

**SELECCIÓN Y PRODUCCIÓN DE BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FÓSFORO EMPLEANDO
ROCA FOSFORICA COMO SUSTRATO**

Lina María Rodríguez Gacha

Natalia Sánchez Castro

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL
BOGOTA D.C.
JUNIO 2018**

**SELECCIÓN Y PRODUCCIÓN DE BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FÓSFORO EMPLEANDO
ROCA FOSFORICA COMO SUSTRATO**

Lina María Rodríguez Gacha

Natalia Sánchez Castro

" APROBADO

**Concepción Puerta Bula, Bact, Ph. D
Decana académica Facultad de Ciencias**

**Marcela Franco Correa, PhD
Directora carrera microbiología industrial**

**SELECCIÓN Y PRODUCCIÓN DE BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FÓSFORO EMPLEANDO
ROCA FOSFORICA COMO SUSTRATO**

**Lina María Rodríguez Gacha
Natalia Sánchez Castro**

APROBADO

**Aura Marina Pedroza Rodríguez
Bacterióloga M.Sc., Ph. D
Directora**

**Jose Salvador Montana Lara
Biólogo Cd Ph. D
Evaluador**

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque la tesis no contenga ataques personales contra persona alguna, antes bien se ve en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de Julio de 1946

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios por la fortaleza que nos brindo durante el desarrollo de este proyecto.

Agradecemos a nuestra tutora Aura Marina por su acompañamiento, asesoría y por permitirnos aprender de cada uno de sus conocimientos y mejorar académicamente.

Agradecemos a Andrea Blanco por permitir nuestro acompañamiento en su proyecto de doctorado, por su apoyo y asesoría brindada en cada momento.

Agradecemos a la profesora Claudia Rivera por su asesoría, paciencia y consejos brindados.

Agradecemos a nuestra familia y amigos que siempre nos brindaron fortaleza, compañía y apoyo en todos los momentos.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
1.INTRODUCCIÓN	2
2.PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION	4
3. MARCO TÉORICO	6
3.1 Generalidades del ciclo del fósforo	6
3.2 Formas de fósforo en el suelo.....	7
3.3 Mecanismos de solubilización de fósforo.....	7
3.3.1 Producción de ácidos orgánicos.....	8
3.4 Factores que afectan la solubilización.....	9
3.5 Biofertilizantes a base de BPS según NTC 5843 de 2011.....	10
3.6 Bacilos Gram negativos como solubilizadores.....	12
3.6.1 Producción de ácido gluónico para la solubilización de fósforo.....	14
3.7 Roca fosfórica.....	15
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	17
5. OBJETIVOS	17
5.1 Objetivo general.....	17
5.2 Objetivos específicos.....	17
6. METODOLOGÍA	18
6.1 Zona de muestreo.....	18
6.2 Aislamiento y selección primaria.....	18
6.3 Índice de solubilización.....	18
6.4 Pruebas de interacción de Gauze.....	19
6.5 Elaboración de bancos primarios de trabajo.....	19
6.6 Pruebas preliminares de solubilización en medio liquido.....	19
6.6.1 Producción de ortofosfatos (mg/L).....	20
6.6.2 Consumo de glucosa (g/L).....	20

6.6.3 Recuento de microorganismos.....	20
6.7 Identificación molecular.....	20
6.8 Selección de las condiciones y medio de cultivo que favorecen la producción de biomasa y fósforo disponible.....	21
6.9 Cinéticas de producción.....	22
6.10 Pruebas de estabilidad.....	23
6.11 Pruebas de germinación in vitro e invernadero usando semilla de <i>Allium cepa</i>	23
6.11.1 Pruebas de germinación in vitro.....	24
6.11.2 Pruebas de germinación y crecimiento en invernadero.....	24
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
7.1 Zonas de muestreo.....	26
7.2 Aislamiento y selección.....	27
7.3 Índice de solubilización.....	32
7.4 Pruebas de interacción de Gauze.....	35
7.5 Pruebas preliminares de solubilización en medio líquido.....	36
7.6 identificación molecular.....	39
7.7 Pruebas preliminares por tratamientos en consorcio y co cultivo.....	41
7.8 Selección de las condiciones y medio de cultivo que favorecen la producción de biomasa y fósforo disponible.....	43
7.9 Cinéticas de producción.....	48
7.10 Pruebas de estabilidad.....	53
7.11 Pruebas de germinación in vitro e invernadero usando semilla de <i>Allium cepa</i>	55
7.11.1 Pruebas de germinación de semillas de <i>Allium cepa</i> in vitro.....	56
7.11.2 Pruebas de germinación y crecimiento de las semillas de <i>Allium cepa</i> en invernadero.....	57
7.11.3 Variables de crecimiento vegetal en invernadero.....	58
7.11.4 Estabilidad de las cepas del consorcio y co cultivo durante la prueba de germinación en invernadero.....	60

8. CONCLUSIONES.....	63
9. RECOMENDACIONES.....	63
10. PRODUCTOS CIENTIFICOS DERIVADOS DEL TRABAJO DE GRADO.....	63
11. REFERENCIAS.....	65

TABLA DE CONTENIDO FIGURAS Y TABLAS

Tabla 1. Requisitos de los inoculantes biológicos elaborados con bacterias fosfatofosolubilizadoras según norma técnica vigente NTC 5843 de 2011 y NTC 2018 en consulta.....	11
Tabla 2. Empresas registradas en 2018 en Colombia como productoras de bioinoculantes a base de microorganismos fosfato solubilizadores.....	12
Tabla 3. Géneros de bacterias fosfato solubilizadoras (BFS), producción de fosforo disponible y viabilidad.....	13
Tabla 4. Diseño experimental Plackett-Burman para el diseño de medio de cultivo y condiciones de operación a escala de Erlenmeyer.....	22
Tabla 5. Componente del fertilizante Abundagro, utilizado en las parcelas muestreadas.....	28
Tabla 6. Descripción macroscópica y microscópica de cada una de las bacterias con actividad fosfatofosolubilizadora, aisladas en los Lotes A y C.....	30
Tabla 7. Cepas seleccionadas con su respectiva identificación y Score obtenido en la identificación bacteriana mediante espectrometría de masas por MALDI-TOF.....	39
Tabla 8. Interpretación del score de MALDI-TOF obtenido para cada cepa identificada.....	40
Tabla 9. Tratamientos en co cultivo y consorcio con las cepas seleccionadas en medio SMRS modificado con roca fosfórica.....	42
Tabla 10. Análisis de varianza (ANOVA) para las variables de respuesta recuento de colonias y cocentración de ortofosfatos del diseño Plackett Burman evaluando el consorcio conformado por <i>Pseudomonas koreensis</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> y <i>Kosakonia cowanii</i>	44
Tabla 11. Análisis de varianza (ANOVA) para las variables de respuesta recuento de colonias y concentración de ortofofatos del diseño Plackett Burman evaluando el co cultivo conformado por <i>Pseudomonas koreensis</i> y <i>Serratia liquefaciens</i>	45
Tabla 12. Parámetros cinéticos de producción del consorcio y co cultivo a las 12 y 6 horas en medio T11B.....	51
Figura 1. Ruta de la oxidación de la glucosa a ácido glucónico por la vía de la glucosa deshidrogenasa.....	15
Figura 2. Zonas de estudio.....	26
Figura 3. Recuento de biomasa (Log ₁₀ UFC/g) y pH en las zonas de estudio.....	27
Figura 4. Microscopia de las colonias seleccionadas (bacilos Gram negativos).....	30
Figura 5. Prueba índice de solubilización.....	32
Figura 6. Resultados cuantitativos de la prueba de índice de solubilización.....	33

Figura 7. Resultados prueba interacción de Gauze.....	35
Figura 8. Resultados pruebas preliminares en medio líquido para las bacterias seleccionadas.....	37
Figura 9. Resultados pruebas preliminares en medio líquido para las mejores bacterias.....	38
Figura 10. Resultados pruebas preliminares en medio líquido por tratamientos en consorcio y co cultivo.....	42
Figura 11. Resultados obtenidos en el diseño Plackett Burman.....	46
Figura 12. Cinética de producción del co cultivo.....	49
Figura 13. Cinética de producción del consorcio.....	50
Figura 14. Resultados prueba de estabilidad en medio líquido a temperatura ambiente y a temperatura de refrigeración 4°C.....	53
Figura 15. Índice de germinación de semillas de <i>Allium cepa</i> en cámara húmeda a escala de laboratorio. y Germinación de semillas de <i>Allium cepa</i> en suelo a escala de invernadero.....	56
Figura 16. Resultados prueba en invernadero.....	58
Figura 17. Estabilidad de las cepas del consorcio y co cultivo durante la prueba de germinación en invernadero.....	61

Resumen:

El fósforo (P) es uno de los macronutrientes implicados en el metabolismo de la planta, se necesita de él para la formación de la semilla y para el crecimiento temprano de la raíz; y especialmente en cultivos de hortalizas como la cebolla *Allium cepa* es necesario para el engrosamiento del bulbo (Resende et al., 2016). Sin embargo el P resulta ser uno de los nutrientes más limitantes en los cultivos, ya que tan solo el 0,1 % de P total se encuentra disponible para la absorción de la planta, para suplir la deficiencia de este nutriente, generalmente se utilizan fertilizantes químicos de P, los cuales a largo plazo pueden provocar la pérdida de fertilidad en el suelo y no son amigables con el medio ambiente. Una de las alternativas para aumentar la disponibilidad de P en el suelo, es implementar materias primas menos costosas y más amigables con el medio ambiente, como la roca fosfórica, la cual al combinarla con bacterias fosfato solubilizadoras (BPS) resulta en una alternativa viable y eficiente para aumentar la disponibilidad de fósforo en el suelo, por esta razón se realizó el aislamiento de 51 bacterias de dos parcelas de cultivos de cebolla *Allium cepa* ubicadas en Pesca y Punta larga (Boyacá, Colombia), de estas aislamientos se seleccionaron 28 cepas, cuya morfología correspondía a bacilos Gram negativos, a las 28 cepas se les midió el índice de solubilización (IS) en medio SMRS1 modificado con roca fosfórica, posteriormente se realizaron las pruebas de interacción de Gauze para determinar que cepas presentaban antagonismo entre ellas, las cepas antagónicas fueron eliminadas del estudio dejando en total 19 aislamientos, las cuales fueron sometidas a pruebas preliminares en medio líquido SMRS modificado con roca fosfórica. Solamente 6 cepas produjeron ortofosfatos en concentraciones superiores a 80 mg/L. Las 6 cepas fueron identificadas utilizando el equipo MALDI-TOF (Unidad de proteómica y micosis humanas, Universidad Javeriana), como resultado se determinó que tres pertenecían al género *Enterobacter*.sp y las otras tres fueron identificadas como *Pseudomonas koreensis*, *Serratia liquefaciens* y *Kosakonia cowanii*. Con estas tres cepas se realizó la formulación de 4 tratamientos, un consorcio con las tres cepas y tres co cultivos con diferentes combinaciones entre estas tres cepas, a estos tratamientos también se les realizaron pruebas preliminares en medio líquido SMRS modificado, obteniendo como resultado la mayor liberación de ortofosfatos con 96.5 mg/L por parte del consorcio (*Pseudomonas koreensis*, *Serratia liquefaciens* y *Kosakonia cowanii*) y para el co cultivo conformado por *Pseudomonas koreensis* y *Serratia liquefaciens*, se obtuvo 90.2 mg/L de ortofosfatos. Posteriormente, se realizó un diseño experimental de Plackett Burman con tres puntos centrales, para seleccionar las condiciones de producción y medio de cultivo que favorecen la producción de biomasa y liberación de ortofosfatos. De acuerdo con los análisis estadísticos ANOVA y Pos-Hoc de Tukey se determinó que el mejor tratamiento correspondía al MT11B; donde se obtuvo el mayor recuento de colonias con 8.0 Log₁₀ ufc/mL para el co cultivo y 8.1 Log₁₀ ufc/mL. La mayor concentración de ortofosfatos estuvo por encima de 80 mg/L para el consorcio y el co cultivo. Así mismo se realizaron cinéticas de producción tanto para el consorcio y el co cultivo durante 12 horas en medio SMRS estándar y MT11B; para el consorcio se obtuvo la mayor producción de fósforo disponible, fósforo en solución y recuento de colonias a las 6 horas y para el co cultivo fue a las 12 horas. De igual manera el medio MT11B fue utilizado para determinar la estabilidad del consorcio y el co cultivo en función del tiempo en dos temperaturas diferentes, los resultados indicaron que tanto el consorcio como el co cultivo no son estables ya que su viabilidad decrece rápidamente, por esto es necesario implementar algún soporte que asegure la estabilidad del consorcio y el co cultivo. Finalmente se realizaron ensayos de germinación in vitro y en invernadero de semillas de *Allium cepa*, en donde los resultados indicaron que el consorcio fue el mejor tratamiento obteniendo porcentajes de índice de germinación superiores al 80 % seguido del co cultivo, lo que evidencia el potencial de promotoras de crecimiento vegetal al ser usadas en conjunto.

1. Introducción:

El fósforo (P) es uno de los principales macronutrientes esenciales para el crecimiento y desarrollo vegetal, está implicado en el metabolismo de la planta, incluyendo actividades de división celular, fotosíntesis, respiración, almacenamiento, transferencia de energía y fijación de nitrógeno en legumbres (Pukrishnaraj *et al.*, 2014) y engrosamiento del bulbo en hortalizas como la cebolla (*Allium cepa*). El fósforo presente en el suelo se encuentra en formas orgánicas e inorgánicas. El fósforo inorgánico incluye minerales de P primarios como la apatita, hidroxiapatita y oxiapatita, además de formas minerales de P secundarios como fosfatos de Ca, Mg, Fe o Al. Por otro lado, el fósforo orgánico constituye entre el 30-50 % de fósforo total en el suelo, se encuentra principalmente en formas de fosfato de inositol, fosfomonoésteres y fosfodiésteres; estas formas son originadas por procesos de descomposición de animales, microorganismos y plantas (Renneson *et al.*, 2016). La planta absorbe el fósforo en forma de ortofosfatos solubles ($H_2PO_4^-$ y HPO_4^{2-}), sin embargo solo el 0,1 % de P presente en el suelo se encuentra en forma soluble y disponible para la planta. La baja disponibilidad de fósforo se debe a la fijación de formas no solubles en el suelo y por ende no disponibles para la planta. La fijación de P es un proceso dependiente del pH y del tipo de suelo, es llevado a cabo por reacciones de adsorción de fosfato a la superficie de minerales y por la precipitación de fosfato con hidróxidos libres de Ca, Fe y Al (Sharma *et al.*, 2013).

El ciclo del fósforo se ha reportado como un ciclo “abierto” debido a que no tiene intercambios con la atmósfera, en él participan diferentes procesos que afectan la concentración de P en el suelo. Estos procesos incluyen: disolución-precipitación (equilibrios minerales), adsorción-desorción (interacciones entre P en solución y superficies sólidas del suelo) y mineralización-inmovilización (conversiones biológicas de P entre formas orgánicas e inorgánicas). En este último proceso participan los microorganismos presentes en la rizosfera, por medio de mecanismos de solubilización y mineralización realizan conversiones de fósforo orgánico e inorgánico (Sharma *et al.*, 2013).

Debido a que la mayoría de los suelos son deficientes en fósforo biodisponible, éste debe integrarse al agroecosistema como fertilizante (Lambers *et al.*, 2006) además de recurrir a usar fuentes naturales de fósforo para la producción de fertilizantes fosfatados, como las rocas fosfóricas, con el fin de mantener el nivel fósforo en los suelos fértiles o aumentar el contenido de P en suelos deficientes en fósforo. Las rocas fosfóricas constituyen un recurso natural finito, no renovable y los depósitos geológicos de diferente origen se encuentran en todo el mundo. En la actualidad son explotados pocos yacimientos de roca fosfórica y cerca del 90 % de la producción mundial es utilizada por la industria para la fabricación de fertilizantes fosfatados (Zapata *et al.*, 2007) Colombia se ubica como el tercer productor de roca fosfórica en el mundo siendo de gran importancia las minas presentes en el departamento de Boyacá, dentro de su composición se encuentra en mayor proporción el P (28 % de P_2O_5) seguido del Ca (38% CaO).

Dentro del ciclo del P participan los microorganismos solubilizadores de fósforo, se caracterizan por su capacidad para transformar el P insoluble a formas solubles (Zhu *et al.*, 2018). Existen diversos mecanismos de solubilización del fósforo orgánico e inorgánico ejercidos por los microorganismos, los cuales incluyen: Liberación de complejos o compuestos que disuelven formas minerales del fósforo por medio de aniones de ácidos orgánicos, sideróforos, protones, iones hidroxilo y CO_2 , además de la liberación de enzimas extracelulares como las fosfatasas (mineralización bioquímica del fósforo orgánico) (Sharma *et al.*, 2013). Las bacterias fosfato solubilizadoras (PBS) constituyen alrededor del 20-40% de la población microbiana en el suelo, se caracterizan por su versatilidad metabólica,

excelente capacidad de colonización de la raíz y producción de diversos metabolitos y enzimas (Thakur *et al.*, 2014) , además tienen la capacidad de solubilizar fosfatos minerales como el fosfato tricálcico, fosfato dicálcico, hidroxiapatita y roca fosfórica (Alori *et al.*, 2017). Se han reportado diversos géneros bacterianos con capacidad para solubilizar fósforo: *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Rhizobium* sp., *Burkholderia* sp., *Achromobacter* sp., *Agrobacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Aerobacter* sp., *Flavobacterium* sp., *Mesorhizobium* sp., *Azotobacter* sp., *Azospirillum* sp, *Erwinia* sp.,y *Serratia* sp.,entre otras (Mendoza *et al.*, 2009).

El estudio de los mecanismos de solubilización de P y las condiciones ideales para la producción de bacterias fosfato solubilizadoras (PBS) se reconoce como una alternativa sustentable para la producción de inoculantes biológicos o biofertilizantes, ya que su producción responde la demanda creciente de buscar prácticas agrícolas respetuosas con el medio ambiente, sostenibles y económicamente viables (Pinilla *et al.*, 2010).

Los biofertilizantes son inoculantes microbianos benéficos tanto para la planta como para el suelo, su principal objetivo es movilizar la disponibilidad de nutrientes con base en su actividad biológica, ayudar a recuperar la microbiota perdida y a su vez mejorar la salud del suelo en general. Se caracterizan por ser inofensivos para los seres humanos, puesto que las cepas utilizadas en un bioinoculante no deben ser patógenas para los seres humanos, por estas razones, pueden conducir a un desarrollo económico sostenible para los agricultores y el país donde se produce (Zambrano *et al.*, 2015).

En Colombia, el uso de biofertilizantes ha venido en ascenso, según la base de datos del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) para marzo del 2017, se encontraron un total de 173 empresas de bioinsumos en Colombia. Los bioinsumos que más se comercializan son aquellos utilizados para control biológico. Aproximadamente el 13 % del total se dedican específicamente a la producción de bioinsumos producidos localmente con microorganismos usados como biofertilizantes. Cabe destacar el 46 % correspondiente a las empresas que le han apostado a generar productos biotecnológicos en el país. En esta apuesta sobresale el ICA por un gran portafolio de bioinsumos fabricados a partir de microorganismos, así mismo, esta entidad define la calidad mínima requerida para la producción de biofertilizantes según la norma técnica colombiana 5842 del 2011 (NTC 5842 de 2001; Barajas *et al.*, 2017).

Finalmente, la utilización biotecnológica de BPS con capacidad para solubilizar las reservas fosfóricas del suelo como la roca fosfórica, merece especial atención y estudio para la producción de biofertilizantes. En este estudio se busca aislar bacterias fosfatosolubilizadoras a partir de suelos empleados para la producción de *Allium cepa* y seleccionar las mejores condiciones de producción para el crecimiento de las BPS y la liberación de fósforo disponible.

2. Planteamiento del problema y justificación:

Uno de los nutrientes más limitantes en la producción de cultivos es el fósforo (P), se necesita de él para el desarrollo de procesos de absorción iónica, fotosíntesis, respiración, síntesis multiplicación y diferenciación celular, además de ser necesario para la formación de la semilla y para el crecimiento temprano de la raíz (Pukrishnaraj *et al.*, 2014). Especialmente en cultivos de cebolla el P es un nutriente con expresiva acción en la formación y calidad del bulbo (Resende *et al.*, 2016). Por ende, un adecuado suministro de P es esencial desde los estadios iniciales de crecimiento de la planta, por ejemplo durante el periodo de inicio de engrosamiento del bulbo y la cosecha de cebolla, las plantas extraen alrededor del 85% de N y P del suelo (Hernández *et al.*, 2011). En condiciones de deficiencia de fósforo se reduce la expansión foliar, el área superficial foliar, el número de hojas, el crecimiento de la raíz y el vástago, además de producir la senescencia prematura en las hojas, demora en la floración y un retraso en los procesos de maduración, ocasionando alteraciones y pérdidas en la calidad de los cultivos de frutas, verduras y granos, especialmente en cultivos de cebolla, frijol, algodón, arveja, papa, espinaca y tomate (Ahemad *et al.*, 2011).

Se ha reportado que solo el 0,1% de P total en suelo se encuentra en forma disponible para la absorción de la planta (Sharma *et al.*, 2013). La limitación del fósforo en el suelo se debe principalmente a la alta reactividad del elemento que le permite interactuar químicamente con la materia orgánica, con la superficie mineral de los coloides y con las formas activas de algunos cationes presentes en la solución del suelo. Lo que ha ocasionado el uso constante y elevado de fertilizantes de síntesis química, aumentando de esta manera los costos de producción (Rojas *et al.*, 2017).

En Colombia se estima que los agricultores para abonar una hectárea de tierra tienen que invertir hasta el 30% del total de los costos mínimos de producción de sus cultivos según el ministerio de agricultura. Uno de los fertilizantes más usados en diversos cultivos es el NPK, donde una bolsa de 50 kg cuesta 91.000 COP, contribuyendo a los altos costos de producción de cultivos agrícolas, puesto que además de invertir en la fertilización, también se invierte en la preparación del terreno, mano de obra, maquinaria, insumos agrícolas (Vélez *et al.*, 2014).

Por otro lado, las aplicaciones repetidas e indiscriminadas de los fertilizantes químicos de P conducen a la pérdida de la fertilidad del suelo, alteración de la diversidad microbiana y bajos rendimientos de los cultivos. La aplicación de superfosfato triple (94 kg/ha) ha mostrado una reducción sustancial en la respiración microbiana y el cociente metabólico (Sharma *et al.*, 2013). Lo anterior genera pérdidas en la rentabilidad de los cultivos agrícolas, y hace necesario la búsqueda de alternativas que aumenten la disponibilidad del P en el suelo, a través del uso de materias primas menos costosas y ambientalmente amigables (Cisneros *et al.*, 2016).

Una de las alternativas planteadas es la fertilización fosfórica, donde se aplica directamente la roca fosfórica al suelo y se ha desarrollado especialmente en los países importadores de fertilizantes como Colombia. Otra de las alternativas propuestas es el uso de bacterias solubilizadoras de fósforo (BPS), las cuales convierten las formas de P insolubles a formas P solubles mediante procesos de acidificación, quelatación, reacciones de intercambio y producción de ácidos orgánicos (Torres *et al.*, 2013).

Se ha reportado que mezclar la fertilización directa con roca fosfórica y combinarla con BPS resulta en una alternativa viable y eficiente para aumentar la disponibilidad de fósforo en el suelo. Puesto que las

BPS pueden ejercer mecanismos de solubilización del P insoluble presente en la roca fosfórica y transformarlo a P soluble mediante la producción de ácidos orgánicos (Khan *et al.*, 2013). Por lo tanto, la roca fosfórica puede reconocerse como uno de los sustratos necesarios para la producción biotecnológica de bioinoculantes a base de BPS y así contribuir a la disponibilidad del P en el suelo y considerarse una alternativa ambientalmente amigable y sustentable para los cultivos agrícolas.

3. Marco teórico

3.1 Generalidades del ciclo del fósforo:

El ciclo global del P no cuenta con un componente gaseoso significativo, lo que resulta en una característica única respecto a los otros ciclos biogeoquímicos (Roy., 2017). El fósforo al ser un elemento esencial para todos los organismos debe estar presente en todos los agroecosistemas (Bunemann., 2015). Este elemento proviene de las apatitas y de depósitos de fosfato natural como la roca fosfórica, donde es liberado a través de procesos de meteorización, lixiviación, erosión y extracción industrial como fertilizante. El fosfato liberado de las apatitas lo absorben las plantas y la biomasa microbiana, posteriormente se incorpora en la materia orgánica de los suelos y sedimentos para nuevamente ser depositado en formas minerales poco solubles. La movilidad del fósforo en el suelo involucra la toma del nutriente por las plantas y su retorno a través de los residuos vegetales y animales (Rincón *et al.*, 2012).

