

# Identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos en un Andisol de la región cafetera colombiana

## Identification of phosphate solubilizing bacteria in a Andisol of Colombian coffee region

Carlos A. Cisneros R.<sup>±</sup>, Marina Sánchez de P.<sup>\*\*</sup>, Juan Carlos Menjivar F.<sup>\*\*\*</sup>

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.65966

### Resumen

El fósforo es un elemento esencial para el cultivo de café, sin embargo la mayoría de los suelos en Colombia presentan niveles bajos de este nutriente. La presencia de microorganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) es una de las estrategias para suplir su demanda, en ese sentido se aislaron 26 bacterias rizosféricas de *Typic melanudans* de Cajibío (Cauca, Colombia), en tres agroecosistemas: café sin sombra, café con sombra y relicto de bosque secundario, evaluándoles la eficiencia solubilizadora de P (ESF) en Ca-P, Al-P, Fe-P en medios Pikovskaya sólido y líquido, obteniendo la secuencia de solubilización Ca-P > Al-P > Fe-P. Los dos aislamientos bacterianos con mayor ESF se identificaron por extracción del ADN y análisis del gen 16S rRNA como *Kocuria sp*, y *Bacillus subtilis*. Posteriormente se cuantificaron e identificaron los ácidos orgánicos presentes en las tres fuentes de fósforo por HPLC, siendo ellos los ácidos cítrico, glucónico, D- y L-málico, D- y L-láctico con mayor presencia en Ca-P- *Kocuria sp*. En todas las condiciones, se observó que ocurrió acidificación de los medios, siendo más fuerte en Fe-P y Al-P.

**Palabras claves:** *Bacillus subtilis*, *Kocuria sp*, biofertilizantes, eficiencia solubilizadora de fosfato, ácidos orgánicos.

### Abstract

Phosphorus is an essential nutrient for coffee growing, however, in Colombia most of the soils have low concentrations of this element. A strategy to supply the demand is the use of phosphate solubilizing microorganisms (PSM), in that order, 26 rhizospheric bacteria of *Typic melanudans* soil of Cajibío (Cauca, Colombia) were isolated, in three agroecosystems: coffee at full sun exposure, coffee with shade and relic secondary forest, evaluating the phosphate solubilizing efficiency (PSE) for Ca-P, Al-P, Fe-P in the solid and liquid Pikovskaya media. It showed the following solubilization sequence: Ca-P > Al-P > Fe-P. Two isolated bacteria were identified by DNA extraction and analysis of the 16S rRNA gene as *Kocuria sp*, and *Bacillus subtilis*. Later, using HPLC were identified organic acids present in the three phosphorus sources as: citric, gluconic, D- and L-malic, D- and L-lactic acid with higher presence in Ca-P-*Kocuria sp*. Strong acidification was observed for Fe-P and Al-P in all conditions.

**Key words:** *Bacillus subtilis*, *Kocuria sp*, biofertilizers, phosphate solubilizing efficiency, organic acids.

**Recibido:** agosto 26 de 2016

**Aprobado:** mayo 12 de 2017

\* Profesor Asociado. Químico MSc. y PhD en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia - Facultad de Ingeniería y Administración - Departamento de Ciencias Básicas. Carrera 32 No 12-00, Palmira, Valle del Cauca, Colombia. ± Dirección de correspondencia: cacisnerosr@unal.edu.co.

\*\* Profesora Titular. PhD Ingeniera Agrónoma. Universidad Nacional de Colombia - Facultad de Ciencias Agropecuarias - Departamento de Ciencias Biológicas. Carrera 32 No 12-00, Palmira, Valle del Cauca, Colombia. msanchezpr@unal.edu.co.

\*\*\* Profesor Titular. PhD en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia - Facultad de Ciencias Agropecuarias - Departamento de Ciencias Biológicas. Carrera 32 No 12-00, Palmira, Valle del Cauca, Colombia. jcmenjivarf@unal.edu.co.

## Introducción

Muchos suelos presentan problemas de disponibilidad de fósforo, especialmente los Andisoles derivados de cenizas volcánicas (Sánchez & Rubiano, 2015). Antes de ser absorbido por las raíces, una cantidad del elemento aplicado se transforma rápidamente en formas menos disponibles, es así que para satisfacer los requerimientos de las plantas para su normal desarrollo y crecimiento, se acude a la fertilización química (Khan *et al.*, 2010). La constante aplicación de fósforo puede alterar algunas propiedades químicas y biológicas del suelo, causando reducción en el rendimiento de los cultivos (Khan *et al.*, 2009), lo anterior genera altos costos (Kaur & Reddy, 2014), obligando a reemplazar el uso de fertilizantes químicos por biofertilizantes (Malusá, 2012).

La comprensión del papel que juegan los microorganismos en el ciclo del fósforo según Mahdi *et al.* (2011), permite plantear como alternativa viable la introducción como biofertilizantes de microorganismos solubilizadores de P (MSF); estos se concentran en alta proporción en la rizósfera de las plantas, y son metabólicamente más activos que los que provienen de otras fuentes (Arun, 2007). En los últimos años el conocimiento sobre los MSF se incrementó significativamente (Sharma *et al.* 2013), entre estos se encuentran las bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) capaces de solubilizar varios fosfatos inorgánicos a través de diferentes mecanismos como la producción de ácidos orgánicos (Mishra *et al.*, 2013).

