

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DE LA RIZÓSFERA  
DE CHONTADURO Y EVALUACIÓN DE SU CAPACIDAD SOLUBILIZADORA  
DE FOSFATOS EN LOS SUELOS DEL MUNICIPIO OLAYA HERRERA  
DEPARTAMENTO DE NARIÑO.**



**JOSÉ UBER RIASCOS RIASCOS**

**UNIVERSIDAD DEL PACÍFICO  
PROGRAMA DE AGRONOMÍA DEL TRÓPICO HÚMEDO  
BUENAVENTURA  
2010**

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DE LA RIZÓSFERA  
DE CHONTADURO Y EVALUACIÓN DE SU CAPACIDAD SOLUBILIZADORA  
DE FOSFATOS EN LOS SUELOS DEL MUNICIPIO OLAYA HERRERA  
DEPARTAMENTO DE NARIÑO.**



**JOSÉ UBER RIASCOS RIASCOS**

**Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar al título de  
Agrónomo**

**Director**

**Carlos Patiño, M.Sc. Ph.D.**

**UNIVERSIDAD DEL PACÍFICO  
PROGRAMA DE AGRONOMÍA DEL TRÓPICO HÚMEDO  
BUENAVENTURA  
2010**

## DEDICATORIA

*“Dicen que tener un amigo es el más valioso tesoro que se puede desear; pero yo creo, que más valioso es aún tener un hermano tan especial como tú”. Ese hermano eres tú **OLIVERJO RIASCOS RIASCOS**...sin explicación. Y con él a Gladys Piedad Delgado Riascos, Maira Yisel y Jader Fernando Riascos Delgado (esposa e hijos).*

*Eva Lindsay y Denzel Riascos Padilla, mis hijos, y a mi esposa Ruth Edith Padilla Sánchez.*

*A mi madre Eva María Riascos, quien en medio de su enfermedad ha rogado a Dios por mí cada día de su existencia.*

*A mis demás hermanas y hermanos: María Zoraida, Ruby, Juvenal, Arturo Alberto, Germán, Noemí, Limbania, Nury y Betty.*

## AGRADECIMIENTOS

*Al finalizar el presente trabajo lleno de gratas vivencias, de momentos de éxitos, de dificultades, de lucha constante de angustias y desesperanza, más no por eso apasionante, reconozco que tanto la labor realizada como la importancia de estos aportes, no hubiesen sido posibles si el concurso tanto de personas como de la Institución. Por lo anterior es un verdadero placer para mí expresar mis más sinceros agradecimientos a quienes directa o indirectamente contribuyeron no sólo durante el trabajo de grado, sino durante el proceso de formación profesional.*

*A Dios Todopoderoso por el milagro de la vida y por ser testigo de su gran amor por mí.*

*A los que durante este tiempo ejercieron como directores del programa de Agronomía del Trópico Húmedo: Doctor Arnulfo Gómez Carabali; Doctor Alfredo León (q.e.p.d.) y al Doctor Robert Tulio González Mina.*

*A mi director de trabajo de grado: Doctor Carlos Patiño Torres, por sus cualidades personales y excelente profesional y amigo; por su apoyo incondicional facilitándome medios suficientes para llevar a cabo muchas de las actividades propuestas durante el desarrollo de esta trabajo.*

*Al profesor Javier López, por su acompañamiento generoso, constante preocupación y apoyo logístico.*

*A los profesores y profesoras: Francisco Molineros, Carlos Medina, Diana María Delgado y Nelly Pérez.*

*A la secretaria del Programa de Agronomía: Ana Milena Ibargüen.*

*A los demás profesores que tuve durante la carrera; no los nombraré por temor a no mencionar alguno de ellos, pero que saben de mi gratitud por haber sido parte de un periodo muy importante en mi vida.*

*A los compañeros Bibiana Amú Riascos y Herminio Paredes.*

*A la Fundación Cultural Afrocolombiana Huellas Africanas, especialmente a Fray. William Robert Riascos y Amanda Garcés.*

*Al grupo A.A, porque por la misericordia de Dios me permitió superar mi adicción.*

*Y a todas aquellas personas que de una u otra forma me ayudaron a llegar a feliz término.*

*Agradecimiento especial a mi hermana Esp. María Zoraida Riascos Riascos.*

*Agradecimiento especial a la señora Ruperta Sánchez.*

*Agradecimiento especial a Benildo Estupiñán*

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1 El fósforo en la nutrición de las plantas	6
2.2 Dinámica del fósforo en el suelo y biodisponibilidad	8
2.3 Disponibilidad del fósforo en los suelos del trópico	12
2.4 Los microorganismos en el ciclo biogeoquímico del fósforo	13
2.4.1 Microorganismos solubilizadores de fosfato	14
2.4.2 Mecanismos de Solubilización / mineralización	17
2.4.3 Experiencias con bacterias solubilizadoras de fosfatos	18
2.4.4 Ventajas ambientales y económicas del uso de bacterias solubilizadoras de fosfatos	22
2.5 Consecuencias ambientales del uso de agroquímicos	25
3. OBJETIVOS	26
3.1. General	26
3.2. Específicos	26
4. MATERIALES Y MÉTODOS	27
4.1 Metodología	27
4.1.1 Localización del proyecto	27
4.1.2 Obtención de muestras de suelo rizosférico	27
4.1.3 Aislamiento y purificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos	28
4.1.4 Evaluación de la eficiencia de la capacidad solubilizadora de fosfato <i>in vitro</i>	30
4.1.5 Multiplicación del inóculo de los microorganismos solubilizadores de fosfato	30
4.1.6 Identificación de los aislamientos con capacidad solubilizadora de fosfatos	30
4.2 Ensayo de inoculación en campo	31
4.3 Análisis estadístico	32
5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
5.1 Aislamiento y purificación de bacterias solubilizadoras de fosfato	33
5.2 Evaluación de la eficiencia de la capacidad solubilizadora de fosfato <i>in Vitro</i>	35
5.3 Identificación molecular de los aislamientos bacterianos:	40

	<b>Ensayos de inoculación de las cepas en campo</b>	
<b>5.4</b>	<b>Taxonomía de la Solubilización de fosfatos</b>	<b>40</b>
<b>5.5</b>	<b><i>Género Burkholderia cepacia, sp</i></b>	<b>48</b>
<b>5.5.1</b>	<b>Taxonómia</b>	<b>48</b>
<b>5.5.2</b>	<b><i>Burkholderia cepacia</i></b>	<b>49</b>
<b>5.4.2.2</b>	<b>Taxonomía</b>	
	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>51</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>52</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>64</b>
	<b>Anexo 1. DISTRIBUCIÓN EN CAMPO DE LOS TRATAMIENTOS DE INOCULACIÓN.</b>	<b>65</b>
	<b>Anexo 2. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE SUELO CORRESPONDIENTES AL SITIO DE SIEMBRA EN EL CAMPUS UNIVERSITARIO.</b>	<b>66</b>

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1:</b> Localización geográfica del municipio de Olaya Herrera en el departamento de Nariño	<b>28</b>
<b>Figura 2:</b> Toma De muestra de rizósfera de <i>Bactris gasipaes</i>	<b>28</b>
<b>Figura 3:</b> Aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfatos	<b>29</b>
<b>Figura 4:</b> Halo de solubilización formado sobre medio Pikovskaya, para el reconocimiento de bacterias con capacidad solubilizadora de fosfato.	<b>33</b>
<b>Figura 5:</b> Diagrama de barras para la ESF de los 15 aislamientos bacterianos.	<b>36</b>
<b>Figura 6:</b> Diagrama de barras para altura de planta obtenida por la aplicación de los diferentes tratamientos.	<b>43</b>
<b>Figura 7:</b> Planta de maíz de 27 días tratada con roca fosfórica más el aislado bacteriano 04050204.	<b>44</b>
<b>Figura 8</b> Distribución en campode los tratamientos de inoculos. En primer plano, plantas de 27 días, tratadas con roca fosfórica más el aislado bacteriano 04050204	<b>44</b>



## LISTA DE TABLAS

		Pág.
<b>Tabla 1 :</b>	Análisis de varianza para ESF de los aislamientos.	36
<b>Tabla 2 :</b>	Agrupamiento de los aislados bacterianos según su ESF, hecho por la prueba de Duncan.	37
<b>Tabla 3 :</b>	Análisis de varianza para altura de planta a los 27 días, en un cultivo de maíz.	41
<b>Tabla 4 :</b>	Agrupamiento para la variable altura de plantas a los 27 días según la prueba de Duncan.	41
<b>Tabla 5 :</b>	Análisis de varianza para altura de planta a los 57 días, en un cultivo de maíz.	42
<b>Tabla 6 :</b>	Agrupamiento para la variable altura de plantas a los 57 días según la prueba de Duncan.	42

## RESÚMEN

Con el fin de aislar, identificar y evaluar bacterias solubilizadoras de fosfato en un cultivo de maíz, se realizó un muestreo de suelo en cultivo de chontaduro ubicado en el municipio Olaya Herrera, Departamento de Nariño. El aislamiento se hizo en medio Pikovskaya con  $5 \text{ g L}^{-1}$  de fosfato tricálcico como única fuente de fósforo. Se midió el tamaño de los halos de solubilización y se aislaron aquellas colonias que mostraron mayor eficiencia solubilizadora. La identificación se hizo a través del análisis comparativo de las secuencias DNAr 16S en el GenBank. EL aislamiento con mayor capacidad solubilizadora se identificó como *Burkholderia cepacia*. La bacteria se multiplicó en medio líquido PVK a un pH inicial de 7.0, en condiciones ambientales de humedad relativa del 86%, temperatura de 28°C durante ocho días, para ser utilizada como tratamiento biofertilizante en un cultivo de maíz. Posteriormente, en el campus universitario de la Universidad del Pacífico se estableció un experimento de fertilización con y sin la bacteria como tratamiento biofertilizante, en un cultivo de maíz variedad DWAB-688 utilizando un diseño de parcelas completamente al azar con 6 tratamientos para evaluar la altura. Los resultados mostraron que no existió diferencia significativa entre los mismos.

Palabras claves: suelos ácidos, Bacterias solubilizadoras de fosfatos, *Burkholderia cepacia*,

## ABSTRACT

In order to isolate, identify and evaluate phosphate solubilizing bacteria, we sampled soil in peach palm, located in the municipality Olaya Herrera, Departamento de Nariño. The isolation was made in the Pikovskaya's medium with 5 g L<sup>-1</sup> calcium phosphate (tribasic) as the sole source of phosphorus which was possible to demonstrate the formation of transparent halos around the colonies. We measured the size of the solubilization halos and isolated colonies which showed higher solubilizing efficiency. The identification was done through comparative analysis of 16S rDNA sequences in GenBank. The isolate with greater solubilizing capacity was identified as *Burkholderia cepacia*. The bacteria multiplied in liquid medium PVK an initial pH 7.0, in conditions of 86% relative humidity and 28°C, for eight days. Subsequently, on the campus of the Universidad del Pacífico was established an randomized experimental design with six treatments and three replications, using corn as indicator plant, to evaluate the variables percent germination and plant height. The analysis of variance test showed no significant difference between them.

Key words: acid grounds, solubilizadoras phosphate Bacteria, *Burkholderia cepac*

## 1. INTRODUCCIÓN

La región del Pacífico colombiano ha sido considerada una zona de vocación forestal y fue declarada como tal por la Ley 2 de 1959. Esta zona es poco apta para la agricultura convencional, intensiva y extensiva, debido a varios factores limitantes tales como: las altas temperaturas que intensifican los procesos de intemperización y la degradación del material parental del suelo. y aceleran la lixiviación de los nutrientes; la pérdida de cationes como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{K}^{1+}$  debido a que son reemplazados por iones de  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y principalmente  $\text{Al}^{3+}$  (Shenoy y otros. 2005), por el exceso de precipitaciones, a través del procesos de intercambio catiónico (Vega, Correa. 2005). Además, por la poca disponibilidad de nutrientes (Sánchez g.,e. 1994), entre los cuales vale la pena destacar al fósforo, dada las condiciones de saturación de Hierro (Fe) y Aluminio (Al), asociados con la alta acidez de los suelos (pH en el rango 4.5 - 5.5). (Deubel, A. et al., 2005).

Uribe y Marín (1990) citados por Del Valle, (1994), clasificaron los suelos de los diques y vegas del río Sanquianga, dentro del orden entisol, subórdenes Flavaquent y Tropaquent en razón de el escaso desarrollo de su perfil. De igual manera, Del Valle (1994) afirma que las principales limitaciones de estos suelos son la baja fertilidad y el mal drenaje; además, químicamente son muy ácidos a moderadamente ácidos y bajos en fósforo.

Es probable que en esta región, la mayoría de los nutrientes y minerales se encuentren en forma de biomasa, principalmente vegetal, la cual es descompuesta por los microorganismos; estos asimilan ventajosamente los nutrientes disminuyendo su disponibilidad para las plantas (Sánchez G., E. 1994).

Según Alexander, 1980, citado por Fernández y otros 2006, el fósforo después del nitrógeno, es el nutriente inorgánico más requerido por plantas y microorganismos y además, en el suelo es el factor limitante del desarrollo vegetal a pesar de ser abundante tanto en formas inorgánicas como orgánicas.

Las plantas deben absorberlo del suelo, donde se encuentra en muy baja concentración, normalmente en niveles que varían entre 5 y 30 mg kg<sup>-1</sup>. Estos índices bajos del nutriente se deben a que el fósforo soluble reacciona con iones como Calcio (Ca), el Hierro (Fe) o el Aluminio (Al) que provocan su precipitación o fijación, disminuyendo su disponibilidad para los vegetales (Rodríguez y Fraga, 1999).

