (Prabhu, Borkar & Garg, 2019).....	14
Figura 5. Mapa de ubicación de los puntos de colecta de las muestras de suelo para obtención de quistes de nematodos y aislamiento de microorganismos.....	19

Figura 6. Dendrograma UPGMA generado a partir del marcador molecular amplified fragment length polymorphism (AFLP) utilizando las distancias genéticas de Nei que muestra la diversidad genética de los aislados de <i>Trichoderma harzianum</i>	31
Figura 7. Dendrograma UPGMA generado a partir del marcador molecular amplified fragment length polymorphism (AFLP) utilizando las distancias genéticas de Nei que muestra la diversidad genética de los aislados de <i>Trichoderma sp.</i>	32
Figura 8. Dendrograma UPGMA generado a partir del marcador molecular amplified fragment length polymorphism (AFLP) utilizando las distancias genéticas de Nei que muestra la diversidad genética de los aislados de <i>Paecilomyces lilacinus</i>	33
Figura 9. Dendrograma UPGMA generado a partir del marcador molecular amplified fragment length polymorphism (AFLP) utilizando las distancias genéticas de Nei que muestra la diversidad genética de los aislados de <i>Penicillium oxalicum</i>	33
Figura 10. Dendrograma UPGMA generado a partir del marcador molecular amplified fragment length polymorphism (AFLP) utilizando las distancias genéticas de Nei que muestra la diversidad genética de los aislados de <i>Aspergillus niger</i>	34
Figura 11. Dendrograma UPGMA generado a partir del marcador molecular amplified fragment length polymorphism (AFLP) utilizando las distancias genéticas de Nei que muestra la diversidad genética de los aislados de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	35
Figura 12. Media de diámetro de solubilización de los aislados de (a) <i>A. niger</i> (b) <i>P. lilacinus</i> (c) <i>P. oxalicum</i> (d) <i>P. fluorescens</i> (e) <i>T. sp</i> (f) <i>T. harzianum</i> . Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa $p < .05$	36

1 Resumen

El fósforo (P) es un elemento esencial en la producción agrícola, sin embargo, dado su compleja dinámica en el suelo, principalmente en suelos de origen volcánico denominados andisoles, es difícilmente aprovechable por las plantas. Los microorganismos con capacidad solubilizadora de fósforo (MSF) son una alternativa para transformar este elemento a formas solubles y aprovechables por las plantas. Además, estos no generan contaminación ambiental y representan un bajo costo en comparación a la producción de fertilizantes. Esta investigación identificó y evaluó in vitro aislados nativos de las especies de hongos *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium oxalicum* y *Aspergillus niger*, y la bacteria *Pseudomonas fluorescens*, provenientes de suelos andisoles del país. Un total de 104 aislados de cinco especies de MSF se identificaron y confirmaron a través de PCR. Se analizó su diversidad genética mediante el marcador molecular AFLP. Posteriormente fue evaluada la eficiencia y estabilidad solubilizadora, para lo cual se realizaron cultivos in vitro de los microorganismos, tomando como fuente de fósforo insoluble el fosfato tricálcico. Se identificó que el aislado Th 10 de la especie *Trichoderma harzianum* fue el que mostró mayor eficiencia de solubilización, mientras que, el aislados Pf 7 de *Pseudomonas fluorescens* demostró ser el aislado más estable a lo largo de las resiembras realizadas sobre el medio de cultivo NBRIP. La colección de MSF mostró ser eficiente para la solubilización de fósforo, bajo condiciones in vitro, y será la base para posteriores investigaciones en donde se incluyan otros factores como diversidad de suelos y cultivos.

2 Palabras clave

fosfatos insolubles, hongos, bacterias, diversidad genética, índice de solubilización de fósforo

3 Abstract

Phosphorus (P) is an essential element in agricultural production, however, given its complex dynamics in the soil, mainly in soils of volcanic origin called andisols, it is hardly usable by plants. Microorganisms with phosphorus solubilizing capacity (MSF) are an alternative to transform this element into soluble and usable forms by plants. In addition, these do not generate environmental pollution and represent a low cost compared to the production of fertilizers. This research identified and evaluated in vitro isolates native to the species of fungi *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium oxalicum* and *Aspergillus niger*, and the bacterium *Pseudomonas fluorescens*, from the country's andisol soils. A total of 104 isolates from five MSF species were identified and confirmed by PCR. Its genetic diversity was analyzed using the AFLP molecular marker. Subsequently, the solubilizing efficiency and stability was evaluated, for which in vitro cultures of the microorganisms were carried out, taking as a source of insoluble phosphorus the tricalcium phosphate. It was identified that the Th 10 isolate of the *Trichoderma harzianum* species showed the highest solubilization efficiency, while the Pf 7 isolate of *Pseudomonas fluorescens* proved to be the most stable isolate throughout the reseeding carried out on the NBRIP culture medium. The MSF collection proved to be efficient for phosphorus solubilization, under in vitro conditions, and will be the basis for further research where other factors such as soil and crop diversity are included.

4 Introducción

El fósforo (P) es un elemento clave en muchos procesos fisiológicos y bioquímicos de los seres vivos, forma parte estructural de complejas moléculas como el ADN y ARN y es un componente esencial en el transporte de energía en la célula (Johnston & Steén, 2000). Este elemento presenta un ciclo dinámico y complejo en el suelo involucrando la acumulación de biomasa microbiana, materia orgánica y formas inorgánicas. Este dinamismo provoca que, únicamente, una pequeña porción del fósforo soluble presente en el suelo, pueda ser aprovechado por las plantas, dejando el resto del P en formas insolubles o fijadas a través de fosfatos de Ca, Fe y Al, y fosfatos fijados por los óxidos y minerales silicatados (Picone

& Zamuner, 2002) principalmente en suelos de origen volcánico denominados andisoles (Espinosa, 1996).

Tras varios esfuerzos encaminados a la cuantificación de las reservas mundiales de P, Cordell, Drangert y White (2009) han estimado que este recurso natural no renovable podría agotarse en los próximos 50 a 100 años, llevando a la agricultura a una situación de alto riesgo a causa de la dependencia a fertilizantes fosfatados. En Guatemala, los suelos andisoles, en los cuales la disponibilidad de fósforo soluble es un serio problema, están presentes en la región central y occidental del país. En dichas zonas las actividades hortícolas y de caficultura están ampliamente establecidas y dadas las condiciones antes descritas de los suelos andisoles, existe una total dependencia de fertilizantes fosforados. Para evidenciar el problema de la fijación de fósforo en suelos andisoles, el estudio de Pérez (2008) realizado en el valle de Almolonga, reportó un promedio de 459 ppm de fósforo a 15 cm de profundidad, lo que equivale a 689 Kg/ha de fósforo puro y a 1,578 kg/ha de P_2O_5 , cantidad que sobrepasa el rango de suficiencia óptimo de 12 a 16 ppm, determinados a través de la solución extractora de Mehlich I. Esta situación refleja el uso desmedido de fertilizantes fosforados que terminan por transformarse a formas insolubles, y que, además, provocan deficiencias de hierro y calcio, dependiendo del pH del suelo, por el desbalance de elementos químicos (Jones, 2003).

Ante esta situación, el uso de microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF) representan una alternativa a la dependencia actual sobre los fertilizantes fosfatados, debido a su habilidad para transformar el P fijado en el suelo a formas solubles aprovechables por las plantas (Richardson, Barea, McNeill, & Prigent-Combaret, 2009; Song et al., 2008). Además, estos microorganismos: tienen una rápida acción, no representan un riesgo ambiental, consumen poca energía y representan un menor costo en comparación a los fertilizantes (Fernández & Rodríguez, 2005), existiendo reportes positivos sobre la acción de hongos y bacterias en la solubilización de P (Gomes, de Cássia, Marriel, de Oliveira, & Gomes, 2014; Kobra, Ebrahim, Reza, & Hamidreza, 2016; Li et al., 2016; Liu et al., 2016; Yasser, Mousa, Massoud, & Nasr, 2014)

La presente investigación es explicativa de tipo experimental, enfoque cuantitativo y plantea la identificación y evaluación de las especies nativas de las bacterias *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens* y los hongos *Trichoderma harzianum*,

Paecilomyces lilacinus, *Penicillium oxalicum* y *Aspergillus niger* en la solubilización de fósforo bajo condiciones in vitro. La confirmación de las especies de microorganismos solubilizadores se realizó a través de métodos moleculares, además, las cepas de estos serán analizadas con el marcador molecular AFLP, con la finalidad de detallar la diversidad genética y relacionar este factor con su capacidad solubilizadora, llegando así a definir el microorganismo más eficiente en la solubilización de fósforo.

La evaluación se realizó a través de la inoculación de las cepas de los microorganismos sobre el medio de cultivo (NBRIP) Nacional Botanical Research Institute Phosphate growth medium (Nautiyal, 1999) tomando como fuente de fósforo insoluble $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ siendo los factores a evaluar: (a) microorganismos, (b) grupo filogenético de los microorganismos. El experimento se desarrolló bajo un diseño completamente al azar, siendo las variables de respuesta (a) índice de eficiencia de solubilización (ESF) y (b) estabilidad de solubilización. Los resultados fueron analizados mediante un análisis de varianza y posterior análisis de comparación múltiple de medias.

5 Planteamiento del problema

Debido a la compleja dinámica del fósforo en el suelo, únicamente, una pequeña porción se encuentra en forma soluble, la cual puede ser aprovechada por las plantas, pero la mayor parte de este recurso se encuentra en formas insolubles o fijadas en la superficie de las arcillas coloidales (Jones, 2003; Melenya et al., 2015) por lo que las plantas son incapaces de aprovechar este elemento debido a la ausencia de mecanismos capaces de solubilizar el fósforo fijado o insoluble, especialmente, en suelos andisoles, los cuales son derivados de cenizas volcánicas (Espinosa, 1996). Esta situación obliga a la aplicación de altas cantidades de fósforo para suplir los requerimientos de los cultivos, aunque gran parte de este no podrá ser aprovechado por las raíces, debido al proceso de fijación (Mahdi, Talat, Dar, Hamid, & Ahmad, 2012). Dada la importancia del fósforo, se han realizado cuantificaciones de las reservas de este recurso, sugiriendo el considerarlo como un agente que ocupe un lugar central en las discusiones científicas y políticas, debido a que este es un recurso no renovable y las reservas podrían agotarse en un periodo de 50 a 100 años, ya que, se espera que para el año 2030 la demanda de fósforo llegue a su punto máximo (Cordell et al., 2009).

En Guatemala, los suelos andisoles están presentes en la región central y occidental del país, donde las actividades hortícola y caficultora están ampliamente establecidas. Sin embargo, la fijación de P es uno de los mayores inconvenientes para la producción agrícola, como muestra el estudio de Pérez (2008) realizado en el valle de Almolonga, el cual reporta un promedio de 459 ppm de fósforo a 15 cm de profundidad, lo que equivale a 689 kg/ha de fósforo puro y a 1,578 kg/ha de P₂O₅, una cantidad que sobre pasa los rangos de suficiencia óptimos de 12 a 16 ppm, determinados a través de la solución extractora de Mehlich I, situación que refleja el uso desmedido de fertilizantes fosforados que terminan por transformarse a formas insolubles, y que además, provocan deficiencias de hierro y calcio, dependiendo del pH del suelo, por el desbalance de elementos químicos (Jones, 2003).

Ante las situaciones descritas anteriormente, el uso de microorganismos nativos, como inoculantes para favorecer la solubilización de fósforo pobremente disponible por encontrarse en formas insolubles o fijado, se presentan como una alternativa para transformar este elemento en formas disponibles y aprovechables para las plantas (Richardson et al., 2009; Song et al., 2008) por ofrecer resultados rápidos, no constituir un factor contaminante y representar un bajo costo en comparación con los fertilizantes, mejorando así la productividad de los cultivos, además de reducir la contaminación ambiental y ayudar a reducir la dependencia hacia los fertilizantes sintéticos (Fernández & Rodríguez, 2005; Nisha, Devi, & Vasandha, 2014) brindando así, una alternativa viable a los agricultores guatemaltecos que, actualmente, deben enfrentarse a este serio problema.

6 Preguntas de investigación

General

- ¿Cuál será la capacidad de solubilización de fósforo de las especies *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium oxalicum* y *Aspergillus niger* que estén presentes en las zonas con suelos andisoles de la región central y occidental de Guatemala?

Específicas

- ¿Cuáles de las especies de microorganismos solubilizadores de fósforo *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium oxalicum* y *Aspergillus niger* provenientes están presentes en las zonas con suelos andisoles de la región central y occidental de Guatemala?
- ¿Cómo es la diversidad genética de las especies de microorganismos bajo evaluación?
- ¿Cuál de las especies bajo evaluación es más eficiente en la solubilización de fósforo bajo condiciones in vitro?
- ¿Cuál de las especies bajo evaluación es más estable en la solubilización de fósforo bajo condiciones in vitro?

7 Delimitación en tiempo y espacio

La investigación se realizó en el periodo de febrero a noviembre del año 2019 constando de tres fases: campo, laboratorio y gabinete. En la fase de campo se realizó la colecta de muestras de suelo agrícola de la región central y occidental del país en donde se localizan los suelos andisoles, dicha zona comprende los departamentos de Sacatepéquez, Chimaltenango, Escuintla, Sololá, Totonicapán, Quetzaltenango y San Marcos, como se muestra en la Figura 1. Esta fase se realizó desde el mes de febrero hasta el mes de mayo.

De marzo hasta octubre se realizó la fase de laboratorio, en la cual se identificaron los microorganismos a través de métodos moleculares y se realizaron las evaluaciones in vitro para analizar la eficiencia y estabilidad en la solubilización de fósforo y el análisis de la variabilidad genética de cada especie a través del uso de marcadores moleculares. Durante los meses de noviembre y diciembre se elaboró el informe final y manuscrito. La fase de laboratorio y gabinete se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía

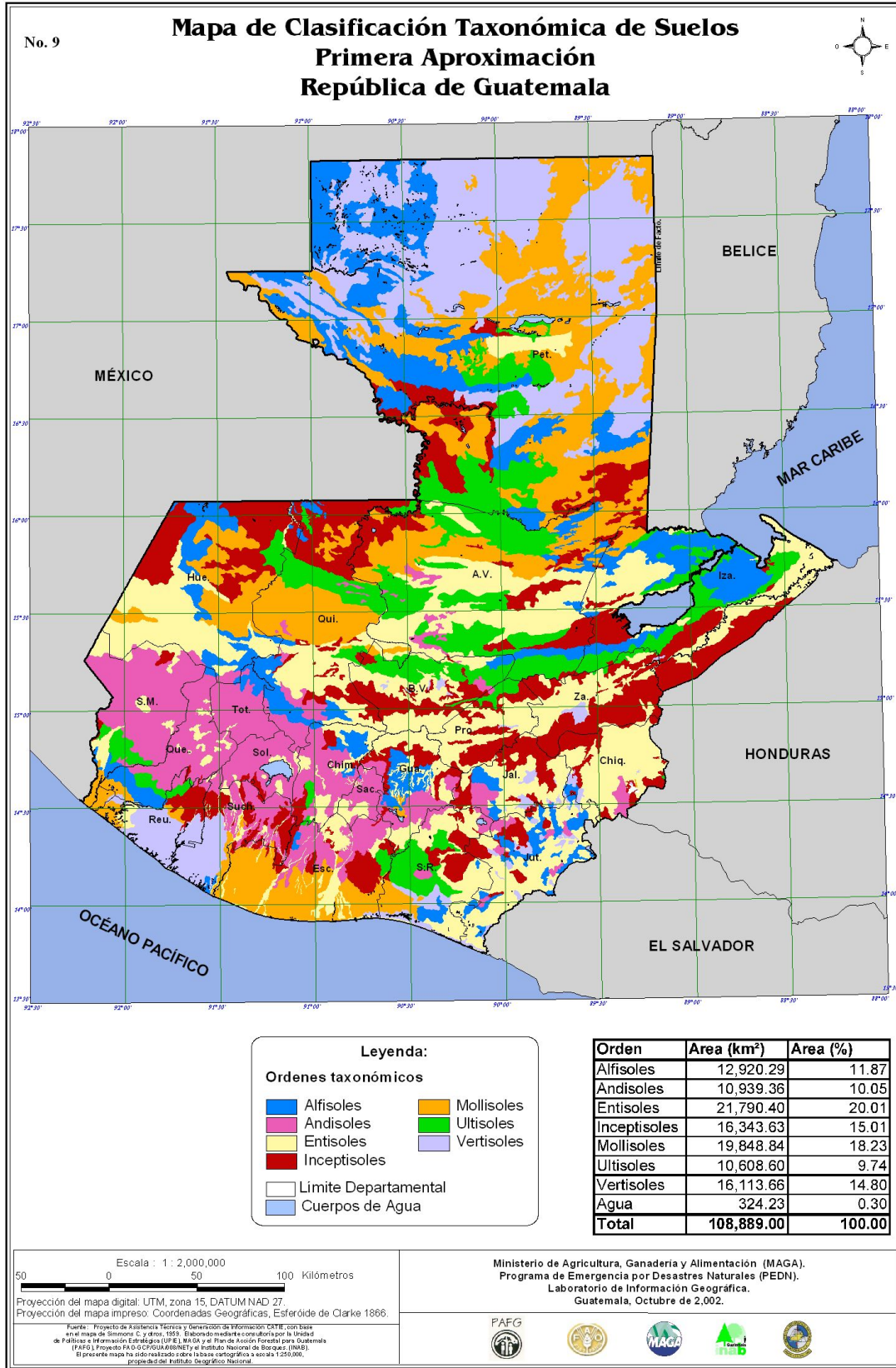


Figura 1. Mapa de clasificación taxonómica de suelos de Guatemala (Maga, 2000)

