



**UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA  
METROPOLITANA**  
Unidad Xochimilco

**Reporte final de servicio social**

**Licenciatura en Agronomía**

**Nombre: Fátima Popo Fernandez**

**Matricula: 2202030619**

**Nombre del proyecto: Aislamiento y caracterización de  
bacterias solubilizadoras de fósforo de suelos salinos.**

**Vo.Bo. Dr. Iván Pável Moreno Espíndola**

## **Introducción**

La salinidad en suelos de uso agrícola es un problema frecuente en regiones áridas y semiáridas debido a la falta de lluvias, al inadecuado manejo del agua de riego y al exceso en la aplicación de fertilizantes. Los suelos salinos contienen altas concentraciones de sales solubles, esto eleva el potencial osmótico de la solución del suelo, lo cual causa cierto estrés fisiológico, estos suelos representan poca capacidad para el crecimiento de plantas y los vuelve no productivos (Terrazas, 2018).

Los efectos negativos de la salinidad del suelo se manifiestan en la disminución en la disponibilidad de nutrientes para las plantas y en la consecuente reducción de la producción y calidad de los cultivos. Es crucial abordar este problema mediante la implementación de prácticas de manejo adecuadas y el desarrollo de técnicas de riego, incorporación de materia orgánica y fertilización racional para mejorar las condiciones para la productividad y sustentabilidad de la agricultura en las regiones afectadas (Camejo y Torres, 2000; Martínez et al., 2011; Ramírez et al., 2017).

En los últimos años se ha buscado la disminución de daños al ambiente, con estrategias que puedan remplazar a los fertilizantes químicos, los microorganismos han demostrado que son capaces de efectuar funciones que sostienen el equilibrio del suelo y ayudan con el crecimiento directa e indirectamente, contienen mecanismos que pueden interactuar entre sí mismos, esto para formar relaciones benéficas, particularmente con las raíces de las plantas (Ahmad et al., 2009).

Existen grupos de microorganismos que están involucrados en la transformación del fósforo (P), del suelo y son esenciales en el ciclo de este nutriente. Estos microorganismos pueden participar en la solubilización del fosfato inorgánico y en la mineralización del fosfato orgánico, también se ha observado su participación en la inmovilización del P (Richardson, 1994). Estos microorganismos son abundantes en la rizosfera e incluyen bacterias Gram positivas y Gram negativas (Babenko,

1984). Los microorganismos solubilizadores de P pueden favorecer el aumento en el rendimiento de los cultivos (Sundara., et al. 2002).

El P es el segundo nutriente esencial para las plantas, se le requiere en el metabolismo celular, en el crecimiento y desarrollo de las plantas (FAO, 2007). El P es absorbido por la planta en forma soluble sin embargo, cuando este nutriente se introduce al suelo aproximadamente el 90% deja de estar disponible, por ello, gran parte de los fertilizantes fosfatados utilizados no son aprovechados por las plantas. Como respuesta a lo anterior, se buscan alternativas que permitan el aprovechamiento de este nutriente y la disminución en el uso de fertilizantes altamente solubles (Montecinos, 2003).

El interés en la producción de bioinsumos basados en cepas aisladas o en consorcios microbianos, radica en la búsqueda de estrategias e insumos que ayuden a optimizar la interacción de los componentes de un agrosistema en particular en cuanto a la nutrición de las plantas (Pacheco et al., 2019; Li et al., 2021). El impacto principal del uso de bioinsumos se puede comprobar a partir de la relación con las variables ambientales, las cuales están asociadas con la reducción del uso de agroquímicos (mejora de las condiciones fisicoquímicas del suelo y menor contaminación de suelo y aire). En las variables productivas se utilizan para biofertilizantes, quienes se encargan de un mejor crecimiento de los cultivos y en el incremento de la captación de nutrientes (Schütz et al., 2018; Dos Santos et al., 2020).

### **Justificación e importancia social**

El presente proyecto de servicio social relacionado con actividades profesionales hace una contribución a la sociedad debido a que busca generar conocimiento y un insumo útil como biofertilizante a partir de la identificación y caracterización de bacterias solubilizadoras de fósforo capaces de crecer en suelos salinos.

La formulación del inoculante bacteriano contiene una o más cepas de bacterias, las cuales son benéficas, de forma orgánica, inorgánica o sintética. El impacto del

inoculante en la plantas puede estar presente en el mejoramiento de absorción de nutrientes y en la solubilización de minerales en el suelo y planta (Bashan, 2008).