La fracción de P está constituida por diversos iones ortofosfatos, puede ser utilizada por las plantas y los microorganismos en forma inmediata, su abundancia y tipo dependen en gran medida del pH del suelo. Esta fracción también es afectada por reacciones tales como adsorción física y precipitación, los cuales se han denominado fijación o retención del P (Pagliari *et al.*, 2017). La fijación de P por los minerales y compuestos del suelo es inicialmente una reacción de intercambio de ligando del fosfato con grupos funcionales en las superficies de estos materiales. El intercambio de ligando del elemento puede ocurrir sobre las superficies hidroxiladas de los óxidos de Fe y Al y de silicatos poco cristalinos, así como en los bordes de las superficies de los octaedros de Al. De esta forma, el fosfato penetra la capa de coordinación del Al o Fe y se une en forma covalente con el catión vía grupos oxígeno e hidroxilos. Este fenómeno también ocurre con Al y Fe asociados a los complejos orgánicos. Luego de este proceso de intercambio de ligando, la sorción prosigue con reacciones más lentas, como de difusión al estado líquido en los microporos, difusión al estado sólido o bien precipitación (Henríquez., 2005).

La precipitación de iones de P con cationes metálicos, forman un rango de minerales de P. El tipo de mineral formado depende del pH del suelo, bajo condiciones neutras a alcalinas en el suelo, los iones P precipitan como fosfatos de Ca: fosfatos de dicalcio u octacalcio, hidroxiapatita y en apatitas menos solubles. Por el contrario, bajo condiciones ácidas los iones P precipitan como fosfatos de Fe y Al, tales como strengita, vivianita, variscita y diversos minerales del grupo de plumbogummitas. Los fosfatos de Fe y Al tienen una solubilidad creciente al aumentar el pH, mientras que los fosfatos de Ca tienen una solubilidad decreciente al aumentar el pH, excepto por valores de pH superiores a 8. Los minerales de P constituyen una parte significativa de P en el suelo, predominando en suelos altamente fertilizados (Hinsinger., 2001).

En el ciclo microbiano del P se producen transformaciones de formas inorgánicas a formas orgánicas y se da la conversión de formas inmóviles insolubles a compuestos solubles móviles. La conversión de fosfatos inorgánicos disponibles para la planta y para los microorganismos en formas orgánicas no disponibles se denomina inmovilización; el proceso contrario es la mineralización, que se define como la conversión de formas orgánicas a ortofosfatos (H_2PO_4 o H_3PO_4); el fósforo orgánico puede ser mineralizado como subproducto de la mineralización de la materia orgánica del suelo o mediante la acción de enzimas específicas que son reguladas por la demanda de este nutriente (Picone *et al.*, 2002). También se pueden desarrollar procesos de solubilización microbiana de fósforo, por medio de diversos mecanismos de solubilización tales como producción de ácidos orgánicos, sideróforos, H_2S ,

los cuales llevan a cabo la transformación del fósforo inorgánico poco soluble a formas de fósforo solubles para la planta (Sharma *et al.*, 2013).

3.2. Formas de fósforo en suelo:

La mayoría de fósforo presente en los ecosistemas terrestres se encuentra localizado en el suelo (Cerón *et al.*, 2012), este elemento existe en diversas formas, donde se pueden agrupar en cuatro formas generales: P inorgánico disponible para las plantas y tres formas de fósforo no disponibles para la planta: P orgánico, P adsorbido y P de minerales primarios, a su vez estos compuestos de P pueden estar en el suelo en formas disueltas (en solución) o en formas sólidas (P en partículas). El P disuelto conforma menos del 0.1 % del P total del suelo y generalmente existe como iones ortofosfato, polifosfatos inorgánicas y P orgánico. El fósforo debe estar en solución antes de que pueda ser absorbido por las raíces de las plantas. Después de la absorción en la planta, gran parte del fosfato reacciona rápidamente para formar compuestos orgánicos (Prasad., 2006).

El P orgánico representa entre el 20-80 % del P total en el horizonte superficial del suelo, en ambientes naturales, después de la mineralización representa una fuente de P significativa para las plantas y ocurre especialmente en suelos bajo condiciones tropicales y subtropicales (Tiecher *et al.*, 2012). La principal fuente de compuestos orgánicos de fósforo (Po) lo constituyen animales, biomasa microbiana y plantas en proceso de descomposición (Cerón *et al.*, 2012). El fósforo orgánico se clasifica en tres grupos en función de los diferentes enlaces de fósforo: (i) Éster fosfato, (ii) fosfonatos, (iii) anhídridos de ácido fosfórico (polifosfato orgánica). A su vez los ésteres de fosfato se subclasifican en: monoésteres de fosfato y diésteres de fosfato. Los monoésteres de fosfato representan la forma predominante de fósforo orgánico en suelos con condiciones aeróbicas y se producen principalmente como fosfatos de inositol. Los diésteres de fosfato incluyen ácidos nucleicos (ADN y ARN), fosfolípidos y ácidos teicoicos. Por otra parte, los fosfonatos son compuestos unidos por enlaces carbono-fósforo y tienden a acumularse en suelos ácidos. Finalmente, los anhídridos de ácido fosfórico son considerados de gran importancia para la transferencia de energía, los más reconocidos son adenosina difosfato (ADP) y adenosina trifosfato (ATP) (Huang *et al.*, 2017).

El fósforo también se encuentra en el suelo en forma inorgánica (Pi) y comprende entre el 50-70 % del P total, aunque el contenido puede variar dependiendo del tipo de suelo. El fósforo inorgánico se encuentra formando parte de minerales de Ca, Fe y Al originados por mecanismos de precipitación y pueden liberar fósforo muy lentamente por medio de la meteorización. Los compuestos de fósforo inorgánico pueden encontrarse en forma de sales en solución, sales cristalinas o sales absorbidas por los coloides del suelo; también pueden formar enlaces de gran estabilidad con hidróxidos de hierro, aluminio o manganeso y son menos solubles que los compuestos de fósforo orgánico. El fósforo disponible para las plantas se encuentra en el suelo en forma de ortofosfatos, que son formas inorgánicas solubles, encontrándose iones monobásicos ($H_2 PO_4^{-1}$) y dibásicos (HPO_4^{-2}) (Behera *et al.*, 2014).

3.3 Mecanismos de solubilización de fósforo:

Los microorganismos participan del ciclo natural del fósforo debido a que están involucrados en varias transformaciones que sufre el P en el suelo, tienen la capacidad de liberar P soluble de las mezclas inorgánicas y orgánicas del P total que conforma el suelo a través de la solubilización y mineralización (Behera *et al.*, 2014). Se ha reportado la capacidad que tienen algunas especies bacterianas de

solubilizar los compuestos de fosfato inorgánico insolubles, como lo son el fosfato tricálcico, fosfato dicálcico, la hidroxiapatita y la roca fosfórica (Sashidhar *et al.*, 2010). Se puede encontrar mayor abundancia de microorganismos solubilizadores en condiciones aeróbicas y en la rizosfera (Sharma *et al.*, 2013). Los principales mecanismos de solubilización de fósforo empleado por los microorganismos son: Liberación de complejos o compuestos que disuelven minerales de fósforo por medio de aniones de ácidos orgánicos, sideróforos, protones, iones hidroxilo, CO₂, además de la liberación de enzimas extracelulares (mineralización del fósforo) (Sharma *et al.*, 2013).

3.3.1 Producción de ácidos orgánicos:

La solubilización del fósforo inorgánico está determinada por la capacidad que tienen las bacterias fosfato solubilizadoras (PSB) de liberar metabolitos primarios y secundarios como los ácidos orgánicos de bajo peso molecular (Khan *et al.*, 2009). Estos ácidos pueden aumentar la disponibilidad de minerales de P inorgánicos escasamente solubles (Chen *et al.*, 2008), la liberación de estos ácidos orgánicos por las PSB aumenta la solubilización de fosfatos fijados en el suelo y por ende la absorción de P por la planta, lo que genera altos rendimientos en cultivos y su estudio resulta de gran interés para la producción de biofertilizantes (Miller *et al.*, 2010).

Dentro de los ácidos orgánicos producidos por las PSB se reportan el oxálico, cítrico, glucónico, malónico, succínico, málico, oxalacético, acético, isovalerico, fumárico, adípico (Alori *et al.*, 2017), estos ácidos son de bajo peso molecular y poseen uno o más grupos carboxilo. Dependiendo de las propiedades de disociación y el número de grupos carboxilo, los ácidos orgánicos tienen carga negativa, por lo que pueden formar complejos con cationes metálicos en solución y el desplazamiento de aniones de la solución del suelo. Los ácidos orgánicos de bajo peso molecular provienen del metabolismo de compuestos de alto peso molecular, como carbohidratos, péptidos y lípidos. Los ácidos orgánicos o carboxílicos son sustancias polares y son capaces de formar puentes de hidrógeno entre sí y con el agua. La mayoría de los ácidos orgánicos producidos por las PSB son alifáticos, es decir, son ácidos no aromáticos (Mendoza *et al.*, 2010).

La producción de ácidos orgánicos por las BSP tiene acción directa en la acidificación, quelación, precipitación y las reacciones de óxido reducción en la rizósfera. La acción de los ácidos orgánicos en la solubilización de minerales puede atribuirse a la disminución en el pH por medio de la extrusión de H⁺ o por la secreción de diversos ácidos orgánicos. Adicionalmente, los ácidos orgánicos llevan a cabo la formación de complejos estables con Ca₂⁺, Mg₂⁺, Fe₃⁺ y Al₃⁺. Se ha demostrado que los ácidos orgánicos reducen la precipitación de fosfato con el hierro y el aluminio. La solubilización es el resultado de la acidificación del espacio periplásmico, debido a la oxidación directa de la glucosa o de otra aldosa por acción del quino proteína glucosa deshidrogenasa. La glucosa se convierte en ácido glucónico y después de dos oxidaciones sucesivas, en el espacio periplásmico, se convierte en ácido 2-cetoglucónico ó 2,5-dicetoglucónico, siendo este mecanismo reportado como el principal mecanismo de solubilización de fosfato mineral en bacterias Gram negativas (Adhya *et al.*, 2015).

La solubilización del fosfato por los ácidos orgánicos depende del pH y la mineralogía del suelo. Existen dos mecanismos para que esto ocurra. El primero es un intercambio del ácido, por ejemplo, los H⁺ provenientes del citrato se intercambian por el P ligado a la superficie de los cristales de Al(OH)₃ o Fe(OH)₃ reduciéndolos y liberando II P. El segundo mecanismo depende de la concentración de los ácidos orgánicos producidos por las BSP, el cual involucra la formación de complejos con iones de metales provenientes de la roca fosfórica (Mendoza *et al.*, 2010).

La quelación es otro de los mecanismos reportados para la solubilización de fósforo, la quelación implica la formación de dos o más enlaces coordinados entre una molécula aniónica o polar y un catión, dando como resultado un complejo con estructura de anillo. Los aniones de ácidos orgánicos, con grupos hidroxilo y carboxilo que contienen oxígeno, tienen la capacidad de formar complejos estables con cationes como Ca^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} y Al^{3+} , que a menudo se unen con fósforo. Al formar complejos con los cationes en la superficie del mineral, los aniones de ácidos orgánicos debilitan los enlaces de cationes-oxígeno de la estructura mineral y catalizan la liberación de cationes a la solución, también los ácidos orgánicos pueden disolver directamente el P mineral por el intercambio aniónico de fosfato por anión ácido (Arcand *et al.*, 2006).

Otros mecanismos de solubilización reportados es la producción de H_2S y CO_2 . Inicialmente el H_2S reacciona con el fosfato férrico para producir sulfato ferroso y así liberar fósforo. Por otro lado, se ha sugerido que la actividad de BPS ocurre como consecuencia de la oxidación microbiana del azufre, la producción de nitrato y la formación de CO_2 . Estos procesos dan como resultado la formación de ácidos inorgánicos como el ácido sulfúrico. Sin embargo, su efectividad ha sido poco aceptada en comparación a la producción de ácidos orgánico (Sharma *et al.*, 2013).

Uno de los mecanismos reportados para la solubilización de fósforo sin producción de ácido es la excreción de H^+ proveniente de la asimilación de NH_4^+ por medio de la liberación de protones que acompañan la respiración o la asimilación de NH_4^+ . Los protones que se bombean fuera de la célula son el principal factor responsable de la solubilización de P, lo que indica que para diferentes especies pueden existir diferentes mecanismos de solubilización (Sharma *et al.*, 2013).

3.4. Factores que afectan la solubilización:

La solubilización del fósforo puede verse afectada por diferentes factores, uno de los principales es el pH, ya que la solubilización de los minerales portadores de fósforo es altamente dependiente del pH, a pH bajos (1,5-6,0) el fósforo es precipitado por el hierro (Fe) y el aluminio (Al) que se encuentran en el suelo, a diferencia de los fosfatos de calcio (Ca) y magnesio (Mg) que se encuentran a pH altos (6,5-9,0) (Oburger *et al.*, 2011). La disponibilidad del fósforo está en un rango muy pequeño de pH entre 6,0 a 7,0, esto se debe principalmente a que dentro de este rango de pH ocurre la máxima solubilidad de las formas inorgánicas en el suelo (Wang *et al.*, 2015).

Otro factor importante es la materia orgánica presente en el suelo, la cual se transforma por la acción de microorganismos que habitan en estos suelos, a medida que la materia orgánica se descompone algunos nutrientes como el carbono, nitrógeno, fósforo y azufre son liberados en el suelo en formas disponibles para la planta, esto se debe a que la materia orgánica del suelo se encuentra en mayor parte con carga negativa, ocasionando que los ácidos orgánicos reaccionen con cationes hidroxilados como el hidróxido de hierro $\text{Fe}(\text{OH})_2$ o hidróxido de aluminio $\text{Al}(\text{OH})_2$, creando combinaciones complejas que dan como resultado la inmovilización de estos iones, liberando los iones fosfato, por otro lado la solubilización mediada por ácidos orgánicos es favorecida por un contenido de materia orgánica de 19.0 g/kg a 23.2 g/kg en el suelo (Wang *et al.*, 2015).

En el suelo la relación C/N/P es otro factor esencial que puede afectar la solubilización del fósforo, estos elementos son importantes para la todos los seres vivos, de estos elementos el carbono es el que se encuentra en mayor porcentaje en suelo, seguido por el nitrógeno y el fósforo, por esta razón la

poca disponibilidad de este último elemento en el suelo podría ser un factor limitante para los microorganismos que solubilizan el fósforo. Las proporciones de los elementos pueden variar en diferentes condiciones como por ejemplo los diferentes tipos de vegetación y materia orgánica presente (Sun *et al.*, 2013). La relación C/N/P que favorece la solubilización es de 100/10/1, la cual es una relación C/N/P que facilita mecanismos como la mineralización y la solubilización, ya que al presentarse esta relación o valores cercanos a esta, los microorganismos no necesitan inmovilizar e incorporar el fósforo presente en el suelo a su biomasa, sino que lo pueden transformar de su forma orgánica a inorgánica haciéndolo disponible para la planta (Stahr *et al.*, 2017).

La temperatura es otro factor influyente que puede llegar a afectar la solubilización del fósforo, pues se ha reportado que a temperaturas de 30 ° C, o mayores, la solubilización del fósforo se incrementa, pero al tener temperaturas bajas, la solubilización es menor, esto se debe a que los microorganismos encargados de la solubilización en el suelo son principalmente mesófilos y termófilos por lo tanto están adaptados a temperaturas altas (Forber *et al.*, 2017), además la temperatura es un parámetro que puede determinar la velocidad en la que se producen muchas de las reacciones biológicas (Bustamante *et al.*, 2016).

3.5. Biofertilizantes a base de BPS según NTC 5843 de 2011.

Los biofertilizantes están definidos como productos que contienen microorganismos viables y benéficos, los cuales no deben ser patógenos para humanos, plantas o animales; estos bioinoculantes se emplean en agricultura para la fijación de nitrógeno, promoción del crecimiento vegetal, micorrización, transformación de materia orgánica o solubilización de materiales portadores de nutrientes tales como el fósforo; los inoculantes biológicos en Colombia están clasificados en inoculantes con hongos micorrizogenos arbusculares, inoculantes con bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas y asimbióticas, inoculantes elaborados con microorganismos solubilizadores de fosfato, inoculantes hechos a partir de microorganismos promotores de crecimiento vegetal e inoculantes preparados a partir de microorganismos transformadores de materia orgánica para la producción de abonos (NTC 5843 de 2011).

La Norma técnica Colombiana que establece los requisitos de los inoculantes biológicos empleados en el sector agrícola y los métodos empleados para la verificación del control de calidad de estos productos es la referencia normativa NTC 5843 de 2011, los criterios de calidad que debe cumplir un biofertilizante a base de microorganismos fosfato solubilizadores como lo son algunos hongos, actinobacterias y bacterias, para ser aceptados por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) se encuentran en la resolución 0698 de 2011, resolución en la cual se establecen los requisitos para el registro y control de ensayos, productores e importadores de bioinsumos de uso agrícola, dentro de estos requisitos generales establecidos en esta resolución están los certificados de existencia y representación legal si se trata de persona jurídica, o matrícula mercantil si es persona natural, con fecha de expedición no mayor a noventa (90) días calendario al momento de la presentación del formulario de solicitud ante el ICA, por otro lado también se debe contar con documentos que acrediten las instalaciones como domicilios, laboratorios y plantas de producción en donde se realicen actividades relacionadas con biofertilizantes, también se debe contar con un plan de análisis de control de calidad en el que se especifique el porcentaje de muestras por cada lote elaborado de acuerdo a lo que solicite el laboratorio registrado en el ICA para su respectivo análisis, finalmente la misma resolución trata los requisitos para la experimentación con muestras, estos últimos requisitos resultan

relevantes ya que permiten conocer los requisitos para llevar a cabo el trabajo experimental (ICA, resolución 0698 de 2011). En la Tabla.1 se presentan los criterios de calidad que debe cumplir un inoculante biológico a base de bacterias fosfatosolubilizadoras establecidos por la NTC 5843 de 2011, estos mismos criterios se conservan en la NTC que se encuentra en consulta.

Tabla 1. Requisitos de los inoculantes biológicos elaborados con bacterias fosfatosolubilizadoras según norma técnica vigente NTC 5843 de 2011 y NTC del 2018 que se encuentra en consulta.

Requisito	Solido	Líquido
Concentración mínima por cada microorganismo (NTC 5843 de 2011)	1×10^7 ufc/ml o ufc/g	1×10^7 ufc/ml o ufc/g
Concentración mínima por cada microorganismo (NTC de 2018 en consulta)	1×10^4 ufc/ml o ufc/g	1×10^4 ufc/ml o ufc/g
Pureza microbiológica	95%	95%
Actividad biológica, incremento de biomasa, altura o desarrollo radical en una especie indicadora y absorción de fósforo	90% Alfa:0.05	90% Alfa:0.05
Fósforo solubilizado o actividad fosfatasa	Especificado por el productor	Especificado por el productor
pH	Especificado por el productor	Especificado por el productor
Densidad	Especificado por el productor	Especificado por el productor
Humedad	Especificado por el productor	NA

En Colombia existen pocos estudios acerca de bioinoculantes, datos del Instituto Agropecuario de Colombia reportaron que durante el 2017, se registraron alrededor de 173 empresas de bioinsumos, dentro de las cuales el 54 % de las empresas son importadoras de productos utilizados para el control biológico, el 33 % se encargan de productos biotecnológicos para la producción de microorganismos promotores de crecimiento vegetal, y tan solo el 13 % de las empresas se encarga específicamente de la producción de bioinsumos elaborados a partir de microorganismos usados como bioinoculantes (Afanador., 2017), dentro de los tipos de inoculantes biológicos se encuentran los elaborados con microorganismos solubilizadores de fosfatos, este tipo de inoculantes en Colombia se usan principalmente en cultivos de café y cultivos de papa (Posada *et al.*, 2012), en la Tabla 2 se muestran algunas de las empresas registradas en Colombia durante el 2018, como productoras de bioinoculantes a base de microorganismos solubilizadores de fosfatos.

Tabla 2. Empresas registradas durante el 2018 en Colombia como productoras de bioinoculantes a base de microorganismos solubilizadores de fosfatos.

Titular (nombre razón de la social)	Cuidad	Actividad	Tipo de bioinsumo
Agroquímicos semillas y equipos de riego S.A	Bogotá	Importador	Inoculantes a base de microorganismos solubilizadores de fosfatos (<i>Pseudomonas fluorescens</i>).
Alteo S.A.S	Cali/Valle del cauca	Productor	Bioinsumos de uso agrícola, a base de <i>Pseudomonas fluorescens</i> y <i>Bacillus megaterium</i> .
Biodyne Colombia S.A.S	Chía/ Cundinamarca	Productor	Inoculante biológico de uso agrícola, a base de <i>Pseudomonas fluorescens</i> y <i>Bacillus subtilis</i> .
Biomerck S.A.S	Chía/Cundinamarca	Productor	Inoculante biológico líquido y en polvo, a base de <i>Pseudomonas fluorescens</i> y <i>Bacillus subtilis</i> .
Popac S.A.S	Huila	Importador	Bioinsumo de uso agrícola de tipo inoculante biológico.
Rizobacter de Colombia S.A.S	Bogotá	Productor	Inoculante biológico a base de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i> .
Soluciones microbianas del trópico S.A.S	Chinchina/Caldas	Productor	Bioinoculantes biológicos en formulaciones sólidas, gel y líquidas.

Un aspecto clave al tratarse de bioinoculantes, es la calidad del mismo, ya que esta asegura a los agricultores que la aplicación en campo será exitosa, dentro de los parámetros establecidos para determinar la calidad de un bioinoculante se encuentra la viabilidad del microorganismo o microorganismos que lo componen, así mismo estos se deben encontrar en un vehículo o soporte adecuado que los proteja durante el almacenamiento previo a su uso. Es importante tener en cuenta que un bioinoculante debe ser fácil de aplicar y manejar, de igual manera debe garantizar que los microorganismos estén protegidos de factores medioambientales que puedan disminuir su viabilidad asegurando su actividad en el campo (Afanador., 2017).

3.6. Bacilos Gram negativos como solubilizadores:

Las bacterias fosfatosolubilizadoras (PSB) tienen la capacidad de solubilizar compuestos insolubles de fosfato inorgánico como el fosfato tricálcico, dicálcico, hidroxapatita y la roca fosfórica para ponerlo a disposición de las plantas para su absorción, dentro de este grupo de bacterias, están reportadas

como solubilizadoras de fosfatos algunos bacilos Gram negativos y algunas bacterias pertenecientes al género *Bacillus* sp., dentro de los bacilos Gram negativos se encuentran géneros como *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp. *Serratia* sp., entre otros. El principal mecanismo para la solubilización de fosfatos, implica la producción de ácidos orgánicos sintetizados por estas bacterias, la producción de estos ácidos orgánicos da como resultado la acidificación del medio en el que se encuentra la bacteria, como consecuencia el fósforo inorgánico es liberado de un fosfato mineral (Ordoñez *et al.*, 2016), adicionalmente está reportado que algunos de estos géneros bacterianos además de ser excelentes solubilizadoras de fósforo también pueden ser bacterias promotoras de crecimiento vegetal, esto se debe principalmente a la producción de la fitohormona ácido indolacético (Awais *et al.*, 2017). A continuación en la Tabla 3 se presentan los géneros bacterianos más reportados como solubilizadores de fósforo, con la producción de fósforo disponible reportada para cada una y su viabilidad.

Tabla 3. Géneros de bacterias fosfato solubilizadoras (BFS), producción de fósforo disponible y viabilidad.