8 Marco teórico

8.1 Importancia del fósforo

El fósforo es considerado como un elemento esencial para el desarrollo de la vida debido a que está presente en cada célula de todos los organismos vivos y éste no puede ser reemplazado por ningún otro elemento; en las plantas es ampliamente utilizado por ser un elemento clave en muchos procesos fisiológicos y bioquímicos necesarios para lograr un adecuado crecimiento. Además, el fósforo es un elemento estructural de las complejas moléculas de ADN y ARN de todos los seres vivos, así como un componente esencial en el sistema de transporte de energía de las células (Johnston & Steén, 2000).

8.2 Formas de fosfatos disponibles en el suelo

En el suelo, el fósforo (P) existe principalmente en forma de ortofosfato, aunque la fosfina y fosfanato han sido detectados bajo las mismas condiciones. Las diversas formas de P pueden ser categorizadas como fósforo soluble, existiendo solo una pequeña fracción del total de P en esta forma (0.1 %), el resto del P no puede ser empleado por las plantas debido a su baja solubilidad y a la fijación de este en el suelo. La mayor parte del P es absorbido en forma de H_2PO_4^- o HPO_4^{2-} dependiendo del pH en el suelo. El fosfato mineral también puede estar asociado a la superficie de hidróxidos de Fe, Al y Mn los cuales son pobremente solubles y asimilables (P inorgánico insoluble). Esta característica de suelos ferralíticos, en los cuales la hidratación y acumulación de óxidos hidratados e hidróxidos de Fe toman lugar, produce un incremento de la capacidad de fijación del fósforo. La mayoría de suelos agrícolas contienen grandes reservas de fósforo, el cual se ha acumulado a consecuencia de la aplicación de fertilizantes, según menciona Richardson (citado en Mahdi, Talat, Dar, Hamid, & Ahmad, 2012)

Sin embargo, una gran porción del fosfato soluble inorgánico aplicado al suelo como fertilizantes químicos es rápidamente inmovilizado después de la aplicación y se convierte en formas no disponibles para las plantas. El fenómeno de fijación y precipitación de P en el suelo depende mayormente del pH y el tipo de suelo; por lo que, en suelos ácidos, el P es fijado por óxidos libres e hidróxidos de aluminio y hierro, mientras en suelos alcalinos este será fijado por calcio, causando una baja eficiencia de P soluble de los fertilizantes aplicados

(Jones, 2003). El tercer gran componente de P en el suelo está en forma orgánica. Esta forma de P puede constituir entre 30-50 % del total de P en la mayoría de suelos, aunque este rango podría variar tan bajo como 5 % y tan alto como 95 %. Este tipo de P orgánico se encuentra principalmente la forma de fosfato de inositol, el cual es sintetizado por microorganismos y plantas siendo la forma más estable de este tipo de P en el suelo (Goldstein, 1994).

8.3 Dinámica del fósforo

El ciclo del fósforo (P) en el suelo es un sistema dinámico y complejo que involucra la acumulación del elemento en la biomasa microbiana, materia orgánica y formas inorgánicas. El P en el suelo puede ser particionado en compartimentos que varían en su disponibilidad para las plantas y microorganismos. Una fracción pequeña se encuentra en forma soluble, la cual está en equilibrio con la fracción lábil que comprende el P orgánico fácilmente mineralizable y los fosfatos débilmente adsorbidos a las arcillas coloidales. La mayor parte está en formas insolubles o fijadas, principalmente como minerales primarios fosfatados, humus, fosfatos insolubles de Ca, Fe y Al, y fosfatos fijados por los óxidos y minerales silicatados (Picone & Zamuner, 2002).

El fósforo tiene su origen a partir de las apatitas y depósitos de fosfato natural a partir de los cuales es obtenido mediante los procesos de meteorización, lixiviación, erosión y extracción industrial como fertilizante. De forma natural, el fosfato que se va liberando es absorbido por las plantas y la biomasa microbiana, el cual es incorporado en la materia orgánica de los suelos y sedimentos quedando nuevamente depositado en formas minerales poco solubles. Generalmente, el fósforo inorgánico (Pi) se presenta fuertemente fijado en formas de fosfatos de Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} y Al^{3+} , especialmente en las arcillas del grupo de las caolinitas y ocluido en los óxidos de hierro y aluminio. El fósforo, aplicado como fertilizante en la forma de superfosfato, puede formar rápidamente compuestos inorgánicos inutilizables como respuesta a la inmovilización sobre la materia orgánica y arcillas (Cerón & Aristizábal, 2012; Mahdi et al., 2012)

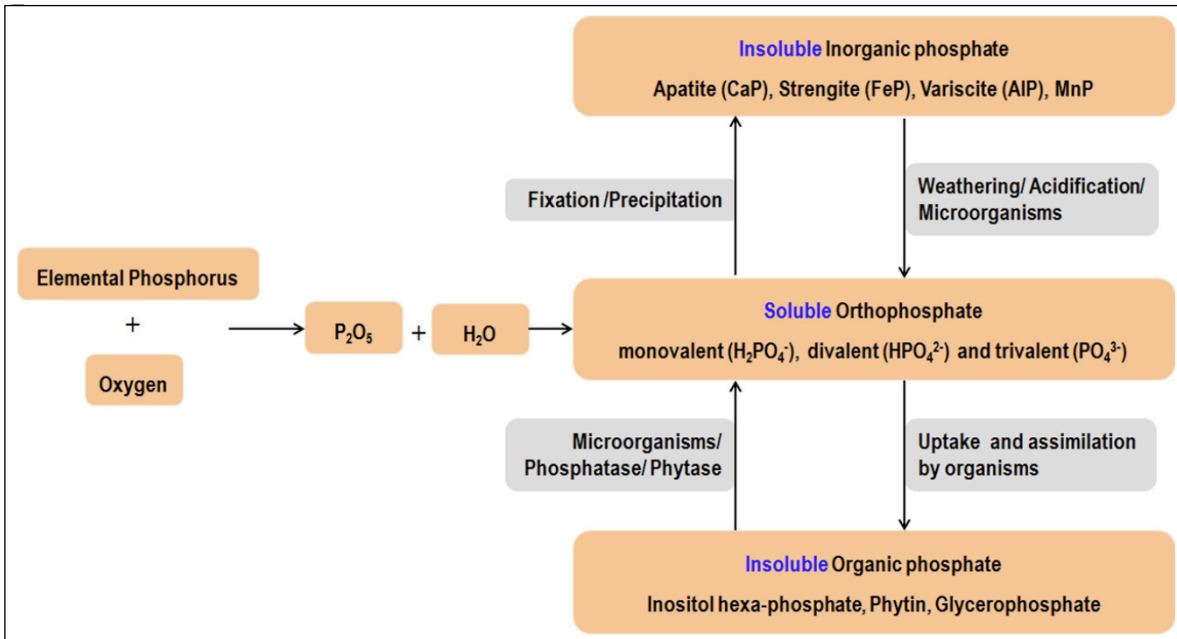


Figura 2. Ciclo del fósforo en el ambiente (Prabhu, Borkar & Garg, 2019).

8.4 Fijación del fósforo inorgánico en el suelo

La fijación del P se refiere al proceso por el cual el P inorgánico es fijado por Al, Fe y Ca para producir compuestos con presencia de P con menor solubilidad al momento de realizar aplicaciones de fertilizantes con P. Esto incluye una serie de reacciones en las cuales el P es removido de la solución del suelo y lo convierte en no disponible para las plantas y reduce la eficiencia a 15-20% de manera temporal o permanente, dependiendo de la etapa/tiempo de las reacciones químicas de fijación (Idris & Ahmed, 2012; Melenya et al., 2015). Según Sánchez y Aehara (1980) describen que la fijación del Pi es un serio problema en los suelos agrícolas, siendo aquellos suelos de los trópicos, que han sido altamente expuestos al proceso de meteorización, los más afectados. De igual forma, mencionan que, según las estimaciones, 1,018 millones de hectáreas en los trópicos tienen una alta capacidad de fijación de P, existiendo en América tropical 659 millones de hectáreas afectadas, 210 millones de hectáreas en África y 199 millones de hectáreas en Asia. Una gran parte de la región de América Central y América del Sur son suelos derivados de cenizas volcánicas (Andisoles). En estos suelos la fracción de arcilla está dominada por alófana e imogolita

(minerales amorfos de rango corto) provenientes de la meteorización de los materiales piroclásticos, producto de recientes deposiciones volcánicas. Este tipo de suelos presenta una alta capacidad para la fijación de fósforo en la superficie de los minerales amorfos, la cual varía con el tipo de arcilla y esto a su vez cambia el efecto residual de las aplicaciones de fosfato (Espinosa, 1996).

8.5 Mecanismos de fijación

La adsorción de Pi es particularmente fuerte sobre óxidos-hidróxidos de hierro y aluminio que predominan en suelos altamente meteorizados de regiones húmedas y sabanas ácidas tropicales. Los mecanismos de adsorción de Pi son descritos por (Mattingly, 1974): (a) adsorción no específica la cual consiste en la atracción electrostática que ejercen las cargas positivas de la superficie de algunos coloides minerales (p.e., óxidos e hidróxidos de hierro); (b) adsorción específica la cual consiste en la sustitución de grupos OH^- por grupos H_2P_04^- en la estructura superficial de algunos coloides minerales. La precipitación de Pi en los suelos ácidos ocurre cuando los iones Pi reaccionan con las formas activas de aluminio (Al^{3+}) y de hierro, (Fe^{3+}); mientras que, en los suelos neutros y alcalinos, el Pi se precipita principalmente con calcio (Ca^{2+}) según Bohn y colaboradores (citado por Bernal, 2006), además la dominancia de estos precipitados depende del grado de meteorización y del pH del suelo. El Pi se precipita inicialmente para formar compuestos amorfos (no cristalinos) los cuales, con el tiempo, llegan a ser cristalinos, por ende, más insolubles.

8.6 La acción de los microorganismos en la solubilización del fósforo en el suelo

A pesar que el fósforo puede encontrarse en cantidades vastas en el suelo, mucho de este no es disponible para la planta debido a los procesos de fijación previamente descritos. Sin embargo, la disponibilidad de este esencial elemento puede ser facilitada por la acción de algunos microorganismos solubilizadores de fosfatos de calcio, hierro y aluminio (Richardson et al., 2009). Estos microorganismos presentan una fuerte influencia en la nutrición vegetal al incrementar la disponibilidad del fósforo del suelo. El problema de la baja disponibilidad del fósforo ha llevado al desarrollo de estudios durante los últimos años en busca de lograr el aislamiento, caracterización y evaluación del potencial para incrementar

el rendimiento de los cultivos a través de la acción de estos microorganismos solubilizadores de fosfatos, evidenciando así la importancia en el tema, como menciona Goldstein (citado por Hernández-Leal, Carrión, & Heredia, 2011). Los microorganismos solubilizadores de fósforo promueven la movilización del fósforo inorgánico a través de la producción de ácidos orgánicos o la liberación de protones y si estos producen fosfatasas también están en capacidad de mineralizar fósforo orgánico (Antoun, 2012). Oberson y Joner (citado por Patiño, 2010) mencionan que la absorción microbiana del fósforo y su posterior liberación y redistribución, afectan la disponibilidad del fósforo para las plantas en los ecosistemas naturales y manejados, especialmente cuando los últimos reciben enmiendas orgánicas. Aquellos organismos celulares propios de la microbiota del suelo con diámetro menor a 100 μm capaces de realizar transformaciones en el fósforo incluyen bacterias, hongos, cromistas, protozoos y algunos nematodos



Figura 3. Halo de solubilización sobre medio NBRIP producido por la cepa CR318 de *B. Cenocepacia* (You et al., 2020)

Varios estudios han demostrado la capacidad solubilizadora de fosfatos por parte de diferentes microorganismos (Chakraborty, Chakraborty, Saha, Sunar, & Dey, 2010; Khan, Zaidi, Ahemad, Oves, & Wani, 2010; Khan, Zaidi, & Wani, 2007). Los géneros de bacterias más estudiados son: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Pantotea*,

Klebsiella, *Rhodobacter*, *Arthrobacter*, *Serratia* y *Erwinia*; mientras en los hongos se mencionan principalmente, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium* y *Paecilomyces*. Además, en comparación con las bacterias, se ha registrado que los hongos poseen, en general, mayor capacidad de solubilización de fósforo, sin embargo, la concurrencia de diferentes actividades metabólicas bacterianas que redundan en beneficio de las plantas, ha incrementado el interés en su estudio (Patiño Torres & Sánchez de Prager, 2012).

8.7 Mecanismos empleados por los microorganismos para la solubilización de fósforo

Los microorganismos juegan un papel importante en la solubilización de P a través de la secreción de ácidos orgánicos causando (a) decremento del pH (b) quelatación de los puentes de cationes de P (c) compitiendo por sitios de adsorción en el suelo. La baja en los valores de pH en el medio sugiere la secreción de ácidos orgánicos por la solubilización de P por parte de los microorganismos, por vía directa de la ruta de oxidación que ocurre en la cara externa de la membrana citoplasmática (Maliha, Samina, Najma, Sadia, & Farooq, 2004; Whitelaw, 2000). Cuando el P es aplicado al suelo, este interactúa con otros elementos como iones de Fe, Al y Ca los cuales vuelven no disponible el P tras la formación de varios tipos de fosfatos insolubles y la liberación de ácidos orgánicos por parte de los microorganismos lidera una reacción de quelatación por la cual los puentes de P con otros elementos metálicos son liberados, dejando al P disponible para las plantas. Los ácidos mayormente producidos son ácido glucónico, ácido oxálico, ácido cítrico (Kim, McDonald, & Jordan, 1997) ácido láctico, ácido tartárico y ácido aspártico (Venkateswarlu, Rao, Raina, & Ahmad, 1984).

