

## 1. RESUMEN

El departamento de Boyacá en Colombia, es una región reconocida por la alta productividad y desarrollo en la agricultura, sin embargo, sus suelos por lo general presentan deficiencias en elementos nutricionales como el fósforo, concentraciones que usualmente son controladas mediante la adición de fertilizantes químicos, siendo esta práctica costosa y altamente contaminante. Una de las alternativas para resolver este problema, es el uso de biofertilizantes en su mayoría a base de bacterias y hongos solubilizadores de fosfatos, por el contrario las actinobacterias han sido poco exploradas en el desarrollo de esta actividad. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue aislar actinobacterias, capaces de liberar fósforo soluble de forma *In vitro*. Un total de 32 actinobacterias fueron aisladas y caracterizadas; para determinar su actividad solubilizadora de fósforo, se evaluaron dos pruebas cualitativas en medio sólido SMRS-1 y medio líquido NBRIP-BPB, además de cuantificar liberación de por el método de azul de molibdeno con los aislamientos de mejor actividad en los ensayos cualitativos. El aislamiento T3A fue seleccionado por presentar los valores de solubilización  $512,7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  para  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  y  $24,9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  con  $\text{AlPO}_4$ . Posteriormente, se evaluaron cinéticas de crecimiento bajo diferentes fuentes de fosfato insoluble ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{AlPO}_4$  y roca fosfórica) cuantificando parámetros de biomasa, consumo de glucosa, pH y cantidad de fósforo soluble liberado. Adicionalmente, se evaluó la actividad solubilizadora de fósforo bajo diferentes valores de arranque del pH (4, 5, 6, 8). Los resultados mostraron que el aislamiento T3A tiene la capacidad de solubilizar otras fuentes de fosfatos insolubles bajo diferentes niveles de pH. La actividad solubilizadora de fósforo de este aislamiento puede estar directamente asociada con la liberación de ácidos orgánicos, este hecho fue evidenciado por la disminución del pH en el medio, por lo que se decidió identificar los ácidos orgánicos involucrados en el proceso de solubilización mediante cromatografía de capa delgada, sin embargo las bajas concentraciones de ácidos orgánicos en el medio no permitieron su detección bajo esta metodología. Los desarrollos del presente estudio sugieren el potencial que presentan las actinobacterias como solubilizadoras de fósforo, siendo este el primer reporte de solubilización de  $\text{AlPO}_4$ , así mismo contribuyen al avance en la investigación de actinobacterias como PGPR para ser propuestas en la formulación de un bioinoculante.

## 2. INTRODUCCIÓN

En los últimos años la humanidad se ha preocupado ampliamente por el uso razonable del suelo, debido a que en él, se llevan a cabo diferentes actividades. Dentro de estas se encuentra la agricultura, la cual sigue siendo la principal fuente de alimentación para la población mundial. Por lo anterior, se hace necesario el desarrollo de una agricultura sostenible, donde se lleven a cabo buenas prácticas agrícolas; todo esto representa un reto actual para aquellos quienes trabajan e investigan en esta área, uno de los temas más relevantes es la nutrición de las plantas cultivables pues de esto depende el desarrollo y rendimiento del cultivo de interés (1).

El fósforo en la nutrición vegetal es un elemento que limita el crecimiento de las plantas debido a que se encuentra en formas poco disponibles para estas. La disponibilidad se encuentra condicionada por factores tales como: fluidos y minerales presentes en el suelo, el pH, la actividad microbiana, la presencia de enzimas, sideróforos, ácidos orgánicos y la intensidad de demanda del nutriente (2). Dada la baja disponibilidad de este elemento en el suelo, los microorganismos participan activamente en la movilización de fósforo para las plantas al mantenerlo en sus estados de mayor disponibilidad (3). Por lo tanto, los microorganismos son fundamentales para asegurar el ciclaje del fósforo en el suelo (4). Existen muchos estudios de microorganismos solubilizadores de fósforo como una alternativa para resolver este problema. Pocos autores reportan actinobacterias con esta capacidad, sin embargo se ha demostrado que estos microorganismos tienen la habilidad de generar una mayor disponibilidad de este elemento (5-11),

Las actinobacterias son un grupo de microorganismos que se encuentran en la mayoría de ecosistemas y son ampliamente estudiados por su alta diversidad metabólica y por desarrollar diversas actividades, tales como: mejoramiento de la estructura del suelo, producción de compuestos bioactivos con actividad antagonista, producción de enzimas extracelulares, pigmentos, terpenoides, así mismo juegan un papel importante en la mineralización del nitrógeno y el carbono, la degradación de la materia orgánica y la solubilización de fosfatos, entre otras actividades. Debido a esto, recientemente se les ha considerado como "Rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas" llamadas así porque desempeñan funciones claves para la planta que incluyen mecanismos de antagonismo contra patógenos, mayor disponibilidad de nutrientes, producción de reguladores de crecimiento que inducen alargamiento de la raíz, floración, formación de frutos, entre otras actividades (5, 7, 12, 13, 14). En este caso, la biodisponibilidad del fósforo como elemento esencial para las plantas, se encuentra dentro de las actividades directas de promoción del crecimiento vegetal y pueden ser llevadas a cabo por las actinobacterias mediante mecanismos de disponibilidad de fósforo tales como: reducción-oxidación, mineralización del fósforo orgánico por la producción de fosfatasas y solubilización del fósforo inorgánico por medio de la producción de sideróforos y la secreción de ácidos orgánicos (15), 16).

Debido a la poca información que se encuentra sobre la solubilización de fósforo por las actinobacterias y a la gran limitación del fósforo como nutriente vegetal, se realizaron

aislamientos de estos microorganismos en áreas con problemas de altas fertilizaciones con fósforo en el departamento de Boyacá para determinar la actividad solubilizadora de fósforo y la secreción de ácidos orgánicos de estos microorganismos.

### **3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El fósforo es uno de los nutrientes más limitantes para el crecimiento vegetal (15), constituyente fundamental de los sistemas de captación, almacenamiento, transferencia de energía y, adicionalmente forma parte de la mayoría de los procesos fisiológicos de los organismos (17). En el suelo, el fósforo se encuentra tanto en formas orgánicas como inorgánicas y su disponibilidad para las plantas está condicionada por reacciones fisicoquímicas y biológicas (18). Un suelo contiene aproximadamente de 0.4 a 1.2 g de Fósforo por Kg de suelo y el 95 al 98% de este fósforo se encuentra en la forma de quelatos metálicos insolubles que no pueden ser tomados por las plantas (19). En Colombia se presenta una deficiencia del 98% de fósforo para las plantas (20), los niveles de fósforo total son variables, mientras que los de fósforo disponible son generalmente muy bajos (21), en los suelos de Boyacá el contenido de fósforo aprovechable es muy bajo (22) con valores que oscilan entre 4.0 y 40 ppm dependiendo de la zona (23, 24), una de las principales causas de la limitación de este elemento es la precipitación de los fosfatos disponibles para las plantas ya que en los procesos de precipitación el predominio de una u otra forma iónica depende directamente del pH (5). Es así como el fósforo, al ser uno de los elementos más limitantes para el crecimiento y desarrollo de las plantas, debe ser suministrado bajo la adición de fertilizantes químicos (3), encontrándose dosis de 450 kg/ha de  $P_2O_5$  (24), sin embargo, este fósforo es rápidamente fijado a formas no disponibles para las plantas (25), así mismo el uso de estos químicos sigue representando una fuente de contaminación tanto para el medio ambiente como para la salud humana.

Para mitigar los efectos mencionados anteriormente, se propone el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, que llevan a cabo diferentes mecanismos para la solubilización de fósforo, uno de estos procesos es la producción de ácidos orgánicos. Esta investigación se enfoca en este tipo de solubilización, ya que existen reportes donde se determina que este es el principal mecanismo de solubilización (15, 26, 27); uno de los

métodos más utilizados para la estimación de la actividad solubilizadora de un microorganismo es determinar la naturaleza de los ácidos orgánicos producidos (28), esta identificación puede realizarse por medio de cromatografía de capa fina al ser una técnica económica, rápida y sencilla que identificará de forma preliminar los ácidos orgánicos presentes (29); el uso de la cromatografía de capa fina es una herramienta importante porque permite evidenciar una correlación entre los mejores aislamientos solubilizadores de fósforo y el tipo de ácido involucrado en este mecanismo, lo que facilitaría mejorar las condiciones de diseño y optimización de medio de cultivo, escalamiento del proceso, separación, purificación y la formulación de un bioinoculante. Una de las poblaciones de microorganismos con menos estudios publicados en este campo son las actinobacterias, existen reportes que señalan que son capaces de producir ácidos orgánicos y que este podría ser el principal mecanismo de obtención de fósforo soluble (10, 30); sin embargo, otros autores como Hamdali *et al.* (2012) atribuyen la solubilización a la producción de sideróforos y no de ácidos orgánicos (31); por lo anterior, se hace necesario profundizar en el estudio de estos microorganismos como solubilizadores de fósforo y el mecanismo por el cual se da este proceso, así mismo, continuar con la evaluación de las actividades de promoción de crecimiento vegetal para una futura producción de bioinoculantes eficientes que mejoren la productividad de cultivos y disminuyan el uso de fertilizantes químicos, reduciendo costos de producción, asegurando la seguridad alimentaria e implementando buenas prácticas agrícolas para el desarrollo de una agricultura sostenible (32).

Con base a los problemas que presenta el fósforo como elemento limitante en los cultivos agrícolas y al poco estudio de poblaciones microbianas como las actinobacterias, en esta investigación se evaluó la actividad solubilizadora de fósforo por parte de actinobacterias, para ser propuestas en el diseño de bioinoculantes de la industria agrícola.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1 *El suelo y su composición*

El suelo es la parte más externa de la corteza terrestre, se considera como un sistema de interacción entre una fase sólida compuesta por materia mineral y orgánica, una fase líquida y una gaseosa, todos los constituyentes de este sistema se hallan dispersos en una matriz heterogénea. El material mineral presente en el suelo viene dado por las características de las rocas del subsuelo así como los procesos edáficos que hayan tenido lugar en su formación, la materia orgánica resulta de la actividad de los distintos organismos presentes en el suelo, su cantidad y composición resultan ser variables, el resto del volumen del suelo está constituido por espacios porosos que a su vez están ocupados por agua y gases que constituyen la atmósfera edáfica. El suelo es el medio principal para el crecimiento de las plantas, es una mezcla de material biológicamente activo resultante de las transformaciones complejas que incluyen el intemperismo de rocas y minerales, el ciclaje de nutrientes, la producción y descomposición de biomasa (22, 33).

Al ser el suelo un sistema complejo que presenta una alta heterogeneidad espacial y temporal, alberga una gran cantidad de especies vegetales, animales y microbianas, estas poblaciones presentan unas características especiales y realizan una diversidad de funciones que repercuten en las condiciones del suelo (22). La naturaleza del hábitat en que vive la comunidad de organismos, está determinada por una compleja interacción entre la geología, el clima, la vegetación, la interacción con las rocas y el material parental presente en el suelo (34). Debido a esto, en los suelos se producen una enorme gama de hábitats que soportan una gran cantidad de biomasa y con esto una amplia diversidad genética, un solo gramo de suelo contiene kilómetros de hifas de hongos y más de  $10^9$  células bacterianas, organismos pertenecientes a decenas de miles de diferentes especies (34).

Las interacciones entre plantas y microorganismos del suelo se manifiestan de forma especial en la rizosfera, la zona del suelo afectada por el desarrollo de las raíces las cuales estimulan la actividad de microorganismos tales como hongos, micorrizas, bacterias, arqueas, actinobacterias, virus, entre otros (5, 35, 36). Todos estos organismos establecen relaciones entre ellos de formas muy variadas y complejas y también

contribuyen a las características propias del suelo ya que desempeñan funciones de gran importancia en relación con procesos de edafogénesis; ciclos biogeoquímicos de elementos como el carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre, fósforo, hierro y otros metales; fertilidad de las plantas y protección frente a patógenos, al mismo tiempo de degradar compuestos xenobióticos, entre otras (33).

#### **4.2 Actinobacterias como promotoras de crecimiento vegetal**

Un considerable número de bacterias que presentan una asociación con la rizosfera de las plantas y que ejercen importantes beneficios sobre el desarrollo de estas, han sido denominadas “Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal” (PGPR, acrónimo del inglés “*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*”) (5, 37, 38); son llamadas así porque desempeñan funciones claves en el crecimiento y desarrollo de las plantas que incluyen mecanismos de acción directa e indirecta, los mecanismos de acción directa son aquellos que favorecen la disponibilidad de nutrientes para las plantas como son la fijación de nitrógeno y la solubilización de fosfatos y la producción de reguladores de crecimiento u hormonas vegetales. Los mecanismos indirectos benefician a la planta en la interacción con otros factores que pueden afectar su crecimiento como lo son el biocontrol sobre organismos fitopatógenos por la producción de sustancias bioactivas y la inducción de mecanismos de resistencia en la planta (37, 39, 40).

Gran parte de los estudios de microorganismos promotores del crecimiento vegetal están enfocados en la búsqueda y evaluación de bacterias no filamentosas y hongos capaces de llevar a cabo actividades metabólicas para ser empleadas en beneficio de las plantas; en este contexto, cabe mencionar los pocos estudios de actinobacterias como promotores del crecimiento vegetal y el interés de algunos autores en avanzar en la investigación de estas actividades (12). Las actinobacterias comprenden un grupo de microorganismos que se encuentran en gran parte de los ecosistemas como suelos, aguas dulces, marinas, ríos, polvo, etc. (41); se caracterizan por ser bacterias Gram positivas, con capacidad de formar filamentos ramificados y tener un alto contenido guanina-citosina (G+C) en sus genomas (5, 42). Ecológicamente, las actinobacterias son generalmente saprófitas y viven en el suelo, se ha demostrado que habitan la rizosfera de muchas especies de plantas (42). Estos microorganismos son ampliamente conocidos por su habilidad para producir antibióticos, pigmentos, terpenoides, enzimas extracelulares con las que son capaces de degradar materia orgánica de origen vegetal y animal (43, 44, 45).

Las actinobacterias habitan comúnmente el suelo, contribuyendo en la estructura y olor característico del mismo; recientemente, se han caracterizado actividades relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal, en especial como agentes de control biológico de varias enfermedades de plantas, con la producción de antibióticos y de enzimas extracelulares como quitinasas, glucanasas, peroxidasas y otras (5, 7, 12, 13). Así mismo, otras investigaciones se han centrado en la producción de hormonas promotoras del crecimiento como auxinas y giberelinas, fijación de nitrógeno, producción de sideróforos y solubilización de fosfatos, concluyendo que las actinobacterias presentan un efecto benéfico sobre plantas (10,11, 12, 14, 46, 47).

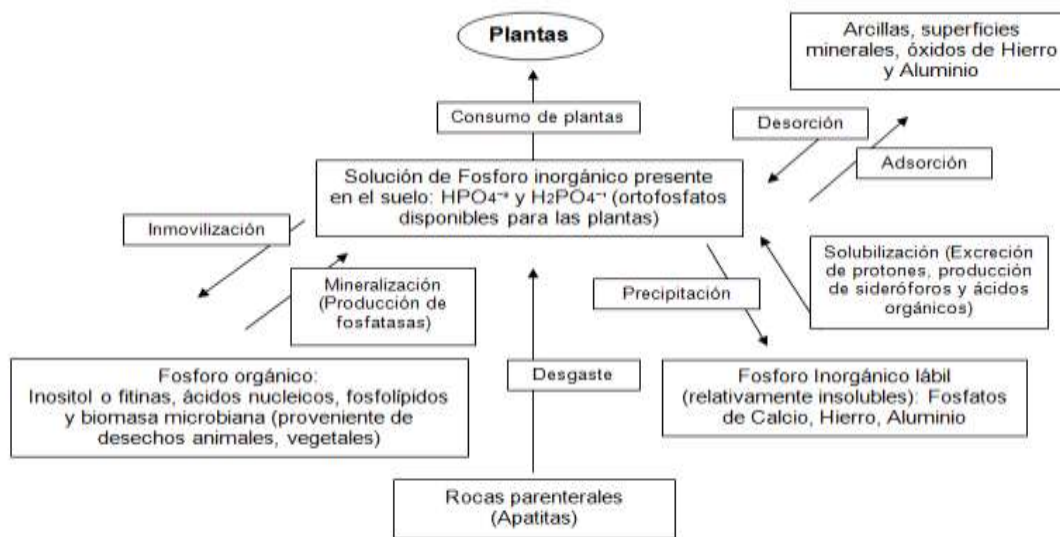
Una buena selección de cepas promotoras del crecimiento vegetal, requiere un entendimiento de la dinámica y composición de las comunidades bacterianas que colonizan la rizosfera y una profundización en la caracterización de las actividades directas e indirectas para la promoción del crecimiento (25).

#### ***4.3 El fósforo en los suelos***

El fósforo es un elemento esencial para todos los organismos vivos, juega un rol estructural y funcional y se encuentra en moléculas como los ácidos nucleicos (DNA, RNA), fosfolípidos, ATP, entre otras (34, 36). Aunque el fósforo se encuentra en cantidades abundantes en muchos suelos, es un elemento que limita el crecimiento y desarrollo de plantas ya que solo el 0,1% del fósforo total que existe en los suelos se encuentra en formas disponibles para estas (48, 49). El fósforo existe en el suelo de forma orgánica e inorgánica, el fósforo orgánico proviene de los restos vegetales y animales que al ser degradados por los microorganismos del suelo liberan compuestos fosfatados, constituye del 29 al 65 % del fósforo en suelos agrícolas; el fósforo orgánico se encuentra en el suelo, principalmente en forma de fitato o formas relacionadas, fosfolípidos, ácidos nucleicos y sus derivados (34, 50).

El fósforo inorgánico está representado en los suelos por las rocas y minerales primarios como apatitas, hidroxapatitas y oxiapatitas, estas formas, se caracterizan por ser insolubles, sin embargo bajo condiciones apropiadas pueden ser solubilizadas y convertirse en formas disponibles para plantas y microorganismos, otras formas inorgánicas de fósforo también pueden ser encontradas en la superficie de hidróxidos de hierro, aluminio y manganeso que son poco solubles y asimilables (4). Teniendo en

cuenta la baja disponibilidad, el fósforo debe ser agregado al suelo en forma de fertilizantes fosfatados, parte de este, es utilizado por las plantas pero otra parte se pierde rápidamente, debido a que forma complejos insolubles con constituyentes del suelo reduciendo la eficiencia del uso de fertilizantes en cultivos. Este fenómeno, se debe a que el fósforo soluble reacciona con cationes formando complejos insolubles en los cuales, el predominio de una u otra forma iónica depende directamente del pH y el tipo de suelo, así, en suelos ácidos, el fósforo es fijado por hierro y aluminio, mientras que en suelos alcalinos este es fijado por calcio; así mismo, este elemento puede adsorberse sobre la superficie de los coloides del suelo (materia orgánica, arcillas), por fuerzas electrostáticas, de Van der Waals o químicas (15, 48, 51). Por lo anterior, el fósforo no puede ser aprovechado totalmente por las plantas lo que incrementa el interés de investigar mecanismos de solubilización de este elemento (11).



**Figura 1. Mecanismos biológicos, químicos y físicos que ocurren dentro del ciclo del fósforo**

Por consiguiente, los microorganismos del suelo que solubilizan fosfatos se convierten en una alternativa para proveer de este elemento a las plantas, por lo que juegan un rol importante en el desarrollo de una agricultura sostenible (52). Los microorganismos fosfato solubilizadores realizan transformaciones de los compuestos orgánicos e



inorgánicos de fósforo insoluble a formas solubles como los ortofosfatos, tales transformaciones se llevan a cabo por mecanismos de mineralización por producción de fosfatasas y solubilización por producción de ácidos orgánicos, excreción de protones y producción de agentes quelantes (sideróforos) (4, 25, 53, 54, 55); recientemente, Hamdali *et al.* (2010) detectaron la presencia de moléculas pertenecientes a la familia de las viridomicinas involucradas en el proceso de solubilización de fósforo, estas moléculas son consideradas como quelantes fuertes de cationes y tienen la habilidad de capturar los iones cargados positivamente, desestabilizando la estructura de las hidroxiapatitas, liberando fosfatos que se encuentran cargados negativamente, reduciendo la concentración de protones libres y causando la alcalinización del medio (19).

#### - **Mineralización**

La mineralización es la conversión microbiana de fósforo orgánico a formas de fósforo disponibles para las plantas; ocurre cuando el fósforo inorgánico celular, a partir de las células muertas, es liberado a la solución y cuando los compuestos orgánicos son hidrolizados, sobre las superficies externas de las membranas celulares. La mineralización de fósforo orgánico es llevada a cabo por muchos microorganismos que tienen fosfatasas extracelulares y que implican la hidrólisis de enlaces fosfodiéster o fosfoanhidrido; la liberación de fósforo a partir de la materia orgánica por medio de estas enzimas, puede llegar a ser una importante fuente de fósforo disponible (4, 11, 50).

#### - **Solubilización**

La solubilización es la conversión de formas inorgánicas de fósforo insolubles en formas solubles (36); varios mecanismos se proponen para explicar la solubilización del fósforo inorgánico por parte de los microorganismos a través de procesos como:

##### **Exudación de sustancias quelantes (sideróforos):**

Los sideróforos son metabolitos producidos por microorganismos en el suelo y basan su actividad en fenómenos de quelación, es decir, la habilidad de un compuesto químico de formar una estructura en anillo con un ion metálico,

resultando en un compuesto con propiedades totalmente diferentes al del metal inicial. Los sideróforos en este caso, se encargan de captar el hierro que se encuentra unido a los fosfatos aumentando la disponibilidad de este elemento (5, 51).

### **Excreción de protones:**

En algunos casos, se ha reportado solubilización de fósforo inorgánico en la ausencia de ácidos orgánicos, esto puede explicarse por la excreción de protones desde el citoplasma a la superficie externa de la célula, procedentes del proceso de respiración aeróbica. Así mismo, la asimilación de  $\text{NH}_4^+$  por parte de los microorganismos, en el que el uso de sales de amonio como fuente de nitrógeno causa la acidificación por la liberación de protones  $\text{H}^+$  haciendo que se libere fósforo soluble (27, 54, 56, 58, 59).

### **Producción de ácidos orgánicos**

Está determinada por la habilidad de los microorganismos para liberar metabolitos tales como ácidos orgánicos, los cuales a través de sus grupos hidroxilo y carboxilo quelan los cationes que se encuentran unidos a los fosfatos (15). Los ácidos orgánicos son producidos por microorganismos que se encuentran en la rizosfera y provienen de compuestos de alto peso molecular como los carbohidratos; existe un gran número de microorganismos que son capaces de solubilizar fosfatos, los cuales usan la glucosa como fuente de carbono, al usar este criterio, todos los microorganismos que posean la ruta de la oxidación directa de la glucosa, tendrían la capacidad de solubilizar fósforo (27). En los últimos años, se ha avanzado en el estudio del mecanismo que se encuentran directamente involucrado en la solubilización de fósforo en bacterias Gram negativas, estas han sido designadas como fenotipo  $\text{MPS}^+$  determinando que es necesaria la presencia de un conjunto de genes, los cuales están involucrados en la biosíntesis del cofactor quinona de pirrolo-quinolina (PQQ) y la formación de la enzima glucosa deshidrogenasa (GDH) que cataliza la formación de ácido glucónico por la vía de oxidación directa de la glucosa (4, 27, 60).

Los ácidos orgánicos producidos por los microorganismos fosfato solubilizadores liberan fósforo soluble al quelar cationes de calcio, hierro o aluminio, la quelación involucra la formación de enlaces entre una molécula y el ion metálico, lo que crea una estructura compleja, esto ocurre a través de el oxígeno que contienen los grupos hidroxilo y carboxilo de los ácidos orgánicos como glucónico, oxálico, cítrico, málico, láctico y se da siempre y cuando la estructura de los ácidos permita formar complejos estables. Así mismo, los ácidos orgánicos causan la disminución de la adsorción de los fosfatos solubles sobre los coloides del suelo como las arcillas, debido a la competencia con el fósforo por los sitios de adsorción al suelo, lo cual incrementa la accesibilidad de formas disponibles de fósforo para la plantas (4, 36, 15, 56, 27, 61).

