BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESTIMULACIÓN DEL CRECIMIENTO DE LA FLOR "CRISANTEMO" (*Chrysanthemum* sp), POR LA FORMULACIÓN MULTIESPECIES EMMIM-1.

Tesis para obtener el título de:

LICENCIADO (A) EN BIOLOGÍA

PRESENTA:
FANNY DAFNE VÁZQUEZ AYALA

DIRECTORA: D. C. YOLANDA ELIZABETH MORALES GARCÍA

OCTUBRE 2018

El presente proyecto se realizó en el laboratorio de Ecología Molecular Microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Se agradece el apoyo brindado de los siguientes proyectos VIEP-BUAP-2016 Proyecto: 00513 y VIEP-BUAP-2017 ID Proyecto: 00468

Para la realización de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Doctor Jesús Muñoz Rojas por haberme aceptado en su grupo de investigación, por la revisión y aportaciones al presente trabajo. De igual manera agradezco a la Doctora Elizabeth Morales García por su tiempo dedicado a las asesorías y contribuciones a la tesis; gracias a ambos.

A la Doctora Dalia Molina Romero y al Doctor Jesús Muñoz Rojas, por la revisión de tesis.

A los profesores que me brindaron conocimiento: herramienta de trabajo para poder desarrollar mis aptitudes y habilidades.

A mis amigos en especial a Ana Laura por sus asesorías y por enseñarme lo que hoy se, gracias por tu comprensión y apoyo en momentos difíciles, por tu amistad gracias.

A todos mis compañeros del laboratorio, por su amistad y por compartir conmigo sus conocimientos.

A mis padres que sin ellos nada de esto sería posible, gracias por el esfuerzo que siempre han hecho por mí, a mis hermanas por siempre alentarme, a mi esposo e hija por su comprensión y apoyo incondicional.

DEDICATORIA

A:

Dios, por haberme dado la oportunidad de llegar hasta este punto, por la salud para lograr mis objetivos, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber aquellas personas que han sido mi soporte y compañía todo el periodo de estudio: mis padres.

Mis padres, por ser los pilares más importantes en mi educación, tanto académica, como en la vida, por su incondicional apoyo y esfuerzo para cumplir mis sueños. Porque a pesar de todo siempre estuvieron a mi lado brindándome su apoyo y sus consejos para hacer de mí una mejor persona. Papás gracias por su amor incondicional y por darme lo mejor en la vida mi estudio.

Mis hermanas, por su cariño e impulsarme a salir siempre adelante.

Mi esposo Ildegardo, por cuidar de nuestra hija durante el proceso de mi titulación, pero sobre todo por el amor y la confianza.

ÍNDICE

	Página
1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Antecedentes	9
4. Justificación	13
5. Hipótesis	15
6. Objetivo general	15
7. Objetivos particulares	15
8. Material y Métodos	16
8.1. Experimento I. Estimulación del crecimiento de la flor “crisantemo” por la formulación multi-especies EMMIM-1.	16
8.1.1. Experimento II. Solubilización de fosfato	18
9. Resultados	22
9.1. Estimulación del crecimiento de la flor “crisantemo” por la formulación multi-especies EMMIM-1.	22
9.1.2 Altura de la planta	22
9.1.3. Diámetro del tallo	23
9.1.4. Peso fresco y seco aéreo	24
9.1.5. Peso fresco y seco de la raíz	26
10. Solubilización de fosfato	31
10.1. Combinaciones de dos cepas	31
10.1.2. Combinaciones de tres cepas	36
10.1.3. Combinaciones de cuatro cepas	43
10.1.4. Combinaciones de cinco cepas	49
10.1.5. Cepas individuales y mezcla de las seis	59

11. Discusión **66**

11.1. Estimulación del crecimiento de la flor "crisantemo" por la formulación multi-especies EMMIM-1 **66**

11.1.1. Solubilización de fosfato **68**

12. Conclusiones y perspectivas **73**

13. Bibliografía **75**

RESUMEN

Los inoculantes microbianos son productos preparados a base de microorganismos benéficos para la aplicación en semillas o suelos, con la finalidad de incrementar su productividad, proporcionando mayor disponibilidad de nutrientes para las plantas y ayudando a su crecimiento; estos inoculantes pueden sustituir parcial o totalmente a los fertilizantes químicos, por lo que son de gran importancia para la sustentabilidad de la agricultura. Además, la interacción que muestran los organismos benéficos con la planta es importante ya que estos colonizan la rizósfera generando así nuevas estructuras especializadas en la provisión de nutrientes esenciales para las plantas.

El uso de inoculantes microbianos conlleva a una alternativa viable y amigable con el ambiente; en especial con los suelos ya que nutren los cultivos e incrementan la productividad. El objetivo de este trabajo se centró en la evaluación del efecto del inoculante multiespecies EMMIM-1, en el crecimiento del *Chrysanthemum* spp. El presente estudio se realizó en el Centro de investigaciones en Ciencias Microbiologías (CICM), ICUAP, de julio 2016 a marzo 2017.

La aplicación del inoculante se realizó al inicio del experimento y las variables de respuesta fueron el crecimiento (altura de la planta), diámetro del tallo, peso fresco y seco tanto de las raíces como aéreo. Para la cuantificación de UFC/ml se realizó el método de Goteo en placa, donde se observó buena supervivencia de las cepas bacterianas cuando se asocian a las plantas.

Además, se evaluó la capacidad de solubilizar fosfatos por parte de las diferentes cepas microbianas que conforman el inoculante multiespecies, tanto individuales, en combinaciones (dos cepas, tres cepas, cuatro cepas y cinco cepas) y en mezcla, es decir, las 6 cepas.

Introducción

El crisantemo es una de las especies ornamentales más cultivadas en todo el mundo, especialmente desde el punto de vista comercial (Rego *et al*., 2009). La gran popularidad de esta flor ornamental se debe a las diferentes formas y colores de su inflorescencia y al amplio rango de condiciones ambientales en donde es cultivable (Augustinova *et al*., 2016; Sanjaya *et al*., 2018; Kumar *et al*., 2017).

Además de ser la tercera flor de corte más importante a nivel internacional, después de la rosa (*Rosa* spp.) y el clavel (*Dianthus caryophyllus* L.). Es una planta herbácea, procedente del hemisferio norte y Asia oriental, que pertenece a la familia de las *Asteraceas* o compuestas, comúnmente se denominan margaritas, sus hojas pueden ser lobuladas o dentadas, lisas o rugosas, de color variable entre el verde claro y oscuro (Villanueva *et al*., 2010; Flores-Ruvalcaba *et al*., 2005; Kumar *et al*., 2017).

El crisantemo en general prefiere una tierra suelta con un buen contenido de materia orgánica, con un pH entre 5.5 a 6.5 unidades (Mixtega-Olin, 2007). Con una temperatura mínima entre los 6° y 8°C, y como máxima entre los 25° y 30°C (Janka *et al*., 2015).

Es una planta que florece en otoño, y por ello tiene la fama de ser la planta de los muertos; ya que justo en esa época está en plena floración.
El crisantemo responde al fotoperiodo, concretamente a días cortos, para la obtención de flores en cualquier época del año, es decir que, necesita luz y obscuridad por medios artificiales (Mixtega-Olin, 2007).

En la actualidad la contaminación de aguas freáticas, el aumento de gases de invernadero y la acumulación de sustancias tóxicas en la cadena trófica, son algunos de los graves problemas que se presentan por el uso indiscriminado de agroquímicos (Pazos-Rojas *et al*., 2016). Como alternativa para disminuir el uso de fertilizantes químicos se realizan investigaciones con las denominadas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (**PGPR** por sus siglas en inglés) (Camelo *et al*., 2011; León., 2014; Molina-Romero *et al*., 2015).

Estudios de las **PGPR** se han realizado desde hace muchos años, producto de estas investigaciones han sugerido que las bacterias fijadoras de nitrógeno son el grupo de microorganismos más importantes presentes en la rizósfera del suelo. Debido a que esta clase de bacterias pueden establecer relaciones muy específicas con las plantas y de esta manera evitar la competencia con toda la microflora presente en el suelo (Camelo *et al*., 2011; Lugtenberg y Kamilova, 2009).

El suelo es considerado un ecosistema dinámico y vivo en el que habitan diferentes organismos, tanto unicelulares como pluricelulares. En general todos los organismos que habitan el suelo son de gran importancia ecológica ya que son responsables del proceso de descomposición y transformación de la materia orgánica a sustancias que puedan ser asimilada por las plantas (Cuéllar-Gaviria, 2014).

Actualmente en la agricultura existe un amplio interés por el uso de estrategias que permitan incrementar el rendimiento en la producción de los cultivos. Siendo la biofertilización una alternativa que permita el uso de **PGPR**, las cuales ayudan a la planta en su proceso natural de nutrición y también se encargan de colonizar la

rizósfera; además de ser regeneradoras del suelo (Norberto-Silva, 2011; Baez-Rogelio *et al*., 2017).

El término rizósfera fue acuñado por primera vez por Hiltner en 1904 para referirse a la zona del suelo inmediatamente adyacente a las raíces de las leguminosas en donde existe alta actividad bacteriana (Molina-Romero et al., 2015). En la rizósfera existen muchas interacciones entre los microorganismos y la planta, las cuales pueden ser clasificadas como benéficas, saprofitas, simbióticas o patogénicas; dentro de los microorganismos que interactúan de forma benéfica con las plantas se encuentran las micorrizas, cianobacterias y bacterias. En el caso de bacterias, existen diversas cepas de varios géneros entre los que se encuentran *Pseudomonas, Azospirillum, Rhizobium, Bacillus,* entre otros. Estas cepas bacterianas han sido ampliamente usadas para la promoción de crecimiento y biocontrol de fitopatógenos (Cuéllar-Gaviria, 2014).

Desde hace varias décadas se vienen desarrollando estudios sobre cómo y porqué las **PGPR** cumplen con varias funciones, entre las cuales se destaca la fijación biológica de nitrógeno (**FBN**), la síntesis de fitohormonas, sinergismo con otros microorganismos benéficos para las plantas, inhibición de la producción de etileno por parte de las plantas y la solubilización de elementos como el fósforo, el cual es de vital importancia en el desarrollo de las células vegetales (Camelo *et al*., 2011; Vivanco-Calixto *et al*., 2016). Se conoce que la estimulación del crecimiento vegetal se desarrolla través de dos mecanismos fundamentales, uno directo y otro indirecto (Molina-Romero *et al*., 2016):

1. Estimulación directa: El metabolito producido por la bacteria es capaz de estimular el crecimiento del vegetal o bien sirve como nutrimento. A través

de este mecanismo se desarrollan procesos tales como: fijación de nitrógeno y la producción de fitohormonas.

2. Estimulación indirecta: es cuando la bacteria es capaz de liberar una o varias sustancias (antibióticos, sideróforos, bacteriocinas, etc.) que inhiben el crecimiento de patógenos o metabolitos que intervienen en procesos que inducen la respuesta de defensa de las plantas impidiendo el establecimiento de los microorganismos patógenos; como los hongos. (Bach-Álvarez *et al*., 2008).

Actualmente las **PGPR** son de suma importancia ya que favorecen el crecimiento de las raíces y los pelos radiculares; lo cual mejora la absorción de agua y de nutrientes del suelo produciendo un mejor desarrollo e incremento del tamaño global de las plantas (Caballero-Mellado., 2004). Se considera que la capacidad para colonizar las raíces es una condición indispensable para que una bacteria sea considerada como una verdadera **PGPR**, al mismo tiempo, esa capacidad contribuye a la selección de los inóculos microbianos para ser usados como biofertilizantes, biopesticidas, fitoestimuladores o biorremediadores (Lugtenberg *et al*., 2001; Lugtenberg y Kamilova, 2009).

Los biofertilizantes son preparados de uno o varios microorganismos aplicados a la semilla, suelo o planta con el fin de sustituir parcial o totalmente la fertilización sintética, así como disminuir la contaminación generada por los agroquímicos (Bashan, 1998).

Por lo consiguiente y teniendo en cuenta la versatilidad y beneficios que confiere el uso de biofertilizantes, una alternativa ecológicamente aceptable para aumentar el rendimiento de los cultivos es la inoculación con microorganismos promotores del crecimiento vegetal (biofertilizantes), ya que estos microorganismos tienen la

capacidad de mejorar la fertilidad del suelo (Norberto-Silva, 2011; Reyes-Ramírez *et al*., 2014; Baez-Rogelio *et al*., 2017). En general las **PGPR** incluyen un amplio rango de bacterias benéficas para las plantas, a continuación se ejemplifican algunas bacterias con estas características.

***Pseudomonas putida* (KT2440)**

Las bacterias del género *Pseudomonas* pertenecen a la subclase de las proteobacterias gamma (γ) y son bacilos aerobios Gram negativos, con flagelos polares.

Además, incrementan la absorción de nutrimentos, como N, P y K, y sirven como agentes de biocontrol de hongos fitopatógenos; producen fitohormonas en la rizósfera, lo cual promueve mayor crecimiento de las plantas (Díaz-Vargas *et al*., 2001).

Este género es conocido por su capacidad de degradar sustancias xenobióticas, tales como hidrocarburos alifáticos y aromáticos.

Pseudomonas KT2440 también es capaz de colonizar y sobrevivir en la rizósfera de una amplia variedad de plantas de cultivo como: el maíz, el trigo, la fresa, la caña de azúcar y la espinaca. Además, se está utilizando para desarrollar nuevos biopesticidas (Ramos *et al*., 2000; Timmis K. N., 2002). Esta bacteria promueve el crecimiento del maíz (Molina-Romero *et al*., 2017b), posiblemente mediante la inducción de la respuesta de defensa (Matilla et al., 2010).

Levadura MS22

Este microorganismo es capaz de ejercer un efecto benéfico en el crecimiento de las plantas (Morales-García, 2013).

Poco se sabe sobre la capacidad de las levaduras para promover el crecimiento de plantas, sin embargo, se ha reportado que *Williopsis saturnus* es capaz de

promover el crecimiento de maíz mediante la producción de ácido indol acético (Nassar *et al*., 2005). Otras levaduras ejercen biocontrol inhibiendo el crecimiento de hongos fitopatógenos (Khaled *et al*., 2006) y promueven el crecimiento de plantas; como ocurre para *Candida valida*, *Rhodotorula glutinis* y *Trichosporon asahii* en betabel (El-Tarabily, 2004). La levadura usada en este trabajo originalmente fue aislada de nódulo de trébol y por las características de crecimiento fue estudiada entre cepas de *Bradhyrhizobium* sp. (Corral-Lugo *et al*., 2012; Trujeque-Montiel, 2009; Molina-Romero *et al*., 2017), pero su 16S DNA ribosomal no pudo ser amplificado con los oligonucleótidos de rutina. En el laboratorio de Ecología y Supervivencia de Microorganismos recientemente se realizaron ensayos microscópicos con este microorganismo mostrándose que es una levadura (Vivanco-Calixto et al., comunicación personal) y en la actualidad esta cepa microbiana está en fase de caracterización molecular mediante su amplificación de la región intergénica ITS usado para varios hongos y levaduras (Munguía *et al*., 2011; Salazar-Cerezo *et al*., 2018). La levadura MS22 fue incluida en la formulación EMMIM-1 y los antecedentes muestran que es un microorganismo compatible con diversas plantas y un buen promotor de crecimiento (Morales-García, 2013; Juárez-Hernández, 2013; Hernández-Tenorio, 2014; Juárez-Hernández, 2015; Santiago-Saenz, 2014).

***Sphingomonas* sp. (OF178)**

El género *Sphingomonas* aloja bacterias estrictamente aeróbicas, quimioheterotrófas (usan la fuente de carbono como energía), son Gram negativas, en forma de bacilos, generalmente pigmentadas de color amarillo. Pertenecen al subgrupo α-4 de las Proteobacterias.

Las bacterias del genero *Sphingomona*s se encuentran distribuidas en el suelo, el agua y en los sedimentos, se sabe que tienen la capacidad de degradar

hidrocarburos poliaromáticos y precipitar uranio (Alducin-Ruiz J., 2015; Basta *et al*., 2004). *Sphingomonas* sp. OF178 fue aislada de suelo contaminado con lindano (Böltner *et al*., 2008), esta cepa bacteriana es capaz de colonizar y estimular el crecimiento de maíz y cactus (Morales-García, 2013; Alatorre-Cruz, 2013).

***Burkholderia unamae* (MTl-641^T)**

Son bacterias Gram negativas, fijadoras de nitrógeno, involucradas en procesos de biorremediación de compuestos aromáticos, en la promoción del crecimiento de las plantas, en la solubilización de fosfatos y la producción de sideróforos (Caballero-Mellado *et al*., 2007; Bolívar-Anillo *et al*., 2016). *Burkholderia unamae* MTl-641 tiene un potencial alto para degradar compuestos aromáticos (Caballero-Mellado *et al*., 2007) y es altamente tolerante a desecación (Pazos-Rojas *et al*., 2018), por lo que podría usarse para procesos de bioaugmentación aun en sitios donde hay escasez de agua.

***Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAI 5^T)**

Son bacterias Gram negativas, originalmente aisladas de la caña de azúcar, son endófitas, además se ha comprobado que son capaces de fijar cantidades considerables de nitrógeno y producir sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal, fundamentalmente ácido indol acético (Rodríguez-Andrade et al., 2015; Rojas et al., 2015).

La solubilización de nutrientes minerales como fosfato, zinc, hierro y manganeso también podría contribuir a la estimulación del crecimiento vegetal por parte del género *Gluconacetobacter*, al igual que su efecto antagonista, el que ha sido demostrado frente a diferentes organismos fitopatógenos (Saravanan *et al*., 2006; Rojas *et al*., 2007; Ríos-Rocafull *et al*., 2016).

***Azospirillum brasilense* (Sp7)**

Son bacterias Gram negativas, fijadoras de nitrógeno, son móviles, en forma de espirales, con flagelos polares en medios líquidos y cilios laterales en medios sólidos, además promueven el crecimiento de las plantas, reducen el nitrato, producen fitohormonas tales como auxinas, giberelinas y citoquininas. Pueden colonizar la rizósfera principalmente de cereales, por ejemplo: maíz, trigo, arroz y sorgo, lo cual favorece a la absorción de nutrientes (Cassán *et al*., 2008; Assmus *et al*., 1995; Parra *et al*., 2001).

Microorganismos solubilizadores de fosfatos

Entre los microorganismos solubilizadores de fosfato (**MSP**), se encuentran las bacterias promotoras del crecimiento vegetal o **PGRP**. Estas bacterias son de vida libre en el suelo y son capaces de adaptarse, colonizar y persistir en la rizósfera de la planta y favorecer el crecimiento y desarrollo de las mismas (Lugtemberg y Kamilova, 2009). Las rizobacterias, además, pueden ser antagónicas de fitopatógenos y beneficiar a las plantas (Goswami *et al*., 2016; Molina-Romero *et al*., 2015). Otra de las cualidades benéficas es la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular ya que se ha descrito como un mecanismo de solubilización del fosfato del suelo. La presencia de estos ácidos hace al fosfato (**P**) disponible para la absorción por parte de las plantas. La producción de ácidos orgánicos tiene acción directa en la acidificación, quelación, precipitación y en las reacciones de óxido reducción en las rizósfera (Paredes-Mendoza *et al*., 2010). Sin embargo, este no es el único mecanismo para dejar fósforo biodisponible para las plantas (Molina-Romero *et al*., 2015).

Las bacterias solubilizadoras de fosfato transforman los fosfatos insolubles (**Pi**), a formas solubles por la acción de diferentes procesos microbianos involucrados en la solubilización de **P**, entre los que destacan: la acción de ácidos orgánicos producidos por microorganismos y la acción enzimática (Khan et al., 2007). La quelación de elementos responsables de la insolubilidad de fosfatos presentes y la asimilación directa de fosfatos insolubles por microorganismos que los acumulan en sus células y los liberan posteriormente son mecanismos alternativos para utilizar fosforo insoluble (Restrepo-Franco *et al*., 2015).

