SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS POR POBLACIONES BACTERIANAS AISLADAS DE UN SUELO DEL VALLE DEL CAUCA. ESTUDIO DE BIODIVERSIDAD Y EFICIENCIA

CARLOS OMAR PATIÑO TORRES, M.Sc.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

COORDINACION GENERAL DE POSGRADOS

PALMIRA

2010

SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS POR POBLACIONES BACTERIANAS AISLADAS DE UN SUELO DEL VALLE DEL CAUCA. ESTUDIO DE BIODIVERSIDAD Y EFICIENCIA

CARLOS OMAR PATIÑO TORRES, M.Sc.

Trabajo de tesis como requisito parcial para optar al título de Doctor en Ciencias Agropecuarias Línea de Investigación Manejo de Suelos y Aguas

DIRIGIDO POR:

MARINA SANCHEZ DE PRAGER Ph.D

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

COORDINACION GENERAL DE POSGRADOS

PALMIRA

2010

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE PALMIRA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ACTA DE JURADO DE TESIS

DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS
LÍNEA DE INVESTIGACIÓN MANEJO DE SUELOS Y AGUAS

En Palmira a los once (11) días del mes de noviembre de 2010, se reunió en esta Sede el Jurado Calificador de Tesis, integrado por los doctores: CARLOS GERMAN MUÑOZ PEREA, IDUPULAPATI M. RAO y EYDER DANIEL GOMEZ

Para calificar la Tesis de Grado de:

CARLOS OMAR PATIÑO TORRES

Titulada:

"SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS POR POBLACIONES BACTERIANAS AISLADAS DE UN SUELO DEL VALLE DEL CAUCA.ESTUDIO DE BIODIVERSIDAD Y EFICIENCIA", bajo la dirección de Marina Sánchez de Prager, Ph.D.

Después de oír el informe del jurado evaluador compuesto por los Doctores CARLOS GERMAN MUÑOZ PEREA, IDUPULAPATI M. RAO y EYDER DANIEL GOMEZ y de haber cumplido con el proceso de evaluación, la tesis fue calificada como:

APROBADA X

REPROBADA ___

CARLOS GERMAN MUÑOZ

IDUPULAPATI M. RAO

EYDER DANIEL GOMEZ

DEDICATORIA

Por quienes todo ha valido la pena, Andrés, Daniel y Gabriela; a mi esposa y compañera, Sandra; a mis padres, Carlos y Nelly; a mis hermanos Álvaro, Jesús y Ximena; a mis muchos sobrinos; a mis tíos, Guillermo y Betty.

AGRADECIMIENTOS

Sólo el tiempo devela la amistad verdadera, el objetivo final y los papeles trascendentales de nuestra existencia, pero el consejo y apoyo trascienden al tiempo. Gracias a quienes me permitieron ser...

Gracias a:

Mi tutora y amiga, Dra. Marina Sánchez de Prager, maestra en lo personal, como profesora y consejera; a ella debo mucho de mi futuro;

A Arnulfo, Germán, Ana, Sandra, Nelly y Carlos, quienes me permitieron volver a confiar;

Por sus consejos y apoyo, gracias a mis profesores, Dr. Juan Carlos Menjivar, Dra. Karina López, Dr. Carlos Germán Muñoz, Dr. Jaime Muñoz, Dra. Sara Mejía.

Al Dr. Idupulapati Rao, por facilitar el suelo usado en los ensayos de invernadero, y por sus invaluables consejos.

Gracias a la fuerza infinita y eterna que me permite mantener la esperanza.

La facultad y los jurados de tesis

no se harán responsables de las ideas

emitidas por el autor.

Articulo 24, resolución 04 de 1974

CONTENIDO

Pag.

INTRODUCCIÓN 18

1. OBJETIVOS 20

1.1 OBJETIVO GENERAL 20

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS 20

2. REVISIÓN DE LITERATURA 21

2.1 EL FÓSFORO COMO ELEMENTO ESENCIAL EN LA NUTRICIÓN DE LAS PLANTAS. 21

2.2 EL CICLO Y DINÁMICA DEL FÓSFORO EN EL SUELO 25

2.3 LOS MICROORGANISMOS COMO FUENTE Y DINAMIZADORES DEL FÓSFORO EN EL SUELO 29

2.3.1 Microorganismos promotores del crecimiento vegetal y solubilización de fosfatos. 30

2.3.1.1 Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal. 30

2.3.1.2 La solubilización de fosfatos por los microorganismos. 31

2.3.1.3 Mecanismos genéticos de la mineralización/solubilización de fosfatos. 32

2.3.2 Impacto de la aplicación de los MPCV en la agricultura moderna. 40

3. MATERIALES Y MÉTODOS 47

3.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO 47

3.1.1 Aislamiento y purificación de poblaciones bacterianas con capacidad solubilizadora de fosfatos a partir de muestras rizosféricas. 47

3.1.2 Evaluación de la estabilidad fenotípica de la capacidad solubilizadora y estimación de su eficiencia *in vitro.* 48

3.1.3 Aislamiento y purificación de ADN genómico y amplificación del gen rDNA 16S de los aislamientos bacterianos. 49

3.1.4 Perfilamiento molecular de los aislados. 50

3.1.5 Determinación de actividad nitrogenasa. 50

3.2 ENSAYOS DE INVERNADERO 51

3.2.1 Multiplicación de inóculo de los aislamientos. 51

3.2.2 Inoculación de las semillas. 51

3.2.3 Ensayos de inoculación en invernadero. 52

3.2.4 Recuperación de inoculantes. 54

3.3 SÍNTESIS DE PROCEDIMIENTOS Y VARIABLES 54

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 56

4.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO 56

4.1.1 Aislamiento y purificación de poblaciones bacterianas con capacidad solubilizadora de fosfatos a partir de muestras rizosféricas. 56

4.1.2 Evaluación de la estabilidad fenotípica de la capacidad solubilizadora y estimación de su eficiencia *in vitro.* 56

4.1.3 Análisis de secuencias DNAr 16S y perfilamiento molecular de los aislados. 59

4.1.4 Determinación de actividad nitrogenasa. 62

4.2 ENSAYOS DE INVERNADERO 63

4.2.1 Recuperación de inoculantes 71

4.3 CAMBIO DE pH EN LOS MEDIOS DE CULTIVO 72

4.4 DISCUSION DE RESULTADOS 72

5. CONCLUSIONES 92

6. RECOMENDACIONES 93

BIBLIOGRAFÍA 94

ANEXOS 114

LISTA DE TABLAS

Pag.

Tabla 1. Tratamientos para evaluar el efecto de la inoculación con BSF y la aplicación de roca fosfórica sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de ají. ...53

Tabla 2. Resumen metodológico del proyecto. 54

Tabla 3. Eficiencia solubilizadora de fosfatos - ESF de los aislamientos UNBS1 a UNBS7. Agrupamiento según la prueba de Duncan (α=0.05), por aislado y por clasificación filogenética. Promedio de cinco resiembras y 4 replicaciones por resiembra. 58

Tabla 4. Homología taxonómica del gen ADNr 16S de los aislamientos UNBS1 a UNBS7 según búsqueda en GenBank y otras bases de datos públicas. 60

Tabla 5. Efecto de la aplicación de BSF y RF sobre el crecimiento de plantas de ají en condiciones de invernadero. Evaluación hecha a los 68 días después de la siembra. 64

Tabla 6. Efecto de la aplicación de BSF y RF sobre el contenido de P en los tejidos e índice relativo de eficiencia de uso del P. Evaluación hecha a los 68 días después de la siembra. 65

Tabla 7. Conteo de UFC recuperadas del suelo rizosférico de plantas de ají sometidas a los diferentes tratamientos de inoculación en invernadero. 71

LISTA DE FIGURAS

Pag.

Figura 1. Halos de solubilización producidos por los aislamientos UNBS1 a UNBS7 y parámetros para evaluación de la ESF. 57

Figura 2. Eficiencia Solubilizadora de Fosfatos (ESF) de los aislamientos UNBS1 a UN BS7 en cinco ciclos de resiembra consecutivos. 58

Figura 3. Amplicones DNA 16S obtenidos de los aislamientos UNBS1 a UNBS7. La primera columna corresponde al patrón generado por el marcador de peso molecular. 59

Figura 4. Perfiles BOX-PCR de los aislamientos UNBS1 a UNBS7. La primera columna corresponde al patrón generado por del marcador de peso molecular. ..61

Figura 5. Dendograma generado con TotalLab ® TL120 1D en base a los perfiles BOX-PCR de los aislamientos UNBS1 a UNBS7.....62

Figura 6. Amplicones de la secuencia parcial del gen *nifH* de los aislados UNBS1 a UNBS7, obtenidos con los primer *nifH* R y *nifH* F (Roesch *et al.,* 2006).....63

Figura 7. Efecto de la aplicación de RF (12 o 24 g) y BSF (*B. ambifaria* o *B. lata cepa 383*) sobre el peso fresco de la raíz de plantas de ají, bajo condiciones de invernadero. Las barras indican el error estándar y las letras señalan diferencias estadísticas significativas cuando son distintas. 66

Figura 8. Efecto de la aplicación de RF (12 o 24 g) y BSF (B. ambifaria o B. lata cepa 383) sobre la materia seca de la raíz de plantas de ají, bajo condiciones de

invernadero. Las barras indican el error estándar y las letras señalan diferencias estadísticas significativas cuando son distintas. 66

Figura 9. Efecto de la aplicación de RF (12 o 24 g) y BSF (*B. ambifaria* o *B. lata cepa 383*) sobre el peso fresco del tallo de plantas de ají, bajo condiciones de invernadero. Las barras indican el error estándar y las letras señalan diferencias estadísticas significativas cuando son distintas. 67

Figura 10. Efecto de la aplicación de RF (12 o 24 g) y BSF (*B. ambifaria* o *B. lata cepa 383*) sobre la materia seca del tallo de plantas de ají, bajo condiciones de invernadero. Las barras indican el error estándar y las letras señalan diferencias estadísticas significativas cuando son distintas. 67

Figura 11. Efecto de la aplicación de RF (12 o 24 g) y BSF (*B. ambifaria* o *B. lata cepa 383*) sobre la relación PFR/PFT de plantas de ají, bajo condiciones de invernadero. Las barras indican el error estándar y las letras señalan diferencias estadísticas significativas cuando son distintas. 68

Figura 12. Efecto de la aplicación de RF (12 o 24 g) y BSF (*B. ambifaria* o *B. lata* cepa 383) sobre el contenido de P de los tejidos de plantas de ají, bajo condiciones de invernadero. 69

Figura 13. Efecto de la aplicación de RF (12 o 24 g) y BSF (*B. ambifaria* o *B. lata* cepa 383) sobre el peso fresco total (g) y sobre el índice relativo de eficiencia en el uso del P de las plantas de ají, bajo condiciones de invernadero. 70

Figura 14. . Efecto de la aplicación de RF y la bioinoculación con *B. ambifaria* sobre el crecimiento radical de plantas de ají. B.a: *B. ambifaria*, SC: sin cepa, SRF: sin roca fosfórica. 88

Figura 15. Efecto de la aplicación de RF y BSF sobre la morfología y biomasa radical.....89

Figura 16. Efecto de la roca fosfórica (RF) y la inoculación con BSF (*B. lata* cepa 383 *o B. ambifaria*) sobre el crecimiento aéreo de plantas de ají (*C. annum*). Evaluación realizada a los 68 días de la siembra. 90

LISTA DE ANEXOS

Pag.

Anexo A. Análisis de varianza para ESF de los aislamientos. El análisis se hizo para cinco resiembras (semanas) consecutivas y cuatro replicas por semana y por aislamiento, utilizando el modelo lineal general del software profesional IBM SPSS 19.....114

Anexo B. Análisis de varianza para efecto de tratamientos sobre peso fresco de la raíz de plantas de ají. Evaluación hecha a los 68 días de efectuada la inoculación y la siembra. El análisis se hizo para cuatro replicas por tratamiento, utilizando el modelo lineal general del software profesional IBM SPSS 19. 115

Anexo C. Análisis de varianza para efecto de tratamientos sobre peso volumen de la raíz de plantas de ají. Evaluación hecha a los 68 días de efectuada la inoculación y la siembra. El análisis se hizo para cuatro replicas por tratamiento, utilizando el modelo lineal general del software profesional IBM SPSS 19. 116

Anexo D. Análisis de varianza para efecto de tratamientos sobre peso materia seca de la raíz de plantas de ají. Evaluación hecha a los 68 días de efectuada la inoculación y la siembra. El análisis se hizo para cuatro replicas por tratamiento, utilizando el modelo lineal general del software profesional IBM SPSS 19. 117

Anexo E. Análisis de varianza para efecto de tratamientos sobre peso fresco del tallo de plantas de ají. Evaluación hecha a los 68 días de efectuada la inoculación y la siembra. El análisis se hizo para cuatro replicas por tratamiento, utilizando el modelo lineal general del software profesional IBM SPSS 19. 118

Anexo F. Análisis de varianza para efecto de tratamientos sobre peso de materia seca del tallo de plantas de ají. Evaluación hecha a los 68 días de efectuada la inoculación y la siembra. El análisis se hizo para cuatro replicas por tratamiento, utilizando el modelo lineal general del software profesional IBM SPSS 19 120

Anexo G. Análisis de varianza para efecto de tratamientos sobre la relación peso fresco de la raíz/ peso fresco del tallo de plantas de ají. Evaluación hecha a los 68 días de efectuada la inoculación y la siembra. El análisis se hizo para cuatro replicas por tratamiento, utilizando el modelo lineal general del software profesional IBM SPSS 19. 121

Anexo H. Análisis de varianza para efecto de tratamientos sobre biomasa total (peso fresco total) de plantas de ají. Evaluación hecha a los 68 días de efectuada la inoculación y la siembra. El análisis se hizo para cuatro replicas por tratamiento, utilizando el modelo lineal general del software profesional IBM SPSS 19. 122

Anexo I. Análisis de varianza para efecto de tratamientos sobre el área foliar de plantas de ají. Evaluación hecha a los 68 días de efectuada la inoculación y la siembra. El análisis se hizo para cuatro replicas por tratamiento, utilizando el modelo lineal general del software profesional IBM SPSS 19. 123

Anexo J. Análisis de varianza para efecto de tratamientos sobre la eficiencia de uso del P de plantas de ají. Evaluación hecha a los 68 días de efectuada la inoculación y la siembra. El análisis se hizo para cuatro replicas por tratamiento, utilizando el modelo lineal general del software profesional IBM SPSS 19. 124

Anexo K. Secuencias de ADNr 16S de los aislados UNBS1 a UNBS7 ensambladas con Geneious v. 4.8.4 ® 126

RESUMEN

Se seleccionaron plantas de chontaduro (*Bactris gasipaes* Kunth) silvestres crecidas en un suelo de la Costa Pacífica vallecaucana, típicamente ácido y muy deficiente en nutrientes, para realizar la bioprospección de poblaciones bacterianas rizosféricas con capacidad para solubilizar fósforo. Los aislamientos se identificaron por análisis del gen ADNr 16S como *Burkholderia ambifaria, Burkholderia lata* y *Pseudomonas putida*, las cuales ya se han registrado como solubilizadoras en muchos ecosistemas, asociadas a la rizosfera en diferentes cultivos de interés comercial.

Inicialmente, 22 aislamientos mostraron capacidad de solubilización, pero sólo siete conservaron la característica cuando se hicieron resiembras sobre medio PVK. Cuando se evaluó su eficiencia solubilizadora *in vitro*, los aislados demostraron capacidad de solubilización estadísticamente diferente. Cuatro identificados como *B. ambifaria* presentaron la mayor eficiencia, seguidos por dos aislamientos de *B. lata*. Con la técnica empleada *P. putida* mostró ser la menos eficiente. El perfilamiento molecular por BOX-PCR de los aislamientos obtenidos permitió evidenciar diversidad intraespecífica entre los mismos.

Los ensayos de invernadero, en los cuales se evaluó el efecto conjunto o independiente de la aplicación de roca fosfórica (RF) y de los aislamientos biofertilizantes (*B. ambifaria o B. lata*) sobre varios parámetros de crecimiento vegetativo de plantas de ají (*Capsicum annum*), mostraron efecto significativo de la RF sola y/o en conjunto con los aislamientos inoculados. La bioinoculación permitió disminuir la RF, a la mitad de la dosis aplicada, sin que el crecimiento de las plantas se afectara, igualmente, los contenidos de P en los tejidos de las plantas inoculadas con las bacterias fueron superiores comparados con el de aquellas no inoculadas.

Palabras claves: solubilización de fosfatos, PGPR, *Burkholderia*, rizosfera

ABSTRACT

Wild peach palm (Bactris gasipaes Kunth) plants were selected, grown in a soil of the Valle del Cauca pacific coast, typically acidic and very poor in nutrients, for bioprospecting of rhizosphere bacterial populations with the capacity to solubilize phosphate. The isolates were identified by analysis of 16S rDNA gene as *Burkholderia ambifaria*, *Burkholderia lata* and *Pseudomonas putida*, which has already been registered as solubilizers in many ecosystems, associated with the rhizosphere of different crops of commercial interest.

Initially, 22 isolates showed solubilization capacity, but only seven retained the property when they were reseeding on PVK medium. When solubilizing efficiency was evaluated *in vitro*, the isolates showed statistically different solubilization capacity. Four identified as *B. ambifaria* had the highest efficiency, followed by two isolates of *B. lata*. With the technique used *P. putida* was shown to be the least efficient. The molecular profiling by BOX-PCR of the isolates obtained allowed to demonstrate intraspecific diversity among them.

Greenhouse tests, in which we evaluated the combined effect or independent of the application of phosphate rock (RF) and bioinoculants (*B. ambifaria* or *B. lata*) on various parameters of vegetative growth of pepper plants (*Capsicum annum*) showed significant effect of RF alone and / or in conjunction with the inoculated isolates. The bioinoculation helped to reduce the RF dose, half of the applied dose, without the growth of plants affected. Also, the contents of P in plant tissue inoculated with bacteria were higher compared with those not inoculated.

Keywords: phosphate solubilization, PGPR, *Burkholderia*, rhizosphere.

INTRODUCCIÓN

En un escenario en el que la agricultura debe ofrecer más alimento con cada vez menos recursos y tierra adecuada para esta actividad, condicionada además a las severas limitaciones que le impone el cambio climático, es urgente y oportuna la búsqueda de prácticas tecnológicas alternativas, que se vislumbren como eficaces y sustentables, capaces de dar salidas a las típicas de la revolución verde, incluida la fertilización de síntesis química.

Destaca en este último caso la fertilización fosfórica, la cual por sus varios impactos negativos ha demostrado ser una práctica no sostenible ni tampoco viable a mediano plazo. Las alternativas propuestas para una adecuada nutrición fosfórica de los cultivos abarcan desde esfuerzos de mejoramiento para una mayor eficiencia de absorción y utilización del fósforo por las plantas, incluidas prácticas de mejoramiento molecular, hasta la aplicación de enmiendas orgánicas con compost o con residuos vegetales. Es claro por otra parte, que una sola estrategia no será la mejor opción para todos los casos. La mejor propuesta debe buscarse en los contextos y potencialidades regionales y posiblemente, surja de la sumatoria de varias alternativas.

Debido a la riqueza genética de los ecosistemas del trópico, el uso de la biodiversidad vegetal y/o microbiana es una apuesta natural para resolver el problema aludido. En el primer caso, la solución será particular a cada cultivo, en la segunda, el alcance es mayor, dado que los microorganismos, en la mayoría de los casos, se establecen en la rizosfera de muchas especies vegetales. La participación de los microorganismos en la nutrición fosfórica de las plantas es un hecho reconocido desde hace ya muchas décadas, sin embargo, sólo la reciente preocupación internacional en los problemas ambientales colocó el tema en una

perspectiva de uso práctico. Además de ser en sí mismos, como biomasa, una de las reservas de P, los microorganismos contribuyen con la mineralización del P orgánico y con la solubilización del P inorgánico del suelo. Este último fenómeno constituye el interés del presente proyecto.

Aunque en diferentes partes del mundo se ha empezado a estudiar extensivamente el tema de la solubilización del fósforo por los microorganismos del suelo, la existencia de usos experimentales y comerciales prometedores, aún es vasto el campo de estudio para comprender sus aspectos básicos: ¿Es la capacidad solubilizadora de fosfatos una característica genética de unas pocas especies microbianas o es una cualidad generalizada?, ¿Cuál es la distribución biogeográfica global y regional de los microorganismos solubilizadores de P (MSP)?, ¿Cuánto de la nutrición fosfórica en los ecosistemas naturales y agroecosistemas puede deberse a la acción de los MSP?, ¿Cuáles son los mecanismos que explican el proceso de solubilización microbiana del P *in vitro* e *in situ*?, ¿Es la asociación rizosférica con MSP una estrategia adaptativa de las especies vegetales endémicas que crecen en suelos deficitarios en P disponible?

Se requieren igualmente, ensayos de evaluación del efecto de tales MSP bajo condiciones de invernadero y de campo, con el fin de analizar los efectos.

Sólo cuando se implementen criterios de calidad adecuados en su producción, manejo y comercialización, los biofertilizantes representarán para el sector rural una tecnología alternativa sostenible para la producción agrícola, y ello, debe ser consecuencia del desarrollo de estudios sistemáticos, profundos y objetivos de los aspectos ya señalados. La presente investigación es un primer esfuerzo en los suelos de la Costa Pacífica vallecaucana.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Reconocer a nivel filogenético las bacterias asociadas a la raíz del chontaduro con capacidad solubilizadora de fosfatos y evaluar su eficiencia bajo condiciones *in vitro* y en invernadero.

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Evaluar *in vitro* la capacidad de solubilización de fosfatos de las poblaciones bacterianas asociadas a la rizosfera de plantas de chontaduro, crecidas en un suelo de la Costa Pacífica del Valle del Cauca.

Reconocer a nivel filogenético, las poblaciones bacterianas con respuesta positiva para la solubilización de fosfatos.

Evaluar la eficiencia de solubilización de fosfatos de los aislados en condiciones *in vitro.*

Evaluar el efecto de la bioinoculación de las BSF sobre el crecimiento de plantas de ají en invernadero.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 EL FÓSFORO COMO ELEMENTO ESENCIAL EN LA NUTRICIÓN DE LAS PLANTAS.

El fósforo es un elemento nutriente para todos los seres vivos, los cuales lo demandan en cantidades apreciables debido a que hace parte de la composición de las moléculas orgánicas esenciales para la vida. Por ejemplo, el P es parte integral del metabolismo energético y constituyente básico de los ácidos nucléicos y de las membranas en todos los seres vivos. En las plantas, los principales procesos bioquímicos, la fotosíntesis y la respiración, son activados por el P inorgánico y/o sus derivados orgánicos. Los ésteres de fosfato actúan, en general, como portadores energéticos en varias rutas metabólicas y como precursores de los ácidos nucléicos, mientras los fosfolípidos juegan papel importante en la integridad y función de las membranas celulares (Calderón-Vásquez *et al.,* 2009; Maathuis, 2009; Sánchez, 2007).

En los procesos de señalización celular, la fosforilación y la defosforilación de las proteínas son cruciales para las rutas de transducción, y en el cloroplasto, la homeostasis del fosfato regula el transporte de los azúcares fosforilados a través de la membrana y la síntesis de almidón (Raghothama y Karthikeyan, 2005).

En términos de contenido, las semillas son el principal reservorio de P, particularmente en las vacuolas. Allí, este elemento se almacena en forma de ácido fítico, el cual quelata la mayor parte de los cationes contenidos en la semilla, Ca^{2+}, Mg^{2+} y K^{+}, aunque también Fe^{2+} y Zn^{2+} (Maathuis, 2009).

El P disponible para las plantas es el fosfato inorgánico (Pi) presente en la solución del suelo como iones ortofosfato, procedente de la mineralización de

materiales orgánicos y solubilización de fuentes minerales (Smith *et al.,* 2003). Los requerimientos de P para un crecimiento óptimo, fluctúan entre 0.3 a 0.5% de la masa seca de la planta. La deficiencia de P en el suelo y por tanto en las plantas, se traduce en retardos en el crecimiento y una coloración purpura en las hojas, no asociada a clorosis, debida a un exceso en la producción de antocianinas. Además, las plantas presentan muy baja eficiencia fotosintética por unidad de clorofila, lo que conlleva la reducción de la mayoría de los procesos metabólicos, y un retraso en los procesos de maduración (Taiz and Zeiger, 2010).

Debido a que la mayoría de los ecosistemas tienen baja disponibilidad de P asimilable en el suelo, y a que su concentración varía en forma considerable temporal y espacialmente (Gojon *et al.,* 2009; Robinson, 2005), las plantas para incrementar la adquisición del Pi y/o para mejorar la eficiencia de su utilización interna, han desarrollado diferentes estrategias morfológicas, bioquímicas y simbióticas adaptativas (Vance *et al.,* 2003; Lambers *et al.,* 2006).

Entre las adaptaciones morfológicas se destaca la formación de raíces “cluster” por algunas especies mono y dicotiledóneas (denominadas raíces proteoides en el caso de las *Protaceae* y dauciformers en el caso de las *Cyperaceae*) (Lambers et al., 2006). Allí se combina alta densidad de raíces laterales muy finas distribuidas en un volumen limitado de suelo (lo cual garantiza a la planta un estrecho contacto), acompañada de una liberación sincronizada de ácidos orgánicos y fosfatasas ácidas o básicas, que incrementan la disponibilidad de P_i en la vecindad inmediata a estas raíces al mismo tiempo que la absorción eficiente del nutriente (Smith *et al.,* 2003; Wey *et al*., 2009; Tran *et al*., 2010).

Además de las raíces cluster, existe la micorriza como estrategia simbiótica y mutualística más generalizada entre las raíces de las plantas y los hongos para mejorar la eficiencia del uso del P del suelo. Alrededor del 80% de las plantas terrestres poseen la simbiosis denominada micorriza arbusculares (MA). La

ventaja de esta estrategia radica en la mayor extensión que el micelio fungoso imprime al sistema radical para absorción eficiente de nutrientes a partir del suelo, especialmente del P, además de los cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos que se suceden en los simbiontes (Sánchez, 2007; Sánchez de P., 2007; Finlay, 2005; Harrier y Watson, 2003).

Para mantener de forma estricta la homeostasis del P celular y un gradiente de concentración de casi tres órdenes de magnitud a través de la membrana plasmática, las plantas han producido en el transcurso de la evolución, varios mecanismos morfofisiológicos, que solos o en combinación, optimizan la absorción y traslocación del P.

Se han propuesto diferentes modelos de toma de iones para explicar la habilidad de las plantas para adquirir P_i tanto bajo condiciones de deficiencia como de suficiencia de P_i. El modelo más aceptado en la actualidad, es el de toma dual, que involucra mecanismos de absorción de P de alta y baja afinidad. De hecho, hay evidencias que soportan la presencia de transportadores que operan con eficiencia en altas y bajas concentraciones de P_i en el medio. Mientras el sistema de transportadores de baja afinidad parece expresarse constitutivamente en las plantas, las condiciones de deficiencia de Pi inducen la expresión del sistema de transporte de alta afinidad (Raghothama y Karthikeyan, 2005; Smith, 2002; Smith *et al.,* 2003). Actualmente se reconocen tres familias de transportadores de Pi, PHT1, PHT2 y PHT3, de las cuales PHT1, un sistema de transportadores de alta afinidad con 9 genes, es particularmente importante en la raíz (Gojon *et al.,* 2009).