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

Evaluar la capacidad solubilizadora de fósforo de actinobacterias aisladas a partir de suelos del departamento de Boyacá.

### **5.2 Objetivos específicos**

Caracterizar morfológicamente actinobacterias aisladas a partir de suelos del departamento de Boyacá.

Seleccionar las actinobacterias con capacidad solubilizadora de fósforo a partir de los aislamientos realizados.

Identificar preliminarmente los ácidos orgánicos sintetizados por las actinobacterias que participan en el proceso de solubilización de fósforo.

## **6. METODOLOGÍA**

El proyecto se desarrollo en las instalaciones de la Unidad de Investigaciones Agropecuarias (UNIDIA) de la Pontificia Universidad Javeriana.

### **6.1 Recolección de la muestra.**

Las muestras de suelo se tomaron en la rizosfera a una profundidad de 15 a 30 cm de plantas silvestres en las localidades de Tota y Paipa en el departamento de Boyacá, Colombia. Las muestras se colocaron en bolsas de polietileno, cerradas herméticamente y se transportaron refrigeradas a la Unidad de Investigaciones Agropecuarias (UNIDIA); cada una de las muestras fue debidamente marcada según su geoposición indicando coordenadas, temperatura, humedad relativa y altura sobre el nivel del mar.

### **6.2 Procesamiento de la muestra.**

#### **6.2.1 Aislamiento de actinobacterias a partir de muestras de suelo.**

De cada una de las muestras de suelo de las zonas de aislamiento se tomaron 10 g de suelo previamente homogenizado y se realizaron diluciones seriadas en base 10 con solución salina al 0.85% (Anexo A) hasta  $10^{-7}$ . A partir de las diluciones  $10^{-4}$  a  $10^{-7}$ , se sembró por triplicado en medios sólidos avena y avena–extracto de suelo (Anexo B) suplementados con 0,1% de nistatina como agente inhibidor de hongos. La suspensión se distribuyó homogéneamente sobre la superficie del agar y posteriormente se incubó a  $23^{\circ}\text{C} \pm 2$  inspeccionando durante 30 días colonias con características de actinobacterias (puntiformes, secas y pulverulentas), pasado el tiempo de incubación se seleccionaron las colonias presuntivas y se repicaron por aislamiento en medio sólido avena suplementado con nistatina al 0,1% hasta purificar totalmente el aislamiento. Los aislamientos fueron codificados de acuerdo a la zona de aislamiento, punto de muestreo y orden de aparición (5).

## **6.2.2 Caracterización morfológica de las actinobacterias aisladas.**

### **6.2.2.1 Caracterización macroscópica.**

A partir de los aislamientos puros, se observaron las características de las colonias a nivel macroscópico, teniendo en cuenta color del anverso y del reverso, presencia de pigmentos y textura de la colonia (5, 62).

### **6.2.2.2 Caracterización microscópica.**

Los diferentes aislamientos de actinobacterias se sembraron de forma masiva en medio sólido avena suplementado con nistatina al 0,1%. Posteriormente, se realizó la caracterización microscópica haciendo el montaje en una lámina y observando sus características con la coloración de Gram (filamentos, propágulos, ramificaciones y forma de las mismas). Así mismo, a partir de un cultivo puro se introdujeron laminillas estériles con una inclinación de 45° con respecto a la superficie del agar. Las cajas se incubaron a 23°C ± 2 durante 15 días, posteriormente las laminillas se colocaron sobre una lámina portaobjetos con cristal-violeta para la observación al microscopio del micelio y propágulos formados (5).

## **6.3 Conservación de los aislamientos.**

Se preparó solución salina al 0.85% con glicerol al 20%, adicionando 1 mL de esta solución a tubos crioviales de 1,5 mL secos y estériles; cada uno de los aislamientos se adicionó a los crioviales sobre medio sólido avena en forma de discos de 5 mm de diámetro, 5 discos por vial. Finalmente, se almacenaron los aislamientos a -20°C verificando viabilidad, pureza y estabilidad al cabo de 1 mes y 6 meses.

## **6.4 Ensayos *in vitro* para evaluar la capacidad solubilizadora de fósforo de los aislamientos de actinobacterias.**

### **6.4.1 Evaluación cualitativa en medio sólido.**

A partir de un cultivo puro de los aislamientos en medio sólido avena, se sembraron en medio SMRS1 con fosfato tricálcico como fuente de fósforo insoluble (Anexo B) dos discos de 5 mm de diámetro separados de forma equidistante, abriendo un hueco de 5 mm de diámetro en el medio SMRS1 y posteriormente remplazando con el disco de cada aislamiento. Se incubó a  $23^{\circ}\text{C} \pm 2$  revisando de manera diaria durante 10 días, la acidificación del medio SMRS1 (viraje a color amarillo por el indicador de pH) y halo de hidrólisis indicaban una prueba positiva (63, 64). Este procedimiento se realizó por cuadruplicado.

Se tomaron los datos de medida de la colonia y halo de hidrólisis para establecer la eficiencia de la solubilización de fósforo por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia de la solubilización} = \frac{\text{Diámetro halo de hidrólisis}}{\text{Diámetro de la colonia}} \times 100, (2).$$

### **6.4.2 Preparación de inóculos.**

Se realizó una reactivación a partir de un vial de las actinobacterias en medio avena suplementado con 0.1% de nistatina y se incubó a  $23^{\circ}\text{C} \pm 2$  por 7 días. Posteriormente, se realizó una suspensión de conidios u estructuras reproductivas en tubos de 16 x 150 mm tapa rosca con solución salina al 0.85% y se preparó un inóculo con concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/mL u estructuras reproductivas.

### **6.4.3 Evaluación cualitativa en medio líquido.**

A partir del inóculo (preparado según el numeral 5.4.2) se tomaron 40  $\mu\text{L}$  de este y se adicionaron a tubos 16 x 150 mm tapa rosca con 5 mL de medio líquido NBRIP-BPB con fosfato tricálcico como fuente de fósforo insoluble (Anexo B), se incubó a  $23^{\circ}\text{C} \pm 2$  y 120 rpm y se revisó durante 5 días observando cambio en la coloración del medio. Este

procedimiento se realizó por cuadruplicado. Pasado el tiempo de incubación se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos, se tomó el sobrenadante y se leyó la absorbancia a 600 nm tomando como blanco de la prueba el medio NBRIP sin BPB (Anexo B). Se registraron los datos y se calculó el cambio en la absorbancia, tomando como referencia el medio NBRIP-BPB sin inocular (65).

Se consideraron aislamientos solubilizadores de fósforo, aquellos que presentaron una absorbancia mayor o igual a 1.5 unidades (66).

#### **6.4.4 Cuantificación de la actividad solubilizadora de fósforo.**

La cuantificación del fósforo soluble se realizó por medio del método de fosfomolibdeno a través del test SPECTROQUANT de Merck® con las cepas seleccionadas como solubilizadoras de fósforo a partir del tamizaje (Numerales 5.4.1 y 5.4.3) (67). Para el desarrollo de esta prueba, inicialmente se preparó una curva patrón con concentraciones conocidas de ortofosfatos ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) según el protocolo 365.2 de la EPA (Anexo C) (68).

Para cuantificar la actividad de los aislamientos se tomaron 160  $\mu\text{L}$  del inóculo y se adicionaron a un erlenmeyer de 100 mL con 20 mL de medio NBRIP suplementado con fosfato tricálcico y fosfato de aluminio como fuente de fósforo insoluble (Anexo B), se incubaron a  $23^\circ\text{C} \pm 2$  y 120 rpm durante 5 días. Pasado el período de incubación, cada muestra se centrifugó a 5000 rpm por 15 minutos, se tomó el sobrenadante y posteriormente se cuantificó la liberación de ortofosfatos de cada uno de los aislamientos (Anexo C) (16, 69). Este procedimiento se realizó por cuadruplicado.

A partir de las evaluaciones cualitativas y cuantitativas se seleccionó el aislamiento con la capacidad de solubilizar las dos fuentes de fósforo evaluadas.

#### **6.5 Curva de crecimiento del mejor aislamiento solubilizador de fósforo bajo diferentes fuentes de fósforo insoluble.**

##### **6.5.1 Preparación de inóculo.**

Se realizó una reactivación a partir de un vial del aislamiento T3A y se incubó a  $23^\circ\text{C} \pm 2$  por 7 días. Posteriormente, se realizó una suspensión de  $1 \times 10^7$  conidios/mL u

estructuras reproductivas en 250 mL de solución salina al 0.85% en erlenmeyer de 500 mL.

### **6.5.2 Fermentación en medio líquido.**

Se preparó un volumen efectivo de trabajo (VET) de 20 mL en un erlenmeyer de 100 mL, de medio NBRIP suplementado con fosfato tricálcico, fosfato de aluminio y roca fosfórica como fuente de fósforo insoluble (Anexo B), con un inóculo de 2 mL o 10% del VET y se llevó a incubación por 7 días a  $23^{\circ}\text{C} \pm 2$  a 120 rpm. Este procedimiento se realizó por cuadruplicado, evaluando producción de biomasa, consumo de sustrato, fósforo soluble liberado y pH durante los 7 días de cultivo.

### **6.5.3 Medición de biomasa por peso seco.**

Se utilizaron tubos de centrifugado de 50 mL, y se llevaron a un horno de secado a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Se pesaron en una balanza analítica, registrando los datos con la unidad de mg. Se tomó el volumen total de cultivo (20 mL) y se transfirió a tubos de 50 mL secos y pesados, se centrifugaron 15 minutos a 5000 rpm. El sobrenadante fue descartado y se realizaron tres lavados con solución salina al 0.85%, posteriormente se centrifugaron (5000 rpm por 15 min), descartando el sobrenadante. Se llevaron nuevamente a un horno de secado a  $60^{\circ}\text{C}$  por tres días, registrando el peso de los tubos cada 24 horas, hasta peso seco constante (70, 71, 72). Este procedimiento se realizó por cada réplica.

### **6.5.4 Consumo de sustrato.**

Se evaluó el consumo de glucosa mediante la técnica del ácido 3,5-dinitrosalicílico DNS (Anexo D) (73).

### **6.5.5 Cuantificación del fósforo soluble liberado.**

La cuantificación del fósforo soluble se realizó mediante el procedimiento ya descrito en el numeral 5.4.4 (Anexo C) (67).



## **6.6 Cuantificación de la actividad solubilizadora de fósforo bajo diferentes pH de arranque.**

### **6.6.1 Preparación de inóculo.**

Se realizó una reactivación a partir de un vial del aislamiento T3A y se incubó a  $23^{\circ}\text{C} \pm 2$  por 7 días. Posteriormente, se realizó una suspensión de conidios u estructuras reproductivas en tubo 16 x 150 mm tapa rosca con solución salina al 0.85% y se preparó un inóculo con concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/mL u estructuras reproductivas.

### **6.6.2 Cuantificación del fósforo soluble bajo diferentes pH de arranque.**

A partir del inóculo se tomaron 160  $\mu\text{L}$  y se adicionaron a un erlenmeyer de 100 mL con 20 mL de medio NBRIP suplementado con fosfato tricálcico, fosfato de aluminio y roca fosfórica como fuente de fósforo insoluble, evaluando un pH inicial de 4, 5, 6 y 8 para cada uno de los medios de cultivo. La cuantificación del fósforo soluble se realizó mediante el procedimiento ya descrito en el numeral 5.4.4. (Anexo C). Este procedimiento se realizó por cuadruplicado.

## **6.7 Identificación de los ácidos orgánicos involucrados en el proceso de solubilización mediante cromatografía de capa fina (TLC).**

A partir del inóculo (preparado según numeral 5.4.2) se tomaron 160  $\mu\text{L}$  y se adicionaron a un erlenmeyer de 100 mL con 20 mL de medio NBRIP suplementado con fosfato tricálcico y fosfato de aluminio como fuente de fósforo insoluble, se incubaron a  $23^{\circ}\text{C} \pm 2$  y 120 rpm durante 5 días. Pasado el tiempo de incubación cada muestra se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos, se tomó el sobrenadante y se filtró a través de una membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ . En placas de sílica gel G/UV 254, se depositaron 10  $\mu\text{L}$  de la muestra, se dejó secar y se realizó el corrido con la fase móvil acetona-agua-cloroformo-etanol-hidróxido de amonio con relaciones 30:2:6:40:22. Las placas fueron reveladas con una solución que contenía 0,125 mg de rojo de metilo y 0,125 mg de azul de bromofenol en etanol al 70%, finalmente, se procedió a obtener la relación de frente (Rf) (74, 75, 76).

## **6.8 Análisis de datos**

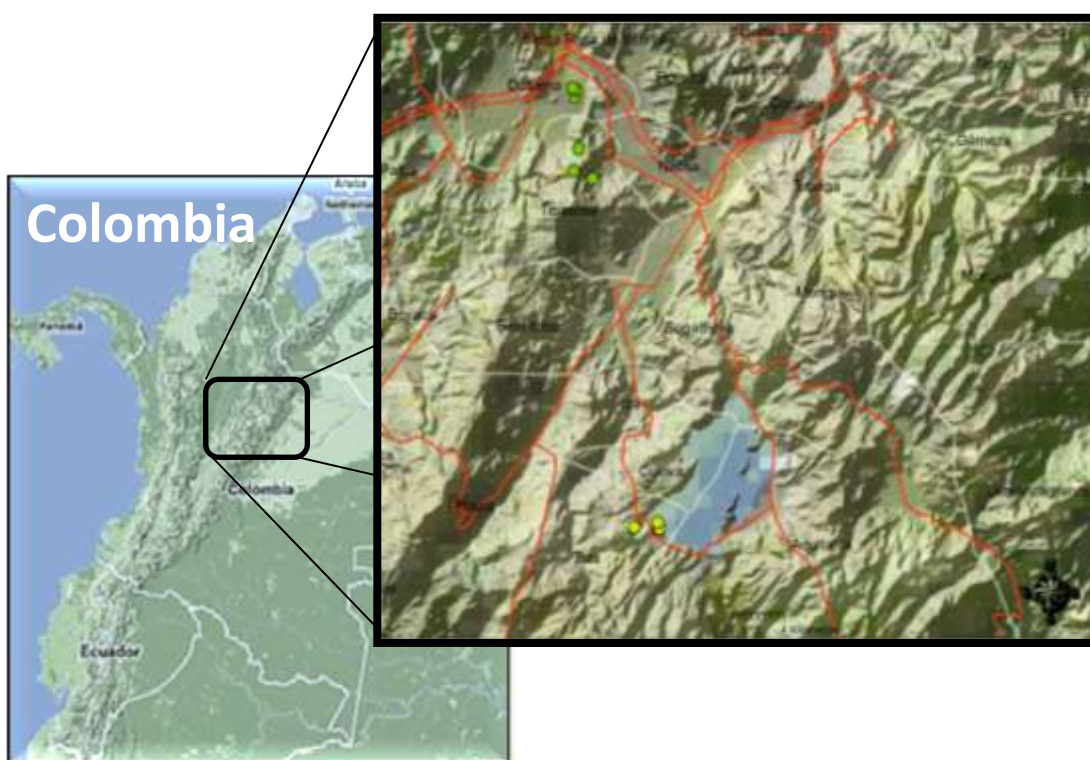
A partir de cada experimento, se evaluó la normalidad de los datos por medio de la prueba de Shapiro-wilk y la homogeneidad de varianzas para definir la distribución de los datos.

El análisis de varianza ANOVA y las pruebas post-hoc (prueba de Tukey), se llevaron a cabo para determinar diferencias estadísticamente significativas de las mejores actinobacterias solubilizadoras de fósforo de acuerdo a los resultados que arrojaron cada una de las pruebas, los datos sometidos a este análisis presentaron normalidad y homogeneidad de varianzas, si este parámetro no era cumplido los datos eran analizados por Kruskal-Wallis que determinaba igual diferencias estadísticamente significativas. Así mismo, para determinar la relación entre las pruebas cualitativas y cuantitativas y de la solubilización del fósforo con el pH se empleó el análisis de correlación de Spearman (77).

## 7. Resultados y Discusión

### 7.1 Aislamiento y caracterización morfológica de las actinobacterias

A partir de las muestras de suelo tomadas de los diferentes puntos de muestreo demarcados por el sistema de georeferenciación, se realizó el mapa en el que se observan claramente los puntos donde fueron obtenidos los aislamientos en las localidades de Tota y Paipa en el departamento de Boyacá, Colombia.



**Figura 2. Mapa de Colombia.** Localización de cada uno de los puntos de muestreo en las localidades de Tota y Paipa en el departamento de Boyacá

La tabla 1 muestra el número total de actinobacterias aisladas de acuerdo a los puntos de muestreo y algunos parámetros del análisis de suelos en estos puntos.

**Tabla 1. Análisis de suelos y aislamiento de actinobacterias**

Localidad	Punto de Muestreo	pH	% Humedad	% C.O	P Total (mg/kg)	P Disponible (mg/kg)	Número de Aislamientos
Tota	T1	4,7	70	1,1	283	64,5	10
	T3	5,3	73	1,9	766	313	7
Paipa	P1	5,5	82	2,8	751	10,3	2
	P2	5,6	84	14,1	890	15,1	6
	P3	7,2	84	8,7	874	37,1	2
	P4	5,0	82	2,0	267	9,9	1
	P5	4,3	86	2,2	291	6,1	4

Se aislaron un total de 32 actinobacterias, 17 de estas pertenecientes a la localidad de Tota y 15 a la localidad de Paipa, todos los aislamientos fueron codificados con base en la localidad y el punto de muestreo del cual procedieron. Según Kuster (1968) las actinobacterias son consideradas uno de los grandes grupos presentes en el suelo, sin embargo, la distribución y actividad de estos microorganismos está determinada por la cantidad de nutrientes disponibles en el suelo tales como carbono orgánico total, nitrógeno y fósforo, así como por la ubicación geográfica, el tipo de suelo, la temperatura, el pH, el contenido de materia orgánica, el cultivo, la aireación y la humedad (78, 79, 80).

No se encontraron diferencias en la cantidad de aislamientos obtenidos a partir de las localidades muestreadas, no obstante el número de actinobacterias recuperadas en condiciones *in vitro* puede variar por diferentes factores ya sea del suelo o de la técnica de aislamiento realizada. De acuerdo a las características físico-químicas que presentaron los suelos muestreados (Anexo E), se observa que la mayoría de los puntos presentaron pH ácido; según lo reportado, se cree que suelos neutros a alcalinos favorecen el crecimiento y desarrollo de estos microorganismos, sin embargo es posible encontrar actinobacterias acidófilas y ácido-tolerantes (81), estudios de distribución de estos microorganismos han demostrado que en suelos ácidos es frecuente encontrar actinobacterias siendo el género *Streptomyces* el más dominante, seguido por *Micromonospora*, *Actinoplanes* y *Glycomyces*, otros géneros como *Actinomadura*, *Dactylosporangium* y *Streptosporangium* también han sido reportados, pero son más comunes en suelos alcalinos (80, 82, 83, 84). Otra propiedad importante en el desarrollo y crecimiento de actinobacterias tiene que ver con los altos contenidos de materia orgánica que favorecen la multiplicación y actividad de estos microorganismos (5, 82), dadas estas características, es posible que la cantidad de aislamientos obtenidos estén relacionados

con los bajos porcentajes de materia orgánica que presentaban los suelos en Tota y Paipa; sin embargo, la cantidad obtenida a partir de estas dos zonas, presenta una ventaja frente a estudios como los de Franco-Correa (2008) que aisló un total de 30 actinobacterias a partir de siete zonas de muestreo ubicadas en los departamentos de Cundinamarca y Boyacá en Colombia (5). En cuanto a la humedad, las actinobacterias al ser principalmente aerobias se desarrollan en suelos bien aireados, suelos con humedades entre el 80 y 90 % pueden ser perjudiciales para el crecimiento de estos microorganismos (5, 81), lo que explica posiblemente la cantidad de aislamientos que se obtuvo en cada uno de los puntos muestreados de la localidad de Paipa. Considerando los resultados obtenidos y dado que los suelos de Tota y Paipa presentaron características atípicas para el crecimiento y desarrollo de actinobacterias entre ellas pH ácido, grandes cantidades de aluminio y hierro, bajo contenido de nutrientes, es posible aislar este tipo de microorganismos, lo que sugiere el enorme potencial biotecnológico que pueden tener estos y que ha sido poco explorado en suelos tropicales como los de Colombia.


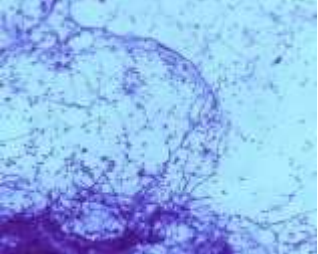

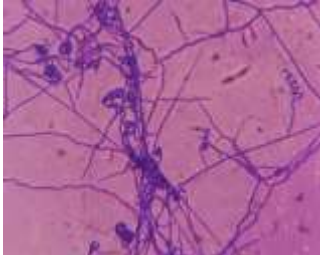

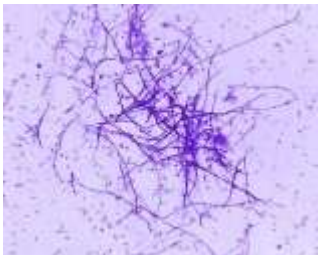
En cuanto a la técnica de aislamiento cabe resaltar que el estudio de actinobacterias se ha llevado a cabo tradicionalmente mediante técnicas dependientes de cultivo (85), dentro de estas, el medio avena ha sido usado ampliamente en la recuperación de actinobacterias a partir de suelos, favoreciendo el crecimiento de estos microorganismos al contener elementos fácilmente asimilables, además de la presencia de vitaminas, hierro, fósforo, calcio, magnesio y minerales que favorecen la esporulación de las actinobacterias (86). Por lo anterior, es un medio de cultivo estándar que favorece el aislamiento de especies en su mayoría pertenecientes al género *Streptomyces* permitiendo el estudio morfológico de estas, este hecho se encuentra relacionado directamente con que los Streptomyces suelen ser el género más común encontrado en suelos debido a que presentan tasas de crecimiento más altas en medios de cultivo sintéticos (87, 88, 89), lo que sugiere que probablemente la mayoría de los aislamientos obtenidos pertenecen a este género. Es importante mencionar que esta metodología de aislamiento puede limitar la recuperación de otros géneros de actinobacterias y que estos podrían ser aislados mediante metodologías que incluyan una variedad de técnicas de enriquecimiento combinadas con el uso de medios de cultivo suplementados con agentes antimicrobianos (89). Otra de las limitantes, que presenta esta metodología de aislamiento, es que al usar un medio de cultivo no selectivo para el crecimiento de


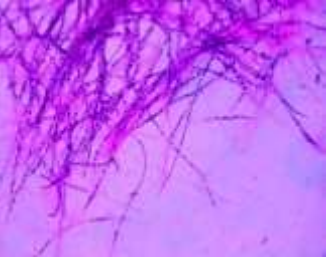

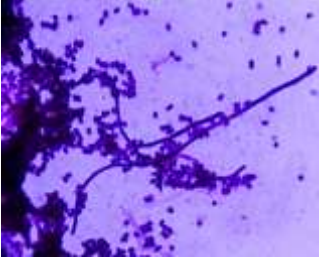

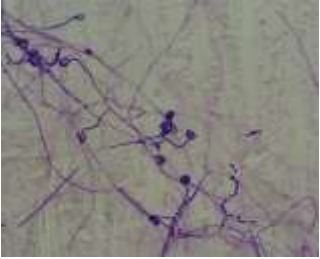
actinobacterias, estas presentan una desventaja competitiva que puede reducir la densidad de los aislamientos al requerir un tiempo de incubación más largo comparado con otros microorganismos que habitan el suelo (hongos, bacterias) y que también pueden ser recuperados en este medio, por lo anterior, es necesario diseñar o usar otros medios de cultivo que reduzcan el desarrollo de otros microorganismos competitivos sin afectar el desarrollo de actinobacterias (89).