Algunas PGPR solubilizan fosfatos a partir de fuentes orgánicas e inorgánicas; involucrando el uso de fosfatasas no específicas, C-P liasas, fosfatasas y fitasas (Lugtemberg y Kamilova, 2009; Molina-Romero *et al*., 2015). Por otro lado, la liberación de ácidos orgánicos por diferentes bacterias podría quelar el fósforo, haciéndolo biodisponible para las plantas (Aeron et al., 2011; Vyas y Gulati, 2009). Las bacterias con la capacidad de solubilizar fosfatos son diversas y algunos ejemplos son: *Pseudomonas putida*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Enterobacter agglomerans* y *Rhizobium leguminosarum* (Molina-Romero et al. 2015, 2017a; Rodríguez et al., 2006). Además de las enzimas y los ácidos orgánicos de origen bacteriano, otros mecanismos de solubilización de fosfatos incluyen ácidos inorgánicos producidos por microorganismos quimioautótrofos y la liberación de H^+ observada en *Penicillum rugulosum* (Khan et al., 2014).

ANTECEDENTES

La inoculación de bacterias benéficas en diversos tipos de plantas se ha experimentado frecuentemente con resultados positivos a lo largo de estos últimos años, a continuación mostramos algunos ejemplos:

- Norberto-Silva (2011), evaluó la respuesta de las plantas de Nochebuena ante la inoculación con tres cepas de *Pseudomonas putida*, bajo condiciones de invernadero, con fertilización química reducida a la mitad. En su trabajo utilizó esquejes enraizados, adquiridos de viveros; los trasplanto en macetas con suelo preparado y a los 15 días después del trasplante inoculó con caldo bacteriano aplicándolo en el sistema radical de la plántula. Se observó que las cepas de la especie *Pseudomonas putida*, promovieron el crecimiento y desarrollo del cultivo.

  Mostrando así que el uso de biofertilizantes elaborados con microorganismos benéficos como las rizobacterias *P. putida* resulta una alternativa esencial para la disminución de los fertilizantes químicos.

- Díaz-Vargas y Colaboradores (2001), evaluaron el efecto promotor de 30 cepas bacterianas en el proceso de germinación de la lechuga, bajo condiciones de laboratorio e invernadero.

  Se observó que de las 30 cepas estudiadas la mayoría tuvo efectos benéficos para dicho cultivo; destacando que la cepa *Hafnia alvei*, promovió el mayor porcentaje de germinación.

  La cepa R1B (No identificada), estimuló el desarrollo del área foliar, peso fresco y seco, así como el volumen radical del cultivo.

  La cepa *Azospirillum brasilense* y *P. aeruginosa* mostraron efectos promotores del crecimiento, tanto en germinación como en el desarrollo vegetativo del cultivo de lechuga.

- Reyes-Ramírez y Colaboradores (2014), evaluaron el efecto de tres inoculantes microbianos en el crecimiento del chile habanero en condiciones de invernadero; los tratamientos que utilizaron fueron a base

las cepas*: Rhizophagus irregularis, Pseudomonas* spp., *Azospirillum brasilense* y el grupo testigo.

No se observaron diferencias significativas a los 30 y 60 días en la altura de la planta y diámetro del tallo, pero a los 120 días registraron diferencias en las plantas inoculadas con *Pseudomonas* spp. en comparación con los demás tratamientos.

Respecto a los resultados de la biomasa de raíz y tallo, encontraron diferencias con *Pseudomonas* spp. en comparación con el testigo, pero no con los otros tratamientos (*R. irregularis y A. brasilense*).

Para la biomasa de las flores y frutos, encontraron diferencias con *Pseudomonas* spp. en comparación con los otros tratamientos. Resultando evidente para los investigadores un efecto positivo en el crecimiento de las plantas inoculadas con *Pseudomonas* spp. después de 120 días.

- Cuéllar-Gaviria (2014), realizó experimentos para determinar la capacidad de promoción de crecimiento del *Bacillus subtilis* EA-CB0575 en el cultivo de crisantemo; con 3 bioformulados.

  Se observó que la aplicación de la bacteria *Bacillus subtilis* en plantas de crisantemo, promovió el crecimiento bajo las diferentes condiciones exploradas.

- Estrada y colaboradores (2013), en sus investigaciones con cepas diazotróficas solubilizadoras de fosfato y su efecto sobre el rendimiento de cultivos de arroz, aislaron 49 cepas bacterianas, fijadoras de nitrógeno. A las cuales examinaron para identificar su capacidad solubilizadora de fosfato inorgánico *in vitro*. Se observó que las cepas con características similares a los géneros de *B. unamae* y *Herbaspirillum* tienen capacidad

solubilizadora de fosfatos y también tienen la capacidad para promover el crecimiento, así como la absorción de nutrientes en plantas de arroz cultivadas en presencia de fosfato tricálcico.

- Sánchez y colaboradores (2012), utilizaron cepas de *P. putida, P. fluorescens, Bacillus* sp y *Enterobacter* sp, para cuantificar la actividad solubilizadora de fosfato de las cepas observando que el género de *Enterobacter* mostró los mejores resultados de solubilización en comparación con las demás y que además el fosfato tricálcico es 10 veces más soluble que la roca fosfórica.

- Li Yongbin y colaboradores (2017), aislaron 6 especies bacterianas correspondientes a los géneros *Pseudomonas*, *Sphingomonas* y *Paenibacillus*. En sus análisis de solubilización de fosfato encontraron que *Pseudomonas* posee el índice de solubilización mayor respecto a las demás; encontrando que tienen la capacidad para colonizar la rizósfera del maíz, a excepción de *Sphingomonas* que no evidenció indicios de crecimiento en las plantas, más sin embargo lleva a cabo la solubilización de fosfato y produce AIA, lo cual la hace ser un microorganismo beneficioso para la planta.

A pesar de que bajo condiciones de laboratorio e invernadero se observan efectos positivos en la promoción de crecimiento de las plantas, estos no se observan bajo condiciones de campo con la misma frecuencia (Vivanco-Calixto et al., 2016). La bacteria con mayores casos de éxito reportada es *Azospirillum brasilense* y solo se ha encontrado ser exitosa en un 70% de casos bajo condiciones de campo (Molina-Romero *et al*., 2015). Se propone que las

inoculaciones con mezclas de bacterias compatibles y tolerantes a la desecación podrían ser más exitosos que los monoinoculantes (Morales-García, 2013; Alatorre-Cruz, 2013; Molina-Romero, 2017), en un concepto denominado como inoculantes de segunda generación (Vivanco-Calixto *et al*., 2016).

En el laboratorio de Ecología y Supervivencia de Microorganismos de han diseñado varios inoculantes de segunda generación, pero el primero se basó en encontrar bacterias compatibles, entre sí, a pesar de producir sustancias inhibitorias contra otros microorganismos (Morales-García, 2013). Aunque en principio el inoculante fue explorado para promover el crecimiento de maíz, hoy se sabe que promueve el crecimiento de otras plantas de interés agrícola como la papa, el jitomate, el frijol, el arroz y el haba (Muñoz-Rojas et al., 2016; Morales-García, 2013; Hernández-Tenorio, 2014; Santiago-Saenz, 2014; Juárez-Hernández, 2013; Juárez-Hernández, 2015). El interés de los agricultores para conocer si esta formulación podría incrementar el rendimiento de los cultivos los ha estimulado para explorar de forma empírica este producto en alrededor de 5000 hectáreas (Muñoz-Rojas, comunicación personal) y han reportado resultados exitosos, por lo que se muestra un potencial enorme para los inoculantes de segunda generación.

JUSTIFICACIÓN

El valor ecológico de las plantas es imprescindible, pues cumplen funciones básicas sin las cuales el resto de los seres vivos no se podría reproducir correctamente. Con respecto a la atmósfera del planeta, las plantas sirven de filtro para la contaminación ambiental, regulan la temperatura, generan oxígeno, y por consiguiente, reducen el calentamiento global, son fertilizantes naturales para el suelo y conjuntamente, para el resto de los seres vivos son una parte primaria de la cadena alimentaria.

Además, se debe destacar el valor socioeconómico que tienen las plantas para los seres humanos, ya que podemos extraer de ellas numerosos productos como materias primas, alimentos, o sustancias orgánicas y medicinales. El caso particular de plantas ornamentales cumplen una función decorativa para hacer sentir bien los ambientes de los hogares y contribuyen al bienestar de las personas.

A pesar de la importancia de la floricultura para la economía nacional, es considerada una actividad agrícola altamente contaminante debido al uso excesivo de fertilizantes y pesticidas químicos. Adicionalmente, el uso excesivo de fertilizantes químicos está relacionado no sólo con la obtención de altas productividades, sino también con las prácticas agrícolas inapropiadas, y es común encontrar que se emplean altas cantidades de fertilizantes que no son aprovechadas por las plantas.

Teniendo en cuenta estas observaciones y debido a las exigencias del mercado de flores en el mundo, se hace evidente la necesidad por la implementación de alternativas sostenibles en el cultivo de flores. La implementación del uso de un inoculante multi-especies en el cultivo de *Chrysanthemum* spp. Podría ser una

alternativa amigable con el medio ambiente; reduciendo así uso de fertilizantes y los efectos contaminantes al medio ambiente; además el inoculante multi-especies EMMIM-1 posee la capacidad de promover el crecimiento vegetal en otras plantas y podría ser una buena alternativa para potenciar el crecimiento de plantas ornamentales.

Por otro lado, la aplicación constante de insumos químicos en los ecosistemas, la calidad del suelo y del agua se ha visto afectada; una alternativa ante estas afectaciones para mantener el equilibrio de los ecosistemas es el uso de microorganismos solubilizadores de fosfato mejor conocidos como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (**PGPR**).

Con el uso de estos microorganismos se obtiene un buen crecimiento, desarrollo y productividad de los cultivos, además de prevenir daños irreversibles al medio ambiente. Ya que estos microorganismos benefician a las plantas mediante un amplio rango de mecanismos como solubilización de fosfato, disminución de los niveles de etileno en plantas, fijación de nitrógeno atmosférico, biocontrol de enfermedades de las plantas y producción de fitohormonas, sideróforos y ácidos orgánicos.

No se conocen los mecanismos por los cuales la formulación EMMIM-1 estimula el crecimiento de las plantas, pero la solubilización de fosfatos podría ser unos de los mecanismos implicados, por esta razón en este trabajo de tesis se propuso explorar este mecanismo entre las cepas implicadas.

HIPÓTESIS

El inoculante multi-especies EMMIM-1 tendrá un efecto benéfico en el crecimiento del *Chrysanthemum* sp., con respecto a las plantas control.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto del inoculante multi-especies EMMIM-1, en el crecimiento del *Chrysanthemum* sp.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la altura de las plantas del *Chrysanthemum* sp., inoculadas con el inoculante multi-especies EMMIM-1 y no inoculadas.
- Evaluar el diámetro del tallo del *Chrysanthemum* sp., de ambos tratamientos (inoculados y no inoculados).
- Determinar el peso fresco y seco tanto aéreo como de la raíz en las plantas de *Chrysanthemum* sp., (inoculadas y no inoculadas).
- Evaluar el diámetro del halo de inhibición de fosfato de las cepas microbianas en combinaciones (pares, tercios, cuartos, quintos), individuales y las seis en conjunto (mezcla).

MATERIAL Y MÉTODOS

Experimento I: Estimulación del crecimiento de la flor crisantemo por la formulación multi-especies EMMIM-1.

Para la realización del experimento se utilizaron 20 macetas con 5 plantas cada una (las cuales fueron adquiridas de un vivero) dichas macetas de plantas se colocaron en unas charolas pequeñas y se distribuyeron aleatoriamente, usando 10 macetas para el grupo 1 (control); las cuales se regaron con 100 ml de agua destilada, y 10 macetas para el grupo 2 (inoculadas), las cuales se regaron con 100 ml del inoculante multi-especies (EMMIM-1).

A cada planta de cada maceta se le tomaron los siguientes datos: altura de la planta y diámetro del tallo, en acuerdo con Norberto-Silva M. I., 2011.

Para la determinación de la altura de la planta se tomó como referencia la base formada entre el tallo y la raíz, ligeramente por encima del sustrato hasta el punto distal de crecimiento de la planta; para tal actividad se utilizó una regla cuya unidad de medida fue en cm.

La evaluación del diámetro del tallo se determinó tomando como referencia dos centímetros arriba de la superficie del soporte y se procedió a medirlo con la ayuda de un vernier.

Los datos (altura de la planta y diámetro del tallo) fueron tomados al inicio del experimento y después esos mismos datos fueron registrados mensualmente durante un periodo de ocho meses; las plantas de *Chrysanthemum* sp., fueron

colocadas en una cámara de plantas. Dichas plantas fueron regadas dos veces por semana, con 100 ml de agua destilada.
Se hizo una segunda inoculación para las plantas, en la donde se utilizaron solo 50 ml, del inoculante multi-especies EMMIM-1 y 50 ml de agua destilada, agregando primero el inoculante por encima del soporte, pero muy junto al tallo de la planta y después el agua destilada.

Previo a realizar cada inoculación se llevó acabo el conteo de las unidades formadoras de colonias por ml (**UFC**/ml) de las cepas microbianas que conforman el inoculante utilizado, con el fin de ver el estado de viabilidad de dichas cepas, el conteo se realizó mediante diluciones seriadas usando el método de goteo en placa (Hoben *et al*., 1982). Se realizaron diluciones seriadas en factor 1:10, posteriormente se hizo el goteo en las placas colocando 20 µl de la dilución y se incubaron a 30°C, posteriormente se realizó el conteo de las colinas, el cual se llevó a cabo de acuerdo el periodo de crecimiento para cada cepa.

Tras pasarlos los ocho meses, las plantas de *Chrysanthemum* sp., se sacaron de la cámara de plantas y se procedió a retirar las plántulas de dichas macetas, tratando de retirar lo mejor posible el sustrato de la raíz; una vez realizada dicha actividad con ayuda de unas tijeras se retiró la raíz del tallo de las plantas, después con ayuda de una balanza analítica se tomó el peso fresco de ambas partes, para los dos grupos (control e inoculado); para la obtención del peso seco las plantas fueron colocadas en bolsas de papel, rotuladas, estas se colocaron en una estufa de secado, ahí se dejaron cuatro días a una temperatura de 75°C (Norberto-Silva, 2011).

Para la evaluación estadística de los datos obtenidos se utilizó el software estadístico Minitab18, a los cuales se les evaluó mediante una *t* de Student.

Las variables evaluadas fueron: altura de la planta, diámetro del tallo, peso fresco y seco (aéreo y de la raíz).

Experimento II: Solubilización de fosfatos.

Para realizar dicho experimento, se utilizaron las 6 cepas microbianas que conforman el inoculante multi-especies EMMIM-1. Proporcionadas del Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana.

Se llevó a cabo la resiembra de las cepas microbianas en su medio de selección correspondiente y se dejaron en incubación a 30°C, para su crecimiento (Tabla 1).

Cepas	Medios de selección	Tiempo de incubación (horas)
***Pseudomonas putida* (KT2440)**	LB	24
Levadura (MS22)	LB + azul de bromotimol	24
***Sphingomonas* sp. (OF178)**	LB 5%	24
***Burkholderia unamae* (MTI-641^{T})**	BAc	24
***Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAI 5^{T})**	LGI	48
***Azospirillum brasilense* (Sp7)**	Rojo Congo	48

Tabla 1. Cepas microbianas, medios de selección sólido y tiempo de crecimiento para cada una de ellas.

Para la nutrición de las cepas se utilizó el medio de cultivo nutritivo liquido King B, el cual favorece la producción de metabolitos en las bacterias (Trujillo *et al*., 2007). Este medio se colocó en tubos Falcón de 15 ml, agregando a cada tubo un

volumen de entre 6 y 7 ml del medio, una vez esterilizado el medio, se resembraron las 6 cepas de microbianas en el medio King B. Con ayuda de un asa bacteriológica, se tomó una colonia aislada de la cepa. Primero fueron sembradas las cepas que crecen en 48 horas, pasadas 24 horas se sembraron las bacterias faltantes (las de crecimiento en 24 horas).

Para la determinación de solubilización de fosfatos se preparó un medio de cultivo sólido **NBRIP** (National Botanical Research Institute Phosphate; Tejera-Hernández *et al*., 2013), usando como única fuente de fosfato roca fosfórica (**RF**), al cual se le agregó azul de bromotimol como indicador de pH, este medio sólido fue preparado en cajas Petri de 100x15 mm.

Se realizaron diferentes combinaciones entre las cepas cultivadas, pero también se evaluaron individualmente y en mezcla, es decir, las 6 cepas (Tabla 2).

Combinación de cepas	No. total de combinaciones	Volumen (µl) por cada cepa
Dos	15	500 c/u
Tres	20	335 c/u
Cuatro	15	250 c/u
Cinco	6	200 c/u
Individuales	6	1000 c/u
Mezcla 6 cepas	1	170 c/u
Control (testigo)	1	1000 µl H_2O destilada estéril

Tabla 2. Se muestra el número de combinaciones totales por cada combinación y volumen utilizado de cada cepa.

Para saber el número total de combinaciones se realizó el cálculo mediante la fórmula:

$$nCr = \frac{n!}{(n-r)!r!}$$

Dónde:

n = número total de objetos

r = combinaciones de r objetos (cambia de acuerdo con el número de objetos que se quiera combinar.

Antes de hacer las combinaciones se realizó un lavado de las 6 cepas para quitar en lo mayor posible cualquier otro factor que pudiera influir en la solubilización de fosfatos. Una vez realizado el lavado, se hizo un conteo de las **UFC**/ml mediante el método de goteo en placa (Hoben *et al*., 1982), para comprobar la viabilidad de las cepas.

Para hacer las diferentes combinaciones se utilizaron 64 tubos Eppendorf estériles, primero se inició con las combinaciones en pares seguidamente las de tercios y así sucesivamente hasta terminar con todas.

A cada tubo Eppendorf se le agregó la cantidad de volumen de cada cepa como se muestra en la tabla 2, obteniendo un volumen total de 1000 µl aproximadamente por cada combinación. Después de tener las combinaciones listas éstas se mezclaron bien con ayuda de un vórtex.

Luego se pasó a la inoculación del medio **NBRIP**, depositando una gota de 10 µl de la muestra correspondiente a cada combinación, se realizaron por triplicado en

una misma caja Petri (dividida en tres partes iguales); se incubaron durante un periodo de 72 horas.
Se midió el diámetro del halo a las 24, 48 y 72 horas (Ríos-Rocafull *et al*., 2016), de las diferentes combinaciones y de las cepas individuales y en mezcla.

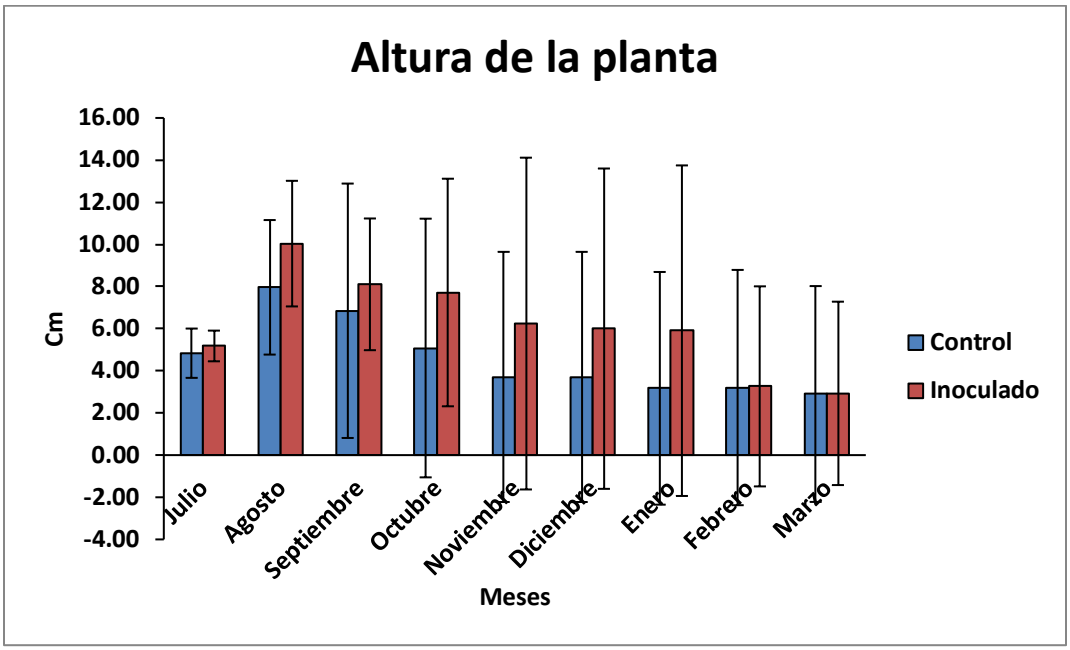
Finalmente, los resultados obtenidos en cada una de las combinaciones realizadas se promediaron con el programa Microsoft Excel 2010 corrido sobre Windows 7, también se utilizó el mismo programa para obtener el cálculo de las desviaciones estándar de las medias y así mismo las gráficas correspondientes.