A nivel molecular, la dinámica de la toma de fosfato bajo condiciones de deficiencia (o suficiencia) en el suelo, es regulada de manera compleja y precisa, e involucra la participación de sistemas de regulación por microRNA. El modelo actual, apoyado en los resultados de varios estudios recientes (Bari *et al.,* 2006; Aung *et al.,* 2006), implica un papel clave del miRNA399, el cual se desempeña

como molécula reguladora central en la expresión de genes relacionados con la respuesta a la deficiencia de P en el suelo (Gojon *et al.,* 2009; Chiou *et al.,* 2006; Chiou, 2007).

Según este modelo, bajo condiciones de deficiencia las células de la planta incrementan los transcritos primarios de varios genes, entre ellos, miRNA399, cuya expresión regula a su vez, negativamente, la expresión del gen *UBC*24 (PHO2) a nivel postranscripcional. El producto del gen *UBC*24 es una enzima conjugativa de ubiquitina E2 (AtUBC24), la cual está involucrada en la ruta de degradación dirigida de proteínas. Los resultados indican que UBC24 juega algún papel en la supresión de la expresión de varios genes bajo condiciones no limitantes de disponibilidad de P. Curso abajo de la señalización por UBC24, se encuentran genes transportadores de fosfato (*PHT1;1, PHT1;4, PHT1;8 y PHT1;9*) que se ha demostrado pueden ser responsables de una mayor toma de P_i por las raíces de la planta bajo condiciones de deficiencia del nutriente. Debido a que las enzimas UBC, normalmente no participan en la regulación de la abundancia de RNAm, los cambios en los niveles de transcritos de los transportadores de P_i, probablemente sean mediados por un intermediario, tal vez un factor de transcripción, que podría ser blanco de la acción de UBC24.

Antes de la actuación del miRNA399, en la cascada de señalización, se ha propuesto la acción del factor de transcripción tipo MYB, PHR1 (gen con respuesta a la deficiencia de P), posiblemente a través de la unión en cis a elementos GNATATNC, ubicados curso arriba de la secuencia de miRNA399 (Bary *et al.,* 2006; Chiou, 2007). El gen miRNA399 no se expresa bajo condiciones de suficiencia de P, ni cuando la planta es sometida a tratamientos de estrés (frío, sales, sequía y/o ácido abscísico), ni tampoco en deficiencias de N, K, S y/o carbohidratos, por cuanto se considera que su respuesta es específica para la deficiencia de P (Bari *et al.,* 2006; Chiou, 2007).

2.2 EL CICLO Y DINÁMICA DEL FÓSFORO EN EL SUELO

El P pertenece al grupo VA de la tabla periódica con una configuración (Ne) $4s^2$ $4p^3$. Es estable en el estado pentavalente formando un anión ortofosfato que retiene un complejo casi tetraédrico rodeado por 4 átomos de oxígeno. En la mayoría de los ambientes suelo/agua, los aniones $H_2PO_4^-$ y HPO_4^{2-} son las especies químicas termodinámicamente estables (para el H_3PO_4: pK_{a1} = 2.1, pK_{a2} = 7.2 y pK_{a3} = 12.3) (Arai y Sparks, 2007) y disponibles para los vegetales.

Más del 90% del P total en el sistema suelo-planta-animal está en los suelos, y menos del 10% en el resto de sistemas biológicos. El contenido de P en la litosfera es de aproximadamente 1200 mg kg^{-1}, mientras en los suelos se presenta en un rango de 200 a 5000 mg Kg^{-1}, con un promedio de 600 mg kg^{-1}. En las rocas primarias y en los suelos jóvenes, el P se encuentra unido principalmente al Ca y Mg, dando al P una solubilidad típica cercana a 0.5 mg L^{-1}. La meteorización de los minerales cambia la solubilidad del P, dado que los compuestos del Ca se lavan de manera preferencial, incrementándose la abundancia relativa del Fe y Al, por cuanto la solubilidad del P llega a ser controlada por los fosfatos de Fe (Fe-P) y de aluminio (Al-P), la cual es mucho más baja que la de los fosfatos de Ca (Ca—P) (Tiessen, 2008; Arai y Sparks, 2007). En la hidrosfera, las concentraciones típicas de P total en las aguas negras, en el drenaje agrícola y en las aguas superficiales de los lagos son, respectivamente, 3-15, 0.05-1.0 y 0.01-0.04 mg L^{-1} (Arai y Sparks, 2007).

En términos de fuentes del nutriente para las plantas, antes que por su naturaleza química, en el suelo se distinguen tres formas principales de P: P_i en solución (P_{sol}), P orgánico (P_o) y P inorgánico (P_i) asociado a partículas minerales, de las cuales, el P_{sol}, principalmente en forma de ortofosfato, es el considerado disponible para las plantas. La concentración del P_{sol} está determinada

principalmente por los procesos de mineralización e inmovilización del P_o, además, por el equilibrio entre los procesos de adsorción-desorción y precipitación-disolución del P_i (Sims y Vadas, 2005).

La mineralización corresponde a la liberación del P_o contenido en la materia orgánica del suelo y su conversión a formas de P_i y/o $P_{(sol)}$, mediada por acción enzimática, mientras la inmovilización es la entrada activa del P_i a las células microbianas, convirtiéndose a formas de P_o (Oberson and Joner, 2005).

La adsorción es la formación de enlaces químicos entre el P y las superficies minerales, y la desorción es la liberación del P de estas mismas superficies hacia la solución del suelo (Arai y Sparks, 2007). Las superficies cargadas positivamente de las arcillas, de los minerales de Fe, Al y Ca, atraen los iones ortofosfato de la solución, los cuales se adsorben a grupos funcionales superficiales, intercambiándose con grupos OH^- y OH_2, a través de la formación de complejos de esfera interna o de esfera externa (adsorción específica o no específica, respectivamente).

Las reacciones de adsorción del P en suelos ácidos son típicamente bifásicas, caracterizadas por una rápida reacción inicial, seguida por una reacción mucho más lenta. Diversos estudios han demostrado que tal retención de P en el suelo es altamente dependiente de sus propiedades físico –químicas, por ejemplo, de los contenidos de óxidos amorfos y cristalinos de Fe y Al, y de los contenidos de materia orgánica, de arcillas y de calcio (Arai y Sparks, 2007).

Las reacciones de precipitación son controladas, a su vez, por la solubilidad de los minerales secundarios del P (fosfatos de aluminio (Al-P), de hierro (Fe-P) y de calcio (Ca-P)). La solubilidad del mineral representa las concentraciones de sus iones constituyentes que pueden mantenerse en solución bajo condiciones de equilibrio. Cuando la concentración del P_{sol} es mayor que la soportada por la

solubilidad química del mineral, el P_{sol} se precipita con los cationes metálicos (Al, Ca, Fe) y forma minerales de P. Cuando el P_{sol} es menor, los minerales de P se disuelven en la solución. Bajo condiciones de pH comunes en los suelos, la solubilidad de los precipitados metálicos del P sigue el orden: Ca-P > Al-P > Fe-P (Chuang et al.; 2007).

En el suelo, el P_i forma parte de los minerales primarios (Apatita: $Ca_{10}(PO_4)_6X_2$; siendo $X_2 = F^-$, OH^- o Cl^-) y de los minerales secundarios (formados por precipitación del P con Al, Ca y Fe), se presenta además como: a) P adsorbido sobre las superficies de los minerales de arcilla; b) como oxihidróxidos de Fe y Al (Fe-P y Al-P); c) como carbonatos de Ca (Ca-P), y; d) como P físicamente ocluido dentro de los minerales secundarios. Como parte de estos últimos, los Ca-P ($Ca_3(PO_4)_2$) dominan en suelos neutrales y alcalinos, mientras los Fe-P (Strengita: $FePO_4.2H_2O$) y Al-P (Variscita: $AlPO_4.2H_2O$) predominan en los suelos ácidos (Sims y Vadas, 2005).

Las formas iónicas del P_i son dependientes del pH. A valores de pH entre 4.0 y 6.0, la mayoría del P_i está presente como ión $H_2PO_4^-$, forma que puede ser absorbida por las plantas debido a su solubilidad en agua. A pH entre 6.5 y 7.5, el P_i en la solución del suelo está presente principalmente como $H_2PO_4^-$ y HPO_4^{2-}, forma esta última la cual también puede ser absorbida por las raíces de las plantas, pero en menor proporción que la primera. A pH entre 8.0 y 10.0, el ión HPO_4^{2-} es dominante. Más allá de un pH de 10.0, la forma iónica dominante es el PO_4^{3-}, y a menos que esté presente como fosfato de sodio, el P no es disponible para las plantas. En el otro extremo, es decir, debajo de pH 3.0, el P está presente como H_3PO_4, una forma química extremadamente reactiva, por lo que en suelos altamente ácidos, la fijación o reversión del fosfato es bastante rápida (Prasad y Power, 1997, Arai y Spark, 2007).

La cantidad de P presente en forma orgánica (Po) en los suelos varía de unos pocos miligramos a casi 0.5 g Kg^{-1} de suelo (20 a 80% del total) (Arai y Sparks, 2007). El contenido de P_o depende de varios factores: clima, vegetación, textura, prácticas de fertilización, riegos y drenaje y del uso del suelo; siendo varios de estos factores interdependientes. El tiempo de residencia media del P_o en el suelo se ha estimado entre 350 y 2000 años (Kögel-Knabner, 2006).

Tres grupos de compuestos forman la reserva de P_o en el suelo: los inositol fosfato (ésteres de inositol fosfato), ácidos nucleicos y fosfolípidos. Estas formas dan cuenta del 50 al 70% del P_o del suelo (Kögel-Knabner, 2006). Debido a su gran estabilidad en el suelo, el inositol fosfato (también llamado ácido fítico o fitato), almacena más del 50% del P_o, mientras el contenido de fosfolípidos comprende entre 0.5 – 7% del P_o total. Los ácidos nucléicos, los cuales se originan a partir de la descomposición de microorganismos, animales y restos vegetales, es la fracción más pequeña (< 3% del P_o total) (Arai y Sparks, 2007).

Por la naturaleza del enlace químico, los compuestos del P en el suelo pueden clasificarse en ésteres de fosfato, fosfonatos y anhídridos (Turner *et al.,* 2006). Los ésteres de fosfato son subclasificados de acuerdo al número de grupos éster que se unen a cada fosfato. Los fosfato monoésteres tienen un enlace éster simple P-O-C, mientras los diésteres de fosfato tienen dos enlaces (O-P-O). Los principales monoésteres de fosfato son los ésteres fosfóricos de hexahidroxiciclohexano (inositol), y en pequeñas concentraciones fosfatos de azúcar, fosfoproteínas y nucleótidos monofosfato. En concentraciones mucho menores (< 10% en suelos agrícolas), los fosfato diésteres incluyen los ácidos nucleicos, los fosfolípidos y los ácidos teicoicos. Los fosfonatos contienen un enlace directo P-C y son poco comunes en los suelos tropicales. Los fosfoanhídridos (polifosfatos orgánicos) tales como el ATP, son una fuente de energía para la mayoría de los procesos metabólicos, pero son detectados raramente en los suelos. Por su parte, los

polifosfatos inorgánicos se presentan con frecuencia en los suelos, especialmente como pirofosfatos, aunque su función y origen preciso no son claros (Turner *et al.,* 2006).

2.3 LOS MICROORGANISMOS COMO FUENTE Y DINAMIZADORES DEL FÓSFORO EN EL SUELO

Los microorganismos además de constituir importante reserva de P en el suelo a través de su biomasa, median varios procesos claves en el ciclo biogeoquímico de este elemento. La absorción microbiana del P y su subsecuente liberación y redistribución, afectan de manera significativa la disponibilidad del P para las plantas en los ecosistemas naturales y manejados, especialmente cuando los últimos reciben enmiendas orgánicas (Oberson y Joner, 2005).

Los organismos del suelo involucrados en las transformaciones del P en el suelo incluyen todos los miembros celulares de la microbiota del suelo menores a 100 µm de diámetro, entre los cuales se cuentan bacterias, hongos, chromista, protozoos y algunos nemátodos. Aunque las bacterias son los microorganismos más numerosos del suelo, en términos de biomasa, los hongos representan los mayores aportes (Oberson y Joner, 2005).

Como reservorio y fuente de P, los microorganismos tienen concentraciones de P altamente variables, que son afectadas por la edad de la célula y la concentración de P en el medio, principalmente. Los compuestos que contienen P en las bacterias y los hongos incluyen 30-50% de ARN, 15-20% de compuestos fosforados orgánicos e inorgánicos solubles en ácido (incluyendo azúcares, ésteres de nucleótidos y varias enzimas fosforiladas y polifosfatos), < 10% de fosfolípidos, 5-10% de ADN y pequeñas cantidades de inositol fosfato (Oberson y Joner, 2005). Además, las células Gram positivas pueden acumular P en sus

paredes celulares como ácido teicoico, el cual puede constituir hasta el 30% del P en células en crecimiento activo de *B. subtilis*.

Los microorganismos del suelo requieren P para su crecimiento y actividades. Si los materiales orgánicos que oxidan para obtener energía contienen menos P que el requerido, los microorganismos inmovilizan P a partir de la solución. Si los materiales orgánicos contienen suficiente o mayor contenido de P que el requerido por el organismo, los microorganismos mineralizan P a la solución del suelo.

La naturaleza química de la materia orgánica y su reactividad asociada determinan su tasa de mineralización y por tanto, la disponibilidad de P para las plantas. Se cree por ejemplo, que los monoésteres de inositol fosfato se acumulan en mayor proporción en los suelos debido a su asociación estructural con componentes del material vegetal senescentes, lo que limita su susceptibilidad al ataque microbiano; por el contrario, las formas diéster del P_o (ácidos nucleicos y fosfolípidos) son relativamente solubles en el suelo y fácilmente mineralizables (Condron, 2004).

Otros factores que influyen la mineralización e inmovilización del P en el suelo incluyen la cantidad de P_o, la proporción C:P y N:P de los materiales orgánicos, la temperatura, la humedad, la aireación, el pH, la intensidad de cultivo y la fertilización con P (Sims y Vadas, 2005).

2.3.1 Microorganismos promotores del crecimiento vegetal y solubilización de fosfatos.

2.3.1.1 Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal.

Los microorganismos promotores del crecimiento vegetal (MPCV) son un grupo heterogéneo de microorganismos, ubicuos en el suelo y la rizosfera, los cuales estimulan el crecimiento vegetal por varios mecanismos directos e indirectos

(Marschner, 2007; Siddiqui, 2006, Khan *et al.,* 2009; Spaepen *et al.,* 2009; Hayat *et al.,* 2010; Dixon y Tilston, 2010).

La promoción indirecta del crecimiento se logra a través de la reducción o la prevención del efecto deletéreo de los microorganismos patógenos, debido principalmente a la síntesis de antibióticos o sideróforos por los MPCV. La promoción directa del crecimiento puede ser el resultado individual o combinado de la síntesis de fitohormonas, la fijación de N_2, la reducción del potencial de membrana de las raíces, la síntesis de enzimas que modulan el nivel hormonal en la planta, así como de la solubilización de Pi y la mineralización de fosfato orgánico (Vassilev *et al.,* 2006; Marschner, 2007; Hayat *et al.,* 2010).

Recientemente se ha demostrado también, que los MPCV producen cambios sustanciales en la expresión génica de las plantas, al activar genes implicados en el metabolismo y en la transducción de señales (Marschner, 2007, Nautiyal y Dion, 2008; Shtark *et al.,* 2010).

2.3.1.2 La solubilización de fosfatos por los microorganismos.

Según Wakelin *et al.,* 2004, Gerretsen demostró inicialmente que la actividad microbiológica en la rizosfera podía disolver P_i poco soluble e incrementar el crecimiento de las plantas. Posteriormente se demostró que muchas especies bacterianas y fungosas tienen actividad solubilizadora de P. En forma consistente, se ha señalado incrementos en la biodisponibilidad de P cuando existen aumentos paralelos en la actividad microbiana del suelo.

Varios estudios han puesto en evidencia la capacidad solubilizadora de fosfatos por diferentes especies microbianas (Khan *et al.,* 2007; Khan *et al.,* 2010, Zaidi *et al.,* 2009). Entre las bacterias destacan los géneros: *Pseudomonas, Bacillus, Rhizobium, Burkholderia, Achromobacter, Agrobacterium, Microccocus, Aereobacter, Flavobacterium, Enterobacter, Pantotea, Klebsiella, Rhodobacter,*

Arthrobacter, Serratia y *Erwinia*; mientras en los hongos se mencionan principalmente, *Aspergillus*, *Penicillium, Trichoderma, Fusarium* y levaduras. Además, en comparación con las bacterias, se ha registrado que los hongos poseen, en general, mayor capacidad de solubilización de P, sin embargo, la concurrencia de diferentes actividades metabólicas bacterianas que redundan en beneficio de las plantas, ha incrementado el interés en su estudio. Entre los mecanismos ampliamente aceptados como responsables de la solubilización del P mineral se tienen la producción de ácidos orgánicos y la producción fisiológica de protones, y la producción y excreción de fosfatasas ácidas para la mineralización del P_o. *Xanthomonas campestris* fue registrada hace poco y por primera vez como solubilizador de fosfatos por Sharan *et al.,* 2008.

2.3.1.3 Mecanismos genéticos de la mineralización/solubilización de fosfatos.

Mineralización de P_o por fosfatasas

La acción hidrolítica de las enzimas extracelulares en la matriz del suelo, permite la reducción de las macromoléculas a moléculas más pequeñas (oligómeros, monómeros, iones pequeños), que son más solubles y pueden difundir en la red de poros del suelo, las cuales son reconocidas por el sistema de permeasas y tomadas por la biota del suelo (Quiquampoix y Mousain, 2005).

El P_o del suelo puede ser liberado de los compuestos orgánicos en el suelo a través del concurso de tres grupos de enzimas: a) fosfatasas no específicas (fosfomonoestresasas), las cuales efectúan la defosforilación de los enlaces fosfoéster o fosfoanhidros presentes en la materia orgánica; b) fitasas, las cuales liberan el P del ácido fítico y c) fosfonatasas y liasas C-P, enzimas que llevan a cabo el clivaje del enlace C-P presente en fosfonatos orgánicos. La principal actividad corresponde aparentemente al trabajo de las fosfatasas ácidas y a las

fitasas, debido a la presencia predominante en el suelo de los sustratos sobre los que actúan (Quiquampoix y Mousain, 2005; Rodríguez *et al.,* 2006).

Las fosfatasas ácidas no específicas producidas por las bacterias (fosfohidrolasas) están formadas por tres familias moleculares, las cuales han sido designadas como clases moleculares A, B y C. Debido a su localización celular, estas enzimas parecen funcionar como secuestradores de fosfoésteres, proveyendo a la célula de nutrientes esenciales y liberando P_i a partir de nucleótidos y azúcares fosforilados, por ejemplo, mientras los subproductos orgánicos son incorporados dentro de la célula (Rodríguez *et al.,* 2006). A nivel genético, la producción de fitasas en bacterias es inducible y su expresión es regulada de manera compleja, sin embargo, su control es diferente para grupos bacterianos distintos (Konietzny y Greiner, 2004).

Se han aislado y caracterizado varios genes de fosfatasas ácidas de bacterias Gram negativas. Algunos de ellos, codifican enzimas fosfatasas ácidas que funcionan adecuadamente en el suelo, por ejemplo, el gen acpA aislado de *Francisella tularensis,* una fosfatasa ácida con acción óptima a pH 6.0, y con un amplio rango de especificidad de sustrato. Otros genes analizados, codifican las fosfatasas ácidas no específicas PhoC y PhoA, en *Morganella morganii*, y las enzimas han sido ampliamente caracterizadas en sus propiedades biofísicas y funcionales. Estas enzimas no son sujetas a represión por el P y en consecuencia, presentan una amplia acción de sustrato y una alta actividad a pH 6.0 y 30ºC (Rodríguez *et al.,* 2006).

Entre las rizobacterias, el grupo de Rodríguez (2000) aislaron un gen de *Burkholderia cepacia* que facilita la actividad fosfatasa. Este gen codifica para una proteína exterior de la membrana que amplifica la síntesis en ausencia de fosfatos insolubles en el medio, y podría estar involucrado en el transporte de P dentro de la célula. Además, también se han clonado los genes de dos fosfatasas ácidas no

específicas periplásmicas de *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) *meliloti*, los genes *nap*D y *nap*E (Rodríguez *et al.,* 2006)

En relación con las fitasas, estas pueden dividirse en dos grupos con base en el sitio de iniciación de la hidrólisis del fosfato sobre el anillo de inositol. Las fitasas microbianas, especialmente las de origen fungoso, frecuentemente escinden el grupo fosfato en el carbono C_1 o C_3 del anillo de inositol, y son llamadas 3-fitasas. Las fitasas vegetales actúan preferentemente sobre el carbono C_6 y se denominan 6-fitasas. Catalíticamente, la mayoría de las fitasas pertenecen a la familia de las fosfatasas ácidas de histidina. Este grupo de enzimas catalizan la hidrólisis del ácido fítico a mono, di, tri, tetra y pentafosfatos de myo-inositol y P_i (Lei y Porres; 2003). La forma salina, el fitato, es la fuente primaria de inositol, la principal forma de almacenamiento del P y representa alrededor del 80% del total del P en cereales y leguminosas (Xiong *et al.,* 2004). A pesar de que el ácido fítico es el mayor componente de las formas orgánicas del P en el suelo, la habilidad de las plantas para obtener el P directamente a partir del fitato es muy limitada.

Generalmente, las fitasas producidas por los hongos son extracelulares, mientras que en las bacterias comúnmente son endoenzimas. Las únicas bacterias en las cuales se ha registrado actividad fitasa extracelular pertenecen a los géneros *Bacillus* y *Enterobacter*. En el caso de *E. coli*, la actividad fitasa se ha detectado en el periplasma (Konietzny y Greiner, 2004). La mayoría de las fitasas tienen un pH óptimo en el rango de 4.5-6.0, pero las fitasas de *Bacillus* sp. tienen pH óptimos neutrales o alcalinos (Lei y Porres, 2003).

En *A. niger*, las cuatro fosfatasas ácidas purificadas a partir del micelio han demostrado amplia especificidad de sustrato, hidrolizando azúcares-fosfato, alcoholes-fosfato, nucleótidos, pirofosfato e incluso sustratos sintéticos (Quiquampoix y Mousain, 2005).

Genes de fitasas se han clonado a partir de hongos, plantas y bacterias (Rodríguez *et al.,* 2006). Xiong *et al.* (2004) aislaron, clonaron, e identificaron el gen *phyI1* a partir de la cepa 113 de *Aspergillus niger*, el cual se expresó a alto nivel en *Pichia pastoris*. El análisis cinético demostró que esta fitasa presentaba su mayor actividad a pH 2.0 y 5.0, y a una temperatura de 60 ºC.

En bacterias, se han clonado genes de fitasas (*phy*) térmicamente estables a partir de *Bacillus* sp. DS11 y *B. subtilis* VVT E-68013. Los genes de las fitasas/fosfatasas ácidas de *E. coli* (*appA* y *appA2*) también han sido aislados y caracterizados. La naturaleza bifuncional de estas últimas enzimas las hacen atractivas para la solubilización del P en el suelo (Rodríguez *et al.,* 2006). Además, genes de fitasas que actúan a pH neutros también han sido clonados de *B. subtilis* y *B. licheniformis*.

Solubilización de P_i por ácidos orgánicos

En la mayoría de las bacterias, se ha demostrado que la capacidad de solubilización del P_i está estrechamente relacionada con la producción de ácidos orgánicos, los cuales pueden solubilizar fosfatos a través de la liberación de protones y su habilidad para quelatar iones Ca^{2+}, Fe^{3+} y Al^{3+} (Chuang *et al.,* 2007). Sin embargo, varias investigaciones no han encontrado una correlación entre la cantidad de P_i solubilizado y la concentración de un ácido orgánico particular, por lo que existen dudas razonables sobre si los ácidos orgánicos son, en estos casos, los únicos responsables de la solubilización (Illmer y Schneider, 1995).

Goldstein (1996) propuso la oxidación directa de la glucosa a ácido glucónico como uno de los principales mecanismos para la solubilización del fosfato mineral en las bacterias Gram negativas, hipótesis que ha sido confirmada por muchos estudios posteriores (Miller *et al.* 2010; Sashidhar y Podile, 2010).

En los últimos años se ha avanzado en forma considerable en la comprensión de los procesos moleculares y bioquímicos involucrados en la solubilización de Pi mediada por ácidos orgánicos. En las bacterias, la reacción de oxidación de la glucosa a ácido glucónico ocurre por acción de la enzima extracelular glucosa deshidrogenasa (GDH, E.C. 1.1.99.17), la cual requiere invariablemente la PQQ (pirroloquinolina quinina) como coenzima. El ácido glucónico resultante puede a su vez ser oxidado hasta 2-cetogluconato por la actividad catalítica de la ácido glucónico deshidrogenasa (GADH). El paso final de oxidación a ácido 2,5-dicetoglucónico es mediado por la 2-cetogluconato deshidrogenasa (KGDH). Todas las tres enzimas están localizadas en la membrana celular y son inducidas por altas concentraciones de glucosa (> 15 mM) (Ramachandran *et al.,* 2006; Sashidhar y Podile, 2010).

Goldstein y Liu (1987) fueron los primeros en clonar un gen involucrado en la solubilización del P_i a partir de la bacteria Gram negativa *Erwinia herbicola*. La expresión de este gen permitió la producción de ácido glucónico en *E. coli* HB101 y le confirió la habilidad para solubilizar hidroxiapatita. *E coli* puede sintetizar GDH, pero no PQQ, de tal manera que en condiciones naturales no produce ácido glucónico.

Algunas bacterias Gram negativas, como *Azospirillum,* no poseen los genes *pqq* que les confieran la habilidad para solubilizar fosfatos. Vikram *et al.,* (2007) produjeron transconjugantes en *Azospirillum* sp., usando el constructo pMCG 898. Este plásmido artificial contiene los genes *ppq* necesarios para la biosíntesis del cofactor PQQ, responsable del ensamblaje de la holoenzima glucosa-deshidrogenasa. Al contrario de la cepa nativa, los transconjugantes mostraron actividad solubilizadora de fosfatos *in vitro*, cuando se utilizó fosfato bicálcico y fosfato tricálcico como fuente de P en el medio de cultivo. Los transconjugantes conservaron intacta su capacidad para fijar N_2, al mismo nivel que la cepa nativa.

Patel *et al.,* (2008) demostraron que la solubilización del P mediada por ácidos orgánicos, está en estrecha relación con la fuente de carbono usada por el microorganismo solubilizador. Estos investigadores aislaron a partir de la rizosfera de plantas de caña de azúcar, un aislado bacteriano de *Citrobacter* sp., el cual fue capaz de crecer en medio con sucrosa y roca fosfórica como fuentes únicas de C y P, respectivamente. La bacteria aislada también fue capaz de utilizar fructosa como fuente de C. Este azúcar junto con la sucrosa, no son sustrato de la enzima glucosa deshidrogenasa. Cuando la bacteria creció en medio de cultivo conteniendo sucrosa o fructosa, el análisis por HPLC de los filtrados demostró la producción de ácido acético. Se detectó además, un bajo nivel de ácido pirúvico cuando la bacteria creció sobre fructosa. En medio con glucosa o maltosa, sólo se reveló la producción de ácido glucónico; sin embargo, este ácido no se evidenció en los sobrenadantes de medio con sucrosa o fructosa.

La importancia de este estudio radica en que bajo condiciones *in situ*, las plantas exudan a través de la raíz gran cantidad de fuentes de C, entre las que destacan la fructosa y en menor proporción la sucrosa, además de la glucosa. La versatilidad de algunas cepas de microorganismos para utilizar varias fuentes de C, como *Citrobacter* sp. cepa DHRSS, hace de estos mejores candidatos para aplicaciones prácticas de biofertilización, debido a sus ventajas competitivas.