Bacterias fosfato solubilizadoras (BFS)	Microscopia	Concentración de Fósforo disponible (mg/L)	Viabilidad
<i>Pseudomonas</i> sp. (Kwak <i>et al.</i> , 2015)	Bacilos Gram negativos	81,76 (Kwak <i>et al.</i> , 2015)	1,0x10 ⁷ ufc/ml (Mantilla <i>et al.</i> , 2015)
<i>Enterobacter</i> sp. (Laral <i>et al.</i> , 2011)	Bacilos Gram negativos	81,09 (Sánchez <i>et al.</i> , 2012)	1,0x10 ⁸ ufc/ml (Laral <i>et al.</i> , 2011)
<i>Serratia</i> sp. (Behera <i>et al.</i> , 2017)	Bacilos Gram negativos	44,84 (Behera <i>et al.</i> , 2017)	7,2x10 ⁷ ufc/ml (Siddiqa <i>et al.</i> , 2016)
<i>Bacillus</i> sp. (Karagöz <i>et al.</i> , 2012)	Bacilos Gram positivos	89,08 (Zhang <i>et al.</i> , 2016)	1,6x10 ¹⁰ ufc/ml (Velineni <i>et al.</i> , 2011)
<i>Burkholderia</i> sp. (Lara <i>et al.</i> , 2011)	Bacilos rectos Gram negativos	97,29 (Zhang <i>et al.</i> , 2016)	1,0x10 ⁸ ufc/ml (Mantilla <i>et al.</i> , 2015)
<i>Kosakonia</i> sp. (Bergottini <i>et al.</i> , 2015)	Bacilos Gram negativos	No determinado	1,0x10 ¹⁰ ufc/ml (Berger <i>et al.</i> , 2018)
<i>Rhizobium</i> sp. (Siddiqa <i>et al.</i> , 2016)	Bacilos Gram negativos	10,78 (Zheng <i>et al.</i> , 2018)	6,2x10 ⁶ ufc/ml (Siddiqa <i>et al.</i> , 2016)
<i>Proteobacteria</i> sp. (Wei <i>et al.</i> , 2018)	Bacilos Gram negativos	17,68 (Wei <i>et al.</i> , 2018)	1x10 ⁸ ufc/ml (Zhang <i>et al.</i> , 2016)
<i>Streptomyces</i> sp. (Gopalakrishnan <i>et al.</i> , 2011)	Actinobacteria Gram positiva	34,41 (Zhang <i>et al.</i> , 2016)	4,5x10 ⁸ ufc/ml (Tamreihao <i>et al.</i> , 2016)

Dentro de los géneros de bacterias identificadas en el presente estudio se encuentra *Pseudomonas koreensis*, esta bacteria está dentro del grupo de promotoras de crecimiento vegetal pues se ha demostrado que incrementa el desarrollo de la raíz y el contenido de fósforo en plantas, este efecto de promotor de crecimiento vegetal se le atribuye a esta cepa por aumentar la disponibilidad de

nutrientes, principalmente el fósforo, la producción de sideroforos y de fitohormonas (Viruel *et al.*, 2011), por otro lado *Serratia liquefaciens* también reportada ampliamente como promotora de crecimiento vegetal, por su capacidad de producir sideroforos, ácido indol acético y solubilizar formas inorgánicas de fosforo (Karlicic *et al.*, 2016), se ha reportado que esta bacteria tiene la presencia de la enzima fosfatasa acida la cual es responsable de la solubilización de fosfato inorgánico, y también es capaz de solubilizar fosforo por la producción de ácidos orgánicos (Behera *et al.*, 2013), finalmente se encuentra *Kosakonia cowanii*, la cual pesar de no encontrarse ampliamente reportada, algunos autores también la clasifican como un microorganismo promotor de crecimiento vegetal, ya que se ha encontrado que esta cepa tiene los genes responsables de la producción de ácido glucónico para la solubilización de fosforo (Bergottini *et al.*, 2015).

3.6.1 Producción de ácido glucónico para la solubilización de fósforo:

Los géneros de bacilos Gram negativos *Pseudomonas* sp., *Kosakonia* sp. y *Serratia* sp., anteriormente mencionados, han sido reportados como bacterias fosfato solubilizadoras, el principal mecanismo utilizado por estas bacterias es la producción de ácidos orgánicos, no solamente ácido gluónico, también pueden producir ácidos orgánicos como el ácido oxálico, cítrico, butírico, malónico, láctico, succínico, málico, acético, glicónico, fumárico, adípico, indolacético y 2-cetoglucónico (Paredes *et al.*, 2010), los ácidos son producidos por las bacterias fosfato solubilizadoras pues estas bacterias cuentan con una batería enzimática para poder realizar la solubilización de fosfatos minerales, las enzimas que se ven involucradas son la glucosa deshidrogenasa y su cofactor pirroloquinolina (PQQ) (Vessey., 2003), el gen que codifica para la glucosa deshidrogenasa dependiente de PQQ y su operon es el gen *pqq*, este gen ha sido ampliamente identificado en el genoma de estas bacterias, además de genes que codifican para enzimas como la lactato deshidrogenasa (EC 1.1.1.28), citrato sintasa (EC 2.3.3.1), pirofosfatasa inorgánica (EC3.6.1.1) y fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1), las cuales son importantes en el proceso de solubilización llevado a cabo por géneros bacterianos como los mencionados anteriormente (Khan *et al.*, 2017).

Se ha observado que la capacidad de algunos géneros de bacterias Gram negativas para solubilizar fosfatos insolubles, se presenta como resultado de la oxidación de la glucosa a ácido glucónico por la vía de la glucosa deshidrogenasa, la cual se presenta en el espacio periplásmico de la bacteria y es un componente en la ruta de oxidación directa de la glucosa, las enzimas de esta ruta se localizan en la membrana citoplasmática, durante esta ruta la glucosa se oxida, este proceso se presenta en el espacio periplásmico generando la formación de ácido glucónico y 2-cetoglucónico (Babu-khan *et al.*, 1995), por otro lado para las bacterias Gram negativas solubilizadoras de fósforo las quinoproteínas resultan de gran importancia, pues regulan los procesos bioenergéticos, una de las más importantes es la quino proteína glucosa deshidrogenasa, la cual se encarga de generar la fuerza motriz de protones durante la oxidación de azúcares controlando una etapa clave en la ruta de oxidación de las aldosas que es el mecanismo principal para la utilización de azúcares por parte de los microorganismos, peor esta enzima solo actúa cuando está presente el cofactor PQQ (Beltran., 2014) lo dicho anteriormente se puede evidenciar en la Figura 1.

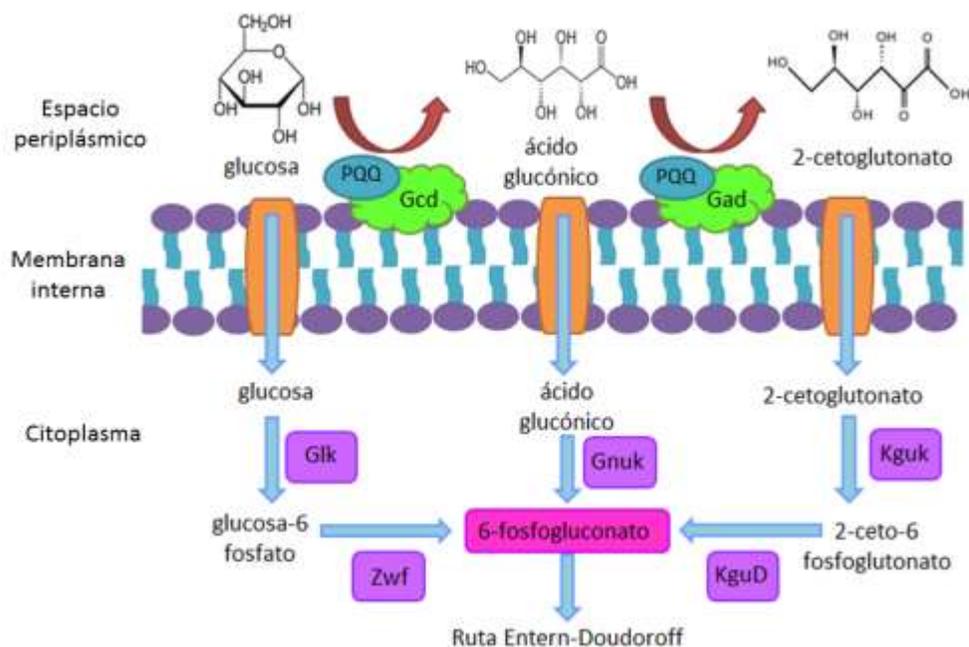


Figura 1. Ruta de la oxidación de la glucosa a ácido glucónico por la vía de la glucosa deshidrogenasa, se observan las enzimas unidas a la membrana implicadas en el metabolismo de la glucosa en el espacio periplásmico, Gcd (glucosa deshidrogenasa), Gad (gluconato deshidrogenasa) y PQQ (cofactor), y enzimas involucradas en el metabolismo de la glucosa en el citoplasma, Glk (glucoquinasa), Zwf (glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa), GnuK (gluconoquinasa), KguK (2-cetoglucuronatoquinasa), KguD (2-cetoglucuronato-6-fosfatoreductasa). (Esquema realizado a partir de modificaciones del estudio de [Werra et al., 2009](#)).

3.7 Roca Fosfórica.

La roca fosfórica (RP) es un mineral que presenta un alto contenido de fósforo natural (P) contiene aproximadamente entre 5-13 % de fósforo inorgánico. Se usa principalmente en la agricultura para la fabricación de fertilizantes y en algunos casos en la fabricación de detergentes, aditivos alimentarios y estabilización de metales. Los depósitos de RP se encuentran prácticamente en todos los continentes del mundo, centrándose en los trópicos y subtropicales, actualmente la roca fosforica se extrae en más de 30 países, sin embargo, muy pocos países son productores de este recurso; en Colombia los principales depósitos de roca fosfórica se encuentran en yacimientos minerales y su extracción se puede hacer por minería a cielo abierto o minería subterránea, los departamentos en los que se pueden encontrar las mayores reservas de roca fosfórica, son Norte de Santander, Boyacá, Huila y Tolima, siendo Boyacá en donde se encuentra un mayor porcentaje de reservas de roca fosfórica, la cual es el 39 % del total nacional, seguido por Huila, Tolima y Norte de Santander ([Alvarado et al., 2005](#)). Existen principalmente dos tipos de depósitos de roca fosfórica: Rocas sedimentarias e ígneas. Los depósitos sedimentarios han proporcionado alrededor del 80-90 % de producción mundial de RP y los depósitos ígneos alrededor del 10-20 %. Dentro de esos depósitos se encuentran minerales de fosfato como: fluorapatita y francolita principalmente en depósitos sedimentarios y en depósitos ígneos predominan hidroxilapatita o clorapatita. Por otra parte, la roca fosfórica contiene como principal

macronutriente el fósforo, también contiene Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu, B y Mo. Los depósitos sedimentarios suelen tener un contenido de 30-35 % aproximadamente de P_2O_5 (Fayiga *et al.*, 2016).

Para la fertilización de cultivos de hortalizas como la cebolla, generalmente se utiliza una dosis de aplicación de 100 a 200 Kg ha⁻¹ de roca fosfórica. Tradicionalmente se han venido usando fertilizantes a base de fosforo que causan impacto medioambiental y generan mayor costo para los agricultores, por esta razón una de las maneras de generar una agricultura sostenible, es mejorar la eficiencia de la roca fosfórica como fertilizante, empleando bacterias fosfatosolubilizadoras capaces de solubilizar de manera eficiente, fuentes de fósforo complejas como lo es la roca fosfórica, por esto la roca fosfórica es usada como fuente de fósforo en los medios implicados en la producción de bacterias fosfatosolubilizadoras, las cuales al mostrar potencial de solubilización de este mineral podrán ser usadas en biofertilizantes (Solanki *et al.*, 2015).

4. Pregunta de investigación.

¿Es posible utilizar roca fosfórica como fuente de fósforo como sustrato para la liberación de ortofosfatos por parte de bacterias Gram negativas fosfatosolubilizadoras?

5. Objetivos

5.1 General:

- Aislar bacterias fosfatosolubilizadoras a partir de suelos empleados para la producción de *Allium cepa* y seleccionar las mejores condiciones de producción para el crecimiento de las mismas y la liberación de ortofosfatos.

5.2 Específicos:

- Seleccionar bacterias Gram negativas fosfato solubilizadoras a partir de suelos empleados en la producción de *Allium cepa*.
- Determinar las condiciones de producción y medio de cultivo que favorecen la producción de biomasa y liberación de ortofosfatos.
- Evaluar la estabilidad en función del tiempo, del bioinoculante en presentación líquida bajo dos condiciones de almacenamiento.
- Realizar ensayos de germinación in vitro, en invernadero de semillas de *Allium cepa*, empleando las bacterias seleccionadas para verificar su potencial como biofertilizantes.

6. Metodología

6.1. Zonas de muestreo.

Se realizaron muestreos en dos zonas de Boyacá, localizadas en Punta Larga y Pesca. El muestreo fue sistemático y georreferenciado, se obtuvieron 18 puntos de muestreo por cada parcela, esto se realizó siguiendo la metodología reportada por [Ortega-Blu., 2014](#) (I Taller Teórico/práctico. Sustrato. Proyecto Colciencias). En cada punto de muestreo se tomó con una pala a 20 cm de profundidad una muestra de suelo de 500 g. Todas las muestras fueron rotuladas y transportadas en bolsas de plástico, contenidas en neveras de icopor al Laboratorio de Microbiología Ambiental y Suelos de la Pontificia Universidad Javeriana.

6.2. Aislamiento y selección primaria.

Para estimar las poblaciones de bacterias totales, bacterias productoras de ácido no solubilizadoras (BPA/NS) y bacterias fosfato solubilizadoras (BPS), se realizaron diluciones decimales y siembra en superficie 0.1 mL en agar SMRS1 con indicador y en agar Pikovskaya. Las cajas se incubaron a 30 °C por 72 horas. Se determinaron los recuentos de los tres grupos recuperados en estos medios de cultivo, los recuentos de bacterias totales fueron todas las bacterias que crecieron en el medio, las bacterias productoras de ácido no solubilizadoras (BPS/NS) fueron aquellas colonias que produjeron cambio de color en el medio pero no halos de aclaración en el mismo medio, finalmente las bacterias fosfatossilubilizadoras (BPS) fueron las que presentaron cambio de color y halo de aclaramiento en el medio ([Kibrom et al., 2017](#)). Adicionalmente, se midió el pH de cada muestra de suelo siguiendo el protocolo reportado por ([García et al., 2015](#)), en el cual se tomaron 10 g de suelo y se llevaron a 50 ml de agua destilada, esto se llevó al Shaker a 120 rpm durante 20 min, posteriormente implementando filtros Whatman de 0,85 µm la muestra fue filtrada, finalmente al producto de filtración se le midió el pH.

A partir de las colonias seleccionadas de los dos medios se realizaron subcultivos empleando los medios SMRS-1 y Pikovskaya para observar las colonias capaces de solubilizar la fuente de fósforo (fosfato tricálcico) y adicionalmente la acidificación del medio por el cambio de color del indicador púrpura de bromocresol, para esta prueba se utilizó una temperatura de 30 °C durante 48 horas. Posteriormente, se realizó una coloración de Gram de cada una de las colonias y se seleccionaron únicamente aquellas cuya morfología correspondía a bacilos Gram negativos cortos. Adicionalmente, las colonias con la morfología descrita fueron sembradas por aislamiento en agar King B suplementado con glicerol 10 ml/L para observar fluorescencia a 366 nm tras la incubación a 30 °C por 48 horas.

6.3 Índice de solubilización

Posteriormente, las colonias seleccionadas fueron sembradas en SMRS 1 modificado (se sustituye el fosfato tricálcico por roca fosfórica a 5 g/L). A cada una de las cepas se les determinó el índice de solubilización por la técnica de microgota en agar SMRS1 modificado y como medio de control agar SMRS1 con fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. La técnica consistió en la siembra de 8 microgotas correspondientes a ocho réplicas de 0,005 ml a partir del inóculo de cada una de las cepas promisorias, como control en la misma caja una microgota de 0,005 ml de agua, posteriormente la incubación se realizó a 30 °C por 48 horas ([Becerra et al., 2011](#)), se seleccionaron las cepas con los

índices de solubilización más altos, para esto se hizo una comparación de medias entre los índices de solubilización (IS) obtenidos para cada cepa (Motamedi., 2016) y una prueba ANOVA de un factor seguida de una prueba Post-Hoc de Tukey.

$$IS = \frac{A}{B} \quad (Ec 1)$$

(Ec 1). Donde A es: Diámetro del halo de colonia en mm + diámetro del halo de solubilización en mm
B: diámetro de la colonia en mm.

6.4. Pruebas de interacción de Gauze.

Se realizaron pruebas de antagonismo entre las bacterias con el mejor índice de solubilización, seleccionadas en el numeral 5,3, mediante la prueba de difusión en agar nutritivo usando suspensiones celulares con una concentración ajustada al tubo 1 de McFarland (3×10^8 UFC/mL) de cada cepa seleccionada, producidas en el medio SMRS-1. Cada una de las cepas fue sembrada de forma masiva en cajas de Petri diferentes, posteriormente se adicionaron tres sensidiscos impregnados con una suspensión de la bacteria a evaluar cuya concentración fue la misma de la cepa sembrada en superficie, de esta forma se obtuvieron tres replicas y como control un sensidisco impregnado en agua estéril, su incubación se realizó a 30 °C por 24 horas. Se determinó el antagonismo por la presencia o ausencia de halos de inhibición de crecimiento los halos de inhibición fueron tomados en mm, las pruebas estadísticas que se realizadas fueron, una prueba ANOVA de un factor seguida de una prueba Post-Hoc de Tukey (Cortés et al., 2012).

6.5. Elaboración de bancos primarios y bancos de trabajo.

Las cepas seleccionadas fueron conservadas mediante el método de criopreservación en eppendorf a -4 °C, utilizando glicerol al 25 % (v/v) como el agente crioprotector. La viabilidad y pureza del banco se verifica cada mes, tomando uno de los eppendorf del banco de cada cepa y reactivándolos en agar nutritivo, para posteriormente realizar una tinción de Gram que permita verificar la pureza del banco, adicionalmente a partir del mismo vial se realizan diluciones seriadas, que son sembradas en masivo en agar nutritivo para verificar la viabilidad del banco, esto con el fin de garantizar la calidad de los bancos (Mesa et al., 2004).

6.6. Pruebas preliminares de solubilización en medio líquido.

La prueba de solubilización de fósforo se le realizó a las cepas que mostraron un buen índice de solubilización y que no mostraban antagonismo en la prueba de interacción, además se produjeron dos tipos de biofertilizantes uno en consorcio y el otro en co cultivo con aquellas cepas que no se inhibieron unas con otras. La solubilización se evaluó en medio líquido SMRS-1 modificado con roca fosfórica, teniendo como medio estándar y/o control el medio SMRS-1 (fuente de fósforo: fosfato tricalcico 5 g/L). Cada una de las cepas, el consorcio y el co cultivo, fueron inoculados en erlenmeyer de 100 mL con un volumen efectivo de trabajo de 25 mL y un porcentaje de inculo del 10%, en ambos medios líquidos, para su posterior incubación a 30 °C por 72 horas a 120 rpm. Cada experimento se realizó por duplicado, adicionalmente se usaron dos cepas como controles, correspondientes a

Pseudomonas fluorescens y a *Pseudomonas azotoformans* Las variables de respuestas evaluadas fueron:

6.6.1 Producción de orto-fosfatos (mg/L):

Para determinar la producción de orto-fosfatos (mg/L) se utilizó el reactivo Test fosfatos de Merck Millipore por técnica colorimétrica, en esta técnica los orto-fosfatos en solución sulfúrica forman con los iones molibdato, ácido molibdofosfórico, que se determinara fotométricamente, a una longitud de onda de 357 nm con un límite de detección de 0,5 a 6 g/L de orto-fosfatos (Mercado., 2017) para verificar que la solubilización se llevó a cabo de manera biológica y no por factores como la agitación o la esterilización del medio, se midió la presencia de orto-fosfatos en medio estéril y puesto en agitación pero sin ser inoculado, para posteriormente calcular la diferencia entre los valores de ortofosfatos obtenidos en los medios inoculados y los valores de ortofosfatos obtenidos en el medio sin inocular.

6.6.2 Consumo de glucosa (g/L):

El consumo de glucosa (g/L) se determinó por la técnica del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS), la cual es una técnica colorimétrica, utilizada para detectar azúcares reductores; para esto lo primero que se realizó fue una curva patrón con el reactivo de DNS, cuyo límite de detección era de 10 g/L de glucosa, posteriormente se tomaron 10 ml de cada muestra y se centrifugaron a 400 rpm durante 20 min, a partir del sobrenadante se realizaron las diluciones correspondientes para realizar la reacción de DNS, teniendo las diluciones de las muestras se tomaron 0,25 ml y se llevaron a tubos HACH y se les agregó 0,25 ml de reactivo DNS; para iniciar la reacción los tubos se calentaron a ebullición durante cinco minutos, cumplido este tiempo se detiene la reacción por inmersión de los tubos en hielo durante cinco minutos, finalmente se agregaron 2,5 ml de agua destilada y se realizaron las determinaciones de absorbancia a una longitud de onda de 540 nm, los resultados de absorbancia se transformaron por medio de la ecuación de la recta obtenida en la curva patrón a concentración de glucosa residual en g/L (Negrulescu *et al.*, 2012).

6.6.3 Recuento de microorganismos:

La producción de biomasa (UFC/mL), fue determinada en medio SMRS modificado con roca fosfórica 5 g/L, glucosa 10 g/L, extracto de levadura 0,5 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 g/L, KCl 0,2 g/L, MgSO_4 0,3 g/L, MnSO_4 0,004 g/L, FeSO_4 0,0004 g/L, NaCl 0,2 g/L, purpura de bromocresol 0,1 g/L y Agar 20 g/L; estos recuentos se realizaron por siembra en superficie hasta la dilución 10^{-9} por triplicado (Oliveira *et al.*, 2009).

6.7 Identificación molecular

Teniendo en cuenta las pruebas de solubilización y a las pruebas preliminares se seleccionaron las seis cepas promisorias, a las cuales se les realizó la reactivación de los viales a partir del banco de trabajo del numeral 5.4, esta reactivación se hizo en agar nutritivo, para su posterior incubación durante 48 horas a 30 °C, una vez reactivadas, se realizó el aislamiento de cada cepa para tenerla purificada y proceder a la identificación molecular por medio del aislamiento y purificación del DNA de cada cepa, para posteriormente amplificar por la técnica PCR la región de 1465 pb del gen ribosomal

16S, los fragmentos amplificados fueron purificados y secuenciados con los iniciadores 27F, 517F, 800R, 1492R del gen ribosomal 16S, después de esto se hizo la limpieza manual de cada uno de las secuencias de los fragmentos obtenidos, para realizar el ensamblaje de las secuencias y obtener la secuencias consenso, a las cuales se les realizó una identificación mediante la comparación contra bases de datos *NCBI (Nation Center of Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)*, *Greengenes (Laurence Berkely National Laboratory, <http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>)* y *RDP (Ribosomal Database Project, [<http://rdp.cme.msu.edu/>]/<http://rdp.cme.msu.edu>)*. Las seis cepas promisorias fueron secuenciadas por la Corporación CorpoGen (Bogotá, Colombia). Igualmente se realizó la identificación bacteriana mediante espectrometría de masas utilizando el dispositivo MAIDI-TOF, esta identificación se llevó a cabo en la Unidad de Investigación en proteómica y Micosis Humanas de la Pontificia Universidad Javeriana.

6.8. Selección de las condiciones y medio de cultivo que favorecen la producción de biomasa y fósforo disponible.

Para seleccionar los componentes del medio de cultivo y las condiciones de operación que favorecieran el crecimiento del consorcio expresado como (UFC/mL) y la producción de ortofosfatos (mg/L), se realizó un diseño experimental de tipo Plackett-Burman (PB) con seis factores a dos niveles (+1; -1) y tres puntos centrales Tabla 4. Como control se empleó el medio SMRS-1 estandar y cada uno de los medios del diseño sin inocular con el consorcio y co cultivo respectivamente. Los resultados fueron tratados con un modelo teórico que permitió relacionar las variables de respuesta con los factores y sus respectivos niveles. Para el este tipo de diseños el modelo de primer orden que se utiliza se presenta en la ecuación 2.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i \quad (Ec.2)$$

Dónde: Y es la respuesta (Recuento de BPS en UFC/mL y concentración de ortofosfatos en mg/L), β_0 es el intercepto del modelo y β_i es el coeficiente estimado para cada factor X_i . El análisis de datos se realizó usando el programa Desing Expert 9.0 para análisis de varianza (ANOVA) y análisis de regresión. Para para determinar diferencias entre tratamientos, se realizó una prueba de comparaciones múltiples post-hoc (Prueba de Tukey) empleando el programa estadístico SAS 9.0, usando un nivel de significancia para todas las pruebas del 5% ($\alpha=0.05$).

El montaje de los experimentos se realizó en Erlenmeyer de 100 mL que contenía 25 mL de los medios evaluados, se inocularon de acuerdo con las combinaciones del diseño experimental (Tabla 1) y se incubaron a 25 °C. Al completar cada uno de los tiempos evaluados (factor F) se retiraron los Erlenmeyer de Shaker y se determinó el recuento de colonias BPS y concentración de ortofosfatos. Para el recuento de colonias se realizaron diluciones decimales y siembra en superficie en agar SMRS-1 modificado con roca fosfórica. Las cajas se incubaron por 48 horas a 25 °C (Angulo *et al.*, 2012). La determinación de la concentración de ortofosfatos los cultivos se centrifugaron 20 min a 4000 rpm y se recuperó el sobrenadante para determinar la concentración ortofosfatos en solución empleando el Kit Test fosfatos De Merck a una longitud de onda de 357 nm.