### **Objetivo general:**

Aislar y caracterizar cepas bacterianas solubilizadoras de fosforo provenientes de suelos salinos, que sean de interés y eficientes para ser utilizadas como biofertilizantes.

### **Objetivos particulares:**

- Aislar y purificar bacterias solubilizadoras de fosforo provenientes de suelos salinos de “las tablas”, Tláhuac, CDMX.
- Realizar pruebas bioquímicas a las bacterias aisladas para su caracterización.
- Realizar un ensayo con las cepas obtenidas para evaluar su efecto en el crecimiento de plántulas de jitomate.

### **Metodología**

El proceso de aislamiento y caracterización se realizó en el Laboratorio de Suelos y Aguas del DPAA y en el de Ecología Microbiana del DHA, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

### **Actividades a desarrolladas:**

1. Elaboración de medio selectivo para bacterias solubilizadoras de fósforo (BSF) (Shekhar, 1999).
2. Cultivo, aislamiento y purificación y caracterización de colonias BSF.
3. Caracterización bioquímica de las BSF aisladas.
4. Ensayo de inoculación con plántulas de jitomate.
5. Procesamiento y análisis de datos.
6. Elaboración de informe.

### **Muestreo de suelo y aislamiento:**

Con el objetivo de aislar bacterias solubilizadoras de fosforo, se colectaron muestras de suelo en áreas con problemas de salinidad ubicadas en Valle de Chalco Solidaridad, Estado de México (19°14'52.4"N 98°57'24.1"W).

A partir de las muestrass de suelo tomadas en campo, se pesaron 5 g y se colocaron en matrâcez con 25 ml de agua estéril y se agitaron durante 15 minutos.

A partir de la suspensión obtenida de los 5 g de suelo, se realizaron diluciones en tubos con 9 ml de agua destilada y con 19 ml para realizar siembras en cajas Petri con medio selectivo para bacterias solubilizadoras de fósforo (Shekhar, 1999). Se sembraron cajas con diluciones 1:10 y 1:20, se incubaron durante 48 horas y se observaron en un estereoscopio para identificar y aislar colonias bacterianas con actividad solubilizadora de P. Las colonias seleccionadas fueron resembradas en medio selectivo mediante estriado, seleccionado en cada ocasión a colonias con las mismas características morfológicas.

### **Caracterización morfológica de las colonias de bacterias:**

Como resultado del proceso de aislamiento realizado durante tres meses, se logró aislar dos colonias bacterianas capaces de solubilizar fosforo. Mediante la observación en estereoscopio se identificaron las características morfológicas de las colonias aisladas. Las colonias aisladas fueron preservadas en viales con 1 ml de biomasa del cultivo bacteriano y 1ml de glicerol, para conservarlas en ultracongelación (-75 °C).

### **Caracterización bioquímica**

Se tomaron muestras de los viales en ultracongelación para activar las bacterias, esta activación se llevó a cabo agitando el vial en un bortex durante un minuto, enseguida se tomó la muestra y se distribuyó en una caja con medio selectivo utilizando una aza Drigalsky, estas se incubaron durante 48 horas a una temperatura de 28 °C, posteriormente activadas se llevaron a cabo las siguientes pruebas (Stanier, Adelverg, e Ingraham, 1976).

#### **Prueba de la catalasa:**

Esta prueba se realizó añadiendo 4 gotas de agua oxigenada (3%) sobre las colonias. Si hay producción de burbujas, indica que esta enzima está presente.

#### Prueba de la oxidasa:

Para esta prueba se utilizó p-fenilendiamina al 1% en agua y se colocó en papel filtro, utilizando una aza bacteriológica, se tomó una muestra de las colonias de 24 horas extendiéndolo sobre el papel mojado. El color azul en esta prueba es el indicador.

#### Fermentación de glucosa:

Esta prueba se llevó a cabo en tubos con medio basal (semisólido), este medio inicialmente fue de color verde. Se inoculó con las cepas bacterianas seleccionadas por picadura en el centro del tubo, estos tubos fueron cubiertos con parafina líquida previamente esterilizada (simula la atmósfera anaeróbica).

#### Tinción de Gram

La selección de muestras para la tinción del frotis bacteriano se llevó a cabo mediante la siembra de la bacteria en medio nutritivo, el cual previamente fue elaborado, estas bacterias se incubaron durante 48 horas a una temperatura de 28°C.