Por otro parte, la deficiencia de fósforo en suelos ácidos, a diferencia de otros elementos, no permite ser corregida con la adición de fertilizantes fosfatados, porque más del 70% del Fósforo (P) aplicado tiende a fijarse rápidamente. Además, la respuesta de los cultivos no es proporcional a la cantidad aplicada, pues el porcentaje de aprovechamiento no alcanza más del 30% en el primer año, y el porcentaje restante se pierde. (Sánchez, 1994).

Un aspecto importante poco conocido de los suelos del Pacífico está relacionado con la importancia y función de las bacterias de la rizósfera como solubilizadoras de fosfatos; es por eso que conociendo el potencial de algunas especies entre ellas: *Pseudomonas sp*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Klebsiella* y *Erwinia* entre otras (Rodríguez y Fraga, 1999), es posible utilizarlas como una alternativa válida que ayude a aumentar el contenido y la disponibilidad del fósforo en los sistemas tradicionales de producción agrícola, reivindicando el papel ecológico que cumplen en el ciclaje del fósforo en estos suelos. (Rodríguez y Fraga, 1999; Filho and Vidor, 2001; Gyaneshwar y otros, 2002, Burbano, 1982)

quienes consideran que en algunos suelos hasta el 85% de la población microbiana tienen la capacidad para solubilizar fósforo.

La adopción y uso eficaz de biofertilizante microbianos (inoculantes) en agricultura está llamada a ser una de las tecnologías clave para asegurar la sustentabilidad y productividad de este sector tan importante - la agricultura - para las economías y las sociedades de los países. La posibilidad de obtener elevados rendimientos agrícolas y al mismo tiempo preservar el medio ambiente está irremediablemente ligada al uso generalizado de estos productos, como alternativa al uso masivo de fertilizantes de origen químico, que son costosos y tienen un impacto negativo sobre la salud y el ambiente. Roveda y otros.2008, Sanjuán, 2007.

El uso de biofertilizantes en la agricultura es una práctica agronómica recomendable, cuya función es garantizar la disponibilidad de nutrientes para la planta y una población microbiana que ayuden a la descomposición de la materia orgánica. Entre mayores sean estos procesos microbianos benéficos en el suelo de un cultivo, mayor será la productividad del mismo (Azcón y Barea, 1997). Citado por Roveda y otros.2008.

Los inoculantes son productos tecnológicos cuyo principio activo es un microorganismo vivo (bacterias y hongos), que tiene la propiedad de mejorar la nutrición y el crecimiento vegetal, permitiendo así un mejor aprovechamiento de los recursos naturales del suelo y del ambiente. La obtención, comercialización y aplicación eficiente de un inoculante eficaz y de alta calidad es un proceso largo y complejo en el que se ven involucrados muchos y muy diversos especialistas: microbiólogos, fisiólogos vegetales, ingenieros agrónomos, ingenieros industriales, técnicos extensionistas, economistas, legisladores, etc., incluidos los propios agricultores como usuarios finales del producto. (Sanjuán. 2007).

En Colombia los principales cultivos en los que se usan los biofertilizantes son algodón, soya, flores, papa y arroz, siendo este último el cultivo que emplea la mayor cantidad de insumos biológicos. (Moreno, sarmiento y otros, 2007).

Varios estudios han demostrado generalmente que los fertilizantes fosfatados así como los insecticidas, afectan negativamente la presencia de microorganismos en el suelo y causan la eutrofización de las fuentes hídricas (Covacevich, et al., 2005).

Roveda y otros. 2008, plantean que en condiciones naturales, la mayoría de las plantas tropicales se encuentran asociadas con microorganismos del suelo los cuales mejoran la disponibilidad de nutrientes, ayudan en la descomposición de la materia orgánica, realizan procesos de fijación biológica del nitrógeno (simbiótica y asimbiótica), mejoran la absorción de nutrientes por las plantas, contribuyen con la solubilización de nutrientes poco solubles como fósforo en el suelo, acondiciona el pH del suelo, mejoran la estructura y estabilidad de los agregados del suelo, ofrecen protección a las plantas frente a microorganismos fitopatógenos del suelo, y en general, disminuyen los niveles de fertilización química.

El chontaduro (*Bactris gasipaes. HBK*) fruto importante de la agrobiodiversidad del trópico húmedo de América Latina, se encuentra bien representado en las regiones del Pacífico y Amazonía Colombiana. Importante por su aporte en nutrientes (carbohidratos, proteínas, lípidos, vitaminas, minerales y fibra) este fruto, cultivado artesanalmente, y cosechado dos veces al año, es gran exponente de la nutraceutica, es decir aquellos que además de ser alimentos cumplen la función medicinal (CRC, 2007). Citado por GODOY, 2007.

Con el presente trabajo se pretende evaluar la capacidad solubilizadora de fosfatos, de algunas bacterias aisladas de la rizósfera de plantas de chontaduro en suelo del Municipio de Olaya Herrera – Nariño.



## **2. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1 EL FÓSFORO EN LA NUTRICIÓN DE LAS PLANTAS**

El fósforo (P) es uno de los elementos esenciales y limitantes en el crecimiento de las plantas, aunque es abundante en el suelo de formas inorgánicas y orgánicas (Gyaneshwar et al., 2002 y Hernández-Valencia, 2005). Se conoce que las plantas solo pueden tomarlo en forma inorgánica, pero además, la concentración de este tipo de fósforo en el suelo es relativamente baja. Además si se compara con otros elementos presenta una baja movilidad en el suelo, por lo que es considerado como un factor limitante para la producción de los cultivos (Jayandra et al., 1999).

Por sus propiedades, el fósforo se constituye en un elemento importante en la fisiología de las plantas, porque promueve la división celular, el transporte de nutrientes dentro de la planta, e interviene en la regulación de rutas metabólicas. (Djbagyara et al., 2000). Igualmente, el fósforo forma parte en la composición de las sustancias de reserva en semillas y bulbos. Contribuye a la formación de yemas, raíces y a la floración así como a la lignificación.

(Burbano. 1982), considera que el fósforo es un elemento básico en la nutrición de las plantas al desempeñar un rol directo en el metabolismo vegetal como conductor de energía y constituyente de compuestos indispensables para la síntesis de proteínas, grasas y almidón, e imprescindible para la fotosíntesis.

Estas características hacen que el fósforo sea uno de los nutrientes esenciales más importantes para el crecimiento y desarrollo de las plantas en todas sus

etapas fisiológicas, pero es a la vez es el elemento que está a menor disposición, para ser absorbido por la planta. Las plantas absorben el fósforo principalmente de las formas  $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$  y  $\text{HPO}_4^{-2}$  (Lovatt, 1990), citado por González Valdez. 2002.

En los tejidos meristemáticos se encuentran fuertes concentraciones de fósforo. Su presencia es fundamental en procesos biológicos como la división y crecimiento celular y en procesos vitales como la fotosíntesis, glucólisis, respiración y síntesis de ácidos grasos, extendiéndose su relevancia a las partes constitutivas esenciales de los ácidos nucleicos, fosfolípidos y ATP. (González Anta,)

Una fuente importante de este mineral lo constituye la roca fosfórica como proveedora de fósforo en los suelos ácidos, convirtiéndose en una alternativa válida (Sánchez y Salinas. 1983), sin embargo debido a su baja solubilidad, su uso es más apropiado en cultivos perennes. (Ramírez, 2006).

En suelos ácidos, la roca fosfórica mantiene una progresiva solubilización a través del tiempo que posibilita un aporte de P similar al de las fuentes más solubles (Horowitz, 1998) citado por Ferraris, 2006. Las fosforitas son insolubles en agua por lo que no se disuelven rápidamente en el suelo como los fosfatos solubles, el factor más importante en determinar la solubilización de la roca fosfórica es el pH del suelo. De esta manera los suelos ácidos con  $\text{pH} < 5,5$  y baja saturación en bases son apropiados y favorecen la reactividad de la roca y la producción de fosfatos asimilables para la planta.

La deficiencia de P es uno de los factores limitantes de crecimiento a nivel mundial en suelos ácidos donde frecuentemente hay alta fijación del suelo. Gyaneshwar. et al., 2002) citando otros autores plantea que muchos suelos presentan

deficiencia de P porque la concentración libre del fósforo (la forma disponible para las plantas) incluso en suelos fértiles no está generalmente más arriba de 10  $\mu\text{M}$  incluso en pH 6.5 donde está la mayoría del P soluble. La deficiencia del fósforo (P) en los suelos del trópico y subtrópico es un problema de reconocida importancia, cuya magnitud constituye una de las limitantes de mayor trascendencia en la producción de los cultivos. (Fernández, López.2005).

La carencia de fósforo en estos suelos se produce no solo por un contenido inadecuado de este nutriente en el suelo, sino por niveles elevados de Aluminio por encima de 2 ppm interfieren drásticamente en el metabolismo del fósforo, inducen una precipitación más intensa del fosfato de aluminio en el espacio libre aparente de la raíz y trae como consecuencia una menor disponibilidad de este elemento para su absorción, transporte y asimilación (Chude, 1994). Citado por (Hernández Díaz, 2001).

## **2.2 DINÁMICA DEL FÓSFORO EN EL SUELO Y BIODISPONIBILIDAD**

El fósforo es un elemento esencial para la vida. Las plantas lo necesitan para crecer y desarrollar su potencial genético; lamentablemente, el fósforo no es abundante en el suelo, y lo que es peor, la mayor parte del fósforo presente en el suelo no está en formas disponibles para la planta.

El fósforo del suelo procede de los minerales del suelo, de la materia orgánica y también de los abonos fosfóricos. Este se va perdiendo por la erosión de las capas superficiales que contienen fósforo, y por el arrastre a capas profundas cuando es lavado por el agua, aunque en este último las pérdidas son pequeñas. Además el fósforo también se pierde por la extracción del mismo por parte de las plantas. (Murrel. 2003).

El fósforo total (PT) varía con la textura ya que cuanto más fina es la textura mayor es su contenido, Y en los suelos de áreas tropicales parece estar ligado a la materia orgánica (MO) y su evolución pedológica. Al aumentar la concentración de la MO y los fosfatos orgánicos se obtiene una mayor cantidad de fósforo total (Fassbender y Bonermisza, 1987), citados por Arzuaga y otros. 2005.

El fósforo orgánico (Po) proviene de restos vegetales y animales que al ser degradados por los microorganismos del suelo liberan compuestos fosfatados. El Po constituye del 29 al 65% del P de la superficie del suelo (Harrison, 1987), la mayoría en compuestos de bajo peso molecular (Condrón and Goh, 1989). Como el Po tiende a ser adsorbido sobre las arcillas, se podrían esperar contenidos superiores de Po en suelos arcillosos que en arenosos o francos (Harrison, 1987; O'Halloran, 1993, citados por Arzuaga y otros. 2005.

El contenido del fósforo total del suelo es generalmente menor que el de N o de K total: comúnmente las concentraciones de P total varían entre 90 y 2000 mg kg<sup>-1</sup> y el valor promedio estaría alrededor de 900 mg kg<sup>-1</sup>. Se podría considerar que en los suelos el 2% del P, referido al total, se encuentra en formas disponibles para las plantas. Por lo general, una importante proporción del P total en los suelos se encuentra en forma orgánica, la que puede ser del orden del 50% o más, pero es muy estable y se mineraliza muy lentamente. (Opazo, et al., 1990).

En promedio, la mayoría de los elementos minerales en la solución del suelo están presentes en cantidades millimolar, sin embargo, el fósforo está presente solamente en pocas cantidades micromolares (Deubel, 2005). Estos bajos niveles de P son debidos entre otros, a la alta reactividad del P soluble con el Calcio (Ca), el Hierro (Fe) o el Aluminio (Al) lo que conduce a la precipitación de P.

Fenster y León (1979), citados por Romero y otros. (2003), afirman que en los suelos ácidos e infértiles de la América latina tropical, el contenido total de fósforo oscila entre 200 y 600 ppm y el fósforo disponible varía entre 1 y 5 ppm. Por su parte, Rodríguez. et al (1999) señalan que el fósforo en el suelo está presente en niveles entre 400 – 1200 mg.Kg<sup>-1</sup>, refiriéndose al fósforo disponible en el suelo.

Rizobacter S.A., 2007, citando a (Lilienfein et al., 2002), plantea que la disponibilidad de fósforo en el suelo depende principalmente de la actividad de los microorganismos. Además, Hernández-Valencia, 2005, afirma que se ha demostrado que los cambios en el uso de la tierra pueden provocar modificaciones en el ciclaje de materia orgánica y nutrimentos, y por lo tanto en la disponibilidad del fósforo para las plantas

Barrow, 198) habla de tres clases de P en el suelo desde un punto de vista funcional, siendo el fósforo que se encuentra inmediatamente disponible para ser absorbido por las plantas el P en solución. El fósforo lábil que representa la cantidad de fósforo disponible durante una temporada de cultivo y el fósforo no lábil que corresponde al fósforo que no sale a la solución del suelo en una temporada de cultivo.

En este mismo sentido, Pinochet 1995, citando a (Barrow, 1980) señala que el fósforo no lábil representa aquellos compuestos fosforados en el suelo que no salen a la solución en una temporada de cultivo. El “pool” de fósforo no lábil tiene una relación de equilibrio con el “pool” de fósforo lábil, pero no directamente con el fósforo de la solución de suelo. Los procesos de transferencia de fósforo que permite el equilibrio entre las fracciones ocurren mediante tres mecanismos: Adsorción – desorción, Precipitación-disolución y mineralización.

Rodríguez, 1993, indica que el fósforo que se encuentra en la solución del suelo es el que las raíces de los cultivos utilizan directamente en el proceso de absorción. Su concentración es muy baja la cual oscila entre 0,06 y 0,5 ppm y corresponde a la fracción que se encuentra en equilibrio con el fósforo lábil del suelo.

Generalmente se ha considerado que las fracciones de P inorgánico son las fuentes principales de P disponible, sin embargo los compuestos orgánicos de P son un factor importante en la producción de formas disponibles de P en el suelo (Sharpley y Halvorson, 1994).

