

BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO CON POTENCIAL BIOFERTILIZANTE EN SUELOS CULTIVADOS CON PAPA (*Solanum tuberosum*)

Mayra Eleonora Beltrán-Pineda*

* Grupo de investigación Gestión ambiental, Universidad de Boyacá, Tunja, Boyacá. Correo electrónico: mebeltran@uniboyaca.edu.co

Recibido: marzo 3 de 2014; aprobado: mayo 12 de 2014

RESUMEN

Las bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) son un grupo de microorganismos que pueden ser la base para la formulación de biofertilizantes, estos son insumos que reemplazan en gran medida a los fertilizantes fosforados de tipo sintético cuya aplicación desmedida ha causado graves problemas a nivel ambiental. En esta investigación se aislaron 21 cepas de BSF presentes en la rizósfera de cultivos de papa (*Solanum tuberosum*), utilizando el medio de cultivo selectivo NBRIP, evaluándose a nivel *in vitro* para conocer su capacidad de solubilizar fosfato a través de técnicas cualitativas como la determinación del diámetro de halo de solubilización y cuantitativas para determinar la cantidad de fosfato solubilizado en medio de cultivo líquido por medio del método colorimétrico del azul de molibdeno. Se lograron seleccionar dos cepas con potencial pertenecientes a los géneros *Enterobacter* sp. y *Streptococcus* sp., estos géneros bacterianos ya han sido reportados como solubilizadores de fosfato en estudios previos y podrían utilizarse para la realización de ensayos *in vivo* con el fin de evidenciar su capacidad biofertilizante en plántulas de papa.

Palabras clave: bacterias solubilizadoras de fosfato, biofertilizantes, suelos, papa.

ABSTRACT

PHOSPHATE SOLUBILIZING BACTERIA WITH BIO-FERTILIZER POTENTIAL IN SOILS CULTIVATED WITH POTATO (*Solanum tuberosum*)

Phosphate solubilizing bacteria (PSB) are a group of microorganisms that can be the basis for the formulation of biofertilizers which are input that can largely replace synthetic phosphate fertilizers whose excessive application has caused serious problems to the environment. In this research 21 PSB strains present in the rhizosphere of potato (*Solanum tuberosum*) crops were isolated using the NBRIP selective culture medium and were evaluated *in vitro* to know their ability to solubilize phosphate through qualitative techniques such as determination of the solubilization halo diameter, and quantitative techniques to determine the amount of phosphate solubilized in liquid culture medium through the molybdenum blue colorimetric method. It was possible to select two potential strains belonging to the *Enterobacter* sp. and *Streptococcus* sp. Genera. These bacterial genera have already been reported as phosphate solubilizing in previous studies and could be used for conducting *in vivo* trials in order to demonstrate their biofertilizer capacity on potato seedlings.

Key words: phosphate solubilizing bacteria, biofertilizers, soils, potato.

INTRODUCCIÓN

La agricultura intensiva en el trópico es una de las causas más frecuentes de contaminación ambiental, las actividades agrícolas requieren de suelos óptimos en términos de sus características fisicoquímicas y biológicas para poder suplir las necesidades alimentarias de la población; sin embargo, estos solo pueden obtenerse con la aplicación constante de agroquímicos. Se conoce que la demanda de fertilizantes químicos ha crecido en las últimas décadas y su consumo es cada vez más habitual (Moreno *et al.*, 2011); no obstante, se considera que los agroecosistemas son ineficientes a causa de la baja eficacia de los fertilizantes; se conoce que entre el 50 y el 70 % de dichos insumos salen del sistema suelo en los lixiviados antes de poder ser tomados por las plantas debido a que estas no los utilizan al mismo tiempo, por lo que el suelo no es capaz de retenerlos para una continua absorción radicular (Chica, 2008).

Específicamente, para el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum*), Alvarado *et al.* (2009) afirman que se requiere de una elevada disponibilidad de fósforo en el suelo para favorecer el buen desarrollo radicular y aéreo en la etapa de establecimiento de las plántulas; este nutriente es fundamental para la formación de compuestos celulares ricos en energía y acelerar la fase de maduración de la planta, así como estimular el crecimiento de las raíces; sin embargo una gran proporción del fosfato inorgánico soluble aplicado a los suelos en forma de fertilizantes sintéticos es rápidamente inmovilizado tras la aplicación, haciéndose no disponible para las plantas (Fankem *et al.*, 2006).

De acuerdo con Soto (1998), en el cultivo de la papa, la eficiencia en la extracción de todos los nutrimentos es inferior al 10 % del total disponible en el suelo y en el caso del P algo menos del 3 %; por esta razón, se requiere aplicar altas cantidades de fertilizante fosfatado. El uso excesivo de fertilizantes en la agricultura es un problema que no solo afecta a la economía desde el punto de vista de costos de producción, sino que también puede

generar desequilibrios en el suelo que perjudican su fertilidad; además de provocar niveles elevados de contaminación ambiental (Yepis *et al.*, 1999; Gyaneshwar *et al.*, 2002).

Los insumos químicos aplicados en los sistemas agrícolas establecidos en zonas de alta precipitación como los trópicos tienen la propiedad de que suelen pasar casi directamente a través del suelo a las aguas subsuperficiales o acuíferas, convirtiéndose en fuente de contaminación hídrica (Chica, 2008). Asimismo, el uso creciente de fertilizantes ha contribuido a que se genere una alta concentración de nutrientes en los cursos y espejos de agua superficial, generándose problemas de eutrofización e hipereutrofización de los recursos hídricos.