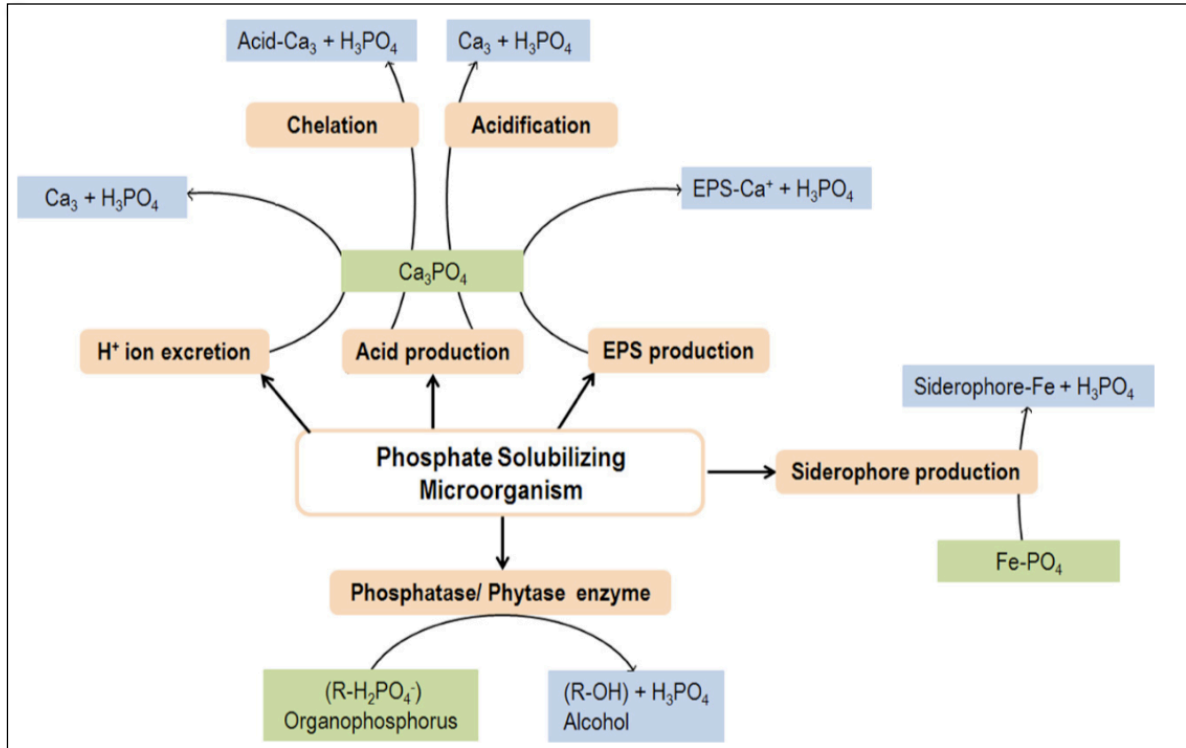


Figura 4. Mecanismos de solubilización de fósforo inorgánico y orgánico por los microorganismos (Prabhu, Borkar & Garg, 2019).

9 Estado del arte

El uso de microorganismos solubilizadores de fósforo ha sido motivo de numerosos estudios y evaluaciones en diversas partes del mundo debido a que, como ha demostrado Cordell y colaboradores (2009) cerca del 93 % de las reservas mundiales de fosfatos se encuentran concentradas en 6 países, por lo cual, debido a la volatilidad de los precios internacionales, esto condiciona la accesibilidad a fertilizantes por parte de agricultores pobres. Bacterias con capacidad solubilizadora de P aisladas a partir de suelos de zonas forestales, fueron evaluadas en el medio de cultivo Sperber, medio de cultivo Pikovskaya y trigo crudo en presencia de roca fosfatada. Los resultados mostraron que dos aislados de bacterias mostraron resultados positivo en la solubilización de P en medios líquidos siendo la melaza un acelerador en el proceso de solubilización (Kobra et al., 2016).

Por la importancia de estos microorganismos en el proceso de solubilización del fósforo, existen constantes estudios que detallan los mecanismos empleados, las aplicaciones y los

avances en las evaluaciones, tanto in vitro como en campo (Prabhu, Borkar & Garg, 2019). También se han reportado efectos positivos en la revitalización de los microorganismos solubilizadores de fósforo y promotores de crecimiento de las plantas tras la aplicación de técnicas de agricultura sostenible (Gouda, Kerry, Das, Paramithiotis, Shin & Patra, 2018). Los estudios más recientes reportan que, además de la solubilización de fósforo, algunos microorganismos también tienen la habilidad de funcionar como control biológico, fijar nitrógeno y secretar ácido indolacético (Li, Qiu, Yao, Ma, Zhang & Yang, 2020). Con ayuda de técnicas de biología molecular, se han realizado los últimos reportes de bacterias con capacidad solubilizadora de fósforo, como el caso de la cepa CR318 de *Burkholderia cenocepacia* con la cual se realizaron pruebas de solubilización bajo condiciones de invernadero identificando genes asociados a dicha capacidad (You, Fang, MacDonald, Xu & Yuan, 2020).

El uso de microorganismos no se ha limitado a las bacterias, ya que han existido evaluaciones de hongos de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Trichoderma* obteniendo halos de solubilización en medios de cultivo Pikovskaya conteniendo fosfato tricálcico como fuente insoluble de P existiendo además, un cambio en los valores de pH los cuales fueron de 3.6, 4.3 y 5.0 para *A. niger*, *P. variable* y *T. harzianum*, respectivamente (Yasser et al., 2014). En otro estudio fueron evaluados 13 hongos y 46 bacterias con capacidad solubilizadora aislados de la rizósfera del cultivo de maíz de los cuales el 51 % de las bacterias y 8 % de los hongos evaluados fueron catalogados como altamente eficientes en la solubilización de P a partir de roca fosfórica, existiendo una disminución del pH lo que sugiere una producción de ácidos por parte de los microorganismos. Los géneros predominantes fueron *Burkholderia* y *Bacillus* en el grupo de bacterias y *Talaromyces* y *Penicillium* en el grupo de hongos (Gomes et al., 2014).

Otras investigaciones respaldan el potencial solubilizador de bacterias del género *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium* y *Enterobacter*, así como los hongos *Aspergillus*, *Penicillium* y *Paecilomyces*. Se ha demostrado que dichos microorganismos presentan la habilidad de convertir fosfatos insolubles en formas solubles a través de procesos como la acidificación, quelatación, reacciones de intercambio y producción de ácidos orgánicos (Charana & Min-Ho, 2012; Karpagam & Nagalakshmi, 2014; Li et al., 2016; Sharma, Sayyed, Trivedi, & Gobi, 2013; Thakur, Kaushal, & Shyam, 2014).

Otras evaluaciones han demostrado valores máximos de solubilización de P de hasta 720.75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ mediante la acción de las bacterias *Burkholderia anthina* y *Patoea agglomerans*. Bajo condiciones de invernadero, dichas bacterias incrementaron los valores de materia seca y longitud de tallos y raíces en el cultivo de *Vigna radiata*, así mismo, al realizar la inoculación de ambas bacterias en el suelo se logró el aprovechamiento del P proveniente de la aplicación de fosfato tricálcico (Charana & Min-Ho, 2013), mientras Panhwar y colaboradores (2014) mencionan resultados positivos con las evaluaciones realizadas con *B. thailandensis*, *Sphingomonas pituitosa* y *B. Seminalis* en suelos ácidos en el cultivo de arroz. Otras evaluaciones califican a *A. niger* y *B. subtilis* como potentes microorganismos solubilizadores determinando que ambos alcanzan sus mayores valores de eficiencia con un pH de 3.0 y temperaturas de 28 C y 37 C respectivamente (Reena, Dhanya, Deepthi, & Pravitha, 2013).

Estudios más recientes han evaluado la acción, bajo condiciones in vitro, de las bacterias *B. megaterium*, *P. putida* y *P. fluorescence* mostrando altos valores de solubilización de P; además se ha determinado que cada una de ellas difiere en la utilización de carbón, nitrógeno, aminoácidos y vitaminas (Tenzing Baliah, Pandiarajan, & Makesh Kumar, 2016) mientras otro estudio identificó, mediante la secuenciación de la región 16S rRNA a las bacterias *B. aryabhatai*, *B. Megaterium*, *Klebsiella variicola*, *Stenotrophomonas rhizophila* y *Enterobacter aerogenes* como solubilizadoras de fósforo, pero además también como bacterias promotoras de crecimiento a través de la fijación de nitrógeno y producción de ácido indolacético, siderofóros, quitinasas y proteasas (Liu et al., 2016)

10 Objetivos

General

- Evaluar la capacidad de solubilización de fósforo de las especies *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Trichoderma harzianum*, *Penicillium oxalicum* y *Aspergillus niger*, aisladas de suelos andisoles de la región central y occidental de Guatemala.

Específicos

- Identificar la presencia de *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium oxalicum* y *Aspergillus niger*, en las zonas con suelos andisoles de la región central y occidental de Guatemala.
- Describir la diversidad genética de las especies de microorganismos bajo evaluación.
- Definir la especie más eficiente en la solubilización de fósforo bajo condiciones in vitro.
- Definir la especie con mayor estabilidad de solubilización de fósforo bajo condiciones in vitro.

11 Hipótesis

Las especies *P. fluorescens*, *B. subtilis*, *S. marcescens*, *T. harzianum*, *P. lilacinus*, *P. oxalicum* y *A. niger*, identificados en las regiones con presencia de suelos andisoles, tienen la capacidad de solubilizar fósforo fijado, dejándolo en formas aprovechables para las plantas, existiendo una mayor eficiencia y estabilidad de solubilización en los microorganismos que presentan mayor diversidad genética, siendo *P. oxalicum* la especie con mejor índice de eficiencia y estabilidad de solubilización.

12 Materiales y métodos

12.1 Enfoque y tipo de investigación

La presente investigación tiene un enfoque cuantitativo debido a la naturaleza de las variables de respuesta, las que servirán para determinar la eficiencia y estabilidad de los microorganismos en la solubilización de fósforo fijado. El alcance de la investigación es explicativo con una primera fase descriptiva, debido a que no existen registros sobre la evaluación de microorganismos nativos con capacidad solubilizadora aislados a partir de las zonas con suelos andisoles de la región central y occidental de Guatemala.

12.2 Recolección de información

La colecta de muestras se realizó en zonas de producción agrícola del país que presentan suelos andisoles, los cuales se encuentran en los departamentos de Sacatepéquez, Chimaltenango, Escuintla, Sololá, Totonicapán, Quetzaltenango, San Marcos y abarcan un área de 1,093,936 ha como se muestra en la figura 5. Se utilizó un muestreo simple aleatorio de población finita para establecer el área a muestrear basado en el siguiente modelo:

$$n = Z^2 N pq / pq Z^2 + (N - 1) e^2$$

$$n = 1.96^2 * 1,093,936 * 0.5 * 0.5 / 0.5 * 0.5 * 1.96^2 + (1,093,936 - 1) 0.15^2$$

$$n = 42.68 \text{ ha}$$

Dónde: n= Tamaño de muestra; N = Área; Z²= Confiabilidad (95 %); pq= varianza máxima; d = Precisión; Z= Valor de tabla para coeficiente de confiabilidad; e= error permisible

Se tomó un área total de muestreo de 45 ha y las muestras fueron colectadas en parcelas de 0.5 ha, por lo cual se muestreó un total de 90 parcelas distribuidas a lo largo de los 35 municipios que se describen a continuación. (1) Departamento de Sacatepéquez: San Lucas Sacatepéquez, Santiago Sacatepéquez, Sumpango, Antigua Guatemala y Alotenango; (2) departamento de Escuintla: Escuintla, Palín, San Vicente Pacaya y Santa Lucía Cotzumalguapa; (3) departamento de Chimaltenango: Yepocapa, Acatenango, Parramos, San Martín Jilopeque, Patzicía y Tecpán; (4) departamento de Sololá: Sololá, Nahualá, San Lucas Tolimán, San Andres Semetabaj y Concepción; (5) departamento de Totonicapán: Totonicapán, San Francisco el Alto, Momostenango, Santa María Chiquimula, San Cristóbal Totonicapán; (6) departamento de Quetzaltenango: Concepción Chiquirichapa, San Juan Ostuncalco, Almolonga, Zunil y Palestina de los Altos; (7) departamento de San Marcos: Tajumulco, Tejutla, San Lorenzo, San Pedro Sacatepéquez y Comitancillo; para un total de 35 municipios muestreados. En cada parcela se tomó una muestra compuesta por 20 submuestras. Las submuestras se tomaron a una profundidad de 15 cm en el área de la rizósfera con ayuda de una pala y fueron homogenizadas para obtener 200 g de muestra compuesta, la cual se tamizó a 2mm. Las muestras fueron depositadas en bolsas plásticas debidamente identificadas (Kitchen, Westfall, & Havlin, 1990) y trasladadas al laboratorio.

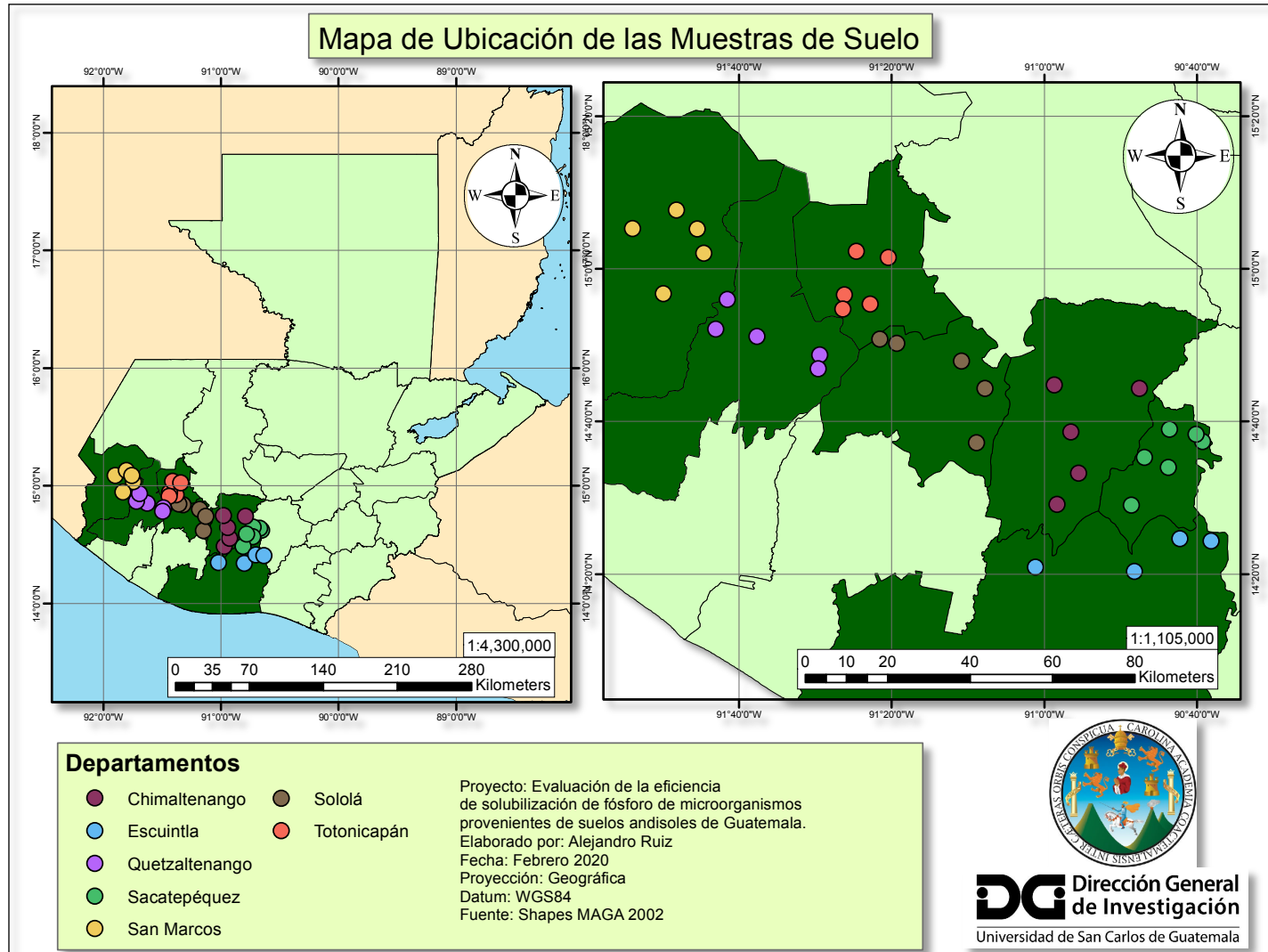


Figura 5 Mapa de ubicación de los puntos de colecta de las muestras de suelo para obtención y aislamiento de microorganismos.