Durante y previo a los procesos de aislamiento y purificación, los 32 aislamientos obtenidos fueron caracterizados macroscópicamente y microscópicamente, los resultados de la caracterización se encuentran en la Tabla 2 y Tabla 3, respectivamente. La caracterización morfológica permitió realizar la descripción de cada una de las actinobacterias aisladas, sin embargo esta puede no ser adecuada para la diferenciación entre géneros (90); en cuanto a la caracterización microscópica esta confirmó que las actinobacterias aisladas fueron Gram positivas, presentaron filamentos delgados, ramificados, que se fragmentaban en unidades más pequeñas algunas de estas en formación de espiral, rectiflexible o retinaculiperti al igual que conidios simples, dobles u organizados en cadenas cortas o largas (5, 43, 87); la caracterización macroscópica evidenció que las actinobacterias aisladas presentaban colonias puntiformes que se adherían fuerte al medio de cultivo, las texturas eran pulverulentas a secas, los colores de las colonias mostraban en su mayoría tonalidades blancas, grises, cafés, amarillas, naranjas y algunas presentaban producción de pigmentos difusibles al medio, así mismo, la mayoría de aislamientos presentaron olor a suelo húmedo característico del género *Streptomyces* y otras actinobacterias por la producción del metabolito geosmina que le da el olor característico al suelo (87; 91 ).


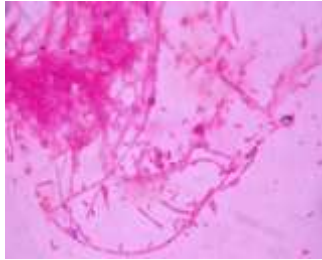




Debido a que la taxonomía de actinobacterias es bastante compleja usando los métodos tradicionales basados en la caracterización morfológica, es recomendable realizar análisis bioquímicos, quimiotaxonómicos o moleculares para dar un resultado más acertado en el género y especie de actinobacterias (43, 88, 92).


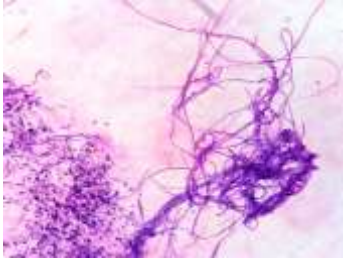



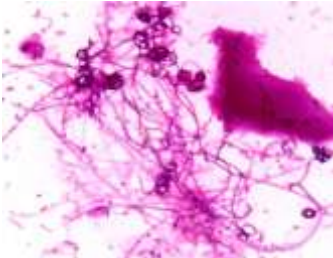
**Tabla 2. Características macroscópicas y microscópicas de los aislamientos obtenidos en la localidad de Tota en el departamento de Boyacá.**




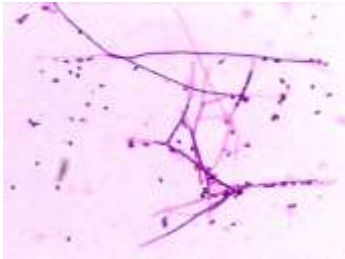

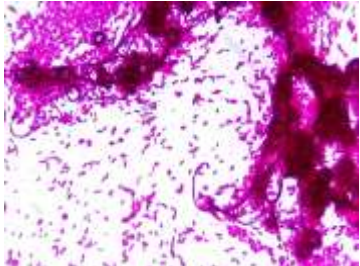
Macroscopía	Microscopía
<p><b>T1A:</b> Colonias pequeñas blancas de aspecto cremoso, se observa algo de conidiación en el centro, sin color en el reverso.</p>	<p>Bacteria filamentososa con micelio delgado y tortuoso, se observa la presencia de conidios ovalados.</p>
	
<p><b>T1B:</b> Colonias grises oscuras puntiformes secas y pulverulentas con pequeños puntos blancos, de borde regular sin pigmentos y sin color en el reverso.</p>	<p>Filamentos medianos delgados con formación no tortuosa, que se fragmentan formando cadenas de conidios retinaculiaperti</p>
	 <p>Possible género: <i>Streptomyces</i></p>
<p><b>T1C:</b> Colonias pequeñas secas, con una leve coloración café de borde irregular, sin colores en el reverso ni pigmentos difusibles.</p>	<p>Micelio de filamentos delgados, con formación de conidios pequeños.</p>
	
<p><b>T1D:</b> Colonias secas y blancas con conidiación blanca a partir del centro de borde regular sin colores en el reverso ni pigmentos difusibles.</p>	<p>Filamentos delgados que se fragmentan en conidios con forma redonda</p>


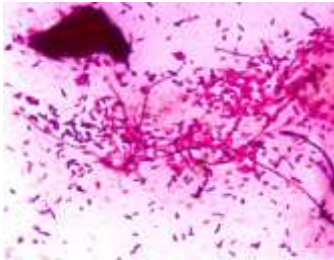

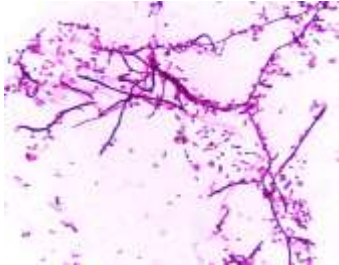
	
<p><b>T1E:</b> Colonias secas pulverulentas con alta conidiación de color blanco pero que se tornan de color gris con el tiempo, sin pigmentos difusibles ni color en el reverso.</p>	<p>Micelio de tamaño mediano, simple y no tortuoso, con conidios redondos (en ocasiones algo ovalados).</p>
	
<p><b>T1F:</b> Colonias blancas secas, con una alta conidiación puede tomar un leve tono rojo, puede producir exudados y el reverso de la colonia muestra tono rojo.</p>	<p>Micelio delgado, no tortuoso que se desprende en cadenas de conidios con formación espiral, los conidios son grandes ovalados.</p>
	 <p>Posible género: <i>Streptomyces</i></p>
<p><b>T1G:</b> Colonias puntiformes, con conidias en el centro de color blanco. Pero que puede tomar una coloración amarillo quemado con el tiempo . sin pigmentos difusibles.</p>	<p>Micelio delgado se puede observar algunas formas bacilares y filamentos largos y una baja presencia de conidios.</p>



	
<p><b>T1H:</b> Colonias secas blancas pulverulentas con borde regular y sin pigmentos difusibles ni colores en el reverso.</p>	<p>Filamentos que pueden presentar una formacion en su mayoría tortuosa, con cademas largas de conidios formadas en espiral que posteriormente se desprenden.</p>
	 <p>Possible género: <i>Streptomyces</i> sp.</p>
<p><b>T1I:</b> Colonias Blancas de tamaño mediano, con produccion de pigmetos difusibles de color rojo, el cual tambien se evidencia al reverso de las colonias pero algo mas opaco.</p>	<p>Los filamentos son delgados pero puede formar conglomerados ( a modo de rizoides) por lo que el micelio observa grueso, presenta un baja formacion de conidios.</p>
	
<p><b>T1J:</b> Colonias secas blancas con conidiacion blanca que crece a partir del centro, sin formacion de pigmentos o rasgos caracteristicos al reverso.</p>	<p>Micelio delgado de filamentos largos que forman ramificacions, gran cantidad de conidios grandes y redondos.</p>




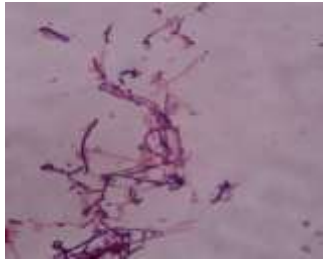


	 <p>Posible género: <i>Streptomyces</i></p>
<p><b>T3A:</b> colonias secas pulverulentas de color blanco crema, con el tiempo al parecer puede tomar una coloración oscura verde-grisacea. En el reverso no tiene ninguna característica ni produce pigmentos difusibles.</p>	<p>Se observan filamentos fragmentados de tamaño mediano poco tortuosos, con baja presencia de conidios, es posible observar algunos bacilos.</p>
	
<p><b>T3B:</b> Colonias blancas seca y pulverulentas de crecimiento muy rápido y que se tornan de color gris con el tiempo, de borde regular y sin pigmentos.</p>	<p>De filamentos tortuosos, con formaciones de cadenas de conidios en forma de espiral. Los conidios son redondos.</p>
	 <p>Posible género: <i>Streptomyces</i></p>
<p><b>T3C:</b> Colonias blancas secas con conidiación a partir del centro de la colonia. Sin pigmentos difusibles ni rasgos en el reverso.</p>	<p>Filamentos simples con baja producción de conidios, en algunas zonas es posible observar fragmentos de conidios de forma bacilar.</p>


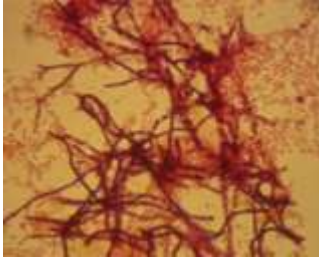

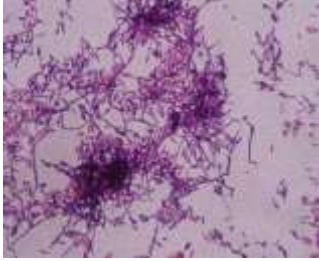



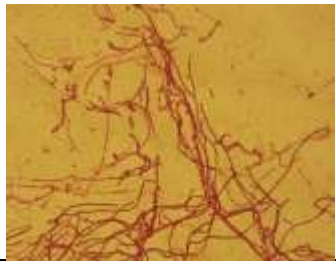
	
<p><b>T3D:</b> Colonias blancas cremosas con un poco conidacion en el centro que con el tiempo toma un leve color gris.</p>	<p>Filamentos simples y delgados en donde se pueden observar conidios redondos algunos levemente ovalados. Ramificación verticilada.</p>
	
<p><b>T3F:</b> Colonias cremosas pero que en el centro presentan conidiacion de color blanco seco y pulverulento, con el tiempo se tornan de color cafe. Sin pigmentos difusibles ni rasgos en el reverso .</p>	<p>Filamentos medianos poco fragmentados no tortuosos, con baja presencia de conidios.</p>
	 <p>Posible género: <i>Streptomyces</i></p>
<p><b>T3G:</b> Colonias de color rosado, de borde irregular con alta esporulacion con pigmentos difusibles al medio de color amarillo que con el tiempo se torna rojo, el cual se observa en zonas masivas y al reverso</p>	<p>Bacterias filamentosas medianas poco fragmentadas y poco tortuosa, conidios grandes, ovalados.</p>


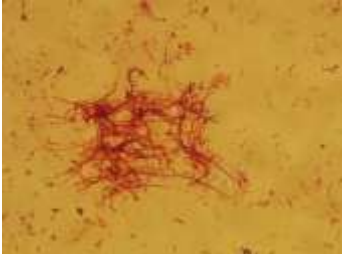

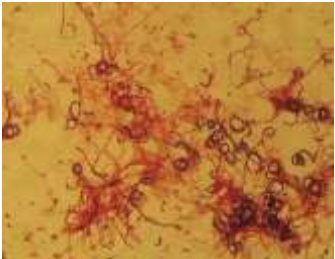

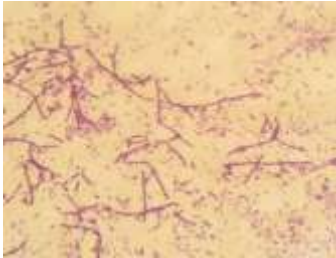
	
<p><b>T3H:</b> Colonias secas con una leve esporulacion blanca que se torna oscura grisacea, de bordes regulares sin pigmentos difusibles ni rasgos caracteristicos en el reverso</p>	<p>Filamentos largos delgados de formacion poco tortuosa y sin fragmentar. Ramificación verticilada</p>
	




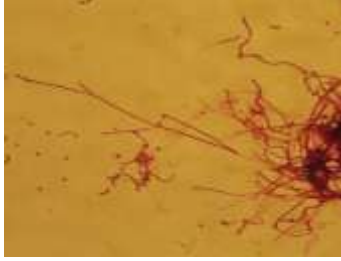

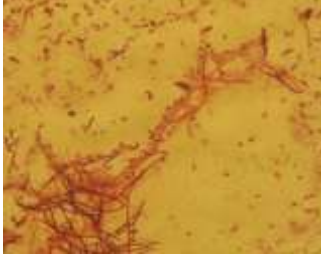


**Tabla 3. Características macroscópicas y microscópicas de los aislamientos obtenidos en la localidad de Paipa en el departamento de Boyacá.**

<b>Macroscopía</b>	<b>Microscopía</b>
<p><b>P1B</b> Colonias secas pulverulentas, anverso de color blanco luego se tornan grises, con pigmentos difusibles amarillos a naranjas.</p>	<p>Micelio delgado que se fragmenta en conidios ovalados organizados en cadenas cortas.</p>
	

<p><b>P1D</b> Colonias pequeñas, secas y pulverulentas anverso de color blanco igual al reverso.</p>	<p>Filamentos no fragmentados de tamaño mediano con conidios en forma bacilar.</p>
	
<p><b>P2E</b> Colonias secas pulverulentas, de tamaño mediano, anverso color gris pigmento difusible color naranja a marrón.</p>	<p>Micelio de tamaño mediano que se fragmenta en unidades de conidios ovalados en forma de espiral.</p>
	
<p><b>P2J</b> Colonia seca pulverulenta de color blanco a gris, se observa la presencia de un pigmento de tonos café.</p>	<p>Filamentos delgados, ramificados que se fragmentan en conidios más pequeños en forma de espiral, los conidios son redondos.</p>
	 <p>Possible género: <i>Streptomyces</i></p>
<p><b>P2K</b> Colonia seca pulverulenta, anverso color gris claro reverso marrón pigmento difusible al medio color marrón.</p>	<p>Filamentos de tamaño mediano, poco tortuoso, se fragmenta en cadenas de conidios rectiflexibles y de forma ovalada.</p>

	
<p><b>P2M</b> Colonias blancas secas pulverulentas, sin color en el reverso ni presencia de pigmentos difusibles.</p>	<p>Filamentos delgados fragmentados, formación de conidios ovalados.</p>
	
<p><b>P2Q</b> Colonias grandes, blancas, secas y pulverulentas con reverso de color naranja pálido.</p>	<p>Filamentos delgados, largos fragmentados en cadenas de conidios que cuando se desprenderse son grandes de forma redonda a ovalada.</p>
	 <p>Posible género: <i>Streptomyces</i></p>
<p><b>P2R</b> Colonias de tamaño mediano, blancas que se tornan a grises, secas y pulverulentas, reverso de color amarillo pálido.</p>	<p>Micelio vegetativo no fragmentado que se fragmenta en cadenas de conidios rectiflexibles y que presentan formas ovaladas.</p>
	

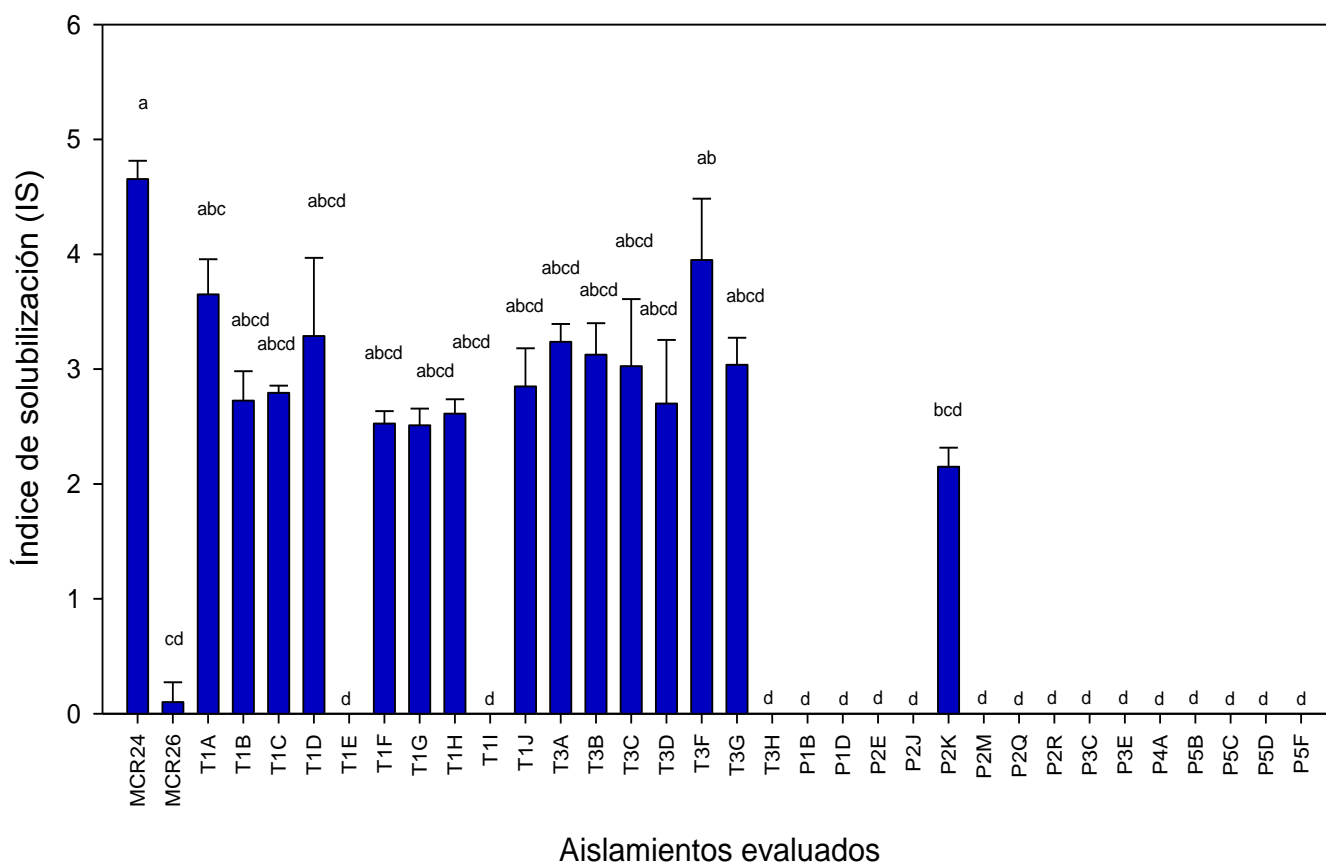
<p><b>P3C</b> Colonias de color blanco a rosado algunas con color negro en el centro.</p>	<p>Filamentos delgados ramificados, tortuosos que se fragmentan en unidades de conidios ovalados grandes.</p>
	
<p><b>P3E</b> Colonia seca y pulverulenta, anverso color café oscuro con conidiación de color blanco, reverso café, sin pigmentos difusibles.</p>	<p>Micelio delgado, ramificado, tortuoso con gran cantidad de conidios organizados en cadena y formando espirales, conidios al desprenderse de forma redonda.</p>
	 <p>Possible género: <i>Streptomyces</i></p>
<p><b>P4A</b> Colonia seca, pulverulenta anverso color blanco algunas colonias con centro color amarillo quemado, reverso color amarillo quemado tornando a café.</p>	<p>Filamentos, delgados largos con aparentes cadenas de conidios rectiflexibles, conidios al desprenderse grandes y redondos.</p>
	
<p><b>P5B</b> Colonias secas pulverulentas de color gris claro con blanco, reverso marrón oscuro,</p>	<p>Filamentos delgados, largos y ramificados que se fragmentan en conidios de forma ovalada a</p>

pigmento difusible al medio de igual color.	redonda.
	
<p><b>P5C</b> Colonias de color gris claro con blanco, secas y pulverulentas que presenta tamaño mediano a grande, reverso color crema y sin presencia de pigmentos difusibles en el medio.</p>	<p>Micelio vegetativo, delgado, no tortuoso y no fragmentado se observan conidios ovalados formando cadena cortas</p>
	
<p><b>P5D</b> Colonia seca, pulverulenta de color blanco tornando a gris algunas con centro color negro, presencia de pigmento difusible en el medio de color marrón.</p>	<p>Filamentos delgados, largos con fragmentaciones que dan lugar a conidios, los cuales al desprenderse presentan forma ovalada a redonda. Algunas cadenas de conidios con formación en espiral.</p>
	
<p><b>P5F</b> Colonias grandes, secas y pulverulentas, color gris claro sin color en el reverso ni presencia de pigmentos difusibles.</p>	<p>Micelio delgado, no fragmentado, se observan conidios redondos, organizados en cadenas cortas.</p>
	 <p>Possible género: <i>Streptomyces</i></p>



## 7.2 Evaluación de las pruebas cualitativas para la selección de actinobacterias solubilizadoras de fósforo

Posterior a la caracterización morfológica se procedieron a evaluar los 32 aislamientos como fosfato solubilizadores empleando dos pruebas cualitativas (sólida y líquida). Los resultados de la evaluación cualitativa en medio sólido se encuentran en la Figura 3, a continuación.



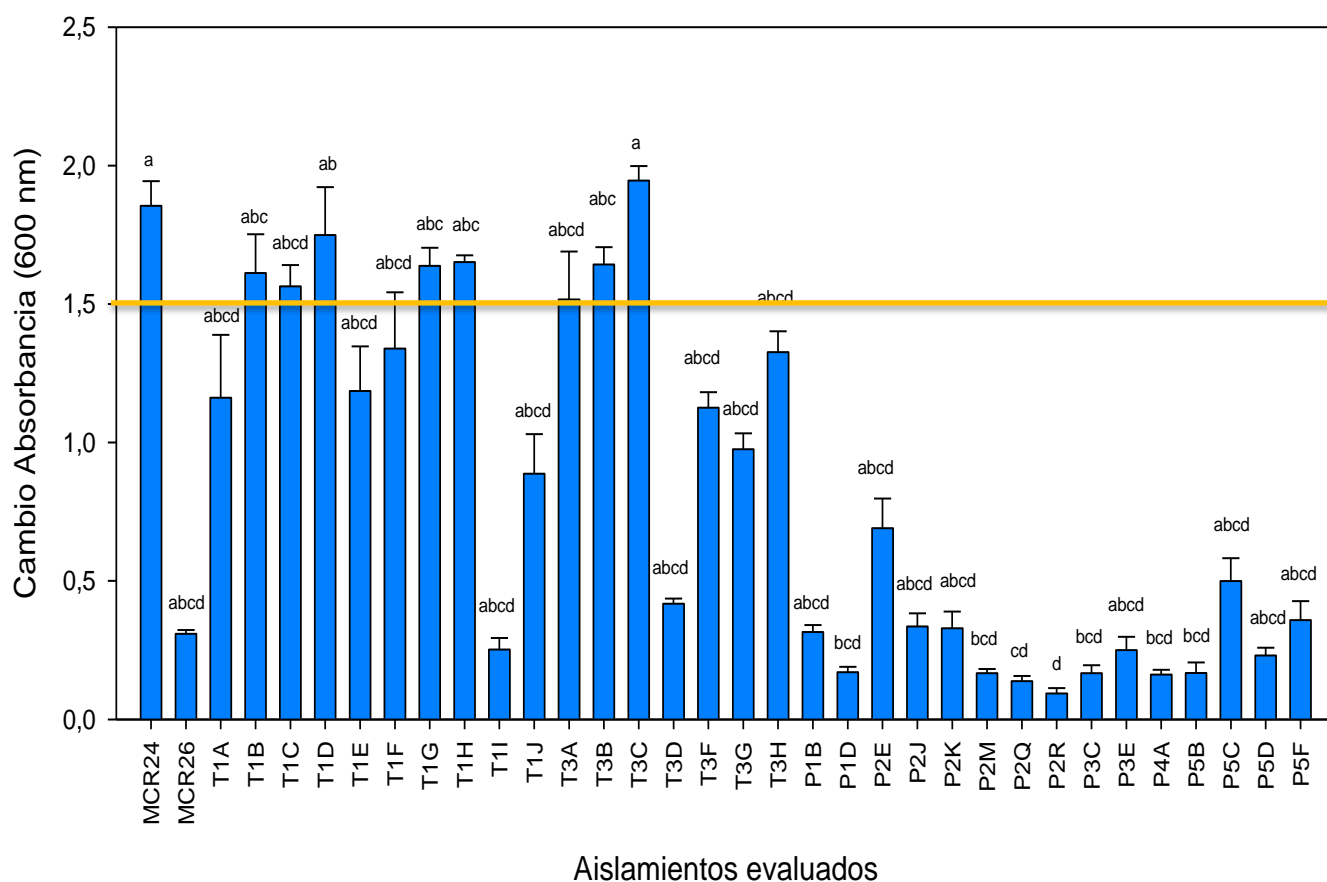
**Figura 3. Resultados de la evaluación cualitativa en medio sólido SMRS-1.** El eje (x) representa los aislamientos evaluados. El eje (y) representa el índice de solubilización (IS) arrojado por cada uno de estos.