RESULTADOS

Estimulación del crecimiento de la flor “crisantemo” (*Chrysanthemum* sp.), por la formulación multi-especies EMMIM-1.

Altura de las plantas

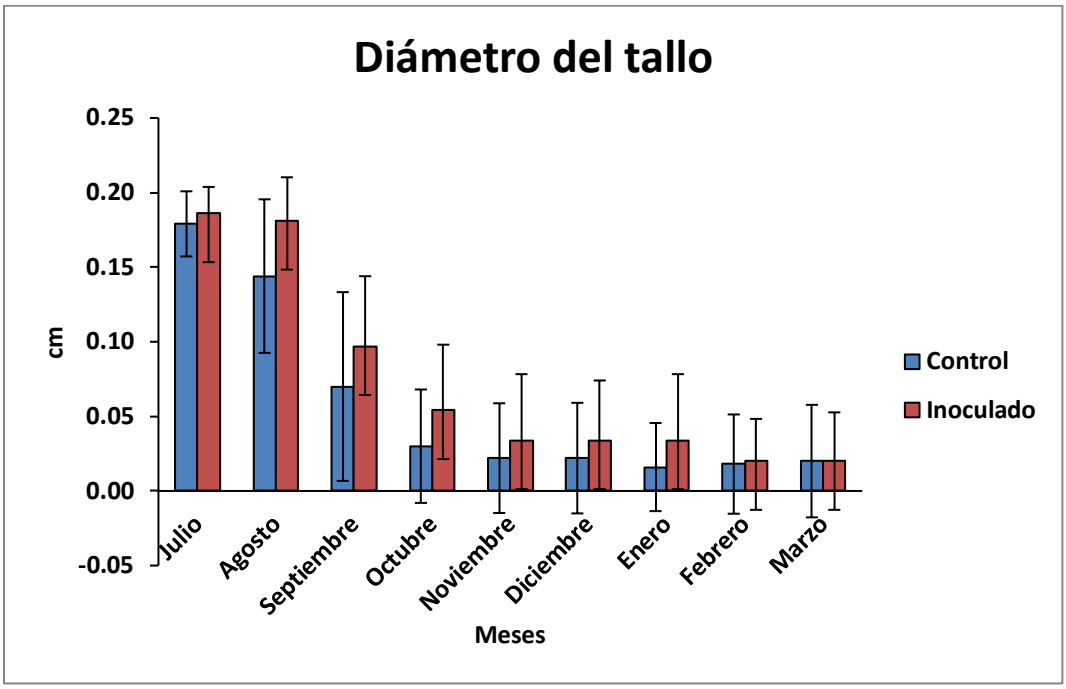
Los resultados obtenidos en la inoculación de las plantas de crisantemo con la formulación multi-especies EMMIM-1, se observó que las plantas inoculadas tuvieron una altura mayor en comparación con las del grupo testigo, pero estadísticamente no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos.
Además la desviación estándar aumentó a medida que transcurrieron los meses, esto debido a que las macetas de plantas de crisantemo fueron adquiridas en un invernadero de Atlixco, lo cual influyó en los resultados obtenidos debido a que las plantas se tuvieron que adaptar a las nuevas condiciones climáticas de la cámara de plantas en la cual fueron colocadas para su estudio. No todas las plantas llegaron al final del experimento, con forme paso el tiempo se comenzaron a marchitar y posteriormente a secarse; hasta el mes de marzo que fue el último mes de evaluación de la altura de las plantas quedaron cuatro macetas de plantas para el tratamiento EMMIM-1, y tres macetas de plantas para el tratamiento testigo. Gráfica 1 y tabla 3.



Gráfica 1. Cada barra muestra el promedio de la altura de la planta crisantemo al inicio de la inoculación (julio-tiempo cero) y meses posteriores a la inoculación. No existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Diámetro del tallo:

Los resultados obtenidos para el diámetro del tallo de las plantas de crisantemo, mostraron un diámetro gráficamente mayor las plantas inoculadas con la formulación multi-especies EMMIM-1, pero al hacer el análisis estadístico con *t* de Student no se registró ninguna diferencia significativa entre los tratamientos. Por otro lado, el gráfico de los diferentes promedios del diámetro del tallo a lo largo de los diferentes meses evaluados, no mostró un crecimiento lineal, debido a que las macetas de plantas fueron adquiridas en un invernadero de Atlixco, y al ser sometidas a la cámara de plantas, estas se tuvieron que adaptar a sus nuevas condiciones climáticas, dado esto no todas las plantas sobrevivieron (Gráfica 2).

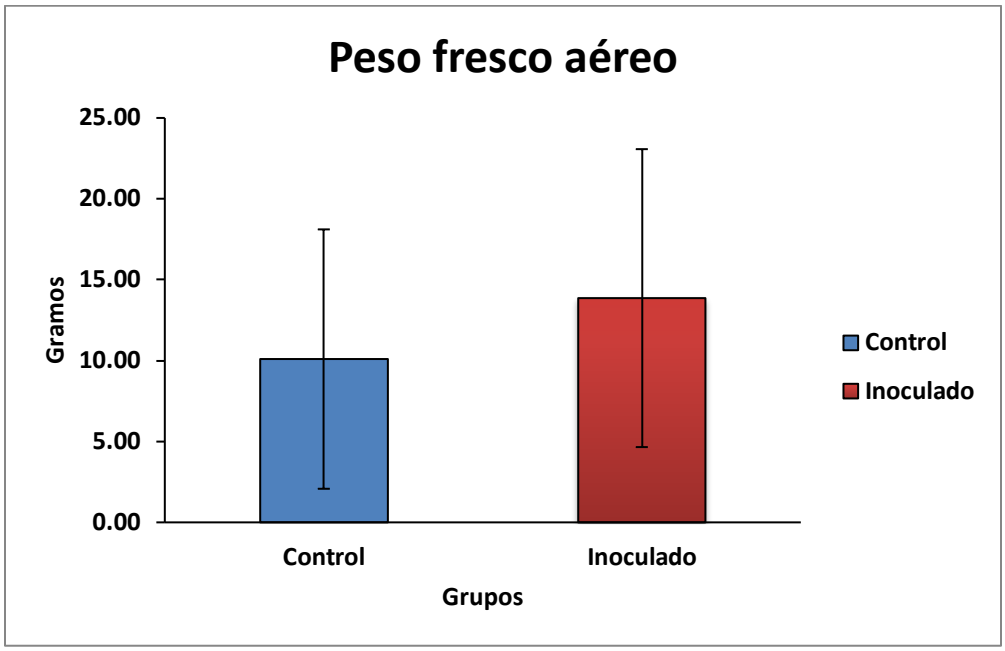


Gráfica 2. Muestra el diámetro del tallo del crisantemo al inicio de la inoculación (julio-tiempo cero) y meses posteriores a la inoculación, donde cada barra muestra la media de las plantas. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.

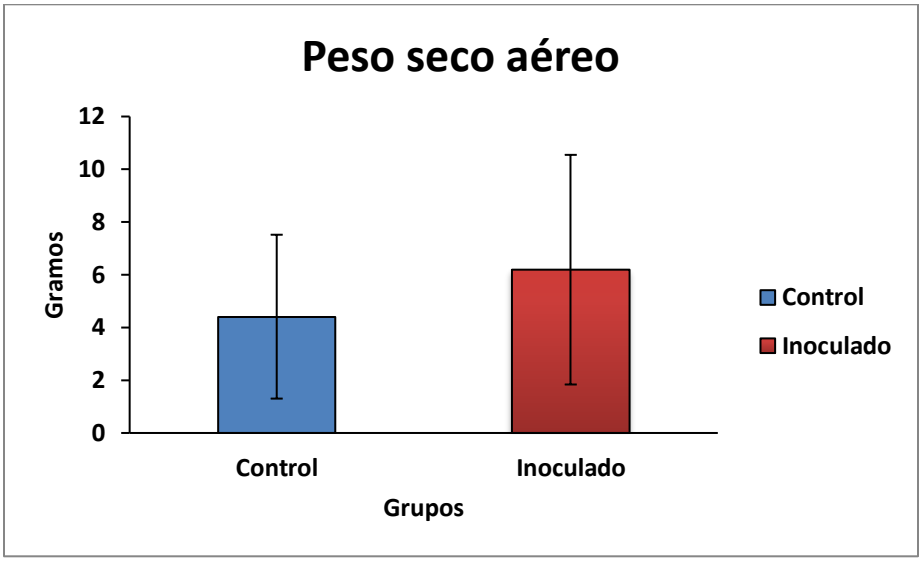
Peso fresco y seco aéreo:

Para evaluar estos resultados se llevó a cabo el secado de las plantas, para ello se separó la raíz del tallo, colocándolos en sobres de papel, cada una rotulado de manera correspondiente. El secado se realizó durante cuatro días con ayuda de una estufa de secado con una temperatura de 75°C.

Los pesos registrados fueron evaluados estadísticamente mediante una *t* de Student, para lo cual no se encontraron diferencias estadísticas significativas para peso fresco entre el tratamiento testigo y el tratamiento EMMIM-1 (Gráfica 3). De igual manera al hacer el análisis de los pesos secos aéreos no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (Gráfica 4).



Gráfica 3. Cada barra muestra el promedio del peso fresco final de las plantas de crisantemo en cada tratamiento. No se encontraron diferencias significativas.

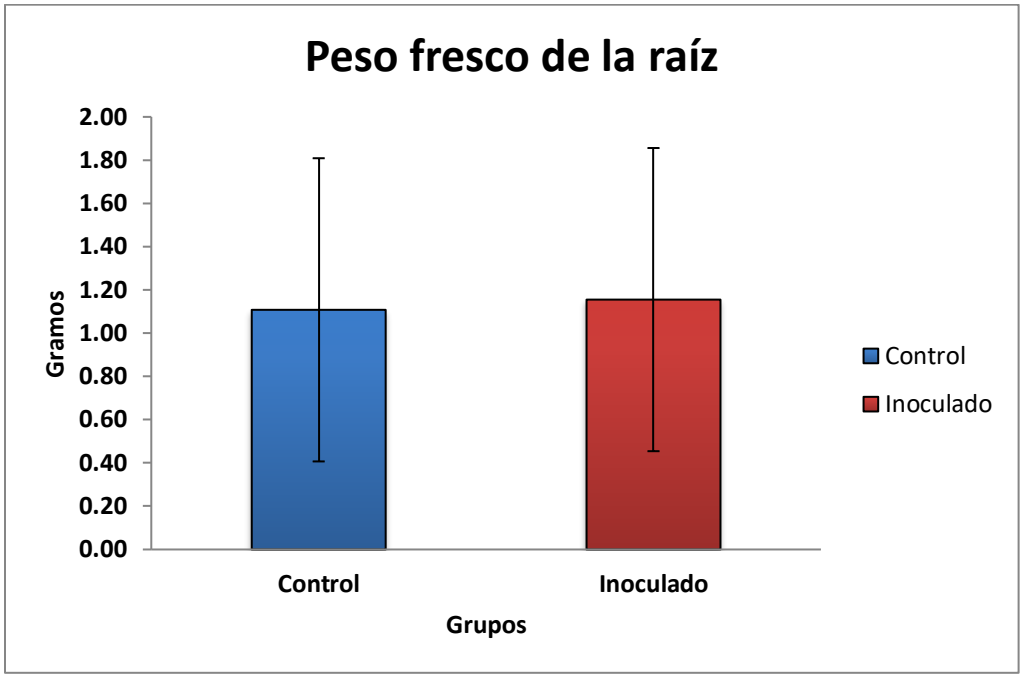


Grafica 4. Cada barra muestra el peso seco aéreo final de las plantas de crisantemo en cada tratamiento. No se encontraron diferencias significativas.

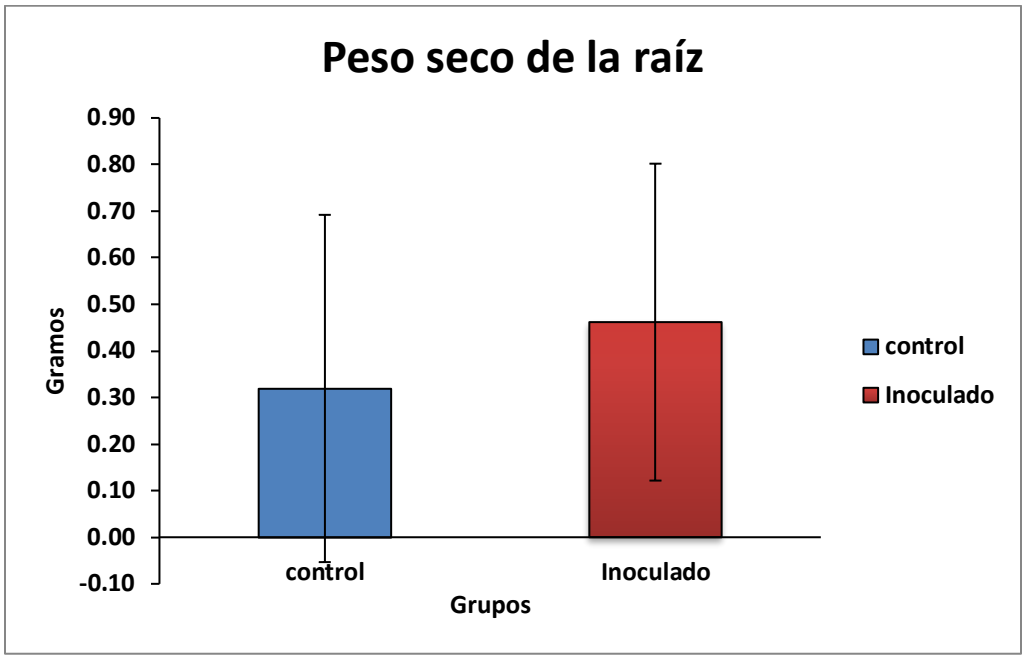
Peso freso y seco de la raíz

En los resultados obtenidos, gráficamente se observó que los pesos frescos de la raíz de las plantas inoculadas obtuvieron un promedio mayor en comparación con el peso fresco de las plantas del grupo testigo (Gráfica 5). Lo mismo ocurrió con el peso seco, las plantas inoculadas presentaron gráficamente un promedio mayor en comparación con el peso seco de las plantas del grupo testigo (Gráfica 6).

Al realizar el análisis estadístico, este mostró que no existen diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, tanto para peso fresco y seco de la raíz.



Gráfica 5. Cada barra muestra el promedio del peso fresco de la raíz de las plantas de crisantemo en cada tratamiento. No existen diferencias estadísticas significativas.



Gráfica 6. Cada barra de esta grafica muestra el promedio del peso seco de la raíz. No existen diferencias significativas entre los tratamientos.

	Tratamientos	
Meses	**Control**	**Inoculado**
Julio		
Agosto		

Septiembre		
Octubre		
Noviembre		

Diciembre		
Enero		
Febrero		

Tabla 3. Muestra el desarrollo mensual de las plantas “crisantemo” desde el inicio de su tratamiento hasta el final del mismo, observando que no todas las plantas llegaron al final del experimento.

Solubilización de fosfatos

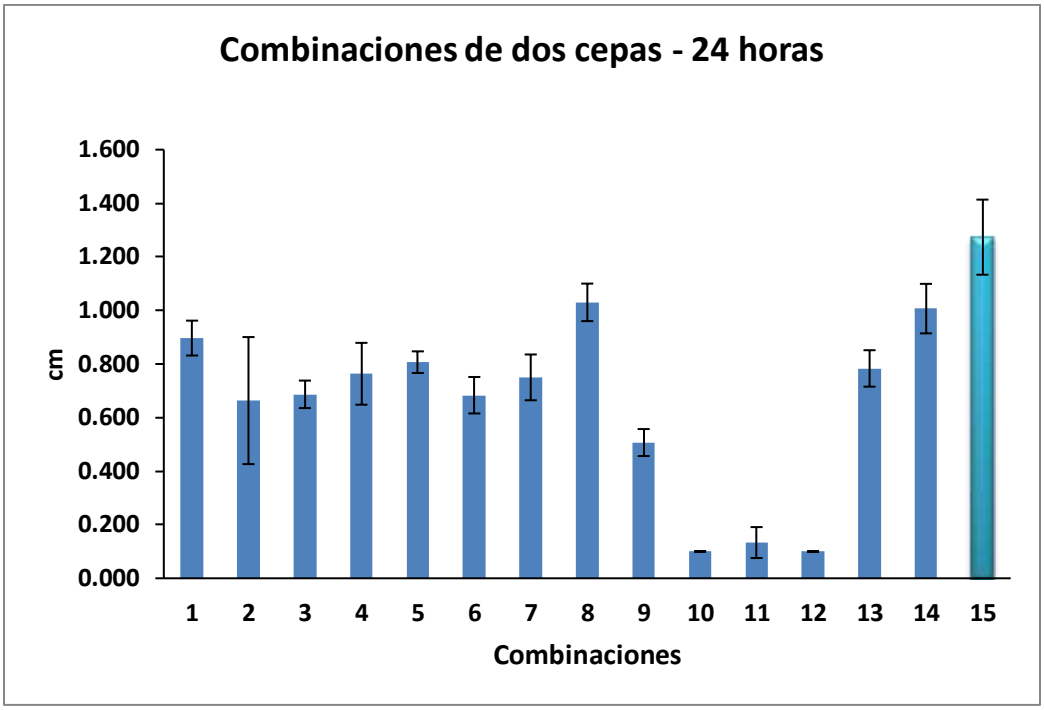
Combinaciones de dos cepas

Después de hacer la inoculación de las combinaciones pares en el medio NBRIP, se dejaron incubar a una temperatura de 30°C, durante un tiempo de 72 horas.
La toma de datos se realizó a las 24, 48 y 72 horas. En donde se midió el diámetro del halo de solubilización de las tres réplicas de las diferentes combinaciones realizadas, tabla 4. Registrando gráficamente a las 24 horas diferencias entre los diámetros del halo de solubilización de las combinaciones pares, destacando que la combinación número 15 formada por las cepas bacterianas *Gluconacetobacter diazotrophicus* y *Azospirillum brasilense*, tuvo un promedio mayor en comparación con las demás combinaciones. Además, los resultados encontrados mostraron que las combinaciones de dos cepas resultan favorables, ya que todas las combinaciones son solubilizadoras de fosfato (Gráfica 7).

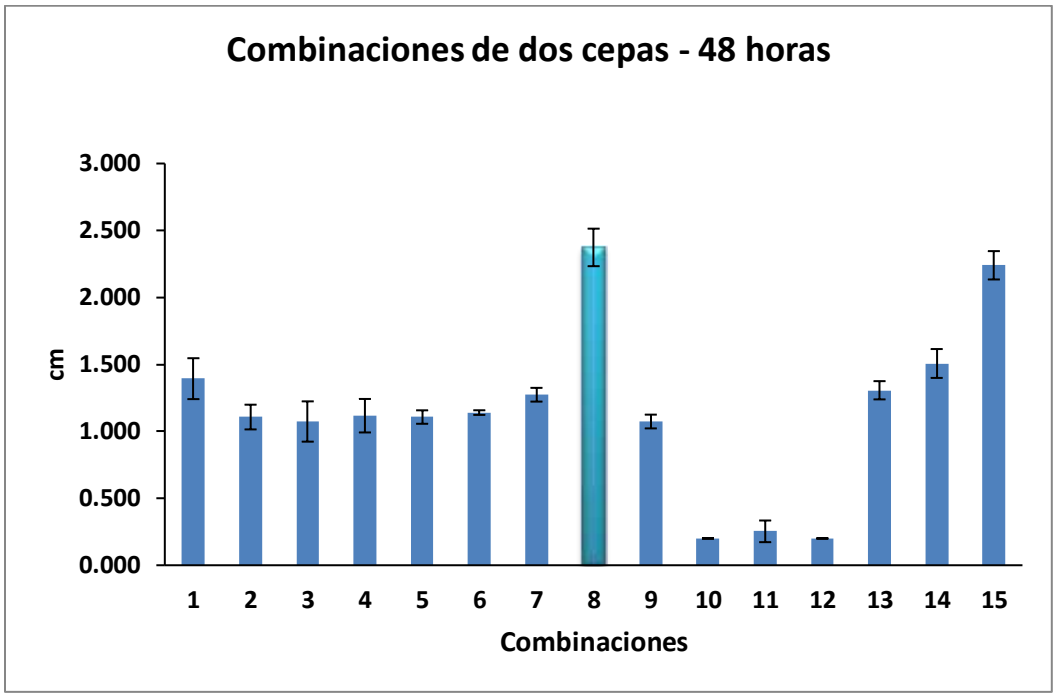
Los resultados observados y evaluados a las 48 horas gráficamente mostraron que las combinaciones poseen diferencia en el promedio de su diámetro del halo de solubilización, en estos resultados se determinó gráficamente que la combinación número 8 formada por las cepas, Levadura MS22 y *G. diazotrophicus* es la que predominó en cuanto al diámetro de su halo de solubilización en comparación con las demás cepas (Gráfica 8).