Se tomó una muestra aleatoria, para la tinción de Gram se siguió el protocolo presentado por Christian Gram (1884) posterior a esto los resultados se observaron en un microscopio marca Velab donde se tomaron 3 campos para la observación, en el objetivo de 100x.

#### Curva de absorción:

Para la curva fueron tomados 0.5 ml de la colonia de bacteria se inocularon en un matraz con 50 ml de caldo nutritivo, el matraz fue llevado a una incubadora con agitación durante 24 horas (91rpm y 28.7 °C) posteriormente se tomó 1 ml de la muestra para llevarla a la lectura en un espectrofotómetro SHIMADZU UV – 1280 con una lectura de 600nm. Este procedimiento se llevó a cabo durante 3 días llevando un control de 24, 48 y 72 horas.

## Unidades formadoras de colonias

Para las unidades formadoras de colonias se llevaron a cabo diluciones. Se utilizaron 7 tubos con 9 ml de agua estéril. En el primer tubo se puso 1 ml de la muestra del matraz que estaba en incubación, las diluciones se realizaron seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ). Esto de acuerdo a los resultados obtenidos en la absorbancia de las primeras 24 horas. Se sembró en cajas con medio nutritivo, tomando 0.5 ml de muestra de los tubos con las diluciones  $1:10^{-6}$  y  $1:10^{-7}$ . Cada tubo fue agitado 15 segundos antes de la toma de la muestra, la muestra fue distribuida con un asa Drigalsky previamente esterilizada. Posteriormente se dejaron incubando durante 24 horas a una temperatura de  $28^{\circ}\text{C}$ , en un contador de colonias Scientific CVP - CM3 se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).

Este procedimiento se llevó a cabo 3 veces, aclarando que el primero fue con el matraz que se encontraba en incubación a las 24 horas, el siguiente conteo se llevó a cabo cuando el matraz con el inocuo bacteriano tenía 48 horas y el mismo procedimiento se realizó a las 72 horas. El conteo de las cajas sembradas se realizó a las 24 horas de incubación.

## Resultados

- Aislamiento y caracterización morfológica de las colonias de bacterias:

Forma colonia	Agrupamiento	Color
Redonda	Pares e individuales	Naranja

Cuadro 1. Características morfológicas



Figura 1. Colonias de bacterias solubilizadoras de fósforo aisladas a partir de muestras de suelo salino de la alcaldía Tiáhuac, CDMX.

De acuerdo a los resultados obtenidos durante el aislamiento de estas bacterias, se observan formas redondas, con color naranja intenso, algunas de ellas se agrupan y otras crecen individualmente (Fig. 1), en las observaciones con respecto a los periodos de incubación los medios viraban de manera homogénea, el medio selectivo cambiaba de ser morado a ser completamente amarillo.

- Pruebas bioquímicas

En estas pruebas se determinó si las bacterias aisladas eran positivas o negativas a catalasa, oxidasa y a la fermentación.

La bibliografía menciona que la enzima que protege a las células del peróxido de hidrogeno producido por el metabolismo del oxígeno es la catalasa (Niklitschek, 2008). Para esta prueba se observó que al poner las gotas de agua oxigenada sobre la muestra comenzó a burbujear, dando como resultado que las bacterias aisladas son positivas a la prueba realizada.

La prueba de oxidasa arrojó un resultado positivo, cuando se agregó p-fenilendiamina la muestra puesta en el papel se tiñó de color azul, de acuerdo con la bibliografía se dice que el citocromo C oxidasa en la cadena de transporte de electrones se detecta utilizando un aceptor de electrones artificial (p-fenilendiamina), lo cual provoca la reacción y el principal indicador es el cambio de color (Niklitschek, 2008).

De acuerdo con la prueba de fermentación los resultados obtenidos fueron que estos microorganismos aislados son positivos a la fermentación aerobia, es decir, la glucosa fermento ya que el medio vió de color amarillo (lo cual era un indicador), este proceso se llevo a cabo sin la presencia de oxígeno.

- Tinción de Gram

Se debe mencionar que la tinción de Gram es una de la tinciones diferenciales más importantes, en ella las células Gram (+) retienen el cristal violeta (debe tratarse con

etanol) las Gram (-) no pueden retenerlo y solo se tiñen de color rojo (safranina). Este comportamiento se debe a la pared celular de la bacteria la cual permite diferenciarlas (Niklitschek, 2008). Los resultados observados a través del microscopio determinan que las colonias aisladas de bacterias pertenecen a Gram positivas y Gram negativas, la forma celular indica que son coco y cocobacilos, a continuación, se presentan imágenes y una tabla de resultados de la tinción de Gram realizada.