La reacción que involucra la conversión de glucosa a ácido glucónico por los hongos filamentosos es catalizada por la enzima glucosa oxidasa (β-D-glucosa: oxigeno 1-oxidoreductasa, E.C. 1.1.3.4). Esta enzima dimérica es una flavoproteína glicosilada, con porcentaje de azúcares en masa de 16-25%, la cual contiene un cofactor FAD unido fuertemente pero no de manera covalente (Ramachandran *et al.,* 2006). En la reacción, la glucosa es deshidratada a glucono-δ-lactona, mientras el hidrógeno se transfiere al FAD. La molécula de

$FADH_2$ resultante es reconvertida a FAD por la cesión del H al oxígeno para formar peróxido de hidrógeno (Ramachandran *et al.,* 2006).

La glucosa oxidasa es inducida en presencia de altos niveles de glucosa en el medio de cultivo, pH alrededor de 5.5 y elevados niveles de oxígeno. La enzima es estable a pH entre 4.0 y 6.0 a 40 ºC por dos horas, pero inestable arriba de 50 ºC. En *Aspergillus* sp., la enzima se inactiva a pH menores a 3.5 y se inhibe por el H_2O_2 (Rachamandran *et al.,* 2006; Chuang *et al.,* 2007).

Aspergillus niger requiere otras enzimas para la producción de ácido glucónico: catalasa, mutarotasa y lactonasa. Aunque la glucosa monohidrato cristalina, la cual está en forma α, se convierte espontáneamente a la forma β en solución, la enzima mutarotasa acelera la reacción. Durante el proceso de conversión de la glucosa, la glucosa oxidasa presente en *A. niger* lleva a cabo una autoreducción por la remoción de dos hidrógenos. La forma reducida de la enzima es entonces oxidada por O_2, lo cual resulta en la producción de H_2O_2. La catalasa producida por *A. niger* actúa sobre el peróxido liberando agua y O_2. La hidrólisis de la glucono-δ-lactona a ácido glucónico es facilitada por la lactonasa (Rachamandran *et al.,* 2006).

Chuang *et al*. (2007), demostraron que *Aspergillus* spp. solubilizó P insoluble en medio de cultivo, con una reducción concomitante en el valor del pH, sin importar la fuente de Pi usada. Según los autores, el mayor contenido de protones responsable de la reducción del pH del medio pudo deberse a la producción de ácidos orgánicos y/o a la excreción de H^+ que acompaña a la asimilación del NH_4^+ presente en el medio. Se observó igualmente que la presencia de NH_4^+ en lugar de NO_3^- en el medio de cultivo, originaba mayor nivel de solubilización del $AlPO_4$.

Otro resultado interesante del estudio de Chuang *et al.,* (2007), es que la fuente de P insoluble utilizada en el medio de cultivo, determina el tipo de ácido orgánico

producido por el hongo responsable de la solubilización. Los investigadores encontraron que cuando el P era suministrado como Ca-P, el principal ácido orgánico producido era el ácido glucónico, mientras que cuando el P se suministró como Al-P o Fe-P, la mayor producción de ácido correspondió al ácido oxálico y no se detectó producción del ácido glucónico. Cuando se adicionaron los ácidos orgánicos solos a los medios de cultivo en concentraciones similares a las producidas por el hongo, no se encontró, sin embargo, un nivel de solubilización similar, sino mucho más bajo que aquel que se obtenía en presencia del hongo. El estudio de qué factores podrían estar incrementando la solubilización del P bajo la presencia del hongo, demostró que en el sobrenadante del cultivo, se presentaban metabolitos con peso molecular mayor a 500 Da, los cuales fueron responsables del 48±18% y 33±17% del P solubilizado para los aislados 1B y 6A de *A. niger*, respectivamente.

Otros mecanismos involucrados en la solubilización de Pi

Se ha demostrado que algunos microorganismos pueden solubilizar fosfatos insolubles, sin producir cualquier tipo de ácido orgánico. En estos casos, se ha propuesto que el mecanismo principal responsable de la solubilización es la producción de protones durante la asimilación del NH_4^+, o a través de las actividades respiratorias (Mullen, 2005).

Yi *et al.,* (2007) demostraron que la producción de exopolisacáridos por los aislados *Enterobacter* sp. EnHy-401, *Arthrobacter* sp. ArHy-505 y *Azotobacter* sp. AzHy-510, confería a estos microorganismos mayor capacidad de solubilización de fosfatos insolubles con relación a la cepa *Enterobacter* sp. EnHy-402, la cual no produce exopolisacáridos. Entre las primeras cepas, la ENI-401 produjo la mayor solubilización, lo cual se correspondió con una mayor producción de exopolisacáridos. Los resultados indicaron una estrecha correlación entre la

cantidad de P solubilizado y la producción de exopolisacáridos por los aislados evaluadas (r=0.93).

Experimentos adicionales demostraron que los exopolisacáridos por sí mismos no pudieron solubilizar fosfatos a partir de fosfato tricálcico, sino que actuaban sinergísticamente con la producción de ácidos orgánicos por los aislados evaluadas. El grado de sinergismo fue dependiente del origen del exopolisacárido así como de su concentración (Yi *et al.,* 2007).

Otros mecanismos que se han propuesto como responsables de la solubilización de fosfatos insolubles son la producción de ácidos inorgánicos como el ácido nítrico y el ácido sulfúrico y la producción de sustancias quelatantes (Yi *et al.,* 2007).

2.3.2 Impacto de la aplicación de los MPCV en la agricultura moderna.

Las plantas toman P desde casi 0.1 mg L^{-1} en la solución del suelo y lo concentran hasta cerca de 100 mg L^{-1} en la solución xilemática, además, pueden acumular hasta casi 4000 mg kg^{-1} en las semillas. Los mamíferos contienen cerca de 25000 mg de fósforo por kg de masa seca. Debido a su importancia para los procesos biológicos, los cambios en la disponibilidad de P pueden tener efectos muy significativos sobre la función y estructura de los ecosistemas, por ejemplo, sobre la fijación de N_2 y/o el secuestro del C (Tiessen, 2008).

Debido a que la mayoría de los suelos tropicales y subtropicales son deficientes en P biodisponible, éste debe ingresarse al agroecosistema como fertilizante. Sin embargo, el P es un recurso finito, no es un recurso renovable y las reservas mundiales se agotan rápidamente. Dependiendo del escenario asumido, se estima que las reservas actuales disminuirán a la mitad entre 2040 y 2060, lo cual, junto al hecho de que los precios de los fertilizantes fosfóricos incrementan constantemente, hace que el uso de estrategias más sostenibles de fertilización o

la creación de variedades vegetales altamente eficientes en su adquisición y uso, sean una necesidad imperiosa (Lambers *et al.,* 2006).

Varios estudios han demostrado que la inoculación con hongos y bacterias solubilizadoras de P pueden incrementar el rendimiento o el crecimiento de las plantas, tanto en condiciones en invernadero como en condiciones de campo (Chuang *et al.,* 2007; Vassilev *et al.,* 2007; Valverde *et al.,* 2007; Wasule *et al.,* 2007; Widada *et al.,* 2007). Numerosos resultados demuestran que con frecuencia, la combinación de microorganismos con diferentes características, tales como solubilizadores de P (MSF) combinados con diazótrofos o con hongos micorrícico arbusculares, arrojan efectos superiores a la inoculación con únicamente el MSF (Valverde *et al.,* 2007; Babana y Antoun, 2007)

Valverde et al., (2007) efectuaron varios experimentos en invernadero y campo para evaluar el efecto de la inoculación con *Pseudomonas jessenii* PS06, bacteria solubilizadora de P, y *Mesorhizobium ciceri* C-2/2, solos o en combinación, sobre el crecimiento de garbanzo. En invernadero, la inoculación con sólo C-2/2 produjo la más alta masa seca en la planta (24% mayor al testigo sin inocular) y la inoculación con PS06 resultó en una masa seca 14% mayor que el testigo no inoculado, aunque no se detecto correlación con el contenido de P en los tallos. La coinoculación con las dos cepas produjo a su vez reducción en la masa seca del garbanzo en relación con la inoculación con únicamente C-2/2. Bajo condiciones de campo, las plantas inoculadas con C-2/2 solo o en combinación, produjeron una mayor masa fresca de los nódulos, mayor número de nódulos y más alto contenido de N. Aunque la inoculación con PS06 no tuvo efecto significativo sobre el crecimiento de las plantas, la co-inoculación produjo mayor rendimiento en semillas (54% mayor al testigo sin inocular) y mayor masa fresca de los nódulos. Los resultados contrastantes de la coinoculación en invernadero y campo pudo

deberse, según los autores, a diferencias en el sustrato (perlita vs. suelo) de siembra y/o a las condiciones climáticas.

Estudios registrados por Babana y Antoun (2007), demostraron que el uso simultáneo de hongos vesiculo arbusculares (VAM) y diferentes MSF como inoculantes, produjo respuestas positivas en varios parámetros agronómicos evaluados sobre plantas de trigo fertilizadas con roca fosfórica. A los 45 días de efectuada la siembra, la inoculación simultánea con hongos VAM y una cepa de *Pseudomonas* sp ocasionó la mayor tasa de colonización por los hongos micorrícicos en relación con el testigo (62% vs. 5.5%). Cuando la inoculación incluyó VAM y los solubilizadores de P *Pseudomonas* sp. y *Aspergillus awamori* C1, se produjeron los mayores rendimientos de grano junto con una mayor concentración de P en los tejidos vegetales.

Resultados similares han sido informados por Rodríguez y Fraga (1999) para el caso de bacterias y por Whitelaw (2000) y Khan *et al.,* (2007, 2010) en el caso de hongos solubilizadores de fosfato.

De otra parte, en condiciones de campo, la efectividad de los inoculantes depende de la capacidad de los aislados para colonizar la rizosfera y mantener alta actividad. Las características que se han identificado como importantes para la competencia de los aislados inoculadas en la rizosfera incluyen: motilidad, alta tasa de crecimiento, habilidad para sintetizar aminoácidos y vitamina B1, habilidad para utilizar ácidos orgánicos y ciertas proteínas de superficie celular, así como rápido ajuste a las condiciones cambiantes del ambiente edáfico (Marschner, 2007). Con relación a las condiciones del suelo, la estabilidad y el adecuado desempeño de las bacterias solubilizadoras de fosfato, éstas se ven altamente influenciadas por factores tales como pH, salinidad y temperatura, entre otros, especialmente bajo condiciones de estrés (Sharan *et al.,* 2008; Trivedi y Sa, 2008).

Con el fin de incrementar la eficiencia de solubilización de los MSF bajo diferentes condiciones edáficas, en particular de estrés por temperatura, salinidad y pH, que permitan la utilización amplia de la biofertilización como herramienta básica para la producción sostenible de los cultivos, recientemente se han adelantado varios trabajos en diferentes laboratorios a nivel mundial.

Para mejorar la capacidad de solubilización de P insoluble de *Pseudomonas corrugata* y ampliar el rango de actividad de la bacteria bajo condiciones de estrés por frío, Trivedi y Sa (2008) desarrollaron mutantes de la bacteria utilizando mutagénesis con nitrosoguanidina, los cuales mostraron capacidad de solubilización de P mayor a la cepa nativa, evaluada a varias temperaturas de incubación (4, 9, 21 y 28ºC). Los autores atribuyeron la capacidad de solubilización de fosfatos, de las cepas nativas y mutantes, a la oxidación secuencial de la glucosa a ácido glucónico y posteriormente a 2-cetogluconato.

Dos de los mutantes aislados, los cuales presentaron la mayor capacidad de solubilización *in vitro*, cuando se inocularon sobre plantas de trigo, produjeron incrementos altamente significativos sobre la longitud y masa seca del tallo y de la raíz y en el contenido de P total. En el suelo, las actividades de fosfatasas ácidas y alcalinas también se vieron incrementadas. Estas respuestas se observaron cuando las bacterias se inocularon solas o con la adición de roca fosfórica, versus los testigos no inoculados o tratados únicamente con roca fosfórica (Trivedi y Sa, 2008).

Sharan *et al.* (2008), aislaron 198 aislados bacterianos a partir de muestras de suelos alcalinos, de los cuales 85 fueron capaces de solubilizar fosfatos a 30ºC en ensayos de cultivo en placa de Petri. Entre las 85 cepas, *X. campestris* demostró ser la más eficiente para el fenotipo solubilizador de P y se eligió como cepa base para desarrollar mutantes más eficientes en la solubilización utilizando mutagénesis con nitrosoguanidina.

Tanto la cepa nativa como la mutante mostraron respuestas diferentes a varios factores de estrés (pH alcalino, temperatura y concentración de sales). La cepa mutante presentó el pico de solubilización a 30ºC y pH 8.0, mientras la cepa nativa mostró solubilización máxima a 35ºC y pH 8.0. El porcentaje de solubilización por ambas cepas reveló fuerte disminución en la solubilización de fosfato tricálcico con incrementos en la concentración de NaCl (0.5 a 10%), junto con una caída en el pH del medio de 8.0 a 4.5 en la cepa nativa y a 4.0 en la mutante. No obstante, en presencia de NaCl, la cepa mutante disolvió dos veces más fosfato tricálcico que la cepa nativa. Los autores proponen que la mayor tolerancia a la salinidad de la cepa mutante podría estar relacionada con una mayor secreción y/o acumulación de xantano, un polisacárido con una alta capacidad de hidratación y de unión al agua (Sharan *et al.*; 2008).

Pandey *et al.* (2008), aislaron a partir de suelos del Himalaya en la india, 72 especies de hongos, 21 de las cuales pertenecieron al género *Penicillium*. Entre estas, varias especies mostraron amplio rango de tolerancia a condiciones de frío, pH y salinidad. Ocho de las especies seleccionadas toleraron temperaturas de crecimiento a 4ºC después de una incubación de una semana (4 cepas) y dos semanas (4 cepas). Todas fueron capaces de crecer a pH entre 2 y 12, e incluso *P. purpurogenum* soportó pH de 2 y *P. raistrickii* toleró pH de 1.5. De las ocho especies, dos toleraron concentraciones salinas del 20%, cinco del 15% y una del 5%. De las 21 especies originales, ocho mostraron solubilización de fosfato de moderada a fuerte, logrando la máxima solubilización a 21ºC, 15 días después de la inoculación sobre medio PVK. Al igual que en muchas otras investigaciones, los autores encontraron una caída paulatina en el pH del medio de cultivo, la cual correlacionó inversamente con la cantidad de Pi solubilizado. Pandey *et al.* (2008) proponen que la caída del pH del medio se debió a la producción de ácidos orgánicos. Todas las ocho especies también mostraron actividad fosfatasa ácida y alcalina, siendo mayor la primera en todos los casos.

También se han hecho adelantos en el estudio y uso de los MSF a través de técnicas de biotecnología molecular. La manipulación genética a través de la introducción o sobreexpresión de los genes involucrados en la solubilización del fosfato del suelo en bacterias nativas de la rizosfera, es una aproximación muy atractiva para mejorar la capacidad de los microorganismos para ser utilizados como inoculantes. La inserción de genes solubilizadores de fosfatos en microorganismos que no poseen esta capacidad, puede evitar la necesidad de mezclar dos poblaciones microbianas, cuando se usan como biofertilizantes con capacidad fijadora de N_2 y solubilizadora de P (Rodríguez *et al.,* 2006). Sin embargo, es de recordar que muchos de los MPCV combinan naturalmente estas dos habilidades.

La expresión heteróloga del gen *nap*A, por ejemplo, fue lograda en *B. cepacia* IS-16, una cepa usada como biofertilizante, usando el vector plasmídico de amplio rango de hospedero pRK293, el transformante resultante mostró incremento en la actividad de fosfatasa extracelular (Rodríguez *et al.,* 2006).

El potencial de uso de los MSF como alternativas a la fertilización tradicional ya ha tenido éxito comercial en varios casos. En Australia, *Penicillium bilaiae* y *Penicillium radicum* se han liberado exitosamente como inoculantes comerciales (Wakelin *et al.,* 2004) y en Canadá, *Penicillium bilaiae*, se comercializó bajo la marca JumpStart®. El producto comercial se registró para uso en trigo en 1990, año en el cual sólo se utilizó en unas pocas hectáreas. Para el 2002, aproximadamente un millón de hectáreas sembradas con los principales cultivos de Canadá utilizaban el biofertilizante (Leggett *et al.,* 2007). En Cuba, Fosforina® es un bioinoculante a base de *Pseudomonas fluorescens* aplicado principalmente en tomate (Uribe *et al.,* 2010). En Colombia, actualmente se comercializa Fosfosol®, producto de la investigación que sobre microorganismos solubilizadores de P (MSP) se hace en la Universidad Nacional de Colombia sede

Bogotá, cuyo ingrediente activo es *Penicillium janthinellum*. Está dirigido especialmente al cultivo del arroz, produciendo incrementos del rendimiento entre el 5 y el 38% con respecto a cultivos no inoculados (Rojas Sierra y Moreno Sarmiento, 2008; Moreno Sarmiento *et al.,* 2007).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Con el fin de cumplir con los objetivos propuestos, en el mes de junio de 2008, se hizo un muestreo de suelo rizosférico en plantas de chontaduro (*B. gassipaes* Kunth) localizadas en el corregimiento del Bajo Calima, en la zona rural del municipio de Buenaventura (Valle del Cauca), cuyos suelos se caracterizan por su alta acidez y muy bajo contenido de P disponible.

Los ensayos y análisis a que dio lugar este muestreo y descritos en seguida, se efectuaron entre el mes de agosto de 2008 y el mes de octubre de 2010, en los laboratorios e instalaciones de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira.

3.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO

3.1.1 Aislamiento y purificación de poblaciones bacterianas con capacidad solubilizadora de fosfatos a partir de muestras rizosféricas.

A partir de las raíces de cuatro plantas de chontaduro (*B. gassipaes* Kunth) en edad productiva, seleccionadas aleatoriamente y crecidas bajo condiciones de bosque natural en un suelo del corregimiento del Bajo Calima, en el municipio de Buenaventura (Valle del Cauca), se tomaron submuestras de suelo rizosférico (partículas adheridas al rizoplano), las cuales se mezclaron y homogenizaron para conformar una muestra de 200 g de suelo, las cuales se recogieron en bolsas plásticas, se almacenaron en nevera de icopor y se transportaron al Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira.

Utilizando agua destilada estéril, se efectuaron diluciones seriales de la muestra de suelo rizosférico hasta 10^{-5}. En medio de cultivo Pikovskaya (PVK), a partir de las diluciones 10^{-3} a 10^{-5} se hicieron aislamientos por estría sobre 4 placas de Petri por cada dilución. El PVK contuvo fosfato tricálcico como única fuente de P, sustancia altamente insoluble, lo cual permitió la selección directa de los microorganismos con capacidad solubilizadora. El halo transparente que se formó alrededor de las colonias, en la medida que ocurrió la solubilización, constituyó el indicador de actividad. Los aislamientos obtenidos se purificaron y conservaron sobre el mismo medio, para análisis posteriores. En todos los casos, los cultivos microbianos se mantuvieron en incubación a 28 ºC y luz natural.

3.1.2 Evaluación de la estabilidad fenotípica de la capacidad solubilizadora y estimación de su eficiencia *in vitro.*

Los aislamientos purificados se sembraron en medio PVK, con 4 réplicas por aislado, depositando con un asa de siembra, una cantidad suficiente de inóculo en el centro de cada una de las placas de Petri. Para determinar la eficiencia de solubilización por cada uno de los aislados, se evaluó la relación de eficiencia solubilizadora de fosfatos (ESF), la cual se midió 7 días después de la siembra.

ESF = área del halo de solubilización / área de crecimiento de la colonia

La lectura de las áreas correspondientes se hizo con ayuda del software de diseño gráfico CorelDraw X4®. Para establecer el carácter heredable de la capacidad de solubilización, que permitiera seleccionar los aislamientos para los ensayos subsiguientes, los aislados se resembraron por cinco generaciones consecutivas, evaluando en cada generación la relación ESF, 7 días después de efectuada la siembra. Los resultados se evaluaron utilizando análisis de varianza en el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 19 (2010). Las medias de los valores ESF se compararon utilizando la prueba de Duncan (α=0.05).

3.1.3 Aislamiento y purificación de ADN genómico y amplificación del gen rDNA 16S de los aislamientos bacterianos.

Para el aislamiento y purificación del ADN genómico de los aislados con capacidad solubilizadora de fosfatos, se utilizó el Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), utilizando los protocolos sugeridos por el fabricante. El gen rDNA 16S en cada uno de los aislados se amplificó con los primer bacterianos universales fD1 (5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y rD1 (5'-CCCGGGATCCAAGCTTAAGGA GGTGATCCAGCC-3') (Weisburg *et al.,* 1991). En todos los casos la PCR fue efectuada en un volumen de reacción de 15 µl, conteniendo: 1 µl de ADN genómico (molde) (concentración de 10 ng/µl), 7.5 µl de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 1 µl de cada primer (a una concentración de 10 pmoles/µl cada uno) y 4.5 µl de agua libre de nucleasas. La reacción de termociclaje consistió de un paso de desnaturalización de 95ºC (2 min), seguido por 30 ciclos de 95ºC (30 s), 50ºC (aislados 1, 2, 4 y 6) o 65ºC (aislados 3, 5 y 7) (30 s), 72ºC (4 min), y un paso final de elongación de 72ºC (5 min). Para verificar la calidad del amplicón, los productos de amplificación se corrieron en un gel de agarosa (0.8%) durante 40 min a 65ºC. Una vez hecha la electroforesis los geles se visualizaron con ayuda de un transiluminador.

Los amplicones obtenidos de cada uno de los siete aislados se secuenciaron a través de un proveedor comercial del servicio, en los dos sentidos 5' a 3' y 3' a 5' y las secuencias se ensamblaron utilizando el software Geneious ® v.4.8.4. Las secuencias ensambladas (Anexo 10) se analizaron utilizando la herramienta BLAST en varias bases de datos disponibles en Internet (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/, http://greengenes.lbl.gov/, http://www.pseudomonas.com/, http://www.burkholderia.com/).

3.1.4 Perfilamiento molecular de los aislados.

Con el objetivo de diferenciar los aislados correspondientes a una misma clasificación filogenética con base en la secuencia DNAr 16S, se efectuó un perfilamiento molecular a través de la técnica BOX-PCR (Versalovic *et al.,* 1994).

Para la obtención del aislamiento del ADN genómico de los diferentes aislados se utilizó el protocolo ya descrito. Para la reacción de amplificación del elemento BOX se preparó la misma mezcla de reacción usada para la amplificación del gen RNA 16S, excepto que el primer utilizado fue el BOX A1R (Versalovic *et al.,* 1994): 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'.

Las condiciones y tiempos del termociclaje fueron descritas por Seo y Tsuchiya (2005). Los amplicones BOX se corrieron en un gel de agarosa (1.5%), durante 90 minutos y un voltaje de 75 V. Los patrones electroforéticos se visualizaron en un transiluminador, y se analizaron con ayuda del software TotalLab ® TL120 1D. Para comprobar la robustez y reproducibilidad de la técnica, la corrida de los amplicones BOX se efectuó dos veces, en días distintos, bajo las mismas condiciones experimentales.

3.1.5 Determinación de actividad nitrogenasa.

Debido a que algunas BSF presentan además actividad diazotrófica, se evaluó la presencia de genes *nifH* en el genoma de los aislados aisladas. Para ello, se utilizó la amplificación de una secuencia parcial del gen por PCR, utilizando los primer *nifH* F y *nifH* R.

Las condiciones de termociclaje fueron: un primer paso de desnaturalización a 94ºC por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94ºC por 45 s; alineación a 55ºC por 45 s; extensión a 72ºC por 45 s; un paso final

de elongación a 72ºC por 5 min). Los productos amplificados se corrieron en un gel de agarosa al 0.8%, por 60 min a 75 v.

3.2 ENSAYOS DE INVERNADERO

3.2.1 Multiplicación de inóculo de los aislamientos.

Para la multiplicación del inóculo de los aislados escogidos para el ensayo de invernadero (UNBS7 y UNBS3) se depositó sobre 75 ml de medio PVK, con asa, una cantidad suficiente de inóculo procedente de cultivo líquido de cada una de los aislados. Los erlenmeyer se colocaron en un agitador orbital a 160 rpm para procurar un nivel de crecimiento adecuado y se dejaron en agitación a temperatura y luz ambiental por 48 horas. Se tomaron medidas de pH del medio de cultivo al inicio de la siembra y a las 48 horas de efectuada.

3.2.2 Inoculación de las semillas.

Se introdujeron 50 semillas de ají en los medios de cultivo líquidos de cada uno de los aislados, obtenidos en la fase anterior y se mantuvo la mezcla en agitación contante a 120 rpm por 12 horas y condiciones de temperatura y luz ambientales, con el objetivo de lograr la formación de una biopelícula sobre la superficie de la semilla, con suficiente cantidad de inóculo para garantizar un nivel adecuado de colonización de los tejidos y alta densidad poblacional. Pasadas 12 horas de agitación adicional, las semillas se sacaron y sembraron directamente sobre el sustrato correspondiente a los ensayos de invernadero. En las macetas, se agregó de manera individual por semilla 0.5 ml del cultivo líquido obtenido en la fase previa, con el fin de asegurar alta cantidad de inóculo bacteriano en los tratamientos correspondientes.

3.2.3 Ensayos de inoculación en invernadero.

Se establecieron 8 tratamientos (Tabla 1) para evaluar el efecto de la fertilización con roca fosfórica Fosforita 30P (RF), y la inoculación con las BSF, sobre varios parámetros de crecimiento de plantas de ají (*Capsicum annum*), sembradas en un suelo ácido y altamente deficiente en P, cuya caracterización química completa fue la siguiente: pH = 4.76, MO (g/kg) 87.59, P-Bray-II (mg/kg) = 3.97, K (cmol/kg) 0.21, Ca (cmol/kg) 2.87, Mg (cm/kg) 4.76, Al (cmol/kg) 1.46, CIC (cmol/kg) 25.9, S (mg/kg) 39.2, B (mg/kg) 0.78, Fe (mg/kg) 36.34, Mn (mg/kg) 23.32, Cu (mg/kg) 0.81, Zn (mg/kg) 2.12.

Las dosis de RF usadas (12 o 24 g por unidad experimental, equivalentes a 6.9 o 13.8 ton ha^{-1}), se establecieron en función del análisis químico del suelo y de los requerimientos del cultivo, siendo 24 g la cantidad óptima. La RF tuvo las siguientes características: 30% P_2O_5; 40% CaO, solubilidad en citrato de amonio neutro 3.1% (reactividad media).

Tabla 1. Tratamientos para evaluar el efecto de la inoculación con BSF y la aplicación de roca fosfórica sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de ají.

Número de tratamiento	NOMBRE	DESCRIPCIÓN
1	SRFSC	Sin roca fosfórica + semilla sin inocular.
2	RF24SC	24 g de roca fosfórica* + semilla sin inocular.
3	SRFBa	Sin roca fosfórica +semilla inoculada con *B. ambifaria*
4	RF24Ba	24 g de roca fosfórica + semilla inoculada con *B. ambifaria*
5	RF12Ba	12 g de roca fosfórica + semilla inoculada con *B. ambifaria*
6	SRFBlata	Sin roca fosfórica + semilla inoculada con *Burkholderia lata cepa 383.*
7	RF24Blata	24 g de roca fosfórica + semilla inoculada con *B. lata cepa 383*
8	RF12Blata	12 g de roca fosfórica + semilla inoculada con *B. lata cepa 383*

(*): La roca fosfórica se aplicó y mezclo con los primeros 5 cm del sustrato.

Se sembraron dos semillas por unidad experimental, consistente en materas con 3.5 kg de suelo no estéril, una de ellas se eliminó a los 15 días de efectuada la siembra. El cultivo de mantuvo en observación constante y con riegos periódicos para mantener el suelo a capacidad de campo.