De diferentes suelos se han aislado BSF pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Mesorhizobium*, *Enterobacter* y *Erwinia* (Zhao *et al.*, 2014). Por lo anterior, la presente investigación tuvo como objetivo aislar e identificar rizobacterias con potencial solubilizador de P, en un suelo Andisol localizado en Cajibío (Cauca, Colombia) bajo diferentes sistemas de manejo, posteriormente evaluar la eficiencia solubilizadora de estos microorganismos cuando crecen sobre fosfatos de calcio, aluminio y hierro, utilizando condiciones *in vitro*.

## Materiales y métodos

**Aislamiento y evaluación *in vitro* de la eficiencia solubilizadora de fosfatos.** A partir de un *Typic Melanudands* del municipio de Cajibío, Departamento del Cauca, Colombia, se tomaron muestras de suelo ri-

zosférico en tres agroecosistemas: relicto de bosque secundario (RBS), café (*Coffea arabica* variedad Caturra bajo sombra de guamo, *Inga* spp. (CCS) y café (*Coffea arabica* variedad Caturra) a libre exposición solar o sin sombra (CSS). Una parte de estas muestras fueron analizadas en el Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT, Palmira, Colombia, otra se trasladó al laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Colombia (sede Palmira), donde se procedió al aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF). Para ello, se prepararon diluciones seriadas hasta  $10^{-6}$  con agua destilada estéril. Por cada dilución se sembraron tres repeticiones en agar Pikovskaya - PVK - con una dosis menor de P (Cisneros y Sánchez de P., 2015). Las siembras se incubaron a 27 °C por una semana, luego se seleccionaron aquellos cultivos que presentaron halo claro alrededor de la colonia, el cual resultado de la solubilización de fosfato tricálcico.

Después de obtener los aislados bacterianos, estos se purificaron en el mismo medio por resiembras. Luego, cada aislamiento se sembró en PVK, utilizando por separado tres distintas fuentes de fósforo: fosfatos tricálcico (Ca-P), de aluminio (Al-P) y de hierro (Fe-P). En cada una de las placas de Petri con las diferentes fuentes de P se midió el diámetro de la colonia y del halo que formaron por espacio de 7 días. La evaluación de la Eficiencia Solubilizadora de Fosfato (ESF), en medio sólido, se realizó de acuerdo con la expresión:

$$ESF = \frac{A}{B}$$

Dónde: A = Diámetro (mm) del halo de solubilización (diámetro colonia + halozona) y B = Diámetro (mm) de crecimiento de la colonia (Cisneros & Sánchez de P., 2015).

Luego se seleccionaron cinco aislados de BSF con mayor ESF promedio en las tres fuentes de P a evaluar en PVK líquido. Para ello, los cultivos bacterianos se incubaron a 28 °C durante siete días, en un agitador orbital a 150 rpm. Al cabo de ese tiempo de incubación, se midió el pH por potenciometría y el P soluble empleando el Método de Molibdovanadato (Cisneros & Sánchez de P., 2015). Después, se seleccionaron los dos aislamientos bacterianos con mayor capacidad solubilizadora de P promedio en los medios probados. Estos aislados se identificaron por técnicas de biología molecular, se evaluaron para producción de ácidos orgánicos y posteriormente su efecto en plántulas de café (Cisneros *et al.*, 2017).

**Identificación de las BSF.** A los dos aislamientos bacterianos seleccionados en medio líquido, se les extrajo el ADN utilizando el *kit* comercial: QIAamp DNA Mini Kit De Qiagen. La identificación de los aislamientos bacterianos se llevó a cabo mediante el gen que codifica la región 16S rRNA, se amplificó a partir de las BSF seleccionadas, por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los cebadores fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Pérez *et al.*, 2007; Matías *et al.*, 2009). Se empleó unas reacciones de PCR en un volumen total de 50 µl que contenía 0.1 mM desoxinucleótidos (DNTPs), 0.2 mM de cada cebador, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 20 mM de Tris HCl, 50 mM KCl, 1U de Taq polimerasa (Invitrogen) y 50 ng de ADN. Se completó con agua libre de RNasas. La amplificación se realizó en un termociclador PT100 (MJ-Research, Watertown, MA). Luego de la amplificación, se tomaron 5 µl de los productos amplificados, los cuales se visualizaron en gel de poliacrilamida al 7% (37:1 acrilamida-bisacrilamida) corridos a 160 voltios por una hora y teñidos en bromuro de etidio (Sambrook *et al.*, 1989).

El tamaño aproximado de las bandas del producto PCR se comparó con un marcador de peso molecular GeneRuler™ de 100bp Thermo Scientific®. Los amplificados observados en los pesos registrados se enviaron a purificar y a secuenciar a Macrogen inc. Korea. Las secuencias sentido y antisentido ("forward" y "reverse") fueron editadas utilizando el software de bioinformática BioEdit v7.2.5 (Hall, 1999), una vez limpias las secuencias, se realizó el alineamiento con la opción *online* de BLAST (bl2seq) y se construyó la secuencia consenso, finalmente se comprobó su identidad en la base de datos de secuencias de DNA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), utilizando el algoritmo BLAST.