La mineralización es la conversión microbiana del fósforo orgánico  $H_2 PO_4^-$  o  $HPO_4^{2-}$  (ortofosfato), que son formas de fósforo disponibles para las plantas. El P orgánico puede ser mineralizado como subproducto de la mineralización de la materia orgánica del suelo o mediante la acción de enzimas específicas que son reguladas por la demanda de ese nutriente (Picote y Zamuner.2002, citados por Bobadillo y Rincón. 2008).

Bobadillo y Rincón. 2008, también citando a Ridge y Rovira. 1971, quienes plantean que la mineralización esta mediada por enzimas fosfatasas que pueden ser sintetizadas por las raíces de las plantas, las cuales producen fosfatasas ácidas como por los hongos y las bacterias capaces de producir fosfatasas ácidas y alcalinas. Entre los compuestos orgánicos de fósforo que comúnmente pueden estar presente en el suelo se encuentran la Lecitina, los Ácidos nucleicos y la Fitina los cuales en presencia de fuentes de carbono y nitrógeno de fácil asimilación para los microorganismos pueden ser degradados por acción de estas enzimas liberando fósforo en forma de fosfatos (Alexander. 1987). Citado por Bobadillo y Rincón. 2008.

## 2.3 DISPONIBILIDAD DEL FÓSFORO EN LOS SUELOS DEL TRÓPICO

Los problemas del P en los suelos tropicales ácidos radican, por un lado, en la pequeña cantidad de fosfatos totales y su distribución en formas poco solubles (fosfatos férricos inertes), y por otro lado, en que los fosfatos aplicados como fertilizantes, pasan rápidamente a formas que no son aprovechables por las plantas. (Fassbender y Bernemisza. 1994).

El contenido del fósforo total del suelo es generalmente menor que el de N o de K total. Comúnmente las concentraciones de P total varían entre 90 y 2000 mg kg<sup>-1</sup> y el valor promedio estaría alrededor de 900 mg kg<sup>-1</sup>. Se podría considerar que en los suelos el 2% del P, referido al total, se encuentra en formas disponibles para las plantas. Por lo general, una importante proporción del P total en los suelos se encuentra en forma orgánica, la que puede ser del orden del 50% o más, pero es muy estable y se mineraliza muy lentamente. (Opazo, et al., 1990).

Fenster y León (1979), citados por Romero y otros. (2003), afirman que en los suelos ácidos e infértiles de la América latina tropical, el contenido total de fósforo oscila entre 200 y 600 ppm y el fósforo disponible varía entre 1 y 5 ppm. Por su parte, Rodríguez y Fraga (1999) señalan que el fósforo en el suelo está presente en niveles entre 400 – 1200 mg.Kg<sup>-1</sup>, refiriéndose al fósforo disponible en el suelo.

En suelos ácidos, el fósforo precipitado con hierro y aluminio pasa lentamente a la disolución. En los suelos muy ácidos los fosfatos de hierro y aluminio se hacen muy insolubles, siendo irrecuperables para la planta, llamándose este proceso retrogradación. Dada la baja movilidad de este nutriente es que factores tales

como humedad, pH, temperatura determinan su disponibilidad. (Bono y Barraco, M. 2005).

La mayor parte del fósforo del suelo no es asimilable por las plantas, esto se debe a su insolubilidad. Las plantas asimilan el fósforo en forma de iones ortofosfato monovalentes y bivalentes, y la solubilidad de estos iones depende del pH del suelo, y de la presencia de otros iones como Ca, Fe, Al y Mg. Si el pH es bajo, aumenta la solubilidad del ion ortofosfato monovalente, y como es el que se absorbe más fácilmente, las plantas disponen en principio de más fósforo cuando el pH es bajo. (Puertas García, sin fecha).

La disponibilidad de este elemento para las plantas también se puede relacionar con otra variable biológica importante como es la población de microorganismos solubilizadores del P, pues mediante la liberación de enzimas y ácidos orgánicos liberan formas de este elemento asimilables para las plantas (Osorio y Pérez, 2001)

## **2.4 LOS MICROORGANISMOS EN EL CICLO BIOGEOQUÍMICO DEL FÓSFORO**

Algunas especies de microorganismos de la tierra están estrechamente envueltas en el ciclo del P, ellos participan en la solubilización del P inorgánico y en la mineralización del P orgánico. (Bardgett, R). Varios de los fosfatos de la corteza terrestre son insolubles en agua lo que hace que su disponibilidad no sea la más óptima. Los fosfatos solubles pasan de la tierra al mar por los fenómenos de lixiviación que sufre el suelo, este proceso se produce en la dirección de la tierra al mar y no al revés (porcentaje mínimo). Se hace necesario que el fósforo que se encuentra insoluble pase a soluble.



Las fosfatasas detectadas en el suelo constituyen un grupo de enzimas de gran importancia en la dinámica de uno de los nutrientes más importantes para las plantas, como lo es el fósforo (P), pues participan en la mineralización del P orgánico, (Portilla et al., 1998), citado por Torres y Lizarazo. 2006

Yoshioka et al. 2006 con relación a las fosfatasas dicen que estas catalizan la hidrólisis de ésteres y anhídridos de  $H_3PO_4$ , son responsables de la mineralización del fósforo orgánico del suelo y de la liberación del fósforo inorgánico necesario para los microorganismos y las plantas.

El número de bacterias tiene una estrecha relación con algunas propiedades físicas del suelo, como la textura, estructura, porosidad, aireación y retención de humedad, ya que su actividad se beneficia con una mayor disponibilidad de oxígeno, principalmente en aquellos suelos con poca compactación y sin excesos de agua. Dentro de las propiedades químicas que favorece la actividad de las bacterias se encuentra un pH cercano a la neutralidad (7.0), una baja acidez, altos contenidos de materia orgánica y alta disponibilidad de algunos elementos necesarios para su metabolismo, como N, Ca y Mg. (Acuña y otros. 2006)

También es importante tomar en cuenta los factores que pueden afectar negativamente las poblaciones de bacterias, dentro de éstos está la presencia de otros organismos antagónicos y de sustancias contaminantes en el suelo, así como la aplicación de agroquímicos. (Acuña, Oscar y otros. 2006)

**2.4.1 Microorganismos solubilizadores de fosfato.** En los últimos años, se le ha dedicado particular atención al papel que juegan los microorganismos habitantes de la rizósfera, con capacidad de movilizar a través de la solubilización elementos poco abundantes, como el fósforo Barea y Azcón-Aguilar, 1983; Kucey *et al.*, 1989. Citados por Toro y otros. 2008).

En varios trabajos realizados se ha descubierto la capacidad de diversas especies bacterianas de solubilizar compuestos inorgánicos insolubles del fosfato, tales como fosfato tricálcico, el fosfato dicálcico, la hydroxyapatita y la roca fosfórica. Entre los géneros bacterianos con esta capacidad están *Chromobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Acronobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium* y *Erwinia*. (Rodríguez, y Fraga. 1999).

Los microorganismos solubilizadores de fosfatos (PSMs) son ubicuos en suelos y podrían desempeñar un papel importante en proveer P a las plantas más ambientalmente de una manera amistosa y sostenible. (Gyaneshwar, et al., 2002).

(Trimble y Knowles, 1995), citados por (Díaz Medina y otros, 2003), afirman que las bacterias solubilizadoras de fósforo (fosforina) juegan un papel vital en la toma del fósforo presente en los suelos, principalmente en las zonas tropicales, donde las cantidades de fósforo asimilable por las plantas son frecuentemente bajas.

Existe un gran interés en el uso de microorganismos como biofertilizantes especialmente en áreas con baja disponibilidad de fósforo asimilable por las plantas como resultado de un pH desfavorable en el suelo (Deubel, et al., 2005). Se conoce que un número considerable de especies bacterianas están asociadas a la rizósfera, las cuales al solubilizar fósforo, incrementan la disponibilidad para las plantas; además, se ha descubierto que en esta zona del suelo, la rizósfera, más que en ninguna, se encuentra mayor cantidad disponible de fósforo. (Rodríguez, et al., 1999).

Según Oviedo y otros.2005, el grupo bacteriano y particularmente una de sus especies, *Pseudomonas fluorescens*, han demostrado gran capacidad para solubilizar las fracciones orgánicas e inorgánicas del fósforo presente en el suelo y

consecuentemente se han transformado en los microorganismos mas interesantes para ser aislados, purificados y multiplicados con el propósitos de elaborar inoculantes microbianos de alta eficiencia solubilizadora del fósforo. (Frioni L., 1999).

Las bacterias *Pseudomonas fluorescens* tienen un alto requerimiento de fósforo que se estima en 10 veces más que el que es requerido por las plantas y por lo tanto han desarrollado diferentes mecanismos para proveérselo tanto desde la fracción orgánica como desde la fracción inorgánica del suelo. Por otra parte en el caso del fósforo orgánico del suelo, las *Pseudomonas fluorescens* producen fosfatasas específicas que cortan las uniones esteres que unen a las estructuras de materia orgánica con los aniones fosfatos liberándolos también a la solución del suelo. (Romero y otros.2003)

La función básica de las bacterias es la descomposición y mineralización de los residuos orgánicos, de donde obtienen su fuente energética y alimenticia. Mediante su metabolismo liberan al medio sustancias como enzimas, proteínas, reguladores de crecimiento, metabolitos y algunos nutrientes. Los beneficios de las bacterias para los cultivos se relacionan con un incremento en la cantidad de raíces y un aporte importante de elementos básicos para el desarrollo y producción. (Acuña, O. y otros)

Las bacterias promotoras de crecimiento de plantas (BPCP) benefician a las plantas a través de diferentes mecanismos, como son: la fijación de N<sub>2</sub>, la producción de fitohormonas y sideróforos, la solubilización de fosfato y la síntesis de enzimas que alteran los niveles de fitohormonas y biocontrol de los fitopatógenos. (Holguin, y otros. 2003).

**2.4.2 Mecanismos de solubilización / mineralización.** Fernández, y otros. 2005, citando a Alexander, 1980 y a Rodríguez y Fraga, 1999, plantean que el principal mecanismo microbiológico por el cual los compuestos fosfatados son movilizados es la disminución del pH del medio por la liberación de ácidos orgánicos. Y otros posibles mecanismos que incluyen la eliminación de protones afuera de la célula y su intercambio con cationes unidos al fósforo o la producción de ácidos inorgánicos como el ácido sulfhídrico, el ácido nítrico o el ácido carbónico.

La solubilización de fósforo mineral y orgánico se produce por la capacidad que presenta la rizobacteria de producir ácidos orgánicos y fosfatasa, respectivamente. Además produce estimulación del crecimiento vegetal por la presencia de citoquininas, giberelinas y ácido indolacético, así como protección fitosanitaria a los cultivos debido a la producción de antibióticos y presencia de sideróforos en la cepa. Citado por (Cracogna. 2003)

En muchos ecosistemas el bajo contenido de fósforo inorgánico soluble es el mayor limitante de la productividad de las plantas. Los cultivos en desarrollo tienden a obtener P inorgánico del fósforo inorgánico, soluble y fósforo orgánico complejo. Muchas plantas especialmente aquellas adaptadas a condiciones de bajo fósforo tienden desarrollar mecanismos bioquímicos para solubilizar fósforo inorgánico complejo. Ellas producen y secretan ácidos orgánicos dentro de la rizósfera (Shane y Lambers. 2005).

La solubilización microbiana del fósforo sería la única vía posible de incrementar el fósforo disponible para las plantas, aparte de la fertilización y la descomposición enzimática. Estos microorganismos actúan sobre las formas orgánica y mineral del fósforo de varias maneras: Los compuestos minerales insolubles son transformados en compuestos solubles que pueden ser absorbidos; transforman el

fósforo orgánico inasimilable en fósforo mineral asimilable (mineralización); transforman el fósforo mineral en fósforo orgánico, cuando toman el fósforo para construir sus propios cuerpos (inmovilización). Este fósforo no se pierde para los cultivos, ya que entra de nuevo en proceso de mineralización cuando los organismos mueren.

Los ácidos orgánicos de bajo peso molecular como el oxálico, fórmico, málico, cítrico, y acético, se producen en el suelo como consecuencia de la descomposición de la materia orgánica. La cantidad y el tipo de ácidos orgánicos liberados dependen del tipo de microorganismos presentes en el suelo. Durante los procesos de oxidación de compuestos inorgánicos de nitrógeno y azufre se produce el ácido nítrico y el sulfúrico, los cuales reaccionan con los fosfatos insolubles causando su solubilización. (Puertas García,).

**2.4.3 Experiencias con bacterias solubilizadoras de fosfatos.** Gómez-Guinan, 2007 plantea que la presencia de microorganismos con gran potencial en la mineralización del fósforo, especialmente en suelos de baja fertilidad, juega un papel importante en la disponibilidad de este elemento para las plantas; dado que en la rizósfera se encuentra una gran cantidad de fósforo orgánico, el cual no puede ser utilizado por las plantas. Cracogna, 2003, citando a Filho and Vidor, 2001. Este factor- los microorganismos como factores de suplementación de fósforo para las plantas- viene despertando la atención para la utilización de esos microorganismos como inoculante comercial o el manejo de sus poblaciones como forma de promover una mejor utilización del fósforo existente en el suelo o el adicionado como fertilizante.

Olivares. 2006, dice que las bacterias relacionadas con la liberación del fósforo se han considerado siempre como paradigma de las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) y han sido conocidas por mucho tiempo como IPSB

(del inglés, bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico); Son muy variadas y están ampliamente extendidas por todos los suelos y condiciones ambientales. Estos microorganismos solubilizadores de fosfatos inorgánicos desempeñan un importante papel en el suplemento de fósforo para las plantas. (Cracogna, 2003.)