Resultados con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de acuerdo al análisis estadístico Kruskal- Wallis.

La prueba cualitativa en medio sólido SMRS-1 es una metodología de screening donde los microorganismos fosfato solubilizadores producen un halo de aclaramiento alrededor de la colonia debido a la solubilización del fosfato tricálcico y un cambio de color en el medio por el viraje del indicador de pH debido a la producción de ácidos orgánicos. La estimación del índice de solubilización (IS) en el medio SMRS-1 mostró el desarrollo de una zona de aclaramiento alrededor de la colonias y la acidificación, las mediciones oscilaron entre 0,1 y 4,65 (IS) y los resultados estadísticos permitieron diferenciar cuatro grupos donde los aislamientos: MCR24 (Control positivo), T3F y T1A presentaron los índices de solubilización más altos 4,65, 3,95 y 3,65 respectivamente. Son pocos los estudios de actinobacterias como solubilizadoras de fósforo, sin embargo Franco *et al.* (2010) evaluaron la solubilización de fósforo inorgánico en medio Pikovskaya y SMRS-1 por parte de actinobacterias, encontrando que estos microorganismos tienen la habilidad de solubilizar fósforo a partir de estos medios lo que fue confirmado durante el desarrollo de este ensayo (14). Los resultados encontrados sugieren buenas actividades de solubilización de fósforo por parte de las actinobacterias, al ser comparados con otros estudios como los de Kumar y Narula (1999) quienes evaluaron esta prueba en cepas de *Azotobacter chroococcum*, aisladas de rizosfera de trigo y encontraron un valor máximo de solubilización de 2,3 (IS) (2). Así mismo Alam *et al.* (2002) evaluaron bacterias no filamentosas, encontrando que estas presentaban un valor de solubilización (IS) de 3,29 (93). Esta primera observación, permitió demostrar la existencia de actinobacterias solubilizadoras de fósforo pertenecientes en su mayoría a la localidad de Tota.

Por otra parte, gran parte de los aislamientos de la localidad de Paipa no presentaron actividad solubilizadora de fósforo mediante esta prueba, con excepción del aislamiento P2K que presentó un índice de solubilización de 2,15, sin embargo, muchos de los aislamientos que mostraron una actividad negativa eran capaces de acidificar el medio de cultivo, esto se observó por el viraje del indicador de pH púrpura de bromocresol, pero a diferencia de los aislamientos positivos no evidenciaban la formación de un halo de aclaramiento alrededor de las colonias, este resultado concuerda con Alam *et al.* (2002) y posiblemente se debe a la producción de ácidos orgánicos por el consumo de glucosa, pero no a la solubilización del fosfato tricálcico (93).

Para confirmar la existencia de actinobacterias solubilizadoras de fósforo, se evaluó una segunda prueba cualitativa en medio líquido NBRIP- BPB. Los resultados del screening de los 32 aislamientos de las localidades de Tota y Paipa y los controles (control positivo MCR24, control negativo MCR26) se encuentran en la Figura 4, donde se determinó el cambio en el valor de la absorbancia por la decoloración del indicador de pH BPB (Anexo G).



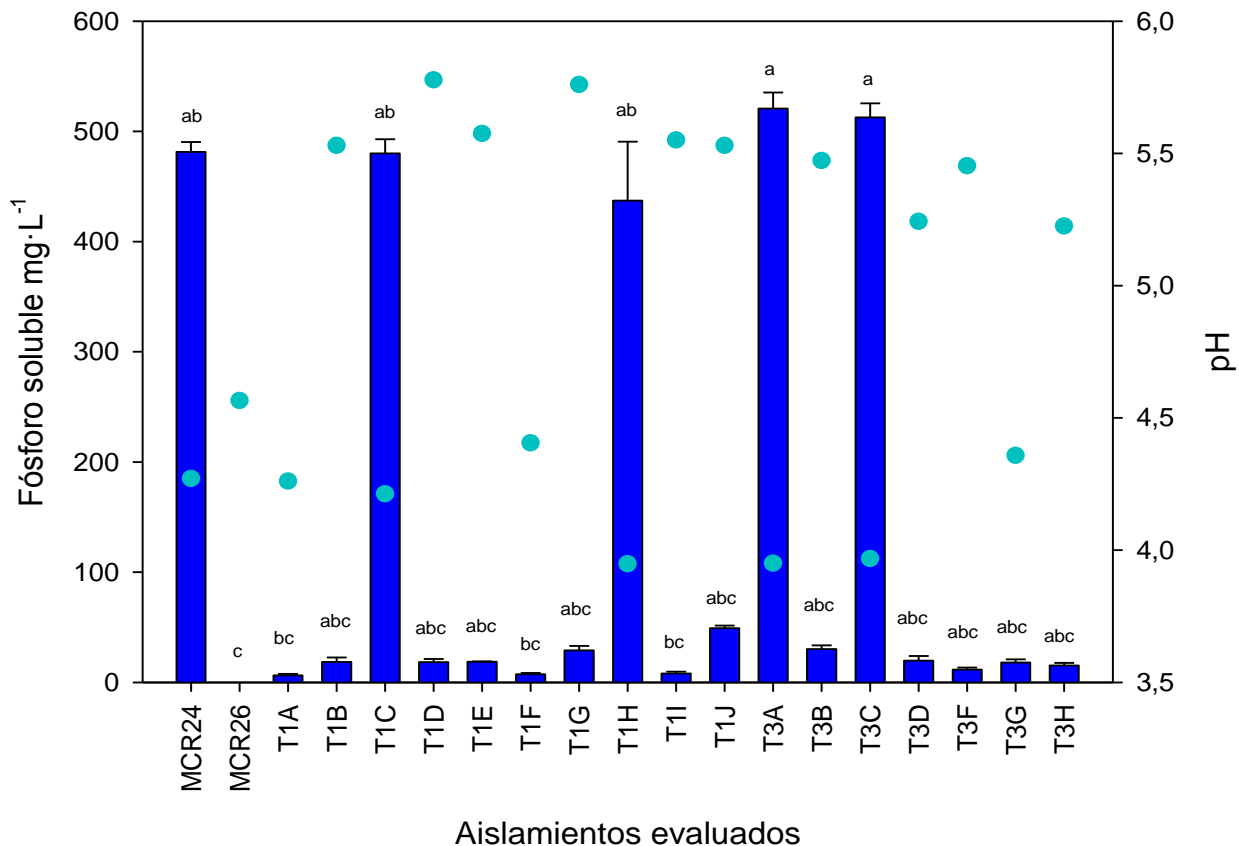
**Figura 4. Resultados de la evaluación cualitativa en medio líquido NBRIP-BPB.** El eje (x) representa los aislamientos evaluados. El eje (y) representa el cambio de absorbancia (600 nm) producto de la decoloración del medio NBRIP-BPB. Resultados con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de acuerdo al análisis estadístico Kruskal- Wallis.

Los resultados de la metodología diseñada por Mehta y Nautiyal (2001) muestran cambio de absorbancia a 600 nm en los 32 aislamientos evaluados. En efecto, algunos aislamientos no mostraron diferencias significativas en el cambio de absorbancia mientras que otros como MCR24 (control positivo) y T3C mostraron unidades de absorbancia mayores o iguales a 1,5, valor reportado por Pérez *et al.* (2007) como suficiente para seleccionar cepas con buena capacidad solubilizadora de fósforo y emplearlas en ensayos posteriores (66). Por otro lado, muchos de los aislamientos de la localidad de Paipa que habían sido designados como negativos en la prueba sólida (Figura 2), presentaban solubilización de fósforo debido al descenso de pH y la decoloración del medio NBRIP, este hecho, reveló que los resultados entre la detección del halo de aclaramiento en medio sólido y la solubilización de fósforo en medio líquido eran contradictorios, lo que concuerda con lo reportado por Rashid *et al.* (2004) y Pérez *et al.* (2007) (66, 94) ; la fiabilidad de este método ha sido ampliamente cuestionada ya que muchas de las cepas que no muestran un halo de aclaramiento en medio sólido podrían solubilizar fósforo en medio líquido, esto posiblemente porque en el medio sólido se dificulta la difusión de los ácidos orgánicos liberados por los microorganismos para solubilizar fósforo (95) adicional a esto, se ha estudiado que la solubilización de fósforo incrementa con la ausencia de extracto de levadura presente en el medio SMRS-1 pero no en NBRIP) lo que probablemente tampoco permitió evidenciar una buena actividad solubilizadora de fósforo en medio sólido (Anexo B) (65, 96).

Los resultados obtenidos pusieron en duda la sensibilidad y credibilidad de las pruebas para la selección de microorganismos solubilizadores de fósforo, por lo que se decidió cuantificar el fósforo soluble liberado por los aislamientos de Tota, ya que estos habían mostrado las mejores actividades solubilizadoras de fósforo y posteriormente, comparar los resultados encontrados con un análisis de correlación entre las pruebas.

### **7.3 Cuantificación de la actividad solubilizadora de fósforo *In vitro***

La Figura 5 muestra los resultados de cuantificación de fósforo soluble en los aislamientos de la localidad de Tota con fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) como fuente insoluble de fósforo (Anexo H).



**Figura 5. Resultados de la evaluación cuantitativa con fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 = 5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) como fuente insoluble de fósforo.** Las barras representan la cantidad de fósforo soluble liberado, los círculos representan el valor del pH en el medio de cultivo después del tiempo de incubación. Resultados con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de acuerdo al análisis estadístico Kruskal- Wallis.

Como se observa en la figura 5, la evaluación cuantitativa de solubilización de fósforo evaluada por el método de fosfomolibdeno, muestra claramente que los aislamientos MCR24 (Control positivo), T1C, T1H, T3A y T3C presentan los valores más altos de solubilización (entre  $437,2$  y  $512,7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Estos resultados fueron mayores a los obtenidos por El-tarabily *et al.* (2006) quienes evaluaron la capacidad solubilizadora de fósforo de *Micromonospora endolithica*, *Actinoplanes sp.* y *Streptosporangium sp.* y por Gupta *et al.* (2010) con *Streptomyces sp.*, no obstante, los valores obtenidos coinciden con los ensayos realizados por Chen *et al.* (2006) que evaluaron esta actividad en actinobacterias pertenecientes a los géneros de *Rhodococcus sp.* y *Arthrobacter sp.* los

cuales presentaron actividades de 186,9 y 519,7 mgP·L<sup>-1</sup>, respectivamente (10, 61, 97). Otros reportes, sugieren que las actinobacterias aisladas presentan buena solubilización con cantidades de fósforo soluble que igualan o superan a las producidas por bacterias no filamentosas como *Burkholderia cepacia*, *B. vietnamiensis*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y otras pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, conocidas ampliamente por su capacidad solubilizadora de fósforo y porque generalmente son propuestas para el diseño de bioinoculantes (26, 66, 98, 99).

Aunque diferentes mecanismos de solubilización de fósforo pueden ser llevados a cabo, el principal se da por la producción de ácidos orgánicos (56). Un cambio significativo en el valor de pH de los mejores aislamientos (MCR24, T1C, T1H, T3A y T3C) se evidenció en la Figura 5 con la solubilización de fosfato tricálcico, sugiriendo la producción de ácidos orgánicos por parte de las actinobacterias, este hecho era de esperarse gracias a la presencia de glucosa en los medios de cultivo y que es metabolizada por actinobacterias vía Embden-Meyerhof-Parnas donde se producen H<sup>+</sup>, piruvato y ATP (100).

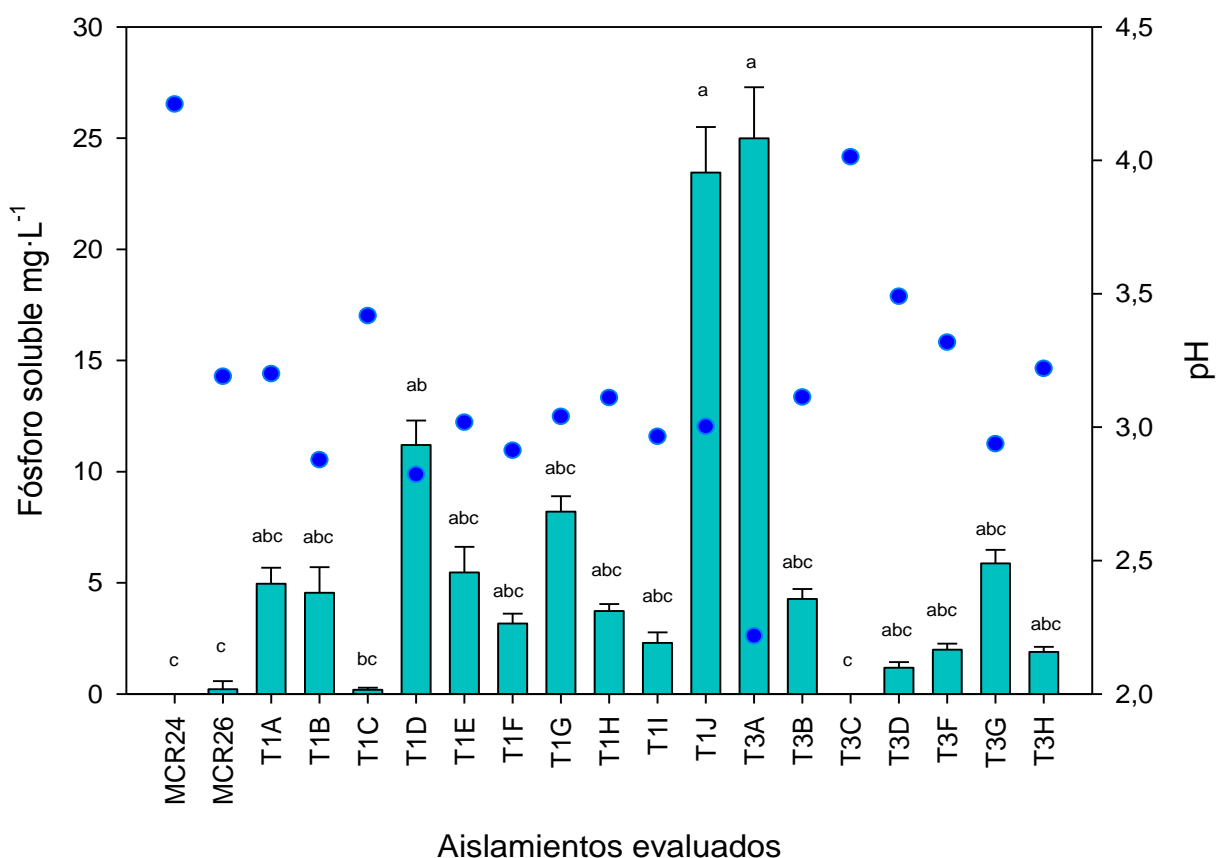
Los coeficientes de correlación de Spearman arrojaron valores significativos ( $p < 0,05$ ), estos resultados permitieron observar que existía una correlación negativa ( $r = -0,343$ ) (Anexo M) entre el pH y el fósforo solubilizado, sugiriendo que la caída del valor de pH estaba asociado con los niveles más altos de solubilización de fósforo, resultados similares son reportados por Banerjee *et al.* (2010), Alam *et al.* (2002) y Chen *et al.* (2006) (49, 61, 93, 101). Considerando estos resultados y al ser comparados con otros ensayos en actinobacterias, es posible que la liberación de ácidos orgánicos sea el mecanismo más importante de solubilización llevado a cabo por estos aislamientos (10), contrario a otros estudios en los que las actinobacterias no mostraron acidificación en el medio de cultivo, mencionando que los procesos de solubilización no son llevados a cabo por ácidos orgánicos sino por otro tipo de sustancias que actúan como quelantes y que alcalinizan el medio de cultivo (6, 31).

Es importante señalar, que no todos los aislamientos que presentaron cambios significativos en el pH arrojaban valores altos de solubilización, un ejemplo de ello fueron los aislamientos T1A, T1F y T3G que mostraron valores de pH alrededor de 4,0 pero en los que no fueron observadas altas cantidades de fósforo soluble. En tal caso, se dice que la solubilización de fósforo llevada a cabo por ácidos orgánicos, depende de las propiedades de disociación y el número de grupos hidroxilo y carboxilo que estos tengan

(27) así como de la presencia de genes implicados en la biosíntesis del cofactor pirroquinolina quinona (PQQ) que permiten la expresión del fenotipo solubilizador de fósforo (60), lo que plantea el estudio de estos mecanismos genéticos en actinobacterias. Otros autores, reportan la capacidad de algunos microorganismos de acumular fosfatos que emplean en la biosíntesis de diversos componentes celulares incluyendo ácidos nucleicos, proteínas y fosfolípidos (6, 93, 101) así que posiblemente gran cantidad de los fosfatos liberados fueron acumulados por parte de las actinobacterias, en caso contrario se podrían usar estos microorganismos en procesos de biorremediación removiendo fósforo de zonas donde se estén llevando a cabo procesos de eutrofización (101). Si bien es cierto, que la producción de ácidos orgánicos es un mecanismo importante en la solubilización, no es el único responsable de estas actividades por lo que es importante que estas sean evaluadas en las actinobacterias aisladas (61, 102).

En cuanto a los análisis de correlación de Spearman para verificar la sensibilidad de las metodologías de screening (Anexo N), es decir cual de las dos pruebas cualitativas se relacionaba más con la cuantitativa, se encontraron valores significativos ( $p < 0,05$ ) en las dos pruebas, expresando que las dos se veían relacionadas con la prueba cuantitativa, sin embargo es la prueba cualitativa líquida la que se encuentra más relacionada con la cuantitativa, con un coeficiente de correlación de 0,635, a diferencia de la sólida que presenta un coeficiente de 0,313, resultados similares son expuestos por Rodríguez y Fraga *et al.* (1999), Mehta y Nautiyal (2001), Pérez *et al.* (2007) y Hui *et al.* (2010), quienes concluyen que esta metodología es bastante fiable y rápida para la selección de microorganismos fosfato solubilizadores (4, 65, 66, 99).

Posteriormente, se realizó la cuantificación de fósforo soluble en los aislamientos de Tota con fosfato de aluminio ( $AlPO_4$ ) como fuente de fósforo insoluble, esto con el fin de evaluar otras fuentes de fósforo insolubles. Los resultados se muestran a continuación.



**Figura 6. Resultados de la evaluación cuantitativa con fosfato de aluminio ( $\text{AlPO}_4$   $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) como fuente insoluble de fósforo.** Las barras representan la cantidad de fósforo soluble liberado, los círculos representan el valor del pH en el medio de cultivo después del tiempo de incubación. Resultados con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de acuerdo al análisis estadístico Kruskal- Wallis.

La existencia de microorganismos capaces de solubilizar distintas formas de fosfato de calcio han sido reportados, sin embargo, pocos estudios investigan la solubilización de otros fosfatos como  $\text{AlPO}_4$  y  $\text{FePO}_4$  (Banerjee *et al.*, 2010), características que causan baja fertilidad en suelos ácidos como los del país (Rengel y Marschenner, 2005; Burbano, 2010), en este caso los aislamientos de Tota fueron evaluados bajo  $\text{AlPO}_4$  como se observa en la Figura 6. Los aislamientos T1J y T3A mostraron una alta actividad solubilizadora de fósforo ( $23,4 \text{ mgP}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $24,9 \text{ mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente) en comparación con los otros aislamientos evaluados. Resultados similares fueron encontrados por Delvasto *et al.* (2006), Pérez *et al.* (2007), Song *et al.* (2008) y Park *et al.* (2010) los



cuales mostraron que los microorganismos evaluados fueron eficaces en la solubilización de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  pero no de  $\text{AlPO}_4$ ; este hecho también fue evidenciado en este ensayo, ya que la solubilización del fósforo a partir de  $\text{AlPO}_4$  se produjo en menor medida comparado con la cantidad de fósforo liberado a partir de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (Figura 3) (26, 53, 66, 103). Algunos autores señalan que el fósforo soluble liberado a partir de  $\text{AlPO}_4$  pueden aumentar el nivel de toxicidad de  $\text{Al}^{+3}$  en solución y que esto podría explicar la supresión de la actividad solubilizadora de fósforo que se observa en este medio (8). No obstante, es importante aclarar que en los suelos el comportamiento es diferente; se encuentra reportado que las actinobacterias y otros microorganismos son capaces de crecer y desarrollarse en estas condiciones de estrés liberando ácidos orgánicos que forman complejos con los metales (Hierro y Aluminio) y de esta forma disminuir la toxicidad del metal (104, 105).

Los resultados también evidenciaron una reducción mayor en el pH del medio con  $\text{AlPO}_4$  que con  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , ya que estos se encontraron en un rango de 2,2 a 4,2 (Figura 3 y Figura 4), en este caso, los aislamientos que presentaron las mejores actividades de solubilización exhibieron valores bajos de pH, lo que fue confirmado con el análisis de correlación de Spearman que mostró una correlación negativa fuerte ( $r = -0,755$ ;  $p < 0,05$ ) entre el pH y la cantidad de fósforo soluble liberado (Anexo M), sin embargo, es importante señalar que la mayoría de aislamientos presentaron un pH ácido en el medio de cultivo, lo que no significó en todos los casos una alta solubilización de  $\text{AlPO}_4$ ; esto indica que posiblemente la producción de ácidos orgánicos se está llevando a cabo por parte de las actinobacterias, pero que la habilidad para quelar cationes como el Aluminio puede depender directamente del número de grupos hidroxilo que estos tengan (56, 106), en consecuencia, otros autores indican que la producción de ácidos orgánicos es un mecanismo importante pero no el más eficaz en el proceso de solubilización de  $\text{AlPO}_4$  y que posiblemente este sea llevado a cabo por otros procesos como la liberación de  $\text{H}^+$  producto de la asimilación de  $\text{NH}_4^+$  o la acción sinérgica de varios ácidos orgánicos. Los resultados también exponen, la alta estabilidad que presenta el complejo  $\text{AlPO}_4$  con respecto a  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , el cual fue fácilmente solubilizado (56, 105, 107).