Las variables de crecimiento analizadas fueron: peso fresco de raíz y del tallo, volumen de la raíz, materia seca de la raíz y del tallo, relación peso fresco raíz/peso fresco tallo, materia fresca total y área foliar. Se analizaron además el

contenido de P total en los tejidos y la eficiencia relativa de uso del P (Eficiencia en el uso del P = Peso fresco total (g) / P total en los tejidos (g)) (Rao *et al*., 1997). El registro de los valores de las variables analizadas se hizo a los 68 días de la siembra. Los tratamientos se dispusieron en un diseño completamente aleatorio en el invernadero. Los datos se analizaron con Anava, utilizando el software IBM SPSS Statistics 19 (2010). La diferencia entre medias se evaluó con la prueba de Duncan (α=0.05).

3.2.4 Recuperación de inoculantes.

Para evaluar la capacidad competitiva y de sobrevivencia de los aislados de *Bulkholderia* utilizados como bioinoculantes frente a las poblaciones bacterianas presentes en el sustrato, una vez finalizados los ensayos de invernadero, se recogió una cantidad suficiente de suelo adherido al rizoplano de las plantas, de manera independiente para cada uno de los tratamientos, y se evaluó mediante técnica de dilución serial, el número de unidades formadoras de colonia, capaces de crecer en medio de cultivo PVK con fosfato tricálcico como única fuente de P. La solubilización de fosfatos se detectó por la presencia de un halo de solubilización transparente alrededor de las colonias. Una vez purificados, los aislamientos se caracterizaron para las siguientes pruebas bioquímicas: catalasa, oxidasa, citrato, ureasa, SIM, tinción de Gram, presencia de endosporas, para establecer su correspondencia con las BSF aplicadas como inoculantes.

3.3 SÍNTESIS DE PROCEDIMIENTOS Y VARIABLES

Con el fin de facilitar un repaso a la estructura metodológica del proyecto, la tabla 2 resume los procedimientos y las variables de estudio utilizadas a lo largo del ensayo.

Tabla 2. Resumen metodológico del proyecto.

Fase	Metodología	Indicador/Variable de estudio
Aislamiento y caracterización de cepas con capacidad solubilizadora de fosfatos	Aislamiento por dilución serial de BSF.	Formación de halo de solubilización.
	Purificación y evaluación de eficiencia solubilizadora de fosfatos.	Determinación de ESF para cada uno de los aislados.
	Evaluación de la estabilidad de la capacidad solubilizadora de fosfatos.	Resiembra y estimación de la ESF durante 5 resiembras consecutivas.
	Identificación filogenética de las BSF más eficientes.	Análisis de secuencias de ADNr 16S.
	Genotipificación molecular de las BSF más eficientes.	Análisis por BOX-PCR
	Evaluación de potencial diazotrófico.	Amplificación de secuencias del gen NifH por PCR.
Ensayos de inoculación de las BSF en invernadero	Multiplicación de inóculo de BSF.	Densidad poblacional en cultivo líquido
	Inoculación de las semillas de ají por inmersión en cultivo líquido.	--
	Efecto de la inoculación sobre parámetros de crecimiento de plantas de ají.	Peso fresco y seco de raíz (PFR - PST) Peso fresco y seco de tallo (PFT - PST) Relación PFR/PFT Peso fresco total (FT) Área foliar (AF) Contenido de P en tejidos Eficiencia en el uso del P.
	Recuperación de inoculantes	UFC en medio de cultivo sólido PVK

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO

4.1.1 Aislamiento y purificación de poblaciones bacterianas con capacidad solubilizadora de fosfatos a partir de muestras rizosféricas.

Se obtuvieron 22 aislamientos bacterianos con capacidad para hacer disponible el fósforo a partir de fosfato tricálcico, sin embargo, al evaluar la estabilidad fenotípica de su capacidad solubilizadora en el tiempo, se encontró que a la quinta resiembra, sólo siete aislados conservaron esta cualidad, los cuales se escogieron para adelantar los ensayos de eficiencia solubilizadora. Estos se denominaron UNBS1 a UNBS7 (Figura 1).

4.1.2 Evaluación de la estabilidad fenotípica de la capacidad solubilizadora y estimación de su eficiencia *in vitro.*

El análisis de varianza mostró diferencias estadísticas significativas en la ESF de los siete aislados estables en su capacidad solubilizadora (Anexo 1) y la prueba de Duncan permitió discriminar tres grupos (Tabla 3, Figura 2). El aislamiento que alcanzó la mayor ESF fue el UNBS7, el cual estadísticamente no se diferenció del UNBS5. Los aislados UNBS6, UNBS5 y UNBS2 no se diferenciaron estadísticamente y presentaron los segundos mayores valores de ESF. En el aislamiento UNBS1 se encontró la menor eficiencia. Aunque UNBS3 y UNBS4 presentaron valores absolutos de ESF ligeramente superiores al valor EFS del aislado UNBS1, no se diferenciaron estadísticamente. La resiembra sucesiva de

los aislados durante cinco semanas llevó a un aumento en el valor de ESF en algunos de ellos (Figura 2), especialmente en UNBS7, UNBS5 y UNBS2, lo cual podría suponer una selección positiva sobre el gen o los genes que confieren la capacidad solubilizadora.

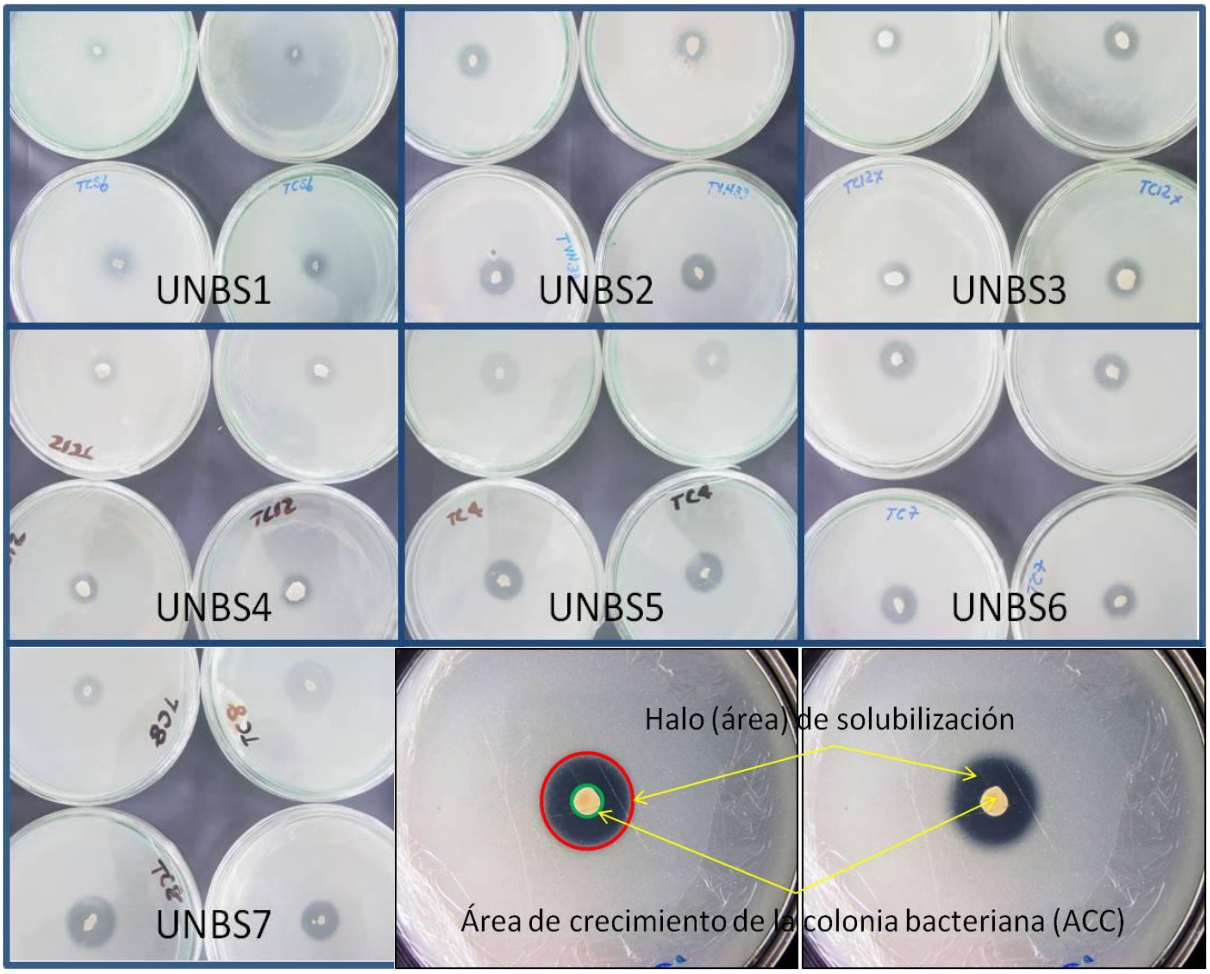

Figura 1. Halos de solubilización producidos por los aislamientos UNBS1 a UNBS7 y parámetros para evaluación de la ESF.

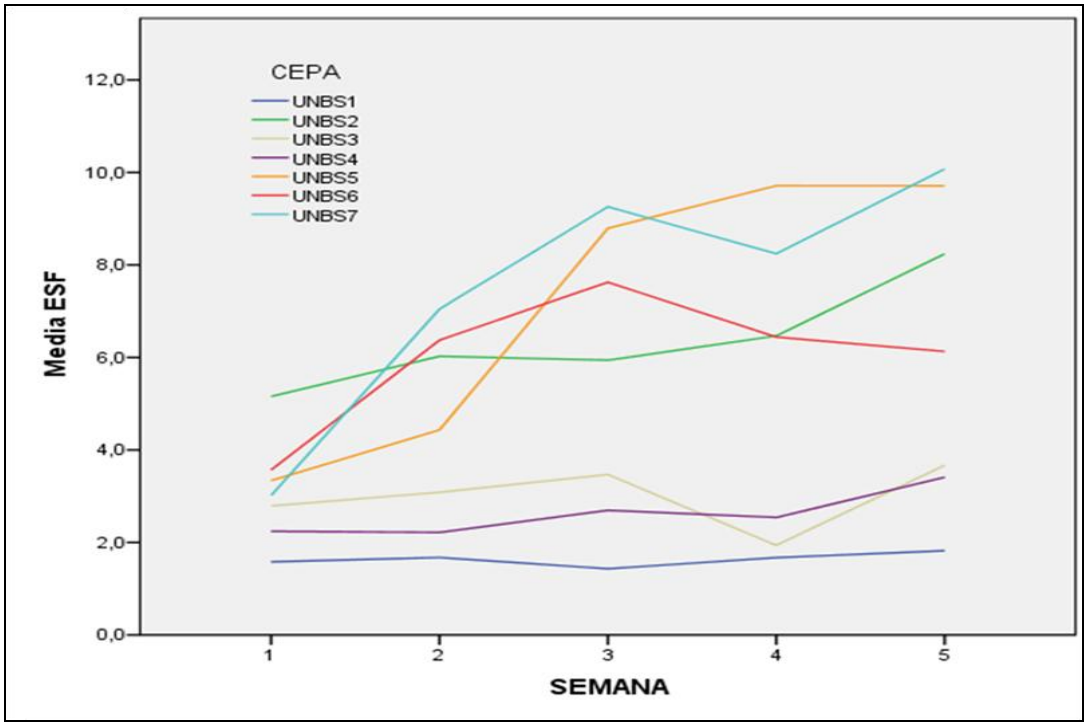

Figura 2. Eficiencia Solubilizadora de Fosfatos (ESF) de los aislamientos UNBS1 a UN BS7 en cinco ciclos de resiembra consecutivos.

Tabla 3. Eficiencia solubilizadora de fosfatos - ESF de los aislamientos UNBS1 a UNBS7. Agrupamiento según la prueba de Duncan (α=0.05), por aislado y por clasificación filogenética. Promedio de cinco resiembras y 4 replicaciones por resiembra.

Tratamiento	Clasificación filogenética	Subconjuntos (Agrupamiento según prueba de Duncan P = 0.05)		
		1	2	3
UNBS1	*P. putida*	1.65 a		
UNBS4	*B. lata cepa 383*	2.58 a		
UNBS3	*B. lata cepa 383*	2.97 a		
UNBS6	*B. ambifaria*		5.90 b	
UNBS2	*B. ambifaria*		6.43 b	
UNBS5	*B. ambifaria*		7.20bc	7.20bc
UNBS7	*B. ambifaria*			8.02 c
P. putida		1.65 a		
B. lata cepa 383			2.77 b	
B. ambifaria				6.89c

4.1.3 Análisis de secuencias DNAr 16S y perfilamiento molecular de los aislados.

El análisis de las secuencias de ADNr 16S amplificadas (Figura 3) demostró alta similaridad de secuencia entre los aislados UNBS2, UNBS5, UNBS6 y UNBS7 y las secuencias de ADNr 16s de *Burkholderia ambifaria* MC60-4 (>99%), (Tabla 4) (Números de accesión CP001025.1, CP001026.1 y CP001027.1 de la base de datos de secuencias del NCBI, cromosomas 1, 2 y 3, secuencias completas), lo que indica que estos aislados se corresponden con tal especie, conclusión que se refuerza con los perfiles BOX-PCR (Figura 4), los cuales agrupan los cuatro aislados dentro de un mismo cluster.

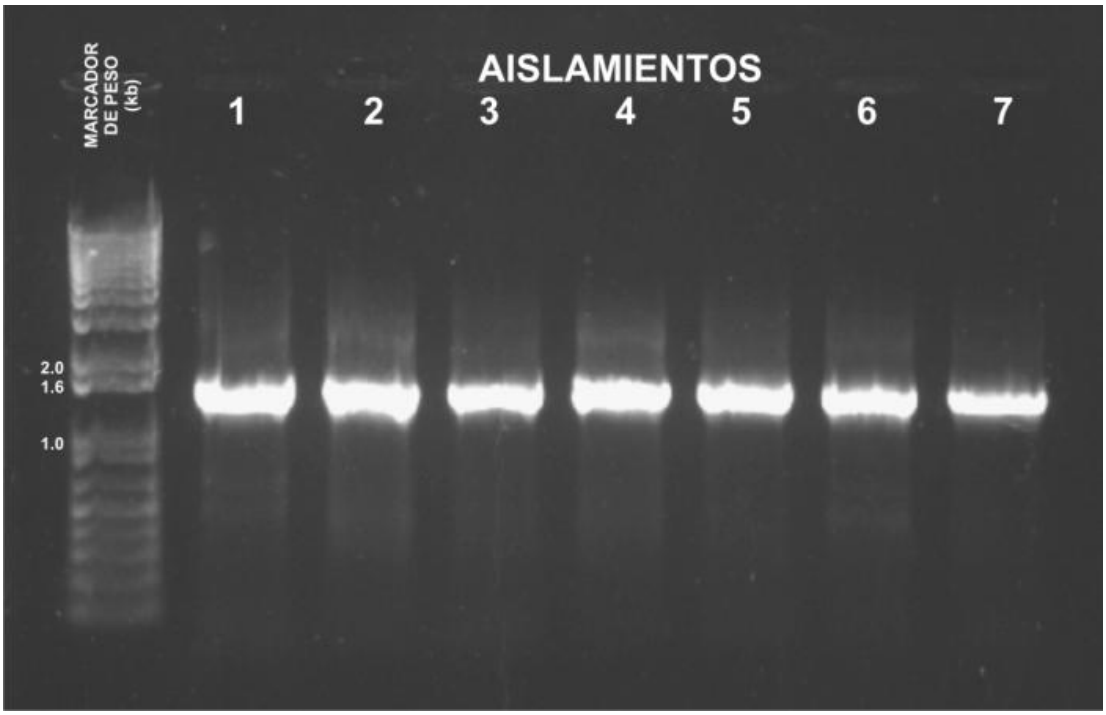

Figura 3. Amplicones DNA 16S obtenidos de los aislamientos UNBS1 a UNBS7. La primera columna corresponde al patrón generado por el marcador de peso molecular.

Tabla 4. Homología taxonómica del gen ADNr 16S de los aislamientos UNBS1 a UNBS7 según búsqueda en GenBank y otras bases de datos públicas.

AISLAMIENTO	Mejor alineación	E value	Identidad nucleotídica (%)	Base de datos
UNBS1	*Pseudomonas putida* strain GB-1	0,0	96,00%	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/
	Pseudomonas putida strain GB-1	0,0	96,03%	http://greengenes.lbl.gov/
	Pseudomonas putida strain GB-1	0,0	99,30%	http://www.pseudomonas.com/
UNBS2	*Burkholderia ambifaria* MC40-6	0,0	99,52%	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/
	Burkholderia ambifaria MC40-6	0,0	99,66%	http://greengenes.lbl.gov/
	Burkholderia ambifaria MC40-6	0,0	99,73%	http://genome.jgi-psf.org/
	Burkholderia ambifaria MC40-6	0,0	99,73%	http://www.burkholderia.com/
UNBS3	*Burkholderia lata cepa 383**	0,0	99,66%	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/
	Burkholderia lata cepa 383	0,0	99,66%	http://greengenes.lbl.gov/
	Burkholderia lata cepa 383	0,0	99,80%	http://genome.jgi-psf.org/
	Burkholderia lata cepa 383	0,0	99,80%	http://www.burkholderia.com/
UNBS4	*Burkholderia lata cepa 383*	0,0	99,52%	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/
	Burkholderia lata cepa 383	0,0	99,66%	http://greengenes.lbl.gov/
	Burkholderia lata cepa 383	0,0	99,79%	http://genome.jgi-psf.org/
	Burkholderia lata cepa 383	0,0	99,66%	http://www.burkholderia.com/
UNBS5	*Burkholderia ambifaria* MC40-6	0,0	99,46%	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/
	Burkholderia ambifaria MC40-6	0,0	99,46%	http://greengenes.lbl.gov/
	Burkholderia ambifaria MC40-6	0,0	99,79%	http://genome.jgi-psf.org/
	Burkholderia ambifaria MC40-6	0,0	99,66%	http://www.burkholderia.com/
UNBS6	*Burkholderia ambifaria* MC40-6	0,0	99,72%	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/
	Burkholderia ambifaria MC40-6	0,0	99,73%	http://greengenes.lbl.gov/
	Burkholderia ambifaria MC40-6	0,0	99,80%	http://genome.jgi-psf.org/
	Burkholderia ambifaria MC40-6	0,0	99,80%	http://www.burkholderia.com/
UNBS7	*Burkholderia ambifaria* MC40-6	0,0	99,53%	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/
	Burkholderia ambifaria MC40-6	0,0	99,79%	http://greengenes.lbl.gov/
	Burkholderia ambifaria MC40-6	0,0	99,79%	http://genome.jgi-psf.org/
	Burkholderia ambifaria MC40-6	0,0	99,79%	http://www.burkholderia.com/

(*): En la literatura anterior a 2009, identificada como *B.* sp. 383

Las secuencias ADNr 16S de los aislamientos UNBS3 y UNBS4 mostraron alta homología a las secuencias correspondientes de *Burkholderia* sp. 383 (actualmente reconocida como *B. lata cepa 383*) (>99%) (Números de accesión CP00152.1, y CP00151.1 de la base de datos de secuencias del NCBI, cromosomas 2 y 1, secuencias completas). Los perfiles BOX-PCR de estos mismos aislados apoyan también su identidad como taxón distinto de los aislados de *B. ambifaria* MC60-4. Por su parte, el aislamiento UNBS1 mostró mayor homología de secuencia con *Pseudomonas putida* cepa GB-1 (≈96%) (Número de accesión CP000926.1 de la base de datos de secuencias del NCBI, secuencia completa), y el perfil BOX-PCR demostró igualmente mayor nivel de divergencia taxonómica en relación con los demás aislados.

Aunque el análisis de la secuencia ADNr 16S no permitió distinguir como diferentes los aislados UNBS2, UNBS5, UNBS6 y UNBS7, el perfil BOX-PCR (Figuras 4 y 5) demostró que UNBS2 y UNBS7 pertenecían a una misma cepa, mientras UNBS5 y UNBS6 correspondían a otra distinta, dentro de la especie *B. ambifaria*. Igual situación se presentó para los aislados UNBS3 y UNBS4, los cuales demostraron ser cepas diferentes de la especie *Burkholderia lata cepa 383*.

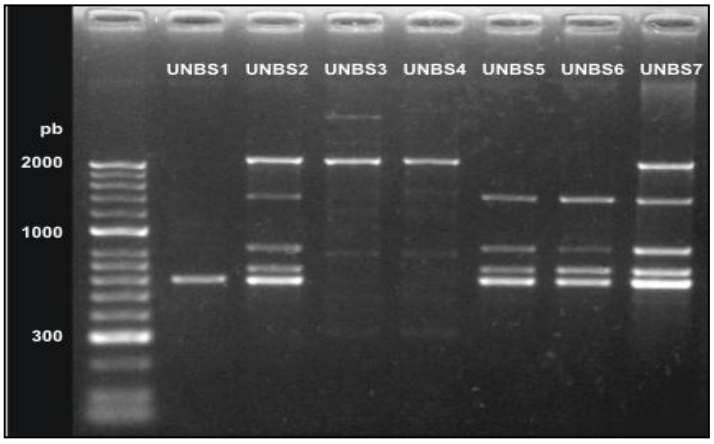

Figura 4. Perfiles BOX-PCR de los aislamientos UNBS1 a UNBS7. La primera columna corresponde al patrón generado por del marcador de peso molecular.

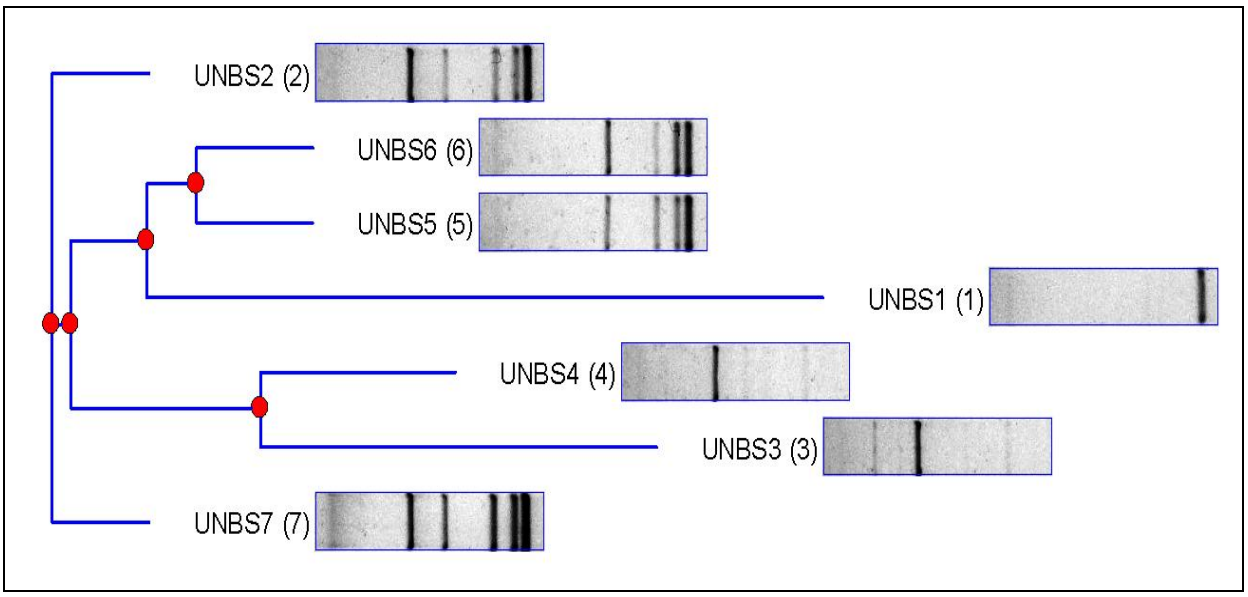

Figura 5. Dendograma generado con TotalLab ® TL120 1D en base a los perfiles BOX-PCR de los aislamientos UNBS1 a UNBS7.

4.1.4 Determinación de actividad nitrogenasa.

La reacción de PCR para la amplificación de la secuencia parcial del gen *nifH*, con los primer *nifH* R y *nifH* F, logró obtener un amplicón de aproximadamente 600 pb, a partir de las secuencias presentes en el genoma de los aislados UNBS2, UNBS5, UNBS6 y UNBS7 (Figura 6), identificados como *B. ambifaria*, lo que demuestra su potencial diazotrófico, sin embargo, no se presentó amplificación a partir del ADN genómico de los aislados UNBS4 y UNBS3, correspondientes a *B. lata cepa 383*.

La amplificación también se logró en el caso del aislado UNBS1, perteneciente a *Pseudomonas putida*, no obstante, en ésta, se obtuvieron bandas de amplificación adicionales, las cuales podrían originarse en una inespecificidad de los cebadores utilizados para este genoma en particular.

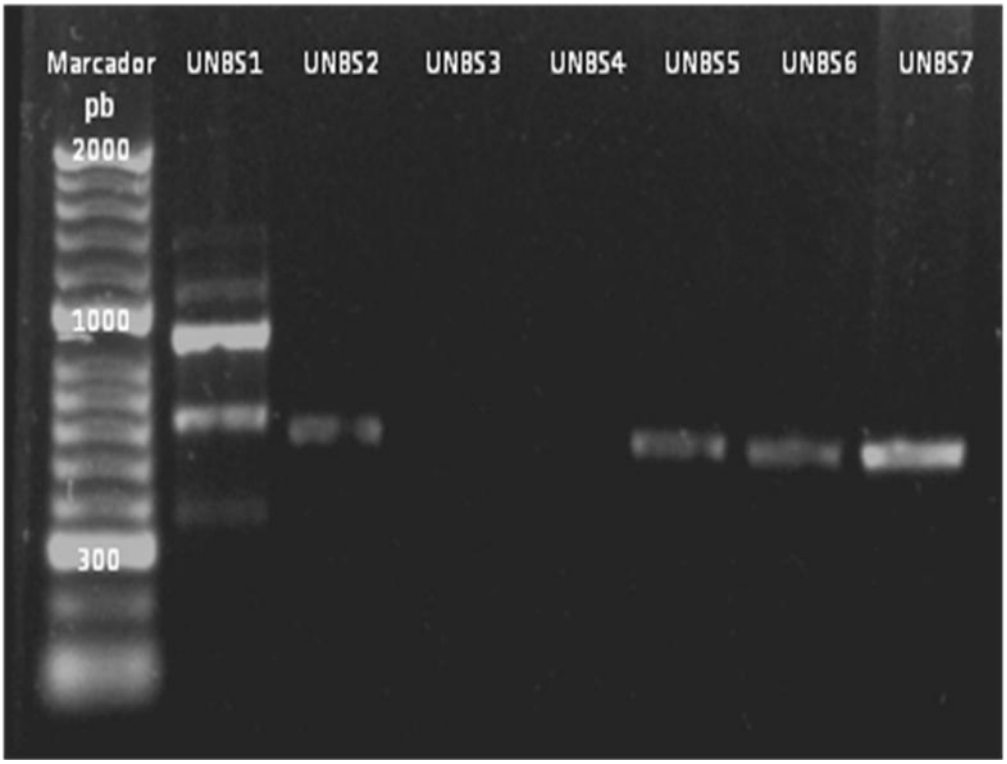

Figura 6. Amplicones de la secuencia parcial del gen *nifH* de los aislados UNBS1 a UNBS7, obtenidos con los primer *nifH* R y *nifH* F (Roesch *et al.,* 2006).