Por otra parte, Nziguheba y Smolders (2008) indican que algunas trazas de metales pesados pueden llegar a los suelos agrícolas gracias a los fertilizantes minerales y por lo tanto constituyen un riesgo potencial para el ambiente y la salud humana. Debido a los largos períodos de aplicación se aumenta la concentración total de metales en el suelo, de ahí su concentración en la cadena trófica (Jones *et al.*, 1987). Los fertilizantes fosforados son generalmente la mayor fuente de trazas de metales, principalmente del cadmio, entre todos los fertilizantes minerales sintéticos (Nicholson *et al.*, 2003).

Debido a los problemas ecológicos comentados, los cuales son provocados por el uso intensivo e inadecuado de los fertilizantes minerales sintéticos en especial los fosforados, la agricultura mundial en los últimos años está encaminada a fomentar estrategias sostenibles que obtengan altos rendimientos con bajas aplicaciones de agroquímicos; por lo que se ha promovido la idea de fabricar productos de origen orgánico o de tipo biológico que favorezcan la recuperación del recurso suelo; dentro de estos se incluyen los biofertilizantes (Terry, 2001).

La biofertilización es una alternativa que permite brindar a las plantas los nutrimentos necesarios para

su desarrollo y reducir los costos de producción por la disminución de las tasas de aplicación de fertilizantes sintéticos, lo que indirectamente mejora la calidad ambiental (Castilla, 2006). Estos fertilizantes biológicos son producidos gracias a la selección de microorganismos benéficos presentes en los suelos, conocidos como microorganismos promotores de crecimiento vegetal o PGPM (por sus siglas en inglés) (Beare *et al.*, 1997), algunos de estos microorganismos muestran alta eficiencia a la hora de proveer los nutrientes necesarios para las plantas en formas realmente disponibles y asimilables debido a una serie de transformaciones químicas (Kadiri *et al.*, 2013).

Las bacterias solubilizadoras de fosfato son un grupo de PGPM que permite incrementar la eficiencia de la adquisición de fosfato por parte de las plantas a través de la hidrólisis del fósforo a su forma inorgánica soluble conocida como ortofosfatos; los cuales se pueden encontrar como iones monobásicos (H_2PO_4^-) y dibásicos (HPO_4^{2-}) (Banerjee *et al.*, 2010). Estas son las formas de fosfato asimilables por las plantas, por esta razón se considera que estos organismos son componentes fundamentales del ciclo del P en el suelo (Deubel *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2006). Souchie *et al.* (2006) afirman que la aplicación de microorganismos solubilizadores de fosfato como inóculo en los suelos es una alternativa para mejorar la disponibilidad de P en las plantas; además, se conoce que la utilización de estos microorganismos benéficos en la agricultura permite obtener mayores rendimientos agrícolas (Hedge *et al.*, 1999).

En Colombia, la agricultura ocupa un renglón destacado en la economía; mientras que el departamento de Boyacá es el segundo productor de papa (*Solanum tuberosum*) a nivel nacional (Ministerio de Agricultura, 2005); no obstante, áreas protegidas

de este departamento tales como los páramos — que son zonas estratégicas por su función como abastecedores de agua— están siendo utilizadas para la producción a gran escala de este cultivo, haciendo que se vea afectada la calidad de sus suelos por la constante aplicación de agroquímicos en especial de fertilizantes. Sin embargo, se conoce que estas zonas muestran un potencial biotecnológico importante debido a las condiciones climáticas extremas a las que se encuentran adaptadas las diferentes especies que lo habitan especialmente los microorganismos (Sturm y Rangel, 1985).

Por tanto, el objetivo de esta investigación fue el de aislar y evaluar las bacterias solubilizadoras de fosfato a partir de la rizósfera de la *Solanum tuberosum* establecidas en suelos de páramo con el fin de seleccionar cepas promisorias *in vitro* para la futura realización de ensayos *in vivo* que permitan determinar la capacidad biofertilizante de estos microorganismos en plántulas de papa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de suelo

Se obtuvieron muestras de suelo a partir de cuatro zonas de páramo cultivadas con papa (*Solanum tuberosum*) en el municipio de Ventaquemada (Boyacá) a una altura aproximada de 3200 msnm. De cada cultivo se tomaron diez muestras de suelo rizosférico que conformaron una muestra compuesta de 1 kg; estas muestras fueron rotuladas y almacenadas en refrigeración para su posterior análisis microbiológico y fisicoquímico. Las características fisicoquímicas de las muestras compuestas obtenidas se evidencian en la Tabla 1.

Tabla 1. Características fisicoquímicas de los suelos estudiados

Finca	Textura	pH	%MO	P(ppm) Bray II	meq/100g					
					Al	Ca	Mg	K	Na	CIC
El Recuerdo (1)	Franco arcilloso arenoso	5,07	19,67	57,03	2,58	2,45	0,20	0,37	0,08	5,68
Villa Rosa (2)	Franco arenoso	4,72	13,45	37,76	2,22	2,09	0,37	0,22	0,13	5,04
Zarcillejos (3)	Orgánico	5,2	21,2	18,8	1,0	3,48	0,44	1,12	0,05	6,69
La Escuela (4)	Franco arenoso	5,2	15,7	60,5	1,0	2,04	0,16	0,11	0,07	3,38

CIC: capacidad de intercambio catiónico.

Aislamiento de las bacterias solubilizadoras de fosfato

Para el aislamiento de los microorganismos de interés se utilizaron diluciones seriadas y siembra en medio de cultivo selectivo NBRIP (National Botanical Research Institute Phosphate growth médium) formulado por Nautiyal (1999). Este medio contiene en (g/L): glucosa 10; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1; KCl 0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5; agar 14; pH 7. Las cajas se incubaron a 28 °C durante 14 días, según Nautiyal (*et al.*, 1999) y Kadir *et al.* (2013), al final del período de incubación se seleccionaron las bacterias que mostraron actividad solubilizadora de fosfato la cual se ve representada por la aparición de halos claros alrededor de las colonias (Chakraborty *et al.*, 2010). Se realizó el proceso de purificación de los aislamientos, luego estos fueron criopreservados siguiendo el protocolo sugerido por Sánchez y Corrales (2005) puesto que se quería consolidar un banco de cepas para análisis posteriores.