Tabla 4. Diseño experimental Plackett-Burman para el diseño de medio de cultivo y condiciones de operación a escalar de Erlenmeyer

Tratamiento	Factores evaluados					
	A	B	C	D	E	F
	Fuente de fósforo g L ⁻¹	Fuente de carbono g L ⁻¹	Fuente de nitrógeno g L ⁻¹	Agitación rpm	Inóculo (%)	Tiempo horas
1	5	5	0.25	200	10	48
2	2.5	5	0.5	120	10	48
3	5	2.5	0.5	200	5	48
4	2.5	5	0.25	200	10	12
5	2.5	2.5	0.5	120	10	48
6	2.5	2.5	0.25	200	5	48
7	5	2.5	0.25	120	10	12
8	5	5	0.25	120	5	48
9	5	5	0.5	120	5	12
10	2.5	5	0.5	200	5	12
11	5	2.5	0.5	200	10	12
12	2.5	2.5	0.25	120	5	12
13	3.75	3.75	0.375	160	7	48
14	3.75	3.75	0.375	160	7	48
15	3.75	3.75	0.375	160	7	48

Para el análisis de resultados se emplearon los programas estadísticos Design Expert® 9.0 y SAS 9.0 para Windows. El primer análisis consistió en una prueba ANOVA para seleccionar los factores más influyentes y los porcentajes de contribución, a continuación se realizará una prueba Post-Hoc de Tukey, para establecer diferencias significativas entre tratamientos (Ferreira *et al.*, 2016).

6.9. Cinéticas de producción.

Se realizaron cinéticas de producción en función de 48 horas para determinar la producción de biomasa (Log₁₀ UFC/ml), producción de fósforo en solución, el cual se determinó utilizando el reactivo Test fosfatos de Merck Millipore en la muestra centrifugada y fósforo disponible como ortofosfatos (mg/L), pH, glucosa residual (g/L), rendimiento de producto/ sustrato y la productividad volumétrica en el tiempo. Estas cinéticas se llevaron a cabo tanto para el co cultivo y para el consorcio y de acuerdo con los resultados obtenidos en el numeral 5.7, se utilizó el medio seleccionado, estas cinéticas

se realizaron por secuestró de Erlenmeyer, teniendo tres réplicas por cada hora evaluada, para esto se utilizaron Erlenmeyer de 100 ml con un volumen efectivo de trabajo de 25 ml y un porcentaje de inóculo del 10 % (Silveston *et al.*, 2007).

La curva se realizó en función de 12 horas, durante este tiempo se determinaron los parámetros previamente mencionados, para el caso del consorcio se realizó un muestreo inicial, media hora, una hora y partir de este, se hicieron muestreos cada hora hasta la hora 12, en el caso del co cultivo los muestreos se hicieron cada dos horas hasta la hora 12, en estas curvas se determinó mediante el uso de las ecuaciones correspondientes, mostradas a continuación, los parámetros de producción como rendimiento de biomasa en glucosa, rendimiento de fósforo disponible y fósforo en solución como ortofosfatos en glucosa, productividad volumétrica para la biomasa y productividad volumétrica para ortofosfatos y las pruebas estadísticas que se realizarán serán una prueba ANOVA de un factor seguida de una prueba Post-Hoc de Tukey (Cortés *et al.*, 2012).

$$Y_{p/s} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} \quad (Ec\ 3)$$

(Ec 3) Donde $Y_{p/s}$ es: rendimiento producto (orto-fosfatos) sobre sustrato (glucosa), P_f : producto final, P_i : producto inicial, S_i : sustrato inicial, S_f : sustrato final.

$$\text{Productividad biomasa} = \frac{X_f - X_i}{T} \quad (Ec\ 4)$$

(Ec 4) Donde X_f : biomasa final, X_i : biomasa inicial, T : tiempo donde se alcanza la máxima biomasa.

$$\text{Productividad producto} = \frac{P_f - P_i}{T} \quad (Ec\ 5)$$

(Ec 5) Donde P_f : producto final, P_i : producto inicial, T : tiempo en donde hay más producto (ortofosfatos)

6.10 Pruebas de estabilidad:

Se realizó la prueba de estabilidad del consorcio y el co cultivo en medio líquido, para esta prueba se utilizaron Erlenmeyer de 2L con un volumen efectivo de trabajo de 800ml. Cada tratamiento es decir el consorcio y el co cultivo se cultivaron en un Shaker durante 12 horas a 30 °C y 120 rpm por duplicado, el volumen total del lote fue subdividido en alícuotas de 30mL, que se transfirieron por triplicado a tubos Falcón de 50mL estériles. Las submuestras se almacenarán a dos temperaturas, 4 °C en refrigeración y a temperatura ambiente 14 °C, se realizaron muestreos iniciales, a los 5, 30 y 60 días, para valorar el recuento de colonias y la producción de ortofosfatos en función del tiempo bajo dos temperaturas de almacenamiento y para poder determinar la vida media del producto. Con los resultados obtenidos se realizó una comparación de medias entre tiempos y temperaturas para establecer si se obtuvieron o no diferencias significativas (Swati *et al.*, 2015).

6.11 Pruebas de germinación in vitro e invernadero usando semilla de *Allium cepa*

Para las pruebas de germinación in vitro se tomaron 20 semillas de *Allium cepa* y se colocaron por triplicado en cajas de Petri de 9,0 cm de diámetro que contenían papel de filtro whatman. A cada caja se le adicionaron 5 mL de una suspensión del consorcio o co cultivo, *Pseudomonas korensis*, *Kosakonia*

cowanni y *Serratia liquefaciens* a una concentración de $7 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/ml}$, obtenidas a partir del cultivo de cada cepa, del consorcio (*Pseudomonas korensis*, *Kosakonia cowanni* y *Serratia liquefaciens*) y del co cultivo (*Pseudomonas korensis* y *Serratia liquefaciens*) en Erlenmeyer de 100 ml con un volumen efectivo de trabajo de 25 ml y el 10 % de inóculo durante 12 horas. Como control se empleó agua destilada. Las cajas se incubaron por 5 días a 20 °C en oscuridad. Al finalizar el tiempo de germinación se determinó el porcentaje de germinación de semillas comparando contra el control y se realizó una comparación entre tratamientos, entendiéndose como el consorcio, el co cultivo y las cepas por separado. Para determinar si alguno de los tratamientos tenía efecto negativo o positivo sobre la germinación y el crecimiento de las plántulas de cebolla *Allium cepa*, se desarrollaron dos diseños experimentales.

6.11.1 Pruebas de germinación in vitro

Se busca evaluar la germinación de semillas in vitro; para esto se utilizaron cajas de Petri por triplicado, a las cuales se les colocó un filtro Whatman No 3, el cual fue humedecido con 5ml de cada uno de los tratamientos y como control agua destilada, posteriormente en cada caja de Petri se adicionaron 20 semillas de *Allium cepa*, correspondientes al 100 % por cada caja, estas cajas se cubrieron con papel aluminio y se almacenaron a 20 °C por 5 días (Álvarez *et al.*, 2017), transcurrido este tiempo se determinó el porcentaje de índice de germinación IG (%) utilizando la Ecuación 6, la cual se presenta a continuación (Zuconni *et al.*, 1985), finalmente con los datos obtenidos se realizó una comparación de medias entre el consorcio, co cultivo y cada cepa por separado para determinar diferencias significativas entre tratamientos, con ayuda del programa estadístico SAS 9.0®.

$$IG\% = \frac{G * L}{G_c * L_c} \times 100 \quad (Ec 6)$$

(Ec 6). Donde G corresponde al promedio de las semillas germinadas durante el tratamiento valorado, L (mm) es el promedio de longitud de la radícula de la muestra, G_c es el promedio de las semillas germinadas en el control con agua destilada y L_c (mm) es el promedio de la longitud de la radícula en el control con agua destilada.

6.11.2 Pruebas de germinación y crecimiento en invernadero

En el segundo diseño experimental se realizaron las pruebas de germinación en invernadero, para la realización de estas pruebas se utilizó suelo proveniente de Topaga Boyacá, este suelo fue esterilizado en dos ciclos cuyo intervalo era de 24 horas, la esterilización se hizo en autoclave durante 15 min, 15 lbs de presión y 120 °C, posteriormente el suelo se irradió con luz ultravioleta a 254 nm durante 12 horas, las pruebas de germinación en invernadero se realizaron en la ciudad de Bogotá a temperatura variable que dependió de los cambios climáticos durante el periodo de evaluación de dos meses. Se emplearon por triplicado vasos de 266 ml a los cuales se les adicionó 100 g de suelo, no se adicionó ningún fertilizante químico u orgánico. En cada vaso se colocaron 7 semillas a 3 cm de profundidad y se cubrieron con suelo, a ese suelo se le adicionaron 10 ml, valor que corresponde a la capacidad de campo del suelo, los 10 ml correspondían a la suspensión del consorcio, co cultivo y cada cepa por separado, como control se tenían vasos en los cuales únicamente se adicionó agua. Cada experimento se regó cada 4 días por un periodo de dos meses correspondientes al periodo de experimentación y al finalizar este periodo, se determinó el porcentaje de germinación de semillas a

plántulas (*Ec 6*,) pH del suelo, peso seco aéreo y peso seco radical, recuento de BPS totales, BPS por morofotipo, finalmente se realizó una comparación de medias entre consorcio y cepas por separado para establecer diferencias significativas entre tratamientos empleando el programa estadístico SAS 9.0®.

7. Resultados y discusión

7.1. Zonas de muestreo.

El aislamiento de bacterias fosfatosolubilizadoras se realizó a partir de las muestras tomadas en los lotes A (Punta larga, Boyacá) y C (Pesca, Boyacá), estos muestreos fueron georreferenciados y sistemáticos tal y como se muestra en la Figura 2, las dos parcelas en las que se muestreo correspondían a cultivos de *Allium cepa* y se encuentran ubicadas en el departamento de Boyacá (Colombia).

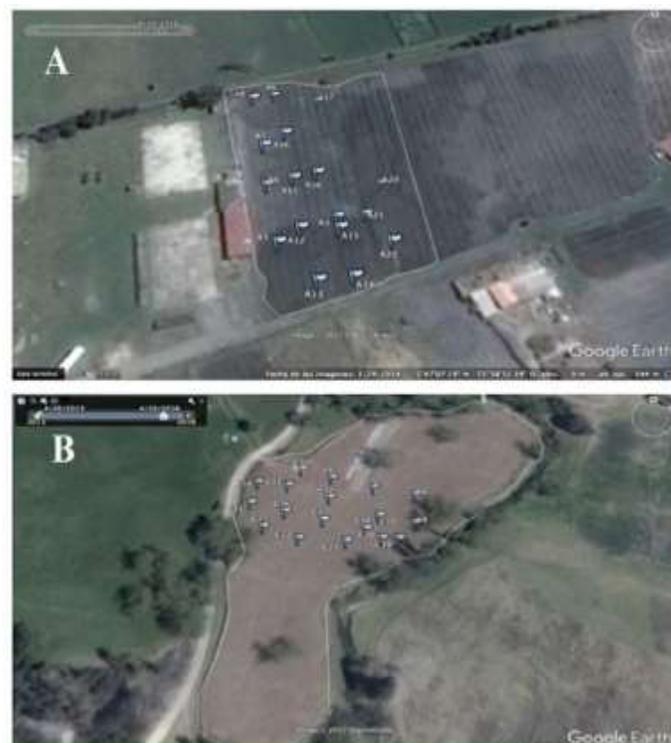


Figura 2. (A) Zona de estudio finca de San Juan ubicada en la vereda de Punta Larga, en el municipio de Nobsa Boyacá correspondiente al Lote A, con un área de 3000m², con coordenadas 5°44'35.5"N72°58'52.7"W, (B) Zona de estudio finca La Vega ubicada en la vereda llano grande, en el municipio de Pesca Boyacá correspondiente al Lote C, con un área de 9000m², cuyas coordenadas son 5°36'58.5"N73°01'42.0"W, en los dos lotes se realizó muestreo georreferenciado y sistemático.

Ambas parcelas corresponden a cultivos de la variedad vegetal *Allium cepa*, estas hortalizas requieren de un manejo apropiado de nutrientes en el suelo donde se encuentran cultivadas, dentro de estos nutrientes es importante destacar al fósforo, ya que este es un macronutriente esencial para que el desarrollo radicular se dé rápidamente al igual que el desarrollo del bulbo durante el los primeros dos meses, si se presenta deficiencia de fósforo puede haber reducción en el tamaño del bulbo y retrasar la maduración, lo cual generaría pérdidas para los agricultores. Para tener un buen rendimiento en el cultivo de cebolla, la absorción total de P por planta debe estar entre 22 a 28 kg de P/ha al momento de la cosecha, el bulbo por su parte acumula el 48 % del fósforo absorbido, al inicio de su desarrollo necesita 1 mg/planta y termina requiriendo de 4 a 5 mg/planta (Horneck., 2004; Moraes *et al.*, 2016).

7.2. Aislamiento y selección primaria:

A partir de las muestras de suelo tomadas de cultivo de cebolla *Allium cepa* en el departamento de Boyacá se recuperaron las bacterias solubilizadoras de fosfato por medio de la formación de halos de aclaramiento en medio Pikovskaya y acidificación en medio SMRS-1. En cada lote, A y C se tenían 18 puntos de muestreo, para un total de 36 muestras de cada muestra de suelo se tenían 500 g, a partir de cada una de estas muestras se identificó la población de bacterias totales, bacterias productoras de ácidos y bacterias solubilizadoras por punto de muestreo, además se realizó la medición de pH del suelo en cada una de las muestras, los resultados obtenidos en los dos lotes muestreados se muestran en la Figura 3.

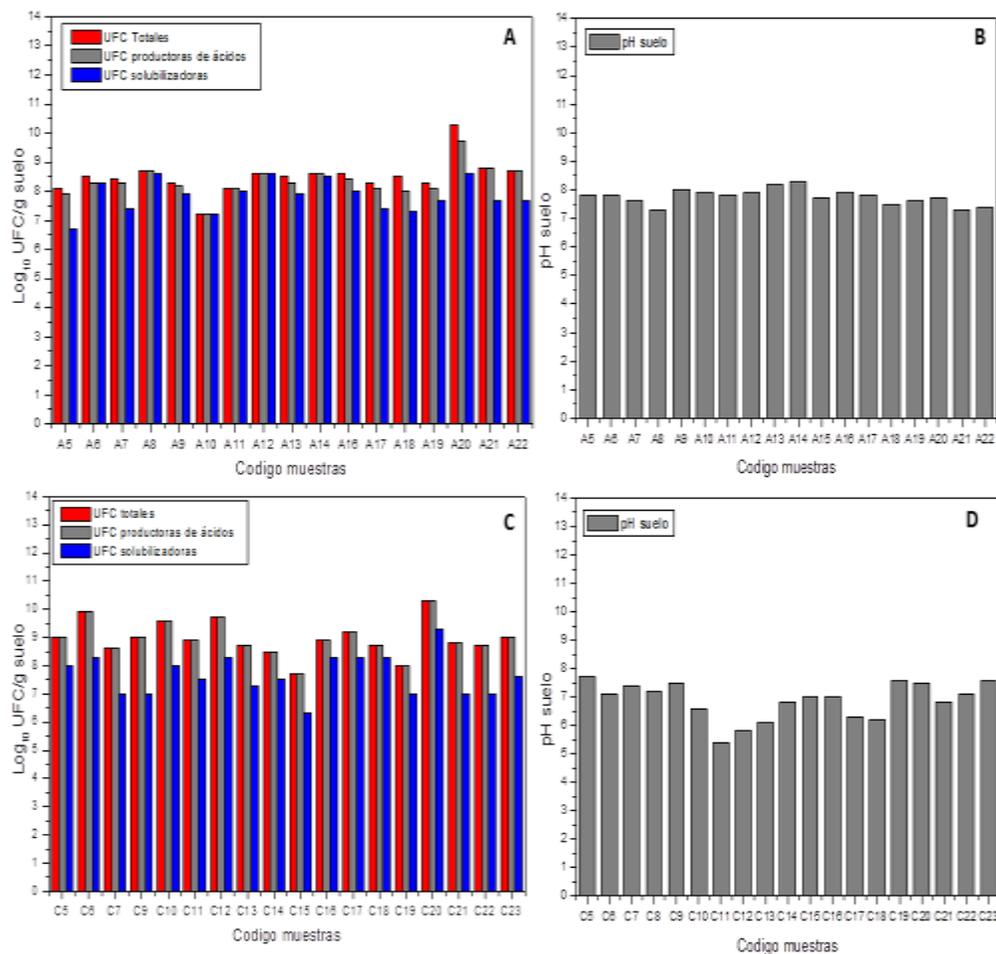


Figura 3. (A) Recuento de colonias expresado en Log₁₀ de UFC/g de suelo del Lote A perteneciente a la finca de San Juan, en donde se diferencian las poblaciones de UFC/g de suelo de bacterias totales, UFC/g de suelo de bacterias productoras de ácidos y UFC/g suelo de bacterias solubilizadoras. (B) pH del suelo en cada uno de los puntos de muestreo tomados en el lote A, (C) Recuento de colonias expresado en Log₁₀ de UFC/g de suelo del Lote C perteneciente a la finca La Vega, en donde se diferencian las poblaciones de UFC/g de suelo de bacterias totales, UFC/g de suelo de bacterias productoras de ácidos y UFC/g suelo de bacterias solubilizadoras. (D) pH del suelo en cada uno de los puntos de muestreo tomados en el lote C.

En total se tenían 36 puntos de muestreo de suelo, de estos puntos muestreados se recuperaron 51 aislamientos de bacterias pertenecientes al lote A y C con capacidad para solubilizar roca fosfórica, en el lote A se identificaron 16 aislamientos y los recuentos oscilaban entre 8 Log₁₀ UFC/g y 9 Log₁₀ UFC/g de bacterias fosfato solubilizadoras (BPS), mientras que en el lote C se identificaron 18 aislamientos y los recuentos se encontraban entre 8,3 Log₁₀ UFC/g y 8,5 Log₁₀ UFC/g de BPS, como se puede evidenciar en la Figura 3A y 3C. La población de microorganismos solubilizadores de fósforo presentes en los lotes muestreados, fue mayor en comparación con los estudios realizados por [Azziz et al., 2012](#) donde reportaron que las poblaciones de bacterias solubilizadoras de fósforo fueron de 4,8 Log₁₀UFC/g a 6,8 Log₁₀UFC/g en muestras de suelos agrícolas usados para cultivar legumbres y algunas hortalizas como lo es la cebolla, una de las razones por las que se obtuvo un mayor recuento de la población de bacterias fosfato solubilizadoras, es que para la recuperación y aislamiento de esta población, se implementó fosfato tricálcico en el medio de pre enriquecimiento y en los dos medios utilizados para la siembra, ya que el fosfato tricálcico es considerado como un factor importante para el aislamiento de microorganismos con capacidad de solubilizar fósforo, pues es una fuente de fósforo inorgánica fácil de solubilizar ([Bashan et al., 2012](#)) y en los medios SMRS1 y Pikovskaya el fosfato tricálcico es la única fuente de fosforo inorgánica que puede ser utilizada por las PSB, también se puede atribuir la alta población de bacterias fosfatosolubilizadoras en los aislamientos realizados, a que se ha reportado que en el suelo pueden habitar bacterias, hongos y actinobacterias solubilizadores de fósforo, sin embargo se considera que las bacterias son más eficientes que los hongos, por lo tanto, la población de bacterias predomina en un 50 % en el suelo ([Behera et al., 2013](#)).

Por otro lado, los resultados que indican una alta población de bacterias fosfato solubilizadoras en estos dos lotes, se pueden atribuir al manejo de los agricultores en ambas parcelas, ya que para el manejo del fósforo y otros nutrientes en estos cultivos se utilizan fertilizantes como el Abundagro, el cual es un fertilizante orgánico-mineral que contiene muchos de los nutrientes que la planta necesita, los componentes de este fertilizante se muestran en la Tabla 5, para suplir los requerimientos de fósforo este fertilizante contiene escorrentías de toma es decir residuos de roca fosfórica y roca fosfórica, esta roca ha sido ampliamente estudiada para su uso en biofertilizantes como el Abundagro, por ser una forma de intensificar de manera sostenible la producción de fertilizantes obteniendo una mayor productividad y ganancias económicas ([Ordoñez et al., 2017](#)). Ambas parcelas fertilizadas con 200 kg/ha de Abundagro, tenían la presencia de roca fosfórica, la cual pudo actuar como una fuente de fosforo inorgánica incrementando de esta manera la población de bacterias fosfato solubilizadoras.

Tabla 5. Componente del fertilizante Abundagro, utilizado en las parcelas muestreadas.

Nutriente	g/Kg
Nitrógeno (N)	2,8
Fósforo (P) Roca fosfórica	98
Potasio (K)	22,5
Calcio (Ca) Oxido de calcio	220
Magnesio (Mg)	11

Azufre (S)	1,3
Manganeso (Mn)	6,0
Boro (B)	0,1
Zinc (Zn)	0,02
Hierro (Fe)	60
Escorrentías de toma	
Silicio (Si)	0,2
Cobre (Cu)	0,02
Sodio (Na)	20
Sales acompañadas de Na	
Materia orgánica	80
Humus (pasto)	

Por otro lado, otro factor importante para que se lograran seleccionar y recuperar estas altas poblaciones de bacterias fosfato solubilizadoras, fue el tipo de suelo en el que se realizaron los muestreos, pues se ha reportado que la población de bacterias fosfato solubilizadoras es mayor en suelos agrícolas que en suelos estériles que nunca han sido utilizados para el cultivo, esto se debe a que en los suelos agrícolas se tiene mayor contenido de materia orgánica y material vegetal que puede ser utilizado por los microorganismos para desarrollarse e incrementar su población ([Kataoka et al., 2017](#)) lo dicho anteriormente se ve reflejado en el estudio realizado por [Paul et al., 2018](#) en el cual comparan la población de microorganismos fosfato solubilizadores en diferentes tipos de cultivos con suelos estériles no utilizados para el cultivo, los resultados indicaron que la población era mayor en los suelos que han sido utilizados para cultivos de diferentes especies vegetales, en este mismo estudio también compraron la concentración de microorganismos en función de la profundidad de los puntos de muestreo, teniendo como resultado que la mayor cantidad de bacterias fosfato solubilizadoras se encontraba en el suelo superficial, es decir en la capa de 0-15 cm de profundidad ([Paul et al., 2018](#)), Lo que concuerda con los altos recuentos obtenidos de bacterias totales, bacterias productoras de ácidos y bacterias fosfato solubilizadoras a que los muestreos se realizaron a 20 cm de profundidad es decir en la capa superficial del suelo en donde la población de fosfato solubilizadoras es mayor.

En la Figura 3B y 3D se puede observar el comportamiento del pH en ambos lotes, en la figura 3B se puede evidenciar que el pH del lote A oscila entre 7.5-8.5, lo que resulta en que el P presente en el suelo puede estar disponible para la planta en forma de ortofosfatos, ya que en valores de 6-7 se encuentra disponible para la planta incluso si el fósforo este precipitado con hidróxidos de Al, Fe y Mn. También se puede evidenciar que el pH alcanza valores de 8 indicando que el P puede estar precipitado con minerales de Ca presentes en el suelo, en la Figura 3D se observa que el pH del lote C correspondiente a la finca La Vega donde el pH oscila entre 5.5-7.5, esta variación de pH con respecto al lote A puede afectar la recuperación de bacterias fosfato solubilizadoras, por esto los recuentos obtenidos en el lote C fueron menores que los obtenidos en el lote A, además en el lote C al presentarse valores de pH ácidos, el P va a precipitarse con hidróxidos de Al, Fe y Mn ([Rashmi et al., 2014](#)).

A partir de la selección de colonias que presentaron capacidad para solubilizar fósforo en medio Pikovskaya y SMRS, se realizó la identificación macroscópica y microscópica de cada una de las colonias, esta identificación se presenta en la Tabla 6 y en la Figura 4.