Cante y otros (sin fecha), en su estudio denominado Influencia de los inoculantes bacterianos como alternativa agroecológica para producir trigo de calidad, utilizando bacterias solubilizadoras de fosfatos, obtuvieron como resultado un incremento máximo de 89% con respecto al control. Y citando a Radwan *et al.*, 2001 quien afirma que se ha demostrado que los incrementos que ocurren en masa seca de la parte aérea y masa seca de raíz son debidos probablemente a los reguladores del crecimiento vegetal producidos por las bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos.

Cracogna, (2003), realizó una investigación con el fin de determinar la influencia de la inoculación con formulaciones comerciales de *Azospirillum sp.* (*bacteria fijadora de nitrógeno*) Az 39 INTA y *Pseudomonas sp- BSF* (bacterias solubilizadoras de fosfatos) y la combinación de ambos inoculantes sobre el crecimiento y productividad del cultivo de trigo en un ensayo de campo. El estudio mostró que la respuesta de las plantas es diferente según la bacteria utilizada como inoculante. Para el crecimiento de las raíces presenta mejores resultados la inoculación con *Azospirillum* y para el rendimiento la coinoculación presenta valores mayores. En general, tanto las inoculaciones simples como la coinoculación marcaron resultados favorables en distintos parámetros y en distintos porcentajes.

Díaz Medina y otros, 2003, evaluaron el efecto de la aplicación individual y combinada de *Azotobacter chroococcum* y bacterias solubilizadoras de fósforo

(Fosforina) sobre el crecimiento y desarrollo de plántulas de cafeto, en un suelo Ferralítico rojo lixiviado típico de montaña, encontrando una mayor efectividad con la combinación de ambos biofertilizantes al compararlos con la aplicación individual, superando en todos los casos al testigo sin inocular, lográndose incrementos desde 2,2 hasta 33 %.reportando en sentido general incrementos sustanciales en los indicadores de crecimiento y rendimientos evaluados.

Estudios realizados por Peix, y otros, 2003 demostraron que cepas bacterianas solubilizadoras de fosfato aisladas de la rizósfera de guisante (*Pisum sativum*) en dos suelos de Francia, aumentaron la biodisponibilidad de fósforo, y por ende mejoraron la producción.

Fernández, y otros, (2005), trabajaron con bacterias solubilizadoras de fosfatos y otras del género *Bradyrhizobium* procedentes de suelos de la región sojera (Buenos Aires) y Manfredi (Córdoba) de Argentina. Los resultados mostraron que los valores medios observados por gramo de suelo seco fueron de  $5.1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias (UFC) bacterianas, siendo  $3.0 \times 10^3$  solubilizadoras de fosfato (0.06% del total). Llegaron a la conclusión de que la identificación de estas bacterias y su aplicación en ensayos directamente en el suelo, permitirá avanzar en el estudio de las mismas como herramientas potenciales de inoculación en los suelos con deficiencias de fósforo.

Ferraris, y otros, (2006), realizaron estudios con el objetivo de evaluar el efecto de la inoculación con *Pseudomonas spp* sobre el crecimiento y el rendimiento del cultivo de trigo en dos lotes comerciales localizados en el sur de Santa Fe (Argentina), teniendo en cuenta que *Pseudomonas spp*, es una BSF. Resaltan que la inoculación con *Pseudomonas spp* produjo un incremento significativo en el número de granos y el rendimiento en uno de los ensayo y en la materia seca total y el número de granos en otro. La baja disponibilidad de P en el suelo y las

excelentes condiciones de producción de ambos ambientes habrían favorecido la expresión de esta respuesta. La inoculación con *Pseudomonas spp* como complemento de la fertilización química fosforada demostró ser una práctica muy promisoría para incrementar los rendimientos en trigo.

Fuentes B. y otros, (sin fecha), realizaron estudios sobre la actividad fosfatasa de bacterias solubilizadoras de fósforo orgánico asociadas a la degradación de excretas de bovino lechero, en suelos del sur de Chile. El estudio consistió en estimar la contribución de las BSF en la descomposición de los residuos orgánicos y su participación en el ciclo de P. Durante la degradación, se detectó la presencia de BSPo y una continúa actividad de fosfatasa ácida y alcalina, con promedios aproximados de 280 y 450  $\mu\text{mol p-nitrofenol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , respectivamente. Esto los llevó a plantear que la continúa actividad fosfatasa y la presencia BSPo podría contribuir a esta actividad enzimática, en conjunto con otros microorganismos, favoreciendo la solubilización de Po.

En un ensayo realizado por Oviedo y otros, 2005 en el que se pretendía evaluar la respuesta de la inoculación con *Pseudomonas* en el cultivo de *Lolium perenne* (raygrás), coinoculado con *Rhizobium* y con fertilización fosfórica, teniendo en cuenta como variables la altura de la planta y peso seco de la misma, se puso en evidencia que para la altura de plantas los resultados estuvieron en función de la dosis de fertilizante agregado. En relación con la inoculación tanto en la simple como en la coinoculación se presentó la misma tendencia. Con relación al peso seco de las plantas mostró resultados coincidentes con lo dicho para la altura de las plantas siendo la cantidad de fosfato agregado la determinante de los resultados. Las inoculaciones no manifestaron mayor efecto en ausencia de Fósforo y con la menor dosis se registran los valores similares o con muy poca diferencia en relación con la mayor dosis. La coinoculación solo marcó una leve diferencia en el aprovechamiento en relación con la mayor dosis de fósforo.



Niklitschek, (sin fecha), realizó un trabajo que consistió en el aislamiento e identificación de bacterias solubilizadoras de fósforo de la rizósfera de especies arbustivas silvestres de la décima región (Chile), las cuales fueron inoculadas en trigo de la variedad Pandora, obteniendo buenos resultados cuando además de las bacterias se le adicionó roca fosfórica.

Zamora, Martín, 2006 realizó un trabajo cuyo objetivo fue evaluar el efecto de la inoculación de las semillas de maíz con *Pseudomonas sp.* sobre el rendimiento, encontrando que el promedio de rendimiento de los tratamientos de fertilización fue de 9833 kg/ha y la aplicación del inoculante presentó un incremento de 977 kg/ha (10,5 % superior al no inoculado), independientemente de la aplicación de fosfato diamónico (FDA).

**2.4.4 Ventajas ambientales y económicas del uso de bacterias solubilizadoras de fosfatos.** El empleo de microorganismos biofertilizantes constituye una vía importante para atenuar la escasez de fertilizantes minerales, a la vez que contribuye a disminuir los costos de la producción agrícola (Martínez Viera, 1986), además, estos microorganismos ayudan a mantener el equilibrio biológico, ya que no producen afectaciones al suelo, a la salud y al ambiente en general.

El uso de agroquímicos ecológicos o biológicos se está extendiendo últimamente, aportando a los productores una alternativa a los productos tradicionales. Su uso permite obtener mayores rendimientos de los cultivos, protegiendo el suelo sin contaminarlo, y hace más segura su manipulación. Los fertilizantes biológicos accionan mediante microorganismos que facilitan la fijación del nitrógeno, produciendo fitohormonas de crecimiento vegetal y enzimas solubilizadoras de fósforo. Las enzimas solubilizadoras de fósforo permiten que mayor cantidad de

este nutriente ingrese a la planta generando mayor masa foliar seca y mayor cantidad de granos. (Carrasco, 2006.)

Zamora, 2005 citando a Illmer and Schinner 1992, plantea que existe un gran interés en la utilización de microorganismos solubilizadores de fosfatos los cuales actúan generalmente a nivel de la rizósfera y que el uso de microorganismos permitirá una mayor disponibilidad de fósforo para las plantas y por consiguiente una reducción en la cantidad de fertilizante mineral aplicado al cultivo. Por lo tanto se considera, que la solubilización de distintas rocas fosfatadas y de otras fuentes de fósforo inorgánico por los microorganismos del suelo es una alternativa fundamental para incrementar la cantidad de nutriente disponible para las plantas

Según (Ferraris y otros, 2006) dentro de las principales ventajas del uso de biofertilizante tenemos las siguientes:

- Aceleran el proceso de germinación de las semillas
- Incrementan el vigor de las plantas viables.
- Producen sustancias que actúan sobre la floración, fructificación, rendimiento total y calidad de los frutos.
- Favorecen la solubilización de fosfatos.
- Acelera el crecimiento de plantas y raíces.
- Son un suplemento vitamínico para las plantas en la zona de las raíces.

Los Bioproductos (biofertilizantes, bioestimuladores y bioplaguicidas) son componentes vitales de los sistemas sustentables, ya que constituyen medios económicamente atractivos y ecológicamente aceptables para reducir los insumos externos y mejorar la cantidad y calidad de los recursos internos, mediante la utilización de microorganismos debidamente seleccionados por su alta eficiencia e inocuidad, (Chirinos y otros. 2006).

De acuerdo con Guerrero, (1990), el fosfato diamónico puede generar efectos tóxicos, especialmente cuando se aplica en la siembra, en la proximidad de las semillas, provocando quemazón en los brotes y limitación de la germinación.

Se ha demostrado que en suelos donde predomina el monocultivo y se utiliza gran cantidad de productos químicos, la comunidad microbiana y la macrofauna asociada es significativamente menor que en suelos donde ha predominado una rotación de cultivos (Filser et al. 1995). Las actividades agrícolas que conllevan a la utilización de gran cantidad de insumos sintéticos (fertilizantes, plaguicidas, entre otros), la eliminación de malezas con herbicidas (cultivo en suelos desnudos) y la no rotación de cultivos, pueden afectar nocivamente a la biodiversidad de los procesos ecológicos del suelo (Zelles et al. 1994 y Kennedy y Smith 1995), citados por (Bustamante y otros. 1979.)

Se presenta un importante incremento mundial de los precios de las materias primas necesarias para la producción de los fertilizantes. En el momento actual, 2005, se ha producido un importante encarecimiento de las materias primas esenciales en la producción de fertilizantes, especialmente del gas natural, fosfato roca, potasa, azufre, etc. El precio de gas que paga la industria se han incrementado desde un 50% por ciento, y la roca fosfórica, en un 90% por encima de las cifras pagadas por la misma roca hace escasamente un año.

Las reservas mundiales de fósforo son limitadas, no es difícil prever masivos problemas de sustentabilidad a corto y mediano plazo, ya sea por encarecimiento significativo de la fertilización fosfatada o directamente por agotamiento de los depósitos de este nutriente. (Christiansen, Lucia y otros. 2005)

## **2.5 CONSECUENCIAS AMBIENTALES DEL USO DE AGROQUÍMICOS**

La eutrofización es un proceso natural de envejecimiento de agua estancada o de corriente lenta con exceso de nutrientes y que acumula en el fondo materia vegetal en descomposición.

El Proceso natural y/o antropogénico de eutrofización resulta de la utilización de fosfatos y nitratos como fertilizantes en los cultivos agrícolas, de la materia orgánica de los residuos sólidos, de los detergentes que contienen fosfatos, que son arrastrados o arrojados a los ríos y lagos convirtiéndose en un problema muy grave para las aguas estancadas cerca de los centros urbanos o agrícolas. Esto ocasiona el crecimiento acelerado de algas, la muerte de peces y demás flora y fauna acuática, generando condiciones anaeróbicas.

La eutrofización derivada de los cultivos agrícolas por la adición reciente de fosfatos y nitratos, como resultado de actividades humanas, es también un problema grave para los lagos y embalses someros, en especial los cercanos a los centros urbanos.

La eutrofización puede comenzar a partir de contenidos de fósforo tan bajos como 20 µg/l, por lo que el lixiviado de fosfatos desde el suelo a los sistemas acuáticos supone, a menudo, serias consecuencias sobre los parámetros de los que depende la calidad medioambiental.(Sande, 2005).

La exportación de nutrientes desde los agroecosistemas hasta la red de drenaje es un factor importante en la contaminación difusa de los sistemas acuáticos superficiales, dado que está considerada como fuente de eutrofización.(SANDE, P y otros. 2005)

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 GENERAL**

Evaluar la capacidad solubilizadora de fosfatos, de algunas bacterias aisladas de la rizósfera de plantas de chontaduro en suelo del Municipio de Olaya Herrera – Nariño.

#### **3.2 ESPECÍFICOS**

Identificar bacterias con capacidad solubilizadora de fosfatos aisladas a partir de las rizósferas de plantas de Chontaduro (*Bactris gasipaes*).

Comparar in Vitro y en campo la eficiencia de la solubilización de fosfatos de los microorganismos solubilizadores aislados.

Evaluar en campo, el potencial biofertilizante de los microorganismos solubilizadores de fosfatos aislados, a través de la respuesta de diferentes parámetros de desarrollo en plantas de maíz.



## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 METODOLOGÍA

**4.1.1 Obtención de muestras de suelo rizosférico.** Se recolectaron muestras de la rizósfera de un cultivo de chontaduro (*Bactris gasipaes*, en la vereda de Soledad, municipio de Olaya Herrera, en el Departamento de Nariño (Figura 1). Esta zona se ubica a una altura de 12.5 msnm, presentando una temperatura promedio de 25.5°C, precipitación anual promedio de 3564 mm, humedad relativa del 87%, y con brillo solar 3.56 h/día, equivalente a 1294.4 horas/año (Del Valle, 1994). Una vez colectadas las muestras, se empacaron en bolsas plásticas de color negro y se llevaron al Laboratorio de la Universidad del Pacífico, en la ciudad de Buenaventura.

**4.1.2 Localización del proyecto.** Este ensayo se realizó en el municipio de Buenaventura (Departamento del Valle del Cauca, Colombia); en un terreno asociado a las instalaciones del Campus de la Universidad del Pacífico, ubicadas en la vía al aeropuerto. Geográficamente el área esta localizada entre 3° 50' 38.9" de latitud Norte y a 77° 00' 7.7" de longitud oeste, con una altitud de 20 m.s.n.m., temperatura promedio de 28°C, precipitación aproximada a 8000 mm/año y humedad relativa media anual del 87% (Eslava, 1994). El trabajo de laboratorio se realizó en el Laboratorio de Biología de la sede Intenalco de la misma universidad.