Evaluación cualitativa de la actividad solubilizadora de fosfato

Las cepas de bacterias solubilizadoras criopreservadas fueron reactivadas sembrando alícuotas de 10 μL del criovial después de su descongelación en cajas de agar nutritivo (Oxoid®), estas fueron incubadas a 28 °C durante 24 horas, luego se realizó un subcultivo

por triplicado en medio de cultivo NBRIP sólido obteniendo así tres réplicas del halo de solubilización de cada aislado. A partir de los diámetros de los halos de solubilización y los diámetros de las colonias bacterianas se pudo determinar la eficiencia de solubilización de cada una de las cepas según Seshadri *et al.* (2000). En este ensayo se utilizó la cepa *Pseudomonas fluorescens* (IBUN Pf095) como cepa control, dicha bacteria fue donada por el Cepario del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia y ha sido reportada como solubilizadora de fosfato en estudios previos (Lara, 2007; Beltrán, 2009).

Evaluación cuantitativa de la actividad solubilizadora de fosfato

Esta evaluación se realizó por duplicado para cada bacteria utilizando la prueba analítica Spectroquant® Test fosfatos (Merck®), cuyo principio se fundamenta en el método del azul molibdeno sugerido por Chen *et al.* (2006); siendo un procedimiento análogo al US Standart methods 4500-P (APHA, 2012) adaptado a las condiciones del ensayo. De cada aislado se realizó un cultivo en 10 mL de caldo nutritivo (Oxoid®) con incubación a 28 °C durante 24 horas, luego se tomó 1 mL del mismo y se centrifugó a 7000 rpm/5 minutos, se retiró el sobrenadante y se llevó la suspensión bacteriana con solución salina estéril al 0,85 % a DO de 1 a 541 nm. Se tomaron alícuotas de

100 µL a partir de dicha suspensión, se inocularon en 50 mL del medio de cultivo NBRIP líquido (sin agar bacteriológico) y fueron incubadas durante 14 días a 28 °C.

Al final del proceso de incubación se centrifugaron los cultivos a 5000 rpm/5 minutos para poder medir el pH final del medio de cultivo (Charakborty *et al.*, 2010) y se tomaron alícuotas de 5 mL del sobrenadante con el fin de realizar la prueba colorimétrica para la determinación de ortofosfatos, se realizó la lectura en espectrofotómetro a 690 nm y se detectó la concentración de fosfato soluble en mg/L (ppm) gracias a la curva de calibración realizada usando como solución patrón KH_2PO_4 (Naik *et al.*, 2008; Banerjee *et al.*, 2010). En el ensayo, la cepa control actuó como control positivo del proceso y el control negativo fue medio de cultivo sin inóculo.

Identificación fenotípica de aislados sobresalientes

La identificación fenotípica de las bacterias que mostraron potencial biofertilizante sobresaliente, según los criterios de mayor eficiencia de solubilización y de acuerdo con la proporción entre el tamaño del diámetro del halo y el tamaño de la colonia al igual que las de mayor cantidad de fosfato solubilizado en medio de cultivo líquido, se realizó empleando el panel de identificación BBL Crystal para gram negativos entéricos no fermentadores ID system y BBL Crystal para gram positivos ID System (Becton Dickinson, Spark, Maryland).

Análisis de resultados

Debido a que los datos generados en el estudio no cumplieron el supuesto estadístico de normalidad se realizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis por pares a un nivel de significancia del $P=0,05$ para verificar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los aislamientos. Posteriormente se realizó la prueba LSD al 5 % de significancia para realizar las comparaciones múltiples entre los aislados

en cuanto al diámetro de halo de solubilización, índice de eficiencia de solubilización, concentración de fosfato soluble en medio líquido y pH final del medio de cultivo. Se realizó una prueba de correlación de Pearson entre el pH del medio y la concentración de ortofosfatos presentes en el medio de cultivo al final del proceso de incubación para conocer la posible correlación entre estos parámetros. El análisis estadístico de los datos se hizo con ayuda de los programas MINITAB ® Release 14, Statistical Software y Statgraphics plus versión 5.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación cualitativa de la actividad solubilizadora

En el proceso de aislamiento se lograron encontrar 21 cepas bacterianas con actividad solubilizadora de fosfato en los suelos estudiados, las cuales fueron codificadas según el terreno en el que se aislaron; en la Tabla 2 se puede observar el diámetro de halo de solubilización después de los 14 días de incubación y la eficiencia de solubilización para cada uno de los aislados. Es importante anotar que algunos de los aislamientos bacterianos después de la reactivación no mostraron los halos de solubilización que si habían mostrado con anterioridad en el mismo medio de cultivo, estos corresponden a los aislamientos con código 1-BSF-01, 3-BSF-01, 4-BSF-02, 4-BSF-05, 4-BSF-06, 4-BSF-09 y 4-BSF-10. Sin embargo, no fueron descartados y se sometieron a la cuantificación de su actividad solubilizadora en medio de cultivo líquido.