**Producción de ácidos orgánicos como posible mecanismo microbiano de solubilización de fosfatos.** Pasados 7 días de incubación en medio líquido, se tomó una alícuota de 20 µl de los filtrados de las dos bacterias más eficientes en solubilización de fosfatos e identificadas molecularmente, según metodología descrita arriba (medio líquido), con el fin de evaluar la producción de los siguientes ácidos orgánicos (acético, cítrico, glucónico, málico y láctico) por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) con una columna de exclusión por tamaño de ion. Para la detección de cada ácido orgánico se utilizó un equipo marca Waters serie con software Breeze, usando las recomendaciones de Mardad *et al.*, 2013. Dichas con-

diciones fueron: Columna Aminex HPX-87H (300 mm x 7.8 mm), temperatura de 35 °C, fase móvil H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.0025 M, flujo de 0.5 ml/min, detector: ultravioleta (UV Waters 2487), longitud de onda: 210 nm. La identificación de los ácidos orgánicos se llevó a cabo por comparación de los tiempos de retención de sus estándares patrón con los de los picos del cromatograma de cada muestra obtenida (Mardad *et al.*, 2013).

**Análisis estadístico.** Para evaluar la eficiencia solubilizadora de las BSF en medios sólido y líquido, por cada aislado bacteriano, se utilizó un diseño completamente al azar, con tres fuentes de fósforo (Ca-P, Al-P y Fe-P) y tres repeticiones. Las diferencias en las actividades de los microorganismos se analizaron a través de una estadística descriptiva, de un análisis de varianza, de prueba de promedios (Tukey) y correlaciones de Pearson. En todos los casos con un nivel de significancia del 95%. Todos los análisis se realizaron utilizando el software SAS versión 9.3 (2010).

## Resultados y discusión

Los análisis químicos del suelo son consistentes con los descritas para Andisoles, ya que presentan algunas de sus características como pH ácido (<5.5); alto contenido de materia orgánica (>10%), alta capacidad de intercambio de cationes (CIC) y muy baja disponibilidad de P (Cisneros y Sánchez de P., 2015).

### Aislamientos de bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF)

Los resultados indican que la población bacteriana con capacidad solubilizadora de fosfatos está presente en los tres agroecosistemas, de hecho se lograron aislar 26 bacterias con capacidad solubilizadora en fosfato tricálcico.

Los aislados bacterianos que formaron halo, correspondieron al 63.6% de los obtenidos en RBS, 60.0% de los procedentes de CCS y 52.6% de CSS. Lo anterior muestra que aunque un número mayor de poblaciones bacterianas se adquirieron de los agroecosistemas CSS y CCS, las BSF tuvieron mayor frecuencia relativa en RBS, cuyos contenidos de fósforo (P-Bray II) son los más bajos, lo cual sugiere la escasa disponibilidad del fósforo como una causa de adaptación de estos microorganismos al suelo (Cisneros R. *et al.*, 2014). También estos resultados reflejan la baja intervención antrópica en RBS comparada con CSS y CCS, es decir, son consecuencia de prácticas agrícolas basadas en productos de síntesis química industrial aplicados a los dos últimos agroecosistemas.

### Evaluación *in vitro* de la eficiencia solubilizadora de las BSF en medio sólido

El análisis de varianza muestra diferencias significativas en la actividad solubilizadora de las bacterias; la prueba de Tukey revela que el mayor valor de Eficiencia Solubilizadora de Fosfato (ESF) se presenta en el medio Ca-P, cuyo valor difiere significativamente de lo observado en Al-P y, en Fe-P cuyos valores fueron menores. Lo anterior es registrado por investigadores como Acevedo *et al.* (2014), y Asuming & Aferi (2014), quienes reportaron que algunos microorganismos presentan alta capacidad de solubilización de Ca-P comparado con otras fuentes como Al-P y Fe-P. Dicha solubilización es explicada a través de los valores de Kps (constante del producto de solubilidad o constante de equilibrio de iones en solución) para los diferentes fosfatos (Khan *et al.*, 2007).

Con lo anterior, se procedió a seleccionar los cinco aislamientos bacterianos más eficientes en las tres fuentes de P, los cuales fueron identificados como UNB1, UNB2, UNB3, UNB4 y UNB5. Posteriormente, estos fueron evaluados en medio de cultivo líquido.

### Estimación de P soluble por parte de los microorganismos seleccionados

Se presentan diferencias altamente significativas en la actividad solubilizadora de estas bacterias de acuerdo con la fuente de fosfato empleada. Para todos los microorganismos, los mayores valores de solubilización de P insoluble se obtuvieron en Ca-P, seguido de Al-P y de Fe-P (tabla 1).