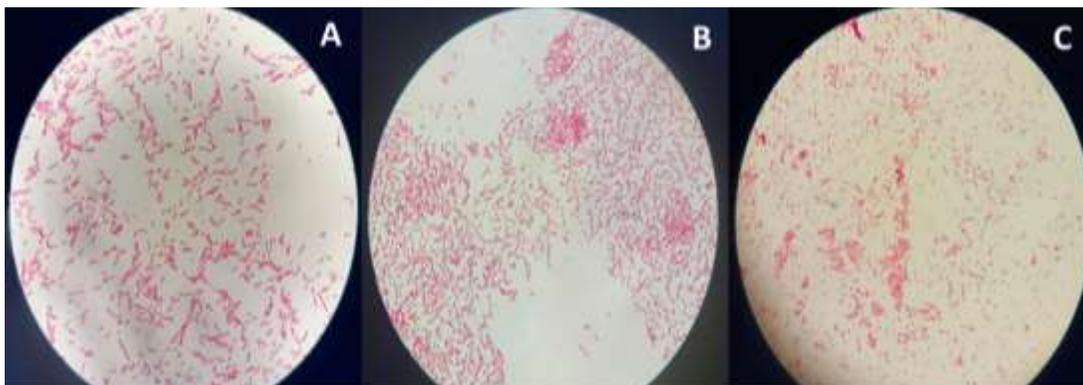


Figura 4. Microscopia (Bacilos Gram negativos) de algunas de las colonias seleccionadas, (A) cepa con código A17, (B) cepa con código C7, (C) cepa con código A18.

Tabla 6. Descripción macroscópica y microscópica de cada una de las bacterias con actividad fosfatosolubilizadora, aisladas en los lotes A y C, en donde el 93 % correspondían a bacilos Gram negativos y el 7 % a bacilos Gram positivos.

Código cepa Lote A	Descripción Macroscópica	Descripción microscópica
A5	Colonias de color blanco- crema, lisas, de borde regular.	Bacilos Gram positivos
A6	Colonias de color blanco- crema, lisas, de borde regular.	Bacilos Gram positivos
A7	Colonias grandes, de color amarillo quemado, lisas de borde irregular	Bacilos Gram negativo
A8	Colonias grandes, de color amarillo, lisas de borde irregular	Bacilos Gram negativo
A9	Colonias grandes, de color blanco, lisas de borde regular	Bacilos Gram negativo
A10	Colonias de color blanco- crema, rugosas, de borde irrregular.	Bacilos Gram positivos
A11	Colonias pequeñas, de color blanco, lisas de borde irregular	Bacilos Gram negativo
A12	Colonias pequeñas, de color amarillo, lisas de borde regular	Bacilos Gram negativo
A13	Colonias grandes, de color crema, rugosas de borde irregular	Bacilos Gram negativo
A14	Colonias grandes, de color blanco, rugosas de borde irregular	Bacilos Gram negativo
A15	Colonias grandes, de color blanco, lisas de borde regular	Bacilos Gram negativo
A16	Colonias grandes, de color blanco, lisas de borde irregular	Bacilos Gram negativo
A17	Colonias pequeñas, color crema-amarillo borde regular lisas.	Bacilos Gram negativo
A18	Colonia grande, de color blanco-crema, lisa de borde regular	Bacilos Gram negativo

A19	Colonias pequeñas, de color blanco, lisas de borde regular.	Bacilos Gram negativo
A20	Colonias grandes, de color blanco, lisas de borde irregular	Bacilos Gram positivos
A21	Colonias grandes, de color blanco, lisas de borde irregular	Bacilos Gram negativo
A22	Colonias pequeñas, de color amarillo, rugosas de borde irregular	Bacilos Gram positivos
C5	Colonias grandes, de color amarillo quemado, lisas de borde irregular.	Bacilos Gram negativo
C6	Colonias de color blanco- crema, lisas, de borde regular.	Bacilos Gram positivos
C7	Colonias pequeñas, de color blanco Lisas, borde regular	Bacilos Gram negativo
C8	Colonias grandes, de color blanco, lisas de borde regular.	Bacilos Gram negativo
C9-1	Colonias pequeñas, de color amarillo quemado, lisas de borde irregular.	Bacilos Gram negativo
C9-2	Colonias grandes, de color blanco, lisas de borde regular.	Bacilos Gram negativo
C10	Colonias de color blanco- crema, lisas, de borde regular.	Bacilos Gram positivos
C11	Colonias de color blanco- crema, rugosas, de borde irregular.	Bacilos Gram positivos
C12	Colonias grandes de color crema, con borde regular, cremosas y lisas.	Levadura
C13	Colonias de color blanco- crema, lisas, de borde regular.	Bacilos Gram positivos
C14	Colonias de color blanco- crema, lisas, de borde regular.	Bacilos Gram positivos
C15	Colonias pequeñas, de color crema, rugosas de borde irregular.	Bacilos Gram negativo
C16	Colonias de color blanco- crema, lisas, de borde regular.	Bacilos Gram positivos
C17	Colonias de color blanco- crema, lisas, de borde irregular.	Bacilos Gram positivos
C18	Colonias grandes, de color amarillo quemado, lisas de borde irregular.	Bacilos Gram negativo
C19	Colonias de color blanco- crema, lisas, de borde irregular.	Bacilos Gram positivos
C20	Colonias pequeñas rosadas, de borde regular, cremosas.	Levadura
C21	Colonias de color blanco- crema, rugosas, de borde irregular.	Bacilos Gram positivos
C22	Colonias grandes, de color crema, lisas de borde irregular.	Bacilos Gram negativo
C23-1	Colonias pequeñas, de color blanco, lisas de borde regular.	Bacilos Gram negativo
C23-2	Colonias pequeñas, de color amarillo-crema.	Bacilos Gram negativo

En la Tabla 6 se puede observar que la morfología más predominante en los lotes A y C fueron Bacilos Gram negativos con un porcentaje del 93 %, seguido por la población de Gram positivos cuyo porcentaje correspondió al 7 %, según estudios reportados por [Mohammadi., 2012](#) los géneros de bacterias fosfatolubilizadoras que más predominan en el suelo corresponden a *Pseudomonas sp.*, *Enterobacter sp.*, y *Rhizobium sp.*, siendo estos géneros bacilos Gram negativos, lo que sugiere que se puede llegar a considerar que alguno de estos géneros de bacterias corresponde a los aislamientos obtenidos, sin embargo, para ello es necesario realizar una identificación molecular.

El interés de buscar específicamente bacterias con morfología correspondiente a bacilos Gram negativos, es que diferentes géneros bacterianos con esta morfología han sido ampliamente reportados como bacterias solubilizadoras de fosfatos, además de que diferentes autores reportan que las poblaciones de bacilos Gram negativos son las más abundantes en el suelo, sobretodo en suelos de tipo agrícola, debido a que este grupo se caracteriza por descomponer la materia orgánica, hacer disponible el fósforo, y producir compuestos que promuevan el crecimiento de las plantas (Kim *et al.*, 2011), lo dicho anteriormente concuerda con los estudios realizados por Lizarazo *et al.*, 2014 en el cual querían evaluar la microbiota presente en la rizosfera de suelos cultivables, los resultados indicaron que el grupo de microorganismos que más predominó, fueron bacilos Gram negativos, específicamente bacterias del género *Pseudomonas* sp., seguido por actinobacterias, hongos filamentosos y levaduras, se puede decir que la alta población de bacilos Gram negativos en comparación con otros microorganismos, se debe a que este grupo de bacterias tiene una gran diversidad metabólica y presenta una relevante intervención en diferentes ciclos como el ciclo del carbono, nitrógeno, fósforo y azufre (Spain *et al.*, 2009).

7.3 Índice de solubilización utilizando roca fosfórica:

A partir de los resultados obtenidos en el aislamiento y selección primaria, se descartaron las bacterias cuya morfología no correspondía a Bacilos Gram negativos, en total se seleccionaron 28 cepas para realizar la prueba del índice de solubilización, en la cual se evaluaron las cepas con mejor capacidad de solubilizar la fuente inorgánica de fósforo, en esta prueba se reemplazó el fosfato tricálcico por la roca fosfórica como fuente de fósforo en el medio SMRS1 modificado, ya que se quería evaluar el potencial de solubilización de la roca fosfórica por parte de las bacterias previamente seleccionadas, los resultados del índice de solubilización de cada cepa se muestran en la Figura 6, algunas imágenes de esta prueba se presentan en la Figura 5.

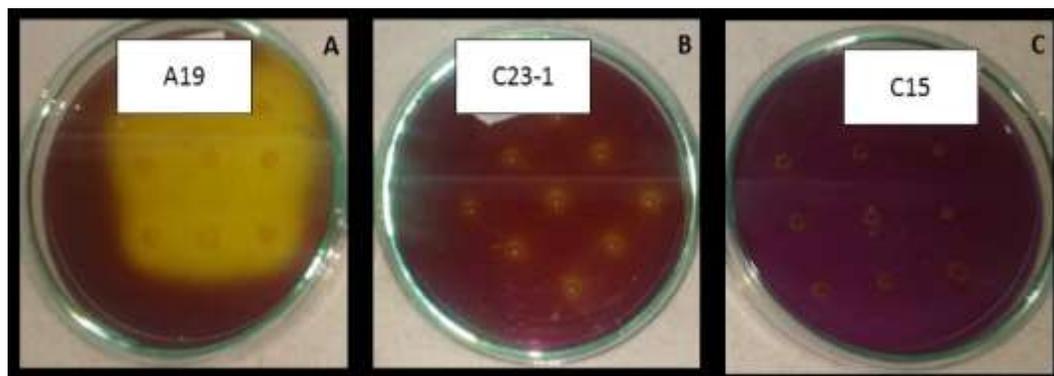


Figura 5. Prueba índice de solubilización (A) Cepa A19, cepa con uno de los mejores mejor índice de solubilización, (B) Cepa C23-1, cepa con un buen índice de solubilización, (C) Cepa C15, cepa con uno de los índices de solubilización mas bajos, con un promedio de ocho replicas por cepa.

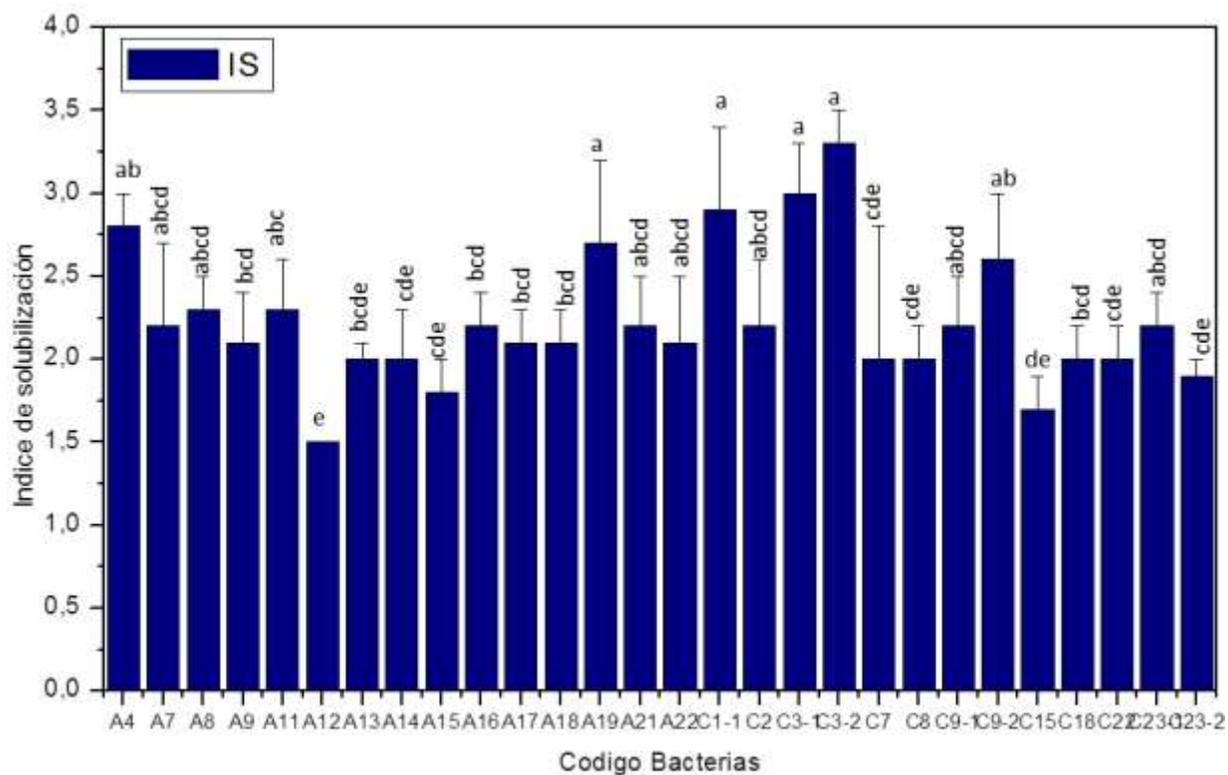


Figura 6. Resultados de la evaluación cuantitativa en medio sólido SMRS-1. Se representa el índice de solubilización en función de cada cepa. Los resultados con letras distintas significan diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo al análisis estadístico Post-Hoc de Tukey, en donde se tenía un promedio de ocho repeticiones por cepa.

Los resultados de la prueba del índice de solubilización, realizados con las 28 bacterias previamente aisladas, mostraron que todas las bacterias eran capaces de solubilizar la roca fosfórica utilizada como fuente de fósforo, ya que todas las bacterias evaluadas tenían un buen índice de solubilización; para las mejores bacterias los valores del índice de solubilización fueron 3,2, 3,0, 2,9, 2,8, 2,8 y 2,7 por parte de las cepas C3-2, C3-1, C1-1, A19, A4 y C9-2 respectivamente, mientras que la cepa que mostro el menor IS fue la cepa A12 con un valor de 1,5, sin embargo todos los valores son considerados como aceptables para un microorganismo fosfato solubilizador según [Ortega et al., 2003](#). Además mediante esta prueba se puede establecer que las cepas aisladas tienen la capacidad de solubilizar el fósforo inorgánico presente en la roca fosfórica, esta capacidad de las bacterias fosfato solubilizadoras aisladas de cultivos, ha sido ampliamente reportada ([Arcand et al., 2006](#)). La medición del índice de solubilización se realizó con las bacterias que presentaron un halo de aclaramiento notable y que promovieron que el indicador de pH púrpura de bromocresol cambiara el color del medio de púrpura a amarillo por la acidificación del mismo, esto ocurre debido a que las bacterias fosfato solubilizadoras solubilizan la fuente de fósforo inorgánico presente en el medio, en este caso la roca fosfórica la cual se encuentra en forma insoluble y pasa a formas solubles, este potencial de solubilización se atribuye a la capacidad de las cepas de reducir el pH del medio ([Hariprasad et al., 2009](#)), esto generalmente ocurre por la acción de ácidos orgánicos tales como el ácido gluconico, ácido oxálico, o el ácido cítrico, entre otros, los cuales son secretados por las bacterias fosfato solubilizadoras, solubilizando el fosfato mineral y generando una mayor disponibilidad de fósforo ([Pande et al., 2017](#)).

La diferencia entre el tamaño de los halos se debe principalmente a la capacidad de solubilizar la roca fosfórica, es decir que la relación entre la capacidad de las bacterias de solubilizar esta fuente de fósforo inorgánico en el medio es directamente proporcional con el tamaño y la claridad que se evidencia en los halos de solubilización, por otro lado en algunos casos se evidenciaba mayor acidificación del medio por el cambio de color del indicador de pH púrpura de bromocresol, pero no se evidenciaban muy claros los halos de solubilización esto puede atribuirse a la producción de ácidos orgánicos a partir de la glucosa del medio pero no a la solubilización de la roca fosfórica (Alam *et al.*, 2002).

Se han reportado que algunos géneros de bacterias Gram negativas, son los que mejores índices de solubilización tienen, en el estudio realizado por Motamedi *et al.*, 2016 se evaluó el potencial de solubilización de diferentes bacterias, dentro de las que se encontraban géneros como *Serratia* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp., *Burkholderia* sp., entre otras, los índices de solubilización de estas bacterias oscilaron entre 1,3 a 4,7, mostrando resultados similares a los obtenidos en este estudio, las bacterias con los mejores resultados de índice de solubilización en el estudio anteriormente reportado correspondían a bacterias Gram negativas, sobretodo reportaron a *Pseudomonas* sp. como uno de los géneros bacterianos con mayor capacidad de solubilización. Lo anterior concuerda con el estudio de Paul *et al.*, 2017 en donde se comparó el potencial de solubilización tres bacterias Gram positivas con tres bacterias Gram negativas, obteniendo como resultado que el mejor índice de solubilización en medio SMRS-1 era de 2,8 y este también fue obtenido por una bacteria del género *Pseudomonas*.sp., los otros índices de solubilización altos, también fueron logrados por bacterias Gram negativas y concuerdan con los resultados obtenidos en este estudio.

Por otro lado, otro factor importante que se debe tener en cuenta es la fuente de fósforo del medio, ya que en el estudio de Paul *et al.*, 2017 utilizaban fosfato tricálcico como la fuente de fósforo inorgánica del medio, a diferencia de este estudio en donde la fuente de fósforo evaluada fue la roca fosfórica, sin embargo se lograron obtener resultados muy parecidos a pesar de que la roca fosfórica sea más difícil de solubilizar por las bacterias fosfato solubilizadoras (Xiao *et al.*, 2013), esto sucede porque en la roca fosfórica el fósforo se encuentra acompañado por otros elementos como el carbono, sodio, magnesio y calcio, haciendo que este mineral sea más difícil de solubilizar que el fosfato tricálcico, el cual es una mezcla de calcio y fósforo más asimilable por las bacterias fosfato solubilizadoras (Chien *et al.*, 2009), es decir que a pesar de que en la roca el fósforo se encuentra acompañado por más elementos se solubilizo de forma similar al fosfato tricálcico que solo tiene dos elementos, lo dicho anteriormente lo podemos contrastar con los resultados del estudio de Manzoor *et al.*, 2017, en el cual evaluaban la roca fosfórica como sustrato y la comparaban con el fosfato tricálcico, sin embargo los resultados del IS en roca fosfórica se encontraban en valores cercanos a 0,15 y 1,9, siendo menores a los que se obtuvieron en este estudio, pese a que también se estuvieran evaluando bacterias Gram negativas aisladas de suelos cultivables, sin embargo la cepa con el IS más alto en roca fosfórica correspondiente a 3,6, este valor concuerda con los resultados del presente estudio en donde la bacteria con el mejor índice de solubilización fue la C3-2 con un IS de 3,2, muy cercano a lo reportado por Manzoor *et al.*, 2017, ya que al igual que en este estudio fue un IS alto logrado en roca fosfórica por una bacteria Gram negativa.

7.4. Pruebas de interacción de Gauze:

Partiendo de los resultados obtenidos en el índice de solubilización de las bacterias evaluadas, los cuales mostraron que las 28 aislamientos seleccionadas solubilizaban la roca fosfórica del medio y tenían valores aceptables de IS para un microorganismo fosfato solubilizador según [Ortega et al., 2003](#), se realizaron las prueba de interacción de Gauze con las mismas 28 bacterias seleccionadas en el numeral 7.2, esta prueba se realizó con el objetivo de conocer que bacterias se inhibían entre ellas, las bacterias que mostraron antagonismo con otras bacterias fueron eliminadas del estudio, ya que se busca que en el bioinoculante obtenido al final del estudio no se encuentren cepas antagonistas que se inhiban entre ellas, los resultados de la prueba de interacción de Gauze se presentan en la Figura 7, en donde se evidencian únicamente las bacterias que inhibieron a las otras bacterias seleccionadas, y de cuanto fue el halo de inhibición.

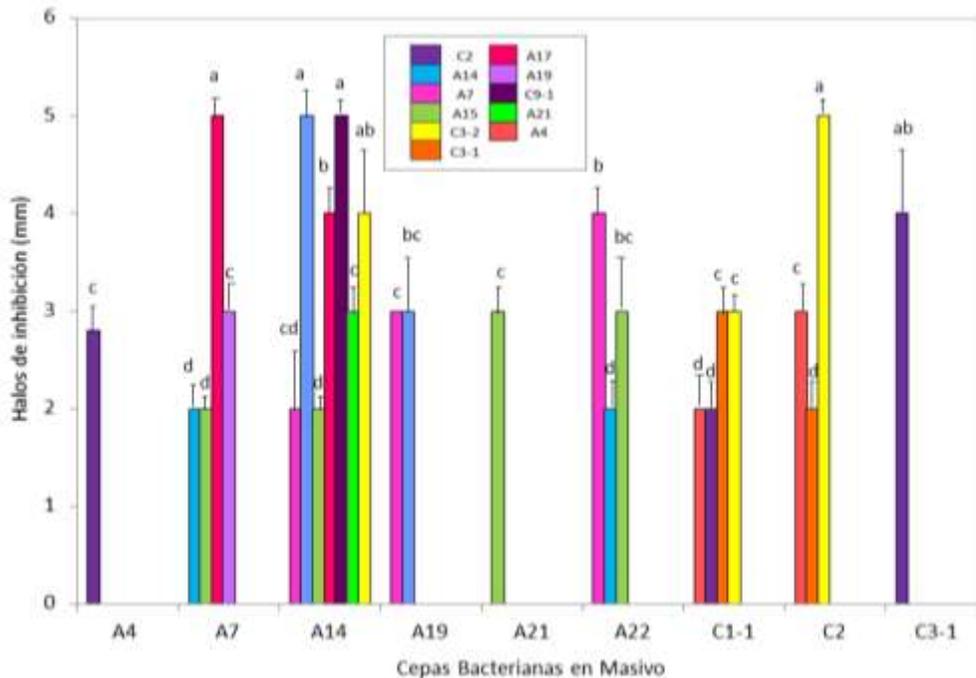


Figura 7. Resultados prueba interacción de Gauze, en el eje x se encuentran las cepas que fueron sembradas de forma masiva, en el eje y se representan los halos de inhibición (mm) generados por las cepas antagonistas, las cuales se ven representadas en las barras con su respectivo cuadro de convenciones, Los resultados con letras distintas significan diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo al análisis estadístico Post-Hoc de Tukey, en donde se tenía un promedio de tres repeticiones por cepa.

De las 28 cepas evaluadas, 9 mostraron tener una inhibición positiva por la presencia de halos de inhibición, la cepa que mostró mayor antagonismo fue la bacteria A14, pues de las 28 cepas evaluadas mostro halos de inhibición que oscilaban entre 2 mm a 5 mm con 7 cepas, seguida por las bacterias A7 y C1-1, las cuales mostraron inhibición con 4 cepas de las 28, en cuanto a la cepa C3-1 la cual tubo uno de los mejores índices de solubilización tuvo que ser eliminada del estudio al mostrar antagonismo con la cepa C2, la cual a su vez también presenta antagonismo con otras tres bacterias.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores se eliminaron del estudio las cepas A4, A7, A14, A19, A21, A22, C1-1, C2 y C3-1, esta inhibición puede deberse a que se ha reportado que tanto en el

suelo como en la rizosfera hay microorganismos como hongos y bacterias capaces de inhibir otras poblaciones, por esta razón son ampliamente usadas como controladoras biológicas, las bacterias más reportadas según [Ntougias et al., 2010](#) son las pertenecientes al género *Bacillus* sp. *Enterobacter* sp. *Pseudomonas* sp. y *Serratia* sp., las tres últimas hacen parte del grupo de bacterias Gram negativas y se encuentran asociadas a suelos cultivables, esto tiene concordancia con los resultados encontrados, en donde las 28 cepas pertenecían al grupo de Gram negativas y podrían inhibirse unas con otras, la capacidad antagónica de estas bacterias se puede deber a la producción de enzimas líticas que degradan las paredes de otros microorganismos ([Someya et al., 2005](#)), otro mecanismo importante que exhiben estas bacterias es la rápida colonización y la competencia por nutrientes, pero en general se reporta que el mecanismo que más se evidencia en las bacterias mencionadas sobretodo en bacterias del genero *Enterobacter* sp. se basa en la antibiosis es decir la producción de sustancias que inhiben el crecimiento de otros microorganismos teniendo un efecto bactericida sobre otra población ([Van Dijk et al., 2000](#)).

7.5 Pruebas preliminares de solubilización en medio líquido.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el numeral anterior, se estableció como criterio de selección los aislamientos que no presentaran antagonismo entre ellos; con lo cual se seleccionaron 19 aislamientos para posteriormente realizar las pruebas de solubilización de P en medio líquido SMRS1 modificado con roca fosfórica (5 g/L) como fuente de P inorgánica en el medio.

En la figura 8 se observan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores de recuento ufc/mL liberación de ortofosfatos mg/L y concentración de glucosa residual g/L de los 19 aislamientos a 72 horas de incubación. Los aislamientos que se caracterizaron por obtener el mayor recuento de colonias fueron A8 Y A17 con $10.9 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/mL}$. (Figura 8A). En relación con la liberación de ortofosfatos se obtuvieron concentraciones por encima de 80 mg/L en los aislamientos A9, A11, A17, A18, C7 Y C8, donde el aislamiento C7 obtuvo la mayor concentración de ortofosfatos con 89.5 mg/L (Figura 8B). Estos mismos aislamientos presentaron las concentraciones más bajas de glucosa residual en el medio, donde los valores oscilan entre 0.2 a 1.5 g/L, indicando el consumo de la fuente de carbono. Con respecto a las cepas control usadas, se puede observar que para el recuento de ufc/mL y liberación de ortofosfatos los 6 aislamientos mencionados anteriormente superan los valores obtenidos por los dos controles.