Los resultados registrados a las 72 horas mostraron un aumento considerado en el diámetro de los halos de solubilización de las combinaciones de las diferentes cepas. Debido a su rápido crecimiento y desarrollo del halo de solubilización de las diferentes combinaciones, hasta este periodo de tiempo 72 horas, ya no fue

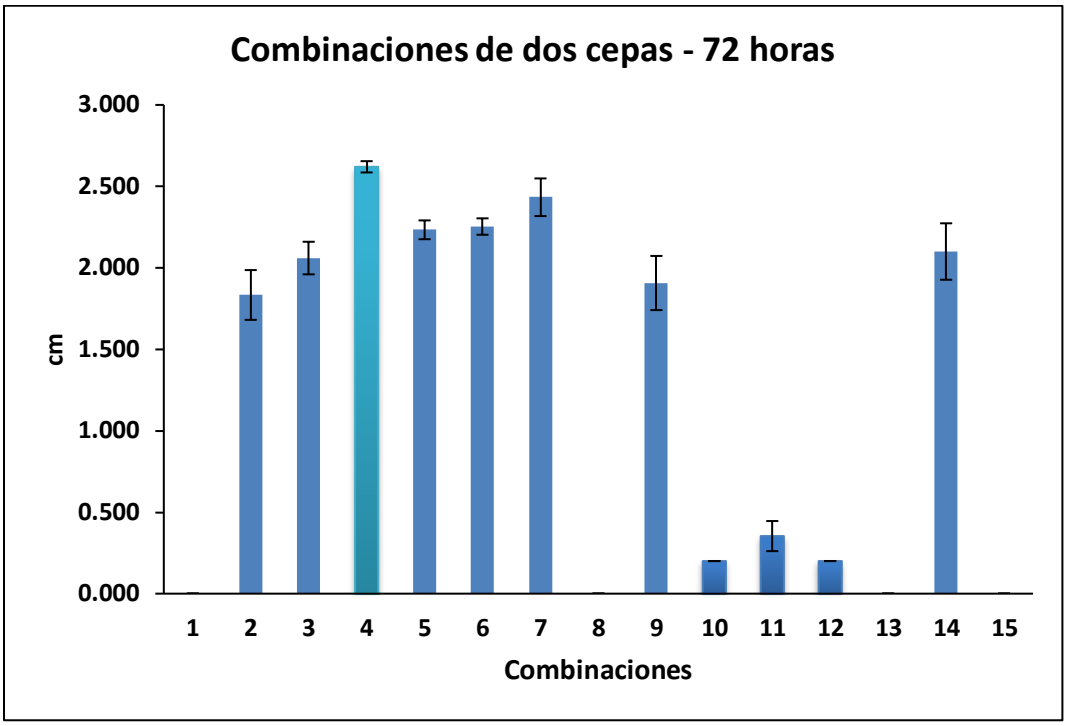
posible medir el diámetro del halo de solubilización, debido a que en una misma caja Petri se encontraban las tres réplicas de cada una de las diferentes combinaciones, por tal motivo el medio se acidifico de manera homogénea lo cual no permitió distinguir entre un halo y otro de cada una de las réplicas (Gráfica 9 y tabla 9).



Gráfica 7. Se muestran las diferentes combinaciones pares de las 6 cepas bacterianas. Cada barra representa el promedio de los halos de solubilización de tres replicas por cada combinación; donde la combinación 15 fue la que presento un diámetro mayor respecto a las demás. (1) *P. putida* y Levadura MS22; (2) *P. putida* y *Sphingomonas* sp; (3) *P. putida* y *B. unamae*; (4) *P. putida* y *G. diazotrophicus*; (5) *P. putida* y *A. brasilense*; (6) Levadura MS22y *Sphingomonas* sp; (7) Levadura MS22y *B. unamae*; (8) Levadura MS22 y *G. diazotrophicus*; (9) Levadura MS22 y *A. brasilense*; (10) *Sphingomonas* sp y *B. unamae*; (11) *Sphingomonas* sp y *G. diazotrophicus*; (12) *Sphingomonas* sp y *A. brasilense*; (13) *B. unamae* y *G. diazotrophicus*; (14) *B. unamae* y *A. brasilense*; (15) *G. diazotrophicus* y *A. brasilense.*



Gráfica 8. Cada barra representa el promedio del diámetro parcial de las tres réplicas de cada combinación par, evaluado a las 48 horas; destacando con un diámetro mayor la combinación 8, en comparación con las demás combinaciones realizadas. (1) *P. putida* y Levadura MS22; (2) *P. putida* y *Sphingomonas* sp; (3) *P. putida* y *B. unamae*; (4) *P. putida* y *G. diazotrophicus*; (5) *P. putida* y *A. brasilense*; (6) Levadura MS22 y *Sphingomonas* sp; (7) Levadura MS22 y *B. unamae*; (8) Levadura MS22 y *G. diazotrophicus*; (9) Levadura MS22 y *A. brasilense*; (10) *Sphingomonas sp* y *B. unamae*; (11) *Sphingomonas sp* y *G. diazotrophicus*; (12) *Sphingomonas sp* y *A. brasilense*; (13) *B. unamae* y *G. diazotrophicus*; (14) *B. unamae* y *A. brasilense*; (15) *G. diazotrophicus* y *A. brasilense.*



Gráfica 9. Se observan los promedios en cada barra de las tres réplicas de cada combinación de dos cepas. (1) *P. putida* y Levadura MS22; (2) *P. putida* y *Sphingomonas* sp.; (3) *P. putida* y *B. unamae*; (4) *P. putida* y *G. diazotrophicus*; (5) *P. putida* y *A. brasilense*; (6) Levadura MS22 y *Sphingomonas sp*; (7) Levadura MS22 y *B. unamae*; (8) Levadura MS22 y *G. diazotrophicus*; (9) Levadura MS22 y *A. brasilense*; (10) *Sphingomonas sp* y *B. unamae*; (11) *Sphingomonas sp* y *G. diazotrophicus*; (12) *Sphingomonas sp* y *A. brasilense*; (13) *B. unamae* y *G. diazotrophicus*; (14) *B. unamae* y *A. brasilense*; (15) *G. diazotrophicus* y *A. brasilense*.

Combinaciones de dos cepas		24 horas cm ±DS	48 horas cm ±DS	72 horas cm ±DS
1	*P. putida* y Levadura MS22	0.897±0.065	1.393±0.153	Acidificó
2	*P. putida* y *Sphingomonas* sp.	0.663±0.237	1.107±0.092	1.833±0.153
3	*P. putida* y *B. unamae*	0.687±0.051	1.073±0.150	2.060±0.100
4	*P. putida* y *G. diazotrophicus*	0.763±0.115	1.117±0.125	2.620±0.035
5	*P. putida* y *A. brasilense*	0.807±0.040	1.107±0.050	2.233±0.058
6	Levadura MS22 y *Sphingomonas* sp.	0.683±0.068	1.140±0.017	2.253±0.050
7	Levadura MS22 y *B. unamae*	0.750±0.085	1.273±0.051	2.433±0.115
8	Levadura MS22 y *G. diazotrophicus*	1.030±0.070	2.373±0.140	Acidificó
9	Levadura MS22 y *A. brasilense*	0.507±0.050	1.073±0.051	1.907±0.166
10	*Sphingomonas* sp. y *B. unamae*	0.100±0.000	0.200±0.000	0.200±0.000
11	*Sphingomonas* sp. y *G. diazotrophicus*	0.133±0.058	0.253±0.081	0.353±0.092
12	*Sphingomonas* sp. y *A. brasilense*	0.100±0.000	0.200±0.000	0.200±0.00
13	*B. unamae* y *G. diazotrophicus*	0.783±0.068	1.307±0.068	Acidificó

14	*B. unamae* y *A. brasilense*	1.007±0.092	1.507±0.108	2.100±0.173
15	*G. diazotrophicus* y *A. brasilense*	1.273±0.140	2.240±0.106	Acidificó

Tabla 4. Muestra el promedio de tres réplicas de dos cepas bacterias, en las diferentes horas de evaluación, 24, 48 y 72 horas.

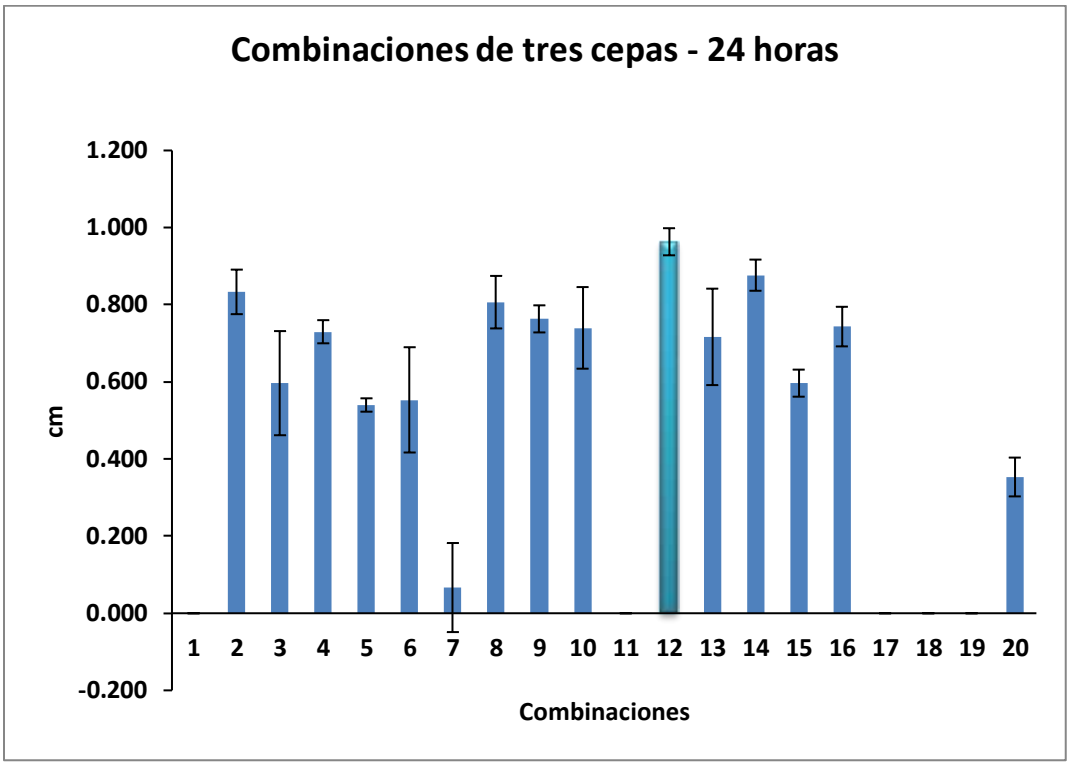
Combinaciones de tres cepas

Los resultados de las combinaciones de tres cepas cada una por triplicado en una misma caja Petri, obtenidos a las 24 horas mostraron gráficamente diferencias entre los diámetros del halo de solubilización de las distintas combinaciones, además se encontró que cinco de las combinaciones de tres cepas no poseen la capacidad para solubilizar fosfatos, estas son: (1) *P. putida,* Levadura MS22 y *Sphingomonas* sp., (11) Levadura MS22*, Sphingomonas* sp. y *B. unamae*, (17) *Sphingomonas* sp.*, B. unamae* y *G. diazotrophicus*, (18) *Sphingomonas* sp.*, B. unamae* y *A. brasilense* y (19) *Sphingomonas* sp.*, G. diazotrophicus* y *A. brasilense* (Gráfica 10 y tabla 5).

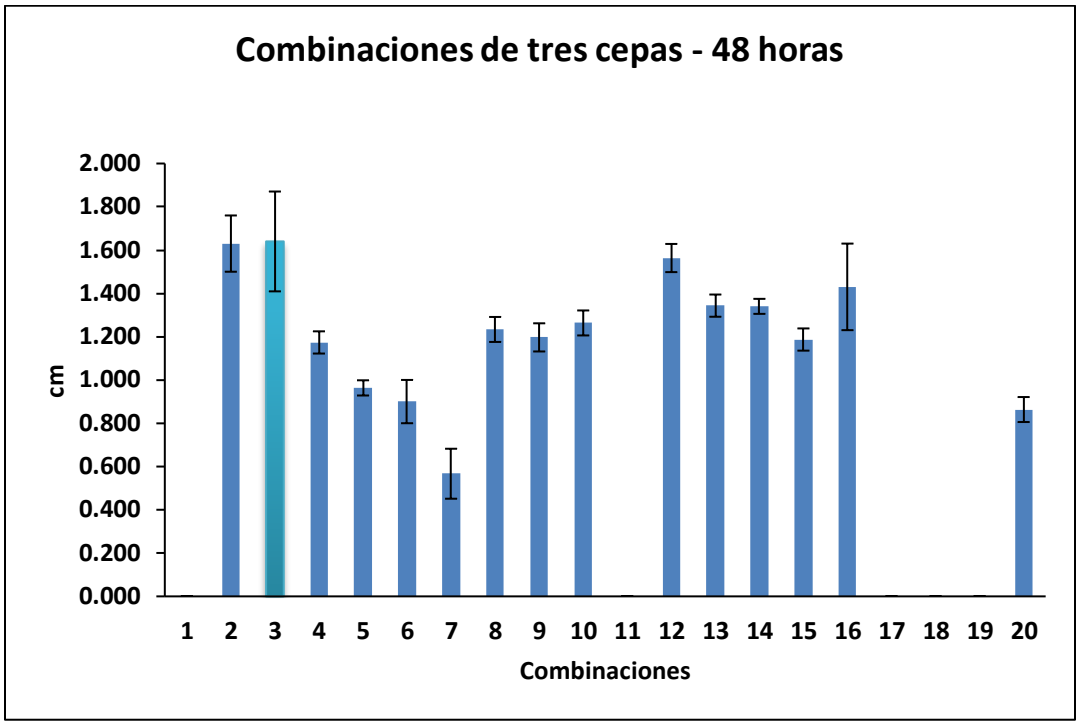
Los resultados obtenidos a las 48 horas de las distintas combinaciones realizadas, se observaron diferencias en el diámetro del halo de solubilización de las distintas combinaciones realizadas, por otro lado las cinco combinaciones que no solubilizaron fosfato a las 24 horas, continúan sin presentar halo de solubilización (Gráfica 11 y tabla 5).

A las 72 horas se observó que el halo de solubilización de las diferentes combinaciones aumento de manera favorable, mostrando gráficamente diferencias en sus diámetros del halo de solubilización de fosfato. Además, se registró

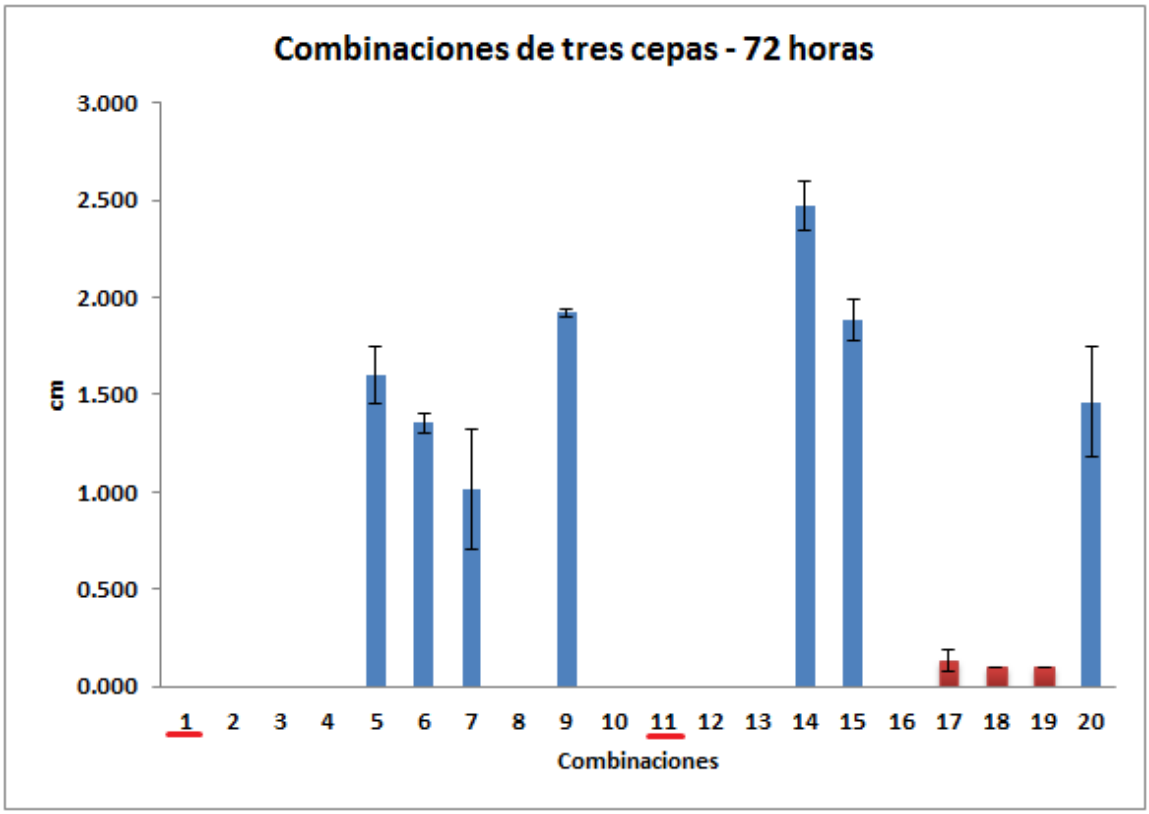
crecimiento del halo de solubilización para tres de las combinaciones que desde su evaluación no lo habían presentado, las cuales son: (17) *Sphingomonas* sp.*, B. unamae* y *G. diazotrophicus*, (18) *Sphingomonas* sp.*, B. unamae* y *A. brasilense* y (19) *Sphingomonas* sp.*, G. diazotrophicus* y *A. brasilense*. Mientras tanto las dos combinaciones restantes: (1) *P. putida,* Levadura MS22 y *Sphingomonas* sp. y (11) Levadura MS22*, Sphingomonas* sp. y *B. unamae*, no son solubilizadoras de fosfato, puesto que no presentaron halo de solubilización en ningún periodo de tiempo en el que fueron evaluadas, posiblemente la actividad para solubilizar fosfatos fue inhibida por alguna de las bacterias que conformaron la combinación. Por otro lado debido a la acidificación del medio y a que en una misma caja Petri se inocularon las tres réplicas de cada combinación, ya no fue posible medir su diámetro del halo de solubilización de algunas de las combinaciones (Gráfica 12, tabla 5 y tabla 9).



Gráfica 10. Esta gráfica muestra el diámetro de las diferentes combinaciones evaluadas a las 24 horas; cada barra muestra el promedio de las tres réplicas de cada combinación. (1) *P. putida,* Levadura MS22 y *Sphingomonas* sp.; (2) P*. putida,* Levadura MS22 y *B. unamae*; (3) *P. putida,* Levadura MS22 y *G. diazotrophicus*; (4) *P. putida,* Levadura MS22 y *A. brasilense*; (5) *P. putida, Sphingomonas* sp. y *B. unamae*; (6) *P. putida, Sphingomonas* sp. y *G. diazotrophicus*; (7) *P. putida*, *Sphingomonas* sp. y *A. brasilense*; (8) *P. putida, B. unamae* y *G. diazotrophicus*; (9) *P. putida, B. unamae* y *A. brasilense*; (10) *P. putida, G. diazotrophicus* y *A. brasilense*; (11) Levadura MS22*, Sphingomonas sp* y *B. unamae*; (12) *Bradyrhizobium* sp., *Sphingomonas* sp. y *G. diazotrophicus*; (13) Levadura MS22*, Sphingomonas* sp. y *A. brasilense*; (14) Levadura MS22*, B. unamae* y *G. diazotrophicus*; (15) Levadura MS22*, B. unamae* y *A. brasilense*; (16) Levadura MS22*, G. diazotrophicus* y *A. brasilense*; (17) *Sphingomonas* sp.*, B. unamae* y *G. diazotrophicus*; (18) *Sphingomonas* sp.*, B. unamae* y *A. brasilense;* (19) *Sphingomonas* sp., *G. diazotrophicus* y *A. brasilense*; (20) *B. unamae, G. diazotrophicus* y *A. brasilense*.