De forma similar varios autores han reportado esta secuencia de solubilización (Acevedo *et al.*, 2014; Asuming & Aferi, 2014). En Ca-P, los aislamientos UNB1 y UNB4 presentan mayor porcentaje de P soluble, sin embargo, éstos no muestran diferencias signifi-

**Tabla 1.** Concentración de P soluble (en %) en los tres medios de cultivo inoculados con los aislamientos bacterianos. Agrupamiento según la prueba de Tukey. **Nota:** Dentro de la misma columna, promedios con la misma letra no difieren estadísticamente.

| Aislamiento | Concentración de Fósforo (%) |    |      |    |      |    |
|-------------|------------------------------|----|------|----|------|----|
|             | Ca-P                         |    | Al-P |    | Fe-P |    |
| UNB5        | 28.4                         | b  | 6.1  | d  | 4.3  | b  |
| UNB4        | 31.0                         | ab | 7.6  | c  | 5.6  | a  |
| UNB3        | 29.2                         | b  | 7.5  | c  | 5.1  | ab |
| UNB2        | 27.9                         | b  | 14.9 | a  | 3.3  | c  |
| UNB1        | 33.1                         | a  | 9.2  | b  | 5.1  | ab |
| Testigo     | 14.7                         | c  | 6.7  | cd | 4.5  | b  |

cativas entre sí, evidenciándose un efecto contrario con el testigo (tabla 1). Con respecto a Al-P, las bacterias UNB2 y UNB1, obtienen el porcentaje de P soluble más alto, los cuales son estadísticamente diferentes, y el aislado UNB5 el menor valor, superado en términos estadísticos por el testigo. Finalmente en Fe-P, no existen diferencias estadísticas entre los porcentajes de P soluble obtenidos de los aislados UNB4, UNB3 y UNB1, presentando los valores más altos, mientras que UNB2 presenta el menor valor, el cual, a su vez, se vio superado por el testigo y el aislamiento UNB5.

La solubilidad de P procedente de cada fosfato representa las concentraciones de sus iones constituyentes que pueden mantenerse en solución bajo condiciones de equilibrio. Cuando la concentración del P soluble es mayor que la soportada por la solubilidad del fosfato, el P soluble se precipita con los cationes  $Ca^{2+}$ ,  $Al^{3+}$  y  $Fe^{3+}$  y forma los fosfatos mencionados. Cuando el P soluble es menor, los fosfatos se disuelven en la solución. Lo anterior es explicado a través del principio de Le Châtelier que está relacionado con los sistemas en equilibrio.

Con respecto al pH (datos no mostrados), después de 7 días de cultivo, este se reduce entre 1 y 2 unidades aproximadamente en relación con el pH que presenta el testigo (aproximadamente neutro). La reducción es en general más marcada cuando se utiliza Al-P y Fe-P, siendo esta última fuente de P la que muestra mayor acidificación con respecto al testigo. Los valores de pH bajo obtenidos (alta acidez) están ligados a la liberación de iones  $H^+$  que balancean la toma de cationes amonio,  $NH_4^+$  procedente del medio de cultivo y a la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular por las bacterias solubilizadoras de fosfato, BSF, cuyas propiedades quelantes ayudan a la formación de complejos insolubles con iones metálicos como  $Ca^{2+}$ ,  $Al^{3+}$  y  $Fe^{3+}$ , con la consecuente liberación del P en forma de fosfato (Beltrán, 2014).

Finalmente, se encontró relación inversa entre pH y P soluble en los medios Ca-P y Fe-P, con coeficientes de correlación de Pearson de -0.895 y -0.893 respectivamente, resultados que coinciden con registros de Prada (2013).

### Identificación molecular de las bacterias seleccionadas

Con los resultados obtenidos de P soluble en las tres fuentes de fosfatos, se seleccionaron los dos aislamientos bacterianos en promedio con mayor capaci-

dad solubilizadora de fosfatos (tabla 1), los cuales fueron identificados como UNB1 y UNB2.

La amplificación por PCR de la región 16S del ADNr de las bacterias, generó un amplicón aproximadamente de 1500 pb con los cebadores fD1 y rD1, además de un peso molecular igual al obtenido por Patiño & Sánchez de P. (2012).

### Análisis de secuencias en el GenBank

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos del GenBank mediante el programa BLAST, revelando que el organismo UNB1 está relacionado con el género *Kocuria sp.*, identidad de 99% ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)). Las bacterias del género *Kocuria* (familia *Micrococcaceae*, orden *Actinomycetales*, clase *Actinobacteria*) son cocos grampositivos (Dastager *et al.*, 2014). Han sido aisladas de variedad de fuentes naturales incluyendo el suelo, la rizósfera, ambientes acuáticos (dulces y marinos), entre otros (Chandna *et al.*, 2013).

Estas bacterias en forma general, han sido consideradas como organismos promotores de crecimiento vegetal por su capacidad de producir sustancias benéficas que también ayudan a controlar la población de hongos fitopatógenos (Goswami *et al.*, 2014); también cumplen un papel importante en la descomposición de materia orgánica, pudiendo ser empleadas como agentes de carga en la producción de compost de alta calidad (Chandna *et al.*, 2013), además presentan un amplio uso en la bioremediación de suelos (Dastager *et al.*, 2014).