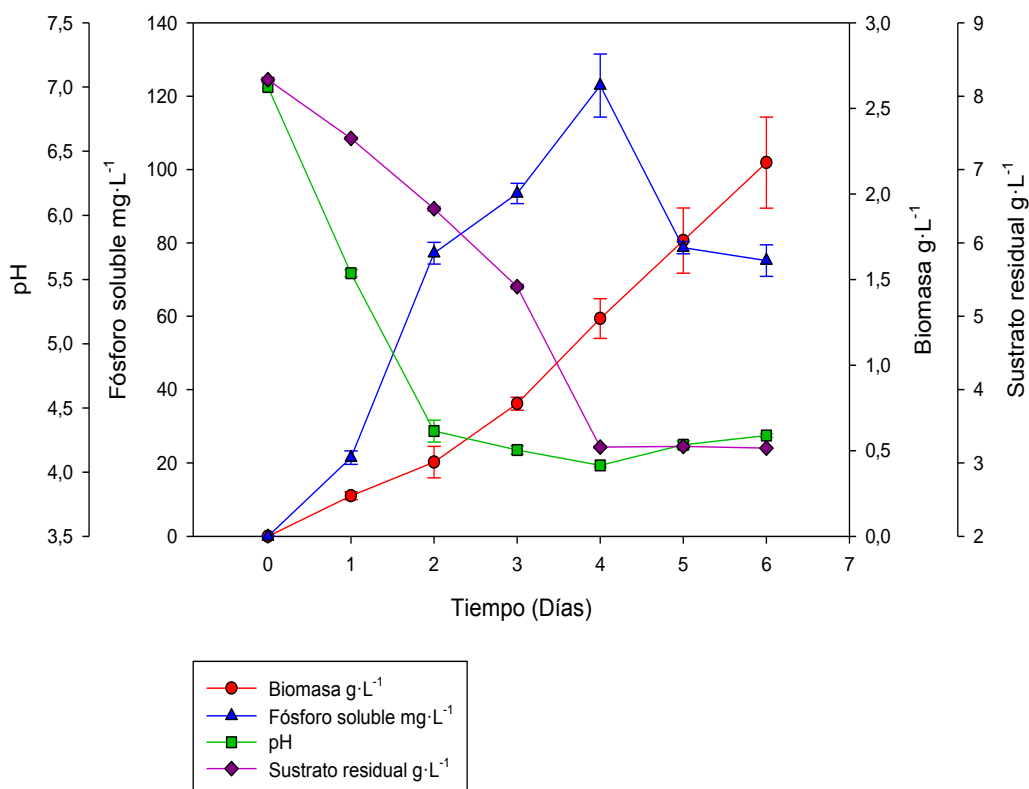
Los resultados del análisis de correlación de Spearman entre la prueba cuantitativa con fosfato tricálcico y fosfato de aluminio (Anexo O) mostraron que no existía correlación entre estas. Lo anterior, sugiere que metodologías de screening convencionales para la

selección o confirmación de microorganismos solubilizadores de fosfatos, están basadas generalmente en el uso de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , generando resultados equívocos debido a que no todos los microorganismos que presentan porcentajes altos de solubilización con esta fuente de fósforo muestran los mismos resultados con fuentes difíciles de solubilizar como  $\text{AlPO}_4$  y  $\text{FePO}_4$  comúnmente encontradas en suelos ácidos como los de Colombia (22, 66).

De acuerdo a los resultados obtenidos, el aislamiento T3A fue el único que presentó una actividad significativa en la solubilización de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  y  $\text{AlPO}_4$ , por lo que fue seleccionado para posteriores ensayos.

#### 7.4 Curva de crecimiento con T3A bajo diferentes fuentes de fósforo insoluble

En las Figuras 7, 8 y 9, se encuentra el comportamiento que presentó el aislamiento T3A bajo tres fuentes de fósforo insoluble (fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), fosfato de aluminio ( $\text{AlPO}_4$ ) y roca fosfórica) que fueron evaluadas durante seis días.

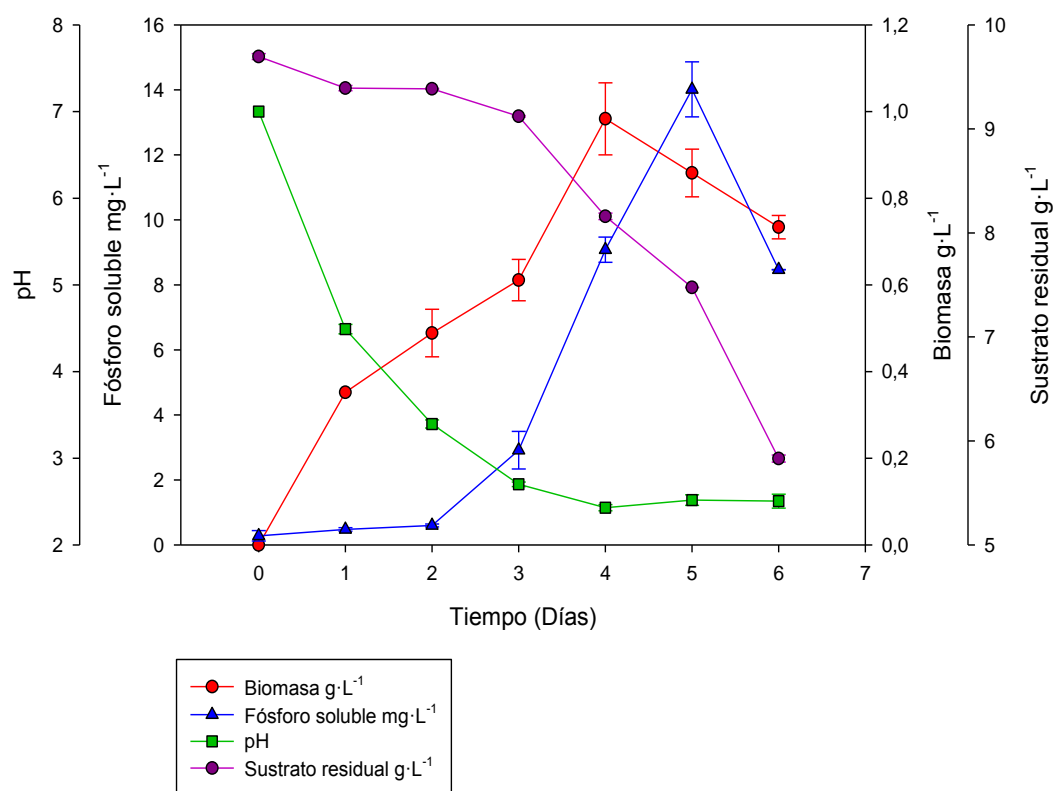


**Figura 7. Comportamiento del aislamiento T3A bajo fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) como fuente de fósforo insoluble.** El eje (x) representa el tiempo de evaluación (6 días). El eje (y) izquierdo representa la cantidad de fósforo soluble liberado ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y el pH. El eje (y) derecho representa la cantidad de biomasa producida ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y el sustrato residual ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

Los resultados obtenidos durante la curva de crecimiento del aislamiento T3A bajo  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  mostraron que el fósforo soluble alcanza un valor máximo de  $122,9 \text{ mgP}\cdot\text{L}^{-1}$  en el cuarto día de cultivo, donde se presentó el valor más bajo de pH (4,05) debido a la liberación de ácidos orgánicos por la degradación de la glucosa presente en el medio de cultivo (41). Adicionalmente, el comportamiento de la glucosa presenta una disminución rápida (8,22 a  $3,21 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) los primeros cuatro días y luego decrece lentamente, este comportamiento se presenta en simultáneo con la disminución de la cantidad de fósforo

soluble ( $78,7 \text{ mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y con un aumento significativo en la biomasa ( $1,2$  a  $2,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), que ocurre posiblemente porque el microorganismo al encontrarse en fase exponencial requiere un mayor consumo de nutrientes esenciales que pueden ser limitantes en el medio de cultivo (en este caso el fósforo) y que probablemente acumula en forma de biomasa (5, 19, 101).

Los resultados del comportamiento del aislamiento T3A bajo fosfato de aluminio se encuentran a continuación en la figura 8.

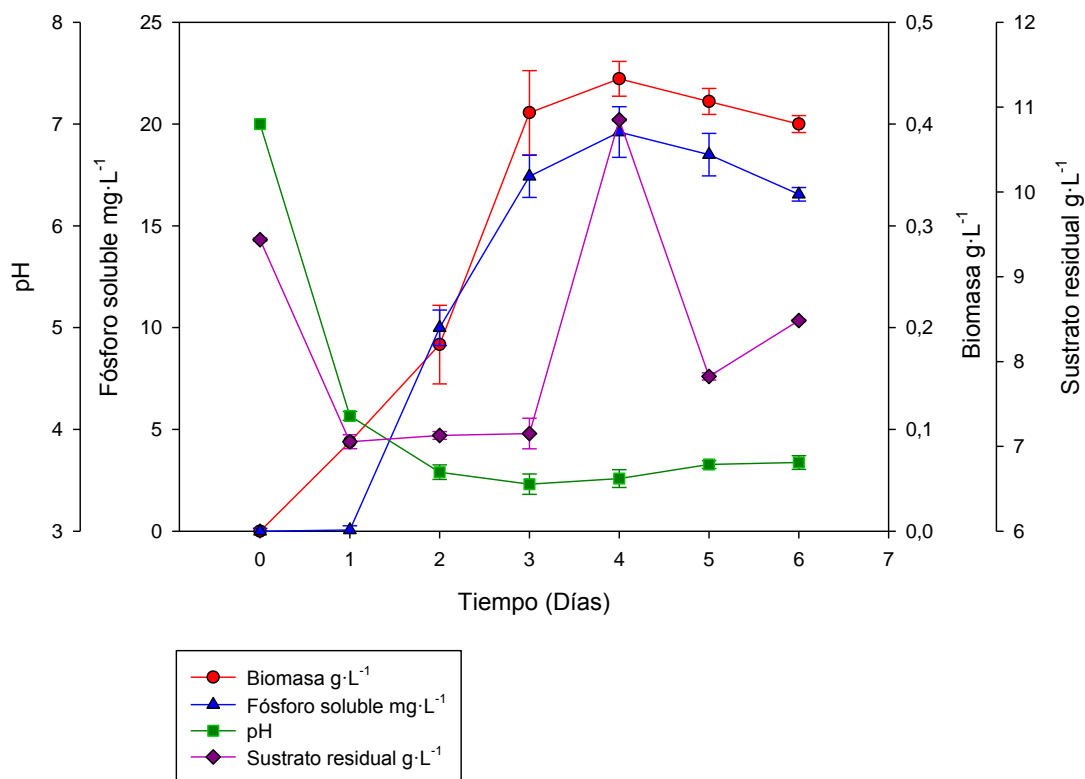


**Figura 8. Comportamiento del aislamiento T3A bajo fosfato de aluminio ( $\text{AlPO}_4$ ) como fuente de fósforo insoluble.** El eje (x) representa el tiempo de evaluación (6 días). El eje (y) izquierdo representa la cantidad de fósforo soluble liberado ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y el pH. El eje (y) derecho representa la cantidad de biomasa producida ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y el sustrato residual ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

En la Figura 8 se observa que la cantidad máxima de fósforo soluble liberado ( $14 \text{ mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ ) se alcanza al día 5 de incubación; las cantidades bajas de fósforo soluble que fueron liberadas, el tiempo en el que son alcanzadas y las tasas de crecimiento de T3A con respecto al fosfato tricálcico (Figura 7) sugieren nuevamente que la solubilización del

fosfato de aluminio es más difícil debido a la estabilidad del complejo y que este elemento puede ser tóxico para el crecimiento del microorganismo afectando la solubilización (8, 56). En este caso, se visualiza que el pH decrece progresivamente desde el momento de la inoculación del microorganismo, esto se debe posiblemente a la liberación de iones  $Al^{+3}$  por los procesos de agitación en los que se lleva a cabo el ensayo. Es importante mencionar que aunque el pH era cercano a 3 en el día 2 de crecimiento, solo se evidenciaron cantidades significativas de fósforo soluble a partir del día 3, tiempo en el que la glucosa es consumida y paralelamente se pueden estar generando ácidos orgánicos responsables del proceso de solubilización.

La Figura 9 expone el comportamiento del aislamiento T3A usando como fuente de fósforo insoluble roca fosfórica.

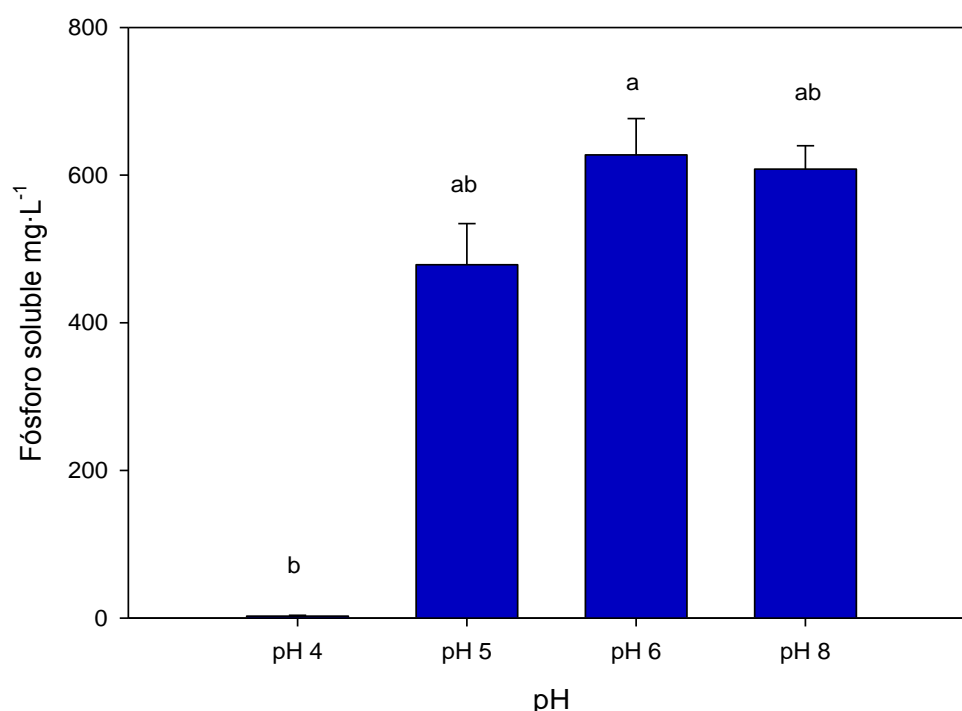


**Figura 9. Comportamiento del aislamiento T3A bajo roca fosfórica ( $0,5 g \cdot L^{-1}$ ) como fuente de fósforo insoluble.** El eje (x) representa el tiempo de evaluación (6 días). El eje (y) izquierdo representa la cantidad de fósforo soluble liberado ( $mg \cdot L^{-1}$ ) y el pH. El eje (y) derecho representa la cantidad de biomasa producida ( $g \cdot L^{-1}$ ) y el sustrato residual ( $g \cdot L^{-1}$ ).

Los resultados observados durante el comportamiento del aislamiento T3A bajo esta fuente muestran que el valor máximo de fósforo soluble fue obtenido al día 4 de crecimiento alcanzando una concentración de  $19,6 \text{ mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ , estos resultados demostraron la presencia de actinobacterias solubilizadoras de roca fosfórica y son comparables con lo reportado por Hamdali *et al.* (2008), que investigaron la solubilización de diferentes tipos de rocas fosfóricas en aislamientos de *Streptomyces* spp., las cuales liberaban cantidades de fósforo soluble en un rango de 8,34 a 29,67  $\text{mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ , contrario a lo encontrado por los autores, se observó la acidificación del medio, producto de la liberación de ácidos orgánicos por el consumo del sustrato, esto indica que posiblemente sea el mecanismo de solubilización que se esté llevando a cabo para solubilizar roca fosfórica, sin embargo estos resultados pueden variar con el tipo de roca, la fisiología del aislamiento y las condiciones de cultivo (6, 108). Finalmente, el consumo de glucosa no pudo ser determinado debido a que las rocas fosfóricas pueden tener silicatos, diversas formas de fósforo u otro tipo de compuestos dentro de su composición, los cuales pueden interferir en la de medición de azúcares reductores (109).

### 7.5 Cuantificación del fósforo soluble en aislamiento T3A bajo diferentes pH de arranque.

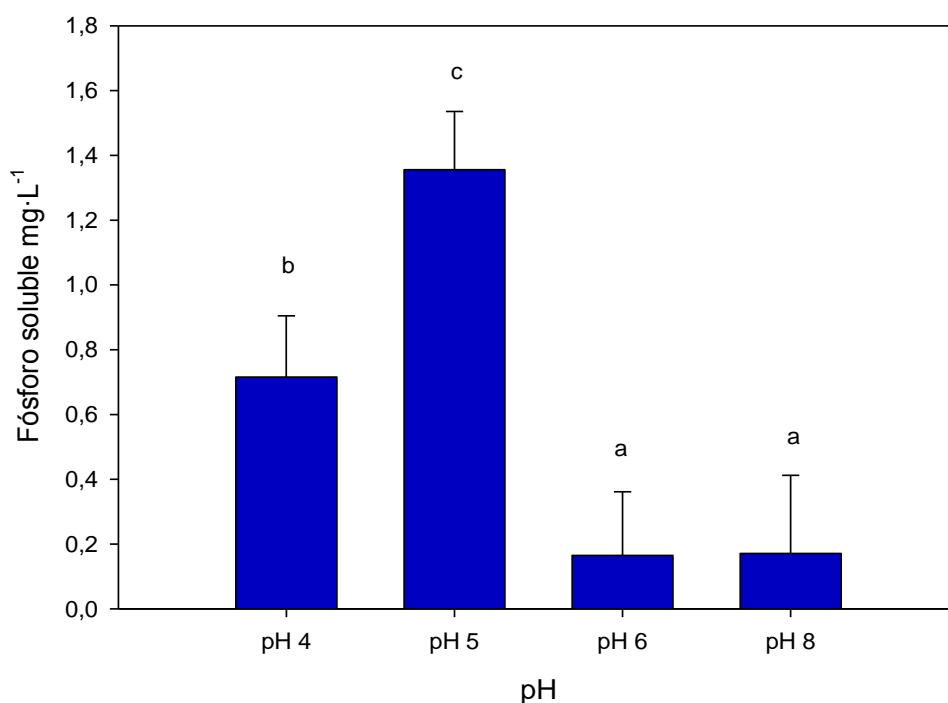
La actividad solubilizadora de fósforo para el aislamiento T3A fue evaluada bajo diferentes condiciones de pH (4, 5, 6 y 8), los resultados se encuentran a continuación:



**Figura 10. Cuantificación de fósforo soluble evaluando diferentes pH de arranque con fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 = 5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) como fuente insoluble de fósforo.** El eje (x) representa el valor del pH evaluado (4, 5, 6 y 8). El eje (y) representa la cantidad de fósforo soluble liberado ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Resultados con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de acuerdo al análisis Kruskal-wallis.

La Figura 10 muestra los resultados de la solubilización de fosfato tricálcico por parte de T3A evaluada bajo diferentes condiciones de pH. Los resultados obtenidos revelan que la solubilización de fósforo en pH 4 se ve afectada negativamente en comparación con los otros pH evaluados, esto se debe posiblemente porque al adicionarse ácido para ajustar el pH del medio, este puede estar llevando a cabo el proceso de solubilización, por tal motivo al inocular el microorganismo no hay formas insolubles de fósforo para que

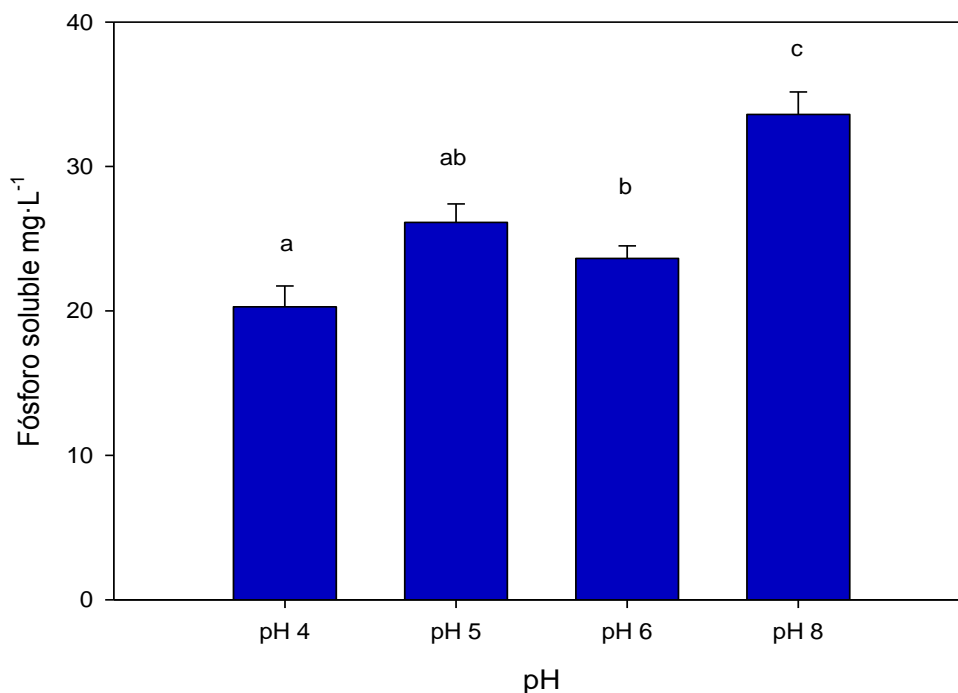
desarrolle su actividad. Estos resultados no concordaron con lo encontrado por Park *et al.* (2010), los cuales evaluaron la actividad solubilizadora de fósforo de *Burkholderia cepacia* bajo diferentes condiciones de estrés dentro de estas el pH, encontrando que este microorganismo es capaz de solubilizar fósforo en un rango de pH de 2 a 11. Este hecho también permitió evidenciar que no solo es necesario un descenso de pH para liberar formas solubles de fósforo sino que son los ácidos orgánicos producidos por los microorganismos, los que tienen esta capacidad y que su alcance depende del tipo de ácido orgánico así como del tipo de suelo (26). Adicional a esto, es posible observar que el aislamiento T3A continua presentando una buena actividad solubilizadora de fósforo en los otros pH evaluados (5, 6 y 8), siendo esta una característica importante, teniendo en cuenta que muchos de los suelos de uso agrícola del país presentan pH ácido (22) (Anexo D).



**Figura 11. Cuantificación de fósforo soluble evaluando diferentes pH de arranque con fosfato de aluminio ( $\text{AlPO}_4 = 1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) como fuente insoluble de fósforo** El eje (x) representa el valor del pH evaluado (4, 5, 6 y 8). El eje (y) representa la cantidad de fósforo soluble liberado ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Resultados con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de acuerdo al análisis de varianza (ANOVA).



La Figura 11 muestra los resultados obtenidos de la solubilización de fósforo del aislamiento T3A evaluada bajo diferentes pH. En este caso, se observa que a pH 4 y 5 se favorece la solubilización de fósforo, no obstante las concentraciones alcanzadas fueron bajas (0,72 y 1,36 mgP·L<sup>-1</sup> respectivamente), esto se debe probablemente a que los fosfatos de aluminio en soluciones acuosas presentan una solubilidad mínima a pH altos, así que cuando los pH decrecen la solubilidad del fósforo tiende a incrementar, facilitando la disponibilidad del compuesto para que el microorganismo libere las formas solubles (56, 110). Sin embargo esta condición de ensayo *in vitro* puede generar resultados diferentes en evaluaciones *in vivo*, debido a que el fósforo se encuentra en una matriz diferente, lo que influye en su movilidad generándose otros procesos como inmovilización, adsorción o precipitación.



**Figura 12. Cuantificación de fósforo soluble evaluando diferentes pH de arranque con roca fosfórica (0,5 g·L<sup>-1</sup>) como fuente insoluble de fósforo** El eje (x) representa el valor del pH evaluado (4, 5, 6 y 8). El eje (y) representa la cantidad de fósforo soluble liberado (mg·L<sup>-1</sup>). Resultados con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de acuerdo al análisis de varianza (ANOVA).