4.2 ENSAYOS DE INVERNADERO

El análisis de varianza (anexos A a J) demostró que los tratamientos aplicados produjeron efectos significativamente diferentes sobre las variables de crecimiento analizadas, excepto para la relación peso fresco de la raíz/peso fresco del tallo, la que no obstante presentó diferencia estadística con un valor p = 0.065. Las medias de los tratamientos y su diferencia estadística según la prueba de Duncan se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Efecto de la aplicación de BSF y RF sobre el crecimiento de plantas de ají en condiciones de invernadero. Evaluación hecha a los 68 días después de la siembra.

Tratamiento	Peso fresco raíz (g)	Materia seca raíz (g)	Peso fresco tallo (g)	Materia seca tallo (g)	Relación PFR/PFT	Peso fresco total (g)	Área foliar (cm^2)
SRFB.lata	1.33a*	0.13 a	4.41 a	0.58 a	0.29 a	5.73a	80.4a
SRFSC	1.77 a	0.16 a	6.73 ab	0.81 a	0.25 a	8.50a	133.6ab
SRFBa	1.82 a	0.13 a	5.42 a	0.66 a	0.34 ab	7.24a	107.0a
RF24Ba	2.84ab	0.25 ab	11.34bc	1.41 ab	0.26 a	14.18ab	318.2cd
RF12B.lata	4.99bc	0.43 b	14.81cd	1.97 bc	0.33 ab	19.80bc	276.9cd
RF24B.lata	5.32bc	0.46 b	16.69cd	2.50 c	0.31 ab	22.01bc	251.2bcd
RF12Ba	5.87 c	0.52 b	15.03cd	2.30 bc	0.37 ab	20.89bc	197.9abc
RF24SC	7.78 c	0.78 c	17.60 d	2.76 c	0.45 b	25.38c	327.3d
PROMEDIO	3.97	0.36	11.52	2.00	0.33	15.47	211.6

(*): Letras diferentes significan promedios estadísticamente diferentes según la prueba de Duncan (0.05)

En todos los casos en los que hubo diferencia significativa y altamente significativa, el mayor efecto en las diferentes variables se logró con los tratamientos en los cuales se incorporó RF al suelo, también fue importante, el que la aplicación de las BSP permitieron disminuir a la mitad la dosis de RF, para alcanzar la misma media estadística en materia seca y fresca del tallo que el obtenido por las plantas fertilizadas con 24 g de RF no inoculadas. Un comportamiento similar se observó para las variables biomasa total (peso fresco

total) y área foliar. Fue especialmente notable el efecto que tuvo la adición de RF sobre el crecimiento de la raíz, pues, cuando se compararon los tratamientos sin inóculo microbiano, con y sin adición de RF, el suministro de 24 g de RF significó un aumento de casi seis veces en el peso fresco de la raíz (Figura 7) y un incremento de cerca de 1.7 veces su volumen, efectos que significaron lograr una mayor cantidad de materia seca en los tratamientos con RF (Figura 8).

La aplicación de sólo RF en cantidad de 24 g tuvo un efecto bastante notable en la producción de biomasa total y también en el área foliar (25.38 g y 327.3 cm^2, respectivamente), mientras, la aplicación conjunta de la RF con las BSP disminuyó el área foliar (318.2 cm^2 cuando se aplicó *B. ambifaria* y 251.2 cm^2 cuando se inoculó el aislado de *B. lata*) y la biomasa total (14.18 g en el caso de la inoculación con *B. ambifaria* y 22.01 g cuando se aplicó *B. lata*) (tabla 5).

Tabla 6. Efecto de la aplicación de BSF y RF sobre el contenido de P en los tejidos e índice relativo de eficiencia de uso del P. Evaluación hecha a los 68 días después de la siembra.

Tratamiento	P total tejidos (mg/kg)	Índice relativo de eficiencia de uso del P
SRFB.lata	2.62	1.78de
SRFSC	1.98	2.42f
SRFBa	2.64	1.69d
RF24Ba	2.56	1.86e
RF12B.lata	4.31	1.05a
RF24B.lata	4.16	1.10a
RF12Ba	3.31	1.32b
RF24SC	2.75	1.51c

(*): Letras diferentes significan promedios estadísticamente diferentes según la prueba de Duncan (0.05)

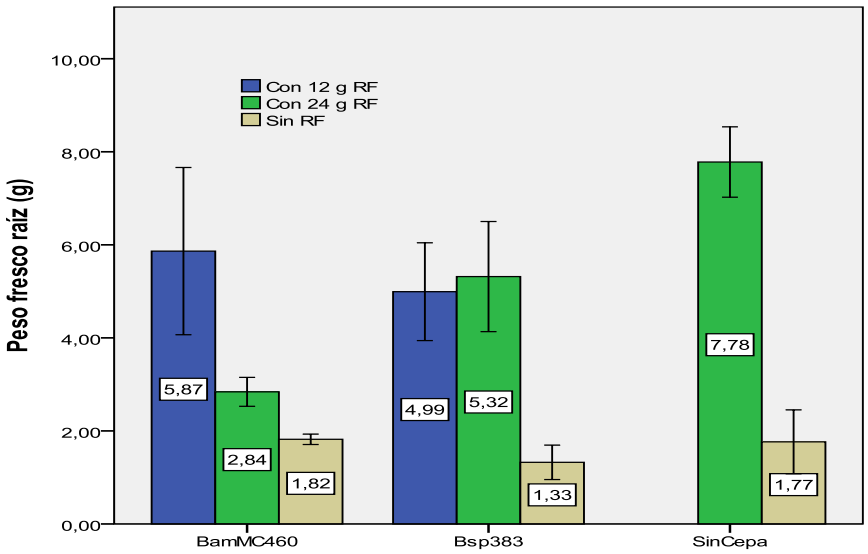

Figura 7. Efecto de la aplicación de RF (12 o 24 g) y BSF (*B. ambifaria* o *B. lata cepa 383*) sobre el peso fresco de la raíz de plantas de ají, bajo condiciones de invernadero. Las barras indican el error estándar y las letras señalan diferencias estadísticas significativas cuando son distintas.

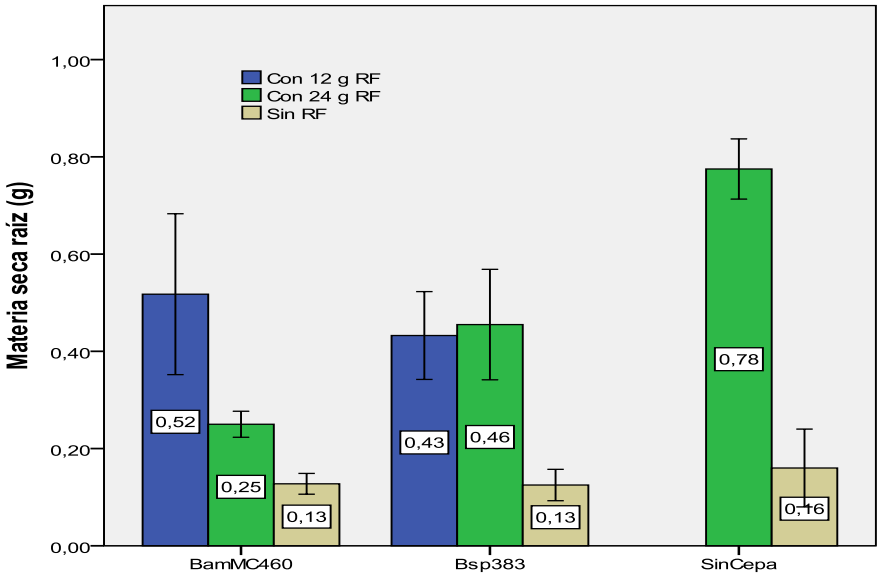

Figura 8. Efecto de la aplicación de RF (12 o 24 g) y BSF (B. ambifaria o B. lata cepa 383) sobre la materia seca de la raíz de plantas de ají, bajo condiciones de invernadero. Las barras indican el error estándar y las letras señalan diferencias estadísticas significativas cuando son distintas.

Diferencias estadísticas se observaron también para el efecto de la RF sobre el peso de la parte aérea de las plantas, tanto en base seca como en peso fresco (Figuras 9 y 10).

Figura 9. Efecto de la aplicación de RF (12 o 24 g) y BSF (*B. ambifaria* o *B. lata cepa 383*) sobre el peso fresco del tallo de plantas de ají, bajo condiciones de invernadero. Las barras indican el error estándar y las letras señalan diferencias estadísticas significativas cuando son distintas.

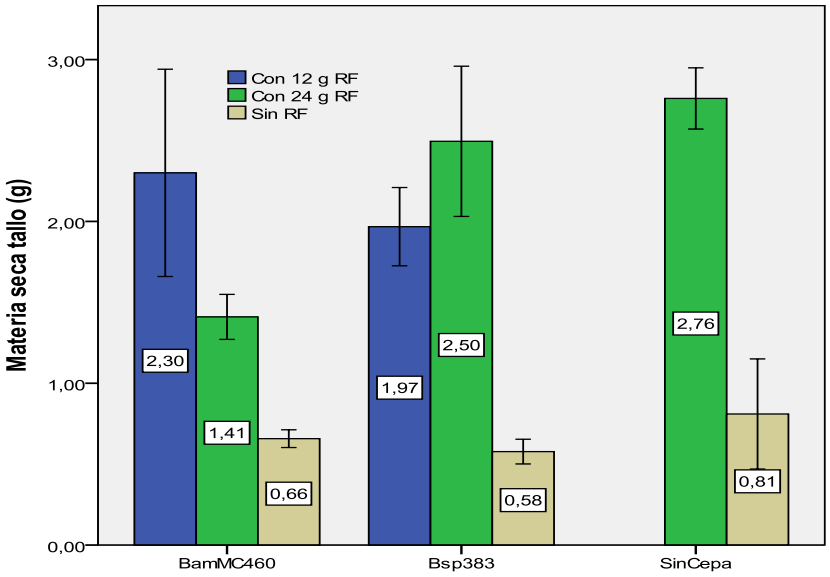

Figura 10. Efecto de la aplicación de RF (12 o 24 g) y BSF (*B. ambifaria* o *B. lata cepa 383*) sobre la materia seca del tallo de plantas de ají, bajo condiciones de invernadero. Las barras indican el error estándar y las letras señalan diferencias estadísticas significativas cuando son distintas.

Es interesante además, observar que cuando se incorporó RF al sustrato en cualquier dosis, la adición del bioinoculante redujo el valor de la relación peso fresco raíz / peso fresco tallo, de 0.45 a 0.26, con diferencia estadística significativa, en el caso de *B. ambifaria* UNBS7 y a 0.31 en el de *B. lata cepa 383* UNBS3 (Figura 11), lo cual significa desde el punto de vista metabólico, que para

obtener una misma cantidad de biomasa aérea, las plantas inoculadas con las BSF requieren de una raíz con menor biomasa, pero más eficiente en los procesos de toma y absorción de nutrientes, procesos asociados a una arquitectura radical mejorada, producida probablemente en respuesta a la acción microbiana.

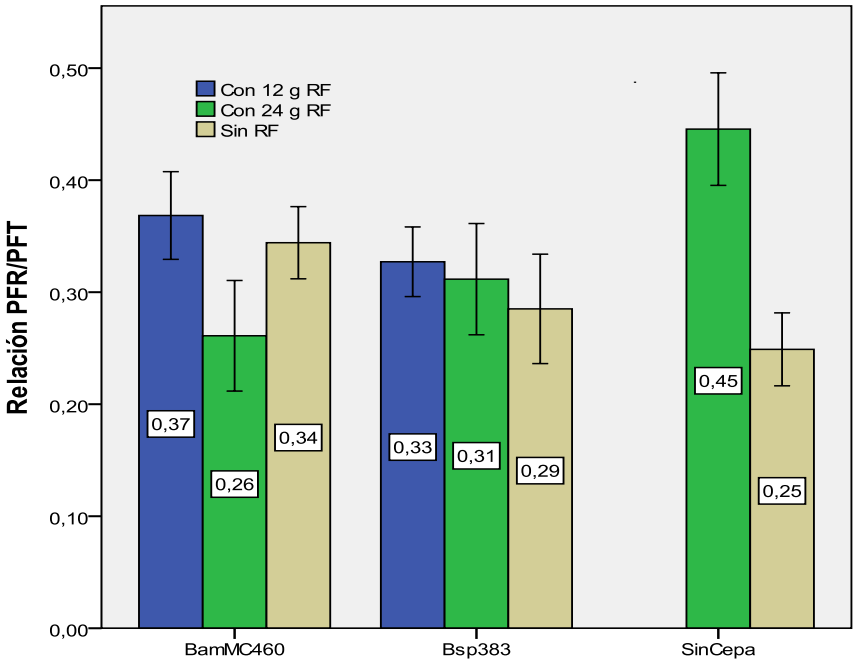

Figura 11. Efecto de la aplicación de RF (12 o 24 g) y BSF (*B. ambifaria* o *B. lata cepa 383*) sobre la relación PFR/PFT de plantas de ají, bajo condiciones de invernadero. Las barras indican el error estándar y las letras señalan diferencias estadísticas significativas cuando son distintas.

Lo anterior se confirma en que las plantas inoculadas con sólo BSP, muestran en relación con el testigo sin inocular, un mayor valor absoluto en el contenido de P total en los tejidos de las plantas (2.62 mg kg^{-1} para las plantas tratadas con *B. lata* y 2.64 mg kg^{-1} en el caso de las plantas inoculadas con *B. ambifaria* vs. 1.98 mg kg^{-1} para el testigo sin inocular) (Figura 12).

Cuando la inoculación de las BSF se acompañó de la aplicación de RF, el incremento en el contenido del P en los tejidos fue aún más notable. Mientras las plantas suplementadas con 12 g de RF e inoculadas con *B. lata cepa 383* tuvieron 4.31 mg kg^{-1} de P, las fertilizadas con 24 g de RF y sin inocular sólo alcanzaron 2.75 mg kg^{-1} de P. Comparativamente las plantas inoculadas con *B. ambifaria* y suplementadas con 12 g de RF tuvieron contenidos de P de 3.31 mg kg^{-1}, superior también al testigo sin inocular, fertilizado con 24 g de RF (Figura 12).

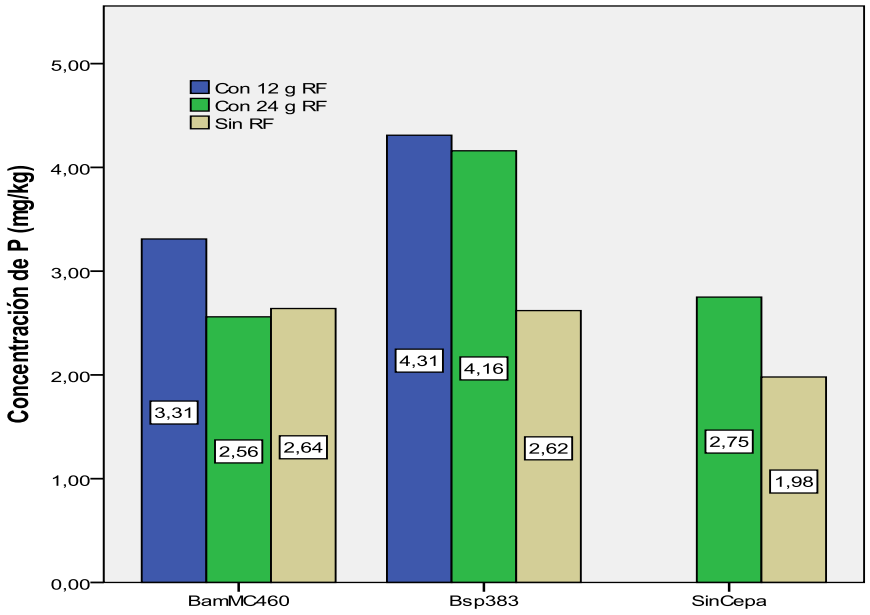

Figura 12. Efecto de la aplicación de RF (12 o 24 g) y BSF (*B. ambifaria* o *B. lata* cepa 383) sobre el contenido de P de los tejidos de plantas de ají, bajo condiciones de invernadero.

En relación con la eficiencia en el uso del P (biomasa producida (g)/P total absorbido (g)), quedo en evidencia que las plantas fertilizadas con P son menos eficientes que aquellas no fertilizadas, independientemente de que sean o no inoculadas. Tomando como base la eficiencia en el uso del P del tratamiento fertilizado con 12 g de RF e inoculado con *B. lata*, el cual tuvo la eficiencia más baja, las plantas no inoculadas ni fertilizadas con RF tuvieron una eficiencia 2.4

veces mayor. No se encontró sin embargo relación directa entre biomasa total y eficiencia de uso del P. Aunque las plantas no fertilizadas con RF presentaron una mayor eficiencia, no lograron producir una buena biomasa relativa a las plantas fertilizadas. Por otro lado, la aplicación de los aislados produjo un efecto negativo, estadísticamente significativo sobre la eficiencia en el uso del P en las plantas inoculadas (figura 13)

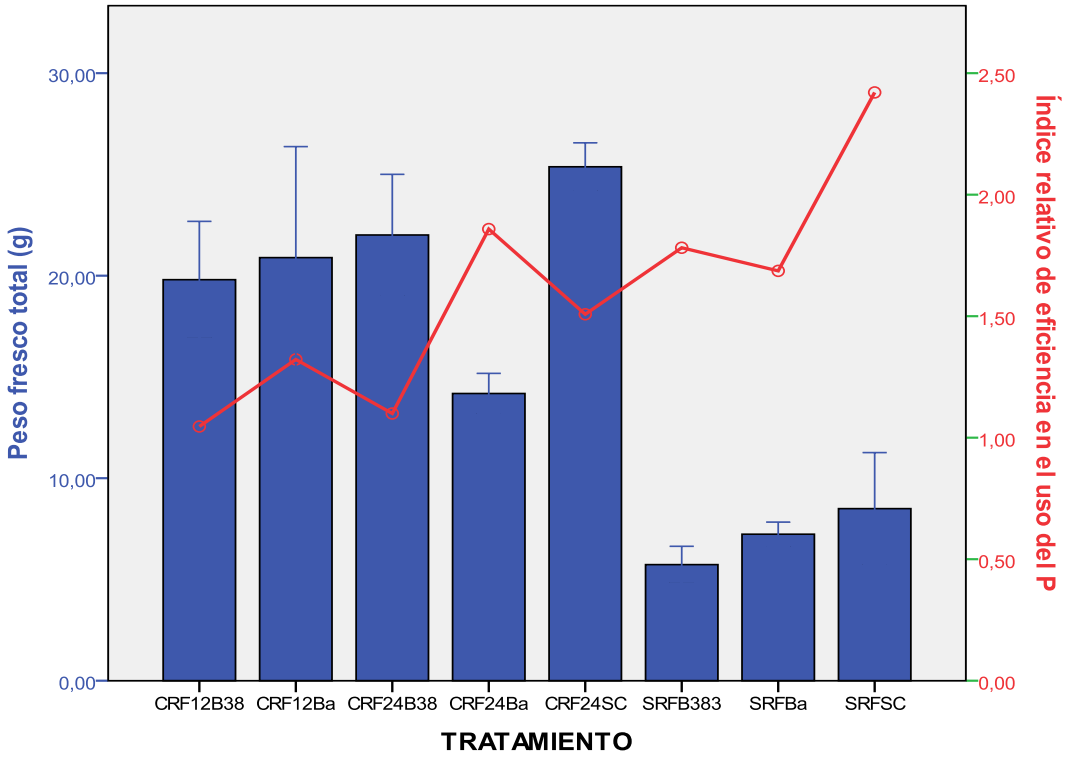

Figura 13. Efecto de la aplicación de RF (12 o 24 g) y BSF (*B. ambifaria* o *B. lata* cepa 383) sobre el peso fresco total (g) y sobre el índice relativo de eficiencia en el uso del P de las plantas de ají, bajo condiciones de invernadero.

4.2.1 Recuperación de inoculantes

A partir de la rizosfera de las plantas sometidas a cada uno de los tratamientos aplicados en los ensayos de invernadero se recuperaron cantidades variables de poblaciones bacterianas con capacidad solubilizadora de fosfatos que tuvieron las mismas propiedades bioquímicas que los aislados utilizados como inoculantes. Los resultados se presentan en la tabla 7.

De los tratamientos que no incluyeron inoculante microbiano, no fue posible recuperar BSF, lo que confirma la validez de la técnica de inoculación, y también la habilidad competitiva de los aislados utilizados.

Tabla 7. Conteo de UFC recuperadas del suelo rizosférico de plantas de ají sometidas a los diferentes tratamientos de inoculación en invernadero**.**

Tratamiento	Unidades formadoras de colonia recuperadas en medio PVK (por gramo de suelo rizosférico)
SRFB.lata*	1×10^7
SRFSC	0
SRFBa*	4×10^7
RF24Ba	1×10^7
RF12B.lata	2×10^7
RF24B.lata	0
RF12Ba	1×10^7
RF24SC	0

(*): Características morfológicas y bioquímicas: bacilos Gram negativos móviles, catalasa +, oxidasa +, citrato +, ureasa -, SIM +, sin endosporas evidentes.

4.3 CAMBIO DE pH EN LOS MEDIOS DE CULTIVO

Los aislamientos de *B. lata* cepa 383 (UNBS3) y *B. ambifaria* (UNBS7) se sembraron sobre medio líquido PVK con fosfato tricálcico como única fuente de P, con un pH inicial de 6.3. Al final de las 48 horas de siembra, el pH de los medios se acidificó, alcanzando en el caso del aislado UNBS3 un pH final de 5.57, y un pH de 5.51 en el caso del aislado UNBS7, lo cual podría indicar la producción de ácidos orgánicos en el medio de cultivo.

4.4 DISCUSION DE RESULTADOS

El reconocimiento y estudio de la microbiota asociada a los ecosistemas naturales y agroecosistemas del trópico, es un paso fundamental para el desarrollo de tecnologías agropecuarias basadas en bioinsumos, las cuales por sus propiedades, son alternativas tecnológicas sostenibles en el contexto de una agricultura moderna, adaptada a nuestras condiciones.

En este sentido, el presente estudio demostró por primera vez en Colombia, que la rizosfera de plantas nativas de chontaduro, crecidas de forma natural en un suelo ácido y de baja fertilidad, constituye nicho de un grupo de bacterias con capacidad para hacer soluble el fósforo inorgánico del suelo, lo cual podría suponer una ventaja adaptativa de ésta especie, debido a que su presencia asegura para la planta una mayor capacidad competitiva por el nutriente, de muy escasa disponibilidad en este tipo de suelos.

Filogenéticamente, las poblaciones de BSF pertenecieron al género *Burkholderia* (aproximadamente el 86%) y al género *Pseudomonas* (14%). Dentro de *Burkholderia*, los aislados se clasificaron por homología de secuencia del gen DNAr 16S, como *B. ambifaria* y *B. lata cepa 383*, conocida en la literatura hasta

2009 como *B.* sp. 383 (Vanlaere *et al.,* 2009). El aislado UNBS1 mostró por su parte, mayor homología de secuencia con *Pseudomonas putida* cepa GB-1.

En la práctica, el hallazgo de aislamientos nativos de *Burkholderia ambifaria, B. lata cepa 383* y *P. putida,* puede consolidar una base para el desarrollo de una industria nacional de bioinsumos eficaces, debido a que estas especies se han reconocido por mucho tiempo como hábiles PGPR en un amplio rango de cultivos y bajo diferentes condiciones edáficas y ambientales.

Burkholderia es un género con alta versatilidad metabólica, que agrupa 58 especies reconocidas formalmente (Wong Villareal y Caballero Mellado, 2010; Smichdt *et al.,* 2009; Compant *et al.,* 2008; Chiarini *et al.,* 2006). Recientemente Levy *et al.,* 2009, registraron la presencia intracelular de ADN de *B. pseudomallei* y otras especies de *Burkholderia*, en esporas de hongos micorrícico arbusculares, obtenidas en muestras de varios suelos australianos. Aunque existen especies fitopatógenas en el género *Burkholderia* spp*.,* de acuerdo con Kawanishi *et al.,* 2009, la mayoría de las asociadas a las plantas son no patogénicas, siendo neutras o benéficas para su hospedero. Es frecuente encontrarlas involucradas con gramíneas (Mahenthiralingam *et al.,* 2008) y tomate (Caballero Mellado *et al.,* 2007).

Por su importancia clínica, ambiental y biotecnológica, dentro de *Burkholderia*, ha sido objeto de muchos estudios el complejo *B. cepacia* (Bcc), con una taxonomía compleja que actualmente contiene 17 especies estrechamente relacionadas (Ferri *et al.,* 2010), incluidas *B. ambifaria* y *B. lata cepa 383.* Miembros de este complejo abundan en la rizósfera de reygrass perenne, arveja, algodón, café (Tabacchioni *et al.,* 2002), arroz, maíz (Zhang y Xie, 2007) y *Lupinus albus* (Unno *et al.,* 2005). *B. ambifaria* en particular, abunda en la rizósfera de plantas de arveja (Compant *et al.,* 2008) y maíz (Ramette *et al.,* 2005; Dalmastri *et al.,* 2007), y de acuerdo a los resultados del presente estudio, también en la rizosfera del

chontaduro. Previamente, Marino *et al.,* 2000, habían aislado *Bacillus* sp. y *Gordonia* sp. como microorganismos solubilizadores de fósforo, a partir de las raíces de este cultivo, en un suelo de Brasil.

Los miembros del género *Burkholderia* registrados como organismos solubilizadores/ mineralizadores de P en el suelo y la rizósfera de muchas plantas, deben su capacidad a distintos mecanismos, los cuales podrían explicar también los resultados del presente estudio. En ensayos *in vitro*, Unno *et al.,* 2005, demostraron que 73 aislamientos de *Burkholderia* obtenidos de la rizósfera de *Lupinus albus*, fueron capaces de utilizar Na-inositol hexafosfato (Na-IHP), Al-IHP y en menor proporción Fe-IHP como única fuente de C y P. Según los autores, esto explicaría posiblemente, la capacidad que tiene *Lupinus* para adaptarse a suelos deficientes en P, con base en la estrecha relación entre sus raíces y esta clase de proteobacterias. En dicho estudio, además de una alta producción de fitasas, varias cepas mostraron efecto promotor del crecimiento vegetal (PGPR) sobre plantas de *Lotus*, y en el caso de la cepa FpRp64, su inoculación logró triplicar el peso seco de la planta y el contenido de P total, y aumentar en más de seis veces, la longitud del tallo.

Caballero-Mellado *et al.,* 2007, señalaron a la producción de ácidos orgánicos por parte de varias cepas diazotróficas de *Burkholderia*, aisladas de la rizósfera y el rizoplano de tomate, como la causa de la solubilización del fosforo mineral en ensayos *in vitro*. En el caso de *B. tropica*, los mismos investigadores presumen la existencia de un mecanismo desconocido, adicional a la producción de ácidos orgánicos, como responsable de la solubilización. Del Vasto *et al.,* 2009, demostraron que *Burkholderia caribensis* FeGL03 produjo ácido glucónico como principal ácido orgánico en medios de cultivo que contenían fosfato tricálcico como única fuente de P, igualmente, Song *et al.,* 2008, identificaron ácido glucónico en

un cultivo de *Burkholderia cepacia*, que contenía mineral triturado de hierro, proveniente de una mina, como fuente de P.

Además de su capacidad solubilizadora, el complejo *B. cepacia* tiene otras características que hacen de sus miembros alternativas promisorias como agentes PGPR. Actúan eficientemente como agentes de biocontrol (Schmidt *et al.,* 2009; Ludovic *et al.,* 2007, Tawfik *et al.,* 2010), tienen alta capacidad degradativa de compuestos xenobióticos, son productores de compuestos reguladores del crecimiento vegetal, particularmente giberelinas y AIA (Ludovic *et al.,* 2007; Sun *et al.,* 2009; Joo *et al.,* 2009) y producen ACC deaminasa, enzima implicada en la hidrólisis del ACC, compuesto que sirve como precursor inmediato de la síntesis del etileno por las plantas (Sun *et al.,* 2009; Caballero Mellado, 2007).