Numero de campos	Intensidad color	de Tinción Gram	de
1	Medio	+	
2	Medio	-	
3	Intenso	+	
4	Intenso	-	

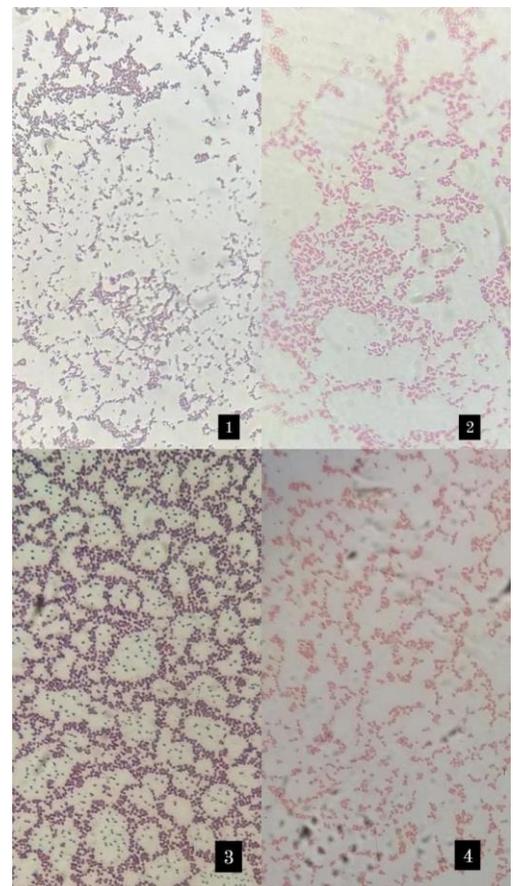


Figura 2. Imágenes tomadas del microscopio.

Cuadro 2. Características morfológicas y tinción de Gram.

- Curva de absorción:

Los resultados del crecimiento microbiano analizados en diferentes tiempos (horas) y medido por cambios de la densidad óptica (600nm) y UFC·mL<sup>-1</sup> presentaron que la fase óptima donde las colonias aisladas tienen un crecimiento y absorción mayor es las 24 horas.

La información proporcionada por la gráfica (figura 2) nos indica que en 24 horas tuvo una densidad óptica de 1.832 ABS, mientras que a las 72 horas (última medición) obtuvo una densidad óptica de 1.726 ABS, lo cual indica una diferencia significativa.

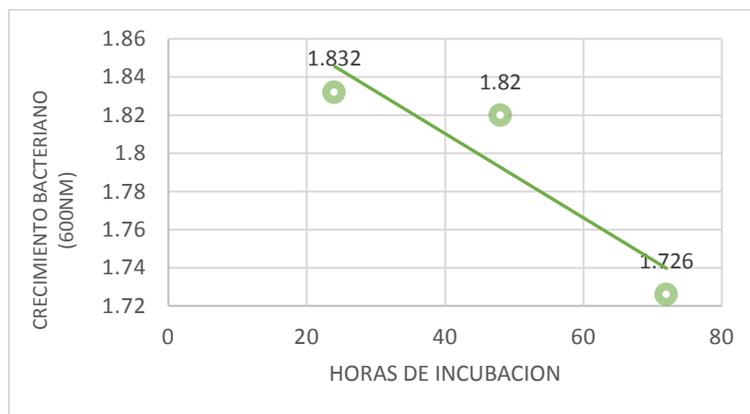


Figura 2. Grafica representativa del comportamiento de las bacterias durante tres periodos (horas).

- Unidades formadoras de colonias

Los resultados obtenidos con el lector de unidades formadoras de colonias con factor de dilución de 1:10<sup>6</sup> (cuadro 2) analizados durante 3 periodos indican que a las 24 horas estas colonias aisladas tienen una mayor concentración de UFC.

Periodo de incubación (horas)	UFC (UFC/ml)
24	2,908 x 10 <sup>6</sup>
48	2,124 x 10 <sup>6</sup>
72	1,764 x 10 <sup>6</sup>

Cuadro 2. Resultados del conteo de UFC/ml en cajas Petri con medio nutritivo

### Conclusión

Las colonias de bacterias aisladas y caracterizadas parcialmente provenientes de suelos salinos de la alcaldía Tláhuac, CDMX, tienen características de interés por su potencial uso agrícola. Si bien se avanzó en el proceso de aislamiento y caracterización, es necesario continuar dicho proceso y realizar ensayos de su efecto en plantas de interés agrícola.