12.3 Técnicas e instrumentos

Aislamiento de los microorganismos solubilizadores de fósforo

Debido a la gran cantidad de microorganismos provenientes en las muestras de suelo, se optó por utilizar medios selectivos para cada una de las especies y posterior confirmación a través de la amplificación de regiones específicas de ADN. El aislamiento fue realizado por medio del método de diluciones seriadas, para lo cual se tomó 1g de suelo y se colocó en 9 ml de agua destilada estéril obteniendo así una dilución 10^{-1} , luego se tomó 1 ml de esta dilución y se diluyó en un tubo de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril y así sucesivamente hasta llegar a la dilución 10^{-5} a partir de la cual se realizó la siembra en medio selectivo, agregando 20 μ l por cada placa de petri (Acevedo, Galindo Castañeda, Prada, Navia, & Romero, 2014).

Para el aislamiento de *P. flourecens* se utilizó el medio King B siguiendo el protocolo establecido por King, Wood y Raney(1954). Para el aislamiento de *B. subtilis* se empleó el medio de cultivo agar nutritivo siguiendo el protocolo descrito por Al-Humam (2016). Para el aislamiento de *S. marcescens* se usó el medio de cultivo Caprylate-thallos agar siguiendo el protocolo propuesto por Starr, Grimont, Grimont y Starr (1976). Para el aislamiento de *T. harzianum*, se empleó el medio TSM (Trichoderma Selective Medium) suplementado con Cloranfenicol (50 ug/mL) y rosa bengala 15 g/L (Attitalla, Adbelrawaf, Saeed, El-Komy, & Sarwar, 2012). Para el aislamiento de *P. lilacinus* se usó el medio basal PDA suplementado con cloranfenicol 0.01% y cloruro de sodio 3% (Chen et al., 2012). Para el aislamiento de *P. oxalicum* se empleó el medio de cultivo MNSM siguiendo el protocolo descrito por Larena y Melgarejo (2009). Para el aislamiento de *A. niger* se utilizó el medio de cultivo B siguiendo el protocolo descrito por Nagano y colaboradores (2008).

Identificación molecular para confirmación de especies de hongos y bacterias

Para llevar a cabo la identificación de los microorganismos, se realizó el aislamiento y extracción del ADN genómico de los aislados empleando el DNeasy UltraClean microbial Kit (QUIAGEN), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Para realizar la identificación de las especies de hongos y bacterias se realizó una amplificación específica de ADN mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR (Mullis, 1990). Para la identificación de *P. flourecens* se usaron los cebadores específicos 16SPSEfluF (5'-

TGCATTCAAAACTGACTG – 3') Y 16SPSER (5' - AATCACACCGTGGTAACCG – 3') siguiendo el protocolo descrito por Scarpellini, Franzetti y Galli (2004). Para realizar la identificación de *B. subtilis* se emplearon los cebadores específicos Bsub5F (5'-AAG TCG AGC GGA CAG ATG G-3') y Bsub3R (5'- CCA GTT CCA ATG ACC CTC CCC-3') siguiendo el protocolo descrito por Ruiz-Sánchez y colaboradores (2016). Para la identificación de *S. marcescens* se emplearon los cebadores específicos Fpfs1 (5'- CCGGCATCGGCAAAGTCT – 3') y Rpfs2 (5'- ATCTGGCCCGGCTCGTAGCC -3') siguiendo el protocolo empleado por (Zhu, Sun y Dang(2008). Para el caso de *T. harzianum*, se usaron los cebadores específicos THITS-F2 (CGGGTTTTTTATAATCTGAGCC) y THITS-R3 (CATTCAGAAGTTGGGTG) siguiendo el protocolo de amplificación descrito por Miyazaki, Tsuchiya y Okuda (2009).

Para la identificación de *P. lilacinus* se emplearon los cebadores específicos PaeF(5'CTC AGT TGC CTC GGC GGG AA 3') y PaeR(5' GTG CAA CTC AGA GAA GAA ATT CCG 3') siguiendo el protocolo descrito por Atkinks, Clark, Pande, Hirsch y Kerry(2005). Para la identificación de *P. oxalicum* se utilizaron los cebadores específicos ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG- 3') / ITS2 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') siguiendo el protocolo descrito por Molar y colaboradores(2013). Para la identificación de *A. niger* se emplearon los cebadores específicos ITS 5 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G- 3')y ITS-4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') siguiendo el protocolo descrito por Diba, Makhdoomi, y Mirhendi(2014).

Análisis de diversidad genética de los hongos y bacterias mediante el marcador molecular AFLP

Una vez confirmada, a través de PCR, cada una de las especies de hongos y bacterias, se empleó el marcador molecular AFLP, con la intención de conocer la diversidad genética que existe en cada una de estas especies. Para ello, se tomaron muestras de ADN de las diferentes aislados de especies de hongos y bacterias, de cada localidad, provenientes de los cultivos puros generados a partir de los medios de cultivo selectivos. Con los resultados obtenidos, se formaron grupos filogenéticos, tomando como máximo los 5 grupos más diversos por cada especie, los cuales fueron utilizados como un factor en el diseño del experimento de solubilización.

La técnica de AFLPs se basa en la digestión de fragmentos de ADN usando las enzimas EcoRI/MseI y la posterior ligación de adaptadores y luego estos son amplificados con cebadores que no tienen nucleótidos selectivos en el extremo 3' del cebador, posteriormente se realiza otra amplificación con cebadores que contienen uno o dos nucleótidos selectivos en el extremo 3' del cebador. El análisis se realizó mediante el Kit AFLP Análisis System for Microorganism de Invitrogen®. En resumen, la metodología utilizada fue la siguiente: se utilizó ADN a una concentración de 25 ng/μl, el cual fue digerido con las enzimas de restricción EcoRI/MseI e incubado por 2 horas a 37°C, después a 70°C por 15 min. La ligación de los adaptadores se hizo con los reactivos del kit y se incubó 2 horas a 20°C. Seguidamente se hizo una preamplificación usando la reacción en cadena de la polimerasa con el siguiente perfil térmico en el termociclador: 94°C por 30 seg, 56°C por 60 seg, 72°C por 60 seg, el termociclador será programado para 20 ciclos. Los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 2%. Se realizó una amplificación selectiva para *Pseudomonas fluorescens* con los cebadores M-A + E-C y para las especies de hongos los cebadores M-C + E-AC por haber mostrado el mayor polimorfismo. Los productos de PCR se corrieron en una gel de poliacrilamida al 5% en la cual se visualizaron las bandas amplificadas.

Evaluación bajo condiciones in vitro de la eficiencia y estabilidad de solubilización de los microorganismos identificados

El experimento constó de dos factores (a) microorganismos, (b) grupos filogenéticos. Para poder determinar los niveles de cada factor, fue necesario establecer dos fases en el experimento. Durante la primera fase, se realizó la identificación de los microorganismos, ya que no existen antecedentes referidos al aislamiento de las especies bajo estudio en las regiones con presencia de suelos andisoles de Guatemala. Así mismo, se llevó a cabo el estudio de diversidad genética de dichos organismos para establecer el número de grupos filogenéticos a evaluar. Una vez establecidos los niveles para los factores a, b se procedió a montar el experimento, el cual tuvo un diseño completamente al azar (DCA) con tres repeticiones y cada unidad experimental estuvo compuesta por una caja de Petri.

El índice de eficiencia de solubilización (ESF) es una variable que indica la capacidad relativa de los microorganismos para utilizar fuentes insolubles de fósforo como sustrato,

volviéndolas disponibles en el medio. Para la determinación de esta variable se emplearon los aislados de los microorganismos confirmados en la primera fase del experimento. Para llevar a cabo la evaluación se utilizó el medio NBRIP (Nacional Botanical Research Institute Phosphate growth medium) (Nautiyal, 1999). El medio estuvo compuesto por (en g/L): Glucosa, 10; (NH₄)₂SO₄, 0.1; KCl, 0.2; MgSO₄·7H₂O, 0.25; MgCl₂·6H₂O, 5; Agar, 14; pH 7 y como fuente de fósforo insoluble se usó Ca₃(PO₄)₂, 5.

A partir de los aislados de hongos, se preparó una solución a una concentración de 10⁶ esporas/mL medido en cámara de Neubauer, mientras en el caso de las bacterias, se preparó una solución, a partir de los aislados de bacterias, a una concentración de 10⁶ UFC. En ambos casos se tomó en cuenta el factor de diversidad genética, de manera que, para un mismo microorganismo, existió un número de soluciones igual a la cantidad de grupos filogenéticos identificados en la primera fase del experimento, el cual se estandarizó en 5 grupos. Las soluciones fueron identificadas como a y b donde “a” fue la especie de microorganismo y “b” fue el grupo filogenético. Posteriormente, se tomaron 20 uL de la solución 1.1 (microorganismo 1 grupo filogenético 1) y se colocaron sobre una caja de Petri conteniendo el medio NBRIP, este procedimiento se repitió 2 veces más para completar las 3 repeticiones. Esta metodología se empleó con el resto de soluciones de hongos y bacterias. Las cajas se incubaron a 28 °C bajo condiciones de luz natural durante 32 días, período en el cual se presentó la formación de un halo transparente alrededor de las colonias y el micelio, a medida que ocurrió la solubilización.

Durante dicho período se realizaron cuatro lecturas, una cada 8 días y en las cuales se tomaron datos de área del halo de solubilización y área de crecimiento de la colonia. Los datos utilizados correspondieron a la segunda lectura (15 días) por ser el período en el cual se desarrolló de mejor forma los microorganismos. Conforme más se acercaba las lecturas a los 32 días, los datos eran más variables, ya que para entonces se presentaron especies de hongos que habían cubierto por completo la caja de Petri, incluso antes de llegar a dicho período de tiempo. A partir de estos datos se calculó el índice ESF a través de la siguiente relación: $ESF = (\text{área de del halo de solubilización} / \text{área de crecimiento de la colonia})$, en el caso de bacterias, mientras en el caso de los hongos el $ESF = (\text{área del halo de solubilización} / \text{área de crecimiento micelial})$ (Khan et al., 2010). Para verificar la estabilidad de solubilización, cada uno de los aislados se sometió a 3 resiembras consecutivas en medio

NBRIP con un espaciamiento de 2 semanas entre cada siembra y se realizó el cálculo de ESF a los 32 días (Khan et al., 2010). Se empleó un diseño de medias repetidas para evaluar el efecto del tiempo sobre la ESF. Cada punto en el tiempo representó una resiembra de los microorganismos.

12.4 Procesamiento y análisis de la información

Para el análisis de los datos generados con el marcador molecular AFLP en el estudio de diversidad genética de los microorganismos, los fragmentos obtenidos a través de la PCR y visualizados tras la electroforesis, fueron codificados como (1) para indicar presencia y (0) para indicar ausencia. Estos datos se almacenaron en una matriz binaria mediante Microsoft® Excel. La determinación de la proporción de loci polimórficos fue calculada con la siguiente fórmula: $P = n/N \times 100\%$ donde “n” representa el número de bandas polimórficas y N el número total de bandas analizadas. La matriz binaria se exportó como un archivo de terminación “.txt” para realizar el cálculo de la matriz de similitud genética mediante el coeficiente de Dice (Dice, 1945). Para el análisis de los datos se utilizó el programa *Dissimilarity analysis and representation for Windows* 6.0.012 (<http://darwin.cirad.fr>). Posteriormente se realizó un dendrograma basado en el método de unión de vecinos (neighbor joining)(Saitou & Nei, 1987).

Con los datos obtenidos de la evaluación de la eficiencia de solubilización de fósforo, a través del índice de eficiencia solubilizadora de fósforo (ESF), se realizó un análisis de varianza con un nivel de significancia del 5 %, con base en el diseño experimental propuesto en la metodología (DCA), empleando el software estadístico Infostat, para determinar si existe diferencia significativa entre los valores de ESF. Para poder aplicar el análisis de varianza se evaluaron los supuestos de normalidad utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov y homocedasticidad con la prueba de Levene. Posteriormente se realizó una comparación múltiple de medias utilizando la prueba de Duncan, debido a que permite ordenar de mayor a menor los efectos y las comparaciones de los tratamientos. El nivel de significancia a fue del 5 %. Para el caso de la estabilidad de solubilización, se tomaron los valores ESF en intervalos de 2 semanas para determinar el punto en el cual el valor de solubilización fue mínimo y máximo.

13 Vinculación, difusión y divulgación

- Se incluyó a dos estudiantes de la facultad de agronomía quienes se involucraron en el muestreo y pruebas moleculares in vitro con el fin de desarrollar su tesis de grado.
Tesista: Santos Cipriano González González
Título: Evaluación de la eficiencia y estabilidad de solubilización de fósforo de 7 aislados de hongos provenientes de suelos andisoles de Guatemala.
Tesista: Marilin Rebeca Barrientos Marroquín
Título: Identificación molecular y evaluación de la eficiencia de solubilización de fósforo de siete aislados de bacterias provenientes de suelos andisoles de Guatemala
- Se redactó un artículo para la revista Ciencia Tecnología y Salud de la Digi, como parte del compromiso del proyecto.

14 Productos, hallazgos, conocimientos o resultados

14.1 Identificación de *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium oxalicum* y *Aspergillus niger*, en las zonas con suelos andisoles de la región central y occidental de Guatemala

Tras finalizar el proceso de muestreo se procedió a la identificación de las especies de microorganismos propuestos a través del uso de medios de cultivo específicos y posterior confirmación molecular. Para el caso de *T. harzianum*, se logró la identificación de 19 aislados positivos para el aislamiento en medio de cultivo selectivo y confirmación molecular. Se identificaron siete falsos positivos en medio de cultivo, lo cual se confirmó tras la amplificación selectiva por PCR. Los sitios de colecta y el número de aislados se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. *Identificación y distribución de Trichoderma harzianum*

No. aislado	Especie	Sitio de colecta	Prueba por medio selectivo	Prueba por PCR
Th 1	<i>Trichoderma harzianum</i>	Sacatepéquez	+	+
Th 2			+	+
Th 3			+	+
Th 4			+	+
Th 5			+	+
Th 6			+	+
Th 7		Quetzaltenango	+	+
Th 8			+	+
Th 9			+	+
Th 10		Sololá	+	+
Th 11			+	+
Th 12			+	+
Th 13			+	+
Th 14			+	+
Th 15			+	+
Th 16		Chimaltenango	+	+
Th 17		Escuintla	+	+
Th 18		San Marcos	+	+
Th 19			+	+
Th 20		Totonicapán	+	-
Th 21			+	-
Th 22			+	-
Th 23		Sacatepéquez	+	-
Th 24			+	-
Th 25		Sololá	+	-
Th 26			+	-

Nota: *+ = reacción positiva, - = reacción negativa.

Durante la identificación de *T. harzianum*, se identificaron 12 aislados que se desarrollaron en el medio de cultivo, pero no se logró su identificación molecular, por lo que se identificaron únicamente a nivel de género por las características observadas bajo el microscopio. Estos aislados mostraron alta capacidad de solubilización, razón por la cual se tomaron en cuenta para las pruebas siguientes. El detalle de los sitios de colecta de estos aislados puede observarse en la Tabla 2.