Se conoce que en ocasiones se puede mostrar inestabilidad del carácter solubilizador en algunas cepas después de varios ciclos de inoculación (Kucey, 1983; Illmer & Schinner, 1995; Halder *et al.*, 1990; Reddy *et al.*, 2002; Osorio, 2010) lo cual podría suponer una variación en la expresión de los genes que confieren el fenotipo solubilizador, que son aquellos que codifican para la quinoproteína glucosa deshidrogenasa (GDH) y la gluconato deshidrogenasa

(GADH); siendo los componentes de la ruta de oxidación directa de la glucosa en los que se producen diversos ácidos orgánicos que son responsables de

la solubilización de fosfatos (Babu-Khan *et al.*, 1995; Pérez *et al.*, 2007).

Tabla 2. Diámetro de halo y eficiencia de solubilización por parte de las bacterias solubilizadoras de fosfato aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*)

Código del aislamiento	Diámetro de la colonia(mm)	Diámetro del halo de solubilización(mm)	Índice de eficiencia (%)
1-BSF-01	2,0	0,0 _h	0,0 _g
1-BSF-02	3,7	2,7 _{cd}	75,6 _{def}
1-BSF-03	2,0	2,0 _f	100,0 _{bcd}
2-BSF-01	3,3	2,0 _f	61,1 _{def}
2-BSF-02	2,7	3,3 _e	138,9 _{abc}
2-BSF-03	3,0	2,0	72,2 _{def}
3-BSF-01	2,0	0,0 _h	0,0 _g
3-BSF-02	2,0	1,3 _g	66,7 _{def}
3-BSF-03	3,0	2,0 _f	72,2 _{def}
3-BSF-04	2,0	2,3 _e	116,7 _{bcd}
3-BSF-05	1,3	1,7	150,0 _{ab}
4-BSF-01	10,0	2,3 _e	27,8 _{fg}
4-BSF-02	3,0	0,0 _h	0,0 _g
4-BSF-03	8,0	6,3 _{bc}	85,2 _{cde}
4-BSF-04	6,0	9,3 _a	155,6 _{ab}
4-BSF-05	2,0	0,0 _h	0,0 _g
4-BSF-06	4,0	0,0 _h	0,0 _g
4-BSF-07	6,7	7,7 _b	115,1 _{bcd}
4-BSF-08	2,3	4,7 _{bcd}	200,0 _a
4-BSF-09	2,0	0,0 _h	0,0 _g
4-BSF-10	2,0	0,0 _h	0,0 _g
Control +	3,3	1,3 _g	41,7 _{ef}

BSF: bacteria solubilizadora de fosfato tricálcico a 0,5 %. Diámetro de colonia, diámetro del halo y el índice de eficiencia de solubilización son promedio de tres replicas. Control +: *Pseudomonas fluorescens* (IBUN Pfl 095). Letras iguales no difieren significativamente según la prueba de LDS al 5 %.

Los halos de solubilización para las bacterias en estudio, que si lo mostraron después del proceso de

reactivación, oscilaron entre 1,3 mm para el aislado 3-BSF-02 y 9,3 mm para el aislado con código 4-BSF-04; en este caso, el control positivo cepa IBUNPfl095 mostró un halo de solubilización de 1,3 mm; este valor es bajo con respecto a la mayoría de los aislados en estudio (Tabla 2). Los resultados obtenidos en este ensayo son comparables a los reportados por Beltrán (2009), quien encontró halos de solubilización para los aislamientos bacterianos provenientes de

cultivos de arroz entre 1,66 y 8,33 mm; de igual manera Fernández *et al.* (2005), estudiando bacterias solubilizadoras en suelos argentinos, encontraron halos de solubilización entre 4 y 15 mm.

Sin embargo los resultados de este estudio son inferiores a los reportados por Fankem *et al.* (2006), quien aisló bacterias solubilizadoras en plantaciones de palma de cera encontrando halos de solubilización para fosfato tricálcico que oscilaron entre 21 y 41,63 mm. Se conoce que la variación entre el diámetro de halo entre aislados sugiere la existencia de diferentes grados de actividad solubilizadora (Pérez *et al.*, 2007).

En cuanto al índice de eficiencia de solubilización se puede observar que el aislado con código 4-BSF-08 mostró una eficiencia del 200 %, a pesar de no tener un tamaño de halo tan grande el control positivo mostró un índice de eficiencia del 41,7 % (Tabla 2); el cual es un valor inferior al que se puede evidenciar para la mayoría de los aislados bacterianos en estudio. En la investigación realizada por Fankem *et al.* (2006) se reportaron porcentajes de eficiencia de hasta 2,3 %, que son valores inferiores a los encontrados en esta investigación. Alikhani *et al.* (2006), estudiando la actividad solubilizadora de rizobios nativos de suelos en Irán, encontró eficiencias de solubilización de hasta 248 %; estos son valores comparables a los registrados en esta oportunidad. Dentro de los aislamientos evaluados en suelos venezolanos por Pérez *et al.* (2007) se encontraron eficiencias de hasta 375 %; superiores a las reportados en este estudio.

Evaluación cuantitativa de la actividad solubilizadora

En este análisis se pudo observar que la totalidad de bacterias evaluadas cuantitativamente mostraron actividad solubilizadora, a pesar de que algunas no mostraron halo de solubilización en medio de

cultivo sólido. Esta situación también se evidenció en el trabajo realizado por Deubel y Merbach (2000), quienes evaluaron ocho cepas solubilizadoras de fosfato tricálcico encontrando que solo dos de ellas mostraron un halo de solubilización en medio sólido; mientras que una de las que no lo mostró fue la más eficiente a la hora de solubilizar en medio líquido.