Recientemente, Leveau y Gerards (2008) demostraron además, la presencia de un cluster de genes relacionados con el catabolismo del AIA, denominado *iac*, en el genoma de *P. putida, B. ambifaria* y *B. lata cepa 383*, lo que confiere a aquellas bacterias la capacidad de usar la hormona AIA de origen vegetal como única fuente de carbono y energía. Esta característica genética explicaría en buena medida la alta capacidad competitiva de estas especies en la rizosfera de las plantas que colonizan.

De especial relevancia para aplicaciones agrobiotecnológicas, es el hecho que varias especies de *Burkholderia* no incluidas (Caballero Mellado *et al.,* 2007; Sprent *et al.,* 2008) y también pertenecientes (Tabacchioni *et al.,* 2002) al complejo *B. cepacia*, tienen la capacidad de fijar N_2, en asociaciones simbióticas. En el presente estudio, la amplificación de una secuencia parcial del gen *nifH* demostró que la cepa de *B. ambifaria* presente en las raíces del chontaduro tiene la capacidad genética para la diazotrofía, sin embargo, determinar si la expresión de los genes relacionados con la fijación de N_2 ocurre *in situ*, requiere de estudios adicionales. En las mismas pruebas, la cepa de *B. lata cepa 383* UNBS3, al

contrario de *B. ambifaria* UNBS7, demostró no contener genes *nifH* en su genoma, pues no se logró la amplificación de alguna secuencia del gen bajo las condiciones utilizadas, sin embargo, la secuenciación de su genoma ha permitido establecer la presencia de genes relacionados con el proceso de nodulación (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/77970124?report=GenPept, acceso el 23 de septiembre de 2010).

Por otra parte, los miembros de *Burkholderia* compiten ventajosamente por los exudados radicales y de la semilla (Tabacchioni *et al.,* 2002), lo cual les confiere ventajas competitivas en este nicho, característica clave para que una cepa pueda considerarse un inoculante efectivo. En la presente investigación, se demostró que tanto *Burkholderia ambifaria* UNBS7 como *B. lata cepa 383* UNBS3, fueron capaces de colonizar efectivamente el suelo rizosférico y el rizoplano del chontaduro, haciendo factible su recuperación a los 68 días de efectuada la inoculación y la siembra de las semillas. Por el contrario, en el suelo y el rizoplano de las semillas que no se inocularon no fue posible reaislar poblaciones bacterianas con capacidad para solubilizar fosfatos. Esta es sin duda una característica clave para efectos del desarrollo de las tecnologías de bioinoculación.

En el caso de *B. ambifaria*, se han registrado efectos PGPR en maíz y de biocontrol contra: *Fusarium verticillioides* en este mismo cultivo, *Meloidogyne incognita* en ají, *Phytium aphanidermatum* y *Aphanomyces euteiches* en arveja (Chiarini *et al.,* 2006). A principios de la década del 1990, este conocimiento acumulado llevó a que se registraran ante la EPA (USA) cuatro cepas para uso como biopesticidas, tres de las cuales fueron identificadas posteriormente como *B. ambifaria*.

No obstante sus ventajas, el uso biotecnológico con fines agrícolas y ambientales de las especies del género *Burkholderia*, en especial las incluidas dentro del

complejo *B. cepacia*, se ha visto restringido debido a que algunos de sus miembros constituyen factores de riesgo para pacientes humanos que padecen de fibrosis quística (FQ), una condición patológica con base genética autosómica recesiva, que se presenta con mayor frecuencia en poblaciones caucásicas con una incidencia aproximada de 1 de cada 2500 individuos (George *et al.,* 2009). Dentro de las Bcc, descontando a *B. cenocepacia* y *B. multivorans*, las cuales representan casi el 90% de las infecciones registradas, el resto de especies formalmente reconocidas dan cuenta de menos del 10% de todas las infecciones causadas en pacientes con FQ por el complejo *B. cepacia* (Mahenthiralingam *et al.,* 2008). En el caso particular de *B. ambifaria*, los registros de identificación a partir de muestras de pacientes con FQ es menor al 1% (Chiarini *et al.,* 2006).

En términos de análisis de riesgos para pacientes con fibrosis quística, los estudios disponibles señalan que la introducción de cepas exógenas de *Burkholderia* en la rizósfera de plantas de cultivo sólo causa pequeños cambios en las densidades poblacionales relativas de las diferentes especies naturales de *Burkholderia*, los cuales son además temporales, lo que sugiere que los riesgos potenciales asociados a la rizósfera como reservorio de cepas patogénicas para estos pacientes, no deberían incrementarse por la introducción de cepas de *B. cepacia* en este hábitat (Tabacchioni *et al.,* 2002). Además, desde un enfoque de epidemiología médica, no se ha establecido hasta ahora una correlación causal fuerte entre la presencia de *B. ambifaria, B. pyrrocinia* y *B. anthina* en las secreciones pulmonares de pacientes con FQ y una declinación en su estado de salud. Por ello se cuestiona si estas especies, al contrario de *B. cenocepacia* y *B. multivorans*, sean realmente patógenos oportunistas (Chiarini *et al.,* 2006).

Al igual que *Burkholderia, Pseudomonas* ha sido aislado en todas partes del mundo, a partir de todo tipo de ambiente (Peix *et al.,* 2009). Presenta alta gama de capacidades metabólicas, que le hacen que compita con éxito en todos los nichos

en que habita. En su interacción con las plantas, *Pseudomonas* puede tener efectos perjudiciales (Bender *et al.,* 1999), pero en la mayoría de los casos, su acción propicia el crecimiento y desarrollo vegetal (Miller *et al.,* 2008). Debido a que los exudados radicales y la superficie radical determinan un nicho que favorece las poblaciones altamente competitivas de *Pseudomonas*, la raíz de las plantas es un reservorio natural de este género (Mercado Blanco y Bakker, 2007; Kravchenko *et al.,* 2003).

Hay revisiones exhaustivas sobre los efectos de fitoestimulación, biocontrol y biofertilización, entre otros, que ejercen varias especies de *Pseudomonas* sobre diferentes cultivos (Höfte y Altier, 2010; Miller *et al.,* 2008; Mercado Blanco y Bakker, 2007; Haas y Défago, 2005), así como sus aplicaciones ambientales (Rehm, 2008; Jiménez *et al.,* 2010, Cao y Loh, 2008). Actividades registradas para miembros de las pseudomonadas fluorescentes son la producción de AIA, de ACC deaminasa, de sideróforos y de compuestos con actividad antifúngica, además de la secreción de quitinasas, celulasas y proteasas (Naik *et al.,* 2008).

En términos de capacidad solubilizadora de fosfatos, *Pseudomonas* es uno de los géneros bacterianos más eficientes. Naik *et al.,* 2008, en extenso estudio sobre la capacidad solubilizadora de fosfatos de 443 aislamientos de pseudomonadas fluorescentes, obtenidos a partir de la rizosfera de banano y arroz, encontraron que 80 fueron eficientes solubilizadores de P, incluyendo: *Pseudomonas monteilii, P. putida, P. plecoglossicida, P. fluorescens, P. fulva, P. mosselii* y *P. aeruginosa*. Dentro de éstas, 12 (15%) se clasificaron como *P. putida.* El análisis de BOX-PCR determinó además, amplia diversidad intraespecífica entre los aislamientos. En un estudio similar, Naik *et al.,* 2008b, no encontraron a *P. putida* en la rizosfera de banano, lo cual asociaron a posibles variaciones condicionadas por el genotipo del huésped. Browne *et al.,* 2009, encontraron mayor densidad de pseudomonadas fluorescentes en trigo en comparación con cebada, aunque las poblaciones de

BSP no variaron significativamente entre los dos cultivos. En ambas plantas, la mayor tasa de solubilización estuvo asociada a aislados de la especie *P. fluorescens*.

Con relación a los posibles mecanismos de solubilización de fosfatos, varios estudios confirman que en *Pseudomonas*, incluyendo *P. Putida*, están asociados a la producción de ácidos orgánicos, especialmente a través de la oxidación de glucosa a ácido glucónico por la ruta de oxidación directa, la que está a su vez relacionada directamente con la acidificación del medio de cultivo (Naik *et al.,* 2008). *P. putida* es igualmente reconocida como eficiente productora de fosfatasas que mineralizan el fósforo a partir de los materiales orgánicos presentes en el suelo (Malboobi *et al.,* 2009a).

Park *et al.,* 2009, aislaron de la rizosfera de plantas de ginseng, la cepa *P. fluorescens* RAF15, la cual demostró actividad solubilizadora de fosfatos y actividad antifúngica contra los fitopatógenos *Botrytis cinerea, Phytium ultimum* y *Rhizoctonia solani.* Aunque la cepa solubilizó el P eficientemente, como $Ca_3(PO_4)_2$, cuando se utilizó glucosa como única fuente de C, con NH_4-N o con NO_3-N, como fuente de N, no se obtuvo ningún nivel de solubilización cuando la fuente de C consistió en fructosa suplementada con cualquiera de las fuentes nitrogenadas, a pesar de que en este último caso, la biomasa celular obtenida fue significativa. Este resultado indica que para esta cepa, la excreción de protones debida a la asimilación de amonio, no es un mecanismo que explique la solubilización del P, o en cualquier caso, no tiene efectos importantes. Park *et al.,* 2009, encontraron además, que con glucosa como fuente de C, el nivel de solubilización de P tuvo relación inversa con la producción de ácidos orgánicos en el medio de cultivo, principalmente ácido glucónico y tartárico. Se detectaron además pequeñas cantidades de ácido 2-cetoglucónico, fórmico y acético.

La cepa *P. fluorescens* RAF15, aislada por Park y Son (Park *et al.,* 2009), además de su actividad solubilizadora de P, demostró la producción de varios metabolitos secundarios incluyendo AIA, sideróforos y HCN, los cuales están relacionados con la promoción del crecimiento de las plantas el primero, y con efectos antifúngicos y antagonistas para el caso de los dos últimos. Los ensayos demostraron además, que esta cepa fue capaz de producir *in vitro* proteasas, lipasas y pectinasas.

De otra parte, se ha señalado por varios autores, que el éxito de las prácticas de biofertilización con MSF, está estrechamente ligada al hecho que la capacidad de solubilización de fosfatos de los microorganismos utilizados sea característica genética de los aislados, y no un evento temporal epigenético, por cuanto su evaluación es prioritaria. Este hecho se hizo evidente en la presente investigación, pues a pesar de obtener 22 aislamientos en una primera oportunidad en medio sólido PVK, 15 de éstos no fueron estables en su capacidad solubilizadora, como se demostró por la desaparición del halo de solubilización en las resiembras consecutivas. Esto corrobora la importancia, cuando se seleccionan cepas, de efectuar la confirmación de la estabilidad del fenotipo solubilizador por varios ciclos de siembra consecutivos, que garanticen una base genética que se exprese continuamente en el fenotipo.

La desaparición del halo de solubilización no implica, sin embargo, que las causas sean genéticas. De hecho podrían proponerse mecanismos de represión genética regulados por la disponibilidad de P soluble o fenómenos de reprecipitación del P solubilizado originalmente. Cualquiera que sea el caso, se requiere de estudios adicionales.

La afirmación que se hace con respecto a que la solubilización de fosfatos en estas cepas está condicionada genéticamente, se apoya en la evaluación de la ESF de los siete aislados restantes que permanecieron estables en su capacidad solubilizadora. En ellos se encontró un aumento en el índice de eficiencia de la

solubilización a través de cinco ciclos de resiembra, lo que indicaría la selección positiva de una característica determinada genéticamente.

En términos de la eficacia de la técnica de evaluación de la solubilización de fosfatos en medio sólido, utilizando PVK como única fuente de fósforo, hay posiciones contrapuestas, debido a que en muchos casos, no hay correspondencia ni correlación entre los resultados obtenidos en las pruebas en medio líquido y las efectuadas en medio sólido. Fankem *et al.,* (2006), evaluaron varios aislados procedentes de rizosfera de palma de aceite por su habilidad solubilizadora de P-Ca, P-Al y P-Fe sobre placas de agar y también en cultivo líquido. En todos los casos, los aislados evaluados demostraron su capacidad solubilizadora en cultivo líquido, independiente del tipo de fosfato utilizado, contrario a lo que se observó cuando se uso la prueba en placa. De hecho, la cepa que demostró la mayor solubilización en medio líquido, no fue capaz de formar un halo de solubilización en medio sólido. En cultivo líquido, ésta cepa fue la mayor productora de citrato, el único carbolixato con capacidad de solubilizar $Ca_3(PO_4)_2$ bajo condiciones neutrales de pH. De acuerdo con los autores, la precipitación del citrato de calcio previene la detección de los halos a pesar de la solubilización del fosfato. Fankem *et al.,* (2006) y Rodríguez y Fraga (1999) están de acuerdo, sin embargo, en que la técnica de placa en agar es un método adecuado cuando se trata de aislar y caracterizar elevado número de aislamientos con capacidad de solubilización.

Por otra parte, en la práctica, que los aislados nativos de *Burkholderia* utilizados hayan mostrado efecto sinergístico positivo sobre las plantas de ají (*C. annum*), es indicativo de la adaptabilidad reconocida de esta especie a diferentes genotipos vegetales, lo cual es un aspecto clave en términos de su uso como biofertilizante.

Teóricamente es de esperar que en la práctica, la aplicación de BSF individuales como inoculantes a las semillas o al suelo, tenga efecto positivo sobre la

disponibilidad de P para los cultivos, sólo cuando en el suelo existan fuentes disponibles de P inorgánico y/u orgánico, a partir del cual ocurra la liberación del nutriente. Si este no es el caso, lo cual es cierto para una gran parte de los suelos tropicales, el P debería suministrarse como insumo externo al agroecosistema. Aparentemente, en este hecho radica la alta respuesta que se obtuvo en esta investigación al aplicar la RF. Es de recordar que los contenidos iniciales de P disponible en el suelo empleado sólo llegaban a menos de 4 ppm, lo cual permitió diagnosticarlo como deficiente en este nutriente.

La fertilización directa con roca fosfórica (RF) es una de las alternativas propuestas como adecuadas para los ambientes tropicales (FAO, 2004, Rajan *et al.,* 1996), debido a su disponibilidad y bajos costos y a varias consideraciones de índole físico-químico: primero, el incremento en la tasa de disolución de las rocas y minerales y el aumento en la tasa de reacción entre las superficies minerales y la solución del suelo, que se presenta bajo regímenes de alta humedad y altas temperaturas; segundo, porque el potencial de respuesta a la fertilización con rocas y minerales es mayor en suelos deficientes en nutrientes y, tercero, porque las condiciones de alta acidez de muchos de los suelos tropicales favorecen su solubilización (Edwards *et al.,* 2010).

Hay considerable información sobre el uso de roca fosfórica para aplicación directa al suelo (Rajan *et al.,* 1996), o sobre técnicas de modificación de la RF antes de su aplicación directa (Abouzeid, 2008; FAO, 2004). Las respuestas agronómicas varían desde efectos casi nulos, a efectos comparables con los producidos por el superfosfato triple (Chien y Menon, 1995). Tal diversidad de respuesta, se debe a los distintos factores que influyen en la efectividad agronómica de la RF, entre los que se incluyen algunos de naturaleza edáfica, otros relacionados con la especie vegetal, además de factores debidos al manejo del cultivo y al manejo de la misma RF (Edwards *et al.,* 2010).

En muchos ejemplos, la baja efectividad de la RF se debe a que no libera suficiente P para suplir las necesidades del cultivo en un solo ciclo de producción. Se han diseñado así, diferentes estrategias con el fin de incrementar y acelerar la tasa de solubilización del P presente en las RF, las que incluyen: i) modificaciones físicas: pulverización, activación mecánica (Abouzeid, 2007); ii) Modificación fisicoquímica: fusión y calcinación (Abouzeid, 2007); iii) modificaciones químicas: acidulación, acidulación parcial, adición de azufre, mezclado y granulación (Rajan y Watkinson, 1992; Rajan y Marwaha, 1993;); y iv) modificaciones biológicas: fosfocompostaje, adición de desechos verdes, biosubilización, fitoextracción e inoculación con micorrizas (Nziguheba, 2007; FAO, 2004; Agyin-Birikorang *et al.,* 2007; Biswas y Narayanasami, 2006).

En particular, la biosolubilización, es decir, el uso conjunto de RF y microorganismos solubilizadores de P, es una técnica que ha mostrado resultados bastante prometedores. En la biosolubilización se han empelado con éxitos varios MSF. Entre las bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF) destacan los siguientes géneros: *Pseudomonas, Bacillus, Rhizobium, Burkholderia, Achromobacter, Agrobacterium, Micrococcus, Aereobacter, Flavobacterium, Enterobacter, Pañotea, Klebsiella, Rhodobacter, Arthrobacter, Serratia* y *Erwinia* (Rodríguez y Fraga, 1999); mientras, en los hongos se han registrado principalmente, *Aspergillus*, *Penicillium, Trichoderma* y levaduras (Khan *et al.,* 2010; Whitelav, 2000).

En ensayos exitosos en campo y/o invernadero efectuados por Dwivedi *et al.,* (2004) encontraron que la inoculación directa de plántulas de arroz y trigo con *Aspergillus awamori* incrementó las respuestas del cultivo a la aplicación de RF “Musoorie” con respecto al tratamiento no inoculado, sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. En materos, Vassilev *et al.,* (1996) estudió el efecto de la adición de desechos de *Beta vulgaris*, preinoculados con *A.*

niger y en presencia de RF “Marroquí” sobre el crecimiento de *Trifolium repens*. El pretratamiento de la RF con los desechos inoculados de *B. vulgaris* mejoró significativamente el peso seco y el contenido de P del tallo en relación con las plantas tratadas con la misma cantidad de RF y los desechos de *B. vulgaris*. En otro ensayo, usando la misma RF, Rodríguez *et al.,* (1999) encontraron resultados similares sobre el rendimiento de alfalfa.

En el caso de biosolubilización con bacterias, Supanjani *et al.,* (2006) y Han *et al.,* (2006) encontraron que la aplicación de BSF (*Bacillus megaterium* var. *phosphaticum*) junto con RF produjo incrementos en varios parámetros de crecimiento y rendimiento, en cultivos de ají y pepino, en condiciones de invernadero y campo.

En dicho ensayo, cuando en invernadero el sustrato de siembra (suelo Inceptisol, pH= 5.4, P disponible = 9.1 mg kg^{-1}) se inoculó con la BSF y se fertilizó con RF 3 g kg^{-1}, los contenidos de N, P y K en la materia seca del tallo y la raíz del ají fueron mayores y significativamente diferentes de los obtenidos por el tratamiento control sin RF ni BSF (mg $planta^{-1}$) (tallo N-P-K: 15.0, 1.91, 21.7 vs. 13.6, 1.61, 19.2; raíz N-P-K: 3.95, 0.53, 6.7 vs. 3.69, 0.46, 5.92). También se obtuvieron incrementos significativos, pero menores a los anteriores, cuando sólo se aplicó la BSF. Si además de RF y BSF se inoculó con bacterias solubilizadoras de K (BSK) y se adicionó illita (como polvo), el tratamiento incrementó los contenidos de N, P y K en los tallos (21, 31 y 33%, respectivamente para el ají y 29, 41 y 29% en el pimentón) y en las raíces (16, 33 y 26% en el ají, y 29, 34 y 50% para el pimentón). Este último tratamiento también aumentó la fotosíntesis foliar en 20% en el ají y 16% en las plantas de pimentón en relación con el control (Han *et al.,* 2006).

Siguiendo las tendencias anteriores, los ensayos en campo, demostraron también un efecto benéfico de las BSF. Cuando se aplicó RF y *B. megaterium* var.

phosphaticum como inoculante al suelo, en dos años consecutivos, se obtuvieron incrementos significativos en la biomasa total (2001: 274 vs. 160 g planta^{-1}; 2002: 199.6 vs. 166.1 g planta^{-1}, en base seca) y rendimiento de fruta (2001: 1.91 vs 1.51 t ha^{-1}; 2002: 1.95 vs. 1.55 t ha^{-1} en base seca) de ají. Estos rendimientos no fueron estadísticamente diferentes de los logrados con la aplicación de un fertilizante altamente soluble, los cuales incrementaron las variables entre el 21 y el 35%) (Supanjani *et al.,* 2006). Solas o en combinación con BSK, RF y polvo de Illita, las BSF aumentaron además, la tasa fotosintética, el área foliar y los contenidos de N, P y K en las plantas tratadas.

Leaungvutiviroj *et al.,* (2010) encontraron efectos similares sobre el crecimiento en invernadero de maíz y brócoli chino. Cuando una cepa solubilizadora de fosfatos de *Burkholderia unamae* se aplicó en mezcla con *Bacillus subtilis* (BSK), el diazótrofo *Azotobacter tropicalis*, y la cepa KJB9, productora de auxinas, el peso seco se incrementó de 4.14 a 8.76 g planta^{-1} en el caso del maíz, y de 11.1 a 40.8 g planta^{-1} en el caso del brócoli. Cuando además de la mezcla de los microorganismos se adicionó RF y polvo de feldespatos, la masa seca aumentó a 10.2 g planta^{-1} en el maíz, y 79.9 g planta^{-1} en el caso del brócoli, un aumento de casi 4 y 7 veces, respectivamente.

En fríjol, Collavino *et al.,* (2010) no encontraron efectos sobre el peso de la materia seca de la raíz o del tallo, o sobre el tamaño del área foliar, cuando *Bulkholderia* se aplicó sola o en combinación con una fuente de fósforo. Sin embargo, la relación de materia seca de la raíz/materia seca del tallo presentó un menor valor absoluto, lo cual indica que la planta invirtió menos fotosintatos en el desarrollo del sistema radical, dado que había mayor disponibilidad de nutrientes, especialmente P en la zona rizosférica.

Estos resultados concuerdan plenamente con los encontrados en el presente ensayo. Como se aprecia en la Tabla 5, la relación peso fresco de raíz/peso fresco

del tallo, en la dosis máxima de RF (24 mg kg^{-1}) alcanzó una relación de 0.45, cuando la misma dosis se combinó con *B. ambifaria* esta relación se redujo a 0.26, que indican una menor inversión de fotosintatos para la obtención de nutrientes y/o un incremento en la eficiencia de los procesos de toma y adquisición de nutrientes y agua a través de la raíz, a través de un mayor desarrollo radical lateral. Esta conclusión se apoya en el hecho de que los contenidos de P de los tejidos inoculados con las bacterias fueron mayores que los alcanzados por las plantas no inoculadas. Este menor gasto, indudablemente beneficia el desarrollo aéreo y se espera que, por tanto, la productividad del cultivo. Cabría esperar entonces que esta capacidad tenga implicaciones en el rendimiento de frutos, como ha sido demostrado por Supanjani *et al.,* (2006) y Han *et al*., (2006).

Aunque en la presente investigación, la inoculación con BSF no provocó una biomasa radical mayor, sí mejoró de manera ostensible la arquitectura de la raíz, la cual incrementó, en comparación con las raíces de las plantas no inoculadas ni fertilizadas, la densidad de pelos radicales y de raíces secundarias y terciarias (Figura 13), implicadas directamente en la toma y absorción de los nutrientes. Esta es la razón probable por la cual las plantas inoculadas lograron los mayores contenidos de P en sus tejidos. El incremento considerable de raíces finas y pequeñas, permite además, que la planta pueda aprovechar un mayor volumen de suelo en busca de nutrientes y agua. Este efecto fue más notable cuando se utilizó adicionalmente RF como fuente de P (Figura 14).

En contraposición a lo anterior, la aplicación de las BSF solas, en particular del aislamiento de *B. lata* cepa 383, causó una disminución en términos absolutos, pero sin diferencia estadística, del área foliar y de la biomasa total, en comparación con las plantas no inoculadas y no fertilizadas, comportamiento el cual fue también registrado cuando las plantas recibieron fertilización con RF en cualquier dosis, lo que podría implicar efectos negativos de las BSF sobre estas

variables. La razón de este efecto no puede deducirse de los presentes ensayos, sin embargo, podría estar relacionada con la naturaleza fitopatogénica de algunas cepas de *Burkholderia*, las cuales no obstante no se han reportado dentro de las especies *B. ambifaria* o *B. lata*.

Por otra parte, la eficiencia de uso del P se vio disminuida con la aplicación de RF a las plantas, hayan sido estas inoculadas o no. La aplicación de BSP tuvo por su parte efectos negativos sobre la eficiencia en el uso del P, y al igual que en el caso anterior, la aplicación de *B. lata* cepa 383 disminuyó notablemente la eficiencia, cuando se aplicó junto con RF y cuando se aplicó sola. Una explicación adecuada de este comportamiento requiere de estudios adicionales.

Uno de los procesos propuestos para explicar el incremento en la solubilidad de la roca fosfórica sometida a la acción de las BSF, es la reacción de sustitución de iones H^+ por los átomos de Ca contenidos en la RF. En el caso de la apatita, la reacción simplificada es la siguiente (Schneider *et al.,* 2009):

$$Ca_{10}(PO_4)_6F_2 + 12H^+ \longrightarrow 10Ca^{2+} + 6H_2PO_4^- + 2$$

Si por otra parte, los iones de Ca^{2+} liberados son secuestrados por sustancias quelatantes, por ejemplo ácidos carboxílicos, o son precipitados, se establece un equilibrio dinámico que favorece la disolución continua de la RF, pues tales condiciones no permiten que se alcance un punto de saturación en la solución (Sagoe *et al.,* 1998).

Figura 14. . Efecto de la aplicación de RF y la bioinoculación con *B. ambifaria* sobre el crecimiento radical de plantas de ají. B.a: *B. ambifaria*, SC: sin cepa, SRF: sin roca fosfórica.

Calvaruso *et al.*, (2010), encontraron que junto a la asociación micorrízica roble/haya - *Scleroderma citrinum*, el género *Burkholderia* fue el principal responsable de la meteorización de minerales en un suelo ácido, deficiente en nutrientes. La asociación no fue encontrada sin embargo cuando se evaluó la micorrizosfera del abeto rojo. El mecanismo propuesto por los autores para explicar la capacidad degradativa sobre los minerales fue la producción de protones por la célula bacteriana. Este hallazgo podría explicar en nuestro caso, al menos en parte, el efecto sinérgico encontrado, cuando se utilizaron juntos la RF y las BSF.

La anterior es la explicación que sustenta el uso de los microorganismos productores de ácidos orgánicos como solubilizadores de fosfato en el suelo, o

como inoculantes de la RF, previa aplicación de ésta al suelo (Schneider *et al.,* 2009).

Por último, se quieren señalar varios puntos que merecen atención, los cuales se originaron en los resultados encontrados. Como muestra la figura 15, la respuesta obtenida a la aplicación de RF y de las BSF, fue compleja y notable, en términos de crecimiento y desarrollo de las plantas de ají utilizadas como indicadoras.