Figura 1. Municipio de Olaya Herrera - Departamento de Nariño.



Figura 2. Toma De muestra de rizósfera de *Bactris gasipaes*

#### 4.1.3 Aislamiento y purificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos.

Para el aislamiento de los microorganismos solubilizadores de fosfatos, se evaluaron inicialmente cuatro medios de cultivo sólidos, reconocidos por su



selectividad hacia ésta capacidad: a) PDA + fosfato tricálcico, b) NBRIY, c) NBRIP y d) PVK, sobre los cuales se sembraron diluciones seriales entre  $10^{-3}$  a  $10^{-6}$ , de cada una de las muestras rizosféricas. Una vez sembradas, las cajas petri se incubaron a temperatura ambiente durante 5 días, al cabo de los cuales se evaluó la efectividad de los medios por inspección visual, medida como número de cepas recuperadas con capacidad solubilizadora. Los resultados permitieron elegir al medio Pikovskaya (PVK) para los ensayos siguientes de aislamiento.



Figura 3. Aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfatos

Para el aislamiento y purificación posteriores sobre medio PVK, se utilizaron para todas las muestras, las diluciones seriales  $10^{-3}$  a  $10^{-6}$ . El medio de cultivo contenía fosfato tricálcico como única fuente de fósforo inorgánico, con un pH final (antes de la esterilización en autoclave) de 6.8 – 7.0, con miras a favorecer el crecimiento bacteriano. Las cajas de petri se incubaron por cinco días a temperatura ambiente (28°C). De las colonias bacterianas obtenidas, se escogieron aquellas que desarrollaron zonas claras a su alrededor. Las mismas se purificaron por resiembra sobre el mismo medio, y bajo las mismas condiciones ambientales, hasta obtener cultivos puros.

**4.1.4 Evaluación de la eficiencia de la capacidad solubilizadora de fosfato *in vitro*.** Para la evaluación la capacidad solubilizadora de fosfatos (C.S.F) de cada uno de los aislamientos bacterianos con respuesta positiva, se utilizó la siguiente relación:

$$\text{C.S.F.} = \frac{\text{Diámetro del halo}}{\text{Diámetro de la colonia}}$$

Considerándose más eficiente aquel aislamiento que presentara una relación C.S.F. mayor. (GÓMEZ-GUIÑÁN. 2001)

**4.1.5 Multiplicación del inóculo de los microorganismos solubilizadores de fosfato.** Los dos aislamientos bacterianos que presentaron mayor capacidad solubilizadora de fosfatos (C.S.F.) (04050204 y 04050203) se multiplicaron por fermentación en medio de cultivo líquido Pikovskaya (PVK). Para la multiplicación de las bacterias solubilizadoras de fosfato se inocularon 3 trozos de agar con colonia de la bacteria, en 200 ml de medio de cultivo. Los trozos con crecimiento bacteriano procedieron de inóculo crecidos durante siete días bajo las condiciones ambientales antes descritas. En total se inocularon 2 frascos erlenmeyer por cada aislamiento.

**4.1.6 Identificación de los aislamientos con capacidad solubilizadora de fosfatos.** La identificación taxonómica de los aislamientos bacterianos obtenidos en la fase previa, se realizó únicamente para los dos aislamientos que presentaron la mayor eficiencia solubilizadora *in vitro* según la razón C.S.F. Para ello se acudió al Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Colombia, donde se encargaron de la identificación filogenética utilizando métodos moleculares, específicamente, la amplificación por PCR del gen rDNA 16S, secuenciación, y posterior análisis bioinformático de la secuencia.

## 4.2 ENSAYO DE INOCULACIÓN EN CAMPO

Para evaluar el desempeño de los dos mejores aislamientos como inoculantes en campo, se diseñó un experimento simple, con maíz como planta indicadora. Los tratamientos fueron los siguientes:

Tratamiento 1: Aislamiento 04050203 con roca fosfórica (B1+RF)

Tratamiento 2: Aislamiento 04050203 sin roca fosfórica (B1)

Tratamiento 3: Aislamiento 04050204 con roca fosfórica (B2+RF)

Tratamiento 4: Aislamiento 04050204 sin roca fosfórica (B2)

Tratamiento 5: Testigo sin inoculante con roca fosfórica (RF)

Tratamiento 6: Testigo sin inoculante sin roca fosfórica (Testigo)

Una vez inoculadas las semillas, la siembra se hizo sobre un terreno de 32.5 m de largo x 16.0 m de ancho para una área total de 520 m<sup>2</sup>, dividiendo el terreno en 18 partes de 5.0 m x 5.0 m cada una y 0.5 m entre subparcelas. La siembra se realizó a 0.8 m entre hileras y a 0.5 m entre plantas, para un subtotal de 77 sitios por subparcela y un total de 1386 plantas.

Las variables de respuesta evaluadas fueron: a) porcentaje de germinación y b) altura de plantas.

En cuanto al terreno, éste presentó las siguientes características: colina baja, con pendiente, vegetación herbácea con algunos árboles, y suelo arcilloso con poca capa vegetal. Las características químicas del suelo se presentan en el anexo 2, según determinaciones del Laboratorio de Servicios Analíticos del Centro de Agricultura Tropical (CIAT).

La roca fosfórica se aplicó de forma localizada en dosis de 75 Kg de P ha<sup>-1</sup>, de acuerdo con los requerimientos de P del cultivo y el resultado del análisis de suelo.

### 4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La distribución de las parcelas experimentales en campo fue en bloques al azar, con 3 repeticiones por tratamiento (anexo 1). El cultivo de maíz inoculado fue el híbrido DAWB 688 (Semillas Valle). Para la inoculación de las semillas, éstas se sumergieron primero en una mezcla de melaza-agua. Una vez retiradas y dejadas en reposo, se sumergieron de nuevo en el cultivo líquido de los aislamientos bacterianos correspondientes, crecidos por siete días.

Para fines de análisis estadístico, se hicieron tres replicas por cada uno de los aislados, y los datos se evaluaron por análisis de varianza y prueba de Duncan para las medias, en los dos casos con un nivel de significancia del 95%. La distribución de los tratamientos se hizo completamente aleatoria.

Tanto para los ensayos *in vitro* como para los ensayos de campo, la existencia o inexistencia de diferencias entre los efectos de los tratamientos se analizó utilizando análisis de varianza, mientras la diferencia entre las medias de los tratamientos se evaluó por la prueba de Duncan. En todos los casos se utilizó un nivel de confianza del 95%.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATOS

Sobre medio PVK se recuperaron aislamientos bacterianos solubilizadores de fosfato, tanto a partir de las muestras de suelo rizosférico de las plantas de chontaduro como de las provenientes de la vegetación nativa. El criterio que se tuvo en cuenta para reconocer en las cajas petri aquellos aislados con la capacidad para solubilizar fosfatos inorgánicos fue el de la formación de un halo transparente alrededor de la colonia, indicativo de la solubilización del fosfato tricálcico (Deubel y Merbach, 2005) (Figura 2).



**Figura 4.** Halo de solubilización formado sobre medio Pikovskaya, para el reconocimiento de bacterias con capacidad solubilizadora de fosfato.

Después de descartar aquellas colonias que perdieran el fenotipo del halo de solubilización en los ciclos sucesivos de resiembra, y también aquellas con características muy similares obtenidas en la misma placa, se obtuvieron 15 aislamientos con un fenotipo de solubilización estable y morfológicamente diferentes (morfotipos), 9 a partir del suelo rizosférico del chontaduro, y 6 de la muestra de plantas nativas, las cuales se utilizaron para la evaluación de la eficiencia de solubilización in vitro.

El haber encontrado morfotipos bacterianos diferentes asociados a la rizosfera de chontaduro (*Bactris gasipaes*) y de la vegetación nativa, corrobora lo expresado por Gómez-Guinan (2004) y Rodríguez y Fraga. (1999), cuando plantean la presencia ubicua de los microorganismos en la rizosfera de las plantas, la cual es mayor en términos cuantitativos cuando los suelos son de baja fertilidad. Por otra parte, el hecho de que las muestras de rizosfera fueran obtenidas de cultivos y plantas sin presencia de fertilizantes de síntesis química, eleva la probabilidad de encontrar muchos de estos microorganismos; ya que según Filser et al. (1995), citando a Zelles et al., 1994 plantea que cuando se usa gran cantidad de agroquímicos, la comunidad microbiana se ve afectada significativamente disminuyendo sus poblaciones al verse afectados nocivamente los procesos ecológicos del suelo (Zelles et al., 1994 y Kennedy y Smith, 1995).

Muchos investigadores han realizado múltiples aislamientos, tanto de hongos como de bacterias solubilizadoras de fosfatos, utilizando diferentes medios de cultivo y provenientes de diferentes suelos y plantas e incluso de compost (Cheng et al., 2004; Chen et al., 2005; Peix et al., 2003; Fernández y otros, 2004; Oviedo e Iglesias, 2005; Niklitschek, sin fecha; Bobadilla Henao y Vanegas, 2008), sin embargo, en la literatura consultada no se encuentran referencias a aislamientos de bacterias solubilizadoras de fosfatos provenientes de rizósfera de *Bactris gasipaes* de la Costa del Pacífico colombiano, aunque existe un trabajo sobre

Micorrizas vesículo-arbuscular y otro sobre hongos micorrízicos asociadas a la rizósfera de chontaduro en el municipio de Buenaventura – Valle del Cauca (Molineros. 2007 y Riascos, Ortiz. 2007). Este es en consecuencia, el primer reporte relacionado con este grupo funcional asociado a la rizosfera de chontaduro y de vegetación nativa en la zona rural del municipio de Olaya Herrera, en el pacífico colombiano.

## **5.2 EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LA CAPACIDAD SOLUBILIZADORA DE FOSFATOS *in vitro*.**

La capacidad solubilizadora de fosfato tricálcico por las bacterias aisladas se comprobó visualmente de acuerdo a la metodología planteada por Nautiyal et al. (2002), cuando estas se sembraron sobre medio sólido Pikovskaya (PVK) en las cajas petri durante 8 días, las cuales presentaron un halo promedio de sulubilización de 12.9 mm. Este resultado se encuentra por encima del rango encontrado por Nautiyal (1999), citado por Fernández y otros, 2005, en cepas bacterianas de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* en cultivos de 14 días los cuales midieron 2 mm, 6 mm y 7 mm.

El análisis de varianza demostró que hubo diferencias estadísticas significativas para la eficiencia de solubilización entre los 15 aislamientos evaluados (tabla 1, figura 3), siendo el aislado 04050204 el que mayor eficiencia presentó, con una eficiencia, medida por la razón ESF, de  $3.4798 \pm .49$ . El agrupamiento hecho por la prueba de Duncan para las eficacias relativas ubicó éste aislamiento junto con el 04050203, con una media ESF de  $3.0921 \pm 0.63$ . En general, la prueba de Duncan identificó seis grupos según su eficiencia solubilizadora (tabla 2)

Según Puerta García (sin fecha), un aspecto importante al momento de aislar microorganismos solubilizadores de fosfato, es que ésta característica muestra

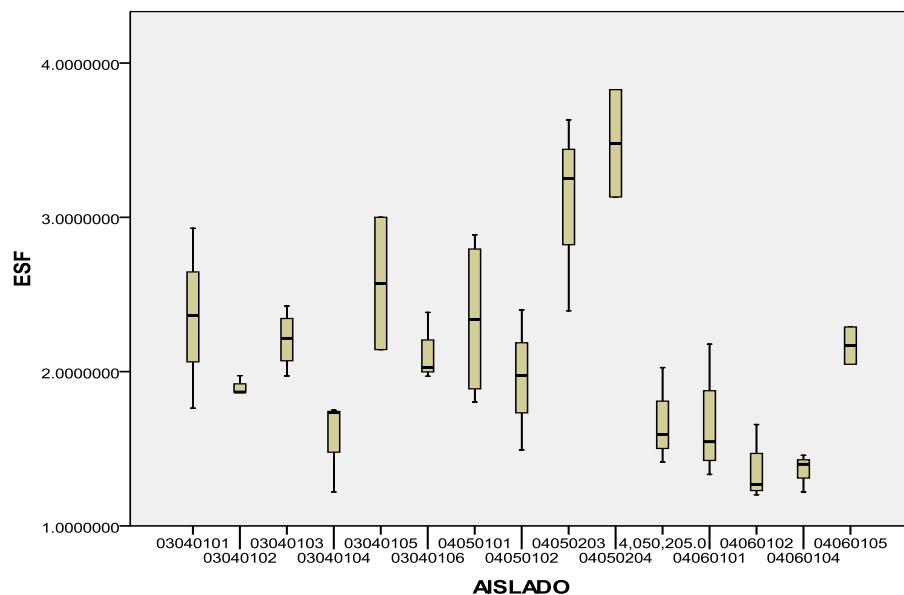
dependencia de la procedencia ecológica, es decir, los microorganismos que proceden del rizoplasma muestran la mayor capacidad, los que provienen de la rizósfera muestran capacidad media, y los que menos capacidad poseen son los aislados en el suelo no rizosférico.

**Tabla 1. Análisis de varianza para ESF de los aislamientos**

Variable dependiente: ESF

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	13.884 <sup>a</sup>	14	.992	6.766	.000
Intersección AISLADO	195.733	1	195.733	1335.414	.000
Error	4.544	31	.147		
Total	213.513	46			
Total corregida	18.428	45			

a. R cuadrado = ,753 (R cuadrado corregida = ,642)



**Figura 5.** Diagrama de barras para la ESF de los 15 aislamientos bacterianos.



**Tabla 2. Agrupamiento de los aislados bacterianos según su ESF, hecho por la prueba de Duncan**

AISLADO	N	Subconjunto					
		1	2	3	4	5	6
04060102	4	1.349354840					
04060104	3	1.359160613					
03040104	3	1.568435078	1.568435078				
04060101	4	1.650226051	1.650226051	1.650226051			
04050205	3	1.676756119	1.676756119	1.676756119			
03040102	3	1.902720840	1.902720840	1.902720840	1.902720840		
04050102	3	1.955249234	1.955249234	1.955249234	1.955249234		
03040106	3		2.126641760	2.126641760	2.126641760		
04060105	2		2.168387838	2.168387838	2.168387838		
03040103	4		2.207224763	2.207224763	2.207224763		
04050101	4			2.341494098	2.341494098		
03040101	3			2.351688312	2.351688312		
03040105	2				2.571428572	2.571428572	
04050203	3					3.092105263	3.092105263
04050204	2						3.479830840
Sig.		.106	.092	.067	.078	.111	.232

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,147.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,903

b. Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.

c. Alfa = ,05.