En la Tabla 3 se evidencia la actividad solubilizadora de fosfato en medio NBRIP líquido por parte de los aislamientos bacterianos y el pH final del medio de cultivo. Se puede evidenciar que el aislado que presentó la mayor actividad fue el 4-BSF-04 que solubilizó 3026,1 mgPO₄/L (ppm) y el que mostró la menor actividad fue el 3-BSF-01 que solubilizó solo 2,0 mgPO₄/L (ppm). Gran parte de los aislamientos presentaron actividades superiores a la registrada por el control positivo, el cual fue de 1214,2 mgPO₄/L (ppm).

BSF: bacteria solubilizadora de fosfato tricálcico a 0,5 %. Control +: *Pseudomonas fluorescens* (IBUN PfI 095). Actividades reportadas son promedio de dos replicas. Letras iguales no difieren significativamente según la prueba de LDS al 5 %.

A pesar de que según el análisis estadístico de datos algunos aislamientos no son diferentes entre ellos en cuanto a su capacidad solubilizadora tal como es el caso de las cepas con código 3-BSF-01 y el 1-BSF-01; es evidente que las concentraciones de ortofosfatos registrados para los aislamientos en estudio son heterogéneas, esto podría explicarse gracias a procesos de inducción o represión del sistema enzimático responsable de la solubilización (Illmer & Schinner, 1995). Se conoce que la solubilización de fosfatos es un fenómeno que depende de muchos factores incluidos las condiciones fisiológicas, nutricionales y de crecimiento de los cultivos sometidos a evaluación (Chen *et al.*, 2006; Chun-qiao *et al.*, 2013).

Tabla 3. Cuantificación de fosfato solubilizado en medio de cultivo NBRIP líquido y pH final del medio de cultivo por parte de las bacterias solubilizadoras de fosfato aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*)

AISLADO	pH	[PO ₄] en mg/L
1-BSF-01	6,0 _b	214,1 _g
1-BSF-02	6,0 _b	115,4 _g
1-BSF-03	7,0 _a	433,7 _{fg}
2-BSF-01	5,0 _d	1407,4 _{cd}
2-BSF-02	5,0 _d	1313,9 _{dc}
2-BSF-03	5,0 _d	1242,5 _{dc}
3-BSF-01	6,0 _b	2,0 _g
3-BSF-02	6,0 _b	41,9 _g
3-BSF-03	6,0 _b	34,5 _g
3-BSF-04	5,0 _d	584,9 _{abc}
3-BSF-05	6,0 _b	130,1 _g
4-BSF-01	6,0 _b	152,2 _g
4-BSF-02	5,0 _d	3140,6 _a
4-BSF-03	5,0 _d	2819,2 _{ab}
4-BSF-04	5,0 _d	3026,1 _a
4-BSF-05	4,5 _e	2583,9 _{ab}
4-BSF-06	6,0 _b	205,8 _g
4-BSF-07	5,5 _c	1505,1 _{cd}
4-BSF-08	5,5 _c	1259,3 _{dc}
4-BSF-09	5,0 _d	2160,6 _{bcd}
4-BSF-10	5,0 _d	2987,3 _a
Control +	5,0 _d	1214,2 _{ef}

Los resultados obtenidos en esta investigación son superiores a los reportados en varios estudios entre ellos el realizado por Fernández *et al.* (2005), que encontraron actividades de hasta 241 ppm de fósforo soluble en cepas bacterianas aisladas de suelos argentinos; Fankem *et al.* (2006), evaluando bacterias aisladas de la rizósfera de palma de cera, encontraron actividades de hasta 308,3 ppm de fosfato soluble por parte de uno de sus aislamientos y Chen *et al.* (2006) encontraron concentraciones de hasta 519,7 ppm de fosfato soluble para bacterias solubilizadoras de fosfato en suelos de Taiwán.

Naik *et al.* (2008), estudiando la diversidad genética y funcional de cepas de *Pseudomonas fluorescens*

solubilizadoras de fosfato aisladas de suelos rizosféricos, encontraron actividades de hasta 105 ppm de fosfato soluble. Por su parte Oliviera *et al.* (2008), estudiando microorganismos solubilizadores de fosfato en suelos brasileños cultivados con maíz, encontraron concentraciones de P soluble de hasta 200 ppm para sus aislamientos bacterianos.

En este estudio se pudo observar que la mayoría de los aislados acidificaron el medio de cultivo con respecto al pH inicial del mismo, el cual fue de 7,0 con excepción del aislado 1-BSF-03 que no exhibió disminución del pH del medio al final del tiempo de incubación (Tabla 3). Estos resultados también fueron encontrados por Fankem *et al.* (2006), Chen

et al. (2006), Naik *et al.* (2008) y Banerjee (2010). Existen algunos reportes que indican que la liberación de H^+ para balancear la toma de NH_4^+ por parte de microorganismos participa en la disminución del pH del medio de cultivo y aumenta la solubilidad de los fosfatos inorgánicos (Gyaneshwar *et al.*, 2002; Scervino *et al.*, 2010; Chun-qiao *et al.*, 2013).

No obstante, se conoce que la solubilización de fosfatos no se correlaciona necesariamente con la acidez; Kim *et al.* (1997) indicaron que algunos aislamientos que no producen ácidos orgánicos, los cuales son los principales responsables de la acidificación del medio, solubilizan fosfato indicando que otras sustancias pueden estar implicadas en el proceso de solubilización. Se conoce que la capacidad

de solubilización depende de la naturaleza de la fuente de nitrógeno usada en el medio de cultivo (Beltrán, 2014) y que el proceso también se puede deber a la excreción de sustancias quelantes tales como los sideróforos que forman complejos estables con absorbentes de fósforo incluyendo al hierro, aluminio o calcio, liberando el fosfato ligado a estos elementos (Welch *et al.*, 2002).