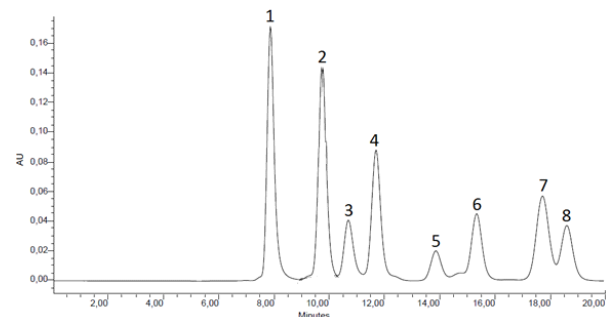
Prada (2013) señaló que de 57 aislados de actinobacterias sólo diez mostraron mediante evaluaciones cualitativas y cuantitativas tener una actividad solubilizadora de fósforo significativamente alta y la presencia dominante de los ácidos oxálico, cítrico y glucónico. De igual manera, Goswami *et al.* (2014), encontraron que *Kocuria turfanensis* es un eficiente microorganismo solubilizador de fosfato, productor de sideróforos y amoníaco. Por otra parte, el análisis de las secuencias del aislamiento UNB2 mostró un nivel de identidad 98% con *Bacillus subtilis* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)).

Las bacterias grampositivas, aerobias facultativas, que pertenecen al género *Bacillus* (familia *Bacillaceae*), se encuentran distribuidas en diferentes tipos de ambientes como el suelo, plantas y ecosistemas de aguas dulce y marina (Badía *et al.*, 2011). Son microorganismos capaces de resistir condiciones físicas extremas

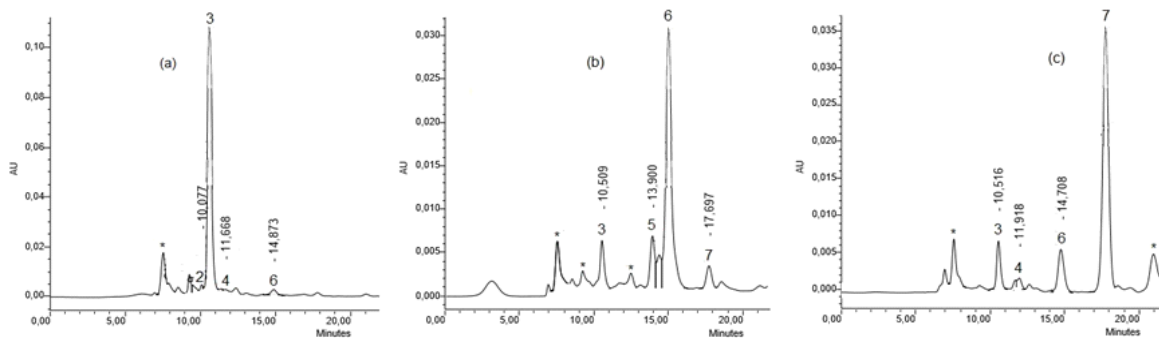
por formar endosporas lo cual influye en su amplia distribución y adaptabilidad a diferentes ecosistemas (Kumar *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2015). Entre las especies de *Bacillus* se registran *B. subtilis*, entre otras (Kumar *et al.*, 2012). Este género ha demostrado capacidad para incrementar el crecimiento de las plantas (Angulo *et al.*, 2014). Varias investigaciones han demostrado la capacidad del género *Bacillus* como solubilizador de fosfato (Maheswar & Sathiyavani, 2012; Tejera *et al.*, 2013). A su vez, tiene capacidad para fijar nitrógeno (Beneduzi *et al.*, 2008) y producir reguladores del crecimiento vegetal como auxinas, citoquininas y/o giberelinas (Mutua *et al.*, 2011).

### Estimación de la producción de ácidos orgánicos

Los aislamientos acidificaron el medio de cultivo, posiblemente producto de la biosíntesis y liberación de una amplia variedad de ácidos orgánicos, considerado uno de los mecanismos más importantes utilizado por los microorganismos para solubilizar fuentes de fosfatos. Las dos bacterias aisladas e identificadas (*Kocuria sp.* y *Bacillus subtilis*) produjeron diferentes ácidos orgánicos en las tres fuentes de fosfato, excepto ácido oxálico (utilizado como uno de los estándares que confirmaron la presencia de los diferentes ácidos orgánicos), en menos de 20 minutos (figura 1): 1. ácido oxálico: 8.1 minutos, 2. ácido cítrico: 10.1 minutos, 3. ácido glucónico: 10.7 minutos, 4. ácido D-málico: 12.2 minutos, 5. ácido D-láctico: 13.9 minutos, 6. ácido L-láctico: 15.3 minutos, 7. ácido L-málico: 17.8 minutos y 8. ácido acético: 19.1 minutos. Sus concentraciones variaron con la fuente de P a la que se expuso el microorganismo (tabla 2). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por varios autores que también encontraron una concentración y perfil de ácidos diferentes según la fuente de P usada (Vyas & Gulati, 2009; Prada, 2013).



**Figura 1.** Cromatograma de HPLC de los estándares de ácidos orgánicos, separados en menos de 20 minutos. **Nota:** longitud de onda utilizada 210 nm (Mardad *et al.*, 2013).