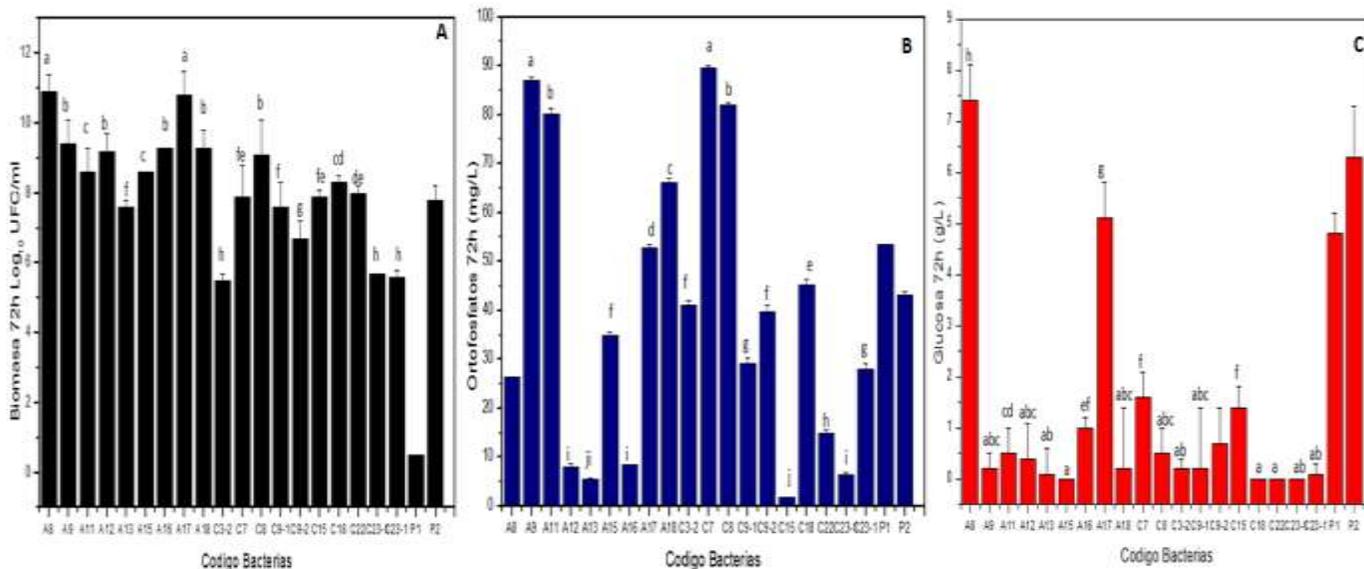


Figura 8. (A) Resultados de Biomasa expresadas el Log₁₀ de UFC/ml en función de cada una de las cepas evaluadas y de los controles *Pseudomonas fluorescens* (P1) y a *Pseudomonas azotoformans* (P2) utilizados en las pruebas preliminares realizadas en medio líquido, (B) Producción de ortofosfatos (mg/L) durante las 72 horas de las pruebas preliminares en función de cada cepa evaluada y de los controles, (C) Glucosa residual (g/L) durante las 72 horas de la prueba preliminar en medio líquido en función de las cepas evaluadas y los controles. Los resultados con letras distintas son significativamente diferentes (p < 0,05) de acuerdo al análisis estadístico Post-Hoc de Tukey con un promedio de tres replicas por cepa.

Según los resultados presentados anteriormente, se seleccionaron los aislamientos A9, A11, A17, A18, C7 Y C8 debido a que obtuvieron los valores más altos en recuento de ufc/mL y en la liberación de ortofosfatos. Por ende, continuaron en el estudio para realizar nuevamente la prueba de solubilización de P en medio SMRS1 líquido con fosfato tricálcico (5g/L) como fuente de P.

Se pueden observar diferencias significativas (p < 0.05) entre los valores del recuento de ufc/mL y concentración de glucosa residual g/L en los 6 aislamientos (Figura 9). El aislamiento A17 obtuvo el valor más alto de recuento de colonias con 14 Log₁₀ ufc/mL y 0,8 g/L de glucosa residual, efectivamente se puede observar una relación entre el crecimiento celular y el consumo de la fuente de carbono. Con respecto a la liberación de ortofosfatos en los 6 aislamientos no se observaron diferencias significativas (p > 0.05), se obtuvieron concentraciones de ortofosfatos por encima de 100 mg/L, donde la mayor liberación de ortofosfatos se obtuvo en el aislamiento A18 con 134.3 mg/L. Por otro lado, se puede observar que las cepas control obtuvieron mayor recuento de colonias y liberación de ortofosfatos con valores por encima de 10 Log₁₀ ufc/mL y 165 mg/L con respecto a los 6 aislamientos.

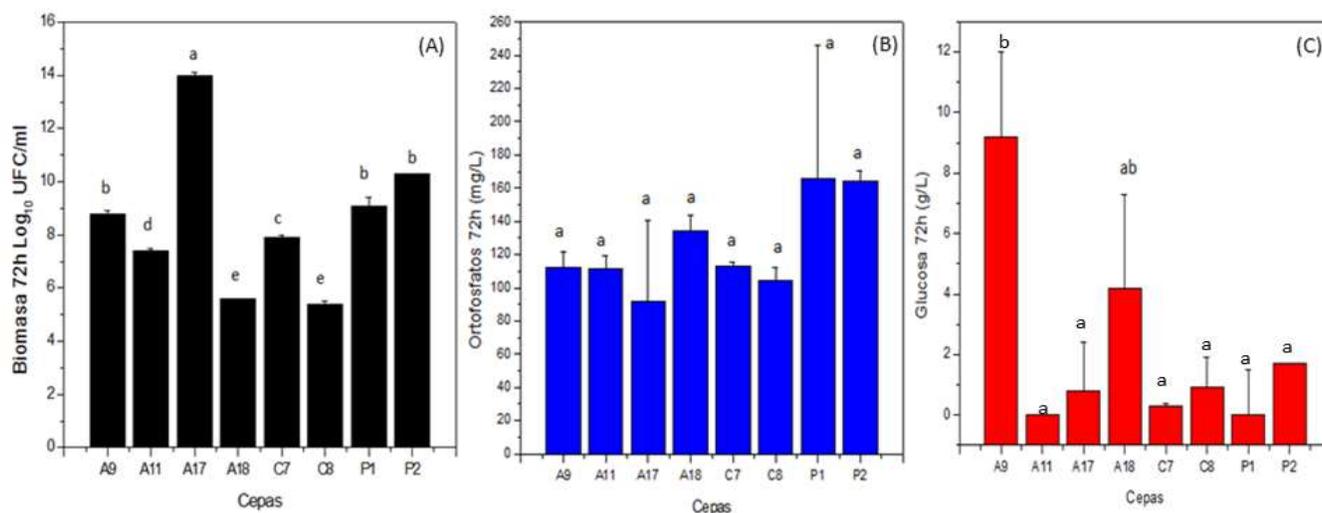


Figura 9. Resultados de producción de biomasa Log₁₀ de UFC/ml (A), producción de ortofosfatos mg/L (B), y consumo de glucosa g/L (C), durante las prueba preliminares de 72h en medio SMRS-1, en función de las sepas seleccionadas y las cepas utilizadas como control, *Pseudomonas fluorescens* (P1) y a *Pseudomonas azotoformans* (P2). Los resultados con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$) de acuerdo al análisis estadístico Post-Hoc de Tukey, con un promedio de tres replicas por cepa.

El estudio de la solubilización microbiana de P in “vitro” ha sido ampliamente reportado, diversos autores han mencionado la importancia de evaluar la solubilización en medio líquido con el fin de identificar las diferentes vías involucradas en el proceso de solubilización de P, donde el mecanismo más reportado es la producción de ácidos orgánicos, por parte de las PSB (Panhwar *et al.*, 2009)

En este estudio se identificaron 19 aislamientos con capacidad para solubilizar roca fosfórica, la máxima concentración de ortofosfatos se obtuvo en el aislamiento C7 con 89.5 mg/L (Figura 8B); resultado que supera al encontrado por Sreenivasulu *et al.*, 2014, donde evalúan la capacidad para solubilizar roca fosfórica en tres aislamientos bacterianos autóctonos de la mina de moscovita, los autores obtienen la mayor solubilización de P en el aislamiento SVUNM17 con 76.10 mg/L de ortofosfatos a los 28 días de cultivo.

A partir de los 19 aislamientos mencionados anteriormente, se seleccionaron los aislamientos que obtuvieron concentraciones por encima de 80 mg/L de ortofosfatos y presentaron recuentos de unidades formadoras de colonias por encima de 8 Log₁₀ ufc/mL, se seleccionaron los aislamientos: A9, A11, A17, A18, C7 Y C8 y se evaluó su capacidad para solubilizar fosfato tricálcico en medio líquido (Figura 9); De los 6 aislamientos la mayor concentración de ortofosfatos la obtuvo el aislamiento A18 con 134.3 mg/L, superando así a los estudios de Sarker *et al.*, 2014 donde aíslan 9 BPS de cultivos de trigo y obtienen la mayor producción de fósforo disponible a las 72 horas con una concentración de 66.32 mg/L en medio NBRIP líquido con fosfato tricálcico como fuente de P en el medio.

Además de evidenciar la liberación de ortofosfatos al medio; La solubilización microbiana del P también se relaciona con el pH. Puesto que se ha reportado que la liberación de P soluble se debe principalmente a los ácidos orgánicos producto del metabolismo de las BPS. Bajo condiciones in vitro las BPS quelatan los iones minerales o disminuyen el pH del medio para liberar el P a la solución. Por

ende, la acidificación del entorno conduce a la liberación de los iones P presentes en las formas de fosfato de mineral como fosfato tricálcico y roca fosfórica por sustitución de H + por Ca²⁺ (Hajjam *et al.*, 2016). En este estudio las pruebas de solubilización en medio líquido con ambas fuentes de P usadas (Roca fosfórica y fosfato tricálcico) iniciaron con un pH de 7.04 y al finalizar las 72 horas de cultivo se obtuvieron valores de pH que oscilaban entre 3.46 y 5.00 en los 19 aislamientos, lo que indica una acidificación en el medio; Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Panhwar *et al.*, 2009 donde evidencian la caída del pH inicial del medio de 7 a 3.2 con el crecimiento continuo de aislamientos de PSB durante siete días. Incluso otros autores han reportado pH finales de 4.0 cuando se usa *Pseudomonas fluorescens* (Paul *et al.*, 2016)

Se ha reportado que el tiempo de incubación óptimo para la solubilización de fósforo se encuentra en el periodo de 10 a 15 días, sin embargo, muchos autores han mencionado valores máximos de P soluble desde las 72 a 96 horas de incubación (Paul *et al.*, 2016). Lo anterior explica el criterio de selección del tiempo de incubación en el estudio, el cual fue de 72 horas, asimismo indica que se podría aumentar el tiempo de incubación para obtener concentraciones más altas de ortofosfatos.

7.6 Identificación molecular:

Las cepas que mostraron un buen índice de solubilización y que de igual manera mostraron buenos resultados en las pruebas preliminares fueron seleccionadas para ser secuenciadas por la corporación CorpoGen (Bogotá, Colombia) para realizar su identificación molecular, también se realizó una identificación bacteriana mediante espectrometría de masas utilizando el dispositivo MALDI-TOF, esta identificación se llevó a cabo en la Unidad de Investigación en proteómica y Miosis Humanas de la Pontificia Universidad Javeriana, los resultados obtenidos concuerdan tanto en la identificación molecular por amplificación como en el análisis realizado por MALDI-TOF, los resultados para las seis cepas seleccionadas se evidencian en la Tabla 7 en donde se muestran los códigos de las cepas con su respectiva identificación y el score obtenido en la identificación bacteriana mediante espectrometría de masas, por otro lado en la Tabla 8 se evidencia el significado de los scores obtenidos.

Tabla 7. Cepas seleccionadas con su respectiva identificación y Score obtenido en la identificación bacteriana mediante espectrometría de masas por MALDI-TOF.

Código Cepa	Microorganismo identificado	Score
A9	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,325
A11	<i>Enterobacter ludwigii</i>	2,291
A17	<i>Kosakonia kowanii</i>	1,978
A18	<i>Pseudomonas koreensis</i>	1,878
C7	<i>Serratia liquefaciens</i>	2,078
C8	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,025

Tabla 8. Interpretación del score de MALDI-TOF obtenido para cada cepa identificada.

Rango	Descripción
2,300 - 3,000	Identificación de especies altamente probable
2,000 - 2,299	Identificación de genero altamente segura y probable identificación de especie
1,700 – 1,999	Probable identificación de genero
0,000 – 1,699	Identificación no confiable

La tecnología MALDI-TOF ha permitido la utilización de la espectrometría de masas para la identificación microbiológica, mediante el análisis de proteínas, principalmente proteínas ribosomales, a partir de las colonias bacterianas o directamente de muestras, a través de la creación de un espectro de masas específico para cada especie (Legarraza *et al.*, 2013), el fundamento de esta técnica se basa en el uso de una fuente ionizante para transferir iones a las moléculas de la muestra en una fase gaseosa, un analizador de masas que separa los iones de acuerdo con su relación masa/carga y un dispositivo de detección para monitorizar los iones separados, en el método se emplean células intactas de un microorganismo, tomando una porción de la colonia pura de la bacteria crecida en medio de cultivo sólido y llevándola a una placa metálica conductora para posteriormente adicionar una solución saturada de un compuesto orgánico de baja masa, denominada matriz, esta mezcla entre el microorganismo y la matriz al secarse se cristalizan, en ese momento se puede llevar la placa al espectrómetro de masas, en donde la mezcla es irradiada un rayo láser UV cuya longitud de onda generalmente es de 337 nm. La interacción entre los fotones de las moléculas del láser y de la matriz, desencadenan una sublimación de la matriz en una fase gaseosa, seguida por la ionización de la muestra del microorganismo con mínima fragmentación. Al ionizarse, las proteínas son aceleradas a través de un campo electrostático y luego son expulsadas en un tubo de vuelo al vacío, donde se separan en función de su velocidad o tiempo de vuelo, llegando finalmente al detector de masas que genera información característica de la composición del microorganismo mediante un espectro de picos, frente a su relación masa/carga (m/z), llamada también huella digital de la masa de los péptidos (*peptide mass fingerprinting*) (Clack *et al.*, 2013). Una vez generado, el perfil espectral del microorganismo de prueba, es comparado automáticamente mediante un programa informático con una base de datos de espectros que es construida a partir de cepas de referencia, permitiendo la identificación del microorganismo (Murray., 2012). La identificación de los microorganismos por MALDI-TOF se basa en que las huellas digitales espectrales varían entre los microorganismos, algunos picos son específicos del género, otros de la especie y otros, a veces, de las subespecies (Maldonado *et al.*, 2018).

Al realizar la identificación molecular, los resultados obtenidos en el análisis taxonómico de las secuencias ensambladas de 1114 pb, 1082 pb y 1114pb correspondientes a las cepas con código A9, A11 y C8 respectivamente, contra la base de datos refseq/RNA del NCBI, indican que estas cepas tienen un 99 % de identidad con el 100 % de cobertura, con secuencias del gen ribosomal 16S pertenecientes al género bacteriano *Enterobacter* sp, el análisis contra las bases de datos RDP y Greengenes sólo permitió la identificación hasta el género, en este caso *Enterobacter* sp, sin embargo por medio de la comparación de la secuencia con la base de datos de NCBI se logró determinar que

las cepas A9 y C8 corresponden a *Enterobacter cloacae* y la cepa A11 a *Enterobacter ludwigii*, estos tres géneros bacterianos a pesar de estar ampliamente reportados como solubilizadores de fosfatos (Laral *et al.*, 2011).

Por otro lado la cepa con código A17 cuyos resultados del análisis taxonómico de la secuencia ensamblada de 1078 pb contra refseq/RNA del NCBI muestran que esta cepa tiene un 99 % de identidad con el 100 % de cobertura, con secuencias del gen ribosomal 16S con *Kosakonia* sp. se logró llegar hasta especie determinando que la cepa A17 correspondía a *Kosakonia cowanii*, la cual es reportada como bacteria promotora de crecimiento vegetal y solubilizadora de fósforo (Berger *et al.*, 2018), otra de las cepas que puede ser utilizada en el bioinoculante es la cepa A18 la cual fue identificada como *Pseudomonas koreensis*, al utilizar una secuencia ensamblada de 927pb contra refseq/RNA del NCBI, estos resultados indican que la cepa A18 tiene un 99 % de identidad con el 100 % de su longitud o cobertura con secuencias del gen ribosomal 16S pertenecientes probablemente a la especie *Pseudomonas koreensis*, el género *Pseudomonas* sp. es uno de los más reportados como solubilizadora de fosfatos (Viruel *et al.*, 2011), finalmente se identificó la cepa C7, cuyos resultados de análisis taxonómico de la secuencia ensamblada de 842pb comparados con refseq/RNA del NCBI, indican que la cepa C7 tiene un 99 % de identidad con el 100 % de cobertura con las secuencias pertenecientes al gen ribosomal 16S de *Serratia liquefaciens*, la cual también demostró tener un índice de solubilización alto, lo que concuerda con reportes que indican que esta cepa tiene gran capacidad de solubilizar fosfato inorgánico (Karlicic *et al.*, 2016).

Con respecto a la cepa A17 identificada como *Kosakonia cowanii*, es importante decir que esta bacteria es relativamente nueva como bacteria fosfato solubilizadora, ya que esta cepa estaba anteriormente clasificada desde el punto de vista taxonómico como una bacteria del género *Enterobacter* sp. específicamente *Enterobacter cowanii* (Inoue *et al.*, 2000), en el estudio de Brady *et al.*, 2013 desarrollaron un análisis multilocus de secuencias (MLSA) con el fin de realizar la caracterización taxonómica de *Enterobacter* sp., concluyendo que la taxonomía de esta bacteria tiene una historia complicada, con varias especies transferidas desde y hacia este género, los análisis filogenéticos de las secuencias de nucleótidos concatenados revelaron que *Enterobacter* sp. se puede dividir en cinco grupos compatibles, lo que sugiere que la especie debe reclasificarse en cinco géneros diferentes, dentro de estos se proponen tres géneros nuevos: *Lelliottia* gen. nov., *Pluralibacter* gen. nov. y *Kosakonia* gen. nov. y nuevas combinaciones dentro de las que se encuentra *Kosakonia cowanii* comb. nov. (Brady *et al.*, 2013).

7.7 Pruebas preliminares por tratamientos en consorcio y co cultivo:

Debido al potencial de solubilización de P evidenciado en el numeral 6.5 de las 6 cepas anteriormente identificadas, se estableció la formulación de 4 tratamientos: 1 consorcio y 3 co cultivos (Tabla 9) con el fin de evaluar la capacidad de solubilización de P de cada uno de los 4 tratamientos en medio líquido SMRS1 modificado con roca fosfórica (5g/L) como fuente de P en el medio. Para el consorcio y los 3 co cultivos se plantearon diferentes combinaciones de las cepas seleccionadas, las cuales corresponden a *Pseudomonas koreensis*, *Serratia liquefaciens* y *Kosakonia cowanii*. Puesto que las tres cepas restantes pertenecen al género *Enterobacter* sp, las cuales al ser patógenas representan un riesgo para la salud humana, impidiendo su uso para la formulación de un bioinoculante según los requisitos planteados en la NTC 5843 del 2011.

Tabla 9. Tratamientos en co cultivo y consorcio con las cepas seleccionadas en medio SMRS modificado con roca fosfórica.

Tratamientos	Cepas por tratamiento	Microorganismo
T1	A17	<i>Kosakonia cowanii</i>
Consorcio	A18	<i>Pseudomonas koreensis</i>
	C7	<i>Serratia liquefaciens</i>
T2	A17	<i>Kosakonia cowanii</i>
Co cultivo 1	A18	<i>Pseudomonas koreensis</i>
T3	A17	<i>Kosakonia cowanii</i>
Co cultivo 2	C7	<i>Serratia liquefaciens</i>
T4		
Co cultivo 3	A18	<i>Pseudomonas koreensis</i>
	C7	<i>Serratia liquefaciens</i>

En estas pruebas preliminares se evaluaron las mismas variables de respuesta propuestas en el numeral 6.5, donde se puede observar en la figura 12, que los 4 tratamientos presentaron diferencias significativas $p < 0,05$ para el recuento ufc/mL, liberación de ortofosfatos mg/L y concentración de glucosa residual g/L a 72 horas de incubación. Los tratamientos 1 y 4 obtuvieron la mayor liberación de ortofosfatos con 90,2 y 96,5 mg/L respectivamente (Figura 9B), igualmente obtuvieron 8.9 y 9 g/L de glucosa residual (Figura 9C), lo que resulta en un bajo consumo de glucosa por parte del T1 y T4. Con relación al recuento de colonias, el T2 evidenció el valor más alto con 5.9 Log_{10} ufc/mL seguido del T3, T1 Y T4, donde se obtuvo 2.7 y 2.5 Log_{10} UFC/mL respectivamente. Para el recuento de colonias ufc/mL y liberación de ortofosfatos las cepas control obtuvieron valores superiores a los 4 tratamientos, por lo cual el mayor consumo de glucosa se evidenció en los dos controles.

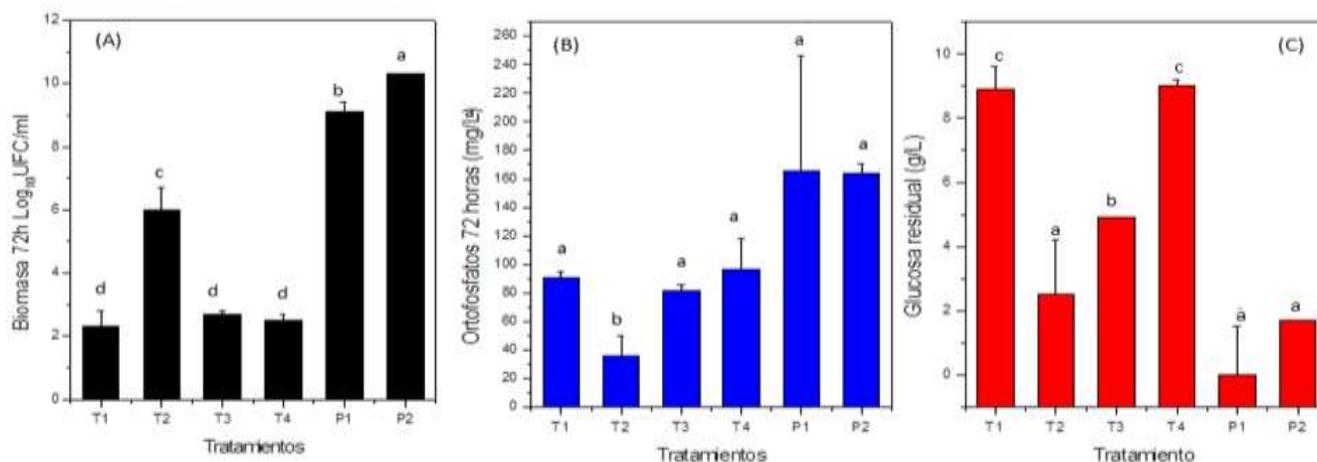


Figura 10. Resultados comparación entre tratamientos para determinar la producción de biomasa Log_{10} UFC/ml (A), producción de ortofosfatos mg/L (B) y consumo de glucosa g/L (C), en función de los tratamientos evaluados en los cuales las cepas se encuentran en consorcio y co cultivo, teniendo como control las cepas de *Pseudomonas fluorescens* (P1) y *Pseudomonas azotoformans* (P2). Los resultados con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$) de acuerdo al análisis estadístico Post-Hoc de Tukey, con un promedio de tres replicas por tratamiento.