Gráfica 11. En esta gráfica cada barra muestra el promedio de las tres réplicas de cada combinación, a las 48 horas. (1) *P. putida,* Levadura MS22 y *Sphingomonas* sp.; (2) P*. putida,* Levadura MS22 y *B. unamae*; (3) *P. putida,* Levadura MS22 y *G. diazotrophicus*; (4) *P. putida,* Levadura MS22 y *A. brasilense*; (5) *P. putida, Sphingomonas* sp. y *B. unamae*; (6) *P. putida, Sphingomonas* sp. y *G. diazotrophicus*; (7) *P. putida*, *Sphingomonas* sp. y *A. brasilense*; (8) *P. putida, B. unamae* y *G. diazotrophicus*; (9) *P. putida, B. unamae* y *A. brasilense*; (10) *P. putida, G. diazotrophicus* y *A. brasilense*; (11) Levadura MS22*, Sphingomonas* sp. y *B. unamae*; (12) Levadura MS22, *Sphingomonas* sp. y *G. diazotrophicus*; (13) Levadura MS22*, Sphingomonas* sp. y *A. brasilense*; (14) Levadura MS22*, B. unamae* y *G. diazotrophicus*; (15) Levadura MS22*, B. unamae* y *A. brasilense*; (16) Levadura MS22*, G. diazotrophicus* y *A. brasilense*; (17) *Sphingomonas* sp., *B. unamae* y *G. diazotrophicus*; (18) *Sphingomonas* sp., *B. unamae* y *A. brasilense;* (19) *Sphingomonas* sp., *G. diazotrophicus* y *A. brasilense*; (20) *B. unamae, G. diazotrophicus* y *A. brasilense*.



Gráfica 12. Cada barra muestra el promedio de las tres réplicas de cada combinación, evaluado a las 72 horas. (1) *P. putida,* Levadura MS22 y *Sphingomonas* sp.; (2) P. *putida,* Levadura MS22 y *B. unamae*; (3) *P. putida,* Levadura MS22 y *G. diazotrophicus*; (4) *P. putida,* Levadura MS22 y *A. brasilense*; (5) *P. putida, Sphingomonas* sp. y *B. unamae*; (6) *P. putida, Sphingomonas* sp. y *G. diazotrophicus*; (7) *P. putida*, *Sphingomonas* sp. y *A. brasilense*; (8) *P. putida, B. unamae* y *G. diazotrophicus*; (9) *P. putida, B. unamae* y *A. brasilense*; (10) *P. putida, G. diazotrophicus* y *A. brasilense*; (11) Levadura MS22*, Sphingomonas* sp. y *B. unamae*; (12) , *Sphingomonas* sp. y *G. diazotrophicus*; (13) Levadura MS22*, Sphingomonas* sp. y *A. brasilense*; (14) Levadura MS22*, B. unamae* y *G. diazotrophicus*; (15) Levadura MS22*, B. unamae* y *A. brasilense*; (16) Levadura MS22*, G. diazotrophicus* y *A. brasilense*; (17) *Sphingomonas* sp., *B. unamae* y *G. diazotrophicus*; (18) *Sphingomonas* sp., *B. unamae* y *A. brasilense;* (19) *Sphingomonas* sp., *G. diazotrophicus* y *A. brasilense*; (20) *B. unamae, G. diazotrophicus* y *A. brasilense*.

Combinaciones de tres cepas		24 horas cm ±DS	48 horas cm ±DS	72 horas cm ±DS
1	*P. putida,* Levadura MS22 y *Sphingomonas* sp	-	-	No solubiliza
2	P. *putida,* Levadura MS22 y *B. unamae*	0.833±0.058	1.630±0.130	Acidificó
3	*P. putida,* Levadura MS22 y *G. diazotrophicus*	0.597±0.135	1.640±0.231	Acidificó
4	*P. putida,* Levadura MS22 y *A. brasilense*	0.730±0.030	1.173±0.051	Acidificó
5	*P. putida, Sphingomonas* sp. y *B. unamae*	0.540±0.017	0.963±0.035	1.597±0.146
6	*P. putida, Sphingomonas* sp. y *G. diazotrophicus*	0.553±0.137	0.900±0.100	1.353±0.052
7	*P. putida*, *Sphingomonas* sp. y *A. brasilense*	0.067±0.115	0.567±0.115	1.017±0.309
8	*P. putida, B. unamae* y *G. diazotrophicus*	0.807±0.068	1.233±0.058	Acidificó

9	*P. putida, B. unamae* y *A. brasilense*	0.763±0.035	1.197±0.065	1.920±0.017
10	*P. putida, G. diazotrophicus y A. brasilense*	0.740±0.106	1.263±0.058	Acidificó
11	Levadura MS22, *Sphingomonas* sp y *B. unamae*	-	-	No solubiliza
12	Levadura MS22, *Sphingomonas* sp. y *G. diazotrophicus*	0.963±0.035	1.563±0.065	Acidificó
13	Levadura MS22, *Sphingomonas* sp. y *A. brasilense*	0.717±0.125	1.343±0.051	Acidificó
14	Levadura MS22, *B. unamae* y *G. diazotrophicus*	0.877±0.040	1.340±0.035	2.473±0.125
15	Levadura MS22, *B. unamae* y *A. brasilense*	0.597±0.035	1.187±0.051	1.883±0.108
16	Levadura MS22, *G. diazotrophicus* y *A. brasilense*	0.743±0.051	1.430±0.200	Acidificó
17	*Sphingomonas* sp., *B. unamae* y *G. diazotrophicus*	-	-	0.133±0.058

18	*Sphingomonas* sp., *B. unamae* y *A. brasilense*	-	-	0.100±0.000
19	*Sphingomonas* sp., *G. diazotrophicus* y *A. brasilense*	-	-	0.100±0.000
20	*B. unamae, G. diazotrophicus* y *A. brasilense*	0.353±0.050	0.863±0.058	1.463±0.281

Tabla 5. Muestra el promedio en centímetros de tres réplicas realizadas por cada combinación de tres cepas bacterianas, evaluadas a las 24, 48 y 72 horas.

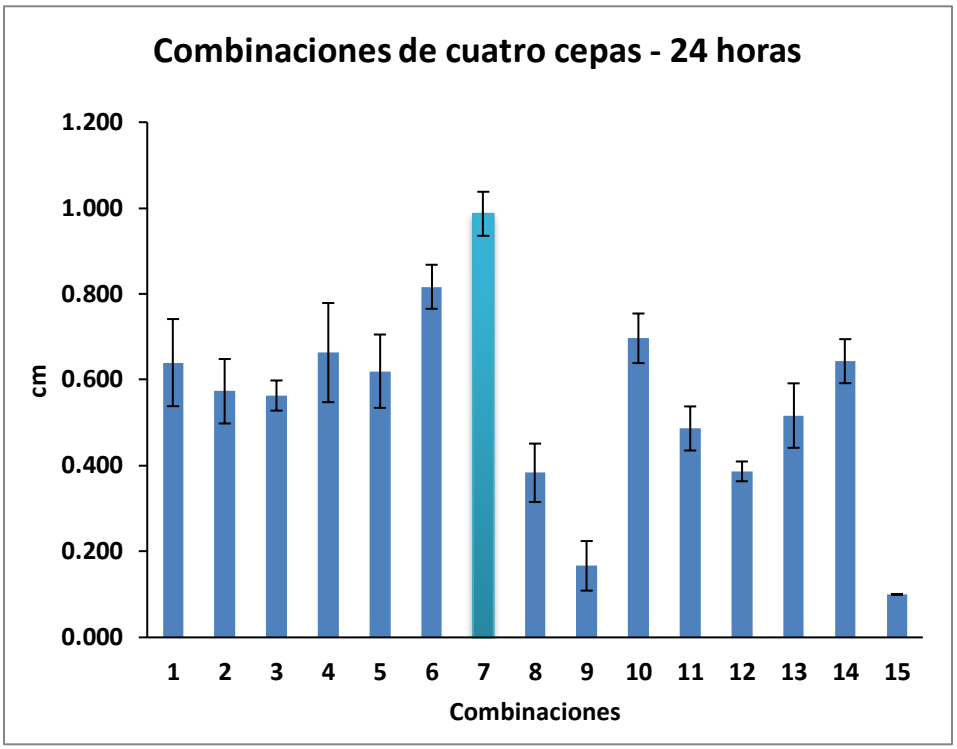
Combinaciones de cuatro cepas

De las combinaciones de cuatro cepas los resultados evaluados a las 24 horas mostraron gráficamente diferencias en sus diámetros del halo de solubilización; además se observó que todas las combinaciones son solubilizadoras de fosfatos, destacando que la combinación 7 formada por las cepas: *P. putida, Sphingomonas* sp., *B. unamae* y *G. diazotrophicus,* tuvo un promedio en su diámetro el cual fue mayor en comparación con las demás combinaciones (Gráfica 13 y tabla 6).

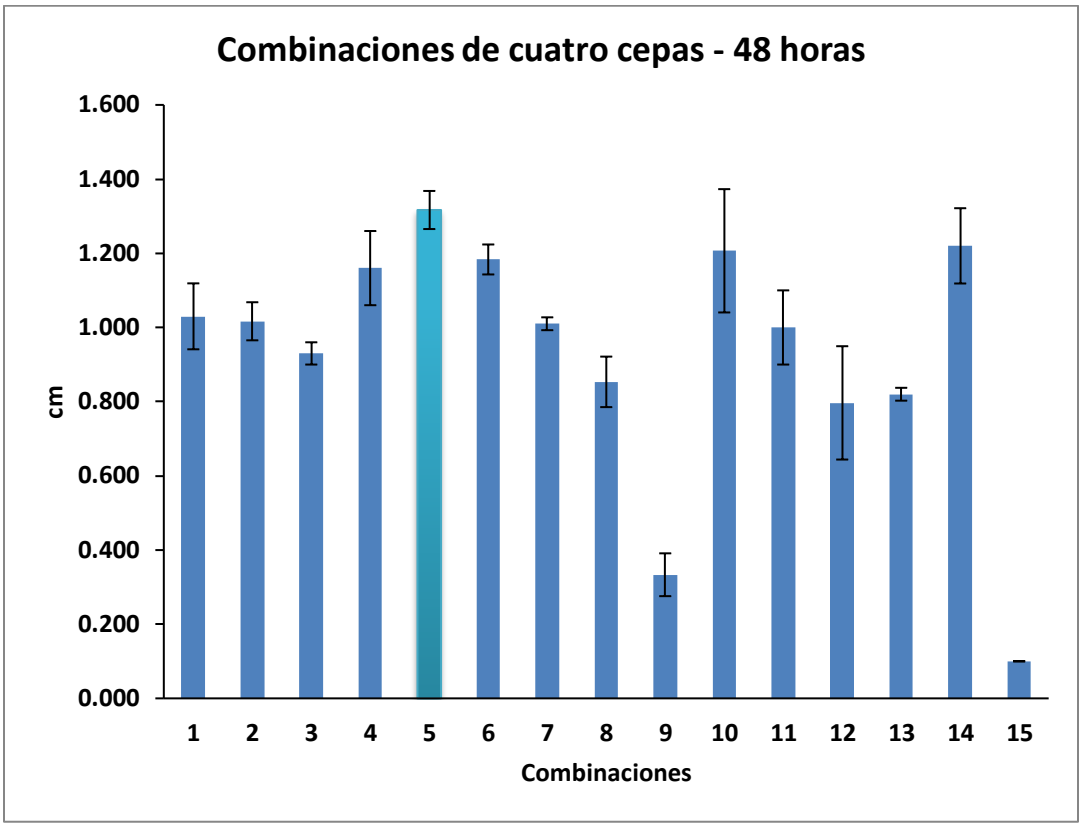
En los resultados evaluados a las 48 horas, se observó un crecimiento favorable en el diámetro de las combinaciones, gráficamente se observaron diferencias entre los diámetros de los halos de las combinaciones (Gráfica 14 y tabla 6).

Para los resultados obtenidos a las 72 horas, ya no fue posible medir el diámetro de dos de las combinaciones, debido a que el medio NBRIP se había acidificado

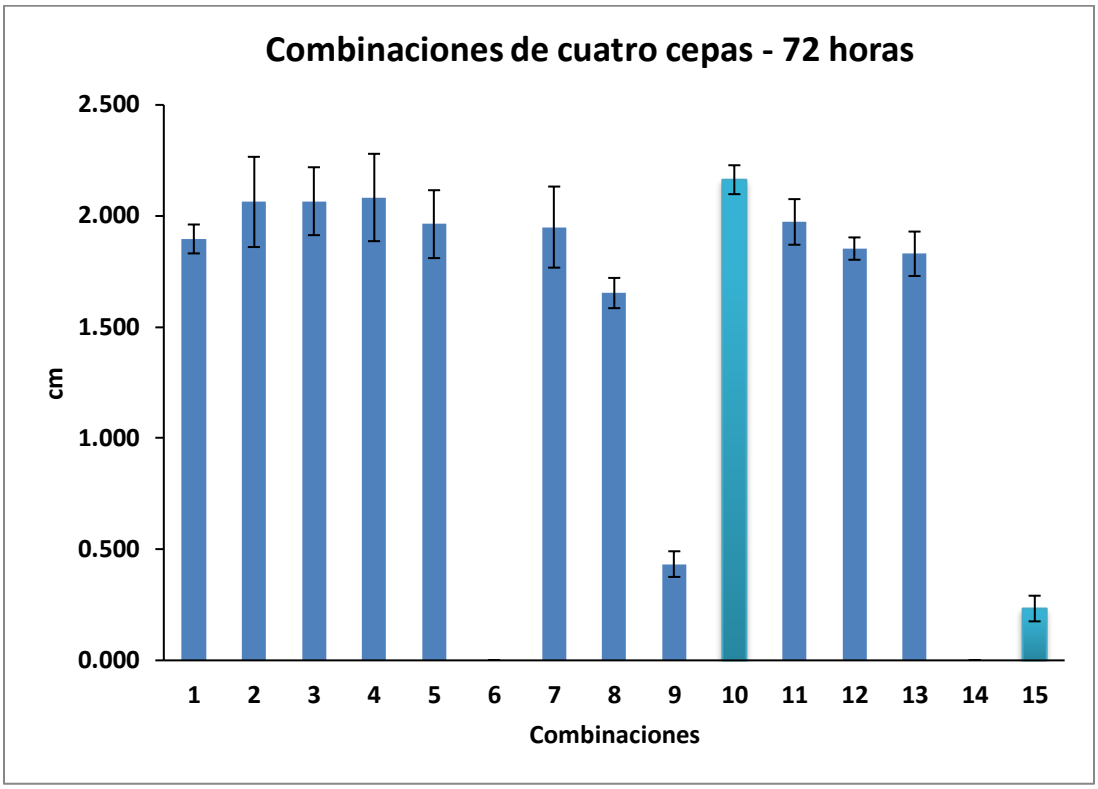
completamente, además de que en una misma caja Petri se inocularon las tres réplicas de cada una de las combinaciones (Grafica 15, tabla 6 y tabla 9).



Gráfica 13. Muestra el promedio del diámetro de tres réplicas de las diferentes combinaciones de cuatro cepas, evaluado a las 24 horas. Observándose que todas las combinaciones realizaron solubilización de fosfatos. (1) *P. putida,* Levadura MS22*, Sphingomonas* sp. y *B. unamae*; (2) *P. putida,* Levadura MS22*, Sphingomonas* sp. y *G. diazotrophicus;* (3) *P. putida,* Levadura MS22*, Sphingomonas* sp. y *A. brasilense;* (4) *P. putida,* Levadura MS22*, B. unamae* y *G. diazotrophicus;* (5) *P. putida,* Levadura MS22*, B. unamae* y *A. brasilense;* (6) *P. putida,* Levadura MS22*, G. diazotrophicus* y *A. brasilense;* (7) *P. putida, Sphingomonas* sp., *B. unamae* y *G. diazotrophicus;* (8) *P. putida, Sphingomonas* sp., *B. unamae* y *A. brasilense;* (9) *P. putida, Sphingomonas* sp., *G. diazotrophicus* y *A. brasilense;* (10) *P. putida, B. unamae, G. diazotrophicus* y *A. brasilense;* (11) Levadura MS22*, Sphingomonas* sp., *B. unamae* y *G. diazotrophicus;* (12) Levadura MS22*, Sphingomonas* sp., *B. unamae* y *A. brasilense;* (13) Levadura MS22*, Sphingomonas* sp., *G. diazotrophicus* y *A. brasilense;* (14) Levadura MS22*, B. unamae, G. diazotrophicus* y *A. brasilense;* (15) *Sphingomonas* sp., *B. unamae, G. diazotrophicus* y *A. brasilense*.



Gráfica 14. Cada barra representa el promedio del diámetro de las tres réplicas de cada combinación de cuatro cepas. (1) *P. putida,* Levadura MS22*, Sphingomonas* sp. y *B. unamae*; (2) *P. putida,* Levadura MS22*, Sphingomonas* sp. y *G. diazotrophicus;* (3) *P. putida,* Levadura MS22*, Sphingomonas* sp. y *A. brasilense;* (4) *P. putida,* Levadura MS22*, B. unamae* y *G. diazotrophicus;* (5) *P. putida,* Levadura MS22*, B. unamae* y *A. brasilense;* (6) *P. putida,* Levadura MS22*, G. diazotrophicus* y *A. brasilense;* (7) *P. putida, Sphingomonas* sp., *B. unamae* y *G. diazotrophicus;* (8) *P. putida, Sphingomonas sp, B. unamae* y *A. brasilense;* (9) *P. putida, Sphingomonas* sp., *G. diazotrophicus* y *A. brasilense;* (10) *P. putida, B. unamae, G. diazotrophicus* y *A. brasilense;* (11) Levadura MS22*, Sphingomonas* sp., *B. unamae* y *G. diazotrophicus;* (12) Levadura MS22*, Sphingomonas* sp., *B. unamae* y *A. brasilense;* (13) Levadura MS22*, Sphingomonas* sp., *G. diazotrophicus* y *A. brasilense;* (14) Levadura MS22*, B. unamae, G. diazotrophicus* y *A. brasilense;* (15) *Sphingomonas* sp., *B. unamae, G. diazotrophicus* y *A. brasilense*.



Gráfica 15. Se muestra el promedio del diámetro del tallo de tres réplicas en cada combinación, evaluado a las 72 horas. (1) *P. putida,* Levadura MS22*, Sphingomonas* sp. y *B. unamae*; (2) *P. putida,* Levadura MS22*, Sphingomonas* sp. y *G. diazotrophicus;* (3) *P. putida,* Levadura MS22*, Sphingomonas* sp. y *A. brasilense;* (4) *P. putida,* Levadura MS22*, B. unamae* y *G. diazotrophicus;* (5) *P. putida,* Levadura MS22*, B. unamae* y *A. brasilense;* (6) *P. putida,* Levadura MS22*, G. diazotrophicus* y *A. brasilense;* (7) *P. putida, Sphingomonas* sp., *B. unamae* y *G. diazotrophicus;* (8) *P. putida, Sphingomonas* sp., *B. unamae* y *A. brasilense;* (9) *P. putida, Sphingomonas* sp., *G. diazotrophicus* y *A. brasilense;* (10) *P. putida, B. unamae, G. diazotrophicus* y *A. brasilense;* (11) Levadura MS22*, Sphingomonas* sp., *B. unamae* y *G. diazotrophicus;* (12) Levadura MS22*, Sphingomonas* sp., *B. unamae* y *A. brasilense;* (13) Levadura MS22*, Sphingomonas* sp., *G. diazotrophicus* y *A. brasilense;* (14) Levadura MS22*, B. unamae, G. diazotrophicus* y *A. brasilense;* (15) *Sphingomonas* sp., *B. unamae, G. diazotrophicus* y *A. brasilense*.