En la Figura 1 se puede observar el análisis de correlación entre el pH final del medio de cultivo y la concentración de ortofosfatos en el medio después del proceso de incubación, en este análisis se evidencia que existe una relación lineal negativa estadísticamente significativa entre estas dos variables ($r: -0,674$ y $p: 0,000$).

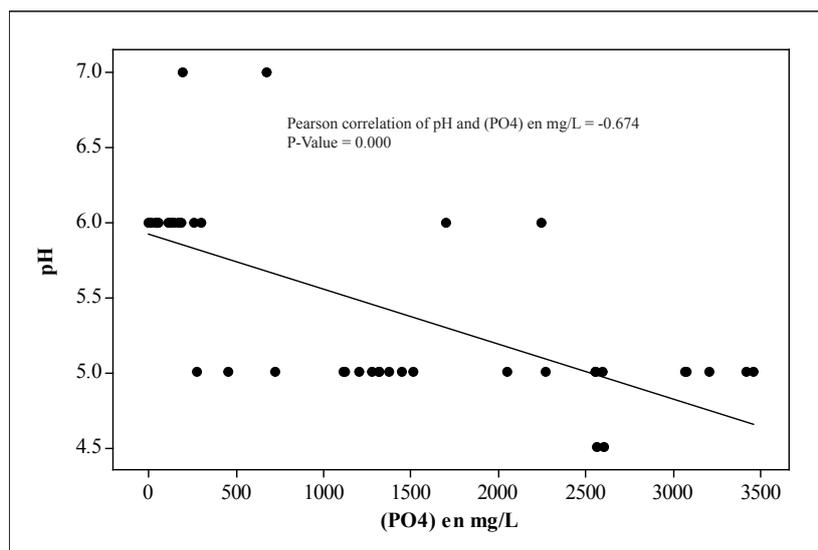


Figura 1. Correlación lineal entre el pH final del medio de cultivo y la concentración de ortofosfatos liberados. Se evidencian el coeficiente de correlación de Pearson y el valor P.

En esta investigación la mejor bacteria solubilizadora de fosfato desde el punto de vista cuantitativo también fue sobresaliente en la evaluación cualitativa, pues fue la que presentó el diámetro de halo de solubilización más grande; mientras que la bacteria que mostró la menor cantidad de fosfato solubilizado no mostró

halo de solubilización en la evaluación cualitativa. No obstante, en estudios previos, se ha reportado que en algunos casos se presentan resultados contradictorios entre la detección del halo en medio sólido y la solubilización en medio de cultivo líquido (Rodríguez *et al.*, 1999).

Identificación fenotípica de aislados sobresalientes

La mejor bacteria solubilizadora de fosfato en términos de la proporción tamaño de diámetro halo y tamaño de diámetro de la colonia es el aislamiento con código 4-BSF-08 que según el sistema de identificación BD BBLCRYSTAL™ para gram positivos, corresponde a la especie *Streptococcus porcinus*, este género bacteriano ha sido reconocido por solubilizar fosfato en el estudio realizado por Kadiri *et al.* (2013) en suelos de la India; además, ha sido reportado como habitante de la rizósfera de trigo (Rawat *et al.*, 2011) y otras gramíneas como el millo perlado, también se ha identificado su capacidad de producir ácido indól acético y solubilizar fosfatos (Prashar *et al.*, 2012).

Por otra parte la bacteria con código 4-BSF-04 presentó las mejores características de solubilización de fosfatos en medio de cultivo líquido y según el sistema de identificación BD BBLCRYSTAL™ para microorganismos entéricos no fermentadores corresponde a la especie *Enterobacter cloacae*, este género bacteriano ya ha sido reportado en la literatura como solubilizador de fosfatos en suelos (Toto *et al.*, 1997; Rodríguez *et al.*, 1999; Villegas *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2005; Haameda *et al.*, 2008; Souchie *et al.*, 2006; Guang-Can *et al.*, 2008 y Kadiri *et al.*, 2013); además, el género es un buen productor de auxinas por lo tanto juega un rol en la promoción de crecimiento vegetal de caña de azúcar (Naomi *et al.*, 2012); finalmente, la especie bacteriana *E. cloacae* ha sido reportada por colonizar la rizósfera y promover el crecimiento de plantas de arroz (Shankar *et al.*, 2011).

CONCLUSIONES

Se lograron aislar y evaluar 21 cepas bacterianas solubilizadoras de fosfato, de las cuales dos se destacaron por sus propiedades de solubilización de fosfato *in vitro*: las pertenecientes a los géneros *Enterobacter* y *Streptococcus*. Estos géneros han sido detectados en varios tipos de suelo y son reconocidos como promotores de crecimiento vegetal ya sea

por su propiedad de solubilizar fosfatos o por la producción de auxinas o ácido indól acético en varios estudios (Rodríguez *et al.*, 1999; Villegas *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2005; Haameda *et al.*, 2008; Souchie *et al.*, 2006; Guang-Can *et al.*, 2008; Kadiri *et al.*, 2013; Naomi *et al.*, 2002; Shankar *et al.*, 2011; Rawat *et al.*, 2011; Prashar *et al.*, 2012).

No obstante, se requiere investigar a profundidad acerca de la identidad de estos microorganismos desde el punto de vista molecular y acerca de sus capacidades de promoción de crecimiento vegetal a nivel de invernadero y de campo, así como estudios que permitan conocer su dinámica en la colonización de raíces que es un rasgo esencial de un potencial biofertilizante (Kloepper & Beauchamp, 1992).