Otra cuestión clave es que los microorganismos pueden llegar a perder esa capacidad tras varios pases de cultivos en laboratorio, e incluso cuando son pasados de medio sólido de agar a medio líquido, y en consideración de ello, las lecturas de solubilización en éste estudio se hicieron después de al menos 10 subcultivos, durante los cuales no se observó pérdida del fenotipo solubilizador.

En el mismo sentido, Nautiyal (1999), citado por Fernández y otros 2005, afirma que el halo de solubilización como indicador de la capacidad que tiene la bacteria de solubilizar fosfatos no es del todo confiable; en cuanto se han encontrado microorganismos que tienen la propiedad de solubilizar varias fuentes de fosfato inorgánico y no producen zonas de halo en las cajas petri con el medio de cultivo. Para contrarrestar ésta posibilidad, Deubel y Merbach (2005) recomiendan establecer la disminución del pH, relacionada con la solubilización, mediante la incorporación en el medio de cultivo de algún indicador de pH. A pesar de las objeciones anteriores, la técnica es adecuada cuando se trata de investigaciones primarias de biodiversidad, aspecto que primó en el presente estudio.

En relación con el mecanismo que explica la solubilización de fosfatos, hecha visible por el halo formado alrededor del crecimiento de la colonia, varios autores señalan que la solubilización se debe principalmente a la producción de ácidos orgánicos que quelatan los cationes unidos a los fosfatos, haciendo a estos últimos solubles y por tanto, disponibles.

Para Alexander (1980), el principal mecanismo por el cual los compuestos fosfatados son movilizados, es la disminución del pH del medio por la liberación de ácidos orgánicos. Por su parte, Rodríguez y Fraga (1999), plantean otros posibles mecanismos de solubilización por parte de las bacterias que incluyen: eliminación de protones hacia al exterior de la célula y/o la producción de ácidos inorgánicos como el ácido sulfhídrico, el ácido nítrico o el ácido carbónico.

Debido al alcance del presente proyecto, es imposible definir cuál de estos mecanismos fue el responsable del efecto de solubilización visto, no obstante, las causas podrían ser múltiples. En primer lugar, la glucosa presente en el medio favorecería la producción de ácidos orgánicos a través de las rutas primarias de la glucólisis, mientras la presencia de sales de amonio como fuentes de nitrógeno podría coadyuvar en la secreción de protones y consecuente acidificación del medio.

Aun cuando el ensayo de solubilización en cajas de petri se diseñó originalmente, y se ha referenciado normalmente para la visualización directa de la solubilización de fosfatos inorgánicos, por ejemplo, en el caso del medio PVK del fosfato tribásico, la inclusión de extracto de levadura en el medio podría también inducir la secreción por parte de los microorganismos de fosfatasas, capaces de hacer disponible el fósforo orgánico que en forma de esteres está presente en algunos componentes del extracto, por ejemplo de los ácidos nucleicos (Bobadillo Henao y Rincón Vanegas, 2008).

Por otra parte, el medio PVK incluye glucosa como fuente de carbono, y de ésta manera, la siembra favorecería el crecimiento de microorganismos que utilicen eficientemente los carbohidratos (Kucey, 1983), para efectos del estudio ésta es una variable importante, pues las muestras de suelo se obtuvieron de la rizosfera de las plantas, zona comparativamente rica en carbohidratos, aportados en forma de exudados por las plantas.

En el presente estudio, el diámetro de las colonias osciló entre 5.0 y 15.5 mm; mientras el halo de solubilización osciló entre 5.0 y 19.4 mm. El índice promedio de solubilización de fosfatos estuvo entre 1.6 y 3.1. Es probable que éstos valores evidencien diferencias en la capacidad solubilizadora de los distintos aislados, sin embargo, dado que la prueba de placas de petri se considera de naturaleza

cualitativa, no puede establecerse como una conclusión. Para saber si este es el caso o no, estudios posteriores deberían hacer las determinaciones midiendo la cantidad de fósforo solubilizado por cada una de las cepas a través de técnicas espectrofotométricas.

### **5.3 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS**

La identificación se hizo a través del análisis comparativo de las secuencias DNAr 16S en el GenBank en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Colombia, identificándola como un microorganismo del género *Burkholderia spp.*

### **5.4 ENSAYOS DE INOCULACIÓN DE LAS CEPAS EN CAMPO**

Ninguno de los dos aislamientos utilizados como inoculantes de las semillas de maíz produjo efectos estadísticamente diferentes sobre los parámetros de crecimiento de la planta evaluados, es decir, ni sobre el porcentaje de germinación, ni tampoco sobre la altura de la planta, evaluada a los 27 y 57 días (tablas 3 a 6) después de la siembra.

**Tabla 3. Análisis de varianza para altura de planta a los 27 días, en un cultivo de maíz**

Variable dependiente: AP27

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo	184.474 <sup>a</sup>	8	23.059	58.892	.000
TRATAMIENTO	2.749	5	.550	1.404	.302
BLOQUE	.591	2	.296	.755	.495
Error	3.916	10	.392		
Total	188.390	18			

a. R cuadrado = ,979 (R cuadrado corregida = ,963)

**Tabla 4. Agrupamiento para la variable altura de plantas a los 27 días según la prueba de Duncan**

TRATAMIENTO	N	Subconjunto
		1
Duncan <sup>a,b</sup> B1+RF	3	2.7667
B1	3	2.9000
B2	3	2.9667
TESTIGO	3	2.9667
RF	3	3.7000
B2+RF	3	3.7333
Sig.		.115

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,392.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000

**Tabla 4. Agrupamiento para la variable altura de plantas a los 27 días según la prueba de Duncan**

TRATAMIENTO	N	Subconjunto
		1
Duncan <sup>a,b</sup> B1+RF	3	2.7667
B1	3	2.9000
B2	3	2.9667
TESTIGO	3	2.9667
RF	3	3.7000
B2+RF	3	3.7333
Sig.		.115

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) =,392.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000

b. Alfa = ,05.

**Tabla 5. Análisis de varianza para altura de planta a los 57 días, en un cultivo de maíz**

Variable dependiente: AP57

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo	5046.578 <sup>a</sup>	8	630.822	33.672	.000
TRATAMIENTO	177.718	5	35.544	1.897	.182
BLOQUE	73.391	2	36.696	1.959	.192
Error	187.342	10	18.734		
Total	5233.920	18			

a. R cuadrado = ,964 (R cuadrado corregida = ,936)

**Tabla 6. Agrupamiento para la variable altura de plantas a los 57 días según la prueba de Duncan**

TRATAMIENTO	N	Subconjunto	
		1	2
Duncan <sup>a,,b</sup> B1	3	13.5000	
B1+RF	3	14.2333	
TESTIGO	3	14.8667	14.8667
B2	3	15.6333	15.6333
RF	3	16.7333	16.7333
B2+RF	3		22.9667
Sig.		.417	.058

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

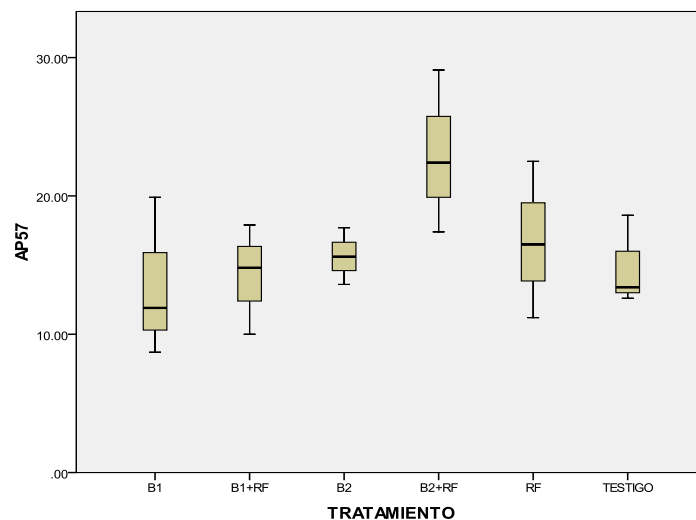
El término de error es la media cuadrática (Error) = 18,734.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000

b. Alfa = ,05.

En cuanto a la germinación de la semilla, se logró un porcentaje de germinación del 100% para todos los tratamientos, incluido el testigo, entre 7 y 9 días después de sembradas, lo cual está en correspondencia con el potencial genético y calidad de la semilla utilizada, y pese a las condiciones adversas del suelo.

Cuando se comparan la altura media de las plantas obtenidas por los diferentes tratamientos (tablas 4 y 6 y figuras 4 y 5), se hace evidente que tanto a los 27 como a los 57 días de la siembra, el tratamiento que produjo el mayor valor absoluto fue aquel en el que la semilla recibió roca fosfórica y se trató con el aislamiento bacteriano 04050204, aún cuando tal efecto no es estadísticamente diferente del producido por los demás tratamientos.



**Figura 6.** Diagrama de barras para altura de planta obtenida por la aplicación de los diferentes tratamientos

Lo que no se hace evidente por el simple análisis estadístico es que además, las plantas tratadas con el aislamiento 04050204 más la roca fosfórica, presentaron también un mayor vigor, un mejor crecimiento radical y lograron un mayor tiempo de sobrevivencia después de los 57 días. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que exista un efecto de sinergia que se traduce en un mejor crecimiento



de las plantas a la acción combinada de la bacteria solubilizadora de fosfato y la aplicación de la roca fosfórica.



**Figura 7.** Planta de maíz de 27 días tratada con roca fosfórica + el aislado bacteriano 04050204.



**Figura 8.** Distribución en campo de los tratamientos de inoculación. En primer plano, plantas de 27 días, tratadas con roca fosfórica más el aislado bacteriano 04050204.

Aunque por otra parte, las plantas tratadas con la roca fosfórica sola o en combinación con las bacterias solubilizadoras alcanzaron el estado de floración, fue evidente que ninguna expresó su potencial genético de manera adecuada, lo cual se explica por la no aplicación de fertilizantes que permitieran corregir las deficiencias de nutrientes evidentes en el análisis de suelos (anexo 2). Para los

híbridos de maíz como el utilizado en el presente estudio, (Bernal y otros. 2004) señalan requerimientos en cuanto fertilización de: 100-120 kg de N/ha, 90 kg de  $P_2O_5$  /ha, 90 kg de  $K_2O$ /ha y aplicaciones de boro, cobre y zinc (0.5, 0.1 y 6 kg/ha, respectivamente).

Las subparcelas correspondiente a los testigos (con y sin roca fosfórica) y las que contenían la bacteria sin roca fosfórica fueron las que presentaron los mayores síntomas de deficiencia de nutrientes. Después de cincuenta y siete días empezaron ha marchitarse hasta morir.

Aunque en el presente trabajo no fue posible evaluar el rendimiento del cultivo, el International Plant Nutrition Institute (2008), plantea que el lograr un buen rendimiento del cultivo de maíz requiere que el suelo este bien suplido de elementos nutritivos. Para esto es necesario utilizar un buen programa de fertilización balanceada. Es decir, se requiere Nitrógeno (N) y Fósforo (P) además de una abundante cantidad de Potasio (K), Magnesio (Mg) y Azufre (S), para poder asegurar que los nutrientes se encuentren en tiempo y forma en el suelo y para poder ser aprovechados por las plantas en el momento adecuado.

Los resultados confirman además, que el fósforo es uno de los principales nutrientes requeridos por las plantas (Pradhan y Sukia, 2005) y que en el trópico es una limitante (Djbagyaraj et al., 2000; Gyaneshwar et al., 2002) importante, especialmente en los suelos ácidos del trópico, para la cual el uso de roca fosfórica y de bacterias solubilizadoras podrían constituir alternativas viables y sostenibles de solución.

El hecho de que los resultados estadísticos no muestren diferencias significativas con la inoculación de bacterias y la aplicación de roca fosfórica, tampoco implica negar la existencia de estos microorganismos en la rizosfera de las plantas de

chontaduro y otras de la región, con capacidad para solubilizar fosfatos inorgánicos, los cuales pueden ayudar a incrementar la disponibilidad del fósforo acumulado en el suelo haciéndolo soluble para las plantas (Gyaneshwar et al., 2002). En este sentido, Rachewad et al. (1992) citado por Bagyaraj et al., (2000), plantea que algunos estudios han mostrado respuestas e incrementos en la toma del fósforo inorgánico cuando se le ha adicionado al cultivo roca fosfórica combinada con microorganismos del suelo.

Por otro lado, la roca fosfórica es una fuente importante de fósforo y una alternativa de bajo costo comparado con otras fuentes; sin embargo, esta es una fuente poco soluble, por lo que se recomienda aplicarla al suelo mucho antes del establecimiento del cultivo. Al ser una fuente de fósforo poco soluble, se han ideado varios métodos para incrementar su disponibilidad. Dentro de esos métodos se encuentra la acidulación parcial con pequeñas cantidades de  $H_2SO_4$  o con  $H_3PO_4$ . (Vassilev et al., 2001) y la aplicación conjunta de microorganismos solubilizadores de fosfato, en una práctica conocida como bioacidulación.