**Figura 2.** Cromatogramas de HPLC de los ácidos orgánicos producidos por UNB1 (a) con  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , (b) con  $\text{AlPO}_4$  y (c) con  $\text{FePO}_4$  como fuente de fósforo.

Los diferentes ácidos orgánicos presentes en una de las dos muestras de cultivos bacterianos evaluados, se ilustran en los cromatogramas de la figura 2: UNB1, *Kocuria sp* (a, b, c). En los cromatogramas se observan compuestos desconocidos (\*), adicionalmente se visualizan picos con intensidades diferentes para cada fuente de fosfato, por lo cual se puede deducir que las concentraciones de ácidos orgánicos producidas por las bacterias también varían con respecto a la fuente de P empleada. Cromatogramas similares se observan en UNB2 (*Bacillus subtilis*).

**Tabla 2.** Concentración de ácidos orgánicos producidos por las bacterias en las tres fuentes de P empleadas.

|           |       | Concentración (ppm) |       |
|-----------|-------|---------------------|-------|
| Acido     | Medio | Bacteria            |       |
|           |       | UNB1                | UNB2  |
| Cítrico   | Ca-P  | 19.2                | 380.0 |
|           | Al-P  | 0.0                 | 10.1  |
|           | Fe-P  | 0.0                 | 0.0   |
| Glucónico | Ca-P  | 1814.6              | 162.0 |
|           | Al-P  | 115.7               | 54.8  |
|           | Fe-P  | 100.9               | 0.0   |
| D-Málico  | Ca-P  | 15.6                | 208.3 |
|           | Al-P  | 0.0                 | 14.0  |
|           | Fe-P  | 10.0                | 15.8  |
| D-Láctico | Ca-P  | 0.0                 | 0.0   |
|           | Al-P  | 65.0                | 0.0   |
|           | Fe-P  | 0.0                 | 0.0   |
| L-Láctico | Ca-P  | 39.9                | 42.3  |
|           | Al-P  | 366.1               | 0.0   |
|           | Fe-P  | 76.1                | 0.0   |
| L-Málico  | Ca-P  | 0.0                 | 0.0   |
|           | Al-P  | 19.2                | 0.0   |
|           | Fe-P  | 215.4               | 37.7  |
| Acético   | Ca-P  | 0.0                 | 0.0   |
|           | Al-P  | 0.0                 | 0.0   |
|           | Fe-P  | 0.0                 | 0.0   |

De acuerdo con la tabla 2, los ácidos orgánicos producidos en mayor proporción en las tres fuentes de P, por las bacterias, en su orden son: ácidos glucónico > L-láctico > cítrico > L-málico.

En general, hay mayor diversidad de ácidos orgánicos liberados en Ca-P que en Al-P y en Fe-P. Este hecho puede estar relacionado con la facilidad de liberar mayor cantidad de ortofosfato a partir de Ca-P que de Al-P y de Fe-P; adicionalmente se destaca que *Kocuria sp* con los ácidos glucónico y L-láctico, fue el microorganismo que formó ácidos orgánicos en las tres fuentes de P evaluadas (tabla 2). Con respecto a la concentración de cada ácido orgánico, en Ca-P y en Fe-P, *Kocuria sp* fue el microorganismo que más altas concentraciones generó (ácido glucónico: 1814.6 ppm y ácido L-málico: 215.4 ppm). Existen pocos reportes de la actividad solubilizadora de P y producción de ácidos orgánicos de *Kocuria sp*, sin embargo Goswami et al. (2014), encontraron que *Kocuria turfanensis* es un eficiente microorganismo solubilizador de fosfato, productor de sideróforos y amoniaco. En cuanto a *Bacillus subtilis*, Sharma et al. (2013), y Behera et al. (2014), mencionan la producción de ácidos cítrico, láctico, málico, glucónico y oxálico, responsables de la solubilización de fosfatos y que explican la reducción de pH en los medios de cultivo.

Los ácidos orgánicos producidos por las bacterias pueden disolver los fosfatos empleados como resultado de intercambio aniónico o quelatación con los iones  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Al}^{+3}$  o  $\text{Fe}^{+3}$  asociados con los fosfatos insolubles Ca-P, Al-P y Fe-P (Sharma et al., 2013), se cree que más que la concentración o cantidad de ácidos orgánicos, es su estructura la que puede determinar la solubilización de fosfatos (Vyas & Gulati, 2009), en ese sentido, los ácidos orgánicos producidos por los microorganismos se desprotonan para quelatar los cationes metálicos  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Al}^{+3}$  y  $\text{Fe}^{+3}$  involucrados en los fosfatos empleados.

Por otra parte, los coeficientes de correlación de Pearson entre la producción de ácidos orgánicos y el fósforo soluble en los tres fosfatos no arrojaron valores significativos ( $p > 0.05$ ), por lo anterior se cree que la obtención de ácidos orgánicos no parece ser el único mecanismo de solubilización en este trabajo, ya que en algunos casos pueden intervenir otros factores encargados de reducir el pH de los medios de cultivo, por ejemplo, la fuente de N empleada. Se han registrado altas tasas de solubilización en presencia de sales de amonio como sulfato de amonio (empleado en este trabajo). Lo anterior se atribuye a la liberación de  $H^+$  que compensan la toma del ion amonio, bajando el pH (Beltrán, 2014). Adicionalmente, Bolívar *et al.* (2016), mencionan que en *Burkholderia tropica*, existe un mecanismo adicional, ya que esta especie solubiliza fósforo incluso en un medio fuertemente amortiguado.