Los resultados anteriormente presentados en la figura 10 permitieron evidenciar la capacidad de solubilización de fósforo en conjunto por varios microorganismos, donde los tratamientos que favorecieron la mayor concentración de ortofosfatos fueron el consorcio (T1) y el co cultivo # 3 (T4). En diversos estudios se ha reportado que los microorganismos en consorcios presentan mayor solubilización de fósforo que aquellos que se encuentran por individual debido a que los consorcios microbianos en muchos casos interactúan de manera sinérgica estimulando algunas actividades físicas o bioquímicas de las bacterias presentes en los consorcios (Mantilla *et al.*, 2015). Además se obtuvieron concentraciones más altas de P soluble en los T1 y T4 en comparación con estudios de Quevedo *et al.*, 2014 donde evalúan la efectividad de usar microorganismos en consorcio y en co cultivo para solubilizar roca fosfórica de Norte de Santander y Boyacá; los investigadores obtienen la mayor concentración de P soluble con 80 mg/L cuando evalúan el co cultivo conformado por *Bacillus sp* y *A. niger* y cuando evalúan el consorcio conformado por *Bacillus sp*, *A. niger* y actinomicete obtienen 60 mg/L usando la roca fosfórica de Boyacá.

7.8 Selección de las condiciones y medio de cultivo que favorecen la producción de biomasa y fósforo disponible.

Dada la importancia de la producción de ortofosfatos y biomasa se realizó un diseño Plackett Burman para el co-cultivo y consorcio, donde se evaluó los factores más influyentes sobre el recuento de BPS UFC/mL Y concentración de ortofosfatos (mg/L).

De acuerdo con los resultados del análisis de varianza ANOVA, Los modelos para recuento de BPS y concentración de ortofosfatos fueron estadísticamente significativos con $p=0.0101$ y $p=0.0014$ respectivamente, por lo que se pudieron evaluar los efectos principales de los factores sobre estas variables. En la tabla 10 se presentan los valores de significancia de los modelos, los factores ($\text{Prob}>f$), los efectos y porcentajes de contribución de cada uno de los factores (Blanco 2017)

En relación con el recuento de BPS, los factores influyentes fueron la concentración de hidrolizado de levadura cervecera ($p= 0.00451$) y tiempo ($p=0.0003$); de ellos el porcentaje de contribución más alto lo tuvo el tiempo (83.4 %), seguido por la fuente de nitrógeno (7.4 %). Para el tiempo y la fuente de nitrógeno el efecto fue negativo (-1.77 y -0.22 respectivamente), indicando que se podría trabajar con un nivel bajo en el tiempo (24 h), además de una concentración más baja del hidrolizado de levadura cervecera. Los factores roca fosfórica, glucosa, velocidad de agitación, porcentaje de inóculo y tiempo no fueron significativos sobre esta variable de respuesta ($p>0.05$).

Para la concentración de ortofosfatos, los factores influyentes fueron la concentración de roca fosfórica, hidrolizado de levadura cervecera y tiempo ($p= 0.0433$, 0.0410 y $p<0.0001$, respectivamente); de ellos el porcentaje de contribución más alto lo tuvo el tiempo (79.6 %), seguido por la roca fosfórica y fuente de nitrógeno (8.8 y 3.67 %). Para los tres factores los coeficientes de regresión fueron positivos indicando que se podría trabajar con el nivel alto de los mismos. Los factores glucosa roca fosfórica, velocidad de agitación y porcentaje de inóculo fueron significativos sobre esta variable de respuesta ($p>0.05$)

Tabla 10. Análisis de varianza (ANOVA) para las variables de respuesta recuento de colonias y concentración de ortofosfatos del diseño Plackett Burman evaluando el consorcio conformado por *Pseudomonas koreensis*, *Serratia liquefaciens* y *Kosakonia cowanii* (Blanco 2017)

Recuento de BPS ufc/mL					Concentración de Ortofosfatos mg/L				
Factor	Valor F	Prob>f p value	Stand. Effect	% contributi on	Factor	Valor F	Prob>f p value	Stand. Effect	% contribution
Model	7.6	0.0101	5.28		Model	13.92	0.0014	90.2	
A-Roca	0.015	0.9050	0.033	0.0298	A-Roca	4.43	0.0433	3.93	8.860
B-Glucosa	0,016	0.09051	0.032	0.298	B-Glucosa	0.51	0.4970	1.34	0.562
C-Nitrogeno	0.63	0.0451	-0.22	7.4	C-Nitrogeno	3.35	0.0410	3.41	3.67
D- Agitacion	0.001	1	0.001	0.3	D- Agitacion	1.56	0.251	2.33	1.71
E-inoculo	0.094	0.768	0.083	0.186	E-inoculo	1.10	0.328	1.96	1.21
F: Tiempo	42.1	0.0003	-1.77	83.4	F: Tiempo	72.58	<0.0001	15.90	79.64
Curvature F- value		0.583			Curvature F- value		0.465		
Lack of fit		0.852			Lack of fit		0.344		

Con respecto al co cultivo, las dos variables de respuestas evaluadas (recuento de BPS y concentración de ortofosfatos) fueron estadísticamente significativas con $p=0.0003$ y $p= 0.0482$ respectivamente según los resultados del análisis de varianza ANOVA. En la Tabla 11 se presentan los valores de significancia de los modelos, los factores (Prob>f), los efectos y porcentajes de contribución de cada factor.

Para al recuento de BPS, los factores influyentes fueron la concentración de roca ($p=0.0406$), glucosa ($p=0.0408$), hidrolizado de levadura cervecera ($p= 0.0468$) y tiempo ($p=<0.0001$); donde el porcentaje de contribución más alto lo tuvo el tiempo (83.1%), seguido por la fuente de nitrógeno (7.4 %). Para el tiempo el efecto fue negativo (-2.94), indicando que se podría trabajar con un nivel bajo (24 h) y para la fuente de carbono y nitrógeno el efecto fue positivo (2.83 y 2.17 respectivamente), lo que indica que se podría trabajar con niveles de concentración más altos. Por otro lado, se evidencia que los factores roca fosfórica, glucosa, velocidad de agitación, porcentaje de inóculo y tiempo no fueron significativos sobre esta variable de respuesta ($p>0.05$).

En relación con la concentración de ortofosfatos, los factores influyentes fueron la concentración de roca fosfórica ($p=0.0328$), glucosa ($p=0.0424$) y tiempo ($p=0.0341$); de ellos el porcentaje de contribución más alto lo tuvo el tiempo (25.15 %), seguido por la fuente de carbono (13.84%).Igualmente los dos factores presentaron un efecto positivo (16.78 y 12.45 respectivamente) indicando que se podría trabajar con niveles más altos de los mismos. Los factores glucosa roca

fosfórica, velocidad de agitación y porcentaje de inóculo fueron significativos sobre esta variable de respuesta ($p > 0.05$).

Tabla 11. Análisis de varianza (ANOVA) para las variables de respuesta recuento de colonias y concentración de ortofosfatos del diseño Plackett Burman evaluando el co cultivo conformado por *Pseudomonas koreensis* y *Serratia liquefaciens* (Blanco 2017)

Recuento de BPS ufc/mL					Concentración de Ortofosfatos mg/L				
Factor	Valor F	Prob>f p value	Stand. Effect	% contrib ution	Factor	Valor F	Prob>f p value	Stand. Effect	% contributi on
Model	22.4	0.0003	5.16		Model	3.38	0.0482	88.19	
A-Roca	1.50	0.0406	0.33	1.01	A-Roca	1.71	0.0328	-8.34	6.22
B-Glucosa	4.16	0.0408	-0.54	2.83	B-Glucosa	3.80	0.0424	12.45	13.8424
C-Nitrogeno	3.2	0.0468	0.47	2.17	C- Nitrogeno	1.03	0.3447	6.47	3.74188
D- Agitacion	2.56	0.153	0.43	1.74	D- Agitacion	3.00	0.1270	-11.06	10.9316
E-inoculo	0.52	0.493	-0.19	0.35	E-inoculo	3.83	0.0911	12.51	13.9757
F: Tiempo	122	<0.0001	-2.94	83.1	F: Tiempo	6.90	0.0341	16.78	25.1555
Curvature F- value	5.23	0.0560			Curvature F-value		0.6941		
Lack of fit		0.297			Lack of fit		0.0251		

La Figura 11 presenta la comparación de medias entre los tratamientos (prueba de Tukey) para las variables de respuesta recuento de BPS, concentración de ortofosfatos y glucosa del consorcio y co cultivo. En el consorcio los tratamientos T11 y T12 obtuvieron los valores más altos con 8.1 Log_{10} y 2×10^7 UFC/mL respectivamente. Para la concentración de ortofosfatos los tratamientos T1, T3 fueron los que favorecieron la mayor producción con valores de 120 mg/L y 109 mg/L. Las concentraciones de T11 y T12 fueron más bajas que en T1 y T3, posiblemente por el tiempo de producción, ya que se pueden necesitar mayores tiempos de cultivo para obtener mayor concentración de ortofosfatos. En relación con la concentración de glucosa residual en T11 y T12 se obtuvieron los valores más bajos demostrando que el consorcio consumió eficientemente la fuente de carbono del medio y esto podría favorecer la producción de ácidos orgánicos ya que para estos tratamientos los valores fueron de 1.2 g/L y 0.9 g/L respectivamente.

Con respecto al co-cultivo, los tratamientos T9 y T11 obtuvieron el valor más alto con 8.0 Log_{10} UFC/mL de BPS para ambos tratamientos. Se alcanzaron concentraciones de 183,6 y 103.1 mg/L de ortofosfatos producidos en los T1 y T5 respectivamente. También se evidencia que el T9 Y T12 obtuvieron concentraciones más bajas de ortofosfatos, posiblemente al tiempo de producción, puesto que al igual que el consorcio se necesita mayor tiempo de cultivo para obtener mayores

concentraciones de ortofosfatos. Finalmente, en la concentración de glucosa residual para el T9 Y T11 se obtuvo 1 y 0.6 g/L respectivamente, evidenciando un consumo de la fuente de carbono del medio.

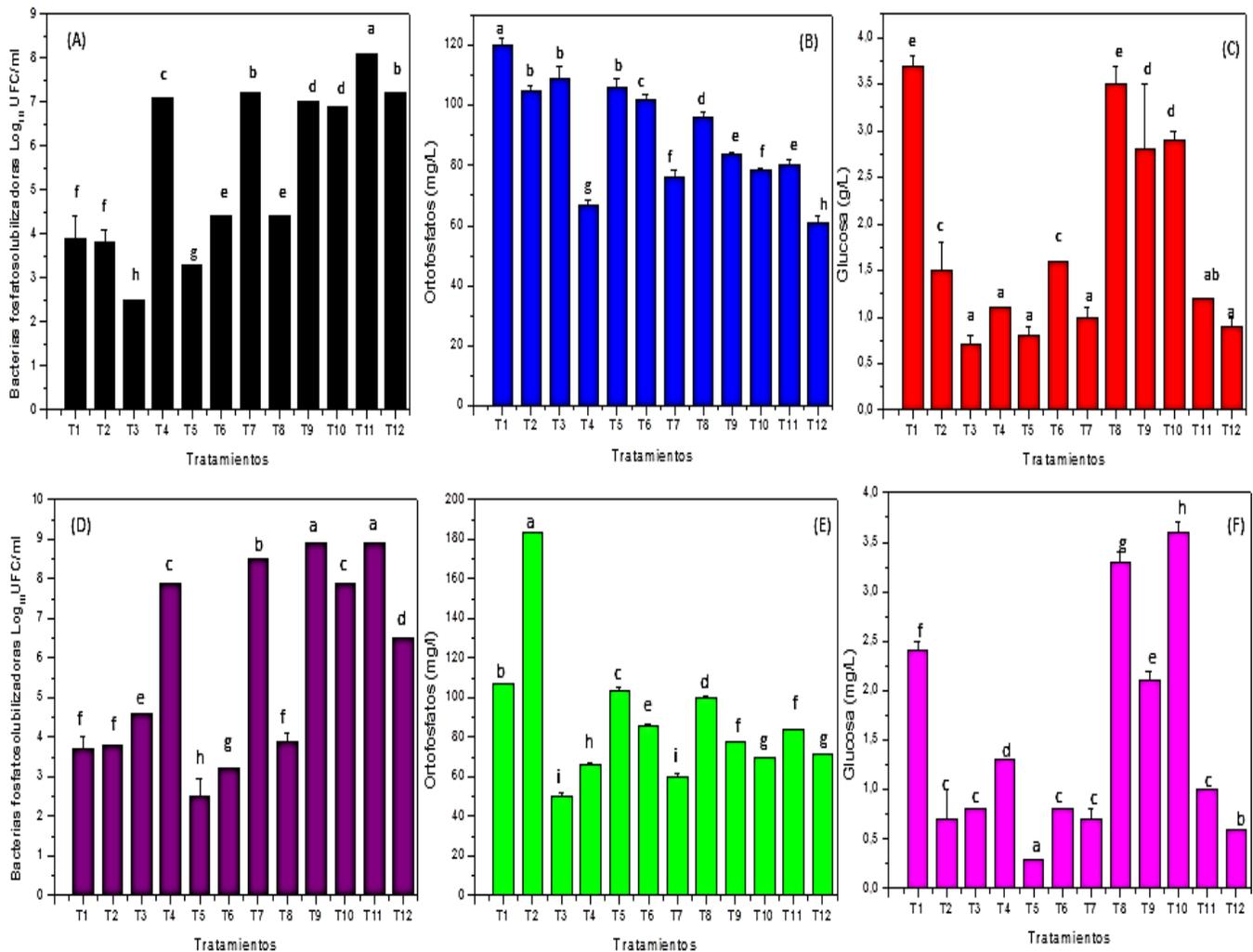


Figura 11. Resultados obtenidos en el diseño Plackett Burman. Se representan las variables de respuesta, recuento de bacterias fosfatosolubilizadoras dentro del consorcio Log₁₀ UFC/ml (A), producción de ortofosfatos mg/L por el consorcio (*Pseudomonas koreensis*, *Serratia liquefaciens* y *Kosakonia cowanii*) (B) y azúcares reductores g/L del consorcio (C), recuento de bacterias fosfatosolubilizadoras del co cultivo Log₁₀ UFC/ml (D), producción de ortofosfatos mg/L por el co cultivo (*Pseudomonas koreensis* y *Serratia liquefaciens*) (E) y azúcares reductores g/L en el co cultivo (F), en función de cada tratamiento evaluado en el Plackett Burman. Los resultados con letras distintas son significativamente diferentes (p<0,005) de acuerdo con el análisis estadístico Post-Hoc de Tukey.

Según los resultados presentados anteriormente se seleccionó el MT11B diseñado por Blanco., 2017 en función de la variable de respuesta recuento de BPS/mL, puesto que el MT11B evidenció los recuentos de poblaciones de BPS más altas. La formulación y condiciones de operación de este tratamiento son: sulfato de amonio 0.5 g/L, cloruro de potasio 0.2 g/L, sulfato de magnesio 0.3 g/L, sulfato de manganeso 0.004 g/L, sulfato de hierro heptahidratado 0.0004 g/L, cloruro de sodio 0.2 g/L, glucosa 2.5 g/L, hidrolizado de levadura 0.5 g/L, roca fosfórica 5 g/L y pH 7.2, 30°C, 200 rpm, 10 % (v/v) de inóculo (Figura 13). El criterio de selección se basa en mantener poblaciones altas de PBS

para que efectivamente se produzca una solubilización de roca fosfórica y por ende se produzca altas concentraciones de fósforo disponible, incluso al evidenciar el potencial que presenta el consorcio y co cultivo para la creación de un bioinoculante, se exige por NTC 5842 del 2011 tener poblaciones de BPS de 1×10^7 ufc/m L en presentaciones líquidas, con lo cual el recuento de BPS se debe mantener bajo las condiciones de operación del MT11B .

Por otro lado, se puede evidenciar en el diseño Plackett Burman que el tiempo fue el factor que influyó sobre las dos variables de respuesta evaluadas: recuento de BPS ufc/mL y concentración de ortofosfatos tanto para el consorcio y el co cultivo, incluso fue el factor que presentó los mayores porcentajes de contribución respecto a los otros factores (Tabla 10 y 11). Al presentarse un efecto negativo sobre el recuento de BPS/mL y un efecto positivo sobre la concentración de ortofosfatos, se puede evidenciar que la concentración de ortofosfatos aumenta en función del tiempo y la producción de biomasa disminuye. Esto se debe a la secreción de ácidos orgánicos por parte de las cepas, al ser metabolitos secundarios, estos van a ser producidos cuando el crecimiento bacteriano se encuentre limitado por el agotamiento de nutrientes como el carbono, nitrógeno, fósforo y otros nutrientes presentes en el medio (Maghraoui *et al.*, 2016) .Esta limitación ocurre conforme aumenta el tiempo, puesto que al inicio del proceso la disponibilidad de los nutrientes va ser alta y las cepas van a empezar a multiplicarse, encontrándose en su fase exponencial, por lo tanto la producción de fósforo disponible aumenta a medida que el microorganismo desarrolla su fase estacionaria y empieza la producción de metabolitos secundarios como los ácidos orgánicos (Maghraoui *et al.*, 2016);siendo este el mecanismo de solubilización de fósforo reconocido en él estudio. Esto puede observarse en la Figura 11A y 11D, ya que los recuentos de BPS más bajos se obtuvieron en los tratamientos T1, T2, T5 los cuales operaban a 48 horas. Por el contrario, en el T11 Y T12 se alcanzaron los mayores recuentos de BPS debido que operaban a 12 horas. Incluso la baja producción de biomasa presentada en los tratamientos 1, 2, 3 puede explicarse en estudios de Koch *et al.*, 2012 donde explican que la viabilidad de las células puede disminuir notablemente debido a procesos de acidificación del medio o la acumulación de metales tóxicos, produciendo la muerte de las células bacterianas o que se encuentren en un estado viable pero no cultivable, impidiendo que se puedan identificar en unidades formadoras de colonia.

En relación con las fuentes de carbono y nitrógeno, donde también fueron factores influyentes sobre la concentración de ortofosfatos y recuento de BPS, se explica inicialmente desde el crecimiento celular, puesto que al tener una concentración óptima de nutrientes en un medio de cultivo y un balance adecuado entre las fuentes de energía va a permitir una mayor producción de biomasa (Cortes *et al.*, 2011). En la tabla 10 Y 11 se puede observar el efecto que tuvo la glucosa y el hidrolizado de levadura cervecera sobre las variables de respuesta, indicando que se podrían trabajar con niveles más altos o más bajos de los mismos, asimismo se presentaron porcentajes de contribución notables por parte de ambas fuentes. Evidenciando que no solo son necesarios para el crecimiento celular, también lo son para la solubilización de fósforo. Se ha reportado que las BPS pueden solubilizar el fósforo insoluble produciendo ácidos orgánicos de fuentes de carbono como la glucosa (Mardad *et al.*, 2013). Inclusive en estudios de Baliah *et al.*, 2017 afirman que las fuentes de carbono disponibles afectan en gran medida al crecimiento celular y a la solubilización de fosfato bajo condiciones in vitro, encontrando la solubilización más activa en presencia de hexosas y pentosas o disacáridos. Además, explican que al usar fuentes de nitrógeno ricas en proteínas y aminoácidos como el hidrolizado de levadura cervecera, favorece el crecimiento celular y aumenta la solubilización en *Pseudomonas*. No obstante, usar estas

fuentes de carbono y nitrógeno representan un costo económico rentable, lo que resulta en otra ventaja importante para tener en cuenta.

Con respecto a la roca fosfórica, se puede evidenciar que además de ser un factor influyente, presento un efecto positivo en ambas variables de respuesta, tanto para el consorcio y co cultivo, indicando que se podría trabajar con niveles más altos de roca fosfórica. Se ha reportado que altas concentraciones de fósforo pueden inducir más rápido la producción de metabolitos secundarios (Maghraoui, et al 2016). Asimismo, es importante tener en cuenta que la fuente de P, como el tipo de ácido metabolizado y su concentración influyen en la generación y cantidad de fósforo disponible (Posso et al., 2017). Dentro de la composición química de la roca fosfórica el mineral que más predomina es el óxido de calcio (CaO) y en estudios de Posso et al., 2017 se ha descrito una mayor producción de ácidos orgánicos cuando se usan fuentes de fósforo asociadas a Ca, incluso proponen un orden de mayor solubilización usando diversas fuentes de fósforo asociadas a otros compuestos como (P-Ca> P-Al> P-Fe). Lo que podría explicar que se alcancen concentraciones superiores a 100 mg/L de ortofosfatos en T1 y T2 (Figura 11). Incluso en el MT11B se alcanzan concentraciones superiores a 80 mg/L a las 12 horas de cultivo, donde al mismo tiempo se obtienen las producciones más altas de BPS tanto para el consorcio y co cultivo.

7.9 Cinéticas de producción:

Las cinéticas de crecimiento para el consorcio y co-cultivo fueron realizadas en el medio MT11B diseñado y evaluado por Blanco., 2017. En relación con el co-cultivo en la Figura 12A, se puede observar que el mayor recuento de colonias se obtuvo a las 8 horas con 10.44 Log₁₀ ufc/mL, además se puede observar en la Figura 12C el crecimiento de cada una de las cepas que conforman el co cultivo; *Serratia liquefaciens* y *Pseudomonas koreensis* donde alcanzan el mayor recuento de colonias a la hora 8 obteniendo 10.21 Log₁₀ ufc/mL y 10.05 Log₁₀ ufc/mL respectivamente, con lo cual se puede determinar que dentro de las bacterias totales se evidencio mayor crecimiento por parte de *Serratia liquefaciens*.

También se puede observar el comportamiento del P disponible y P en solución en función de las 12 horas de cultivo, donde la mayor concentración de P disponible se obtuvo a las 12 horas con 101.69 mg/L; y para el P en solución se obtuvo la mayor concentración a las 10 horas con 35.63 mg/L. Con respecto a la concentración de glucosa residual se puede establecer una relación inversamente proporcional con el recuento de colonias, puesto que a medida que aumenta el recuento de colonias la concentración de glucosa residual disminuye, por ende, el mayor consumo de glucosa se evidencia a la hora 12 con 0,26 g/L de glucosa residual, indicando que el consumo de glucosa es necesario para el crecimiento de las PBS. Finalmente se puede observar el comportamiento del pH durante las 12 horas de incubación; El pH del medio inicia con 6.06 y en la hora 2 disminuye dos unidades alcanzando 4.14, a partir de la hora 4 el pH disminuye una unidad y se mantiene estable hasta la hora 12, donde se obtuvo un pH de 3.64. Al presentarse una acidificación en el medio desde las primeras horas del cultivo, se establece que efectivamente el mecanismo de solubilización de fósforo ejercido es la producción de ácidos orgánicos.

En cuanto a la cinética de producción en medio SMRS 1 del co-cultivo, se observa en la figura 12B que el mayor recuento de colonias se obtuvo a las 8 horas con 10.50 Log₁₀ ufc/mL. En cuanto al fósforo disponible y en solución se alcanzaron concentraciones más altas respecto al medio MT11B, donde se obtuvieron 272.5 mg/L a las 12 horas de P disponible y 185.87 mg/L a las 8 horas de P en solución. Con relación a la concentración de glucosa residual se obtuvo 1,011 g/L a las 12 horas, también se

establece la relación inversamente proporcional entre el recuento de colonias y la concentración de glucosa residual. Finalmente se observa el comportamiento del pH durante las 12 horas de cultivo, en donde se evidencia una disminución de dos unidades respecto al pH inicial del medio, puesto que este inicio con 6.37 y termino con 4.09.