Conviene ahora señalar los posibles mecanismos por los cuales la roca fosfórica mejoró el desarrollo y crecimiento de las plantas en las primeras etapas.

De manera general se ha aceptado que el principal mecanismo de la solubilización de minerales fosfatados es la síntesis de ácidos orgánicos realizada por varios microorganismos del suelo (Rodríguez y Fraga, 1999). El principal ácido orgánico producido por *Pseudomonas* sp, *Erwinia herbícola*, *Pseudomonas cepacia* y *Burkholderia cepacia*, es el ácido glucónico. Además de los ácidos orgánicos, realizan la producción fisiológica de protones y la producción y excreción de fosfatasas ácidas para la mineralización del fósforo orgánico. La acción de los ácidos orgánicos en la solubilización de minerales puede atribuirse a que

disminuyen el pH y, más aún, a la formación de complejos estables con Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> y Al<sup>3+</sup>.(Paredes y otros, 2009).

## 5.5 Género *Burkholderia* spp

### 5.5.1 Taxonomía

Reino: Bacteria

Phylum: *Proteobacteria*;

Clase: *Betaproteobacteria*;

Orden: *Burkholderiales*;

Familia: *Burkholderiaceae*;

Género: *Burkholderia*;

Especie: *Burkholderia cepacia*.

El género *Burkholderia* es muy diverso y dentro de este se encuentran especies que son comunes no solo en plantas y suelos sino que también son simbioses de insectos y patógenos humanos. (Los miembros del género *Burkholderia* poseen un genoma complejo, formado por varios replicones, que le proporciona una extraordinaria versatilidad metabólica y capacidad de adaptación a nuevos ambientes. Se encuentran frecuentemente en ambientes acuáticos, suelos y en relaciones simbióticas con otros microorganismos, animales y plantas.( Ramette, 2005) citado por Araque y otros, 2008.

Entre sus mecanismos de acción se destacan el aumento de la toma de agua y nutrientes por la planta, la fitohormonas y el biocontrol de patógenos como *Fusarium* sp. (Toledo – Hernández y otros, 2002). *Capnodium* spp, debido a la producción de sideróforos (Velazquez, 1999) y sustancias antifúngicas. citados por (Vega – Hernández y otros. 2007) Coenye and Vandamme, 2003).

Presenta diversas características entre las que se pueden resaltar: Gram negativos, móviles, aerobios, quimiorganotrofos. Gran versatilidad metabólica, Capacidad para degradar varios compuestos tóxicos, la producción de sideróforos, (Alexander y Zuberer, 1991; Barelman et al., 1996), polihidroxitirato, bacteriocinas y antibióticos, (Picard et al., 2000) con posibilidad para aplicaciones en bioremediación; además de la actividad promotora de crecimiento vegetal (De Salmone et al., 2001) (Tran Van et al., 2000). ligada a la solubilización de fosfato, la producción de ácido indol acético, la fijación de nitrógeno y antagonismo contra fitopatógenos. (Palleroni & Holmes 1981), (Nandakumar et al., 2001). Citados por Hernández y otros. 2002).

**5.5.2 *Burkholderia cepacia*.** *Burkholderia cepacia* es una bacteria Gram – negativa que originalmente fue descrita como una fitopatógeno de la cebolla (Burkholder, 1950). Esta bacteria originalmente fue clasificada en el género *Pseudomonas* y en 1992 fue trasladada al género *Burkholderia* con base en el análisis de la secuencia de rRNA. (Yabuuchi et al., 1992).

*Burkholderia cepacia* es un bacilo curvo o recto, con los extremos romos. El tamaño de las células es de 0,5 – 1 x 1,5 – 4 µm. Móviles por la presencia de varios flagelos. No producen ningún tipo de estructura de resistencia o latencia. Producen gránulos intracelulares de poli-β-hidroxitirato, que cumplen el papel de material de reserva de carbono. Poseen uno o más tipos de pili en distribución peritrica, que facilitan su adherencia a las superficies mucosas epiteliales. La pigmentación no es una característica universal de esta especie, algunas cepas no son pigmentadas y otras producen pigmentos de fenazina con una gran variedad de colores (amarillo, rojo, marrón, violeta y púrpura). Estos pigmentos son hidrosolubles por lo que se difunden al medio de cultivo. Este microorganismo puede utilizar una gran variedad de compuestos orgánicos como fuente de carbono y de energía. (Palleroni & Holmes 1981).

*Burkholderia cepacia* es un organismo muy versátil que es realmente considerado como amigo y enemigo de los seres humanos; Se trata de un microorganismo ubicuo con el suelo, agua, animales, plantas y seres humanos como nichos. Aunque en un principio conocido como un patógeno de las plantas, es ahora reconocida como un organismo más útil para la protección de plantas y la promoción del crecimiento vegetal. (Peter AR Vandamme. 2005)

*Burkholderia cepacia* se describe como una bacteria muy atractiva y de considerable atención por su gran diversidad genética, apareciendo como patógeno de plantas, saprofítico, biorremediador, estimulador del crecimiento vegetal y biocontrolador de diferentes cultivos de interés agrícola.

La diversidad de hábitat en los que ha sido descrito este microorganismo y la caracterización de las variadas fuentes de compuestos que es capaz de catabolizar revela la gran versatilidad metabólica que posee. No hay duda que en la naturaleza esta propiedad lo involucra como un agente importante en la mineralización de la materia orgánica. Se ha demostrado que las cepas de esta especie, obtenidas de la rizósfera de plantas, producen ácido indol acético y generar una variedad de antibióticos con actividad frente a fitopatógenos. Adicionalmente, algunas cepas, que provienen de suelos ácidos, presentan actividad solubilizadora de fosfato de calcio en medio de cultivo (Useche, 2003).

## CONCLUSIONES

El medio de cultivo y la técnica utilizada permitió aislar dos cepas bacterianas de rizósfera de chontaduro cuya característica corresponde a bacilo Gram. negativos con capacidad solubilizadora de fosfato *in vitro* asociadas a la rizosfera de planta de chontaduro.

Las cepas bacterianas aisladas mostraron mayor eficiencia en la solubilización de fosfato tribásico (*in vitro*) que con la roca fosfórica en campo.

La utilización de roca fosfórica para ser solubilizada por la bacteria aparentemente no produjo un resultado positivo bajo las condiciones de campo en las que se llevó a cabo el ensayo con plantas de maíz, al no reflejar diferencias significativas especialmente en la altura de las plantas.

La bacteria aislada corresponde al género *Burkholderia*, un género con potencial agrícola y biotecnológico debido a sus propiedades como estimulador del crecimiento vegetal, biocontrolador de diferentes plagas y solubilizador de fosfatos.

## BIBLIOGRAFÍA

ACUÑA, Oscar y otros. 2006. LA IMPORTANCIA DE LOS MICROORGANISMOS EN LA CALIDAD Y SALUD DE SUELOS. Laboratorio de Bioquímica, Centro de Investigaciones Agronómicas – Universidad de Costa Rica.

ARAQUE y otros. 2008. Identificación bioquímica y PCR especie-específica de cepas de *Burkholderia cepacia* de origen hospitalario y ambiental en Venezuela. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología.

ARZUAGA, SILVIA A. Y OTROS. 2005. Fósforo total, fósforo orgánico y fosfatasa ácida, en Entisoles, Alfisoles y Vertisoles de Corrientes con diferentes usos agrícolas. UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Argentina S. A.

BARDGETT, RICHARD. 2005. The biology of soil. A community an ecosystem approach. Oxford University Press.

BARROTI G. y NAHAS E. 2003. EL FÓSFORO Y EL ENCALADO SOBRE LAS FOSFATASAS Y LA PRODUCCIÓN DE *Braquiaria ruzizensis* Y *Cajanus cajan*

BERNAL, R y otros. 2004. Sin fecha. Híbridos de maíz amarillo adaptados a suelos ácidos de la altillanura plana colombiana. CORPOICA.

BOBADILLO HENAO, Catalina y RINCÓN VANEGAS, Sandra Carolina. 2008. Aislamiento de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza. Bogotá. D.C.

BONO, A, BARRACO, M. 2005. Momentos y formas de aplicación de fósforo en maíz bajo siembra directa: en el oeste y noroeste bonaerense. EEA INTA Anguil.



BURBANO O., H. 1989. El suelo: una visión sobre sus componentes bioorgánicos. 1ª edición. Universidad de Nariño. Pasto. 447p.

BUSTAMANTE y otros. 1979. Biodiversidad como fundamento en la exclusión y manejo de plagas. <http://web.catie.ac.cr/informacion/rmip/rmip56/art1-b.htm>.

CANTE, M. J. y otros. INFLUENCIA DE LOS INOCULANTES BACTERIANOS COMO ALTERNATIVA AGROECOLOGICA PARA PRODUCIR TRIGO DE CALIDAD. Instituto de Ciencias Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.  
CARRASCO, 2006. Beneficios del uso de agroquímicos biológicos. [www.atinabiotec.cl/content/view/221/Beneficios-del-uso-de-agroquimicos-biologicos.html](http://www.atinabiotec.cl/content/view/221/Beneficios-del-uso-de-agroquimicos-biologicos.html).

CARRILLO, LEONOR. 2003. Microbiología Agrícola. Capítulo 3

CHEN, Y.P. et al., 2005. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied soil ecology*. 34 pp 33 – 41.

CHIRINOS Y OTROS, 2006. Uso de Insumos Biológicos como Alternativa para la Agricultura Sostenible en la Zona Sur del Estado Anzoátegui. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas El Tigre.

CHRISTIANSEN y otros, 2005. Recuperando la biofertilidad del suelo. En [http://www.fundacionypf.org/educacion/04/Monograf%EDa\\_de\\_Ciencias\\_Naturales\\_2005bis.pdf](http://www.fundacionypf.org/educacion/04/Monograf%EDa_de_Ciencias_Naturales_2005bis.pdf)

COVACEVICH, Fernanda. 2005. Formas De Colocación De Fósforo Sobre El Crecimiento y La Micorrización Espontánea Del Cultivo De Trigo. *CI. SUELO (ARGENTINA)* - 23 (1) 39-45, 2005. <http://www.scielo.org.ar>

CRACOGNA, Mariano F. 2003. Bacterias Solubilizadoras. Universidad Nacional Del Nordeste. Argentina. <http://www1.unne.edu.ar/cyt/2003/>.

CRACOGNA Y OTROS. 2003. Utilización de *Azospirillum* y bacterias solubilizadoras de fósforo en el cultivo de trigo. UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Argentina S. A.

DEL VALLE, Jorge I. (1996). El medio biofísico de los Bosques de Guandal. En: Renacientes del Guandal. "Grupos negros de los ríos Satinga y Sanquianga. En PROYECTO BIOPACÍFICO – UNIVERSIDAD NACIONAL. 1996.

DEUBEL, Annette, Merbach, Wolfgang. 2005. Influence of Microorganisms on Phosphorus bioavailability. Soil Biology, Volúmen 3.

DE VIZCARRONDO, Milagros y de Gamboa Sofía Gutiérrez. 2002. IDENTIFICACIÓN. MICROBIANA. Identificación microbiana mediante métodos basados en sistema de utilización de sustratos, inmunoensayos y detección molecular. En [http://www.ucv.ve/Farmacia/Micro\\_web/Catedras02/tema12.pdf](http://www.ucv.ve/Farmacia/Micro_web/Catedras02/tema12.pdf).

DÍAZ MEDINA, A. 2003. Efecto de la aplicación de *Azotobacter chroococcum* y bacterias solubilizadoras de fósforo sobre el desarrollo de posturas de cafeto (*Coffea arabica* L.).

ESLAVA, J, 1994 Climatología del Pacífico Colombiano. Academia Colombiana de Ciencias Geográficas. Colección Erastostenes 1 ed. Gente Nueva. Bogotá

DJBAGYARAJ et al., 2000. Mineral phosphate solubilization: Agronomic implications, mechanism and molecular genetics. Proc. Indian natn. Sci Acad. (PINSAs) B66 Nos 2&3 pp 69-82.

FERRARIS, G. y COURETOT, Lucrecia. 2006. Evaluación de la utilización de bacterias solubilizadoras de fósforo (*Pseudomonas* spp) en Trigo. En <http://www.elsitioagricola.com/articulos/ferraris/Evaluacion%20de%20la%20Utilizacion%20de%20Bacterias%20Solubilizadoras%20de%20fosforo%20en%20trigo.asp>.

FERNÁNDEZ, L. A. y otros (2005) Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. Cienc. Suelo v.23 n.1. Buenos Aires. En [www.scielo.org.ar](http://www.scielo.org.ar)

FERNÁNDEZ, LETICIA ANDREA y otros. 2006. BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO INORGÁNICO AISLADAS DE SUELOS DE LA REGIÓN SOJERA. Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur, 8000 Bahía Blanca.

FONTÚRBEL Rada, F. 2005. Indicadores físicoquímicos de y biológicos del proceso de eutrofización de los lagos Titikaka (Bolivia. Departamento Académico de Biología. Universidad Nacional Agraria, La Molina. Lima – Perú.

FUENTES B., JORQUERA, M y MORA M. L. Bacterias solubilizadoras de fósforo orgánico y actividad fosfatasa asociadas a la degradación de excretas de bovino lechero. En [http://www.ufro.cl/rnndoc/resumen\\_fuentes.doc](http://www.ufro.cl/rnndoc/resumen_fuentes.doc).

GODOY y otros, 2007. Clasificación automática del Chontaduro (*Bactris gassipaes*) para su aplicación en conserva, mermelada y harinas. Facultad de Ciencias Agropecuarias 138 Vol 5 No. 2 Agosto 2007.