Tabla 2. *Identificación y distribución de Trichoderma sp.*

No.	Especie	Sitio de colecta
T. sp1	<i>Trichoderma sp.</i>	Quetzaltenango
T. sp2		
T. sp3		
T. sp4		
T. sp5		
T. sp6		Sololá
T. sp7		
T. sp8		
T. sp9		Totonicapán
T. sp10		
T. sp11		
T. sp12		

Nota: *+ = reacción positiva, - = reacción negativa.

Para el caso de *P. lilacinus*, se logró la identificación de 8 aislados positivos para el medio de cultivo selectivo y la confirmación molecular. También se presentaron tres falsos positivos en medios de cultivo, los cuales se confirmaron como negativos mediante la amplificación específica por PCR. Los sitios de colecta y el número de aislados se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. *Identificación y distribución de Paecilomyces lilacinus*

No. aislado	Especie	Sitio de colecta	Prueba por medio selectivo	Prueba por PCR
PI 1	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Sololá	+	+
PI 2			+	+
PI 3			+	+
PI 4		Sacatepéquez	+	+
PI 5			+	+
PI 6			+	+
PI 7			+	+
PI 8		Chimaltenango	+	+
PI 9			+	-
PI 10		Quetzaltenango	+	-
PI 11			+	-
		Escuintla	+	-

Nota: *+ = reacción positiva, - = reacción negativa.

En cuanto a la especie *P. oxalicum*, se logró la identificación de 21 aislados positivos para la prueba de medio de cultivo e identificación molecular. Por otra parte, se identificaron

8 falsos positivos en el medio de cultivo, los cuales fueron confirmados como negativos con las pruebas moleculares. Los sitios de colecta y el número de aislados se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4. *Identificación y distribución de Penicillium oxalicum*

No.	Especie	Sitio de colecta	Prueba por medio selectivo	Prueba por PCR
Po 1	<i>Penicillium oxalicum</i>	Escuintla	+	+
Po 2			+	+
Po 3			+	+
Po 4		Totonicapán	+	+
Po 5			+	+
Po 6			+	+
Po 7			+	+
Po 8		Sololá	+	+
Po 9			+	+
Po 10		Sacatepéquez	+	+
Po 11			+	+
Po 12			+	+
Po 13			+	+
Po 14			+	+
Po 15		Quetzaltenango	+	+
Po 16			+	+
Po 17			+	+
Po 18		Chimaltenango	+	+
Po 19			+	+
Po 20		San Marcos	+	+
Po 21			+	+
Po 22		Totonicapán	+	-
Po 23			+	-
Po 24		Sacatepéquez	+	-
Po 25			+	-
Po 26		Chimaltenango	+	-
Po 27			+	-
Po 28			+	-
Po 29		Escuitla	+	-

Nota: *+ = reacción positiva, - = reacción negativa.

Para el caso de *A. niger*, se logró la identificación de 9 aislados positivos para el medio de cultivo selectivo y la confirmación molecular. También se presentaron tres falsos positivos en medio de cultivo, los cuales se descartaron tras observar que la reacción de PCR fue negativa. Los sitios de colecta y el número de aislados se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5. *Identificación y distribución de Aspergillus niger*

No.	Especie	Sitio de colecta	Prueba por medio selectivo	Prueba por PCR
An 1	<i>Aspergillus niger</i>	Chimaltenango	+	+
An 2			+	+
An 3			+	+
An 4		Sololá	+	+
An 5			+	+
An 6			+	+
An 7		Totoncapán	+	+
An 8			+	+
An 9			+	+
An 10		Sacatepéquez	+	+
An 11			+	-
An 12			+	-

Nota: *+ = reacción positiva, - = reacción negativa.

Para el caso de *P. fluorescens*, se logró la identificación de 35 aislados positivos para el medio de cultivo selectivo y la confirmación molecular. Se presentaron 5 falsos positivos en medio de cultivo, los cuales se identificaron al observarse una reacción negativa por PCR. Los sitios de colecta y el número de aislados se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6. *Identificación y distribución de Pseudomonas fluorescens*

No.	Especie	Sitio de colecta	Prueba por medio selectivo	Prueba por PCR
Pf 1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Escuintla	+	+
Pf 2			+	+
Pf 3			+	+
Pf 4			+	+
Pf 5		Chimaltenango	+	+
Pf 6			+	+
Pf 7			+	+
Pf 8			+	+
Pf 9			+	+
Pf 10			+	+
Pf 11			+	+
Pf 12			+	+
Pf 13		San Marcos	+	+
Pf 14			+	+
Pf 15			+	+
Pf 16			+	+

Pf 17		+	+
Pf 18		+	+
Pf 19		+	+
Pf 20	Totonicapán	+	+
Pf 21		+	+
Pf 22		+	+
Pf 23		+	+
Pf 24		+	+
Pf 25	Quetzaltenango	+	+
Pf 26		+	+
Pf 27		+	+
Pf 28		+	+
Pf 29		+	+
Pf 30	Sololá	+	+
Pf 31		+	+
Pf 32		+	+
Pf 33		+	+
Pf 34	Sacatepéquez	+	+
Pf 35		+	+
Pf 36		+	-
Pf 37	Chimaltenango	+	-
Pf 38		+	-
Pf 39	San Marcos	+	-
Pf 40	Escuintla	+	-

Nota: *+ = reacción positiva, - = reacción negativa.

En el total de muestras analizadas, no se identificó la presencia de *S. marcenses* ni *B. subtilis*.

14.2 Diversidad genética de los microorganismos identificados

Tras la lectura y análisis el gel de poliacrilamida, para los 19 aislados de *T. harzianum*, se obtuvo un total de 36 loci identificados con un porcentaje de polimorfismo del 71.3. Con el análisis de conglomerados se generó un dendrograma en el cual se muestra el grado de similitud genética entre los aislados que fueron analizados. Se observa que el aislado Th 4, proveniente de Sacatepéquez, es el que se encuentra genéticamente más distante al mostrar tan solo un 30% de similitud genética. Por otra parte, los aislados más cercanos son el Th 7 (Quetzaltenango) y Th 13 (Sololá) con un 87% de similitud. El detalle de la relación genética se detalla en la Figura 6.

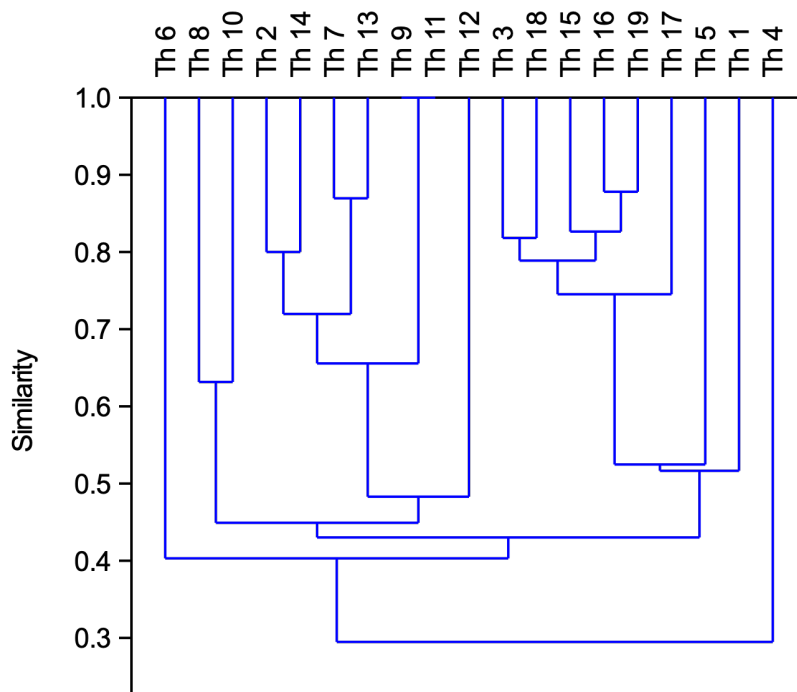


Figura 6. Dendrograma UPGMA generado a partir del marcador molecular amplified fragment length polymorphism (AFLP) utilizando las distancias genéticas de Nei que muestra la diversidad genética de los aislados de *Trichoderma harzianum*

En cuanto a los 12 aislados de *Trichoderma sp.* se obtuvo un total de 29 loci identificados con un porcentaje de polimorfismo del 79.4. En el dendrograma se observa que los aislados Ts 1, y Ts 2 ambos provenientes de Quetzaltenango, son los que se encuentran genéticamente más distantes con un 50% de similitud genética. Por otra parte, los aislados

más cercanos son el Ts 4 (Quetzaltenango) y Ts 7 (Sololá) con un 85% de similitud. El detalle de la relación genética se detalla en la Figura 7.

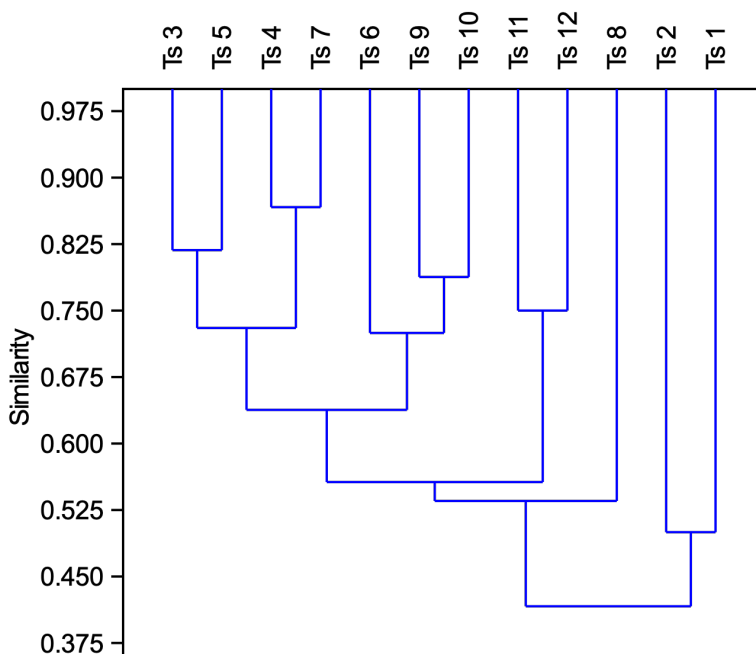


Figura 7. Dendrograma UPGMA generado a partir del marcador molecular amplified fragment length polymorphism (AFLP) utilizando las distancias genéticas de Nei que muestra la diversidad genética de los aislados de *Trichoderma sp.*

En cuanto a los aislados de *Paecilomyces lilacinus* se obtuvo un total de 42 loci identificados con un porcentaje de polimorfismo del 69.1. En el dendrograma se observa que los aislado PI (Sololá) 1 y PI 8 (Chimaltenango) son los que se encuentra genéticamente más distantes con un 40% de similitud genética. Por otra parte, los aislados más cercanos son el PI 3 (Sololá) y PI 6 (Chimaltenango) con un 78% de similitud. El detalle de la relación genética se detalla en la Figura 8.

En cuanto a los aislados de *Penicillium oxalicum* se obtuvo un total de 44 loci identificados con un porcentaje de polimorfismo del 85.7. En el dendrograma se observa que los aislado Po 3 (Escuintla) 3 y Po 20 (San Marcos) son los que se encuentra genéticamente más distantes con un 25% de similitud genética. Por otra parte, los aislados más cercanos son el Po 12 (Sacatepéquez) y Po 18 (Chimaltenango) con un 85% de similitud. El detalle de la relación genética se detalla en la Figura 9.

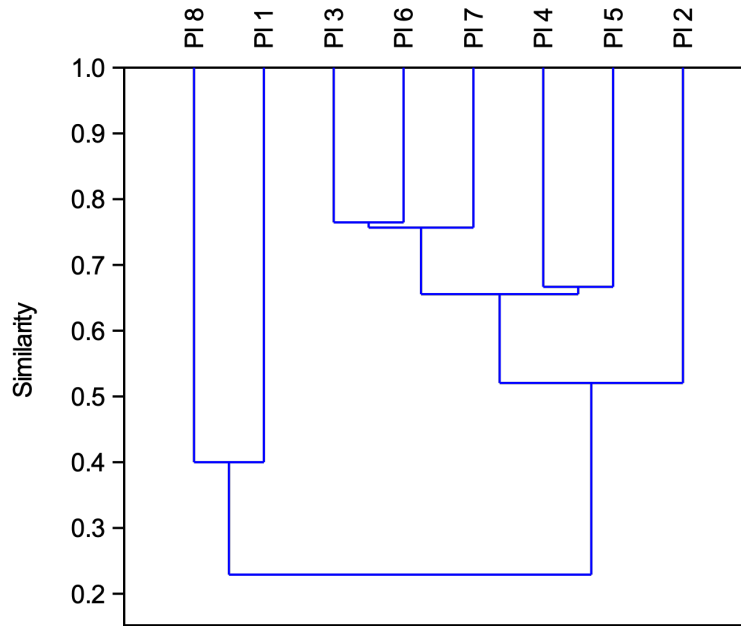


Figura 8. Dendrograma UPGMA generado a partir del marcador molecular amplified fragment length polymorphism (AFLP) utilizando las distancias genéticas de Nei que muestra la diversidad genética de los aislados de *Paecilomyces lilacinus*.

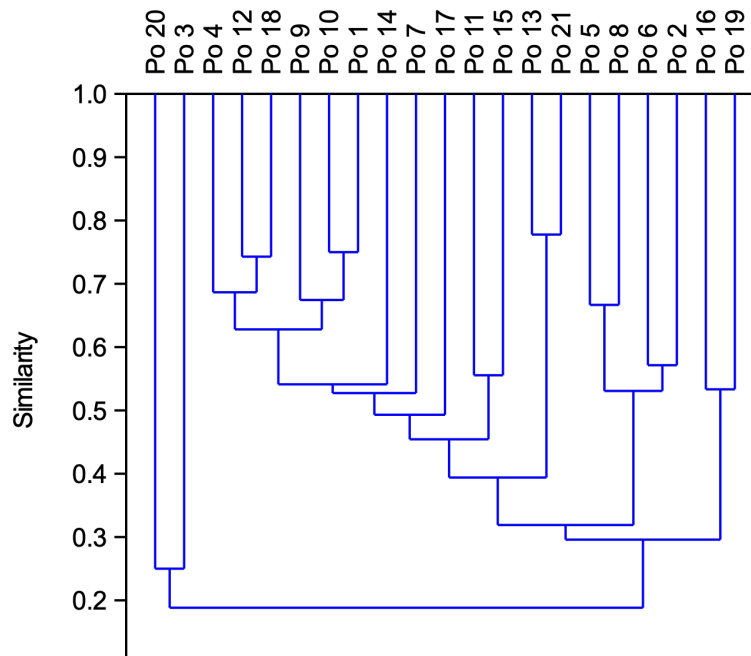


Figura 9. Dendrograma UPGMA generado a partir del marcador molecular amplified fragment length polymorphism (AFLP) utilizando las distancias genéticas de Nei que muestra la diversidad genética de los aislados de *Penicillium oxalicum*.

En cuanto a los aislados de *Aspergillus niger*, se obtuvo un total de 39 loci identificados con un porcentaje de polimorfismo del 71.2. En el dendrograma se observa la formación de dos grupos claramente diferenciados. El primero se compone de los aislados An 5 (Sololá) y An 6 (San Marcos) los cuales comparten una identidad genética del 80%. El segundo grupo filogenético está compuesto por los restantes aislados, siendo los aislados An 2 (Chimaltenango) y An 8 (Sacatepéquez) los más cercanos genéticamente con un 90% de similitud. El detalle de la relación genética se detalla en la Figura 10.