Si al comprobar la efectividad de estos aislamientos a nivel *in vivo* se obtienen buenos resultados, estos microorganismos servirían como base para la formulación de biofertilizantes comerciales que al ser aplicados en los suelos podrían sustituir en gran medida a las estrategias de fertilización tradicional; ya que se conoce que el manejo de la fertilidad del suelo usando biofertilizantes es uno de los componentes básicos de la agricultura sostenible por sus efectos benéficos sobre el medio ambiente al disminuir la aplicación de insumos químicos (Kadiri *et al.*, 2013). Finalmente debido a que los microorganismos rizosféricos tienen una importante contribución en la degradación y remoción de contaminantes (Salgado *et al.*, 2012) se debería evaluar en estudios posteriores la capacidad de estos aislamientos para degradar agroquímicos en general.

AGRADECIMIENTOS

Al grupo de investigación Gestión ambiental de la Facultad de Ciencias e Ingeniería de la Universidad de Boyacá, al laboratorio de Microbiología de la misma institución y al Cepario del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia por la donación de la cepa control utilizada en los experimentos.

REFERENCIAS

- Alikhani, H., Saleh-Rastin, N. & Antoun, H. 2006. Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. *Plant and Soil*. 287: 35-41.
- Alvarado, A., Iturriaga, I., Smyth, J., Ureña, M. y Portuquez, E. 2009. Efecto de la fertilización con fósforo sobre el rendimiento y la absorción de nutrimentos de la papa en un Andisol de Juan Viñas, Costa Rica. *Agronomía Costarricense*. 33 (1): 45-61.
- APHA. 2002. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 22th ed. American Public Health Association, Washington, EUA.
- Babu-Khan, S., Chia Yeo, T., Martin, W., Duron, R., Goldstein, A. 1995. Cloning a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. *Applied and Environmental Microbiology*. 61 (3): 972-978.
- Banerjee, S., Palit, R., Sengupta, C. & Standing, D. 2010. Stress induced phosphate solubilization by *Arthrobacter sp.* and *Bacillus sp.* Isolated from tomato rhizosphere. *Australian Journal of Crop Science*. 4 (6): 378-383.
- Beare, M., Reddy, M., Tian, G. & Srivastava, S. 1997. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function in the tropics: The role of decomposer biota. *Applied Soil Ecology*. 6: 87-108.
- Beltrán, M. 2009. Evaluación del efecto del sistema de producción del cultivo del arroz (secano e inundado) sobre la población microbiana y la actividad enzimática asociada al metabolismo edáfico del fósforo. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, Colombia.
- Beltrán, M. 2014. La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 15 (1): 81-93.
- Castilla, L. 2006. La biofertilización en el manejo integrado de nutrimentos para la nutrición vegetal. pp. 7-16. En: Castilla, L. et al. *Biofertilización: una alternativa viable para la nutrición vegetal*. Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo, Tolima.
- Chakraborty, B., Chakraborty, U., Sha, A., Sunar, K. & Dey, P. 2010. Evaluation of phosphate solubilizers from soils of North bengal and their diversity analysis. *World Journal of Agricultural Sciences*. 6 (2): 195-200.
- Chen, Y., Rekha, P., Arun, A., Shen, F., Lai, W. & Young, C. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*. 34: 33-41.
- Chica, F. 2008. Evaluación de la adición de zeolitas al suelo como factor para mitigar la contaminación producto de la fertilización agrícola. *Producción + Limpia*. 3 (1): 7-24.
- Chung, H. et al. 2005. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. *Soil Biology & Biochemistry*. 37: 1970-1974.
- Chun-qiao, X., Chi, R. & Hu, Li. 2013. Solubilization of aluminum phosphate by specific *Penicillium* spp. *Journal of Central South University*. 20: 2109-2114.
- Deubel, A., Gransee, A. & Merbach, W. 2000. Transformation of organic rhizodepositions by rhizosphere bacteria and its influence on the availability of tertiary calcium phosphate. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 163: 387-392.
- Fankem, H., Nwaga, D., Deubel, A., Dieng, W. & Merbach, W. 2006. Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) rhizosphere in Cameroon. *African Journal of Biotechnology*. 5 (24): 2450-2460.
- Fernández, L., Zalba, P. & Gómez, M. 2005. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Ciencia del Suelo*. 23 (1): 31-37.

- Guang-Can, T., Shu-tun, T., Miao-Ying, C. & Guang-hui, X. 2008. Phosphate solubilizing and mineralizing abilities of bacteria isolated from soils. *Pedosphere*. 18 (4): 515-523.
- Gyaneshwar, P., Naresh, G., Kumar, L., Parek, J. & Poole, P. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil*. 245: 83-93.
- Haameda, B., Harini, G., Rupela, O., Wani, S. & Reddy, G. 2008. Growth promotion of maize by phosphate solubilizing bacteria isolated from compost and macrofauna. *Microbiological Research*. 163: 234-242.
- Halder, A., Mishra, A., Bhattacharyya, P. & Chakrabartty, P. 1990. Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 36: 81-92.
- Hedge, D., Dwivedi, B. & Sudhara, S. 1999. Biofertilizers for cereal production in India. A review. *The Indian Journal of Agricultural Sciences*. 69 (2): 73-83.
- Illmer, P. & Schinner, F. 1995. Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms. *Soil Biology & Biochemistry*. 27 (3): 257-263.
- Jones, K., Symon, C. & Johnston, A. 1987. Retrospective analysis of an archived soil collection. II. Cadmium. *Science of the Total Environment*. 67: 75-89.
- Kadiri, D., Gorle, N., Peetala, K. & Peela, S. 2013. Isolation, screening and identification of phosphate solubilizing bacteria from different regions of Visakhapatnam and Araku valley. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*. 4 (4): 518-526.
- Kim, K., McDonald, G. & Jordan, D. 1997. Solubilization of hydroxyapatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *Escherichia coli* in culture medium. *Biology and Fertility of Soils*. 24: 347-352.
- Klopper, J. & Beauchamp, C. 1992. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 38: 1219-1232.
- Kucey, R. 1983. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. *Canadian Journal of Soil Science*. 63: 671-678.
- Lara, S. 2007. Determinación del potencial agronómico de aislamientos nativos de *Pseudomonas fluorescens* en términos de su capacidad solubilizadora de fosfatos y antagonista contra *Rhizoctonia solani*. Tesis de Maestría en Ciencias-Microbiología. Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, Colombia.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 2005. Observatorio Agrociencias Colombia. Documento de trabajo No. 54. La cadena de la papa en Colombia. Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005.
- Moreno, R., García, T., Storch, J., Muñoz, M., Yáñez, E. & Pérez, E. 2011. Fertilización y corrección edáfica de suelos agrícolas con productos orgánicos. En: *Tecnología@ y desarrollo*. Revista de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente. Vol. IX. http://www.uax.es/publicaciones/archivos/TECMAD11_003.pdf.
- Naik, P., Raman, G., Narayanan, K. & Natarajan, N. 2008. Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. *BCM Microbiology*. 230 (8): 1-14.
- Naomi, R. et al. 2012. Phosphorus solubilizing and IAA production activities in plant growth promoting rhizobacteria from Brazilian soils under sugarcane cultivation. *Journal of Engineering and Applied Sciences*. 7 (11): 1446-1454.
- Nautiyal, C. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate-solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*. 170: 265-270.
- Nicholson, F., Smith, S., Alloway, B., Carlton-Smith, C. & Chambers, B. 2003. An inventory of heavy metal trace metal inputs to agricultural soils in England and Wales. *Science of the Total Environment*. 311: 205-19.