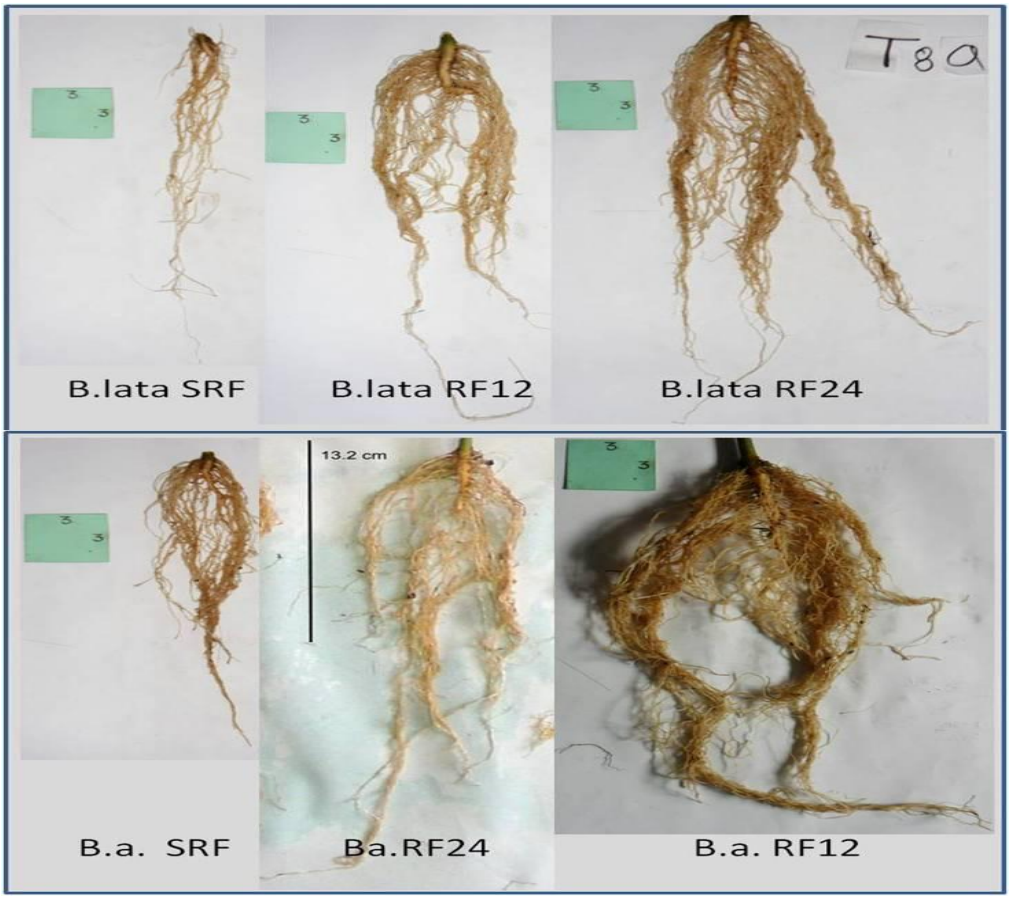

Figura 15. Efecto de la aplicación de RF y BSF sobre la morfología y biomasa radical.

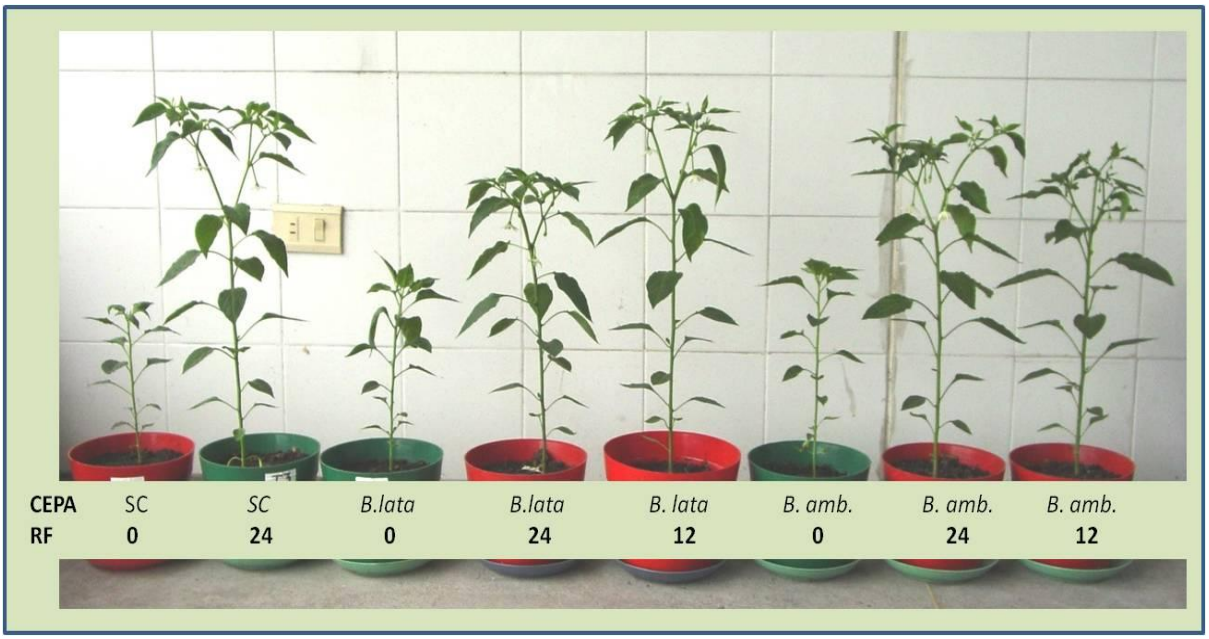

Figura 16. Efecto de la roca fosfórica (RF) y la inoculación con BSF (*B. lata* cepa 383 *o B. ambifaria*) sobre el crecimiento aéreo de plantas de ají (*C. annum*). Evaluación realizada a los 68 días de la siembra**.**

Que las plantas inoculadas con BSF y fertilizadas con RF no evidencien síntomas de deficiencia de nutrientes, a pesar de su poca disponibilidad en el suelo, plantea la posibilidad de que la acción de los microorganismos no solo fuese sobre el P, sino que además afectara la disponibilidad y movilización de muchos otros, a partir de procesos de mineralización (en el caso del N) y solubilización (especialmente en el caso del K), procesos los cuales ya han sido documentados reiteradamente para miembros del género *Burkholderia*, y por efecto de acción de masas, como ocurre también cuando hay inoculaciones exitosas de HMA. Además, la clonación de un segmento del gen *Nif*H abre de hecho la posibilidad de que podrían estar implicados procesos de fijación de N_2 en el caso de *B. ambifaria*.

Por otra parte, cuando las plantas se fertilizaron con RF y no se inocularon, se obtuvo también un buen crecimiento y desarrollo, sin síntomas de deficiencias

nutritivas evidentes. Esto podría explicarse por la presencia de microorganismos nativos en el suelo utilizado como sustrato, capaces de solubilizar la RF aplicada, la cual podría tener a su vez un efecto “priming” sobre la microbiota del suelo, activándola y favoreciendo aquellos microorganismos nativos con capacidad de solubilización.

Así, preguntas aparentemente sencillas, en términos de las BSF como dinamizadoras del P del suelo, se traducen en respuestas complejas que señalan las interacciones de los diferentes componentes del sistema suelo y su interacción con la planta y el ambiente. De allí la necesidad de repetir las mismas preguntas bajo diferentes condiciones de suelo, que permitan expresar las capacidades de estas BSF como potenciales biofertilizantes.

5. CONCLUSIONES

De los 22 aislamientos bacterianos aislados en el muestreo realizado en chontaduro (*B. gasipaes*) procedente de Buenaventura, sólo siete conservaron la ESF a través del tiempo y dos de ellas, presentaron la máxima tasa solubilizadora. Al inocularse en ají (*C. annum*), estos dos aislamientos fueron capaces de adaptarse a su rizosfera e incrementar la eficiencia en el uso de la RF, hasta el punto de permitir reducir su aplicación a la mitad sin que hayan diferencias significativas en la respuesta de las variables de crecimiento evaluadas.

La identificación molecular y genotipificación de los siete aislados mostró su pertenencia a *Pseudomonas putida*, *Burkholderia ambifaria (4 aislados)* y *Burkholderia lata* cepa 383 (2 aislados), siendo los dos últimos los que presentaron la mayor ESF. Los aislados de *Burkholderia ambifaria* presentaron además, secuencias del gen *Nif*H, componente de la enzima nitrogenasa.

6. RECOMENDACIONES

Para los aislados, almacenados en el laboratorio de Fitopatología de la UNAL Palmira, urgen estudios adicionales que determinen otras cualidades PGPR además de la capacidad solubilizadora de fosfatos y de diazotrofía encontradas, por ejemplo la producción de sustancias con acción hormonal, la producción de ACC deaminasa y sideróforos, y la producción de metabolitos con actividad biocida, entre otros.

Para su uso práctico deben además adelantarse estudios básicos sobre la ecología de los aislados, procesos de regulación metabólica de la diazotrofía y de la solubilización de fosfatos y sobre las bases genéticas de tales fenotipos.

Debido a los reportes agronómicos positivos que se han hecho sobre el desempeño de estos géneros bacterianos cuando se aplican en mezcla con otros grupos funcionales del suelo, por ejemplo solubilizadores de K o fijadores de N más eficientes, sería conveniente adelantar estudios de inoculación mezclada, tanto en invernadero como en campo, utilizando cultivos diferentes al ají, de importancia económica en la región.

Debería verificarse en condiciones de campo, el efecto de la aplicación de dosis reducidas de RF, cuando se utiliza en conjunto con bioinoculantes. .

BIBLIOGRAFÍA

Abouzeid, A. Z. M. 2008. Physical and thermal treatment of phosphate ores – An overview. International journal of Mineral processing, 85(4): 59-84.

Agyin-Birikorang, S.; Abekoe, M. K. and Oladeji, O. O. 2007. Enhancing the agronomic effectiveness of natural phosphate rock with poultry manure: a way forward to sustainable crop production: Nutriente Cycxling in Agroecosystems, 79(2): 113-123.

Arai, Y. and Sparks, D. L. 2007. Phosphate reaction dynamics in soils and soil components: a multiscale approach. Adv. Agron., 94: 135-179.

Aung, K.; Lin, S. I.; Wu, C. C.; Huang, Y. T.; Su, C. and Chiou, T. J. 2006. pho2, a phosphate overaccumulator, is caused by a nonsense mutation in a microRNA399 target gene. Plant Physiol., 141: 1000–1011.

Babana, A. H. and Antoun, H. 2007. Effect of Tilemsi phosphate rock-solubilizing microorganisms on phosphorus uptake and yield of field-grown wheat (*Triticum aestivum* L.) in Mali. In: E. Velázquez and C. Rodríguez-Barrueco (eds.). First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Springer. 51-58 pp.

Bari, R.; Pant, B. D.; Stitt, M. and Scheible, W. 2006. PHO2, MicroRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. Plant Physiol., 141: 988–999.

Bender C. L.; Alarcón Chaidez, F. and Gross, D. C. 1999. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. Microbiol Mol Biol Rev, 63: 266-292.

Biswas D. R. and Narayanasamy, G. 2006. Rock phosphate enriched compost: an approach to improve low-grade Indian rock phosphate. Biores Technol, 97(18): 2243–2251.

Bontemps, C.; Elliot, G. N.; Simon, M. F.; Dos Reis Junior, F.; Gross, E.; Lawton, R. C.; Elias Neto, N.; Loureiro, M. F.; De Faria, S.; Sprent, J.; James, E. K. and Young, P. W. 2010. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. Molecular Ecology, 19: 44-52.

Browne, P.; Rice, O.; Miller, S. H.; Burke, J.; Dowling, D. N.; Morrissey, J. P. and O`Gara, F. 2009. Superior inorganic phosphate solubilization is linked to phylogeny within the Pseudomonas fluorescens complex. Applied Soil Ecology. Doi:10.1016/j.apsoil.2009.06.010.

Caballero Mellado, J.; Onofre L., J.; Estrada de los Santos, P. and Martínez Aguilar, L. 2007. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. Applied and Environmental Microbiology. 73(16): 5308-5319.

Calderón Vásquez, C.; Alatorre Cobos, F.; Simpson Williamson, J. and Herrera Estrella, L. 2009. Maize under phosphate limitation. In: J.L. Bennetzen and S.C. Hake (eds.). Handbook of Maize: Its Biology. 381-404 pp.

Calvaruso, C.; Turpault, M. P.; Leclerc, E.; Ranger, J.; Garbaye, J.; Uroz, S. and Frey-Klett, P. 2010. Influence of Forest Trees on the Distribution of Mineral Weathering-Associated Bacterial Communities of the *Scleroderma citrinum* Mycorrhizosphere. Applied and Environmental Microbiology, 76(14): 4780-4787.

Cao, B. and Loh, K. C. 2008. Catabolic pathways and cellular responses of. *Pseudomonas putida* P8 during growth on benzoate with proteomics approach. Biotechnol Bioengineering, 101(6): 1297-1312.

Chen, Y. P.; Rekha, P. D.; Arun, A. B.; Shen, F. T.; Lai, W. A. and Young, C.C. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Applied Soil Ecology, 34: 33 – 41.

Chiarini, L.; Bevivino, A.; Dalmastri, C.; Tabacchioni, S. and Visca, P. 2006. *Burkholderia cepacia* complex species: health hazards and biotechnological potential. Trends in microbiology, 14(6): 277-286.

Chien S. H. and Menon R. G. 1995. Factors affecting the agronomic José de las Lajas, Cuba. effectiveness of phosphate rock for direct application. Fert Res, 41: 227–234.Chiou, T. J. 2007. The role of microRNAs in sensing nutrient stress. Plant Cell Environ., 30: 323–332.

Chiou, T.J.; Aung, K.; Lin, S. I.; Wu, C. C.; Chiang, S. F. and Su, C. L. 2006. Regulation of phosphate homeostasis by microRNA in *Arabidopsis*. Plant Cell, 18: 412–421.

Chuang, C.; Kuo, Y. L.; Chao, C. and Chao, W. 2007. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. Biol. Fert. Soils, 43: 575–584.

Collavino, M.; Sansberro, P. A., Mroginski, L. A. and Aguilar, O. M. 2010. Comparison of *in vitro* solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. Biology and Fertility of Soils, 46(7): 727-738, DOI: 10.1007/s00374-010-0480-x.

Compant, S., Nowak, J., Coenye, T., Clément, C. and Ait Barka, E. 2008. Diversity and occurrence of Burkholderia spp. in the natural environment. FEMS Microbiol Rev, 32(4): 607-626.

Condron, L. M. 2004. Phosphorus – surplus and deficiency. In: P. Schjønning, S. Elmholt and B.T. Christensen (editors). Managing Soil Quality: Challenges in Modern Agriculture. CAB International. 69-84 pp.

Delvasto, P.; Ballester, A.; Muñoz, J.A.; González, F.; Blásquez, M. L.; Igual, J. M. and Valverde, A. 2009. Mobilization of phosphorus from iron ore by the bacterium *Burkholderia caribensis* FeGLO3. Minerals Engineering, 22: 1-9.

Dixon, G. R. and Tilston, E. L. (Editors). 2010. Soil Microbiology and Sustainable Crop Production. Springer-Verlag, Berlin.

Dwivedi, B. S.; Singh, V. K. and Dwivedi, V. 2004. Application of phosphate rock, with or without Aspergillus awamori inoculation, to meet phosphorus demands of rice-wheat system in the Indo-Gangetic plains of India. Australian Journal of Experimental Agriculture 44: 1041-1050.

Edwards, A. C.; Walker, R. L.; Maskell, P.; Watson, C. A.; Rees, R. M.; Stockdale, E. A. and Knox, O. G. G. 2010. Improving Bioavailability of Phosphate Rock for Organic Farming. In: Eric Lichtfouse. Genetic Engineering, Biofertilisation, Soil Quality and Organic Farming. Sustainable Agriculture Reviews,4: 99 -117. DOI: 10.1007/978-90-481-8741-6_4.

Fageria, N. K. and Baligar, V. C. 2008. Ameliorating soil acidity of tropical Oxisols by liming for sustainable crop production. Advances in Agronomy, 99: 345-399.

Fankem, H.; Nwaga, D.; Deubel, A.; Dieng, L.; Merbach, W. and Etoa, F. X. 2006. Ocurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) rizosphere in Cameroon. African Journal of Biotechnology, 5(24): 2450-2460.

Ferri, L.; Perrin, E.; Campana, S.; Tabacchioni, S; Taccetti, G.; Cocchi, P.; Ravenni, N.; Dalmastri, C.; Chiarini, L.; Bevivino, A.; Manno, G.; Mentasti, M.; and Fani, R. 2010. Application of multiplex single nucleotide primer extension (mSNuPE) to the identification of bacteria: The *Burkholderia cepacia* complex case. J. Microbiol. Methods, In Press. doi:10.1016/j.mimet.2010.01.008.

Finlay, R. 2005. Action and interaction in the mycorrhizal hyphosphere – a re-evaluation of the role of mycorrhizas in nutrient acquisition and plant ecology. In: H.BassiriRad (Ed.) Nutrient acquisition by plants, an ecological perspective. Ecological Studies, Vol. 181. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 221-276 pp.

Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO. 2004. Use of Phosphate Rocks for Sustainable Agriculture. Rome.

George, A. M.; Jones, P. M. and Midleton, P. G. 2009. Cystic fibrosis infections: treatment strategies and prospects. FEMS Microbiol Lett 300: 153–164.

Gojon, A.; Nacry, P. and Davidian, J. C. 2009. Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. Current Opinion in Plant Sciences, 12: 328-338.

Goldstein, A. H. 1996. Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by Gram-negative bacteria. In: A. Torriani-Gorini, E. Yagil and S. Silver (eds.). Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular Biology. ASM Press, Washington, DC.

Goldstein**,** A.H. and Liu, S. T**.** 1987**.** Molecular cloning and regulation of a mineral phosphate solubilizing (mps) gene from Erwinia herbicola . Bio/technology, 5: 72-74.

Gulati, A.; Rahi, P.; and Vyas, P. 2008. Characterization of phosphate-solubilizing fluorescent pseudomonads from the rhizosphere of seabuckthorn growing in the cold deserts of Himalayas. Curr. Microbiol., 56: 73-79.

Haas, D. and Défago, G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. Nature Reviews Microbiology, 3 (4): 307-319.

Han, H. S.; Supanjani, and Lee, K. D. 2006. Effect of co-inoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber. Plant Soil Environ, 52(3): 130–136.

Han, S. H.; Kim, C. H.; Lee, J. H.; Park, J. Y.; Cho, S. M.; Park, S. K.; Kim, K. Y.; Krishnan, H. B. and Kim, Y. C. 2008. Inactivation of *pqq* genes of *Enterobacter intermedium* 60-2G reduces antifungal activity and induction of systemic resistance. FEMS Microbiol Lett, 282: 140 -146.

Harrier, L. A. and Watson, C. A. 2003. The role of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable cropping systems. Adv. Agron., Vol. 20: 185-225.

Harris, J. N.; New, P. B. and Martin, P. M. 2006. Laboratory tests can predict beneficial effects of phosphate-solubilising bacteria on plants. Soil Biology & Biochemistry, 38: 1521-1526.

Hayat, R.; Ali, S.; Amara, U.; Khalid, R. and Ahmed, I. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. Ann Microbiol, DOI 10.1007/s13213-010-0117-1.

He, Z. L.; Yang, X. E.; Baligar, V. C. and Calvert, D. V. 2003. Microbiological and biochemical indexing systems for assessing quality of acid soils. Advances in Agronomy, 78: 89-138.

Hinsinger, P. 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. Plant Soil, 237: 173-195.

Höfte, M. and Altier, N. 2010. Fluorescent pseudomonads as biocontrol agents for sustainable agricultural systems. Research in Microbiology, 161(6): 464-71.

Igual, J. M. and Rodríguez-Barrueco, C. 2007. Fertilizers, food and environment. In: E. Velázquez and C. Rodríguez-Barrueco (eds.). First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Springer. 199–202 pp.

Illmer, P., Schinner, F., 1995. Solubilization of inorganic calcium phosphates – solubilization mechanisms. Soil Biol. Biochem. 27: 257–263.

Jimenez, P. N.; Koch, G.; Papaioannou, E.; Wahjudi, M.; Krzeslak, J.; Coenye, T.; Cool, R. H. and Quax, W. J. 2010. Role of PvdQ in *Pseudomonas aeruginosa* virulence under iron-limiting conditions Microbiology, 156: 49-59.

Joo, G. J.; Kang, S. M.; Hamayun, M.; Kim, S. K.; Na, C. I.; Shin, D. H. and Lee, I. J. 2009. *Burkholderia* sp. KCTC 11096BP as a newly isolated gibberellin producing bacterium. The J Microbiol, 47(2): 167-171.

Kawanishi, T., Uematsu, S., Nishimura, K., Otani, T., Tanaka-Miwa, C., Hamamoto, H. and Bamba, S. 2009. A new selective medium for *Burkholderia caryophylli* the causal agent of carnation bacterial wilt. Plant Pathol, 58(2): 237-242.

Khan, M. S.; Zaidi, A. and Wani, P. 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture – a review. Agron. Sustain. Dev., 27: 29-43.

Khan, M.S.; Zaidi, A.; Ahemad, M.; Oves, M.; Wani, P.A. 2010. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective. Arch Agron Soil Scien, 56(1): 73–98.

Kögel-Knabner, I. 2006. Chemical structure of organic N and organic P in soil. In: P. Nannipieri and K. Smalla (Eds.). Nucleic Acids and Proteins in Soil. Springer Verlag, Berlin. pp. 23-48.

Konietzny, U. and Greiner, R. 2004. Bacterial phytase: potential application, *in vivo* function and regulation of its synthesis. Braz. J. Micro., 35: 11-18.

Konstantinidis, K. T. and Tiedje, J. M. 2007. Prokaryotic taxonomy and phylogeny in the genomic era: advancements and challenges ahead. Current Opinion in Microbiology, 10: 504-509.

Kravchenko, L.V.; Azarova, T.S.; Leonova-Erko, E.I.; Shaposhnikov, A.I.; Makarova, N.M. & Tikhonovich, I.A. Root exudates of tomato plants and their effect on the growth and antifungal activity of *Pseudomonas* Strains. Microbiol., 72:37-41, 2003.

Lambers, H.; Shane, M. W.; Cramer, M. D.; Pearse, S. J. and Veneklaas, E. J. 2006. Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits. Annals Bot., 98: 693-713.

Leaungvutiviroj, C.; Ruangphisarn, P.; Hansanimitkul, P.; Shinkawa, H. and Sasaki, K. 2010. Development of a new biofertilizer with a high capacity for N2 fixation, phosphate and potassium solubilization and auxin production. Biosci Biotechnol Biochem. 74(5): 1098-101.

Leggett, M.; Cross, J.; Hnatowich, G. and Holloway, G. 2007. Challenges in commercializing a phosphate-solubilizing microorganism: Penicillium bilaiae, a

case history. In: E. Velázquez and C. Rodríguez-Barrueco (eds.). First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Springer. 215-222.

Lei, X. G. and Porres, J. M. 2003. Phytase enzymology, applications and biotechnology. Biotech. Letters, 25: 1787–1794.

Leveau, J. H. J. and Gerards, S. 2008. Discovery of a bacterial gene cluster for catabolism of the plant hormone indole 3- acetic acid. FEMS Microbiol Ecol, 65: 238–250.

Levy, A.; Merritt, A. J.; Mayo, M. J.; Chang, B. J.; Abbott, L. K. and Inglis, T. J.J. 2009. Association between *Burkholderia* species and arbuscular mycorrhizal fungus spores in soil. Soil Biology & Biochemistry, 41: 1757-1759.

Lorkowski, S. and Cullen, P. (Editors). 2003. Analysing gene expression. A handbook of methods, possibilities and pitfalls. Wiley-VCH Verlag. 973 p.

Ludovic, V.; Groleau, M. C. ; Dekimpe, V. and Deziel, E. 2007. *Burkholderia* diversity and versatility: an inventory of the extracellular products. J. Microbiol. Biotechnol., 17(9): 1407-1429.

Maathuis, F. J. M. 2009. Physiological functions of mineral macronutrients. Current Opinion in Plant Sciences, 12: 250-258.

Mahenthiralingam, E., Baldwin, A. and Dowson, C. 2008. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. J App Microbiol, 104(6): 1539-1551.

Malagón, D. et al. 1995. Suelos de Colombia. IGAC, Bogotá. 632 p.

Malboobi, M. A.; Behbahani, M.; Madani, H.; Owlia, P.; Dejou, A.; Yakhchali, B.; Moradi, S. and Hassanabadi, H. 2009a. Performance evaluation of potent

phosphate solubilizing bacteria in potato rhizosphere. World J Microbiol Biotechnol, 25: 1479-1484.

Malboobi, M. A.; Owlia, P.; Behbahani, M.; Sarokhani, E.; Moradi, S.; Yakhchali, B.; Deljou, A. and Heravi, K. M. 2009b. Solubilization of organic and inorganic phosphates by three highly efficient soil bacterial isolates. World J Microbiol Biotechnol, 25: 1471-1477.

Marschner, P. 2007. Plant-microbe interactions in the rhizosphere and nutrient cycling. In: P. Marschner and Z. Rengel (Eds). Nutrient cycling in terrestrial ecosystems. Springer-Verlag, Berlin. 159-181 pp.

Mercado-Blanco, J. and Bakker, P. 2007. Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection. Antonie van Leeuwenhoek 92: 367-389.

Miller, S.H., Mark, G.L., Franks, A., and O'Gara, F. 2008. Pseudomonas-Plant Interactions. In: Pseudomonas: Model organism, pathogen, cell factory. (Ed. B.H.A. Rehm). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, pp.353-376.

Miller, S. H.; Browne, P.; Prigent-Combaret, C.; Combes-Meynet, E.; Morrissey, J. P. and O'Gara, F. 2010. Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in Pseudomonas species. Environmental Microbiology Reports, 2(3): 403–411.

Moreno-Sarmiento, N.; Moreno Rodríguez, L. F. y Uribe, D. 2007. Biofertilizantes para la agricultura en Colombia. In: Izaguirre Mayoral, M. L.; Labandera, C. y Sanjuan, J. (eds) Biofertilizantes en Iberoamérica: Visión técnica, científica y empresarial, vol 1. Denad Internacional, Montevideo, pp 38–45.

Mullen, M. D. 2005. Phosphorus in soils. Biological interactions. In: Hatfield, J. L.; Scow, K. M.; Powlson, D. S.; Singer, M. J.; Rosenzweig, C. and Sparks, D. L. (Editors). Encyclopedia of soils in the environment. Vol. 3, Academic Press. 210-216 pp.

Naik, P. R.; Raman, G.; Badri Narayanan, K. and Sakthivel, N. 2008. Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. BMC Microbiology, 8: 230. doi:10.1186/1471-2180-8-230.

Naik, P. R.; Sahoo, N.; Goswami, D.; Ayyadurai, N. and Sakthivel, N. 2008. Genetic and functional diversity among fluorescent pseudomonads isolated from the rhizosphere of banana. Microbial Ecol,Nautiyal, C. S. and Dion, P. (Editors) 2008. Molecular Mechanisms of Plant and Microbe Coexistence. Springer-Verlag, Berlin.

Nziguheba, G. 2007. Overcoming phosphorus deficiency in soils of Eastern Africa: recent advances and challenges. In: Bationo, A.; Waswa, B.; Kihara, J. and Kimetu, J. Advances in Integrated Soil Fertility Management in sub-Saharan Africa: Challenges and Opportunities. 149-160. DOI: 10.1007/978-1-4020-5760-1_13.

Oberson, A. and Joner, E. 2005. Microbial turnover of phosphorus in soil. In: B. L. Turner, E. Frossard and D. S. Baldwin (Editors). Organic phosphorus in the environment. CAB International. 133-160 pp.

Oliveira, C. A.; Alves, V. M. C.; Marriel, I. E.; Gomes, E. A.; Scotti, M. R.; Carneiro, N. P.; Guimaraes, C. T.; Schaffert, R. E. and Sá, N. M. H. 2008. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisoil of the Braziliam Cerrado biome. Soil Biology and Biochemistry. Doi:10.1016/j.soilbio.2008.01.012.

Pandey, A.; Das, N.; Kumar, B.; Rinu, K. and Trivedi, P. 2008. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. isolated from soil samples of Indian Himalayan region. World J. Microbiol. Biotechnol., 24: 97–102.