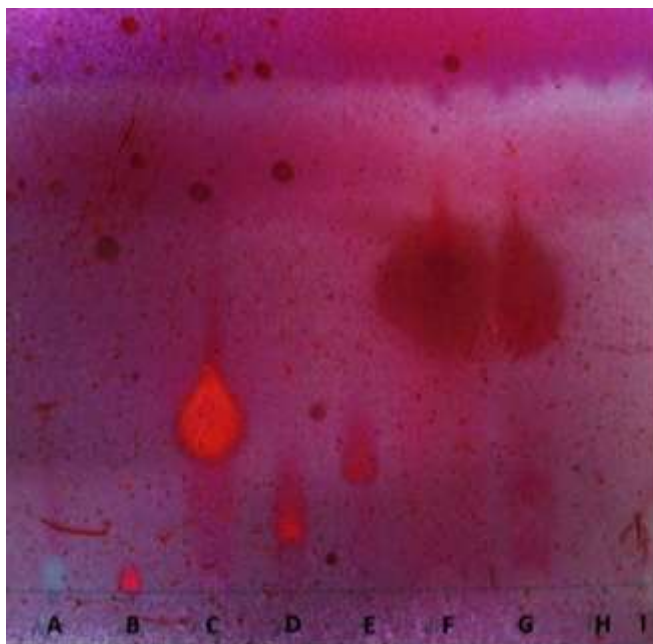
La Figura 12 muestra los resultados de solubilización de fósforo del aislamiento T3A evaluado bajo diferentes pH. En este caso se observa una disminución en las cantidades de fósforo soluble liberado cuando el aislamiento se encuentra en pH 4, estos resultados presentan una tendencia similar a la investigación realizada por Vyas *et al.* (2006), los cuales evaluaron la solubilización de roca fosfórica en *Eupenicillium parvum*, demostrando que a medida que el microorganismo se somete a una condición de estrés (en este caso pH bajo), se reduce la actividad solubilizadora de fósforo (111). Adicional a esto, las diferencias presentadas en los resultados de esta figura pueden atribuirse a las características, composición y diversas formas de fósforo (solubles e insolubles) que pueden presentarse en las rocas fosfóricas, teniendo en cuenta que al variar el pH estas pueden reaccionar de forma diferente influyendo en la solubilidad (112, 113). Dado que las características de las rocas fosfóricas pueden variar dependiendo su tipo, no es claro en que pH se puede establecer la mejor actividad solubilizadora de fósforo, sin embargo los resultados obtenidos demuestran la eficiencia del aislamiento T3A para actuar sobre enmiendas de uso tradicional como las rocas fosfóricas bajo un rango amplio de pH.

#### **7.6 Identificación de los ácidos orgánicos involucrados en el proceso de solubilización por cromatografía de capa fina (TLC).**

Aunque diferentes mecanismos de solubilización pueden ser llevados a cabo, el principal es a través de la producción de ácidos orgánicos; una disminución del pH en los medios de cultivo que contienen fuentes de fósforo insolubles sugieren la liberación de estos por parte de los microorganismos (48, 114). El método de cromatografía de capa fina fue explorado para confirmar la presencia de ácidos orgánicos producidos por las actinobacterias en los medios de cultivo.

La figura 13 muestra la separación del patrón de seis ácidos orgánicos, la mezcla de ácidos, y los controles negativos (Agua y medio NBRIP sin inocular) en placas de sílica gel F-254. El cromatograma del ácido glucónico mostró la presencia de una mancha azul, los cromatogramas del ácido cítrico, láctico, málico y succínico evidenciaron la formación de manchas naranjas mientras que el cromatograma del ácido fórmico se observó con una mancha morada de mayor tamaño. En el caso de la mezcla de ácidos, el ácido fórmico aparece como una mancha morada de tamaño similar al que presentó al correr de forma individual, los demás ácidos se presentan como manchas moradas de menor

tamaño, esto posiblemente dado porque al mezclarse dan lugar a compuestos con características diferentes a las iniciales (115). Adicional a esto, los datos mostraron que los Rf de los ácidos orgánicos diferían uno del otro permitiendo su identificación (Tabla 4).



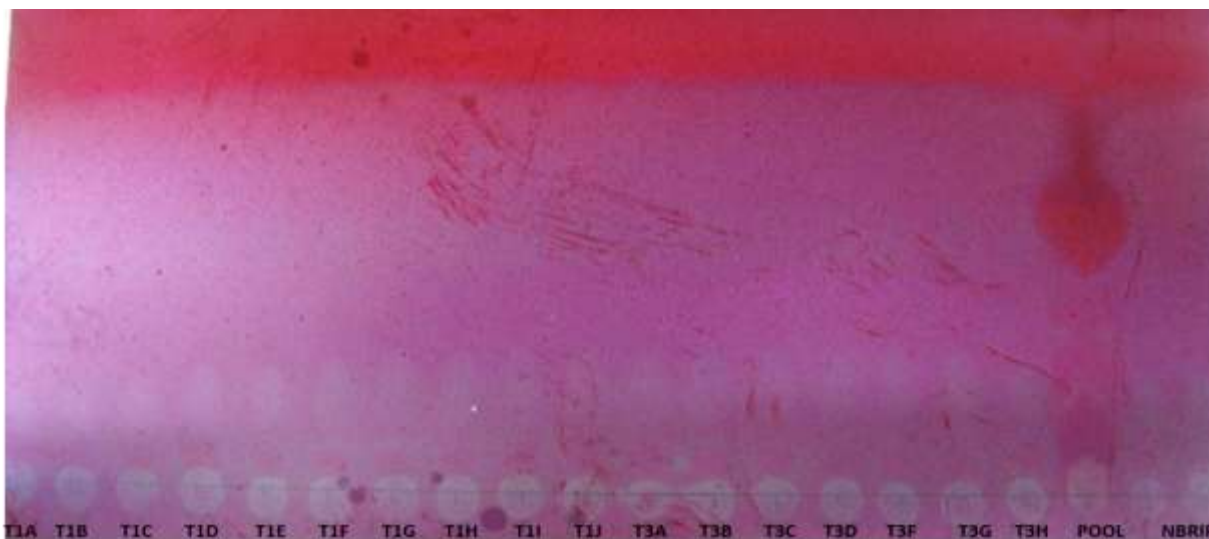
**Figura 13. Separación del patrón de ácidos orgánicos en placas de silica gel F-254; placa de TLC de 10 x 10 cm.** (A) Ácido glucónico, (B) Ácido cítrico, (C) Ácido láctico, (D) Ácido Málico, (E) Ácido succínico, (F) Ácido fórmico, (G) Mezcla de ácidos, (H) Agua, (I) Medio NBRIP sin inocular.

**Tabla 4. Valores de Rf y detección de color del patrón de ácidos orgánicos**

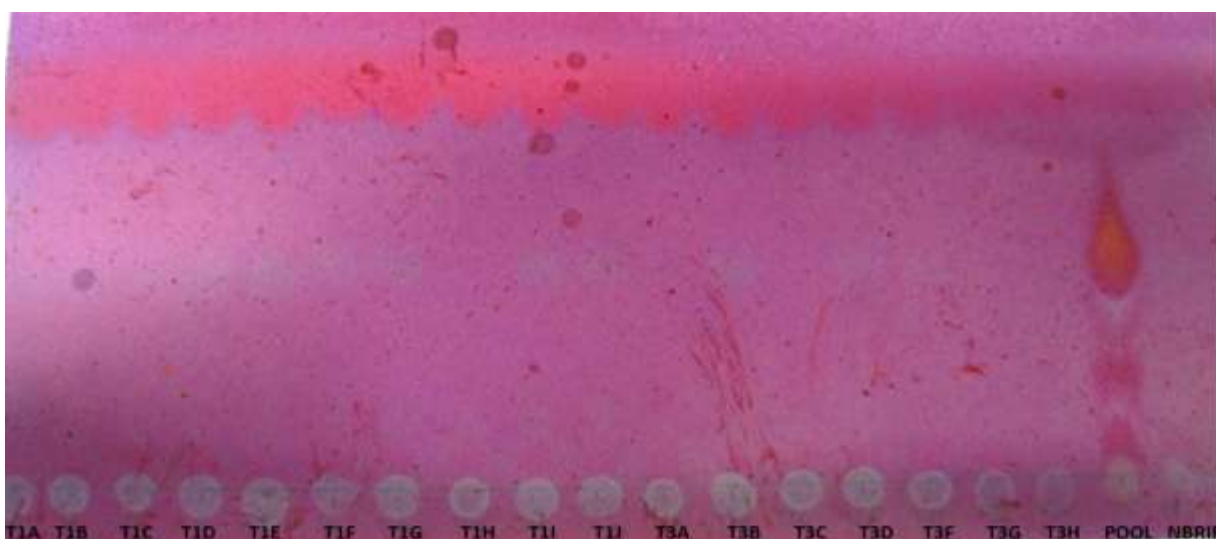
Posición	Muestra	Rf	Color
A	Ácido Glucónico	0,03	Azul cielo
B	Ácido Cítrico	0,02	Naranja
C	Ácido Láctico	0,34	Naranja
D	Ácido Málico	0,16	Naranja
E	Ácido Succínico	0,27	Morado
F	Ácido Fórmico	0,58	Morado
G	Mezcla de ácidos	S= 0,54 M= 0,29 I=0,08	Morado
H	Agua	-	-
I	Medio NBRIP sin inocular	-	-

(S) Rf punto superior, (M) Rf punto medio, (I) Rf punto inferior

La evaluación por TLC de los ácidos orgánicos incluyendo la mezcla del patrón, producidos por los aislamientos de Tota en medio NBRIP con fosfato tricálcico y fosfato de aluminio como fuentes de fósforo insolubles se encuentran a continuación en la Figura 14 y 15, respetivamente.



**Figura 14. Análisis TLC de ácidos orgánicos producidos por los aislamientos de la localidad de Tota en medio NBRIP con fosfato tricálcico.**



**Figura 15. Análisis TLC de ácidos orgánicos producidos por los aislamientos de la localidad de Tota en medio NBRIP con fosfato de aluminio.**

La presencia de ácidos orgánicos no pudo ser detectada o distinguida en ninguno de los aislamientos evaluados bajo las dos fuentes de fósforo insoluble, en los dos casos se observó la presencia de manchas azules muy tenues, sin embargo estas mismas manchas se obtuvieron en el medio NBRIP sin inocular, por lo que no se pudo atribuir a la presencia de ácidos orgánicos. Los resultados obtenidos, pueden ser explicados por las bajas concentraciones en las que pudieron estar presentes los ácidos en los medios de cultivo al encontrarse diluidos, por lo que es recomendable concentrar las muestras para posteriores ensayos. Las bajas concentraciones, también pudieron influir en la detección de los ácidos orgánicos en las placas de TLC, se encuentra reportado que el fondo del revelador, una solución de rojo de metilo y azul de bromofenol en etanol, solo tiene una intensidad de color que es relativa a la cantidad de ácido presente (75).

Por lo tanto, si la cantidad de ácidos orgánicos producidos por las actinobacterias en los medios de cultivo se encontraba en concentraciones menores a las evaluadas con el patrón de ácidos orgánicos (Figura 13), no era posible evidenciar manchas o puntos definidos en las placas de sílica gel. En consecuencia, se decidió evaluar el límite de detección de los ácidos orgánicos bajo esta metodología (datos no mostrados) encontrando que es posible que los ácidos orgánicos presentes en las muestras se encuentren en concentraciones menores a  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Según varios reportes la presencia de ácidos orgánicos ha sido detectada en su mayoría mediante cromatografía de alta eficiencia (HPLC) (26, 28) incluso se han identificado mediante cromatografía de gases (Vásquez *et al.*, 2002). Sin embargo, pocos son los reportes de la detección en papel o mediante TLC (66) de acuerdo a esto, Kraker y Bursch (1973) mencionan que la separación de los ácidos orgánicos presentes en mezclas difícilmente puede ser llevada a cabo, por lo anterior se propone que para posteriores ensayos los ácidos orgánicos sean identificados por HPLC (116).

## **8. CONCLUSIONES**

Los 32 aislamientos obtenidos de suelos rizosféricos en el departamento de Boyacá, sugieren que el desarrollo de actinobacterias también se puede dar bajo condiciones de pH ácido, variedad de texturas y bajos contenidos de materia orgánica en el suelo.

Las correlaciones estadísticas permitieron demostrar que la prueba cualitativa sólida no siempre evidencia los aislamientos con buena capacidad solubilizadora de fósforo, por el contrario, el análisis cuantitativo se correlaciona mejor con la prueba cualitativa líquida, indicando que esta metodología resulta ser más eficiente para la selección o confirmación de microorganismos solubilizadores de fosfato.

Las pruebas cualitativas llevadas a cabo para la selección de microorganismos fosfato solubilizadores y que están basadas en el uso de fosfato tricálcico, permitieron evidenciar que la evaluación con esta fuente de fósforo no se encuentra relacionada con la solubilización de otras fuentes de fósforo mineral.

Los resultados presentados mostraron que los aislamientos T1C, T1H, T3A y T3C son capaces de liberar formas solubles a partir de fosfato tricálcico, sin embargo solo el aislamiento T3A presentó una actividad significativa con fosfato tricálcico y fosfato de aluminio. La capacidad de solubilización de estos aislamientos se encuentra posiblemente relacionada con la liberación de ácidos orgánicos que fueron evidenciados mediante la disminución del pH en el medio.

Los hallazgos encontrados bajo el presente estudio permiten señalar a las actinobacterias como microorganismos con el fenotipo solubilizador de fósforo, siendo este el primer reporte de actinobacterias solubilizadoras de fosfato de aluminio. Se espera que los resultados del presente trabajo conduzcan a la continuidad en la investigación de actinobacterias como PGPR para ser propuestas en el diseño y formulación de biofertilizantes en la industria agrícola.

## **9. RECOMENDACIONES**

Realizar una caracterización bioquímica y molecular para facilitar la identificación de género y especie de los aislamientos obtenidos.

Evaluar la solubilización de fuentes de fósforo insoluble como  $\text{FePO}_4$  y otros tipos de rocas fosfóricas en los aislamientos obtenidos.

Utilizar herramientas de biología molecular para la identificación de los genes involucrados en el proceso de solubilización de fósforo y que han sido poco reportados en Actinobacterias.

Evaluar otros mecanismos de liberación de fósforo como la producción de sideróforos o fosfatasas.

Evaluar otras actividades directas de promoción de crecimiento vegetal mediante ensayos *in vitro* y de invernadero.

Identificar los ácidos orgánicos involucrados en el proceso de solubilización por medio de HPLC.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguirre J, Irizar M, Durán A, Grajeda O, Peña M, Loredó C, Gutiérrez A, Los biofertilizantes microbianos: alternativa para la agricultura en México., Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias., Chiapas, 2009, 86 p.
2. Kumar V, Narula N. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Biology and Fertility of Soils* 1999; **28**: 301-305.
3. Yao Q., Wang L., Zhu H. y Chen J. Effect of arbuscular mycorrhizal fungal inoculation on root system architecture of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L Raf.) seedlings. *Scientia Horticulturae* 2009; **121**: 458 – 461.
4. Rodríguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances* 1999; **17**: 319.339.
5. Franco M. Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos interacción de estas bacterias con hongos de micorriza. **Tesis de Doctorado**. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada, Granada, España, 2008, 260 p.
6. Hamdali H, Bouizgarne B, Hafidi M, Lebrihi A, Virolle M, Ouhdouch Y. Screening for rock phosphate solubilizing Actinomycetes from Moroccan phosphate mines. *Applied soil ecology* 2008; **38**: 12-19
7. Barreto T, Da Silva A, Soares A, De Souza J. Population densities and genetic diversity of actinomycetes associated to rhizosphere of *Theobroma cacao*. *Brazilian Journal of microbiology* 2008; **39**: 464-470.
8. Oliveira C, Alves V, Marriel I, Gomes E, Scotti M, Carneiro N, Guimarães C, Schaffert R, Sá N. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biology and Biochemistry* 2009; **41**: 1782-1787.

9. Kumar M, Sivakumar K, Thangaradjou T, Kannan L. Phosphate solubilizing actinomycetes in the estuarine environment: An inventory. *Journal environmental biology* 2007; **28** (4): 795-798.
10. El-Tarabily K, Nassar A, Sivasithamparam K. Promotion of growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a calcareous soil by a phosphate-solubilizing, rhizosphere-competent isolate of *Micromonospora endolithica*. *Applied soil ecology* 2008; **39**: 161-171.
11. Gómez R, Bello D, Prada L, Rodríguez M, Gómez L, Franco M. actinomicetos mineralizadores de fosfato involucrados en la interacción radical de *Glomus* sp- Trébol Blanco. *Agronomía mesoamericana* 2011; **22** (2): 317-327.
12. Franco M. Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización. *Revista Peruana de Biología* 2009; **16** (2): 239-242.
13. El-Tarabily K, Sivasithamparam K. Non-streptomyceteactinomycetes as biocontrol agents of soil borne fungal plant pathogen and as plant growth promoters. *Soil Biology and Biochemistry* 2006; **38**:1505-1520.
14. Franco M, Quintana A, Duque C, Suárez, Rodríguez M, Bárea J. Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and and mycorrhiza helping activities. *Applied soil and ecology* 2010; **45**:209–217.
15. Khan A, Jilani G, Akhtar M, Saqlan S, Rasheed N. Phosphorous Solubilizing bacteria: Ocurrrence, Mechanisms and their role in crop production. *Journal of Agriculture and Biological Sciences* 2009; **1** (1): 48-58.
16. Bobadilla C, Rincón S. Aislamiento y evaluación de bacterias fosfato solubilizadoras obtenidos a partir de compost obtenido de residuos de plaza. **Tesis de pregrado**. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia, 2008, 87 p.
17. Valenzuela E, Barrera S, Pinochet D. Solubilización de roca fosfórica Carolina del Norte con cepas de *Aspergillus niger* aisladas desde un suelo trumao. *Boletín micológico* 2002; **17**: 81-88.
18. Boschetti N, Quintero C, Benavidez R, Giuffre L. Cuantificación de las fracciones orgánicas e inorgánicas de fósforo en suelos de La Mesopotamia Argentina. *Ciencia del suelo* 2003; **21** (1): 1-8.
19. Hamdali H, Smirnov A, Esnault C, OuhdouchY, Virolle M. Physiological studies and comparative analysis of rock phosphate solubilization abilities of Actinomycetales originating from Moroccan phosphate mines and of *Streptomyces lividans*. *Applied soil ecology* 2010; **44**: 24-31.
20. Jaramillo D. El recurso suelo y la competitividad del sector agrario colombiano. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia. 2004, 26 p.
21. Hernández D, Hernández R, Brossard M. Historia del uso reciente de tierras de las sabanas de América del Sur. Estudios de casos de sabanas del Orinoco. *Revista de Ciencia y tecnología de Latinoamérica* 2005; **30** (10): 623-630.
22. Burbano H, Silva F. Ciencia del suelo: principios básicos. Sociedad Colombiana de la Ciencia del suelo. Primera Edición. Bogotá, D.C., Colombia. 2010, 594 p.
23. Torres M, Lizarazo L. Evaluación de grupos funcionales (ciclo del C, N, P) y actividad de la fosfatasa ácida en dos suelos agrícolas del departamento de Boyacá (Colombia). *Agronomía colombiana* 2006; **24** (2): 317 -325.
24. Guerrero R. Fertilización de cultivos en clima frío. Monómeros Colombo Venezolanos S.A. Segunda Edición. 1998, 370 p.
25. Çakmakçı R, Figen-Dönmez M, Ertürk Y, Erat M, Haznedar A, Sekban R. Diversity and metabolic potential of culturable bacteria from the rhizosphere of Turkish tea grown in acidic soils. *Plant Soil* 2010; **332**: 299-318.



26. Park K, Lee O, Jung H, Jeong J, Jeon Y, Hwang D, Lee C, Son H. Rapid solubilization of insoluble phosphate by a novel environmental stress-tolerant *Burkholderia vietnamiensis* M6 isolated from ginseng rhizospheric soil. *Applied microbiology and biotechnology* 2010; **86**:947-955.
27. Paredes M, Espinosa D. Ácidos orgánicos producidos por Rizobacterias que solubilizan fosfato: Una revisión crítica. *Terra Latinoamericana* 2010; **28** (1): 61-70.
28. Scervino J, Prieto M, Della I, Recchi M, Sarmiento N, Godeas A. Soil fungal isolates produce different organic acid pattern involved in phosphate salts solubilization. *Biology and fertility soils* 2010; **46**: 755-763.
29. Jork H, Funk W, Fischer W, Wimmer H. Thin layer chromatography: Reagents and detection methods. Volume 1a. Weinheim, Federal republic of Germany, 1990. 464 p.
30. Mba C. Rock phosphate solubilizing *Streptosporangium* isolates from casts of tropical earthworms. *Soil Biology and Biochemistry* 1997; **29** (3/4): 381-385.
31. Hamdali H, Moursalou K, Tchangbedji G, Ouhdouch Y, Hafidi M. Isolation and characterization of rock phosphate solubilizing actinobacteria from a Togolose phosphate mine. *African Journal of Biotechnology* 2012; **11** (2): 312-320.
32. FAO Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura. Buenas Prácticas Agrícolas. Disponible en: <http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/bpa/>. Consultado: Septiembre 22 de 2011.
33. Nogales B. La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. *Ecosistemas* 2005; **14** (2): 41-51.
34. Paul E. Soil microbiology, ecology and biochemistry. Elsevier. Third edition. United States of America. 2007, 514 p.
35. Carrillo L. Microbiología agrícola. Universidad Nacional de Salta. Salta, Argentina. 2003.
36. Buscot F, Varma A. Microorganisms in soils: Roles in genesis and functions. Springer. Germany. 2005, 419 p.
37. Maheshwari D. Plant growth and health promoting bacteria. Germany. Springer. 2010, 445 p.
38. Kloepper JW. Plant growth promoting mediated by bacterial rhizosphere colonizers. *The rhizosphere and plant growth* 1991; 315-326.
39. Rokzhadi A, Asgharzadeh A, Darvish F, Nour-Mohammadi G, Majidi E. Influence of plant growth promoting rhizobacteria on dry matter accumulation and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under field conditions. *American-Eurasian journal of agricultural & environmental Sci* 2008; **3** (2): 253-257.
40. Duque C, Quintana M. Determinación preliminar de la actividad promotora de crecimiento vegetal de actinomicetes aislados de suelo. **Tesis de pregrado**. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia, 2008, 126 p.
41. Waskman SA. The Actinomycetes: their nature, occurrence, activities and importance. Chronica Botanica Company. United States of America. 1950, 230 p.
42. Coombs J, Franco C. Isolation and identification of Actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. *Applied and environmental microbiology* 2003; **69** (9): 5603-5608.

43. Sivakumar K. s.f. Actinomycetes. Centre of advanced study in marine biology Annamalai University.
44. Ezziyani M, Pérez C, Requena ME, Rubio L, Candela ME. Biocontrol por *Streptomyces rochei* – Ziyani- de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología* 2004; **26**: 69-78.
45. Ghanem NB, Sabry SA, El-sherif ZM, Abu El- Ela GA. Isolation and enumeration of marine actinomycetes from seawater and sediments in
46. Khamna S, Yokota A, Peberdy JF, Lumyong S. Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. *EurAsian Journal of BioSciences* 2010; **4**: 23-32.
47. Tian C, He X, Zhong Y, Chen J. Effects of VA mycorrhizae and *Frankia* dual inoculation on growth and nitrogen fixation of *Hippophae tibetana*. *Forest ecology and management* 2002; **170**: 307-312.
48. Vassilev N, Medina A, Azcon R, Vassileva M. Microbial solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes and effect of the resulting products on plant growth and P uptake. *Plant and soil* 2006; **287**: 77-84.
49. Banerjee S, Palit R, Sengupta C, Standing D. Stress induced phosphate solubilization by *Arthrobacter* sp. and *Bacillus* sp. isolated from tomato rhizosphere. *Australian Journal of Crop science* 2010; **4** (6): 378-383.
50. Arzuaga SA, Fernández C, Dalurzo HC, Vazquez S. Fósforo total, fósforo orgánico y fosfatasa ácida, en entisoles, alfisoles y vertisoles de corrientes con diferentes usos agrícolas. *Comunicaciones científicas y tecnológicas* 2005.
51. Garavito F. Propiedades químicas de los suelos. Instituto Geográfico “Agustín Codazzi” subdirección agrologica. Segunda edición. Bogotá, D. C., Colombia, 1979.
52. Zhao H, Yan H, Zhou S, Xue Y, Zhang C, Lihouzhang, Dong X, Cui Q, Zhang Y, Zhang B, Zhang Z. The growth promoting of mung bean (*Phaseolus radiatus*) by *Enterobacter asburiae* HPP16 in acidic soils. *African journal of biotechnology* 2011; **10** (63): 13802-13814.
53. Song OR, Lee SJ, Lee YS, Lee SC, Kim KK, Choi YL. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soils. *Brazilian Journal of Microbiology* 2008; **39**: 151-156.
54. Park KH, Lee CY, Son HJ. Mechanism of insoluble phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF15 isolated from ginseng rhizosphere and its plant growth-promoting activities. *Letters in Applied Microbiology* 2009; **49**: 222-228.
55. Alexander M. Introduction of soil microbiology. Editor John Wiley. New York, USA, 1987, 467 p.
56. Whitelaw MA. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Advances in Agronomy* 2000; **69**: 99-151.
57. Madigan M, Martinko J, Parker J. Brock: Biología de los microorganismos. Décima Edición. Editorial Prentice Hall. Madrid, España, 2006, 1011 p.
58. Vazquez P, Holguín G, Puente ME, López A, Bashan Y. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semi-arid coastal lagoon. *Biology and Fertility of soils* 2000; **30**: 460-468.
59. Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry* 1995; **27** (3): 257-263.