Las bacterias pueden tener capacidad de hacer uso de diferentes mecanismos para solubilizar el P, la estimulación puede depender de diversos factores, entre ellos, la procedencia de los aislamientos, las poblaciones alcanzadas, entre otros. Paralelamente, el mecanismo de solubilización de P, puede estar influenciado por el género, la especie o medio de cultivo en el cual se realice la evaluación (Panhwar *et al.*, 2012). En los medios de cultivo, las fuentes de C, de N y las sales ( $MgSO_4$ , KCl, NaCl), influyen en gran medida en los potenciales de solubilidad de fósforo de los microorganismos. Sin embargo, el uso de una fuente de N (sulfato de amonio) en la composición estimula de manera diferente el metabolismo del C e induce la vía metabólica, lo que puede generar la producción de compuestos complejos con capacidad quelante pero con diferente estructura u origen (Prada, 2013; Sharma *et al.*, 2013).

## Conclusiones

En tres agroecosistemas (café sin sombra, café con sombra y relicto de bosque secundario) de un *Typic Melanudand* de Cajibío (Cauca), se identificaron bacterias con capacidad solubilizadora de fosfatos de Ca, Al y Fe, encontrándose la máxima actividad solubilizadora en *Kocuria sp.* y *Bacillus subtilis*.

En las tres fuentes de P (fosfatos de Ca, Al y Fe), se estimaron los siguientes ácidos orgánicos: cítrico, glucónico, D- y L-málico, D- y L-láctico y acético, por parte de las dos bacterias con mayor capacidad solubilizadora de P, se observó que existe mayor diversidad de ácidos orgánicos en la fuente Ca-P y que sus

concentraciones variaron con respecto a la fuente de P para cada microorganismo.

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia (Sede Palmira), a Hongos de Colombia S.A.S (FUNGICOL S.A.S) y al Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), por apoyar la fase experimental.

## Referencias bibliográficas

- Acevedo, E., Galindo-Castaneda, T., Prada, F., Navia, M., & Romero, H. M. (2014). Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Colombia. *Applied Soil Ecology*, 80, 26-33.
- Angulo, V. C., Sanfuentes, E. A., Rodríguez, F., & Sossa, K. E. (2014). Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. *Revista Argentina de HYPERLINK "http://www.sciencedirect.com/science/journal/03257541"Microbiología*, 46HYPERLINK "http://www.sciencedirect.com/science/journal/03257541/46/4"(4), 338-347.
- Asuming, S., & Aferi, N. K. (2014). Isolation of phosphate solubilizing bacteria from tropical soil. *Global Advanced Research Journal of Agricultural Science*, 3(1), 008-015.
- Arun, K. S. (2007). *Bio-fertilizers for sustainable agriculture. Mechanism of P-solubilization*. Sixth edition. Jodhpur, India: Agribios publishers.
- Badía, M. M. R., Hernández, B. T., Murrel, J. A. L., Mahillon, J., & Pérez, M. H. (2011). Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* asociadas al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista Brasileira de Agroecologia*, 6(1), 90-99.
- Behera, B. C., Singdevasachan, S. K., Mishra, R. R., Dutta, S. K., & Thatoi, H. N. (2014). Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove - A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(2), 97-110.
- Beltrán, M. E. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 15 (1),101-113.
- Beneduzi, A., Peres, D., Vargas, L. K., Bodanese, M. H., & Passaglia, L. M. P. (2008). Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. *Applied Soil Ecology*, 39, 311-32.
- Bolívar, H. J., Contreras, M. L., & Teherán, L. G. (2016). *Burkholderia tropica* una bacteria con gran potencial para su uso en la agricultura. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 19(2),102-108.
- Chandna, P., Nain, L., Singh S., & Kuhad, R. C. (2013). Assessment of bacterial diversity during composting of agricultural byproducts. *BMC Microbiology*, 13, 1-14.
- Chen, J. H., Tian, X. R., Ruan, Y., Yang, L. L., He, Z. Q., Tang, S. K., Li, W. J., Shi, H., & Chen, Y. G. (2015). *Bacillus*