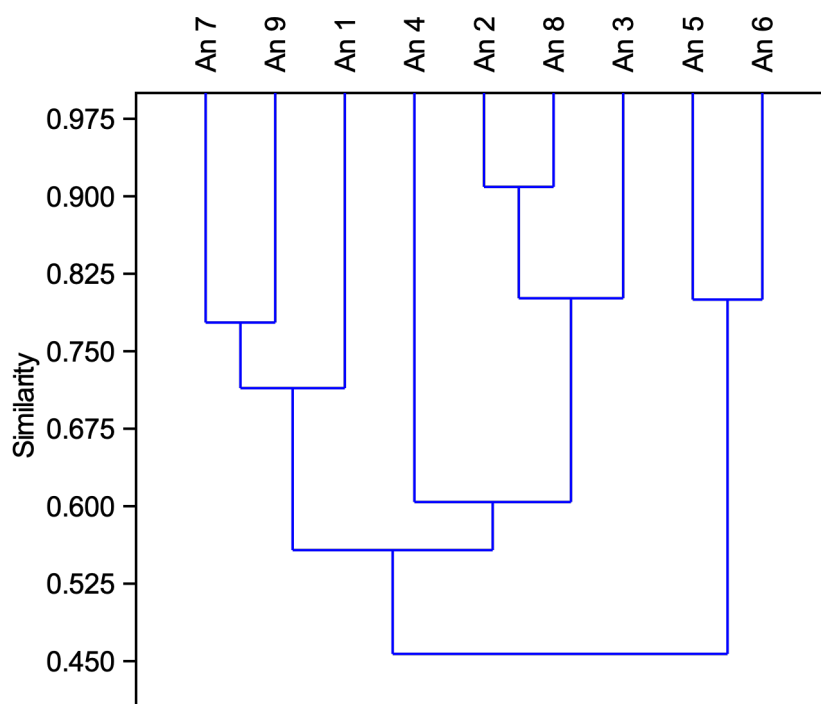


Figura 10. Dendrograma UPGMA generado a partir del marcador molecular amplified fragment length polymorphism (AFLP) utilizando las distancias genéticas de Nei que muestra la diversidad genética de los aislados de *Aspergillus niger*.

En cuanto a los aislados de *Pseudomonas fluorescens*, se obtuvo un total de 25 loci identificados con un porcentaje de polimorfismo del 89.2. En el dendrograma se observa la formación de dos grupos claramente diferenciados. El primero se compone únicamente del aislado Pf 12 (Sololá) con apenas 30% de similitud con el resto de aislados. El segundo grupo filogenético muestra una compleja relación genética por lo cual los grupos filogenéticos son muy variados. Dentro del segundo grupo filogenético, los aislados Pf 3 y

Pf 4, ambos provenientes de Escuintla, son los que se encuentran genéticamente más cercanos. El detalle de la relación genética se detalla en la Figura 11.

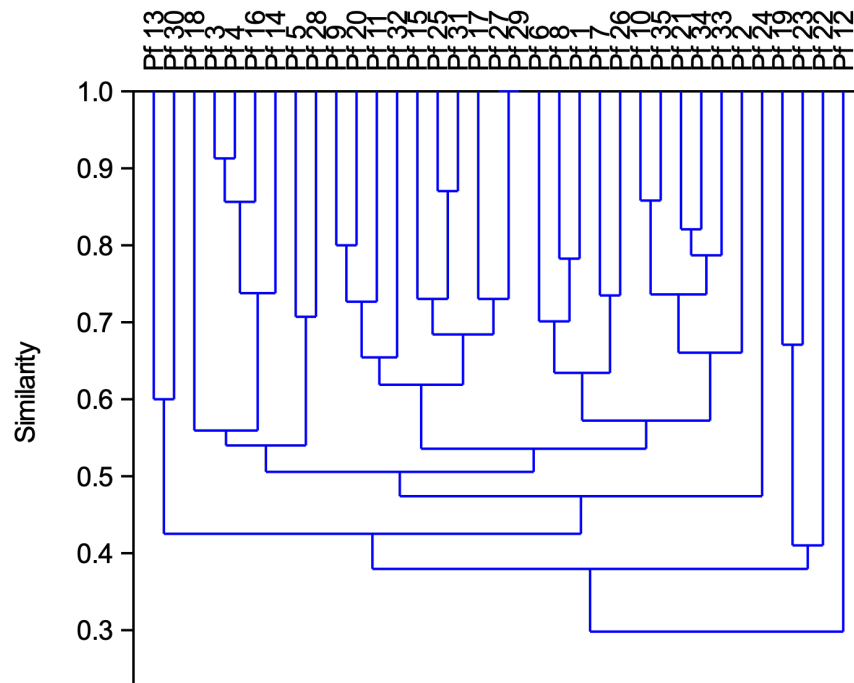


Figura 11. Dendrograma UPGMA generado a partir del marcador molecular amplified fragment length polymorphism (AFLP) utilizando las distancias genéticas de Nei que muestra la diversidad genética de los aislados de *Pseudomonas fluorescens*.

14.3 Capacidad de solubilización de fósforo de las especies de microorganismos

Tras las evaluaciones in vitro sobre los medios de cultivo NBRIP, se detallan los comportamientos de cada uno de los aislados de las diferentes especies de microorganismos evaluados. Para todas las especies existió diferencia estadísticamente significativa, por lo cual se realizaron los posteriores análisis de comparación múltiple de medias. Para la evaluación de la capacidad de solubilización de *T. harzianum* se identificó al aislado Th 10, proveniente de Sololá, como aquel con mayor capacidad de solubilización, mientras que el menos efectivo fue el aislado Th 9 proveniente de Quetzaltenango.

Para el caso de los aislados de *T. sp* que no pudieron ser identificados a nivel de especie, es el aislado Tsp 9 (Tonicapán) el que mostró mayor capacidad de solubilización, mientras que el aislado Ts 5 (Quetzaltenango) mostró los valores más bajos de solubilización.

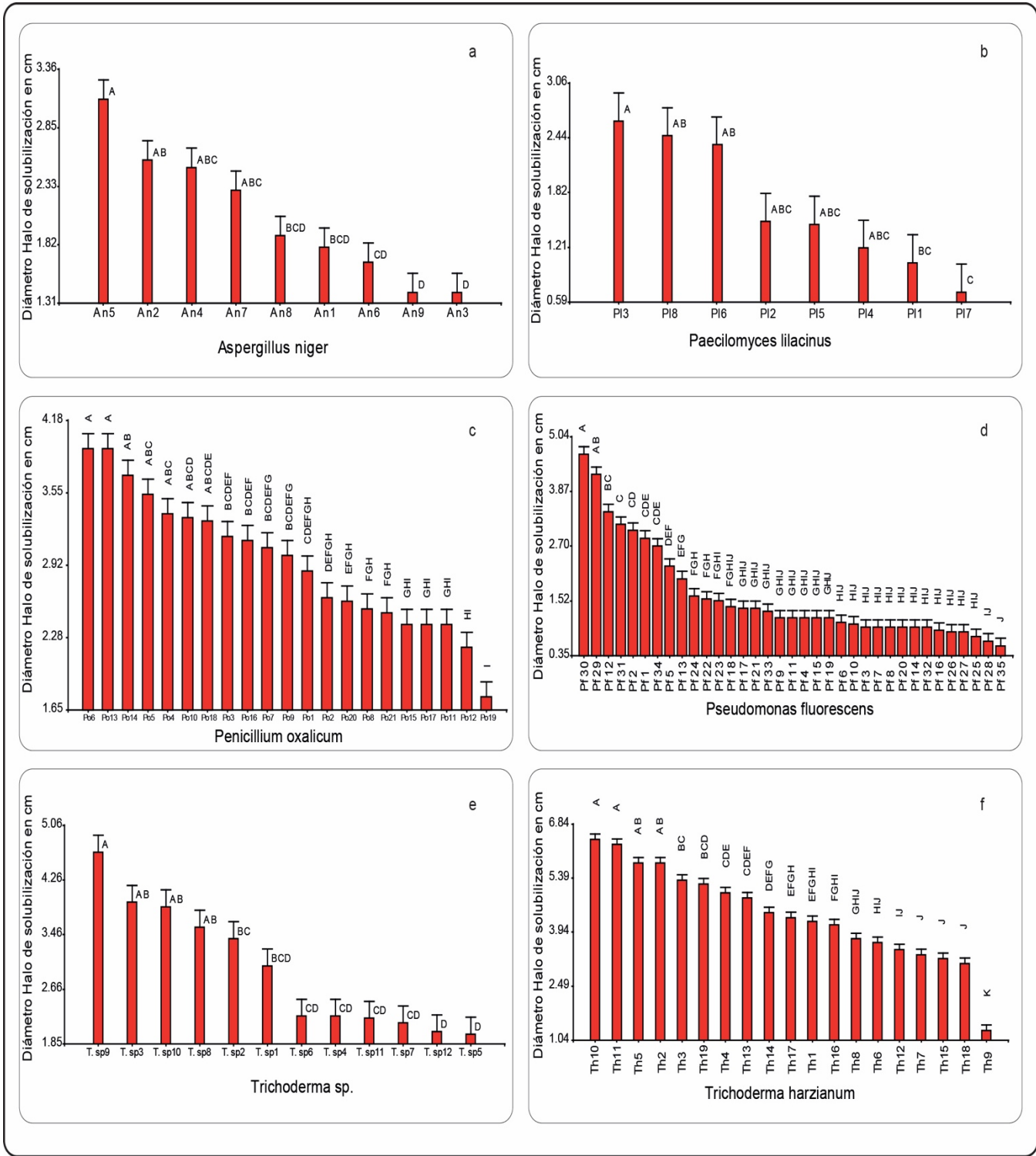


Figura 12. Media de diámetro de solubilización de los aislados de (a) *A. Niger* (b) *P. lilacinus* (c) *P. oxalicum* (d) *P. fluorescens* (e) *T. sp* (f) *T. harzianum*. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa $p < .05$

En cuanto a la especie *P. oxalicum*, fue el aislado Po 6 (Totonicapán) el que mostró mayor capacidad de solubilización, mientras que el aislado Po 19 (Chimaltenango) mostró los valores más bajos de solubilización. Respecto a *P. lilacinus*, el aislado Pl 3 (Sololá) mostró los valores más altos de solubilización, mientras que el aislado Pl 7 (Chimaltenango) fue el que presentó una menor capacidad de solubilización. Respecto a *A. niger*, el aislado An 5 (Sololá) mostró los valores más altos de solubilización, mientras que el aislado An 3 (Chimaltenango) fue el que presentó una menor capacidad de solubilización. En cuanto a *P. fluorescens*, el aislado Pf 30 (Sololá) mostró los valores más altos de solubilización, mientras que el aislado Pf 35 (Sacatepéquez) fue el que presentó una menor capacidad de solubilización. El detalle completo del comportamiento de cada uno de los aislados de las especies de microorganismos puede observarse en la Figura 12.

14.4 Estabilidad de solubilización de fósforo de las especies de microorganismos

Para las pruebas de estabilidad de solubilización, tras haber realizado 3 resiembras consecutivas, se presenta el resumen de los valores medios de los índices de solubilización para cada resiembra. Si al valor diferencial lo antecede un signo “-“ esto indica que el comportamiento de solubilización tiende a descender al cabo de las resiembras. Por el contrario, si al valor diferencial no le antecede ningún signo, esto indica que la capacidad de solubilización aumenta en cada resiembra. Para los casos en los cuales el valor diferencial es 0, esto indica que la capacidad de solubilización no sufre ningún cambio respecto de las resiembras realizadas.

Para el caso de *T. harzianum* fue el aislado Th 1 el que mostró un mayor aumento en la capacidad de solubilización, mientras que el aislado Th 12 fue el que disminuyó en mayor medida sus valores de solubilización a lo largo de las resiembras. El aislado Th 11 mostró un valor diferencial de 0, por lo cual su valor de solubilización de inicio y fin son los mismos. El detalle de los valores de estabilidad de solubilización para cada aislado puede observarse en la Tabla 7.

Tabla 7. Valores de índice de solubilización de tres resiembras consecutivas de los diferentes aislados de *Trichoderma harzianum*.

Cepas de <i>Trichoderma harzianum</i>	ESF primera resiembra	ESF segunda resiembra	ESF tercera resiembra	Diferencial
Th1	0.79	0.82	0.84	0.04
Th2	1.06	1.07	1.07	0.01
Th3	0.97	0.96	0.93	-0.04
Th4	0.86	0.88	0.64	-0.23
Th5	0.96	0.97	0.93	-0.03
Th6	0.79	0.65	0.36	-0.43
Th7	0.81	0.79	0.16	-0.65
Th8	1.21	1.02	0.68	-0.53
Th9	0.26	0.18	0.11	-0.16
Th10	1.08	1.05	1.13	0.05
Th11	1.04	1.03	1.05	0.00
Th12	1.17	1.16	0.55	-0.62
Th13	0.94	0.92	0.97	0.02
Th14	0.84	0.69	0.38	-0.46
Th15	1.18	1.09	1.09	-0.10
Th16	0.93	0.89	0.73	-0.20
Th17	0.90	0.92	0.90	0.01
Th18	0.68	0.58	0.31	-0.37
Th19	1.11	1.07	1.03	-0.08

En cuantos a los aislados de *Trichoderma sp.* fue el aislado Ts 2 el que mostró el mayor valor diferencial positivo, mientras que el aislado Ts 1 fue el que mostró el mayor descenso en la capacidad de solubilización. El detalle de los valores de estabilidad de solubilización para cada aislado puede observarse en la Tabla 8.

Tabla 8. Valores de índice de solubilización de tres resiembras consecutivas de los diferentes aislados de *Trichoderma sp.*

Cepas de <i>Trichoderma sp</i>	ESF primera resiembra	ESF segunda resiembra	ESF tercera resiembra	Diferencial
T. sp1	0.67	0.52	0.29	-0.38
T. sp2	0.75	0.73	0.79	0.04
T. sp3	1.35	1.30	1.30	-0.05
T. sp4	0.67	0.71	0.45	-0.22
T. sp5	0.31	0.23	0.12	-0.19
T. sp6	0.34	0.36	0.23	-0.12
T. sp7	0.44	0.41	0.41	-0.03
T. sp8	0.64	0.62	0.59	-0.05
T. sp9	0.86	0.89	0.83	-0.03
T. sp10	0.93	0.90	0.89	-0.04
T. sp11	0.44	0.30	0.15	-0.29
T. sp12	0.38	0.46	0.23	-0.15

En cuantos a los aislados de *P. oxalicum* fue el aislado Po 2 el que mostró el mayor valor diferencial, mientras que el aislado Po 6 fue el que mostró el mayor descenso en la capacidad de solubilización. El detalle de los valores de estabilidad de solubilización para cada aislado puede observarse en la Tabla 9.

Tabla 9. Valores de índice de solubilización de tres resiembras consecutivas de los diferentes aislados de *Penicillium oxalicum*.

Cepas de <i>Penicillium oxalicum</i>	ESF primera resiembra	ESF segunda resiembra	ESF tercera resiembra	Diferencial
Po1	0.69	0.70	0.70	0.02
Po2	0.73	0.77	0.78	0.04
Po3	1.13	1.13	1.10	-0.03
Po4	1.12	1.07	1.09	-0.03
Po5	1.13	1.09	1.09	-0.04
Po6	1.30	1.26	0.68	-0.62
Po7	1.14	1.08	1.11	-0.03
Po8	0.87	0.86	0.88	0.01
Po9	1.14	0.86	0.88	-0.26

Po10	1.17	1.08	1.09	-0.08
Po11	1.22	1.28	1.07	-0.15
Po12	1.26	1.25	1.15	-0.11
Po13	0.85	0.83	0.82	-0.03
Po14	0.82	0.79	0.37	-0.45
Po15	0.74	0.44	0.22	-0.53
Po16	0.60	0.61	0.64	0.04
Po17	0.51	0.50	0.24	-0.27
Po18	0.57	0.53	0.55	-0.02
Po19	0.65	0.34	0.09	-0.55
Po20	0.48	0.45	0.45	-0.03
Po21	0.46	0.46	0.48	0.02

En cuantos a los aislados de *P. lilacinus* fue el aislado Pl 7 el que mostró el mayor valor diferencial, mientras que el aislado Pl 6 fue el que mostró el mayor descenso en la capacidad de solubilización. El detalle de los valores de estabilidad de solubilización para cada aislado puede observarse en la Tabla 10.