60. Goldstein A, Lester T, Brown J. Research on the metabolic engineering of the direct oxidation pathway for extraction of phosphate from ore has generated preliminary evidence for PQQ biosynthesis in *Escherichia coli* as well as a possible role for the highly conserved region of quinoprotein dehydrogenases. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006; **1647**: 266-271.
61. Chen YP, Rekha PD, Arun AB, Shen FT, Lai WA, Young CC. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing activities. *Applied Soil Ecology* 2006; **34**: 33-41.
62. Labeda D. Actinomycete taxonomy: generic characterization. *Journal of industrial microbiology* 1987; **28** (2): 115-121.
63. Pikovskaya R.I. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Microbiologiya* 1948; **17**: 362-370.
64. Sundara –Rao W, Sinha M. Phosphate dissolving microorganisms in the soil and rhizosphere. *Indian Journal of microbiology* 1963; **41**: 999-1011.
65. Mehta S, Nautiyal C. An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Current Microbiology* 2001; **43**: 51-56
66. Perez E, Sulbarán M, Ball M, Yarzabal L. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuela region. *Soil Biology and Biochemistry* 2007; **39**: 2905-2914.
67. Murphy J, Riley J. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta* 1962; **27**: 31-36.
68. EPA. Procedimiento de la EPA 365.2: Phosphorous, All forms (colorimetric, ascorbic acid, single reagent).
69. Merck. Test de fosfatos para la determinación de ortofosfatos.
70. Pires do nascimento R., Marques S., Alves L., Girio F., Amaral-Collaco M., Rodrigues D., Pinto da Silva E., Reed R. A novel strain of *Streptomyces malaysiensis* isolated from Brazilian soil produces high endo-b-1,4-xylanase titres. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2003; **19** (9): 879-881. (70)
71. Ramirez P., Cocha J. M. Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. *Revista Peruana de Biología* 2003; **10** (1). (71)
72. Schrader K.K., Blevins W.T. Effects of carbon source, phosphorus concentration, and several micronutrients on biomass and geosmin production by *Streptomyces halstedii*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2001; **26** (4): 241-247. (72)
73. Miller, G. Use of Dinitrosalicilic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* 1959; **31**: 426.
74. Ting I, Dugger W. Separation and detection of organic acids on silica gel. *Analytical biochemistry* 1965; **12**:571-578.
75. Lee K-Y, So J-S, Heo T-R. Thin layer chromatographic determination of organic acids for rapid identification of bifidobacteria at genus level, *Journal of Microbiological Methods* 2001; **45** (1): 1-6.
76. Jork H, Funk W, Fischer W, Wimmer H. Thin-layer Chromatography: reagent and detection methods. VCH publishers. Volumen 1a. Weinheim, Germany. 1990, 496 p.
77. Martínez M. Bioestadística amigable. Segunda Edición. Ediciones Díaz de Santos. 2006. 919 p.
78. Kuster E. Taxonomy of soil actinomycetes and related organisms. In: Gray TRG, Parkinson D. The ecology of soil bacteria. Liverpool University, Press, Liverpool.

79. Thangapandian V, Ponmurugan P, Ponmurugan K. Actinomycetes diversity in the rhizosphere soils of different medicinal plants in Kolly Hills-Tamilnadu, India, for secondary metabolite production. *Asian journal of plant sciences* 2007; **6** (1): 66-70.
80. Arifuzzaman M, Khatun MR, Rahman H. Isolation and screening of actinomycetes from Sundarbans soil for antibacterial activity. *African Journal of Biotechnology* 2010; **9** (29): 4615-4619.
81. Dworkin M, Stanley F, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. The Prokaryotes. Volume 3. Springer. Third edition, Singapore. 2006. 1185 p.
82. Lee JY, Hwang BK. Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Canadian Journal of microbiology* 2002; **48**: 407-417.
83. Zakalyukina YV, Zenova GM, Zvyagintsev G. Acidophilic soil actinomycetes. *Microbiology* 2002; **71** (3): 342-345.
84. Zenova GM, Manucharova NA, Zvyagintsev DG. Extremophilic and extremotolerant actinobacteria in different soil types. *Eurasian soil science* 2011; **44** (4): 417- 436.
85. Cardona GI, Peña CP, Ruíz M. Comunidades de hongos actinomicetos en tres tipos de vegetación de la Amazonia colombiana: abundancia, morfotipos y el gen 16 s ADNr. *Revista de biología tropical* 2009; **57** (4): 1119-1139.
86. Molano A, Algecira N, Bernal J, Franco M. Evaluación y selección de un medio de cultivo a partir de Actinomycetes: En memorias del II Congreso Internacional de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C., Colombia. 2000. Mayo 10-12.
87. Shirling EB, Gottlieb D. Method for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of systematic bacteriology* 1966; **16** (3): 313-340.
88. Semedo LTAS, Linhares AA, Gomes RC, Mangio GP, Alviano CS, Linhares LF, Coelho RRR. Isolation and characterization of actinomycetes from Brazilian tropical soils. *Microbiol. Res* 2001; **155**: 291-299.
89. Hayakawa M. Studies on the isolation and distribution of rare Actinomycetes in soil. *Actinomycetologica* 2008; **22**: 12-19.
90. Kishore P. Isolation, characterization and identification of *Actinobacteria* of Mangrove ecosystem, Bhitarkanika, Odisha. **Master of Science in life science**. National Institute of technology. 2011. Rourkela, Odisha. 85 p.
91. Jiang J. Natural products Biosynthesis: I Geosmin Biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Nostoc punctiforme* PCC 73102, II Pentalenolactone Biosynthetic pathway in *Streptomyces avermitilis*. University of Science and Technology, 2009. Providence, Rhode Island, China. 177 p.
92. Wang YX, Zhi XY, Chen HH, Zhang YQ, Tang SK, Jiang CL, Xu LH, Li WJ. *Streptomyces serianimatus* sp. nov., isolated from a rhizosphere of soil. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2007; **92**: 201-206.
93. Alam S, Khalil S, Ayub N, Rashid M. *In vitro* solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) from Maize Rhizosphere. *International Journal of Agriculture & Biology* 2002; **4** (4): 454- 458.
94. Rashid M, Khalil S, Ayub N, Alam S, Lafit F, Organic acids production and phosphate solubilization by Phosphate Solubilizing Microorganism (PSM) under *in vitro* conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 2004; **7** (2): 187-196.
95. Gupta R, Singal R, Shankar A, Kuhad RC, Saxena RK. A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. *Journal of general and applied microbiology* 1994; **40**: 255- 260.

96. Nautiyal CS. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS microbiology letters* 1999; **170**: 265- 270.
97. Gupta N, Sahoo D, Basak U. Evaluation of *in vitro* solubilization potential of phosphate solubilizing *Streptomyces* isolated from rhizosphere of *Heritiera fomes* (mangrove). *African Journal of microbiology research* 2010; **4** (3): 136- 142.
98. Collavino M, Sansberro P, Mroginski R, Aguilar M. Comparison of *in vitro* solubilization activity of diverse phosphate solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. *Biology and fertility of soils* 2010; **46**: 727 – 738.
99. Liu H, Wu XQ, Ren JH, Ye JR. Isolation and identification of phosphobacteria in Poplar rhizosphere from different regions of China. *Pedosphere* 2011; **21** (1): 90-97.
100. Gunarrson N, Mortensen UH, Sosio M, Nielsen J. Identification of the Entner- Duodoroff- Pathway in an Antibiotic-Producing Actinomycete Species. *Molecular Microbiology* 2004; **52** (3): 895- 902.
101. Chauhdry V, Nautiyal CS, A high throughput method and culture medium for rapid screening of phosphate accumulating microorganisms. *Bioresource Technology* 2011; **102**: 8057-8062.
102. Dick WA, Cheng L, Wang P. Soil acid and alkaline phosphatase activity as pH adjustment indicators. *Soil Biology & Biochemistry* 2000; **32**: 1915- 1919.
103. Delvasto P, Ballester A, García C, Igual JM, Muñoz J, González F, Blázquez M. Mineral phosphate-solubilization activity of iron ore associated microflora. *Modern multidisciplinary Appl. Microbiology* s.f; 241- 245.
104. Shirokikh IG, Zenova GM, Zvyagintzev DG. Actinomycetes in the rhizosphere of Barley Grown on Acid Soddy Podzolic Soil. *Microbiology* 2002; **71** (4): 533-537.
105. Chuang CC, Kuo YL, Chao CC, Chao WL. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. *Biology and fertility soils* 2007; **43**: 575- 584.
106. Babá C, Tadeu G, Nahas E. Solubilization of CaHPO<sub>4</sub> and AlPO<sub>4</sub> by *Aspergillus niger* in culture media with different carbon and nitrogen sources. *Brazilian Journal of Microbiology* 2006; **37**: 434- 438.
107. Illmer p, Barbato A, Schinner F. Solubilization of hardly- soluble AlPO<sub>4</sub> with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biology & Biochemistry* 1995; **27** (3): 265- 270.
108. Schneider KD, Van Straaten P, Orduña MR, Glasauer S, Trevors J, Fallow D, Smith PS. Comparing phosphorous mobilization strategies using *Aspergillus niger* for the mineral dissolution of three phosphate rocks. *Journal of applied microbiology* 2010; **108**: 366-374.
109. Dighe AS, Patel PM, Rao KK. Effect of phosphate on the estimation of reducing sugars in biological media. *Biotechnology and Bioengineering* 1985; **27**: 1612- 1615.
110. Sayed WF, Mohaowad SM, El-Karim MM. Effect of Al, Co and Pb ions on growth of *Frankia* spp. In a mineral medium. *Folia Microbiologica* 2000; **45** (2): 153-156.
111. Vyas P, Rahi P, Chauhan A, Gulati A. Phosphate solubilization potential and stress tolerance of *Eupenicillium parvum* from tea soil. *Mycological research* 2007; 931-938.
112. Welch SA, Taunton AE, Banfield JF. Effect of microorganisms and microbial metabolites on apatite dissolution. *Geomicrobiology Journal* 2002; **19**: 343- 367.

113. Salas A, Rivero C, Casanova. Fuente de fósforo absorbido y efectividad agronómica en el maíz en un ultisol del estado de Cojeles, Venezuela. *Agronomía tropical* 2006. **56** (1): 43-60.
114. Behbahani M. Investigation of biological behavior and colonization ability of Iranian indigenous phosphate solubilizing bacteria. *Scientia Horticulturae* 2010; **124**: 393-399.
115. Peter K, Vollhardt C. Química orgánica. Ediciones Omega. Barcelona, España. 1994.
116. Kraiker HP, Burch RE. Thin layer chromatography of Krebs cycle acids. *Z Klin Chen Klin Biochem.* 1973; **11**: 393-397.

## 11. ANEXOS

### Anexo A.

#### PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

##### Solución salina 0,85% (p/v)

COMPONENTE	CONCENTRACION g/L
Cloruro de Sodio (NaCl)	8,5
Agua Destilada	Completar a 1000mL

### Anexo B.

#### MEDIOS DE CULTIVO

##### Agar avena

COMPONENTE	CONCENTRACION g/L
Avena	15 g
Agar-agar	15 g

Todos los componentes se mezclan, se adiciona agua destilada y se mide el pH el cual debe ser ajustado a 7.0 con hidróxido de sodio y ácido clorhídrico. En caso de ser sólido añadir agar-agar según las especificaciones de la casa comercial. Autoclavar (15 lb y 121°C) por 15 minutos, servir en cajas de petri estériles. En caso de realizar el medio con infusión suelo, tomar 50 g de suelo y adicionarlos en el vaso de precipitado con 100 ml de agua destilada. Instalar el sistema de calentamiento con el trípode y la malla de asbesto, y dejar la mezcla hasta que inicie la producción de burbujas. No deje hervir. Retire el vaso de precipitado de la llama y filtre la mezcla en un erlenmeyer de 250 ml. Al producto obtenido se le llamará Infusión de suelo, que será utilizado para la preparación del medio. De la infusión de suelo tome 40 ml mezcle con 160 ml de medio avena disuelto en agua destilada, homogenice hasta disolver completamente el agar avena.

##### SMRS-1

COMPONENTE	CONCENTRACION g/L
Glucosa	10 g
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	5 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5 g
NaCl	0.2 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.3 g
KCl	0.2 g
Extracto de levadura	0.5 g
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0.004 g
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.002 g
Purpura de bromocresol	0.1 g

H <sub>2</sub> O destilada	1 L
----------------------------	-----

Todos los componentes se mezclan, se adiciona agua destilada y se mide el pH el cual debe ser ajustado a 7.0 con hidróxido de sodio y ácido clorhídrico. En caso de ser sólido añadir agar-agar según las especificaciones de la casa comercial. Autoclavar (15 lb y 121°C), agitar muy bien a fin de homogenizar el fosfato tricálcico y servir en erlenmeyer o cajas de petri estériles. En caso de añadir nistatina al 0,1 % debe adicionarse antes de la esterilización del medio de cultivo. Es posible remplazar el fosfato tricálcico por otra fuente de fósforo y modificar la concentración de esta fuente.

#### **NBRIP- Fosfato tricálcico**

COMPONENTE	CONCENTRACION g/L
Glucosa	10 g
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	5 g
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	5 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.1 g
NaCl	0.2 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.25 g
KCl	0.2 g
H <sub>2</sub> O destilada	1 L

Todos los componentes se mezclan, se adiciona agua destilada y se mide el pH el cual debe ser ajustado a 7.0 con hidróxido de sodio y ácido clorhídrico. En caso de ser sólido añadir agar-agar según las especificaciones de la casa comercial. Autoclavar (15 lb y 121°C), agitar muy bien a fin de homogenizar el fosfato tricálcico y servir en erlenmeyer o cajas de petri estériles. En caso de añadir nistatina al 0,1 % debe adicionarse antes de la esterilización del medio de cultivo. Es posible remplazar el fosfato tricálcico por otra fuente de fósforo y modificar la concentración de esta fuente. El medio NBRIP puede ser modificado añadiendo azul de bromofenol (BPB) a una concentración de 0.025 mg/mL, designado al medio NBRIP–BPB.

#### **NBRIP- Fosfato de aluminio**

COMPONENTE	CONCENTRACION g/L
Glucosa	10 g
Al(PO <sub>4</sub> )	1 g
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	5 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.1 g
NaCl	0.2 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.25 g
KCl	0.2 g
H <sub>2</sub> O destilada	1 L

Todos los componentes se mezclan, se adiciona agua destilada y se mide el pH el cual debe ser ajustado a 7.0 con hidróxido de sodio y ácido clorhídrico. En caso de ser sólido añadir agar-agar según las especificaciones de la casa comercial. Autoclavar (15 lb y 121°C), agitar muy bien a fin de homogenizar el fosfato de aluminio y servir en erlenmeyer



o cajas de petri estériles. En caso de añadir nistatina al 0,1 % debe adicionarse antes de la esterilización del medio de cultivo. Es posible remplazar el fosfato de aluminio por otra fuente de fósforo y modificar la concentración de esta fuente.

#### **NBRIP- Roca fosfórica**

COMPONENTE	CONCENTRACION g/L
Glucosa	10 g
Roca Fosfórica	0,5 g
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	5 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.1 g
NaCl	0.2 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.25 g
KCl	0.2 g
H <sub>2</sub> O destilada	1 L

Todos los componentes se mezclan, se adiciona agua destilada y se mide el pH el cual debe ser ajustado a 7.0 con hidróxido de sodio y ácido clorhídrico. En caso de ser sólido añadir agar-agar según las especificaciones de la casa comercial. Autoclavar (15 lb y 121°C), agitar muy bien a fin de homogenizar la roca fosfórica y servir en erlenmeyer o cajas de petri estériles. En caso de añadir nistatina al 0,1 % debe adicionarse antes de la esterilización del medio de cultivo. Es posible remplazar la roca fosfórica por otra fuente de fósforo y modificar la concentración de esta fuente.

#### **Anexo C.**

#### **PROCEDIMIENTO PARA CUANTIFICAR EL FÓSFORO SOLUBLE POR LA TÉCNICA DE AZUL DE FOSFOMOLIBDENO- Análogo al protocolo de la EPA N° 365.2.**

##### **Preparación solución stock de fósforo soluble:**

Disolver en agua destilada 0,2197 g de fosfato dihidrogeno de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) previamente secado en un horno a 105°C, diluir la solución a 1000 mL; 1 mL: 0,05 mg de fósforo.

##### **Preparación solución estándar de fósforo soluble:**

Diluir 10 mL de la solución stock de fósforo soluble a 1000 mL de agua destilada; 1 mL: 0,5 µg de fósforo.

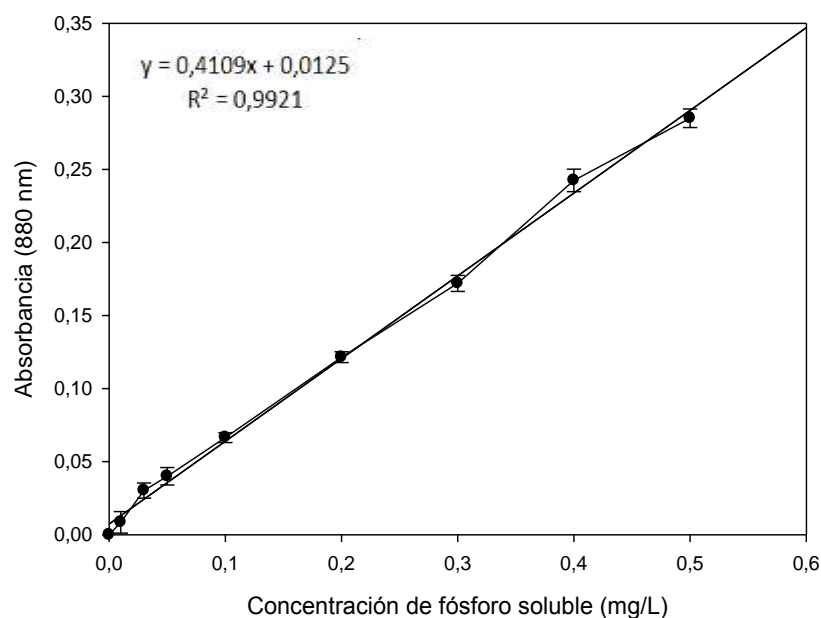
##### **Preparación de las soluciones con concentración conocida:**

Empleando la fórmula  $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$  se prepararon soluciones de concentraciones conocidas (g/L) con un volumen final de 50 mL a partir de la solución estándar de fósforo soluble; con el fin de realizar la curva de calibración.

Concentración mg/L	Volumen de solución estándar de P soluble (mL)	Volumen de Agua Destilada (mL)
0,00	0	50
0,01	1	49
0,03	3	47
0,05	5	45
0,10	10	40
0,20	20	30
0,30	30	20
0,40	40	10
0,50	50	0

## Representación gráfica

Curva de calibración de fósforo soluble



## Determinación de fósforo soluble mediante el método de Azul de fosfomolibdeno por el Test Spectroquant de Merck®:

En un tubo de vidrio se siguió el protocolo del fabricante adicionando 5 mL de sobrenadante obtenido a partir de la muestra, el reactivo 1 (iones molibdato en solución sulfúrica) y el reactivo 2 (ácido ascórbico), esta mezcla se agitó vigorosamente hasta que el reactivo disolvió completamente. Esta solución se dejó reposar durante 5 minutos (Tiempo de reacción, en que se debe visualizar una coloración azul). Posteriormente, se realizó la lectura en el espectrofotómetro a 880 nm, ajustando el cero de absorbancia tomando como blanco de prueba los reactivos sin concentración de ortofosfato;

finalmente, se reportó el fosfato soluble extrapolando las absorbancias a través de la curva patrón.

#### Anexo D.

### PREPARACIÓN DEL REACTIVO DE DNS Y PROCEDIMIENTO PARA CUANTIFICAR AZUCARES REDUCTORES

#### Preparación del reactivo de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS):

COMPONENTE	g/100mL
Ácido 3,5 dinitrosalicílico	1
Tartrato de sodio y potasio (KNaC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> ·4H <sub>2</sub> O)	43,8
Hidróxido de Sodio (NaOH):	1,6
Agua destilada:	Aforar a 100 mL

Se depositaron 70mL de agua destilada en un vaso de precipitado de 250mL, se adicionó el hidróxido de sodio y luego de disolverse, se adicionó el tartrato de sodio y potasio. En un vaso de precipitado de 100mL se adicionaron 20mL de agua destilada y posteriormente se disolvió el ácido 3,5 dinitrosalicílico protegiendo el reactivo de la luz. Los dos vasos de precipitado se dejaron en agitación en plancha magnética a temperatura ambiente durante 12 horas. Pasado este tiempo, se mezclaron las dos soluciones en un balón aforado de 100mL completando el volumen con agua destilada. El reactivo se almacenó en frasco ámbar a temperatura ambiente.

#### Preparación solución patrón de glucosa 40mM:

COMPONENTE	Concentración (g/L)
Glucosa anhidra	7,2
Agua destilada	1000

En 500mL de agua destilada disolver 7.2g de glucosa anhidra, completar a 1000mL en un balón volumétrico. Almacenar en tubos falcon de 15mL y congelar a -15°C. Rotular el frasco con el nombre y concentración de la solución, así como la fecha de preparación y el nombre del responsable del reactivo.

#### Preparación de las soluciones de concentración conocida:

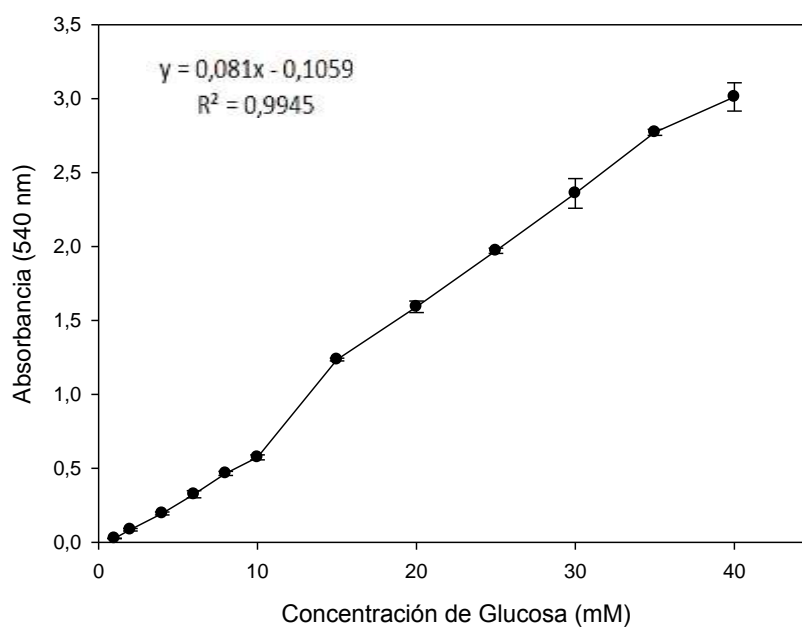
Empleando la fórmula  $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$  se prepararon soluciones de concentraciones conocidas (g/L) con un volumen final de 2mL a partir de una solución stock de glucosa de 40 mM; con el fin de realizar la curva de calibración para el reactivo de DNS.