Combinaciones de cuatro cepas		24 horas cm ± DS	48 horas cm ± DS	72 horas cm ± DS
1	*P. putida,* Levadura MS22, *Sphingomonas* sp. y *B. unamae*	0.640±0.101	1.030±0.089	1.897±0.065
2	*P. putida,* Levadura MS22, *Sphingomonas* sp. y *G. diazotrophicus*	0.573±0.075	1.017±0.051	2.063±0.203
3	*P. putida,* Levadura MS22, *Sphingomonas* sp. y *A. brasilense*	0.563±0.035	0.930±0.030	2.067±0.153
4	*P. putida,* Levadura MS22, *B. unamae* y *G. diazotrophicus*	0.663±0.115	1.160±0.100	2.083±0.197
5	*P. putida,* Levadura MS22, *B. unamae* y *A. brasilense*	0.620±0.085	1.317±0.051	1.963±0.153
6	*P. putida,* Levadura MS22, *G. diazotrophicus* y *A. brasilense*	0.817±0.051	1.183±0.040	Acidificó
7	*P. putida, Sphingomonas* sp., *B. unamae* y *G. diazotrophicus*	0.987±0.051	1.010±0.017	1.950±0.182

8	*P. putida, Sphingomonas* sp., *B. unamae* y *A. brasilense*	0.383±0.068	0.853±0.068	1.653±0.068
9	*P. putida, Sphingomonas* sp., *G. diazotrophicus* y *A. brasilense*	0.167±0.058	0.333±0.058	0.433±0.058
10	*P. putida, B. unamae, G. diazotrophicus* y *A. brasilense*	0.697±0.058	1.207±0.166	2.163±0.065
11	Levadura MS22, *Sphingomonas* sp, *B. unamae* y *G. diazotrophicus*	0.487±0.051	1.000±1.000	1.973±0.103
12	Levadura MS22, *Sphingomonas* sp., *B. unamae* y *A. brasilense*	0.387±0.023	0.797±0.153	1.853±0.050
13	Levadura MS22, *Sphingomonas* sp., *G. diazotrophicus* y *A. brasilense*	0.517±0.075	0.820±0.017	1.830±0.100
14	Levadura MS22, *B. unamae, G. diazotrophicus* y *A. brasilense*	0.643±0.051	1.220±0.101	Acidificó

15	*Sphingomonas* sp., *B. unamae, G. diazotrophicus* y *A. brasilense*	0.100±0.000	0.100±0.000	0.233±0.058

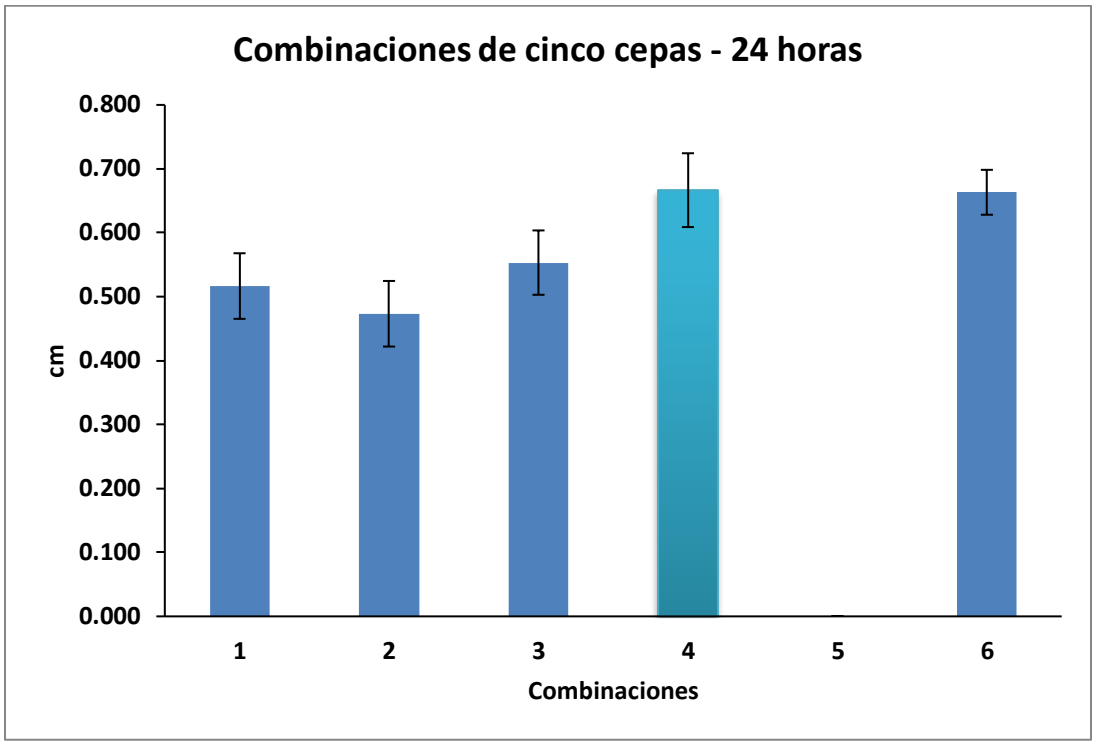
Tabla 6. Muestra el promedio en centímetros de tres replicas realizadas por cada combinación de cuatro cepas bacterianas.

Combinaciones de cinco cepas

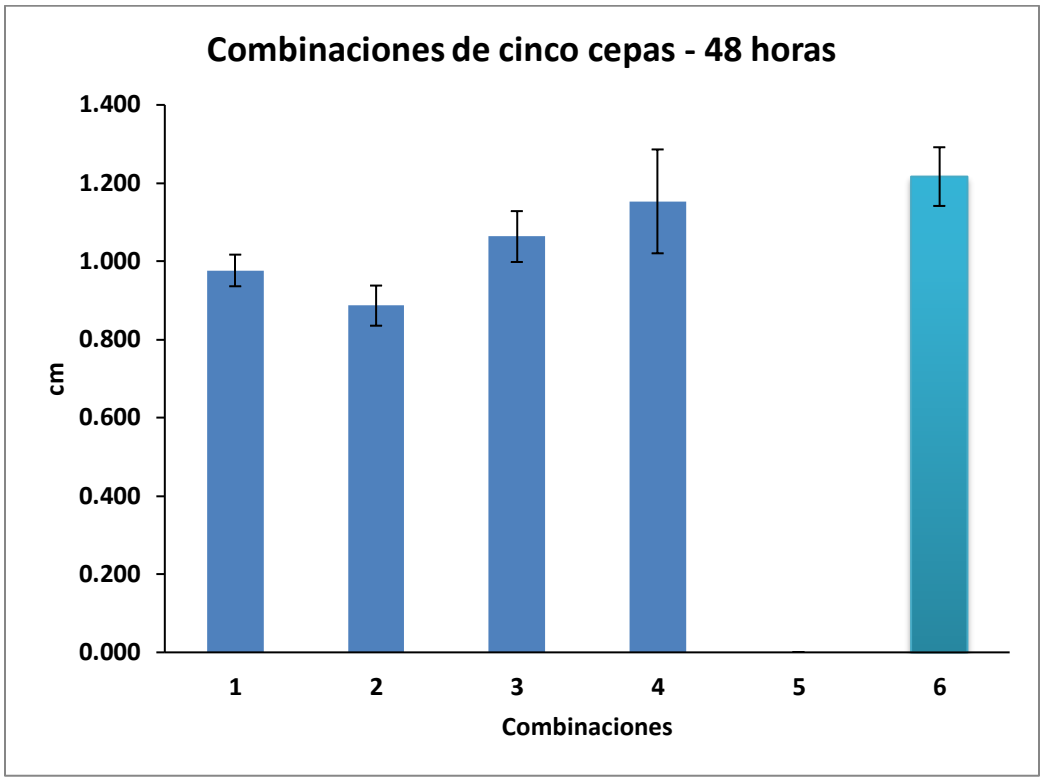
Los resultados obtenidos a las 24 horas gráficamente mostraron diferencias en los diámetros de los halos de solubilización de fosfato de las diferentes combinaciones realizadas, destacando que la combinación número cinco formada por: *P. putida, Sphingomonas* sp., *B. unamae, G. diazotrophicus* y *A. brasilense*, no presento halo de solubilización de fosfato (Gráfica 16 y tabla 7).

Los resultados evaluados a las 48 horas mostraron diferencias entre los diámetros del halo de solubilización de fosfatos, además la combinación cinco al igual que a las 24 horas, continúa sin presentar halo de solubilización (Gráfica 17 y tabla 7).

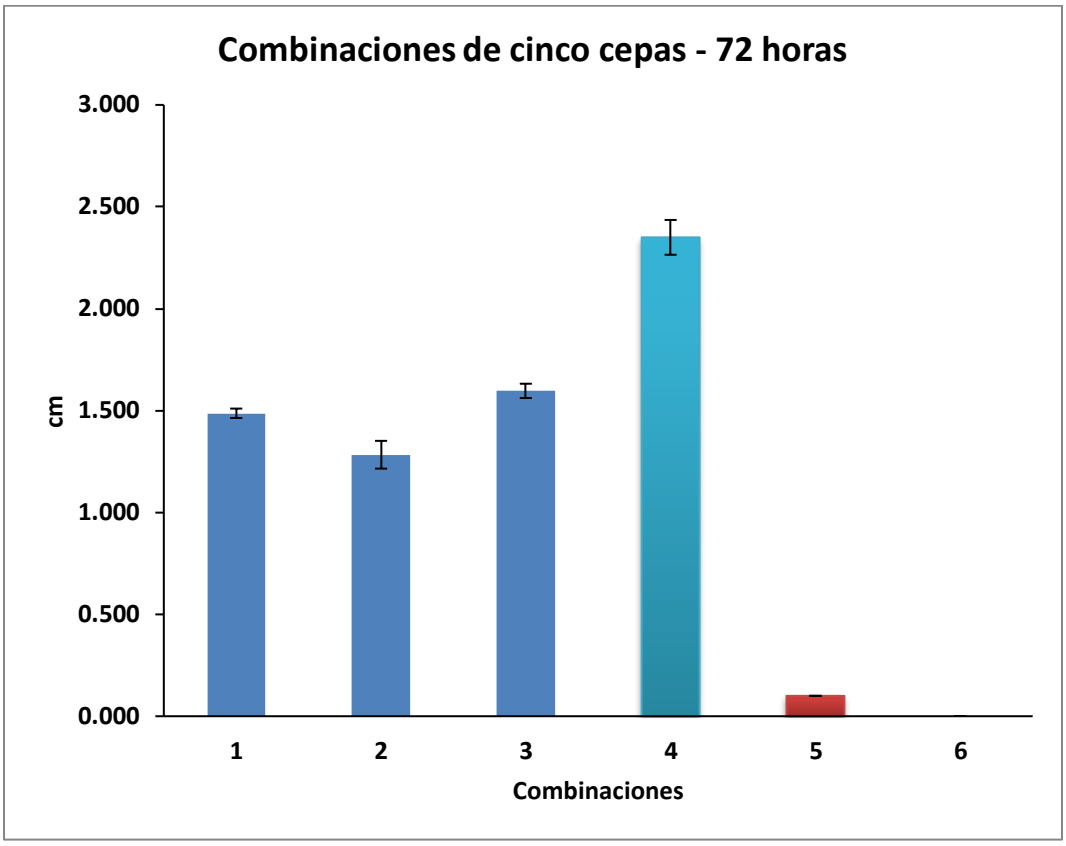
En los resultados obtenidos a las 72 horas, la combinación número seis formada por las cepas: Levadura MS22**,** *Sphingomonas* sp.**,** *B. unamae***,** *G. diazotrophicus* y *A. brasilense,* ya no fue posible medir su diámetro del halo de solubilización debido a que el medio se acidifico, además de que en una misma caja Petri se encontraron las tres réplicas de la combinación. Por otro lado, se encontró que la combinación cinco que no había presentado solubilización, a partir de las 72 horas, mostró halo de solubilización de fosfatos (Gráfica 18, tabla 7 y tabla 9).



Gráfica 16. Cada barra muestra el promedio del diámetro de las tres réplicas de cada combinación evaluadas a las 24 horas. (1) *P. putida,* Levadura MS22*, Sphingomonas* sp., *B. unamae* y *G. diazotrophicus;* (2) *P. putida,* Levadura MS22*, Sphingomonas* sp., *B. unamae* y *A, brasilense;* (3) *P. putida,* Levadura MS22*, Sphingomonas* sp., *G. diazotrophicus* y *A, brasilense;* (4) *P. putida,* Levadura MS22*, B. unamae, G. diazotrophicus* y *A. brasilense;* (5) *P. putida, Sphingomonas* sp., *B. unamae, G. diazotrophicus* y *A. brasilense;* (6) Levadura MS22*, Sphingomonas* sp., *B. unamae, G. diazotrophicus* y *A. brasilense*.



Gráfica 17. Cada barra en esta gráfica muestra el promedio de tres replicas evaluado a las 48 horas. (1) *P. putida,* Levadura MS22*, Sphingomonas* sp., *B. unamae* y *G. diazotrophicus;* (2) *P. putida,* Levadura MS22*, Sphingomonas* sp., *B. unamae* y *A, brasilense;* (3) *P. putida,* Levadura MS22*, Sphingomonas* sp., *G. diazotrophicus* y *A, brasilense;* (4) *P. putida,* Levadura MS22*, B. unamae, G. diazotrophicus* y *A. brasilense;* (5) *P. putida, Sphingomonas* sp., *B. unamae, G. diazotrophicus* y *A. brasilense;* (6) Levadura MS22*, Sphingomonas* sp., *B. unamae, G. diazotrophicus* y *A. brasilense*.



Gráfica 18. Esta gráfica muestra el promedio de las tres réplicas por cada combinación realizada, evaluado a las 72 horas. (1) *P. putida,* Levadura MS22*, Sphingomonas* sp., *B. unamae* y *G. diazotrophicus;* (2) *P. putida,* Levadura MS22*, Sphingomonas* sp., *B. unamae* y *A, brasilense;* (3) *P. putida,* Levadura MS22*, Sphingomonas* sp., *G. diazotrophicus* y *A, brasilense;* (4) *P. putida,* Levadura MS22*, B. unamae, G. diazotrophicus* y *A. brasilense;* (5) *P. putida, Sphingomonas* sp., *B. unamae, G. diazotrophicus* y *A. brasilense;* (6) Levadura MS22*, Sphingomonas* sp., *B. unamae, G. diazotrophicus* y *A. brasilense*.

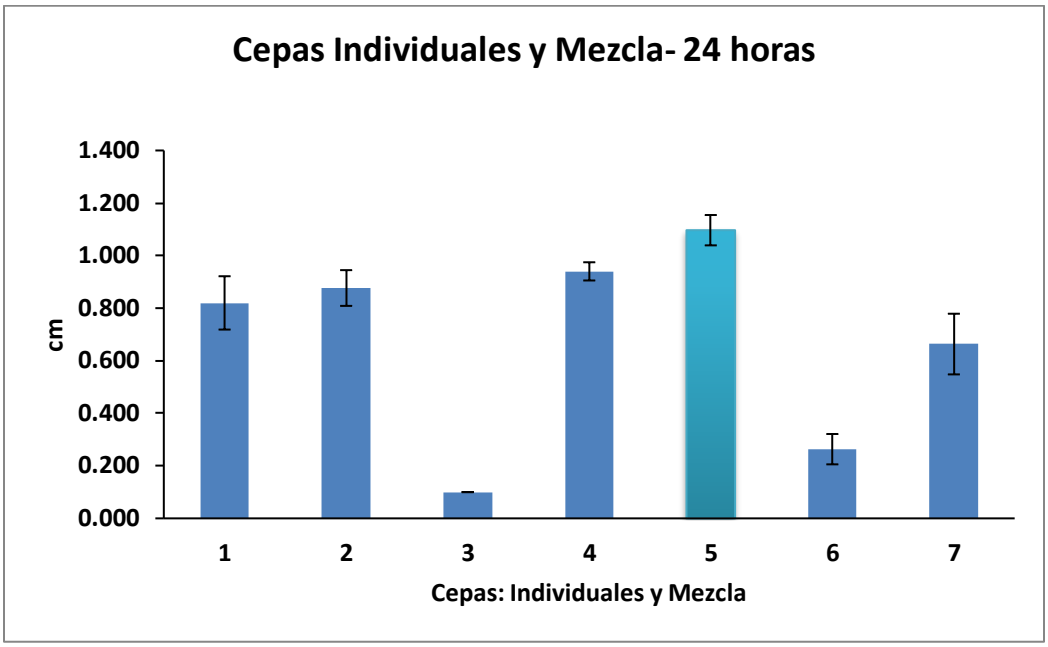
Combinaciones de cinco cepas		24 horas cm ± DS	48 horas cm ± DS	72 horas cm ± DS
1	*P. putida*, Levadura MS22, *Sphingomonas* sp., *B. unamae y G. diazotrophicus*	0.517±0.051	0.977±0.040	1.487±0.023
2	*P. putida*, Levadura MS22, *Sphingomonas* sp., *B. unamae* y *A, brasilense*	0.473±0.051	0.887±0.051	1.283±0.068
3	*P. putida*, Levadura MS22, *Sphingomonas* sp., *G. diazotrophicus* y *A, brasilense*	0.553±0.050	1.063±0.065	1.597±0.035
4	*P. putida*, Levadura MS22, *B. unamae, G. diazotrophicus* y *A. brasilense*	0.667±0.058	1.153±0.133	2.350±0.085
5	*P. putida, Sphingomonas* sp., *B. unamae, G. diazotrophicus* y *A. brasilense*	-	-	0.100±0.000

6	Levadura MS22, *Sphingomonas* sp., *B. unamae, G. diazotrophicus* y *A. brasilense*	0.663±0.035	1.217±0.075	Acidificó

Tabla 7. Muestra el promedio evaluado a las 24, 48 y 72 horas, de tres replicas realizadas por cada combinación de cinco cepas bacterianas.

Cepas individuales y Mezcla de las 6 cepas

Las cepas evaluadas individualmente, así como en mezcla (las seis cepas en conjunto), todas mostraron tener la capacidad para solubilizar fosfatos a partir de las 24 horas de su evaluación. La cepa que tuvo un valor promedio mayor fue *Gluconacetobacter diazotrophicus* en comparación con las demás cepas (Gráfica 19 y tabla 8).



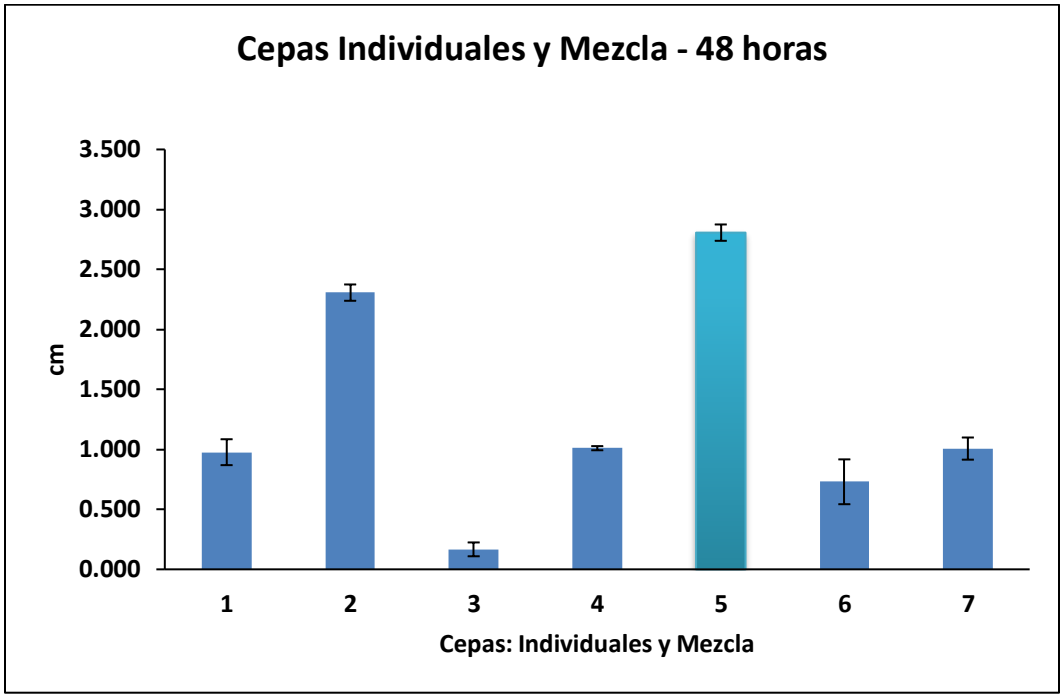
Gráfica 19. Promedio de tres réplicas de la medición del diámetro del halo de solubilización. Para cada cepa de forma individual y en mezcla, evaluado a las 24 horas.