GOMEZ-GUINAN, Y. Actividad de las fosfatasa ácidas y alcalinas (extracelulares e intracelulares) en hongos de la rizosfera de *Arachis hypogaea* (Papilionaceae). *Rev. biol. trop.* [online]. mar. 2004, vol.52, no.1 [citado 08 Enero 2007], p.287-295. Disponible en la World Wide Web: <<http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?>

GONZÁLEZ ANTA, G. Informes técnicos. El fósforo y los microorganismos del suelo. Rizobacter Argentina S.A. [www.rizobacter.com.ar](http://www.rizobacter.com.ar)

GONZÁLEZ VALDEZ. 2002. Efecto de la fertilización con n-p-k-ca en palto (*persea americana* mill.) cv. Hass sobre su desarrollo, productividad y postcosecha.

GUERRERO, RIASCOS, M.,. 1990. La acidez del suelo: su naturaleza, sus implicaciones y su manejo. En: Fundamentos técnicos para la fertilización de cultivos. Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo. Memorias. Bogotá. pp 248 - 278.

GYANESHWAR, P. et al., 2002. Role soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and soil* 245: 83 – 93.

HERNANDEZ, A.C. y otros. 1996. El municipio Olaya Herrera: una aproximación a la realidad socioambiental. Convenio CLEBA - Parroquia El Señor de la Misericordia. Medellín. pp. 9-12.

HERNANDEZ DÍAZ, María Isabel, 2001). Ensayo. La nutrición mineral y biofertilización en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill).

HERNANDEZ-VALENCIA, Ismael y MONTSERRAT, Bautis. 2005. Cambios en el contenido de fósforo en el suelo superficial por la conversión de sabanas en pinares. *Bioagro*. [online]. abr., vol.17, no.2, p.69-78. Disponible en la World Wide Web:<[http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S131633612005000200001&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S131633612005000200001&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 1316-3361.

[http://www.rizobacter.com.ar/home/es/informes\\_tecnicos/index.php?subaction=showfull&id=1152900719&archive=&start from=&ucat=3&](http://www.rizobacter.com.ar/home/es/informes_tecnicos/index.php?subaction=showfull&id=1152900719&archive=&start from=&ucat=3&)

HERNÁNDEZ, Marta y otros. 1994. Utilización de los microorganismos biofertilizantes en los cultivos tropicales.

HOLGUÍN, Gina et al. 2003. PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO EN PLANTAS POR BACTERIAS DE LA RIZOSFERA PLANT GROWTH PROMOTION BY RHIZOSPHERE BACTERIA

IGUAL, José M. et al., 2001. Phosphate solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. INRA. EDP. Scienza. pp. 561-568.

ILLMER, P. et al., 1995. Solubilization of inorganic calcium phosphates- solubilization mechanisms. Soil Biology. Biochem. No.3 pp 257-263.

JAYANDRA KUMAR, Johri, et al (1999). Occurrence of salt, pH and temperature – tolerant, phosphate – solubilizing bacteria in alkaline soils. Current Microbiology Vol. 39. pp 89-93.

KUCEY, R M N. 1983. Phosphate solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. Can. J. Soil Sci. 63:671-678.

LEÓN, L. A., 2001. Evaluación de la fertilidad del suelo. En: Fertilidad de suelos. Diagnóstico y control. Sociedad colombiana de la ciencia del suelo. 2da. Edición. Edit. Guadalupe LTDA. Bogotá D.C. pp. 155-186.

Memorias del X Congreso de la Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo. Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo, Medellín, 189 p.

MOLINEROS, HURTADO F. 2007. Reconocimiento de Hongos Micorrizicos Arbusculares (HMA) nativos en palmas de Chontaduro (*Bactris gassipaes* H.B.K.) presentes en agroecosistemas localizados en los corregimientos de Citronela y Zabaletas municipio de Buenaventura (Valle del Cauca).

MONTEALEGRE A. Jaime R. 1992. Bacterias. En: <http://agronomia.uchile.cl/webcursos/microbiologiagranel/pagina%20microbiologia1/word/Bacterias.rtf>.

MORENO-SARMIENTO, N y otros. (sin fecha). Biofertilizantes para la Agricultura en Colombia *Grupo de Microbiología Agrícola, Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia*. En Biofertilizantes en Iberoamérica: Una visión técnica, Científica y empresarial. Departamento de Microbiología del Suelo y

Sistemas Simbióticos. Estación Experimental del Zaidin, CSIC. Profesor Albareda 1E-18008. Granada, España.

MURREL, T.S. 2003. Transformaciones de los Nutrientes en el Suelo. <http://www.ppi-ppic.org>.

NIKLITSCHKEK, Marta (sin fecha). AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FÓSFORO DE LA RIZÓSFERA DE ESPECIES ARBUSTIVAS SILVESTRES DE LA DÉCIMA REGIÓN. Instituto de Producción y Sanidad Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile.

OLIVARES, PASCUAL, José. (2006) Las plantas no crecen solas. En <http://www.eez.csic.es/~olivares/prensa/elpais19-06-01.htm>

OPAZO, A. José D. 1990. Fertilidad del Suelo. <http://mazinger.sissib.uchile.cl>.

OVIEDO, Mirian E. - IGLESIAS, María C. 2005. Bacterias Solubilizadoras de Fosfatos. <http://www.unne.edu.ar>.

OSORIO, N.W and J.C. Pérez. 2001. Microbial solubilization of phosphates in soils. A review. En: Pérez, J.C., C. Álvarez y N. W. Osorio (Eds.). 2001.

PARKE L. Jennifer et al. 2009. LA DIVERSIDAD DE LA complejo Burkholderia cepacia Y CONSECUENCIAS PARA LA EVALUACIÓN DEL RIESGO DE CEPAS DE CONTROL BIOLÓGICO y Doug Gurian-Sherman<sup>2, 3</sup>  
<sup>1</sup>Departamento de Botánica y Patología de Plantas, y el Departamento de Producción Vegetal y Edafología, Oregon State University, Corvallis, Oregon Center para la Ciencia en el Interés Público, Washington, DC.

*PALLERONI & HOLMES 1981. Burkholderia cepacia. Catálogo de la biodiversidad en Colombia.*

PAREDES.2009. Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. Terra Latinoamericana 28: 61-70. Mexico.

PARKE, L. J. y GURIAN-SHERMAN, D. (2009). La diversidad de la complejo burkholderia cepacia y consecuencias para la evaluación del riesgo de cepas de control biológico.

PATKOWSKA, E. 2002.. The role of rhizosphere antagonistic microorganisms in limiting the infection of underground parts of the spring wheat. Electronic Journal of

Polish (on line). Serie Horticulture. Volume 5, issue 2. <  
<http://www.ejpau.media.pl/series/volume5/issue2/horticulture/art-04.html>> (15 ago. 2004)

PEIX, Alvaro et al., 2003. *Pseudomonas rhizosphaerae* sp.nov., a novel species that actively solubilizes phosphates in vitro. International journal of systematic and evolutionary microbiology.

PINDADO, RODRIGUEZ, José. <http://coli.usal.es>

PRADHAN, N y Sukia LB. 2005. Solubilization of inorganic phosphate by fungus isolated from agricultural soil. Regional research laboratory, Bhubaneswar, Orissa, India.

PROYECTO BIOPACÍFICO. Tomo IV. 1998. Los sistemas productivos tradicionales, una opción propia de desarrollo sostenible. Santafé de Bogotá. Pag. 63.

PUERTAS GARCÍA, M<sup>a</sup> Mercedes. Movilización Biológica de Fosfatos.

QUITRAL VILLANUEVA A. 2005. Solubilización de roca fosfórica por hongos rizosféricos aislados de especies forrajeras de importancia en la X Región de Chile Valdivia - Chile

RAMÍREZ, R. 2006. Eficiencia del uso del fósforo de la roca fosfórica por cultivares de maíz. Interciencia enero, año/ 31, número 001. Asociación Interciencia. Caracas, Venezuela.

RAGHOTHAMA K. G. and KARTHIKEYAN. (A. S. (2005). Phosphate acquisition. Plant and Soil. Pp. 37 – 49.

RIASCOS ORTÍZ. D. 2007. Aislamiento y reconocimiento de hongos benéficos asociados a la rizósfera de chontaduro (*Bactris gasipaes*, HBK) en los Corregimientos de Citronela y Zabaletas, Buenaventura Valle del Cauca.

RODRÍGUEZ, Hilda y FRAGA, Reynaldo. 1999. Bacterias solubilizadoras de fosfato y su papel en el crecimiento de las plantas.

ROMERO, Carlos y otros. 2003. Evaluación inicial de la fertilización con roca fosfórica en tres especies del género *Brachiaria*. En. [www.ceniap.gov.ve](http://www.ceniap.gov.ve).

ROVEDA y otros. 2008. Fertilizantes biológicos. En Uso de microorganismos con potencial como biofertilizantes en el cultivo de mora. C.I. Tibaitatá, CORPOICA

SANDE y otros. 2005. formas de fósforo y su relación con la erosión en aguas superficiales bajo clima atlántico. Facultad de Ciencias. Universidad de A Coruña. A Zapateira s/n. 15071. A Coruña. Escuela Politécnica Superior de Lugo. Universidad de Santiago de Compostela. Campus Universitario. 27002. Lugo.

SANJUÁN, J. 2007. Introducción. Biofertilizantes en Iberoamérica: Una visión técnica, Científica y empresarial. Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos. Estación Experimental del Zaidin, CSIC. Profesor Albareda 1E-18008. Granada, España.

SELLES, F. Influencia de la siembra directa en la dinámica del fósforo en el suelo. Agriculture and Agri-Food Canada. Semiarid Prairie Agricultural Research Centre Swift Current, Saskatchewan, Canadá.

SHENOY V.V., KALAGUDI G.M. (2005) Enhancing plant phosphorus use efficiency for sustainable cropping. Biotechnology Advances. Pp. 501 – 513.

SILVA, V. y TROCHEZ, A. 1992. PROYECTO DE CONTROL DE BARRENADOR DEL FRUTO DEL CHONTADURO por *Geraeus* (Coleóptera Curculionidae) en la Costa Pacífica. ICA, CVC Y CEE. Informe preliminar.

SORIA, Jorge. 2002. El “chontaduro” (*Bactris gasipaes* H.B.K., Arecaceae), especie promisorio de usos múltiples. En [pejibaye@cariari.ucr.ac.cr](mailto:pejibaye@cariari.ucr.ac.cr).

TORO y otros. 2008. Micorrizas arbusculares y bacterias promotoras de crecimiento vegetal, biofertilizantes nativos de sistemas agrícolas bajo manejo conservacionista. Agronomía Trop. Vol. 58. Instituto de Zoología Tropical, Caracas.

TORRES, Martha Viviana y LIZARAZO, Luz Marina. 2006. Evaluation of functional groups (cycles of C, N, P) and activity of the acid phosphatase in two agricultural soils of Department of Boyacá (Colombia).

Useche Y., Peña Venegas C., Cardona Vanegas G.. 2007. *Burkholderia cepacia* (Palleroni & Holmes 1981) Yabuchi, Kosako, Oyaizu, Yano, Hotta, Hashimoto, Ezaki & Arakawa 1993 (*Pseudomonas cepacia* Palleroni & Holmes 1981). <http://www.siac.net.co/sib/catalogoespecies/especie.do?idBuscar=529&met hod=displayAAT>.

VANDAMME, Peter AR. 2005. *Polifásico Taxonomía en practicar: el Desafío de Burkholderia cepacia*. *Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Bélgica*.

VAZQUEZ, Sara and MORALES, Luis Alberto and Dalurzo, Humberto Carlos (2004) Disponibilidad del fósforo en suelos ácidos de misiones, argentina/Phosphorus availability in acidic soils of Misiones, Argentina. *Agricultura Técnica (Chile)* 64(1):pp. 50-57.

VEGA HERNÁNDEZ, 2007. Efecto antagónico de un producto biológico obtenido de Burkholderia cepacia Pelleroni y Holmes contra Capnodium spp. En plántula de café crecida in Vitro e in vivo.

YOSHIOKA T, Isabel Cristina. Y otros. 2006. Actividad de fosfatasas ácida y alcalina en suelo cultivado con plátano en tres sistemas de manejo. Artículo derivado de la tesis de Maestría en Ciencias Agrarias con énfasis en suelos.

ZAMORA, Martín, 2005-2006. Evaluación de bacterias solubilizadoras de fósforo en el centro sur bonaerense. Revista. Cosecha Gruesa. INTA. Buenos Aires Argentina. pp. 74-75.



## **ANEXOS**

## ANEXO 1

### DISTRIBUCIÓN EN CAMPO DE LOS TRATAMIENTOS DE INOCULACIÓN

<b>T1 (B1 + RF)</b>	<b>T3 (B2 + RF)</b>	<b>T6 (TESTIGO))</b>	<b>T2 (B1)</b>	<b>T4 (B2)</b>	<b>T5 (RF)</b>
T5 (RF)	T4 (B2)	T6 (TESTIGO)	T1 (B1 + RF)	T2 (B1)	T3 (B2 + RF)
T6 (TESTIGO)	T4 (B2)	T1 (B1 + RF)	T2 (B1)	T3 (B2 + RF)	T5 (RF)

## ANEXO 2

### RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE SUELO\* CORRESPONDIENTES AL SITIO DE SIEMBRA EN EL CAMPUS UNIVERSITARIO

DESCRIPCIÓN	LDM	Valores
Ph (Un)	0	4.20
MO (g/kg)	0	61.21
P-Brayll (mg/kg)	0	2.15
K (cmol/kg)	0.63	0.07
Ca (cmol/kg)	0	0.17
Mg (cmol/kg)	0.94	0.10
Al (cmol/kg)	0	2.42
Na (cmol/kg)	0	0
CIC (cmol/kg)	0	8.80
S (mg/kg)	0	34.37
B (mg/kg)	0	0.19
Mn (mg/kg)	0	3.64
Fe (mg/kg)	0	137.32
Cu (mg/kg)	0	46.53
Zn (mg/	0	0.74

**LDM:** Límite mínimo de detección

(\*): Resultados provistos por el Laboratorio de Servicios Analíticos del Centro de Agricultura Tropical (CIAT).