## Referencias

Babenko Y. S., G. Tyrygina E. F. Grigoryev L. M. Dolgikh, T. I. Borisova. 1984. Biological activity and physiologo-biochemical properties of bacteria dissolving phosphates. *Microbiologiya*. 53:533-539.

Bashan Y. 2008. La biofertilización como tecnología sostenible. Prólogo. El uso de inoculantes microbianos como una importante contribución al futuro de la agricultura mexicana. Eds. Plaza y Valdés. 1:17-25.

Bullor, L., Braude, H., Monzón, J., Cotes Prado, A. M., Casavola, V., Carbajal Morón., N. y Risopoulos, J. 2023. Bioinsumos: Oportunidades de inversión en América Latina - Direcciones de inversión No. 9. Roma, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc9060es>

FAO. Food and agriculture organization of the United Nations. 2007. Glosario de la gestión integrada de los nutrientes.

FAO. Food and agriculture organization of the United Nations. 2007. Utilización de las rocas fosfóricas para una agricultura sustentable. Roma, Italia. 155p.

González, R., Mendelez, Elizalde, B., Cuevas, Cortez, M., Cruz, & Orduña, M., Sanchez. (2020, noviembre). Las tinciones básicas en el Laboratorio de Microbiología. UNAM. <https://www.zaragoza.unam.mx/wpcontent/Portal2015/publicaciones/libros/cbiologicas/libros/Tinciones.pdf>

MONTECINOS, C. 2003. Manejo biológico del fósforo en el suelo. .

Moreno, L., Ramírez. (2015, 27 agosto). Bacterias solubilizadoras de fosforo nativas del valle de Mexicali; aislamiento, caracterización y evaluación en plantas de algodón. UABC. Disponible en: <https://repositorioinstitucional.uabc.mx/server/api/core/bitstreams/a5190807-a80a4d3c-894c-19558eae1bd5/content>. Consultado el [23/01/2024].

Moreno, L., Ramírez. (2015, 27 agosto). Bacterias solubilizadoras de fosforo nativas del valle de Mexicali; aislamiento, caracterización y evaluación en plantas de algodón. UABC. Disponible en: <https://repositorioinstitucional.uabc.mx/server/api/core/bitstreams/a5190807-a80a4d3c-894c-19558eae1bd5/content>.

Niklitschek, M., Oyarzo. (2008). Evaluación del trigo (*Triticum aestivum*), inoculado con bacterias solubilizadoras de fosforo y una cepa fijadora de Nitrógeno, aisladas de la rizosfera de especies arbustivas. UACH. Recuperado 22 de julio de 2024, de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2008/fan692e/doc/fan692e.pdf>

Ramírez, M., Urdaneta, A., & Pérez, E. (2017). Germinación del guayabo tipo "criolla roja" bajo condiciones de salinidad por cloruro de sodio. *BIOAGRO*, 29(1), 65-72.

Richardson A. E. 1994. Soil microorganisms and phosphorous availability. In *Soil Biota: Management in Sustainable Farming Systems*. Eds. CE Pankhurst, BM Doube VVSR Gupta. 1:50–62.

Rueda, J. (2019). Aprovechamiento del suelo salino: agricultura salina y recuperación de suelos. *Apthapi*, 5(1), 1539-1563. Disponible en: <http://apthapi.agro.umsa.bo/index.php/ATP/article/view/28>.

Rueda, J. (2019). Aprovechamiento del suelo salino: agricultura salina y recuperación de suelos. *Apthapi*, 5(1), 1539-1563. Disponible en: <http://apthapi.agro.umsa.bo/index.php/ATP/article/view/28>.

Shekhar, N.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms *FEMS Microbiology Letters* 170, pp 265-270.

Stanier, R. Y., Adelverg, E.A., e Ingraham, J.L. 1976. *The microbial world*. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey. 853 p.

Sundara B., Natarajan, V., Hari, K. 2002. Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. *Field Crops Research* 77: 43–49.

Sundara B., Natarajan, V., Hari, K. 2002. Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. *Field Crops Research* 77: 43–49.

Terrazas Rueda, J. M. (2018). Efecto de tres niveles de salinidad en el crecimiento del pasto agropiro variedad Alkar (*Thinopyrum ponticum*) mediante reproducción sexual y vegetativa. *Apthapi*, 4(3), 1295-1311. Obtenido de <http://ojs.agro.umsa.bo/index.php/ATP/article/view/261>