Tabla 10. Valores de índice de solubilización de tres resiembras consecutivas de los diferentes aislados de *Paecilomyces lilacinus*.

Cepas de <i>Paecilomyces lilacinus</i>	ESF primera resiembra	ESF segunda resiembra	ESF tercera resiembra	Diferencial
Pl 1	0.62	0.61	0.63	0.01
Pl 2	0.25	0.16	0.08	-0.17
Pl 3	0.47	0.47	0.48	0.02
Pl 4	0.26	0.17	0.08	-0.18
Pl 5	0.27	0.27	0.28	0.01
Pl 6	0.53	0.38	0.18	-0.36
Pl 7	0.12	0.17	0.18	0.06
Pl 8	0.48	0.51	0.48	0.00

En cuantos a los aislados de *A. niger* fue el aislado An 7 el que mostró el mayor valor diferencial, mientras que el aislado An 3 fue el que mostró el mayor descenso en la capacidad

de solubilización. El detalle de los valores de estabilidad de solubilización para cada aislado puede observarse en la Tabla 11.

Tabla 11. *Valores de índice de solubilización de tres resiembras consecutivas de los diferentes aislados de Aspergillus niger.*

Cepas de <i>Aspergillus niger</i>	ESF primera resiembra	ESF segunda resiembra	ESF tercera resiembra	Diferencial
An1	0.50	0.53	0.58	0.08
An2	0.66	0.68	0.68	0.02
An3	0.41	0.22	0.11	-0.29
An4	1.57	1.47	1.50	-0.07
An5	1.26	1.30	1.17	-0.09
An6	0.47	0.47	0.21	-0.26
An7	1.16	1.20	1.28	0.12
An8	0.39	0.43	0.25	-0.14
An9	0.33	0.18	0.11	-0.22

En cuantos a los aislados de *P. fluorescens* fue el aislado Pf 7 el que mostró el mayor valor diferencial, mientras que el aislado Pf 32 fue el que mostró el mayor descenso en la capacidad de solubilización. El detalle de los valores de estabilidad de solubilización para cada aislado puede observarse en la Tabla 12.

Tabla 12. *Valores de índice de solubilización de tres resiembras consecutivas de los diferentes aislados de Pseudomonas fluorescens.*

Cepas de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	ESF primera resiembra	ESF segunda resiembra	ESF tercera resiembra	Diferencial
Pf 1	1.32	1.23	1.28	-0.03
Pf 2	1.20	1.20	1.22	0.02
Pf 3	1.93	2.21	2.20	0.27
Pf 4	2.04	2.10	2.27	0.22
Pf 5	2.20	2.12	2.18	-0.02
Pf 6	1.63	1.08	0.50	-1.13
Pf 7	1.50	1.72	1.82	0.32
Pf 8	1.21	1.23	1.36	0.15
Pf 9	1.53	1.51	1.65	0.12

Pf 10	1.60	1.73	0.63	-0.97
Pf 11	1.35	1.44	1.50	0.15
Pf 12	1.41	1.46	1.59	0.18
Pf 13	1.26	1.32	1.23	-0.03
Pf 14	1.36	1.34	0.68	-0.68
Pf 15	1.66	1.55	1.50	-0.16
Pf 16	1.69	1.20	0.40	-1.29
Pf 17	1.52	1.46	1.34	-0.18
Pf 18	1.92	1.09	0.54	-1.38
Pf 19	1.57	1.57	1.57	0.00
Pf 20	1.53	0.85	0.24	-1.30
Pf 21	1.51	1.47	1.40	-0.11
Pf 22	1.86	1.71	1.69	-0.17
Pf 23	2.19	1.17	0.54	-1.65
Pf 24	3.17	2.94	3.14	-0.02
Pf 25	1.92	0.92	0.37	-1.55
Pf 26	1.59	1.67	0.93	-0.66
Pf 27	1.90	1.93	1.88	-0.02
Pf 28	1.92	1.08	0.39	-1.53
Pf 29	1.10	1.07	1.06	-0.04
Pf 30	1.25	1.25	1.27	0.03
Pf 31	1.64	1.54	1.49	-0.16
Pf 32	2.38	1.07	0.37	-2.01
Pf 33	3.92	3.75	4.11	0.19
Pf 34	1.21	1.18	1.22	0.01
Pf 35	1.68	1.00	0.33	-1.35

15 Análisis y discusión de resultados

15.1 Identificación de *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium oxalicum* y *Aspergillus niger*, en las zonas con suelos andisoles de la región central y occidental de Guatemala

En la identificación de las especies de microorganismos, los medios selectivos ayudaron a restringir el desarrollo de especies no deseadas. Sin embargo, como puede observarse en las tablas de resultados de cada una de las especies, se presentaron falsos positivos en los medios de cultivo, ya que, al realizar las amplificaciones específicas de ADN, los resultados fueron negativos. Para el caso del medio TSM (Attitalla et al., 2012) empleado para el aislamiento selectivo de *T. harzianum*, este permitió el desarrollo otras especies del género *Trichoderma*, los cuales deberán ser identificados a través de un proceso de secuenciación de la región ITS y posterior comparación con secuencias en el banco de genes. No se descarta el uso del medio TSM, pero si se hace mención sobre la posibilidad del desarrollo de otras especies del mismo género. Por otra parte, el uso de los primers THITS-F2 y THITS-R3 descrito por Miyazaki, Tsuchiya y Okuda (2009) si fueron efectivos para la confirmación de los aislados previamente identificados por el medio de cultivo selectivo. Los primers ayudaron a corregir los falsos positivos identificados en el medio de cultivo y ayudan a mantener vigente la recomendación del proceso de secuenciación para identificar los aislados de la Tabla 2. Los aislados de *Trichoderma sp.* continuaron el proceso de evaluación de solubilización, ya que durante pruebas preliminares, estos mostraron alta capacidad de solubilización. Esta situación no se presentó con los aislados catalogados como falsos positivos en medio de cultivo del resto de especies.

En la identificación de *P. lilacinus*, el medio de cultivo también presentó algunas diferencias con la confirmación molecular. Por tanto, la recomendación es similar al caso anterior de *Trichoderma harzianum* en cuanto a la posibilidad de tener falsos positivos con el uso del medio de cultivo por lo que el uso de primers específicos, como los descritos por Atkinks, Clark, Pande, Hirsch y Kerry(2005), es recomendable para garantizar la identidad de la especie. La situación descrita anteriormente, también se presenta en las especies *P. oxalicum*, *A. niger* y *P. fluorescens*. Por tal razón, la confirmación molecular fue clave para

tener certeza sobre las especies con las cuales se realizó el análisis de diversidad genética y pruebas de solubilización de fósforo (Miyazaki et al., 2009; Scarpellini et al., 2004)

15.2 Diversidad genética de los microorganismos identificados

Tras el análisis de los aislados de *T. harzianum*, con el marcador molecular AFLP, se determinó que existe una alta diversidad genética entre estos. Existen aislado que, aún compartiendo en sitio de colecta, son clasificados en grupos filogenéticos distintos. Por ejemplo, los aislados Th 1 y Th 4 colectados en Sacatepéquez fueron clasificados en grupos filogenéticos distintos con tan solo un 40% de similitud genética. El caso contrario se presentó con los aislados Th 3 y Th 18 procedentes de Sacatepéquez y San Marcos respectivamente. Dichos aislados presentaron un 82% de similitud genética a pesar de pertenecer a sitios de colecta distanciados geográficamente. La alta diversidad genética encontrada en este estudio coincide con lo reportado en distintos estudios (Sosa et al., 2014; Yasser et al., 2014). Los fenómenos descritos corresponden a la recombinación genética que da como resultado la alta diversidad encontrada en los aislados que fueron analizados.

La situación con el resto de aislados de los microorganismos identificados, *P. lilacinus*, *P. oxalicum*, *A. niger* y *P. fluorescens*; presentaron el mismo patrón, demostrando que, los aislados obtenidos con el desarrollo de la investigación, son genéticamente diversos y esto tendrá un impacto directo sobre su capacidad de solubilización y adaptación a factores bióticos y abióticos. La alta diversidad genética encontrada en coincide con lo reportado por diversos autores (Charana & Min-Ho, 2012; Karpagam & Nagalakshmi, 2014; Li et al., 2016; Sharma et al., 2013; Thakur et al., 2014).

15.3 Capacidad de solubilización de fósforo de las especies de microorganismos

Los índices de solubilización variaron entre los aislados que se evaluaron, observándose que si existe relación entre los grupos filogenéticos y la capacidad de solubilización. En el caso de *T. harzianum*, los aislados con mayor capacidad de solubilización, Th 10 y T 11, se ubican dentro de un mismo grupo filogenético. Cabe mencionar que, a excepción del aislado Th 9, el resto de aislados mostraron índices de solubilización comparables a los reportados por otros estudios (Charana & Min-Ho, 2013; Gomes et al., 2014). En cuanto a los aislados pertenecientes a las especies *P. lilacinus*, *P.*

oxalicum, *A. niger* y *P. fluorescens*, todos los aislados mostraron tener capacidad para solubilizar fósforo bajo condiciones in vitro, aunque con diferencias en la magnitud entre cada uno de ellos. La capacidad de solubilización encontrada coincide por lo reportado en diversos estudios (Chakraborty et al., 2010; Khan et al., 2010, 2007).

15.4 Estabilización de solubilización de fósforo de las especies de microorganismos

En cuanto a la estabilidad de la capacidad de solubilización en cada resiembra realizada, según los parámetros descritos en la metodología, se observó una tendencia a la disminución en los valores de los índices de solubilización de cada uno de los aislados. La magnitud de estos descensos, medido a través del diferencial entre los valores de solubilización entre las resiembras, fue muy variable. Cabe resaltar que para ningún caso se obtuvieron valores de 0 para el índice de solubilización en ninguna resiembra, por lo que es claro que, a pesar que para la mayoría de casos, los índices tienden a descender, su capacidad de solubilización no llegó a ser nula. Es importante mencionar que los descensos observados tienen una magnitud mínima y en la mayor parte de los casos, los valores siguen siendo muy cercanos a 0, por lo cual, los aislados siguen siendo efectivos en su capacidad de solubilización. Para el caso de *T. harzianum*, puede observarse que los valores diferenciales son variables, y la mayor parte de ellos tienen a descender, tal como se ha descrito, pero se debe resaltar que las magnitudes, en muchos de los casos, son muy cercanas a 0. Incluso, existen aislados, como el caso del Th 1, que se clasificó con una capacidad media de solubilización en la Figura 7, que manifiesta un aumento en su valor de solubilización a medida que transcurren las resiembras. Las situaciones de estabilidad de solubilización encontradas en los aislados de *P. lilacinus*, *P. oxalicum*, *A.s niger* y *P. fluorescens* son similares a las descritas y coinciden con los reportes de otros estudios (Khan et al., 2010, 2007; Maliha et al., 2004; Patiño Torres & Sánchez de Prager, 2012; Whitelaw, 2000)

16 Conclusiones

En el proceso de identificación de las especies de microorganismos con capacidad solubilizadora de fósforo se logró la confirmación de 19 aislados de *T. harzianum*, 12 aislados de *Trichoderma sp.* 21 aislados de *P. oxalicum*, 12 aislados de *P. lilacinus*, 9 aislados de *A. niger* y 35 aislados de *P. fluorescens* colectados de regiones del país son presencia de suelos andisoles.

A través del análisis con el marcador molecular AFLP, se demostró que todos los aislados de las especies de microorganismos identificados, muestran un alto grado de complejidad en cuanto a diversidad genética. Mediante el análisis de conglomerados, todas las especies de microorganismos, con sus respectivos aislados, presentaron al menos 5 grupos filogenéticos. Con esto se demuestra la complejidad y dinamismo de las poblaciones de microorganismos a través de los procesos de recombinación genética.

Bajo condiciones in vitro y tomando como variable de respuesta el índice de solubilización de fósforo, el aislado Th 10 perteneciente a la especie *T. harzianum*, mostró la mayor capacidad de solubilización, por lo cual, bajo las condiciones mencionadas, se presenta como el más eficiente en esta evaluación.

En cuanto a la capacidad de estabilidad de solubilización, el aislado Pf 19, perteneciente a la especie *P. fluorescens*, mostró un valor diferencial del índice de solubilización igual a 0 por lo que se considera como el más estable de todos los aislados evaluados en esta investigación. Sin embargo, el aislado Pf 7 mostró el mayor valor diferencial positivo, por lo cual este aislado tiende a aumentar su capacidad solubilizadora en cada resiembra y será evaluado en futuros ensayos.

17 Impacto esperado

Se cuenta con una colección de 104 aislados de 5 especies de microorganismos con capacidad y estabilidad para solubilizar fósforo bajo condiciones in vitro. Dichos aislados serán la base para futuras evaluaciones bajo condiciones de campo y diversidad de cultivos. El desarrollo de futuras investigaciones ayudará a realizar recomendaciones puntuales a los agricultores de las zonas de estudio para brindar una opción viable a la dependencia de los fertilizantes como única fuente de fósforo.

18 Referencias

- Acevedo, E., Galindo-Castañeda, T., Prada, F., Navia, M., & Romero, H. M. (2014). Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Colombia. *Applied Soil Ecology*, *80*, 26–33. doi:10.1016/j.apsoil.2014.03.011
- Al-Humam, N. (2016). Heat-shock technique for isolation of soil Bacillus species with potential of antibiotics secretion in Saudi Arabia. *British Microbiology Research Journal*, *17*(3), 1–6. doi:10.9734/BMRJ/2016/29126
- Antoun, H. (2012). Beneficial microorganisms for the sustainable use of phosphates in agriculture. *Procedia Engineering*, *46*, 62–67. doi:10.1016/j.proeng.2012.09.446
- Atkins, S., Clark, I., Pande, S., Hirsch, P., & Kerry, B. (2005). The use of real-time PCR and species-specific primers for the identification and monitoring of *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiology Ecology*, *51*, 257–264.
- Attitalla, I., Adbelrawaf, S., Saeed, K., El-Komy, H., & Sarwar, M. (2012). Occurrence and microbiological characteristics of *Trichoderma* in Al-Jabal Al-Akhdar Region, Libya. *Journal of Biological Sciences*, *12*(4), 209–217.
- Cerón, L., & Aristizábal, F. (2012). Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *14*(1), 285–295.
- Chakraborty, B., Chakraborty, U., Saha, A., Sunar, K., & Dey, P. . (2010). Evaluation of phosphate solubilizers from soils of north Bengal and their diversity analysis. *World Journal of Agriculture Sciences*, *6*(2), 195–200.
- Charana, B., & Min-Ho, Y. (2012). Prospectus of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus availability in agricultural soils: A review. *African Journal of Microbiology Research*, *6*(37), 6600–6605. doi:10.5897/AJMR12.889
- Charana, B., & Min-Ho, Y. (2013). Phosphate solubilizing bacteria: Assessment of their effect on growth promotion and phosphorous uptake of mung bean (*Vigna radiata* [L.] R. Wilczek). *Chilean Journal of Agricultural Research*, *73*(3), 275–281.