(1) *P. putida* (2) Levadura MS22 (3) *Sphingomonas* sp.

(4) *B. unamae* (5) *G. diazotrophicus* (6) *A. brasilense*

(7) Mezcla de las 6 cepas.

A las 48 horas se observaron diferencias gráficamente entre las combinaciones, donde *Gluconacetobacter diazotrophicus,* sigue siendo la cepa que predomina en promedio de su diámetro del halo de solubilización en comparación con las demás cepas y con la mezcla de las seis (Gráfica 20 y tabla 8).



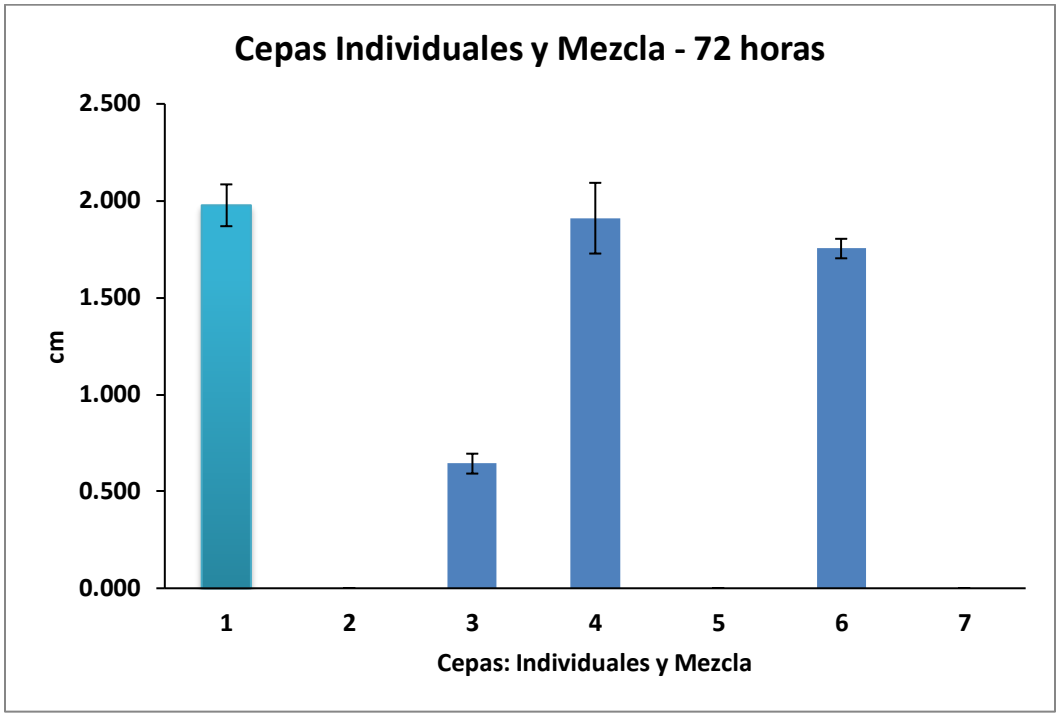
Gráfica 20. En cada una de las barras se observa el promedio de tres réplicas del diámetro del halo de solubilización, de cada cepa individual y en mezcla evaluado a las 48 horas

1. *P. putida* **2.** Levadura MS22 **3.** *Sphingomonas* sp.

4. *B. unamae* **5.** *G. diazotrophicus* **6.** *A. brasilense*

7. Mezcla de 6 cepas

En los resultados obtenidos a las 72 horas se observó que las cepas Levadura MS22*, Gluconacetobacter diazotrophicus* y la mezcla de las 6 cepas, habían acidificado totalmente el medio por tal motivo ya no pudieron ser valuadas (Gráfica 21, tabla 8 y tabla 9).



Gráfica 21. Cada muestra el promedio de las réplicas de cada cepa individual y en mezcla, evaluado a las 72 horas.

1. *P. putida* **2.** Levadura MS22 **3.** *Sphingomonas* sp.
4. *B. unamae* **5.** *G. diazotrophicus* **6.** *A. brasilense*
7. Mezcla de 6 cepas

Cepas individuales y en mezcla		24 horas cm ± DS	48 horas cm ± DS	72 horas cm ± DS
1	*P. putida*	0.820±0.101	0.977±0.108	1.977±0.108
2	Levadura MS22	0.877±0.068	2.307±0.068	Acidificó
3	*Sphingomonas* sp.	0.100±0.000	0.167±0.058	0.643±0.051
4	*B. unamae*	0.940±0.035	1.010±0.017	1.910±0.182
5	*G. diazotrophicus*	1.097±0.058	2.807±0.068	Acidificó
6	*A. brasilense*	0.263±0.058	0.730±0.187	1.753±0.050
7	Mezcla de 6 cepas	0.663±0.115	1.007±0.092	Acidificó

Tabla 8. Muestra el promedio evaluado a las 24, 48 y 72 horas de las cepas individuales y en mezcla.

	24 horas	**48 horas**	**72 horas**
Control		H_2O destilada estéril	
Combinación de dos cepas	OF178 y MTI 641^T	KT2440 y PAI5^T	PAI5^T y Sp7

Combinación de tres cepas	MS22, OF178 y PAI5^{T}	MS22, OF178 y MTI 641^{T}	MS22, OF178 y PAI5^{T}
Combinación de cuatro cepas	KT2440, MTI 641^{T}, PAI5^{T} y Sp7	MS22, OF178, MTI 641^{T} y PAI5^{T}	KT2440, MS22, PAI5^{T} y Sp7
Combinación de cinco cepas	MS22, OF178, MTI 641^{T}, PAI5^{T} y Sp7	KT2440, OF178, MTI 641^{T}, PAI5^{T} y Sp7	KT2440, MS22, MTI 641^{T}, PAI5^{T} y Sp7

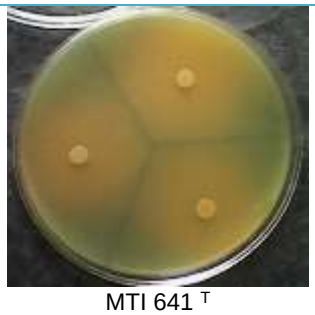
Mezcla de 6 cepas	KT 2440, MS22, OF178, MTI641^{T}, PAI5^{T} y Sp7.	KT 2440, MS22, OF178, MTI641^{T}, PAI5^{T} y Sp7	KT 2440, MS22, OF178, MTI641^{T}, PAI5^{T} y Sp7
Individuales	OF178	 MTI 641 ^{T}	PAI5^{T}
Control		H_2O destilada estéril	

Tabla 9. Se observa el comportamiento de algunas combinaciones realizadas con las cepas bacterianas, tanto individuales como en mezcla, evaluadas a las 24, 48 y 72 horas.

DISCUSIÓN

La inoculación de microorganismos potencia el rendimiento de los cultivos y minimiza el uso de fertilizantes químicos, lo cual representa una estrategia sustentable prometedora (Valetti *et al*., 2018). En este trabajo se realizó la evaluación de la capacidad de la formulación EMMIM-1 para estimular el crecimiento de la flor de "crisantemo" (*Chrysanthemum* sp.). Adicionalmente, se exploró la capacidad de las cepas microbianas de la formulación EMMIM-1 para solubilizar fosfato, ya sea de forma individual como en cointeracción, como posible mecanismo de promoción de crecimiento que ocurre en plantas.

La inoculación del crisantemo con el inoculante multi-especies EMMIM-1, mostró tendencias positivas en la promoción del crecimiento y desarrollo de las plantas en comparación con las no inoculadas (control), en todos los parámetros analizados (altura y diámetro de tallos, peso fresco y seco de la región aérea y de la raíz); pero esta ventaja no fue estadísticamente significativa. Quizás mediante el uso de alguna comparación estadística no paramétrica podrían avalarse las tendencias de mayor tamaño observados en los tratamientos de inoculación; como fue propuesto para evaluar la promoción de crecimiento de *Piriformospora indica* (Sirrenberg *et al*., 2007). Es conocido que la prueba *t* de student, que se usó en nuestro trabajo, es una prueba paramétrica muy exigente y requiere que los datos cumplan la normalización (Hancock *et al*., 1988). En este trabajo, las plantas fueron compradas y la variación entre ellas fue muy alta, por lo que proponemos que las réplicas analizadas no fueron suficientes para cumplir el requisito de normalización de datos, por lo que sugerimos un experimento de mayor magnitud para observar las diferencias significativas.

En contraparte Kumari y cols (2015) observaron que algunas cepas de *Psedomonas* y *Bacillus* fueron capaces de estimular el crecimiento del crisantemo bajo condiciones de campo, posiblemente bajo esas condiciones se favorece la interacción de los microorganismos con las plantas o se desencadena algún mecanismo en dependencia de la expresión de genes (Baez-Rogelio *et al*., 2017). Es importate destacar que en nuestro laboratorio se ha aplicado el inoculante multiespecies con agricultores de la región de Tepeaca-Puebla y han reportado resultados positivos, será importante en un futuro documentar esos resultados para tener una visión mayor de lo que ocurre en condiciones de campo. En otro tipo de flores se han reportado promoción de crecimiento otorgado por la inoculación bacteriana. Por ejemplo, Robledo-Buriticá y cols. (2018), muestran que cepas del género *Bacillus* promueven la formación de mayor número de ramas en plantas inoculadas, pero no detectaron diferencias significativas en parámetos como longitud, diámetro de tallos y flores en las ramas con referencia a las plantas control. Norberto (2011), en sus experimentos con la Nochebuena aunque no encontró diferencias significativas entre los tratamientos inoculados (usando 3 cepas de *Pseudomonas putida*); si encontró diferencias significativas al comparar los tratamientos con el grupo control, resultado este como el mejor. La inoculación de *A. brasilense* en Petunia potenció su desarrollo, mostrando que esta bacteria estimula el crecimiento de esta planta (Toffoli *et al*., 2018). La formulación multiespecies contiene microorganismos reportados como PGPR (Morales-García, 2013; Molina-Romero *et al*., 2015) por lo que se esperaba que estimularan con mayor magnitud el desarrollo de crisantemo. Sin embargo, se sabe que aun la mejor bacteria promotora podría fallar para fitoestimular a la planta en función de las adversidades del ambiente (Baez-Rogelio et al., 2017). Otros experimentos serán requeridos para concluir si las cepas de la formulación multiespecies EMMIM-1 son o no capaces de promover el crecimiento del crisantemo.

Solubilización de fosfatos

Uno de los mecanismos posibles mediante el cual la formulación multiespecies podría promover el crecimiento de las plantas es a través de la solubilización de fosfatos (Khan *et al*., 2007; Molina-Romero *et al*., 2015). Diversas bacterias PGPR tienen la capacidad para solubilizar fosfatos, incluso algunas de las cepas usadas en este trabajo han sido reportadas como solubilizadoras (Molina-Romero *et al*., 2017a). Sin embargo, nunca se ha explorado como esta capacidad podría variar en función con la cointeracción con otros microorganismos beneficiosos. En el presente trabajo se evaluó en condiciones *in vitro* la capacidad de las 6 especies microbianas que conforman al inoculante multiespecies EMMIM-1 para solubilizar fosfatos tanto de manera individual como en las posibles combinatorias de cointeracción. Los datos generados son de frontera y de alto valor para entender como los microorganismos PGPR podrían estar promoviendo el crecimiento de plantas mediante el mecanismo de solubilización de fosfatos.

Combinaciones de dos cepas

De la mezcla en pares de las 6 cepas bacterianas, se observa que todas las combinaciones posibles, son solubilizadoras de fosfatos, la combinación formada por: *G. diazotrophicus* y *A. brasilense,* destacó como la mejor mezcla solubilizadora de fosfato a partir de las 24 horas. A las 72 horas a varias de las cepas ya no es posible medir su diámetro del halo de solubilización porque el espacio fue limitante para el tamaño de halos obtenidos.

Las combinaciones de: *Sphingomonas* sp. y *B. unamae*; *Sphingomonas* sp. y *G. diazotrophicus*; *Sphingomonas* sp. y *A. brasilense*, desde el inicio de su evaluación mantienen un promedio bajo en su halo de solubilización. *Sphingomonas* sp., es una bacteria que es responsable de la degradación de sustancias tóxicas

asociadas a la planta y además contribuye con su crecimiento (Böltner *et al*., 2008; Morales-García, 2013; Molina-Romero *et al*., 2017a; Pazos-Rojas *et al*., 2016), y de alguna manera inhibe el desarrollo a las demás cepas con las que se encuentra en mezcla o bien de su capacidad para producir ácidos orgánicos. Se sabe que los ácidos orgánicos son importantes para la solubilización de fosfatos y su transporte, ya que estos ácidos orgánicos tienen acción directa en la acidificación, quelación, precipitación y en las relaciones de óxido reducción en la rizósfera (Paredes-Mendoza *et al*., 2010).

Combinaciones de tres cepas

Las combinaciones formadas por: *P. putida,* Levadura MS22 y *Sphingomonas* sp**.**; Levadura MS22*, Sphingomonas* sp. y *B. unamae*, se observó que son combinaciones que tienen la capacidad para solubilizar fosfato eficientemente. Mientras tanto las combinaciones formadas por: *Sphingomonas* sp.*, B. unamae* y *G. diazotrophicus*; *Sphingomonas* sp.*, B. unamae* y *G. diazotrophicus*; *Sphingomonas* sp., *G. diazotrophicus* y *A. brasilense*, a pesar de que en un inicio no mostraron halo de solubilización, a las 72 horas se observa su halo de solubilización; el cual posee un promedio bajo en comparación con las demás combinaciones. Además en ese periodo de tiempo (72 horas), también es evidente que algunas de las combinaciones ya no pueden ser evaluadas.

No todas las cepas poseen la capacidad para solubilizar fosfato (Beltrán, 2014), lo cual podría explicar la posible inducción o represión enzimática responsable de la solubilización de fosfatos. La solubilización de fosfatos depende de las condiciones fisiológicas, nutricionales y de crecimiento de los cultivos evaluados (Beltrán, 2014); razón por la cual los resultados obtenidos en esta investigación

pueden ser explicados parcialmente. Además, las combinaciones que desde un inicio no mostraron halo de solubilización, posiblemente se deba a una represión enzimática y por ende la activación del proceso microbiano involucrado en la solubilización, se activó horas más tarde tras la inoculación de las combinaciones en el medio (Restrepo-Franco *et al*., 2015).

Combinaciones de cuatro cepas

Todas las combinaciones realizadas muestran halo de solubilización de fosfatos, observando que las combinaciones formadas por las cepas: *P. putida*, *Sphingomonas* sp., *G. diazotrophicus* y *A. brasilense*; así como *Sphingomonas* sp., *B. unamae, G. diazotrophicus* y *A. brasilense*, muestran desde las 24 hasta las 72 horas un promedio bajo en su diámetro del halo de solubilización en comparación con las demás combinaciones.

Estos resultados podrían ser explicados por la producción de ácidos orgánicos por parte de las cepas bacterianas en cada combinación, lo cual hace posible la inducción de alguno de los procesos microbianos implicados en la solubilización de fosfatos haciendo evidente la formación del halo en las diferentes combinaciones (Paredes-Mendoza et al., 2010). Aun a pesar de saber que *Sphingomonas* sp., es una bacteria que degrada compuestos tóxicos y que además promueve el crecimiento vegetal, en las diferentes combinaciones que se encuentra se observa la capacidad positiva que posee al estar en conjunto para llevar a cabo la solubilización.

Combinaciones de cinco cepas

Se observa que la combinación formada por las cepas: *P. putida**,** Sphingomonas* sp., *B. unamae*, *G. diazotrophicus* y *A. brasilense*, muestra halo de solubilización

hasta las 72 horas de su evaluación, a diferencia de las demás combinaciones que desde el inicio (24 horas) muestran su capacidad positiva para la solubilización de fosfatos. Estos resultados se pueden ser explicados debido a la posible inducción o represión enzimática, la cual es responsable de que ocurra la solubilización (Beltrán-Pineda, 2014), por lo tanto, las combinaciones que muestran solubilización "tardía", hasta las 72 horas quizá se deba a una represión enzimática, evitando de esa manera la expresión de los ácidos orgánicos implicados en la solubilización y transporte de fosfatos (Paredes-Mendoza *et al.,* 2010).

Cepas individuales y en mezcla de las seis cepas

Todas las cepas bacterianas individuales y en mezcla mostraron la capacidad para solubilizar fosfatos; donde *Gluconacetobacter diazotrophicus* resultó ser la cepa bacteriana que mejor solubiliza y *Sphingomonas* sp. resulta ser la cepa bacteriana que solubiliza de manera menos eficiente en comparación con las demás cepas. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Estrada *et al*., 2013, donde demuestran que las bacterias diazotróficas son eficientes en la solubilización de fosfatos, entre las cuales describen a *Gluconacetobacter diazotrophicus* y géneros de *Burkholderia y Herbaspirillum*. En otras investigaciones realizadas por Sánchez *et al*., 2012, se muestran resultados que también coinciden con los obtenidos en este trabajo; en su trabajo ellos analizaron diferentes bacterias solubilizadoras de fosfato, entre ellas están los géneros de, *Enterobacter*, *Pseudomonas putida*, etc., y encontraron que son eficientes para llevar a cabo la solubilización, ya que en condiciones de invernadero, alcanzaron incrementos favorables en los rendimientos del cultivo en comparación con el grupo testigo (químicos).

Respecto a *Sphingomonas* sp., se sabe que es una cepa perteneciente al grupo de las bacterias degradadoras de sustancias tóxicas asociadas a las plantas y en

la producción de frutos libres de tóxicos (Böltner *et al*., 2008; Pazos-Rojas *et al* 2016). Lo observado en este trabajo se observó que es también una bacteria solubilizadora de fosfatos (Li Y *et al*., 2017), por lo cual, al llevar a cabo la solubilización de fosfato, la hace ser un microorganismo benéfico para las plantas.

Lo observado en la mezcla de las 6 cepas en conjunto se observa también la capacidad positiva que poseen estando en conjunto para llevar a cabo dicha solubilización, esto podría ser explicado por el hecho de que todas cepas individualmente muestran ser bacterias solubilizadoras de fosfato por tal razón estando en conjunto las 6 cepas se deduce que trabajan eficientemente cada una aportando beneficios a las plantas, con esto se podría afirmar que si alguna cepa no recibe la señal de activarse las demás lo hacen para que esta se active, y de esa manera se asegure el óptimo crecimiento vegetal, la absorción de nutrientes, la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfatos, la degradación de sustancias tóxicas, la producción de sideróforos, producción de fitohormonas, etc. (Ramos *et al*., 2000; Matos-Cuzcano *et al*., 2003; Basta *et al*., 2004; Caballero-Mellado *et al*., 2007; Rojas-M *et al*., 2007; Cassán *et al*., 2008; Molina-Romero et al., 2015).

Conclusiones

- No se encontraron diferencias estadísticas significativas en la altura y diámetro del tallo del *Chrysanthemum* sp., entre los tratamientos (control e inoculado); sin embargo, las plantas inoculadas presentaron una mayor turgencia y tenían mejor apariencia en comparación al grupo control.

- El peso fresco y seco, tanto aéreo como de la raíz del *Chrysanthemum* sp., de las plantas inoculadas superó en número de población al grupo control, pero estadísticamente no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.

- Las combinaciones de dos y en cuatro cepas microbianas, todas mostraron capacidad positiva para la solubilización de fosfato.

- De las combinaciones de tres cepas microbianas no solubilizan fosfato las combinaciones: **a)** *P. putida,* Levadura MS22 y *Sphingomonas* sp.; **b)** Levadura MS22*, Sphingomonas* sp. y *B.unamae.* Mientras que las combinaciones: **c)** *Sphingomonas* sp., *B. unamae* y *G. diazotrophicus*; **d)** *Sphingomonas* sp., *B. unamae* y *A. brasilense***; e)** *Sphingomonas* sp., *G. diazotrophicus* y *A. brasilense*, presentaron halo de solubilización hasta las 72 horas. El resto de las combinaciones mostraron halo de solubilización desde etapas tempranas de su evaluación.

- La combinación de cinco cepas formada por: *P. putida, Sphingomonas* sp., *B. unamae, G. diazotrophicus* y *A. brasilense*, mostró halo de solubilización hasta las 72 horas. El resto de las combinaciones mostraron halo de solubilización desde el inicio de su evaluación.

- Las cepas individuales y en mezcla mostraron capacidad positiva para solubilizar fosfato; donde se observó que la cepa de *Sphingomonas* sp., muestra el diámetro de menor promedio en comparación con las demás cepas y la mezcla.