- crassostreae* sp. nov., isolated from an oyster (*Crassostrea hongkongensis*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, 1561–1566.
- Cisneros, C., Patiño, C., & Sánchez de P., M. (2014). Solubilización de fosfatos por microorganismos asociados a suelos de tres agroecosistemas cafeteros de la zona andina colombiana. En: *XVII Congreso Colombiano de la Ciencia del Suelo* (pp. 283-287). Popayán, Colombia: Editorial Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo.
- Cisneros, C., & Sánchez de P., M. (2015). Solubilización de fosfatos por hongos asociados a un Andisol de tres agroecosistemas cafeteros de la región andina colombiana. *Ingenium*, 9(25), 37-46.
- Cisneros, C., Sánchez de P., M., & Menijivar, J. C. (2017). Efecto de bacterias solubilizadoras de fosfatos sobre el desarrollo de plántulas de café. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1), 149-158.
- Dastager, S. G., Shan, T., Krishnamurthi, S., Jae, L., & Wen, L. (2014). *Kocuria indica* sp. nov., isolated from a sediment simple. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 869–874.
- Goswami, D., Pithwa, S., Dhandhukia, P., & Thakker, J. N. (2014). Delineating *Kocuria turfandensis* 2M4 as a credible PGPR: a novel IAA-producing bacteria isolated from saline desert. *Journal of Plant Interactions*, 9(1), 566–576.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Kaur, G., & Reddy, M. S. (2014). Role of phosphate-solubilizing bacteria in improving the soil fertility and crop productivity in organic farming. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 60(4), 549–564.
- Khan, M. S., Zaidi, A., & Wani, P. A. (2007). Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture – A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 27, 29–43.
- Khan, M. S., Zaidi, A., Wani, P. A., & Oves, M. (2009). Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. *Environmental Chemistry Letters*, 7, 1-19.
- Khan, M. S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M., & Wani, P. A. (2010). Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi-current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 56, 73-98.
- Kumar, S., Dhankhar, S., Arya, V. P., Yadav, S., & Yadav, J. P. (2012). Antimicrobial activity of *Salvadora oleoides* Decne. against some microorganisms. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(14), 2754-2760.
- Mahdi, S. S., Hassan, G.I., Hussain, A., & Rasool, F. (2011). Phosphorus Availability Issue- Its Fixation and Role of Phosphate Solubilizing Bacteria in Phosphate Solubilization. *Research Journal of Agricultural Sciences*, 2(1), 174-179.
- Maheswar, N. U., & Sathiyavani, G. (2012). Solubilization of phosphate by *Bacillus* Sps. from groundnut rhizosphere (*Arachishypogaea* L). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 4(8), 4007-4011.
- Malusá, E., Sas, L., & Ciesielska, J. (2012). Review Article. Technologies for Beneficial Microorganisms Inocula Used as Biofertilizers. *The Scientific World Journal*, 2012, 1-12.
- Mardad, I., Serrano, A., & Soukri, A. (2013). Solubilization of inorganic phosphate and production of organic acids by bacteria isolated from a Moroccan mineral phosphate deposit. *African Journal of Microbiology Research*, 7(8), 626-635.
- Matias, S. R., Pagano, M. C., Muzzi, F. C., Oliveira, C. A., Almeida, A., Horta, S. N., & Scotti, M. R. (2009). Effect of rhizobia, mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing microorganisms in the rhizosphere of native plants used to recover an iron ore area in Brazil. *European Journal of Soil Biology*, 45, 259-266.
- Mishra, D. J., Singh, R., Mishra, U. K., & Shahi, S. K. (2013). Role of Bio-Fertilizer in Organic Agriculture: A Review. *Research Journal of Recent Sciences*, 2(ISC-2012), 39-41.
- Mutua, G. K., Karanja, N.K., Ayuke, F., Ndukhu, H., & Kimenju, J. W. (2011). The potential of *Bacillus subtilis* and *Rhizobium leguminosarum* in controlling plant-parasitic nematodes in farmers' fields. *African Crop Science Conference Proceedings*, 10, 209 – 215.
- Panhwar, Q. A., Othman, R., Rahman, Z. A., Meon, S., & Ismail, M. R. (2012). Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from aerobic rice. *African Journal of Biotechnology*, 11, 2711-2727.
- Patiño, C., & Sánchez de P., M. (2012). Aislamiento e identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos, habitantes de la rizósfera de chontaduro (*B. gassipaes Kunth*). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10(2), 177 – 187.
- Pérez, E., Sulbarán, M., Ball, M. M., & Yarzabal, L. A. (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.
- Prada, L. D. (2013). Identificación de ácidos orgánicos causantes de la solubilización de fósforo inorgánico sintetizados por actinomicetos aislados de suelos en los andes orientales colombianos. (Tesis de Maestría en Ciencias – Microbiología). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Sambrook, J., Fritschi, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez, J. A., & Rubiano, Y. (2015). Procesos específicos de formación en Andisoles, Alfisoles y Ultisoles en Colombia. *Revista EIA*, 12(2), E85-E97.
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Review. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springer Plus*, 2, 587.
- Tejera, B., Heydrich, M., & Rojas, M. M. (2013). Aislamiento de *Bacillus* solubilizadores de fosfatos asociados al cultivo del arroz. *Agronomía Mesoamericana*, 24(2), 357-364.
- Vyas, P., & Gulati, A. (2009). Organic acid production *in vitro* and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. *BMC Microbiology*, 9, 174.
- Zhao, K., Penttinen, P., Zhang, X., Ao, X., Liu, M., Yu, X., & Chen, Q. (2014). Maize rhizosphere in Sichuan, China, hosts plant growth promoting *Burkholderia cepacia* with phosphate solubilizing and antifungal abilities. *Microbiological Research*, 169, 76–82.