Concentración Glucosa mM	Volumen de Glucosa (µL)	Volumen de Agua Destilada (µL)
1	50	1950
2	100	1900
4	200	1800
6	300	1700
8	400	1600
10	500	1500

15	750	1250
20	1000	1000
25	1250	750
30	1500	500
35	1750	250
40	2000	0

## Representación gráfica

Curva de calibración DNS




## Determinación de azúcares reductores mediante la técnica de DNS:

Se transfirieron 250 $\mu$ L de la actividad enzimática a tubos de 13x100 a los cuales se adicionaron 250 $\mu$ L de reactivo DNS en oscuridad. Dichos tubos se llevaron a ebullición en baño termostataado a 95 $^{\circ}$ C durante 5 minutos y posteriormente se dispusieron en hielo durante 5 minutos más. Se agregaron 2500 $\mu$ L de agua destilada a cada uno de los tubos y finalmente se realizó la lectura en el espectrofotómetro a 540nm, ajustando el cero de absorbancia con el blanco que se trataba de 250 $\mu$ L de reactivo de DNS con 250 $\mu$ L de agua destilada en lugar de la reacción enzimática.

Anexo E.

**ANÁLISIS DE SUELOS ZONAS TOTA Y PAIPA – INSTITUTO GEOGRÁFICO AGUSTÍN CODAZZI**

RESULTADOS ANÁLISIS DE LABORATORIO						FECHA	
 GRUPO INTERNO DE TRABAJO LABORATORIO NACIONAL DE SUELOS						AAAA-MM-DD	
						2011-05-16	
NOMBRE Y APELLIDO / EMPRESA / PROYECTO: <u>LUÍS DANIEL PRADA / MARCELA FRANCO / UNIVERSIDAD JAVERIANA</u> No. SOLICITUD <u>1096</u>							
DEPARTAMENTO / MUNICIPIO / LOCALIZACIÓN: <u>BOGOTÁ, D. C.,</u>							
TIPO DE ANÁLISIS _____ SUPLEMENTO DE RESULTADOS <input type="checkbox"/> DE FECHA _____							
No. DE LABORATORIO	IDENTIFICACIÓN DE CAMPO	pH	P Disponible (mg/Kg)	pW	Ca cmol (+)/Kg	Mg cmol (+)/Kg	
3-93496	T1	4,7	64,5	0,54	0,82	0,12	
3-93497	T3	5,3	313	0,77	3,3	1,0	
3-93498	M1	4,4	1,7	1,3	0,15	0,08	
3-93499	M3	4,6	4,5	1,1	0,35	0,21	
3-93500	M2	4,2	73,0	4,1	0,33	0,55	
3-93501	M4	5,6	1,9	0,61	1,5	0,63	
3-93502	M5	5,2	4,1	0,58	0,59	0,53	
3-93503	P1	5,5	10,3	2,0	5,1	1,1	
3-93504	P2	5,6	15,1	8,0	23,2	7,0	
3-93505	P3	7,2	37,1	4,6	28,6	2,4	
3-93506	P4	5,0	9,9	1,1	4,0	0,80	
3-93507	P5	4,3	6,1	1,4	2,9	0,61	
3-93508	I1	5,1	31,8	5,0	4,6	1,6	
OBSERVACIONES: MÉTODOS: pH Potenciométrico; Fósforo disponible Bray II; Ca, Mg, K, Na, Extracción con acetato de Amonio 1N pH 7 y Cuantificación en Absorción Atómica; Acidez Extracción KCl y Cuantificación por Volumetría; CO Walkley Black; CIC Acetato de Amonio 1N pH 7; Fósforo Total Fusión con Nitrato de Potasio y Cuantificación por Colorimetría.							
N.A. = No aplica; N.E. = No específica; N.D. = No detectado							
MÉTODOS: _____ _____ _____							
NOTA: Los resultados almacenados en la base de datos y los enviados por fax o e-mail se conservarán durante tres meses a partir de la entrega de los mismos. Las muestras se almacenarán durante seis meses (análisis químicos, mineralógicos y físicos); 15 días (análisis biológicos), a partir de la fecha de recepción. Favor comunicarnos su sugerencia, observación o reclamo al teléfono 3884016 o 3884000 Ext. 4016. Prohibida la reproducción parcial sin autorización escrita del Laboratorio.							
APROBADO POR: _____ _____ _____						Firma _____	

(T)= Tota; (P)= Paipa



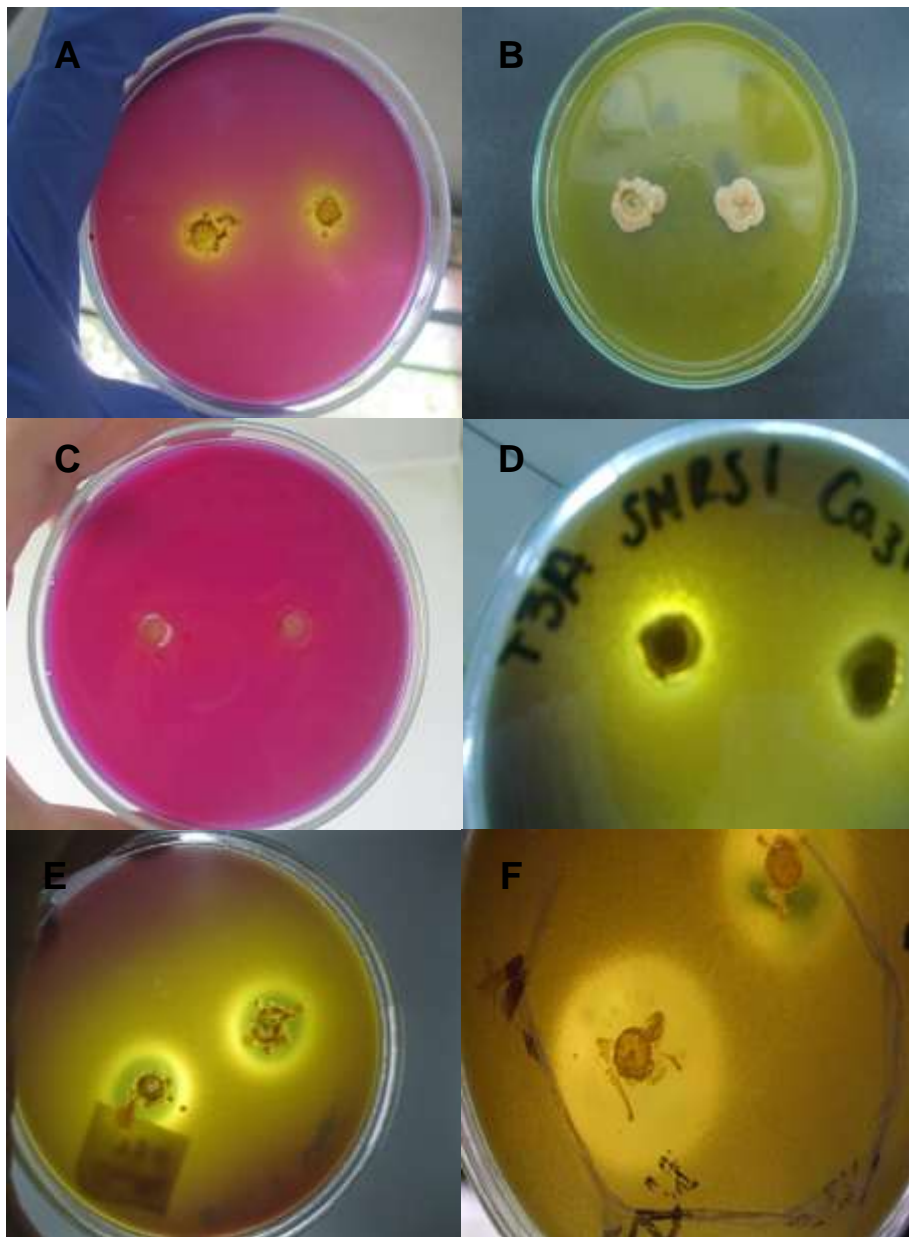
RESULTADOS ANÁLISIS DE LABORATORIO				FECHA	
GRUPO INTERNO DE TRABAJO LABORATORIO NACIONAL DE SUELOS				AAAA-MM-DD	
				2011-05-16	
NOMBRE Y APELLIDO / EMPRESA / PROYECTO		LUÍS DANIEL PARRA / MARCELA PRADA / UNIVERSIDAD JAVERIANA		No. SOLICITUD 1096	
DEPARTAMENTO / MUNICIPIO / LOCALIZACION		BOGOTÁ, D.C.			
TIPO DE ANÁLISIS		SUPLEMENTO DE RESULTADOS <input type="checkbox"/>		DE FECHA	
No. DE LABORATORIO	IDENTIFICACION DE CAMPO	K cmol(+)/Kg	Na cmol(+)/Kg		
3-93496	T1	0,07	0,02		
3-93497	T3	0,42	0,09		
3-93498	M1	0,12	0,06		
3-93499	M3	0,19	0,08		
3-93500	M2	0,54	0,13		
3-93501	M4	0,32	0,13		
3-93502	M5	0,32	0,02		
3-93503	P1	0,46	0,12		
3-93504	P2	1,6	0,09		
3-93505	P3	1,8	0,22		
3-93506	P4	0,68	0,05		
3-93507	P5	0,40	0,10		
3-93508a	I1	1,4	0,29		
OBSERVACIONES:					
N.A. = No aplica; N.E. = No específica; N.D. = No detectado					
METODOS:					
NOTA: Los resultados almacenados en la base de datos y los enviados por fax o e-mail se conservarán durante tres meses a partir de la entrega de los mismos. Las muestras se almacenarán durante seis meses (análisis químicos, mineralógicos y físicos); 15 días (análisis biológicos), a partir de la fecha de recepción. Favor comunicarse su sugerencia, observación o reclamo al teléfono 3884016 ó 3884000 Ext. 4016. Prohibida la reproducción parcial sin autorización escrita del Laboratorio.					
Aprobado por: _____ Firma					

(T)= Tota; (P)= Paipa

## Anexo F.

### EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD SOLUBILIZADORA DE FÓSFORO EN MEDIO SÓLIDO SMRS-1.

Las siguientes imágenes evidencian los diferentes resultados que pudieron ser obtenidos en la prueba sólida en medio SMRS-1. Las imágenes A, B, C corresponden a pruebas negativas de solubilización de fósforo (A, B= Acidificación pero no producción de halo de aclaramiento, C= No acidificación, ni producción de halo de hidrólisis); las imágenes D, E, F corresponden a pruebas positivas de solubilización de fósforo (Acidificación y producción de halo de hidrólisis alrededor de las colonias).

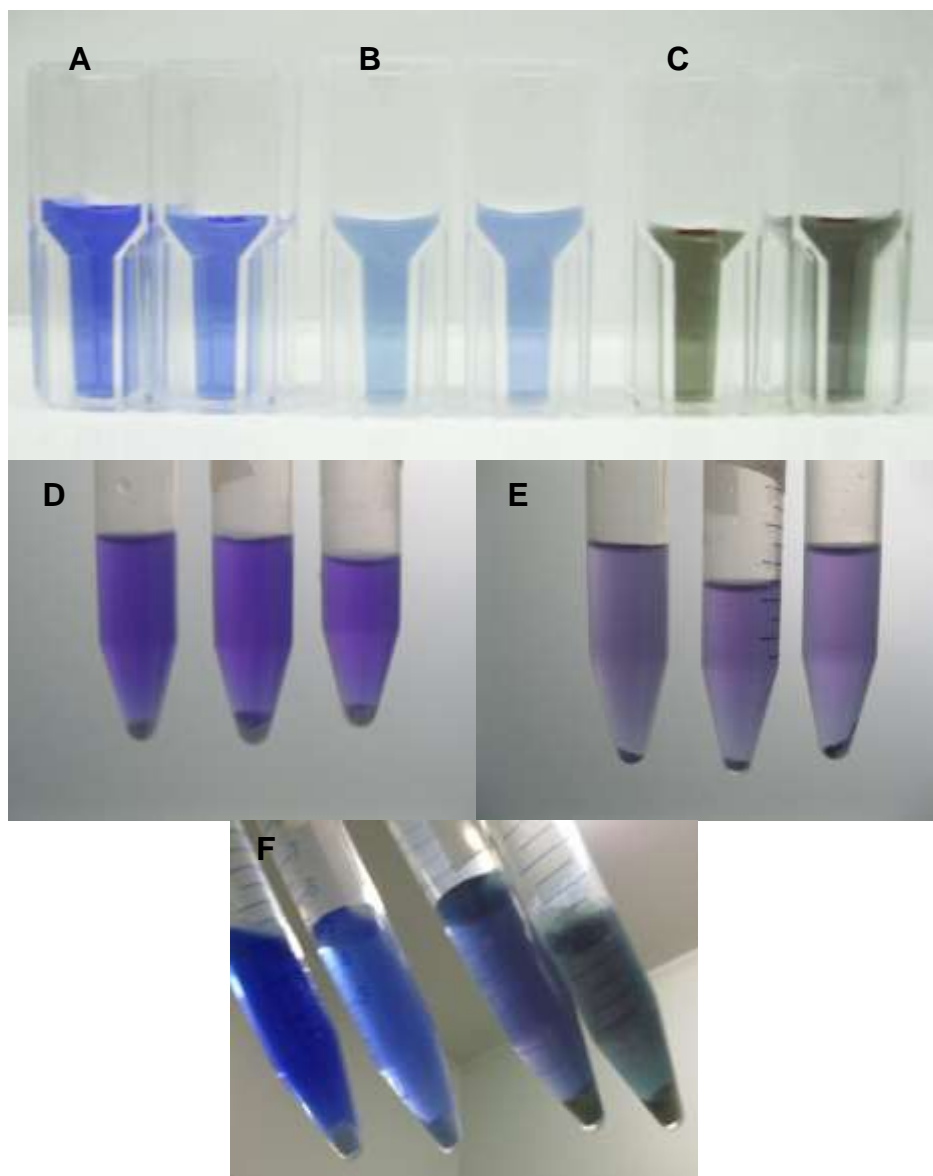




## Anexo G.

### EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD SOLUBILIZADORA DE FÓSFORO EN MEDIO LÍQUIDO NBRIP-BPB.

Las siguientes imágenes evidencian los diferentes resultados que pudieron ser obtenidos en la prueba sólida en medio NBRIP. A= Medio sin inocular; B= Decoloración del medio de cultivo; C= Acidificación del medio de cultivo; D= Medio sin inocular, se observa gran cantidad de fosfato tricálcico comparado con E= Decoloración del medio de cultivo, solubilización de fósforo que se observa por la disminución del fosfato tricálcico; F= Diferencias en los resultados encontrados en la prueba líquida en medio NBRIP.



## Anexo H.

### CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD SOLUBILIZADORA DE FÓSFORO.

Las siguientes imágenes revelan los diferentes resultados que pudieron ser obtenidos en cuantitativa evaluada bajo dos fuentes de fósforo insoluble (fosfato tricálcico y fosfato de aluminio). A= Montaje de la cuantificación de fósforo; B= Izquierda: Medio NBRIP sin inocular, derecha: aislamiento T3A en fosfato tricálcico; C= Izquierda: Medio NBRIP sin inocular, derecha: aislamiento T1C en fosfato tricálcico; D= Izquierda: Medio NBRIP sin inocular, derecha: Asilamiento T1J en fosfato de aluminio.



Anexo I.

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO KRUSKAL-WALLIS PARA EL ÍNDICE DE SOLUBILIZACIÓN  
OBTENIDO EN LA PRUEBA CUALITATIVA EN MEDIO SÓLIDO**

<b>Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Solido by Cepa</b>					
<b>Parametric AOV Applied to Ranks</b>					
<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Between	18	29502.1	1639.01	13.52	0.0000
Within	57	6908.9	121.21		
Total	75	36411.0			

<b>Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of Solido by Cepa</b>		
<b>Cepa</b>	<b>Mean</b>	<b>Homogeneous Groups</b>
1	74.500	A
17	65.750	AB
3	63.250	ABC
13	55.125	ABCD
14	51.750	ABCD
6	51.250	ABCD
18	49.875	ABCD
15	46.375	ABCD
5	41.375	ABCD
12	41.250	ABCD
4	36.500	ABCD
10	32.000	ABCD
16	31.750	ABCD
8	27.875	ABCD
9	27.125	ABCD
19	16.250	BCD
2	7.5000	CD
7	6.0000	D
11	6.0000	D

Alpha 0.05  
 Critical Z Value 3,622 Critical Value for Comparison 56.557  
 There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

Anexo J.

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO KRUSKAL-WALLIS PARA EL CAMBIO DE ABSORBANCIA OBTENIDO EN LA PRUEBA CUALITATIVA EN MEDIO LÍQUIDO**

<b>Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Liquido by Cepa</b>					
<b>Parametric AOV Applied to Ranks</b>					
<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Between	33	203292	6160.37	100.34	0.0000
Within	102	6262	61.39		
Total	135	209555			

<b>Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of Liquido by Cepa</b>		
<b>Cepa</b>	<b>Mean</b>	<b>Homogeneous Groups</b>
15	133.25	A
1	129.38	A
6	122.13	AB
10	117.00	ABC
14	115.38	ABC
9	115.00	ABC
4	112.00	ABC
5	109.88	ABCD
13	107.75	ABCD
8	96.000	ABCD
19	94.500	ABCD
7	88.750	ABCD
3	88.000	ABCD
17	86.250	ABCD
18	79.250	ABCD
12	77.125	ABCD
22	70.375	ABCD
32	65.000	ABCD
16	61.500	ABCD
34	54.750	ABCD
23	50.125	ABCD
24	49.875	ABCD
20	47.500	ABCD
2	47.000	ABCD
11	37.625	ABCD
29	37.125	ABCD

33	33.250	ABCD
25	19.250	BCD
21	19.000	BCD
31	17.750	BCD
28	17.375	BCD
30	16.625	BCD
26	10.500	CD
27	2.7500	D
Alpha 0.05		
Critical Z Value 3,918 Critical Value for Comparison 109.18		
There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.		

**Anexo K.**

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO KRUSKAL-WALLIS PARA LA PRUEBA CUANTITATIVA CON FOSFATO TRICÁLCICO COMO FUENTE DE FÓSFORO INSOLUBLE.**

<b>Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for CuaFT by Cepa</b>					
<b>Parametric AOV Applied to Ranks</b>					
<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Between	18	35155.4	1953.08	78.75	0.0000
Within	57	1413.6	24.80		
Total	75	36569.0			

<b>Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of CuaFT by Cepa</b>		
<b>Cepa</b>	<b>Mean</b>	<b>Homogeneous Groups</b>
13	72.750	A
15	72.000	A
1	64.250	AB
5	63.750	AB
10	59.750	AB
12	54.500	ABC
14	48.500	ABC
9	47.750	ABC
7	37.250	ABC
16	34.000	ABC

4	33.125	ABC
18	33.000	ABC
6	31.125	ABC
19	26.250	ABC
17	19.500	ABC
11	12.250	BC
8	10.250	BC
3	9.0000	BC
2	2.5000	C
Alpha 0.05		
Critical Z Value 3,622 Critical Value for Comparison 56.557		
There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.		

#### Anexo L.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO KRUSKAL-WALLIS PARA LA PRUEBA CUANTITATIVA CON FOSFATO DE ALUMINIO COMO FUENTE DE FÓSFORO INSOLUBLE.

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for CuaFA by Cepa					
Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	18	35394.3	1966.35	104.92	0.0000
Within	57	1068.3	18.74		
Total	75	36462.5			

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of CuaFa by Cepa		
Cepa	Mean	Homogeneous Groups
13	72.750	A
12	72.250	A
6	66.500	AB
9	62.375	ABC
18	55.750	ABC
7	51.875	ABC
3	49.500	ABC
4	47.375	ABC
14	45.000	ABC
10	39.000	ABC
8	36.375	ABC
11	29.125	ABC
17	26.125	ABC
19	24.875	ABC

16	18.625	ABC
5	13.500	BC
2	8.5000	C
1	6.0000	C
15	6.0000	C
Alpha 0.05		
Critical Z Value 3,622 Critical Value for Comparison 56.557		
There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.		

#### Anexo M.

#### ANÁLISIS DE CORRELACIÓN DE SPEARMAN PARA EL pH Y LA SOLUBILIZACIÓN DE FÓSFORO.

Correlación Spearman	Prueba Cuantitativa Fosfato Tricálcico	Prueba Cuantitativa Fosfato de Aluminio
pH	R -0,343 P 0,00250 N 76	R -0,755 P 0,000000200 N 76

Las variables con coeficientes de correlación positivos (R) y con valores de P por debajo de 0,050 tienden a aumentar juntas. Para las variables con coeficientes de correlación negativas y con valores de P inferiores a 0,050, un variable tiende a disminuir mientras que la otra aumenta. Para las variables con valores de P mayores a 0,050, no existe una relación significativa entre las dos variables.

**Anexo N.**

**ANÁLISIS DE CORRELACIÓN DE SPEARMAN ENTRE LAS PRUEBAS CUALITATIVAS (SÓLIDA Y LÍQUIDA) Y LA PRUEBA CUANTITATIVA.**

<b>Correlación Spearman</b>	<b>Prueba cualitativa Sólida</b>	<b>Prueba Cualitativa Líquida</b>	<b>Prueba Cuantitativa</b>
<b>Prueba Cualitativa sólida</b>	---	R 0,754 P 0,000000200 N 136	R 0,313 P 0,00602 N 76
<b>Prueba Cualitativa líquida</b>	R 0,754 P 0,000000200 N 136	---	R 0,635 P 0,000000200 N 76

Las variables con coeficientes de correlación positivos (R) y con valores de P por debajo de 0,050 tienden a aumentar juntas. Para las variables con coeficientes de correlación negativos y con valores de P inferiores a 0,050, un variable tiende a disminuir mientras que la otra aumenta. Para las variables con valores de P mayores a 0,050, no existe una relación significativa entre las dos variables.

**Anexo O.**

**ANÁLISIS DE CORRELACIÓN DE SPEARMAN PARA LA PRUEBA CUANTITATIVA CON FOSFATO TRICÁLCICO Y CON FOSFATO DE ALUMINIO.**

<b>Correlación Spearman</b>	<b>Prueba Cuantitativa Fosfato de Aluminio</b>
<b>Prueba Cuantitativa Fosfato Tricálcico</b>	R 0,0548 P 0,637 N 76



Las variables con coeficientes de correlación positivos (R) y con valores de P por debajo de 0,050 tienden a aumentar juntas. Para las variables con coeficientes de correlación negativas y con valores de P inferiores a 0,050, un variable tiende a disminuir mientras que la otra aumenta. Para las variables con valores de P mayores a 0,050, no existe una relación significativa entre las dos variables.

#### Anexo P.

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO KRUSKAL-WALLIS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FÓSFORO SOLUBLE CON FOSFATO TRICÁLCICO Y BAJO DIFERENTES pH DE ARRANQUE.

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of FT by pH		
pH	Mean	Homogeneous Groups
3	10.000	A
4	9.0000	AB
2	5.0000	AB
1	2.0000	B
Alpha 0.05		
Critical Z Value 2,638 Critical Value for Comparison 7.7668		
There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.		

#### Anexo Q.

#### ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FÓSFORO SOLUBLE CON FOSFATO DE ALUMINIO Y BAJO DIFERENTES pH DE ARRANQUE.

#### ANOVA

FA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2,875	3	,958	15,469	,001
Intra-grupos	,496	8	,062		
Total	3,370	11			

**FA**

		N	Subconjunto para alfa = 0.05		
pH			1	2	3
HSD de Tukey <sup>a</sup>	pH 6	3	,1648		
	pH 8	3	,1707		
	pH 4	3	,7157	,7157	
	pH 5	3		1,3558	
	Sig.		,100	,054	

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

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

### Anexo R.

### ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FÓSFORO SOLUBLE CON FOSFATO DE ALUMINIO Y BAJO DIFERENTES pH DE ARRANQUE.

**ANOVA**

RF

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	288,249	3	96,083	37,105	,000
Intra-grupos	20,716	8	2,589		
Total	308,965	11			

**RF**

		N	Subconjunto para alfa = 0.05		
pH			1	2	3
HSD de Tukey <sup>a</sup>	pH 4	3	20,2813		
	pH 6	3	23,6317	23,6317	
	pH 5	3		26,1333	
	pH 8	3			33,6016
	Sig.		,125	,299	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

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