- De las combinaciones realizadas, las cepas individuales y la mezcla, en el periodo de evaluación de 72 horas ya no pudieron ser evaluadas algunas de ellas debido a que las tres réplicas de cada una fueron colocadas en una misma caja Petri, es por ello que se recomienda utilizar una caja Petri por cada réplica realizada.

PERSPECTIVAS

- Evaluar el inoculante multi-especies EMMIM-1 en plantas de crisantemo usando un mayor número de réplicas bajo condiciones de invernadero y usando fosfato inorgánico como única fuente externa de fosfatos.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Aeron** A., Kumar S., Pandey P. y Maheshwari D.K. Emerging role of plant growth promoting Rhizobacteria in agrobiology. Bacteria in agrobiology: Crop Ecosystems. 2011: 1-36.
2. **Alatorre**-Cruz J.M. Diseño de inoculante multiespecies para cactus con bacterias resistentes a la desecación. Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias (Microbiología), Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 2013.
3. **Alducin**-Ruiz J. Biolixiviación de plata por *Sphingomonas* sp. A partir de radiografías y tarjetas de circuito impreso provenientes de teclados de computadora (Tesis). Universidad Veracruzana, Xalapa, Ver. 2015.
4. **Armenta**-Bojórquez A.D., García-Gutiérrez C., Camacho-Báez J.R., Apodoca-Sánchez M.A., Gerardo-Montoya L. y Nava-Pérez E. Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. Ra Ximhai. 2010; 6 (1): 51-56.
5. **Assmus** B., Hutzler P., Kirchhof G., Amann R., Lawrence J.R. and Hartmann A. In Situ Localization of *Azospirillum brasilense* in the Rhizosphere of Wheat with Fluorescently Labeled, rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes and Scanning Confocal Laser Microscopy. Environmental Microbiology. 1995; 61(3): 1013-1019.
6. **Augustinova** L., Doležalová J., Matiska P., Wimmerová Z., Kodetová T. Testing the Winter hardiness of selected chrysanthemum cultivars of multiflora type. 2016; 43(4): 203-210.
7. **Bach**-Álvarez T. y Díaz M. Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) en la agricultura. Agricultura orgánica. 2008; 3: 35-38.

8. **Baez**-Rogelio A., Morales-García Y.E., Quintero-Hernández V. y Muñoz-Rojas J. Next generation of microbial inoculants for agricultura and bioremediation. Microbial biotechnology. 2017; 10(1): 19-21.
9. **Bashan** Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. Biotechnology Advances. 1998; 16(4): 729-770.
10. **Basta** T, Keck A, Klein J. and Stolz A. Detection and Characterization of Conjugative Degradative Plasmids in Xenobiotic-Degrading *Sphingomonas* Strains. Journal of Bacteriology. 2004; 186: 3862-3872.
11. **Beltrán**-Pineda M.E. Bacterias solubilizadoras de fosfato con potencial biofertilizante en suelos cultivados con papa. Agron. 2014; 22 (2): 7-20.
12. **Bolívar**-Anillo J.H., Contreras-Zentella L.M. y Teherán-Sierra G.L. *Burkholderia tropica* una bacteria con gran potencial para su uso en la agricultura. Rev.Esp.Cienc.Quím.Biol. 2016; 19(2): 102-108.
13. **Böltner** D., Godoy P., Muñoz-Rojas J., Duque E., Moreno-Morillas S., Sánchez L. y Ramos J.L. Rhizoremediation of lindane by root-colonizing *Sphingomonas*. Microbial Biotechnology. 2008; 1(1): 87-93.
14. **Caballero**-Mellado J., Martínez-Aguilar L., Paredes-Valdez G. y Estrada-de los Santos P. *Burkholderia unamae* sp. nov., an N_2-fixing rhizospheric and endophytic species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2004; 54: 1165–1172.
15. **Caballero**-Mellado J., Onofre-Lemus J., Estrada-de los Santos P. and Martínez-Aguilar L. The Tomato Rhizosphere, an Environment Rich in Nitrogen-Fixing *Burkholderia* Species with Capabilities of Interest for Agriculture and Bioremediation. Environmental Microbiology. 2007; 73(16): 5308-5319.

16. **Camelo**-R M., Vera-M S.P. y Bonilla-B R.R. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. Revista Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 2011; 12(2): 159-166.
17. **Cassán**-Dario F. y García-de Salome I. *Azospirillum sp.*: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. 1a ed. Buenos Aires Argentina. 2008.
18. **Corral**-Lugol A., Morales-García Y.E., Pazos-Rojas L.A., Ramírez-Valverde A., Martínez-Contreras R.D. y Muñoz-Rojas J. Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de "Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo". Rev. Colombiana de Biotecnología. 2012; 14(2): 0123-3475.
19. **Cuadrado** B., Rubio G., Santos W. Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de fríjol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. Rev. Colomb. 2009; 38(1): 78-104.
20. **Cuéllar**-Gaviria T. Z. Evaluación de la promoción de crecimiento de *Bacillus subtilis* EA-CB0575 en cultivos de banano, crisantemo y café (Tesis). Universidad EAFIT, Medellín, Colombia. 2014.
21. **Díaz**-Vargas P., Ferrera-Cerrato R., Almaraz-Suárez J.J. y Alcántar-González G. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. 2001; 19 (4): 327-335.
22. **El-Tarabily** K.A. Suppression of *Rhizoctonia solani* diseasses of sugar beet by antagonistic and plant growth-promoting yeasts. Journal of Applied Microbiology. 2004; 96: 69-75.
23. **El-Tarabily** K.A. y Sivasithamparam K. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. Mycoscience. 2006; 47: 25-35.

24. **Estrada**-Andrés G., Diván-Baldani V.L., Messias-de Oliveira D., Urquiaga S., Ivo-Baldani J. Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. Plant soil. 2013; 369: 115-129.
25. **Flores**-Ruvalcaba J. S., Becerril-Román A. E., González-Hernández V. A., Tijerina-Chávez L. y Vásquez-Rojas T. Crecimiento vegetativo y floral del crisantemo en respuesta a la presión osmótica de la solución nutritiva. Rev. Chapingo serie horticultura. 2005; 11: 241-249.
26. **Goswami** D., Thankker J.N. y Dhandhukia P.C. Portraying mechanics of plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): A review. Cogent Food & Agriculture. 2016; 2: 4-19.
27. **Hancock** A.A., Bush E.N., Stanisic D., Kyncl J.J. y Lin C.T. Data normalization before statistical analysis: keeping the horse before the cart. Trends in Pharmacological Sciences. 1988; 9(1): 29-32.
28. **Hernández**-Tenorio A.L. Viabilidad de bacterias de un inoculante multi-especies y su efecto, a corto plazo, en el crecimiento de *Solanum tuberosum* cv. Atlantic. Tesis de Licenciatura, Escuela de Biología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 2014.
29. **Hoben** H. J y Somasegaran P. Comparison of thee Pour, Spread, and Drop Plate Methods for Enumeration of Rhizobium spp. In Inoculants Made from Presterilized Peat. Environmental Microbiology. 1982; 44 (5): 1246-1247.
30. **Janka** E., Körner O., Rosenqvist E. y Ottosen-otto C. Using the quantum yields of photosystem II and the rate of net photosynthesis to monitor high irradiance and temperature stress in chrysanthemum (Dendranthema grandiflora). Plant Physiology and Biochemistry. 2015; 90: 14-22.
31. **Juárez**-Hernández D. Estudios de interacción de Pseudomonas putida KT2440 con bacterias de la formulación EMMIM-1 en plantas de jitomate

(*Lycopersicon esculentum* Mill). Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias (Microbiología), Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 2015.

32. **Juárez**-Hernández D. Evaluación de la capacidad de un inoculante multiespecies para estimular el crecimiento de frijol. Tesis de Licenciatura, Escuela de Biología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 2013.
33. **Khan** M.S., Zaidi A. y Ahmad E. Mechanism of Phosphate solubilization and physiological functions of Phosphate-solubilizing microorganisms. Phosphate solubilizing microorganisms. 2014: 31-62.
34. **Khan** M.S., Zaidi A. y Wani P.A. Role of Phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agricultura – A review. Agron. Sustain. Dev. 2007; 27: 29-43.
35. **Kumar** S., Kumar M., Yadav H.K., Sharma S. y Kumar S. Genetic diversity and population structure analysis of Chrysanthemum (Dendranthema grandiflora Tzvelev) germplasm based on RAPD markers. Journal of Environmental Biology. 2017; 38: 457-464.
36. **Kumari** A., Goyal R.K., Choudhary M. y Sindhu S.S. Effects of some plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR) strains on growth and flowering of chrysanthemum. Journal of Crop and Weed. 2015; 12(1): 07-15.
37. **Li** Y., Liu X., Hao T and Chen S. Colonization and Maize Growth Promotion Induced By Phosphate Solubilizing Bacterial Isolate. International Journal of Molecular Sciences. 2017; 18: 2-16.
38. **Lutenberg** B. y Kamilova F. Plant – Growth – Promoting Rhizobacteria. Rev. Microbiol. 2009; 63: 541-556.
39. **Lutenberg** B., Dekkers L. y Bloemberg G. Molecular determinants of rhizosphere colonization by Pseudomonas. Rev. Phytopathology. 2001; 39: 461-490.

40. **Matilla** M.A., Ramos J.L.,Bakker P.A.H.M., Doornbos R., Badri D.V., Vivanco J.M. y Ramos-Gonzales M.I. *Pseudomonas putida* KT2440 causes induced systemic resistance and changes in Arabidopsis root exudation. Environmental Microbiology Reports. 2010; 2(3): 381-388.
41. **Matos**-Cuzcano G., Zúñiga-Dávila D. Viabilidad de cepas de rizobios en inoculantes basados en soportes no estériles. Ecología Aplicada. 2003; 2: 81-85.
42. **Mixtega**-Olin R. Diagnóstico nutrimental y medidas correctivas de clavel y crisantemo (Tesis).Universidad Autónoma de Chapingo, México. 2007.
43. **Molina**-Romero D. Diseño de inoculante de segunda generación tolerante a condiciones de desecación. Tesis de Doctorado, Posgrado en Ciencias (Microbiología), Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 2017a.
44. **Molina**-Romero D., Baez A., Quintero-Hernández V., Castañeda-Lucio M., Fuentes-Ramírez L.E., Bustillos-Cristales M.R., Rodríguez-Andrade O., Morales-García Y.E., Munive A. y Muñoz-Rojas J. Compatible bacterial mixture, tolerant to desiccation, improves maize plant growth. PLOS ONE. 2017; 12(11): 1-21.
45. **Molina**-Romero D., Bustillos-Cristales M.R., Rodriguez-Andrade O., Morales-García Y.E., Santiago-Saenz Y., Castañeda-Lucio M. y Muñoz-Rojas J. Mecanismos de fitoestimuación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. Rev. De la DES Ciencias Biológico Agropecuarias. 2015; 17(2): 24-34.
46. **Molina**-Romero D., Morales-García Y.E., Hernández-Tenorio A.L., Castañeda-Lucio M., Netzahuatl-Muñoz A.R. y Muñoz-Rojas J. *Pseudomonas putida* estimula el crecimiento de maíz en función de la temperatura. Rev. Iberoamericana de ciencias. 2017b; 4(1): 80-88.

47. **Morales**-García, Y.E. Antagonismo entre bacterias de interés agrícola y evaluación de inoculantes en la promoción del crecimiento del maíz. Tesis de Doctorado, Posgrado en Ciencias (Microbiología). Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 2013.
48. **Munguía**-Pérez R., Díaz-Cabrera E., Martínez-Montiel N. y Martínez-Contreras R. Fungal diversity in soil samples from a mexican región with endemic dermatomicoses. Micologia Aplicada International. 2011; 23(1): 11-19.
49. **Muñoz**-Rojas J., Morales-García Y.E., Juárez-Hernández D., Fuentes-Ramírez L.E. y Munive-Hernández J.A. Formulación de un inoculante multiespecies para potenciar el crecimiento de plantas. 2016. Solicitud expediente: MX/a/2013/007978.
50. **Nassar**-A.H., El-Tarabily K.A. y Sivasithamparam K. Promotion of plant growth by an auxin-producing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. Biol Fertil Soils. 2005; 42: 97-108.
51. **Norberto**-Silva M. I. Potencial de rizobacterias *Pseudomonas putida* como biofertilizantes para el crecimiento de plantas de Nochebuena "*Euphorbia pulcherrima L*" (Tesis).Universidad Veracruzana, Xalapa, Ver. 2011.
52. **Paredes**-Mendoza M., Espinosa-Victoria D. Ácidos orgánicos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. Terra Latinoamericana. 2010; 28 (1): 61-70.
53. **Parra** Y. y Cuevas F. Potencialidades de *Azospirillum* como inoculante para la agricultura. Cultivos tropicales. 2001; 23(3): 31-41.
54. **Pazos**-Rojas L.A., Marín-Cebada V., Morales-garcía Y.E., Baez A., Villalobos-López M.A., Péres-Santos M. y Muñoz-Rojas J. Uso de microorganismos benéficos para reducir los daños causados por la revolución vede. Revista Iberoamericana de Ciencias. 2016; 3(7): 72-85.

55. **Pazos**-Rojas L.A., Marín-Cevada V., Morales-García Y.E., Báez A., Villalobos-López M.A., Pérez-Santos M., Muños-Rojas J. Uso de microorganismos benéficos para reducir los daños causados por la revolución verde. Rev. Iberoamericana de Ciencias. 2016; 3 (7): 72-85.
56. **Pazos**-Rojas L.A., Rodriguez-Andrade O., Muños-Arenas L.C., Morales-García Y.E., Corral-Lugol A., Quintero-Hernández V., Baez A., Molina-Romero D. y Muñoz-Rojas J. Desiccation-Tolerant Rhizobacteria maintain their plant growth-promoting capability after experiencing extreme wáter stress. SciFed Journal of Applied Microbiology. 2018; 1(1): 1-13.
57. **Ramos** C., Molina L., Mölbak L., Ramos-L J., Molin S. A bioluminescent derivative of *Pseudomonas putida* KT2440 for deliberate release into the environment. FEMS Microbiology Ecology. 2000; 34: 91-102.
58. **Rego** JL., Viana TVA., Azevedo BM., Araújo WF., Furlan RA., Bastos FGC Produtividade de crisântemo em função de níveis de irrigação. Horticultura Brasileira. 2009; 27: 045-048.
59. **Restrepo**-Franco G.M., Marulanda-Moreno S., De la Fe-Pérez Y., Díaz-de la Osa A., Lucia-Baldani V., Hernández-Rodríguez A. Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la producción del crecimiento de cultivos de importancia económica. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 2015; 46 (1): 63-76.
60. **Reyes**-Ramírez A., López-Arcos M., Ruiz-Sánchez E., Latournerie-Moreno L., Pérez-Gutiérrez A., Lozano-Contreras M.G y Zavala-León M.J. Efectividad de inoculantes microbianos en el crecimiento y productividad de chiles habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). 2014; 48 (3): 285-294.
61. **Ríos**-Rocafull Y., Dibut-Álvarez B., Rojas-Badía M., Ortega-García M., Arozarena-Daza N. y Rodríguez-Sánchez J. interacción de la bacteria

Gluconacetobacter diazotrophicus y hortalizas de raíz. Cultivos tropicales. 2016; 37: 28-32.

62. **Ríos**-Rocafull Y., Rojas-Badia M., Ortega-García M., Dibut-Álvarez B y Rodríguez-Sánchez J. Aislamiento y caracterización de cepas de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Cultivos tropicales. 2016; 37 (1): 34-39.
63. **Robledo**-Buriticá J., Aristizábal-Loaiza J.C., Caballos-Aguirre N. y Cabra-Cendales T. Influence of plan growth-promoting rhrizobacteria (PGPR) on blackberry (*Rubus glaucus* Benth. cv. thornless) growth under semi-cover and field conditions. Acta agronómica. 2018; 67(2): 258-263.
64. **Rodríguez** H., Fraga R., González T. y Bashan Y. Genetics of Phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. Plant and Soil. 2006; 287: 15-21.
65. **Rodríguez**-Andrade O., Fuentes-Ramírez L.E., Morales-García Y.E., Molina-Romero D., Bustillos-Cristales M.R., Martínez-Contreras R.D. y Muñoz-Rojas J. The decrease in the population of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane after nitrogen fertilization is related to plant physiology in Split root experiments. Rev. Argentina de Microbiología. 2015; 47(4): 335-343.
66. **Rojas** M.M., Rodríguez A.J., González L. y Heydrich M. Influencia de diferentes factores en el crecimiento de bacterias endófitas de caña de azúcar. Rev. Colomb. Biotecnol. 2015; 17(2):149-155.
67. **Rojas**-M M., González O., Rojas N. y Heydrich M. Interacciones entre *Gluconacetobacter diazotrophicus* y la comunidad bacteriana endófita de la caña de azúcar. Cultivos tropicales. 2007; 28(3): 11-16.
68. **Salazar**-Cerezo S., Martínez-Montiel N., Cruz-López M.C. y Martínez-Contreras R.D. Fungal diversity and community composition of culturable

fungi in *Stanhopea trigrina* cast gibberellin producers. Frontiers in Microbiology. 2018; 9: 1-15.

69. **Sánchez**-López D.B., Gómez-Vargas R.M., Garrido-Rubiano M.F., Bonilla-Buitrago R.R. Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 2012; 3 (7): 1401-1415.
70. **Sanjaya** L., Marwoto B., Budiarto K. y Fibrianty E. The evaluation of Chrysanthemum clones under low elevation. 2018; 40(2): 193-201.
71. **Santiago**-Sáenz Y. Efecto de un inoculante multiespecies en papa (*Solanum tuberosum* L. cv. Atlantic) propagada en laboratorio y crecida en invernadero. Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias (Microbiología), Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 2014.
72. **Saravanan** V.S., Kalaiarasan P., Madhaiyan M. and Thangaraju M. Solubilization of insoluble zinc compounds by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and the detrimental action of zinc ion (Zn^{2+}) and zinc chelates on root knot nematode *Meloidogyne incognita*. Applied Microbiology. 2006; 44: 235-241.
73. **Sirrenberg** A., Göbel C., Grond S., Czempinski N., Ratzingen A., Karlovsky P., Santos P., Feussner I. y Pawlowski K. *Piriformospora indica* affects plant growth by auxin production. Physiologia Platarum. 2007; 131: 581-589.
74. **Tejera**-Hernández B., Heydrich-Pérez M y Rojas-Badía M.M. Aislamiento de Bacillus solubilizadores de fosfatos asociados al cultivo del arroz. Agronomía Mesoamericana. 2013; 24 (3): 357-364.
75. **Timmis** K. N. *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. Environmental Microbiology. 2002; 4 (12): 779-781.

76. **Toffoli**-L.M., Medrano N.N., Martínez-Zamora., Guerrero-Molina M.F., Pedraza R.O. y Salazar S.M. Performance of petunia crop in response to inoculantion with *Azospirillum brasilense*. Rev. Agron. Noroeste Argent. 2018; 38(1): 45-49.
77. **Trujeque**-Montiel C. V. Diversidad de bacterias fijadoras de nitrógeno, simbiontes de ambientes forestales de leguminosas, de la sierra norte del estado de Puebla. Puebla, México, Tesis de Doctorado, Posgrado en Ciencias (Microbiología), Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 2009. p. 49.
78. **Trujillo**., Díaz A., Hernández A y Heydrich M. Antagonismo de cepas *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia* contra hongos fitopatógenos de arroz y el maíz. Rev. Protección Veg. 2007; 22 (1): 41-46
79. **Valetti** L., Iriarte L. y Fabra A. Growth promotion of rapeseed (*Brassica napus*) associated with the inoculation of phosphate solubilizing bacteria. Applied Soil Ecology. 2018: 1-10.
80. **Villanueva**-Couoh E., Alcántar-González G., Sánchez-García P., Soria-Fregoso M. y Larque-Saavedra A. Nutrición mineral con N, P y K para la producción de *Chrysanthemum morifolium.* Rev. Terra Latinoamericana. 2010; 28: 43-52.
81. **Vivanco**-Calixto R., Molina-Romero D., Morales-García Y.E., Quintero-Hernández V., Munive-Hernández A., Baez-Rogelio A. y Muñoz-Rojas J. Reto agrobiotecnológico: inoculantes bacterianos de segunda generación. Alianzas y tendencias. 2016; 1(1): 9-19.
82. **Vyas** P. y Gulati A. Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by Phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. BMC Microbiology. 2009; 9: 174.