- Nziguheba, G. & Smolders, E. 2008. Inputs of trace elements in agricultural soils via phosphate fertilizers in European countries. *Science of the Total Environment*. 390: 53-57.
- Osorio, N. 2010. Microorganismos del suelo y su efecto sobre la disponibilidad de nutrientes en suelos ácidos del trópico. *Suelos Ecuatoriales*. 41 (1): 74-91.
- Oliviera, C. et al. 2008. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biology & Biochemistry*. 41 (9): 1782-1787.
- Pérez, E., Sulbarán, M., Ball, M. & Yarzabal, L. 2007. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. *Soil Biology & Biochemistry*. 39: 2905-2914.
- Prashar, P., Kapoor, N. & Sachdeva, S. 2012. Structural and functional diversity of rhizobacteria of pearl millet in semi-arid agroclimatic zone. *Asian Journal of Plant Science and Research*. 2 (5): 599-606.
- Rawat, S., Izhari, A. & Khan, A. 2011. Bacterial diversity in wheat rhizosphere and their characterization. *Advances in Applied Science Research*. 2 (2): 351-356.
- Reddy, M., Kumar, S., Babita, K. & Reddy, M. 2002. Biosolubilization of poorly soluble rock phosphates by *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*. 84: 187-189.
- Rodríguez, H. & Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Research review paper. Biotechnology Advances*. 17: 319-339.
- Salgado, I., Durán, C., Cruz, M., Carballo, M. y Martínez, A. 2012. Bacterias rizosféricas con potencialidades fisiológicas para eliminar materia orgánica de aguas residuales. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 28 (1): 17-26.
- Sánchez, L. & Corrales, L. 2005. Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. *NOVA. Publicación Científica*. 3 (4): 21-29.
- Scervino, M. et al. 2010. Soil fungal isolates produce different organic acid patterns involved in phosphate salts solubilization. *Biology and Fertility of Soils*. 46: 755-763.
- Seshadri, S., Muthukumarasamy, R., Lakshminarasimhan, C. & Ignacimuthu, S. 2000. Solubilization of inorganic phosphates by *Azospirillum halopraeferans*. *Current Science*. 79 (5): 565-567.
- Shankar, M., Ponraj, P., Ilakkiam, D. & Gunasekaran, P. 2011. Root colonization of a rice growth promoting strain of *Enterobacter cloacae*. *Journal of Basic Microbiology*. 51 (5): 523-530.
- Soto, J. 1998. Formas de fósforo y su liberación en Andisoles de la región central oriental de Costa Rica. Tesis de Doctorado. Universidad de Córdoba, España.
- Souchie, E., Saggin, J., Silva, E., Campello, E., Azcón, R. & Barea, J. 2006. Communities of P-Solubilizing Bacteria, Fungi and Arbuscular Mycorrhizal Fungi in grass pasture and secondary forest. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 78 (1): 183-193.
- Sturm, H. & Rangel, O. 1985. Ecología de los páramos andinos: una visión preliminar integrada. Universidad Nacional de Colombia, Instituto de Ciencias Naturales, Bogotá.
- Terry, E., Nuñez, M., Pino, M. & Medina, N. 2001. Efectividad de la combinación Biofertilizantes-Análogo de brasinoesteroides en la nutrición del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Cultivos Tropicales*. 22 (2): 59-65.
- Toro, M., Azcon, R. & Barea J. 1997. Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate solubilizing rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability (P-32) and nutrient cycling. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 4408-4412.

Villegas, J. & Fortin, J. 2001. Phosphorus solubilization and pH changes as a result of the interactions between soil bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on a medium containing NO_3^- as nitrogen source. *Canadian Journal of Botany*. 80: 571-576.

Welch, S.A., Taunton, A.E. & Banfield, J. 2002. Effect of microorganisms and microbial metabolites on apatite dissolution. *Geomicrobiology Journal*. 19: 343-367.

Yepis, O., Fundora, O., Pereira, C. & Crespo, T. 1999. La contaminación ambiental por el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados en el cultivo del tomate. *Scientia Gerundensis*. 24: 5-12.