Park, K. H.; Lee, C. Y. and Son, H. J. 2009. Mechanism of insoluble phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF15 isolated from ginseng rhizosphere and its plant growth-promoting activities. Letters in Applied Microbiology, 49: 222-228.

Patel, D. K.; Archana, G. and Kumar, N. 2008. Variation in the nature of organic acid secretion and mineral phosphate solubilization by *Citrobacter* sp. DHRSS in the presence of different sugars. Curr. Micro., 56: 168–174.

Peix, A.; Ramírez-Bahena, M.H.; and Velazquez, E. 2009. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. Infection Genetics and Evolution, 9: 1132-1147.

Prasad, R. and Power, J. 1997. Phosphorus. In: R. Prasad and J. Power. Soil fertility management for sustainable agriculture. CRC Press LLC, Boca Raton Florida. pp. 171-209.

Quiquampoix, H. and Mousain, D. 2005. Enzymatic hydrolysis of organic phosphorus. In: B. L. Turner, E. Frossard and D. S. Baldwin (Editors). Organic phosphorus in the environment. CAB International. 89-108 pp.

Raghothama, K. G. and Karthikeyan, A. S. 2005. Phosphate acquisition. Plant Soil, 274: 37-49.

Rajan, S. S. S.; Watkinson, J. H. and Sinclair, A. G . 1996. Phosphate rock for direct application to soils. Adv. Agron. 57: 77-159.

Rajan, S. S. S. and Marwaha, B. C. 1993. Use of partially acidulated phosphate rocks as phosphate fertilisers. *Fert. Res*., 35: 47-59.

Rajan, S.S.S. & Watkinson, J.H. 1992. Unacidulated and partially acidulated phosphate rock: agronomic effectiveness and the rates of dissolution of phosphate rock. *Fert. Res*., 33: 267-277.

Ramachandran, S.; Fontanille, P.; Pandey, A. and Larroche, C. 2006. Gluconic Acid: properties, applications and microbial production. Food Technol. Biotechnol., 44 (2): 185–195.

Ramette**,** A., LiPuma, J. J. and Tiedje, J. M. 2005. Species Abundance and Diversity of *Burkholderia cepacia* Complex in the Environment. Applied and Environmental Microbiology, 71(3): 1193-1201.

Rao, I. M.; Borrero, V.; Ricaurte, J.; García, R. and Ayarza, M. A. 1997. Adaptive attributes of tropical forage species to acid soils. III. Differences in phosphorus acquisition and utilization as influenced varying phosphorus supply and soil type. Journal of plant nutrition, 20(1): 155-180.

Reyes, I.; Bernier, L.; Simard, R. R. and Antoun, H. 1999. Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of Penicillium rugulosum and two UV-induced mutants. FEMS Microbiol. Ecol., 28: 281-290.

Robinson, D. 2005. Integrated root responses to variations in nutrient supply. In: H.BassiriRad (Ed.) Nutrient acquisition by plants, an ecological perspective. Ecological Studies, Vol. 181. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 43-61 pp.

Rodriguez, H. and Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnol. Adv., 17: 319–339.

Rodríguez, H.; Fraga, R.; Gonzalez, T. and Bashan, Y. 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plan growth-promoting bacteria. Plant Soil, 56(3): 492-504.

Rodriguez, H.; Gonzalez, T.; Selman, G. 2000. Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. J. Biotechnol., 84: 155-161.

Rogers, P.; Chen, J. S. and Zidwick, M. J. 2006. Organic Acid and Solvent Production. Part I: Acetic, Lactic, Gluconic, Succinic and Polyhydroxyalkanoic Acids. In: The Prokaryotes. Vol 1. pp. 511-755.

Rojas Sierra, J. y Moreno Sarmiento, N. 2008. Producción y formulación de prototipos de un biofertilizante a partir de bacterias nativas asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa*). Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. X No. 2 Diciembre 2008 50-62.

Sagoe, C.I.; Ando, T.; Kouno, K. and Nagaoka, T. 1998. Residual effects of organic acid-treated phosphate rocks on some soil properties and phosphate availability. Soil Sci Plant Nutr, 44: 627-634.

Sanchez, Ch. A. 2007. Phosphorus. In: Barker, A. V. and Pilbean, D. J. (Editors). Manual of plant nutrition. 51-90 pp.

Sánchez de P., M. (Coordinadora). 2007. Las Endomicorrizas: expresión bioedáfica de importancia en el trópico. Editorial Universidad Nacional de Colombia (Sede Palmira), Facultad de Ciencias Agropecuarias. 351 p.

Scherer, H. W. 2005. Fertilizers and fertilization. In: Hatfield, J. L.; Scow, K. M.; Powlson, D. S.; Singer, M. J.; Rosenzweig, C. and Sparks, D. L. (Editors). Encyclopedia of soils in the environment. Vol. 2, Academic Press. 20-26 pp.

Schmidt, S.; Blom, J. F.; Pernthaler, J.; Berg, G.; Baldwin, A.; Mahenthiralingam, E. and Eberl, L. 2009. Production of the antifungal compound pyrrolnitrin is quorum sensing-regulated in members of the Burkholderia cepacia complex. Environ Microbiol, 11(6): 1422-1437.

Schneider, K. D.; van Straaten, P.; de Orduña, R. M.; Glasauer, S.; Trevors, J.; Fallow, D. and P.S. Smith. 2009. Comparing phosphorus mobilization strategies using *Aspergillus niger* for the mineral dissolution of three phosphate rocks. Journal of Applied Microbiology, ISSN 1364-5072. Doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04489.x

Seo, S. T. and Tsuchiya, K. 2005. Genotypic characterization of *Burkholderia cenocepacia* strains by rep-PCR and PCR–RFLP of the fliC gene. FEMS Microbiol Lett, 245(1): 19-24.

Sharan, A.; Shikha, Singh Darmwal, N. and Gaur, R. 2008. Xanthomonas campestris, a novel stress tolerant, phosphate-solubilizing bacterial strain from saline–alkali soils. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24(6): 753-759.

Sharpley, A. N.; Daniel, T.; Sims, T.; Lemunyon, J.; Stevens, R. and Parry, R. 2003. Agricultural Phosphorus and Eutrophication. Second Edition. United States Department of Agriculture. 43 p.

Shtark, O. Y.; Borisov, A. Y.; Zhukov, V. A.; Provorov, N. A. and Tikhonovich, I. A. 2010. Intimate Associations of Beneficial Soil Microbes with Host Plants. In: Dixon, G. R. and Tilston, E. L. (Editors). 2010. Soil Microbiology and Sustainable Crop Production. Springer-Verlag, Berlin.

Siddiqui, Z. A. (ed.). 2006. PGPR: Biocontrol and biofertilization. Springer Verlag, Berlin. 318 p.

Sims, J. T. and Vadas, P. A. 2005. Phosphorus in soils. Overview. In: Hatfield, J. L.; Scow, K. M.; Powlson, D. S.; Singer, M. J.; Rosenzweig, C. and Sparks, D. L. (Editors). Encyclopedia of soils in the environment. Vol. 3, Academic Press. 202-210 pp.

Smith, F. W. 2002. The phosphate uptake mechanism. Plant Soil, 245: 105-114.

Smith, F. W.; Mudge, S. R.; Rae, A. L. and Glassop, D. 2003. Phosphate transport in plants. Plant Soil, 248: 71-83.

Song, O. K.; Lee, S. J.; Lee, Y. S.; Lee, S. C.; Kim, K. K. and Choi, Y. L. 2008. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soil. Brazilian Journal of Microbiology, 39: 151-156.

Spaepen, S.; Vanderleyden, J. and Okon, Y. 2009. Plant Growth-Promoting Actions of Rhizobacteria. Review. Advances in Botanical Research, 51: 283-320.

Sprent, J. I. 2008. 60Ma of legume nodulation. What's new? What's changing? Journal of Experimental Botany, 59(5): 1081-1084.

Sun, Y.; Cheng, Z. and Glick, B. R. 2009. The presence of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase deletion mutation alters the physiology of the endophytic plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN. FEMS Microbiol Lett, 296: 131-136.

Supanjani; Shim, H. H.; Sung, J. J. and Dong, L. K. 2006. Rock phosphate potassium and rock-solbullising bacteria as alternative, sustainable fertilizers. Agronomy for Sustainable Development, 26(4): 233-240.

Tabacchioni, S.; Bevivino, A.; Dalmastri, C. and Chiarini, L. 2002. *Burkholderia cepacia* complex in the rhizosphere: a minireview. Annals of Microbiology, 52: 103-117

Taiz, L. and Zeiger, E. 2010. Plant Physiology. 5th ed. Sinauer Associates, Inc. 782 p.

Tawfik, K. A.; Jeffs, P.; Bray, B.; Dubay, G.; Falkinham III, J. O.; Mesbah, M.; Youssef, D. Khalifa, S. and Schmidt, E. W. 2010. Burkholdines 1097 and 1229, potent antifungal peptides from *Burkholderia ambifaria* 2.2N. Org.Lett., In Press. Doi: 10.1021/ol9029269

Tiessen, H. 2008. Phosphorus in the global environment. In: White, P. J. and Hammond, J. P. (Editors). The ecophysiology of plant-phosphorus interactions. Springer. 1-7 pp.

Tran, H. T.; Hurley, B. A. and Plaxton, W. C. 2010. Feeding hungry plants: The role of purple acid phosphatases in phosphate nutrition. Plant Science, 179(1-2): 14-27.

Trivedi, P. and Sa, T. 2008. *Pseudomonas corrugata* (NRRL B-30409) mutants increased phosphate solubilization, organic acid production, and plant growth at lower temperatures. Curr. Micro., 56:140–144.

Turner, B. L.; Frossard, E. and Oberson, A. 2006. Enhancing Phosphorus Availability in Low-Fertility Soils. In: Biological Approaches to Sustainable Soil Systems. Taylor & Francis Group, LLC. 191-205 pp.

United Nations Environment Programme –UNEP- and International Fertilizer Industry Association –IFA-. 2001. Environmental Aspects of Phosphate and Potash Mining. United Nations Publications, Paris. 68 p.

Unno, Y.; Okubo, K.; Wasaki, J.; Shinamo, T. and Osaki, M. 2005. Plant growth promotion abilities and microscale bacterial dynamics in the rizosphere of lupin analyzed by phytate utilization ability. Environmental Microbiology, 7(3): 396-404.

Valverde, A.; Burgos, A.; Fiscella, T.; Rivas, R.; Velazquez, E.; Rodríguez-Barrueco, C.; Cervantes, E.; Chamber, M. and Igual, J. M. 2007. Differential effects of coinoculations with *Pseudomonas jessenii* PS06 (a phosphate-solubilizing bacterium) and *Mesorhizobium ciceri* C-2/2 strains on the growth and seed yield of chickpea under greenhouse and field conditions. In: E. Velázquez and C. Rodríguez-Barrueco (eds.). First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Springer. 43-50 pp.

Vance, C. P.; Uhde–Stone, C. and Allan, D. L. 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants securing a nonrenewable resource. New Phytol. 157: 423–447.

Vanlaere, E.; Baldwin, A.; Gevers, D.; Henry, D.; De Brandt, E.; LiPuma, J. J.; Mahenthiralingam, E.; Speert, D. P.; Dowson, C. and Vandamme, P. 2009. Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* cepa 383 sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59: 102–111.

Vassilev, N.; Franco, I.; Vassileva, M. and Azcon, R. 1996. Improved plant growth with rock phosphate solubilized by *Aspergillus niger* grown on sugar-beet waste. Bioresource Technol 55: 237-241.

Vassilev, N.; Medina, A.; Azcon, R. and Vassileva, M. 2007. Microbial solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes and effect of the resulting products on plant growth and P uptake. In: E. Velázquez and C. Rodríguez-Barrueco (eds.). First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Springer. 77-84.

Versalovic, J.; Schneider, M.; de Bruijn, F. J. and Lupski, J.R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). Meth.Cell. Mol. Biol. 5: 25-40.

Vikram, A.; Alagawadi, A. R.; Krishnaraj, P. U. and Kumar, M. 2007. Transconjugation studies in *Azospirillum* sp. negative to mineral phosphate solubilization. World J. Microbiol. Biotechnol., 23: 1333–1337

Wakelin, S. A.; Warren, R. A.; Harvey, P. R. and Ryder, M. H. 2004. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. Biol. Fert. Soils, 40: 36–43.

Wasule, D. L.; Wadyalkar, S. R. and Buldeo, A. N. 2007. Effect of phosphate solubilizing bacteria on role of Rhizobium on nodulation by soybean. In: E. Velázquez and C. Rodríguez-Barrueco (eds.). First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Springer. 139-142.

Weisburg, W. G.; Barns, S. M.; Pelletier, D. A. and Lane, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology, 173(2): 697-703.

Wei, L.; Chen, C. and Xu, Z. 2009. Citric acid enhances the mobilization of organic phosphorus in subtropical and tropical forest soils. Biology and Fertility of Soils; 46(7): 765-769.

Whitelaw, M. A. 2000. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. Adv. Agron., 69: 99–151.

Widada, J.; Damarjaya, D. I. and Kabirun, S. 2007. The interactive effects of arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobacteria on the growth and nutrients uptake of sorghum in acid soil. In: E. Velázquez and C. Rodríguez-Barrueco (eds.). First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Springer. 173-177.

Wong Villarreal, A. and Caballero Mellado, J. 2010. Rapid Identification of Nitrogen-fixing and Legume-nodulating *Burkholderia* Species Based on PCR 16S rRNA Species-Specific Oligonucleotides. Syst Appl Microbiol. 33(1): 35-43.

Xiong, A. S.; Yao, Q. H.; Peng, R. H.; Li, X.; Fan, H. Q.; Guo, M. J. and Zhang, S. L. 2004. Isolation, characterization, and molecular cloning of the cDNA encoding a novel phytase from *Aspergillus niger* 113 and high expression in *Pichia pastoris.* Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 37(3): 282-291.

Yi, Y.; Huang, W. and Ge, Y. 2007. Exopolysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. World J. Microbiol. Biotechnol., DOI 10.1007/s11274-007-9575-4.

Zaidi, A.; Khan, M. S.; Ahemad, M.; Oves, M. and Wani, P. A. (Editors). 2009. Recent advances in plant growth promotion by phosphate-solubilizing microbes. In: Mohammad Saghir Khan; Almas Zaidi and Javed Musarrat (Editors). Microbial strategies for crop improvement. Springer-Verlag, Berlin. 23-50 pp.

Zhang, L. and Xie, G. 2007. Diversity and distribution of *Burkholderia cepacia* complex in the rhizosphere of rice and maize, 266: 231-235.

ANEXOS

Anexo A. Análisis de varianza para ESF de los aislamientos. El análisis se hizo para cinco resiembras (semanas) consecutivas y cuatro replicas por semana y por aislamiento, utilizando el modelo lineal general del software profesional IBM SPSS 19.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: ESF

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	992,695[a]	34	29,197	9,221	,000
Intersección	3028,290	1	3028,290	956,427	,000
CEPA	637,319	6	106,220	33,547	,000
SEMANA	135,853	4	33,963	10,727	,000
CEPA * SEMANA	159,133	24	6,631	2,094	,006
Error	297,628	94	3,166		
Total	4431,798	129			
Total corregida	1290,323	128			

[a] R cuadrado = ,769 (R cuadrado corregida = ,686)

Anexo B. Análisis de varianza para efecto de tratamientos sobre peso fresco de la raíz de plantas de ají. Evaluación hecha a los 68 días de efectuada la inoculación y la siembra. El análisis se hizo para cuatro replicas por tratamiento, utilizando el modelo lineal general del software profesional IBM SPSS 19.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: PESOFRAI68

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	154,902[a]	7	22,129	6,298	,000
Intersección	502,604	1	502,604	143,053	,000
TRATAMIENTO	154,902	7	22,129	6,298	,000
Error	84,322	24	3,513		
Total	741,827	32			
Total corregida	239,223	31			

[a] R cuadrado = ,648 (R cuadrado corregida = ,545)

Anexo C. Análisis de varianza para efecto de tratamientos sobre peso volumen de la raíz de plantas de ají. Evaluación hecha a los 68 días de efectuada la inoculación y la siembra. El análisis se hizo para cuatro replicas por tratamiento, utilizando el modelo lineal general del software profesional IBM SPSS 19.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: VOLRAIZ68

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	140,620[a]	7	20,089	5,351	,001
Intersección	496,913	1	496,913	132,367	,000
TRATAMIENTO	140,620	7	20,089	5,351	,001
Error	90,098	24	3,754		
Total	727,630	32			
Total corregida	230,717	31			

[a]R cuadrado = ,609 (R cuadrado corregida = ,496)

Anexo D. Análisis de varianza para efecto de tratamientos sobre peso materia seca de la raíz de plantas de ají. Evaluación hecha a los 68 días de efectuada la inoculación y la siembra. El análisis se hizo para cuatro replicas por tratamiento, utilizando el modelo lineal general del software profesional IBM SPSS 19.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: MATSECARA

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	1,490[a]	7	,213	6,991	,000
Intersección	4,040	1	4,040	132,687	,000
TRATAMIENTO	1,490	7	,213	6,991	,000
Error	,731	24	,030		
Total	6,261	32			
Total corregida	2,221	31			

a. R cuadrado = ,671 (R cuadrado corregida = ,575)

Anexo E. Análisis de varianza para efecto de tratamientos sobre peso fresco del tallo de plantas de ají. Evaluación hecha a los 68 días de efectuada la inoculación y la siembra. El análisis se hizo para cuatro replicas por tratamiento, utilizando el modelo lineal general del software profesional IBM SPSS 19.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente:PESOFTAL68

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	790,502[a]	7	112,929	8,076	,000
Intersección	4234,300	1	4234,300	302,811	,000
TRATAMIENTO	790,502	7	112,929	8,076	,000
Error	335,599	24	13,983		
Total	5360,401	32			
Total corregida	1126,101	31			

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente:PESOFTAL68

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	790,502[a]	7	112,929	8,076	,000
Intersección	4234,300	1	4234,300	302,811	,000
TRATAMIENTO	790,502	7	112,929	8,076	,000
Error	335,599	24	13,983		
Total	5360,401	32			
Total corregida	1126,101	31			

a. R cuadrado = ,702 (R cuadrado corregida = ,615)

Anexo F. Análisis de varianza para efecto de tratamientos sobre peso de materia seca del tallo de plantas de ají. Evaluación hecha a los 68 días de efectuada la inoculación y la siembra. El análisis se hizo para cuatro replicas por tratamiento, utilizando el modelo lineal general del software profesional IBM SPSS 19

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente:MATSECATA

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	21,447[a]	7	3,064	7,092	,000
Intersección	84,208	1	84,208	194,927	,000
TRATAMIENTO	21,447	7	3,064	7,092	,000
Error	10,368	24	,432		
Total	116,023	32			
Total corregida	31,815	31			

a. R cuadrado = ,674 (R cuadrado corregida = ,579)

Anexo G. Análisis de varianza para efecto de tratamientos sobre la relación peso fresco de la raíz/ peso fresco del tallo de plantas de ají. Evaluación hecha a los 68 días de efectuada la inoculación y la siembra. El análisis se hizo para cuatro replicas por tratamiento, utilizando el modelo lineal general del software profesional IBM SPSS 19.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: RELACIONRATAL

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	,114[a]	7	,016	2,255	,065
Intersección	3,360	1	3,360	466,397	,000
TRATAMIENTO	,114	7	,016	2,255	,065
Error	,173	24	,007		
Total	3,646	32			
Total corregida	,287	31			

a. R cuadrado = ,397 (R cuadrado corregida = ,221)

Anexo H. Análisis de varianza para efecto de tratamientos sobre biomasa total (peso fresco total) de plantas de ají. Evaluación hecha a los 68 días de efectuada la inoculación y la siembra. El análisis se hizo para cuatro replicas por tratamiento, utilizando el modelo lineal general del software profesional IBM SPSS 19.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: PESO fresco total

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	1608,047[a]	7	229,721	7,852	,000
Intersección	7654,556	1	7654,556	261,644	,000
TRATAMIENTO	1608,047	7	229,721	7,852	,000
Error	702,134	24	29,256		
Total	9964,737	32			
Total corregida	2310,181	31			

a. R cuadrado = .696 (R cuadrado corregida = .607)

Anexo I. Análisis de varianza para efecto de tratamientos sobre el área foliar de plantas de ají. Evaluación hecha a los 68 días de efectuada la inoculación y la siembra. El análisis se hizo para cuatro replicas por tratamiento, utilizando el modelo lineal general del software profesional IBM SPSS 19.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: AREA FOLIAR

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	260185,640[a]	7	37169,377	6,222	,000
Intersección	1432235,813	1	1432235,813	239,740	,000
TRATAMIENTO	260185,640	7	37169,377	6,222	,000
Error	143378,738	24	5974,114		
Total	1835800,190	32			
Total corregida	403564,377	31			

a. R cuadrado = ,645 (R cuadrado corregida = ,541)

Anexo J. Análisis de varianza para efecto de tratamientos sobre la eficiencia de uso del P de plantas de ají. Evaluación hecha a los 68 días de efectuada la inoculación y la siembra. El análisis se hizo para cuatro replicas por tratamiento, utilizando el modelo lineal general del software profesional IBM SPSS 19.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Eficiencia de uso del P

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	5,692[a]	7	,813	79,017	,000
Intersección	80,936	1	80,936	7864,762	,000
TRATAMIENTO	5,692	7	,813	79,017	,000
Error	,247	24	,010		
Total	86,875	32			
Total corregida	5,939	31			

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Eficiencia de uso del P

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	5,692[a]	7	,813	79,017	,000
Intersección	80,936	1	80,936	7864,762	,000
TRATAMIENTO	5,692	7	,813	79,017	,000
Error	,247	24	,010		
Total	86,875	32			
Total corregida	5,939	31			

a. R cuadrado = ,958 (R cuadrado corregida = ,946)

Anexo K. Secuencias de ADNr 16S de los aislados UNBS1 a UNBS7 ensambladas con Geneious v. 4.8.4 ®

Secuencia DNAr 16S de UNBS1

3’GCAAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTCCTTGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATG
CCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACG
TCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGAT
TAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACTGGTCTGAGAGGATG
ATCAGTCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
TTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATT
GTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTAC
CGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGC
GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTTAAGTTGGATGTGAAAG
CCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGG
TGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAGAGGTGC
GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAA
CTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGG
GGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAG
CATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTT
TCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGC
TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCA
GCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATG
ACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGCGCCAAAATGGTCGGTACAG
AGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCTCCAAAAACGATCGTAGTCCGGATCGCAGT
TTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGA
ATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAG
TAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGATTCATG-5’

Secuencia DNAr 16S de UNBS2

TGCAAGTCGAACGGCAGCACGGGTGCTTGCACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAA
TACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATA
CGATCTAGGGATGAAAGCGGGGGACCTTCGGGCCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTG
ATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGA
CGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA
TTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGG
TTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAATCCTTGGTTCTAATACAGCCGGGGGATGACGGT
ACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGA
GCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGCTAAGACCGATGTGAA
ATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGG
GGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAA
GGCAGNCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA
GATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCATTTCCTTA
GTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCA
AAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGA
AAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAATCCTGCTGAGAGGCGGGAGTGCTCGAAAGA
GAACCGGCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAG
TCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAAGGAGACTGCC
GGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGC
TTCACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCC
AGAAAACCGATCGTAGTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGCTGGAATCGCT
AGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTC
ACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGGAGGACGGTCACCA
CGGTAGGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCC

Secuencia DNAr 16S de UNBS3

CGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGGTGCTTGCACCTGGTGGCGAGTG
GCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCC
GGATTAATACCGCATACGATCTACGGATGAAAGCGGGGGACCTTCGGGCCTCGCGCTATAG
GGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGT
AGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGT
GAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAATCCTTGGCTCTAATACG
GTCGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGTAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTG
CTAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCAGGCTA
GAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG
GAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGG
GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTN
GGGATTCATTTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTC
GCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATT
AATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAATCCCGCTGAGAGG
TGGGAGTGCTCGAAAGAGAACCGGCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCG
TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTGCTACGCAAGAG
CACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCAT
GGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAACCCG
CGAGGGGGAGCTAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTG
CATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGT
CTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACC
GCAAGGAGGACGGTCACCACGGTAGGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACA

Secuencia DNAr 16S de UNBS4

TGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGGTGCTTGCACCTGGTGGCGAGTGGCGAA
CGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATT
AATACCGCATACGATCTACGGATGAAAGCGGGGGACCTTCGGGCCTCGCGCTATAGGGTTG
GCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGGGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTG
GTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCA
GCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGA
AGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAATCCTTGGCTCTAATACGGTCGG
GGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGCTAAG
ACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCAGGCTAGAGTA
TGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATA
CCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGC
AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGAT
TCATTTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAG
ATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCG
ATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAATCCCGCTGAGAGGTGGGAG
TGCTCGAAAGAGAACCGGCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGAT
GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCT
AAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCT
TATGGGTAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGG
GGAGCTAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAA
GCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTA
CACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGG
AGGACGGTCACCACGGTAGGATTCATGACTGGGGTGAAGT

Secuencia DNAr 16S de UNBS5

GCAAGTCGAACGGCAGCACGGGTGCTTGCACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAAT
ACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATAC
GATCTATGGATGAAAGCGGGGGACCTTCGGGCCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGA
TTAGCTAGTTGGGGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGAC
GACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT
TTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGT
TGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAATCCTTGGTTCTAATACAGCCGGGGGATGACGGTA
CCGGAAAAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAG
CGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGCTAAGACCGATGTGAAA
TCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGG
GTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAG
GCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG
ATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCATTTCCTTAG
TAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAA
AGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAA
AAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAATCCTGCTGAGAGGCGGGAGTGCTCGAAAGAG
AACCGGCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGT
CCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAAGGAGACTGCC
GGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGC
TTCACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCC
AGAAAACCGATCGTAGTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGCTGGAATCGCT
AGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTC
ACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGGAGGACGGTCACCA
CGGTAGGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAA

Secuencia DNAr 16S de UNBS6

GCAAGTCGAACGGCAGCACGGGTGCTTGCACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGATTAAT
ACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATAC
GATCTAGGGATGAGAGCGGGGGACCTTCGGGCCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGA
TTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGAC
GACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT
TTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGT
TGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAATCCTTGGTTCTAATACAGCCGGGGGATGACGGTA
CCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAG
CGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGCTAAGACCGATGTGAAA
TCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGG
GTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAG
GCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG
ATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCATTTCCTTAG
TAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAA
AGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAA
AAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAATCCTGCTGAGAGGCGGGAGTGCTCGAAAGAG
AACCGGCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGT
CCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAAGGAGACTGCC
GGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGC
TTCACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCC
AGAAAACCGATCGTAGTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGCTGGAATCGCT
AGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTC
ACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGGAGGACGGTCACCA
CGGTAGGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAAC

Secuencia DNAr 16S de UNBS7

ATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGGTGCTTGCACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTA
ATACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACCGCAT
ACGATCTATGGATGAAAGCGGGGGACCTTCGGGCCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCT
GATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGG
ACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
ATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGG
GTTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAATCCTTGGTTCTAATACAGCCGGGGGATGACGG
TACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCG
AGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGCTAAGACCGATGTGA
AATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGG
GGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGA
AGGCAGNCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT
AGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCATTTCCTT
AGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTC
AAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCG
AAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAATCCTGCTGAGAGGCGGGAGTGCTCGAAAG
AGAACCGGCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAAGGAGACTG
CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGG
GCTTCACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATC
CCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGCTGGAATCG
CTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCG
TCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGGAGGACGGTCAC
CACGGTAGGATTCAT