doi:10.4067/S0718-58392013000300010

- Chen, P., Chan, S., Wong, S., Eng, L., Jiwan, M., Kundat, F., ... Majid, N. (2012). Isolation of indigenous strains of *Paecilomyces lilacinus* with antagonistic activity against *Meloidogyne incognita*. *International Journal of Agriculture & Biology*, *14*, 197–203.
- Cordell, D., Drangert, J. O., & White, S. (2009). The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change*, *19*(2), 292–305. doi:10.1016/j.gloenvcha.2008.10.009
- Diba, K., Makhdoomi, K., & Mirhendi, H. (2014). Molecular characterization of *aspergillus* infections in an Iranian educational hospital using RAPD-PCR method. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, *17*(9), 646–650. doi:10.1111/myc.12380
- Dice, L. R. (1945). Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, *26*, 297–302. doi:10.2307/1932409
- Espinosa, J. (1996). Fijación de fósforo en suelos derivados de ceniza volcánica. *Informaciones Agronómicas*, *23*, 1–5.
- Fernández, M. T., & Rodríguez, H. (2005). El papel de la solubilización de fósforo en los biofertilizantes microbianos. *ICIDCA. Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, *39*(3), 27–34.
- Goldstein, A. (1994). Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by gram-negative bacteria. *Cellular and Molecular Biology*, 197–203.
- Gomes, E., de Cássia, U., Marriel, I., de Oliveira, C., & Gomes, P. (2014). Rock phosphate solubilizing microorganisms isolated from maize rhizosphere soil. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, *13*(1), 69–81.
- Gouda, S., Kerry, R. G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H. S., & Patra, J. K. (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiology Research*, *206*, 131–140. doi:10.1016/j.micres.2017.08.016
- Hernández-Leal, T. I., Carrión, G., & Heredia, G. (2011). Solubilización in vitro de fosfatos por una cepa de *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Agrociencia*, *45*(8), 881–892. doi:10.1074/jbc.M312875200
- Idris, A., & Ahmed, H. (2012). Phosphorus sorption capacity as a guide for phosphorus availability. *African Crop Science Journal*, *20*, 59–65.
- Johnston, A. E., & Steén, I. (2000). Understanding phosphorus and its use in agriculture. Recuperado de http://www.fertilizerseurope.com/fileadmin/user_upload/publications/agriculture_publications/EFMA_Phosphorus_booklet__2_.pdf
- Jones, D. (2003). Solubilization of phosphate in rice soil. *Mycology Research*, *95*, 1090–1093.
- Karpagam, T., & Nagalakshmi, P. K. (2014). Isolation and characterization of phosphate solubilizing microbes from agricultural soil. *International Journal of Current*

- Microbiology and Applied Sciences*, 3(3), 601–614.
- Khan, M. S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M., & Wani, P. A. (2010). Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi - Current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 56(1), 73–98. doi:10.1080/03650340902806469
- Khan, M. S., Zaidi, A., & Wani, P. A. (2007). Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture – A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 27(1), 29–43. doi:10.1051/agro
- Kim, K., McDonald, G., & Jordan, D. (1997). Solubilization of hydroxyapatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *Escherichia coli* in culture medium. *Biology and Fertility of Soils*, 24, 347–352.
- King, E., Wood, M., & Raney, E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and luorescein. *Journal of Laboratory Clinical Medicine*, 44(2), 301–307.
- Kitchen, N. R., Westfall, D. G., & Havlin, J. L. (1990). Soil sampling under no-till banded phosphorus. *Soil Science Society of America Journal*, 54(90), 1661–1665. doi:10.2136/sssaj1990.03615995005400060026x
- Kobra, S., Ebrahim, A., Reza, N., & Hamidreza, O. (2016). The effect of isolated phosphorus solubilizing bacteria and molasses on soluble and available P in wheat straw medium. *Iranian Journal of Environmental Technology*, 2(3), 41–48.
- Larena, I., & Melgarejo, P. (2009). Development of a method for detection of the biocontrol agent *Penicillium oxalicum* strain 212 by combining PCR and a selective medium. *Plant Disease*, 93(9), 919–928. doi:10.1094/PDIS-93-9-0919
- Li, H., Qiu, Y., Yao, T., Ma, Y., Zhang, H., & Yang, X. (2020). Effects of PGPR microbial inoculants on the growth and soil properties of *Avena sativa*, *Medicago sativa*, and *Cucumis sativus* seedlings. *Soil and Tillage Research*, 199, 104577. doi:10.1016/j.still.2020.104577
- Li, Z., Bai, T., Dai, L., Wang, F., Tao, J., Meng, S., ... Hu, S. (2016). A study of organic acid production in contrasts between two phosphate solubilizing fungi: *Penicillium oxalicum* and *Aspergillus niger*. *Scientific Reports*, 6(April), 1–8. doi:10.1038/srep25313
- Liu, M., Liu, X., Cheng, B. Sen, Ma, X. L., Lyu, X. T., Zhao, X. F., ... Fang, Y. L. (2016). Selection and evaluation of phosphate-solubilizing bacteria from grapevine rhizospheres for use as biofertilizers. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 14(4). doi:10.5424/sjar/2016144-9714
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación. (2000). Primera aproximación al mapa de clasificación taxonómica de los suelos de la república de Guatemala. Guatemala: Unidad de políticas e información estratégica y Programa de emergencia por desastres naturales.
- Mahdi, S. S., Talat, M. A., Dar, M. H., Hamid, A., & Ahmad, L. (2012). Soil phosphorus fixation chemistry and role of phosphate solubilizing bacteria in enhancing its efficiency for sustainable cropping - A review. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 66(4),

1905–1911.

- Maliha, R., Samina, K., Najma, A., Sadia, A., & Farooq, L. (2004). Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganism under in vitro condition. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7, 187–194.
- Mattingly, G. E. . (1974). Labile phosphate in soils. *Soil Science*, 119(5), 369–375.
- Melenya, C., Logah, V., Aryee, D., Abubakari, A., Tuffour, H. O., & Yeboah, I. B. (2015). Sorption of phosphorus in soils in the semi deciduous forest zone of Ghana. *Applied Research Journal*, 1(3), 169–175.
- Miyazaki, K., Tsuchiya, Y., & Okuda, T. (2009). Specific PCR assays for the detection of *Trichoderma harzianum* causing green mold disease during mushroom cultivation. *The Mycological Society of Japan*, 50, 94–99.
- Molar, R., Picos, P., Márquez, I., Carrillo, J., García, R., & León, J. (2013). Identificación Morfológica y molecular de *Penicillium oxalicum* causante de pudrición de tallos y frutos de tomate. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31(1), 13–19.
- Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4), 56–65. doi:10.1038/scientificamerican0490-56
- Nagano, Y., Millar, B. C., Goldsmith, C. E., Walker, J. M., Elborn, J. S., Rendall, J., & Moore, J. E. (2008). Development of selective media for the isolation of yeasts and filamentous fungi from the sputum of adult patients with cystic fibrosis (CF). *Journal of Cystic Fibrosis*, 7(6), 566–572. doi:10.1016/j.jcf.2008.06.007
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Letters*, 170, 265–270.
- Nisha, K., Devi, P., & Vasandha, S. (2014). Role of phosphorous solubilizing microorganisms to eradicate P- deficiency in plants : a review. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 4(7), 1–5.
- Panhwar, Q., Naher, U., Shamshuddin, J., Radziah, O., Latif, M., & Mohd Razi, I. (2014). Biochemical and molecular characterization of potential phosphate-solubilizing bacteria in acid sulfate soils and their beneficial effects on rice growth. *PLoS ONE*, 9(10), e97241. doi:10.1371/journal.pone.0097241
- Patiño, C. (2010). *Solubilización de fosfatos por poblaciones bacterianas aisladas de un suelo del Valle del Cauca. Estudios de biodeiversidad y eficiencia* (Tesis doctoral). Universidad Nacional de Colombia.
- Patiño Torres, C., & Sánchez de Prager, M. (2012). Aislamiento e identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos, habitantes de la rizósfera de Chontaduro (*B. gassipaes* kunth). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10(2), 177–187.
- Perez, J. (2008). *Estudio de la concentración de cobre, zinc y manganeso en los suelos hortícolas del valle de San Pedro Almolonga, Quetzaltenango, sometidos a una agricultura intensiva*. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Picone, L. I., & Zamuner, E. (2002). Fósforo orgánico y fertilidad fosfórica. *Informaciones*

- Agronómicas del Cono Sur*, 16, 11–15.
- Prabhu, N., Borkar, S., & Garg, S. (2019). Phosphate solubilization by microorganisms. *Advances in Biological Science Research*, 1, 161–176. doi:10.1016/b978-0-12-817497-5.00011-2
- Reena, T., Dhanya, H., Deepthi, M. ., & Pravitha, D. (2013). Isolation of phosphate solubilizing bacteria and fungi from rhizospheres soil from banana plants and its effect on the growth of *Amaranthus cruentus* L. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 5(3), 2278–3008.
- Richardson, A. E., Barea, J. M., McNeill, A. M., & Prigent-Combaret, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil*, 321(1–2), 305–339. doi:10.1007/s11104-009-9895-2
- Ruiz-Sánchez, E., Mejía-Bautista, M. Á., Serrato-Díaz, A., Reyes-Ramírez, A., Estrada-Girón, Y., & Valencia-Botín, A. J. (2016). Antifungal activity and molecular identification of native strains of *Bacillus subtilis*. *Agrociencia*, 50, 133–148.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406–425. doi:citeulike-article-id:93683
- Sanchez, P., and Uehara. 1980. Management considerations for acid soils with high phosphorus fixation capacity, 471-514 p. in: Khasawneh, F. E. (Ed.). The role of phosphorus in agriculture. Soil Science Society Of America, Madison, WI.
- Scarpellini, M., Franzetti, L., & Galli, A. (2004). Development of PCR assay to identify *Pseudomonas fluorescens* and its biotype. *FEMS Microbiology Ecology*, 236, 257–260.
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2(587), 1–14. doi:10.1186/2193-1801-2-587
- Song, O. R., Lee, S. J., Lee, Y. S., Lee, S. C., Kim, K. K., & Choi, Y. L. (2008). Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(1), 151–156. doi:10.1590/S1517-83822008000100030
- Starr, M., Grimont, P., Grimont, F., & Starr, P. (1976). Caprylate-thallos agar medium for selectively isolating Serratia and its utility in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 4(3), 270–276.
- Tenzing Baliah, N., Pandiarajan, G., & Makesh Kumar, B. (2016). Isolation, identification and characterization of phosphate solubilizing bacteria from different crop soils of Srivilliputtur Taluk, Virudhunagar District, Tamil Nadu. *Tropical Ecology*, 57(3), 465–474.
- Thakur, D., Kaushal, R., & Shyam, V. (2014). Phosphate solubilising microorganisms: role in phosphorus nutrition of crop plants-a review. *Agricultural Reviews*, 35(3), 159. doi:10.5958/0976-0741.2014.00903.9

- Venkateswarlu, B., Rao, A., Raina, P., & Ahmad, N. (1984). Evaluation of phosphorus solubilization by microorganisms isolated from arid soil. *Journal of Indian Society Soil Sciences*, 32, 273–277.
- Whitelaw, M. (2000). Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. *Advanced Agronomy*, 69, 99–161.
- Yasser, M. M., Mousa, A. S. M., Massoud, O. N., & Nasr, S. H. (2014). Solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing fungi isolated from Egyptian soils. *Journal of Biology and Earth Sciences*, 4(1), 83–90.
- You, M., Fang, S., MacDonald, J., Xu, J., & Yuan Z-Chun. (2020). Isolation and characterization of *Burkholderia cenocepacia* CR318, a phosphate solubilizing bacterium promoting corn growth, *Microbiological Research*, 233, 126395. doi: 10.1016/j.micres.2019.126395
- Zhu, H., Sun, S., & Dang, H. (2008). PCR Detection of *Serratia* spp. Using primers targeting pfs and luxS genes involved in AI-2-Dependent quorum sensing. *Current Microbiology*, 57, 326–330.

19 Apéndices

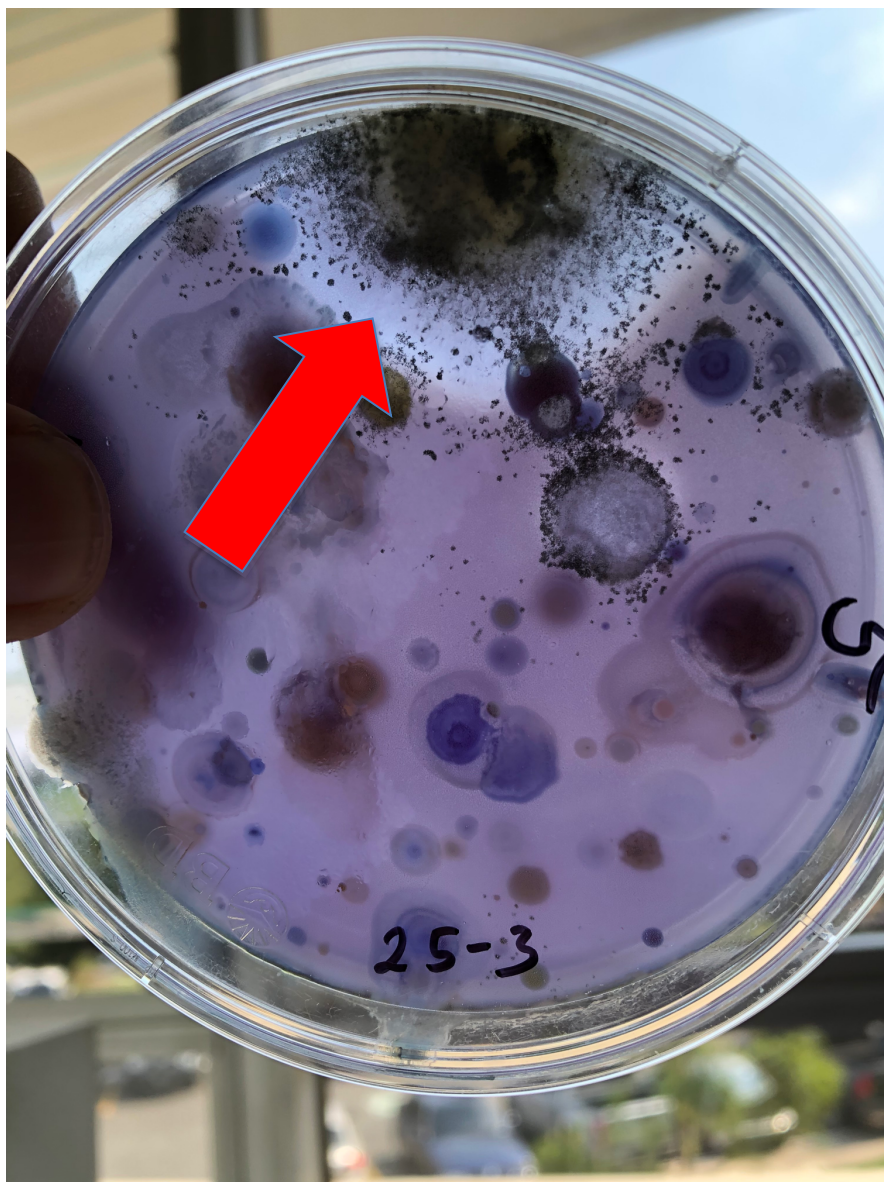


Figura A1. Desarrollo de estructura micelial sobre medio de cultivo NBRIP tras un periodo de incubación de 3 semanas. La flecha roja indica el halo de solubilización, el cual se identifica por la tonalidad transparente del medio.



Figura A2. Desarrollo de unidades formadoras de colonia sobre medio de cultivo NBRIP tras un periodo de incubación de 1 semanas. El círculo rojo señala el halo de solubilización, el cual no es completamente visible aún.



Figura A3. Desarrollo de unidades formadoras de colonia sobre medio de cultivo PVK tras un periodo de incubación de 2 semanas. La flecha indica el halo de solubilización identificado por la tonalidad transparente del medio.

Listado de los integrantes del equipo de investigación (en una sola hoja)

Contratados por contraparte y colaboradores

Nombre	Firma
Gregorio Amílcar Sánchez Pérez	

Contratados por la Dirección General de Investigación

Nombre	Categoría	Registro de Personal	Pago		Firma
			SI	NO	
Julio Ernesto Berdúo Sandoval	Investigador	20101438	X		
José Alejandro Ruiz Chután	Investigador	20101034	X		

Guatemala ____27____ de noviembre ____2019____

Ph.D. Gregorio Amílcar Sánchez Pérez
 Coordinador del proyecto de Investigación

Ing. Agr. MARN. Julio Rufino Salazar
 Programa Universitario de Investigación

Ing. Agr. MARN. Julio Rufino Salazar
 Coordinador General de Programas