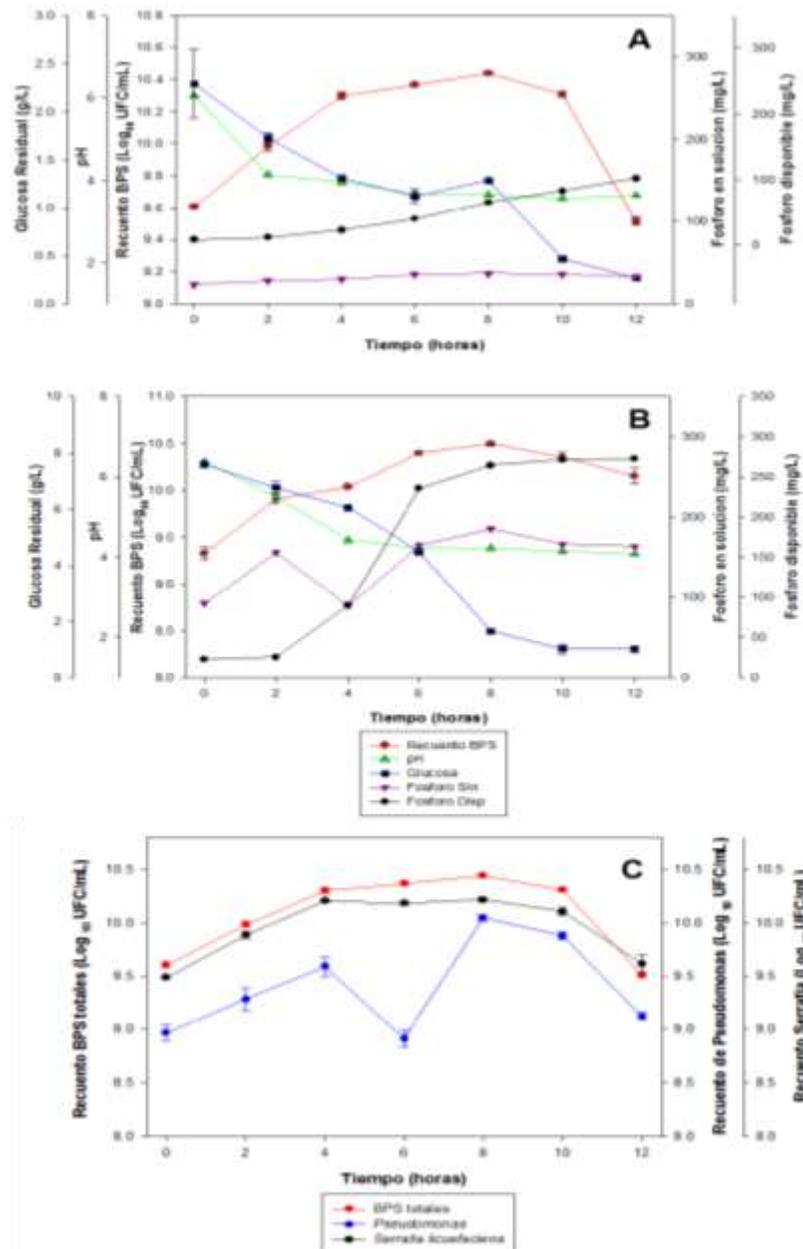


Figura 12. (A) Cinética de producción co cultivo (*Pseudomonas koreensis*, *Serratía liquefaciens*) a 12 en medio MT11B. (B) Cinética en medio MRS1. (C). Recuento de colonias totales y por género en co cultivo, con un promedio de tres replicas.

La cinética de producción del consorcio en medio MT11B se puede observar en la figura 13A, donde el mayor recuento de colonias se obtuvo a las 12 horas con 10.8 Log₁₀ ufc/mL. También se evidencia el consumo de glucosa durante las 12 horas de cultivo; la concentración más baja de glucosa residual se

obtiene a las 11 horas con 0,7 g/L, se puede observar la relación inversamente proporcional entre el recuento de colonias y concentración de glucosa residual.

Referente al P disponible y P en solución se obtuvieron las concentraciones más altas de ortofosfatos a las 10 y 12 horas con 289.5 y 53.5 mg/L respectivamente. Por otro lado, se puede observar el comportamiento del pH en el medio, donde se evidencia que desde la hora 1 el pH del medio empezó a disminuir dos unidades hasta obtener 3.44 a las 12 horas de cultivo.

En la figura 13B se observa la cinética de producción del consorcio en medio SMRS1, donde el mayor recuento de colonias se obtuvo a las 10 horas con 12.3 Log₁₀ ufc/mL, también se obtuvo la menor concentración de glucosa residual a las 11 horas con 1.7 g/L; Lo anterior sigue la misma tendencia mencionada en las anteriores cinéticas de producción, al observar una relación inversamente proporcional entre el recuento de colonias y la concentración de glucosa residual debido a que los microorganismos necesitan de la glucosa para su crecimiento celular y así llevar a cabo su metabolismo.

En cuanto al P soluble y P en solución se obtuvieron las concentraciones más altas de ortofosfatos a las 12 horas con 1112.30 y 325.5 mg/L respectivamente. Lo que resulta en las mayores concentraciones de ortofosfatos obtenidas en comparación al co cultivo (Figura 12). Al final de las 12 horas de incubación se obtuvo un pH de 3.52 indicando una acidificación del medio

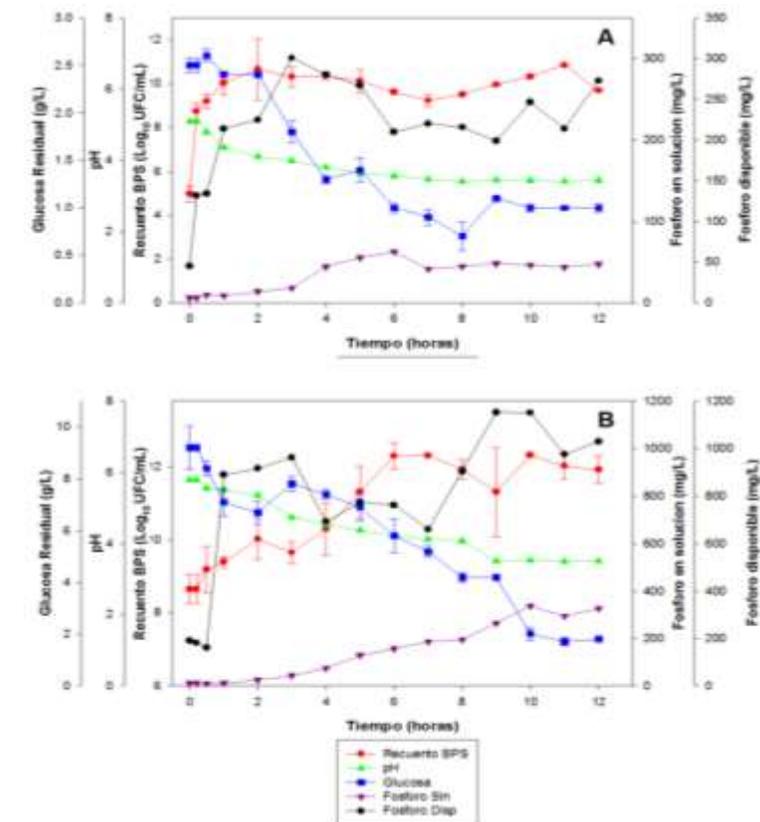


Figura 13. Cinética de producción consorcio (*Pseudomonas koreensis*, *Serratia liquefaciens* y *Kosakonia cowanii*) a 12 en medio MT11B. (B) Cinética en medio SMRS1, con un promedio de tres replicas.

Adicionalmente se determinaron los parámetros cinéticos de producción bajo dos horas diferentes del cultivo presentadas en la Tabla 12. Donde se puede identificar que el consorcio presenta mayores productividades y rendimientos respecto al co cultivo. En la hora 6 se presenta la mayor productividad de biomasa, P disponible y P en solución para el consorcio; y para el co cultivo en la hora 12. Lo que resulta, en una ventaja para la producción del co cultivo y consorcio, pues al hacerlo en periodos de tiempo muy cortos, se genera un ahorro en el uso de equipos y así mismo en los costos de operación.

Tabla 12. Parámetros cinéticos de producción del consorcio y co cultivo a las 12 y 6 horas en medio T11B.

Parámetro	Consorcio en medio T11B a las 6 horas	Consorcio en medio T11B a las 12 horas	Co cultivo en medio T11B a las 6 horas	Co cultivo en medio T11B a las 12 horas
P ^(biomasa) (UFC/ml/h)	7.0x10 ⁸	4.0x10 ⁸	1,4x10 ⁸	3,8x10 ⁹
P ^(P disponible) (mg/L/h)	35	22,7	5,5	7,9
P ^(P solución) (mg/L/h)	6,8	8,9	2,0	0,8
Y ^(P dis/ glucosa) mg/mg	0,14	0,18	0,03	0,05
Y ^(P sin/ glucosa) mg/mg	0,027	0,035	0,010	0,005

La capacidad para solubilizar roca fosfórica y fosfato tricálcico por parte de las tres cepas en co cultivo y en consorcio se puede evidenciar en el estudio. De acuerdo con la Figura 12 y 13 cuando las concentraciones de P disponible y P en solución aumentan en el medio se empieza a generar una disminución en el pH a causa de la producción de ácidos orgánicos que contribuyen a liberar el fósforo de la fuente inorgánica no soluble. Lo cual se observó en las 4 cinéticas de producción realizadas, donde el pH disminuyó dos unidades. En el medio MT11B se obtuvo valores finales de 3.64 para el co-cultivo y 3.44 para el consorcio y en el medio SMRS1 se obtuvo valores finales de 4,09 y 3,52 respectivamente. Este comportamiento es reconocido como una cinética de solubilización de fósforo típica, pues se ha reportado que esta se caracteriza por iniciar con una disminución gradual del pH junto con el aumento de fósforo soluble a lo largo del tiempo, además se ha reconocido la acidificación como un mecanismo importante en el proceso general de solubilización de P por los microorganismos (Wang *et al.*, 2015).

También se puede observar que a medida que el recuento de colonias aumentaba se producía una disminución en la concentración de glucosa residual debido a que las cepas empiezan a consumir la glucosa presente en el medio para su crecimiento celular, y cuando desarrollan su fase exponencial los requerimientos de nutrientes empiezan a ser más altos, por lo que se va a evidenciar mayor consumo de glucosa. Lo que concuerda con los resultados obtenidos ya que se obtuvieron las concentraciones más bajas de glucosa residual en las horas donde el recuento de colonias se encontraba por encima de 9 Log₁₀ ufc/mL. Además, como producto del metabolismo de la glucosa se obtienen diferentes ácidos orgánicos que van a producir la acidificación anteriormente mencionada (Mendoza *et al.*, 2009). Incluso se ha reportado que el proceso de solubilización de fósforo es un proceso que consume energía, es decir, las BPS necesitan consumir fuentes de carbono para obtener suficiente energía y así poder disociar el fósforo presente en la roca fosfórica (Wang *et al.*, 2015).

Al evidenciar una disminución del pH en las pruebas de solubilización en medio líquido (Figura 8 y 9) y en las cinéticas de producción (Figura 12 y 13) se establece que el mecanismo de solubilización de P ejercido es la producción microbiana de ácidos orgánicos, los cuales pueden disociar directamente el fosfato mineral como resultado del intercambio aniónico de PO_4^{2-} por anión ácido o pueden quelar tanto los iones hierro (Fe) y aluminio (Al) asociados al fosfato (Arif *et al.*, 2017). Al tener 3 cepas bacterianas en co cultivo y en consorcio con capacidad para solubilizar P, se puede deducir que se están produciendo diversos ácidos orgánicos para ejercer la solubilización, puesto que la producción simultánea de diferentes ácidos orgánicos por las cepas de PBS puede contribuir a aumentar el potencial de solubilización de fuentes inorgánicas de P insolubles como la roca fosfórica (Khan *et al.*, 2014). Se ha reportado que las PBS producen una variedad de ácidos orgánicos como ácido glucónico, acético, oxálico, cítrico, láctico, fumárico, succínico, entre otros. El tipo de ácido orgánico producido y sus cantidades difieren con los diferentes microorganismos; entre ellos, el ácido glucónico y el ácido 2-cetoglucónico se consideran los más frecuentes en la solubilización de fosfato mineral (Latif *et al.*, 2017). En estudios de Park *et al.*, 2009 reportan que *Pseudomonas* produce en mayor concentración ácido glucónico y tartárico y en estudios de Behera *et al.*, 2017 reportan para *Serratia* sp la producción de ácido málico, láctico y acético.

Teniendo en cuenta que *Pseudomonas koreensis*, *Serratia liquefaciens* y *Kosakonia cowanii* producen diversos ácidos orgánicos para ejercer la solubilización de roca fosfórica y fosfato tricálcico; Se evaluó el potencial de solubilización in vitro del co cultivo y consorcio estimando la cantidad de P disponible en el medio y la cantidad de P en solución en el sobrenadante del medio centrifugado. En las 4 cinéticas de producción se puede observar una relación directamente proporcional entre el recuento de colonias y la concentración de P disponible y P en solución, a diferencia de la relación inversamente proporcional con el pH y la concentración de glucosa residual en función de las 12 horas de incubación.

El recuento de colonias aumenta conforme lo hace el P disponible y P en solución debido a que al inicio del cultivo las cepas en co cultivo y consorcio van a empezar a crecer y a utilizar la fuente de fósforo del medio para liberar las primeras trazas de ácidos orgánicos y así iniciar con el proceso de solubilización mediante la liberación de fósforo disponible al medio (Walpole *et al.*, 2013). Por ende, a medida que las cepas producen ácidos orgánicos se va a liberar P disponible al medio durante las 12 horas de incubación.

Igualmente, se puede observar que las concentraciones de P disponible son más altas que las concentraciones de P en solución en las 4 cinéticas de producción, porque los ortofosfatos que están siendo liberados por las cepas pueden estar asociados a la biomasa celular y a las sales insolubles presentes en el medio, en cambio, el P en solución estima la concentración de ortofosfatos libres, puesto que por proceso de centrifugación se separó la biomasa y las sales insolubles.

Dentro de las cepas que conforman el co cultivo y consorcio se encuentra *Pseudomonas koreensis*, y se ha reportado que *Pseudomonas* es uno de los géneros que poseen una mayor actividad solubilizadora además de *Bacillus* y *Rhizobium* (Torres *et al.*, 2012). Lo que puede contribuir a explicar el potencial de solubilización de P obtenido en el estudio. Incluso al tener a *P. koreensis* en conjunto con otras cepas supera el potencial de solubilización de P obtenido por Midekssa *et al.*, 2015 donde aíslan a *P. koreensis* y evalúan su capacidad para solubilizar roca fosfórica y fosfato tricálcico en medio líquido durante 12 horas, estos autores obtienen a las 12 horas 495 mg/L de fósforo disponible usando fosfato tricálcico y 63 mg/L usando roca fosfórica. Ocurre lo mismo con *Serratia* sp; al usar

esta cepa en consorcio y co cultivo supera los resultados obtenidos por [Behera et al., 2016](#) donde aíslan una cepa de *Serratia* del suelo de manglares y obtienen 44.84 mg/L de fósforo disponible usando como fuente de fósforo el fosfato tricálcico.

Lo anterior pone en evidencia que al usar cepas en consorcio o co cultivo la solubilización de P aumenta. Lo que concuerda con resultados de [Nandimath et al., 2017](#) donde obtienen concentraciones más altas de fósforo disponible y en un intervalo de tiempo más rápido cuando usan el consorcio bacteriano respecto a las cepas solas. Por otro lado, cabe resaltar que el consorcio presentó productividades y rendimientos mucho más altos que las del co cultivo (Tabla 2) y esto puede ser debido a que el consorcio cuenta con tres cepas que pueden estar produciendo simultáneamente diversos ácidos orgánicos que potencialicen la solubilización de roca fosfórica. Se obtienen resultados similares a [Mantilla et al., 2015](#) donde evaluó la capacidad de solubilización de fósforo de consorcios y co-cultivos formados por bacterias nativas de suelos de Córdoba y la máxima eficiencia de solubilización de P la obtiene el consorcio a una concentración de 10×10^8 ufc/mL.

7.10 Pruebas de estabilidad:

Los resultados obtenidos en el numeral 6.8 en el cual se seleccionaron las mejores condiciones y el mejor medio de cultivo para mejorar la producción de biomasa y de fósforo disponible, muestran que mejor tratamiento fue el MT11B, por esta razón para las pruebas de estabilidad se seleccionó este mismo tratamiento, las pruebas de estabilidad se realizaron durante tres meses a dos temperaturas diferentes, temperatura ambiente $14 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ y temperatura de refrigeración $4 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$, se tuvieron en cuenta parámetros como la concentración de biomasa y la producción de fósforo disponible, tanto para el consorcio como para el co cultivo, los resultados obtenidos se evidencian en la Figura 14.

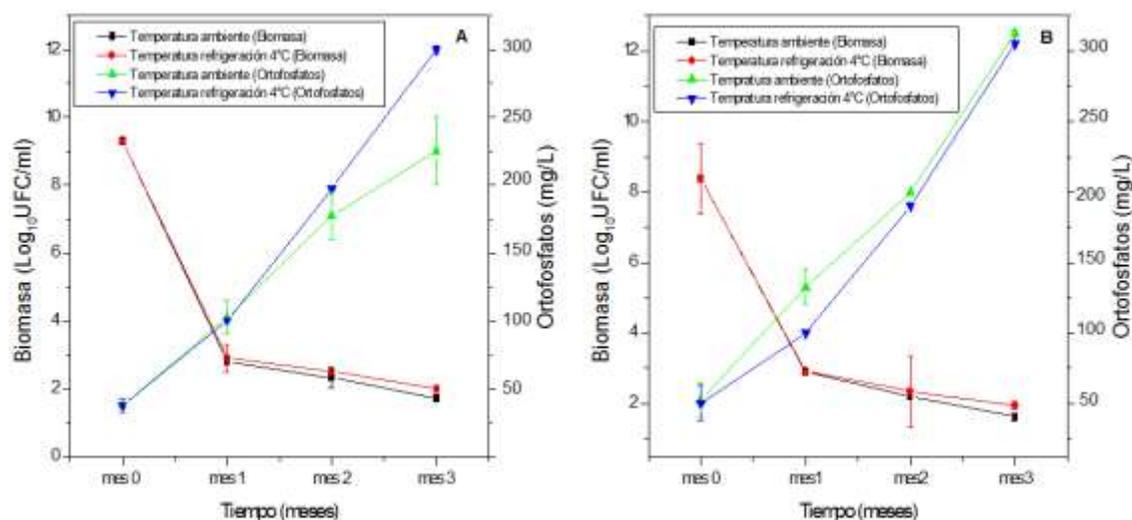


Figura 14. Resultados prueba de estabilidad en medio líquido a temperatura ambiente y a temperatura de refrigeración 4°C. (A) Biomasa del consorcio de bacterias fosfatossolubilizadoras Log₁₀ UFC/ml y producción de ortofosfatos mg/L, en función del tiempo de evaluación, (B) Biomasa del co cultivo de bacterias fosfatossolubilizadoras Log₁₀ UFC/ml y producción de ortofosfatos mg/L, en función del tiempo de evaluación, correspondiente a tres meses, la prueba se realizó con un promedio de tres replicas tanto para el consorcio como para el co cultivo.

Como se puede observar en la Figura 14, tanto para el consorcio como para el co cultivo, al evaluar las dos diferentes temperaturas durante los tres meses, se observó un comportamiento similar, en el cual al transcurrir el tiempo la biomasa decrece, mientras que la producción de fósforo disponible u ortofosfatos aumenta.

De acuerdo con los resultados obtenidos para la estabilidad de la biomasa, se estableció que tanto para el co cultivo como para el consorcio, la concentración de biomasa disminuye notablemente a partir del primer mes de prueba, pues el consorcio en el tiempo cero tenía una concentración de 9,3 Log₁₀UFC/ml en ambas temperaturas, y al transcurrir el primer mes su viabilidad disminuyó en un 70%, teniendo una concentración de 2,8 Log₁₀UFC/ml a temperatura de refrigeración y 2,9 Log₁₀UFC/ml a temperatura ambiente, finalmente en el último mes de muestreo la viabilidad disminuyó en un 81%, obteniendo una concentración de 1,9 Log₁₀UFC/ml para temperatura de refrigeración y 1,7 Log₁₀UFC/ml para temperatura ambiente.

En cuanto al co cultivo algo muy similar ocurrió al evaluar la estabilidad de la biomasa, al iniciar la prueba de estabilidad la población de microorganismos en el tiempo cero era menor que en el consorcio, pues el co cultivo inicio con 8,3 Log₁₀UFC/ml en ambas temperaturas evaluadas, al mes su población había disminuido a 2,9 Log₁₀UFC/ml en ambas temperaturas, es decir que la viabilidad disminuyó en un 65% y finalizó al tercer mes con 1,6 Log₁₀UFC/ml y 1,9 Log₁₀UFC/ml correspondientes a temperatura ambiente y temperatura de refrigeración respectivamente, disminuyendo la viabilidad en un 79%.

Los resultados anteriores muestran que la disminución en la viabilidad es muy similar en las dos temperaturas evaluadas, estos resultados se pueden atribuir a que las bacterias pertenecientes al consorcio y al co cultivo son bacterias mesófilas, es decir están adaptadas a temperaturas entre 30 °C y 40 °C, lo dicho anteriormente lo reportan diferentes autores que afirman que *Pseudomonas koreensis* (Anbu., 2014) , *Serratia liquefaciens* (Berry et al., 2010) y *Kosakonia cowanii* (Berger et al., 2018), crecen bien a temperaturas mayores de 30 °C, pero las temperaturas evaluadas en la prueba de estabilidad fueron temperaturas menores a este valor, ya que la temperatura ambiente de Bogotá (Colombia) es en promedio 14 °C ± 3 °C y la temperatura de refrigeración que se maneja era de 4 °C ± 3 °C; estos resultados concuerdan con lo reportado en algunos estudios en donde evalúan la estabilidad de bioinoculantes a través del tiempo teniendo en cuenta la temperatura, los resultados de los estudios indican que hay mayor viabilidad a temperaturas de 20 a 30 °C o superiores, en el estudio realizado por Swati et al., 2015, se llegó a esta misma conclusión, con la diferencia de que la biomasa en el estudio que ellos realizaron se encontraba en valores cercanos a 8,5 Log₁₀UFC/g a los 30 días de prueba, estos altos resultados de viabilidad los consiguieron al implementar soportes que prolongaron la viabilidad de los microorganismos dentro del bioinoculante, dentro de los soportes utilizados se encontraban talcos, aserrín, arcilla y aditivos biológicos (bioboost), los cuales pueden alargar la vida útil de un bioinoculante pues facilitan el aumento de la población microbiana y su supervivencia en el suelo (Bashan., 1998).

En cuanto a la producción de ortofosfatos en la Figura 14 se evidencia que al transcurrir los tres meses de prueba, el fósforo disponible se incrementó tanto en el consorcio como en el co cultivo; en el consorcio se partió de 44,4 mg/L de ortofosfatos en ambas temperaturas evaluadas, al primer mes el valor de ortofosfatos seguía siendo el mismo en las dos diferentes temperaturas, este valor correspondía a 113,3 mg/L, pero a partir del segundo mes se evidencian las diferencias entre la

producción de ortofosfatos en temperatura ambiente y temperatura de refrigeración, para la primera se tenían 170,9 mg/L y para la segunda 182,2 mg/L, la diferencia más evidente se observó en el último mes de muestreo en donde los ortofosfatos producidos a temperatura ambiente fueron 237,6 mg/L en contraste con los producidos en temperatura de refrigeración cuyo valor fue de 302,6mg/L, esta diferencia en el último punto de muestreo no se ve tan marcada en el co cultivo, el cual en el tiempo cero se tenía una concentración de ortofosfatos de 51 mg/L, a diferencia del primer mes en donde hay mayor cantidad de ortofosfatos en temperatura ambiente, esta valor corresponde a 128,3 mg/L, mientras que a temperatura de refrigeración se produjeron 98,8 mg/L, a partir del segundo mes la producción de fósforo disponible en las dos temperaturas fue muy similar, para temperatura ambiente 199,9 mg/L y en temperatura de refrigeración 186,2mg/L, al finalizar la prueba los resultados fueron 320,4 mg/L y 315,6 mg/L para temperatura ambiente y temperatura de refrigeración respectivamente.

Los resultados de ortofosfatos obtenidos en la prueba de estabilidad, concuerdan con los estudios realizados por [Nishanth *et al.*, 2008](#), en el cual también realizaron la prueba de estabilidad de un bioinoculante a base de roca fosfórica, y midieron la producción de fósforo disponible a partir de la solubilización de la roca fosfórica por parte de bacterias fosfato solubilizadoras durante cuarenta días, los resultados de la concentración de fosforo disponible en el primer mes fue de 120mg/kg de bioinoculante, coinciden con los resultados obtenidos en el presente estudio donde la producción de ortofosfatos oscilaba entre 113,3 y 128,3 mg/L, los cuales son valores cercanos al reportado por los autores, en el mismo estudio durante los cuarenta días de evaluación la liberación de fósforo disponible fue incrementando, misma tendencia que mostro tanto el consorcio como el co cultivo a las dos temperaturas evaluadas en función del tiempo, esto se debe principalmente a que los microorganismos convierten más P en solución que el requerido para su crecimiento y metabolismo, de esta forma el excedente estará disponible para las plantas ([Hinsinger *et al.*, 2003](#)).

*7.11 Pruebas de germinación in vitro e invernadero usando semilla de *Allium cepa**

Las pruebas de germinación con semillas de *Allium cepa* se realizaron in vitro en cámara húmeda e invernadero y se evaluó tanto para el consorcio, el co cultivo, las cepas por separado y como control agua destilada, también se evaluaron las diferencias entre los tiempos de producción de bacterias, consorcio y co cultivo a 12 horas, es decir dosificando con una concentración de 7 Log₁₀UFC/ml y la producción a 24 horas cuando se sabe que la viabilidad ha disminuido (concentración menor a 7 Log₁₀UFC/ml), los resultados de estas pruebas en las semillas de *Allium cepa* en cámara húmeda a escala de laboratorio y a escala de invernadero, se presentan en la Figura 15.

7.11.1 Pruebas de germinación de semillas de *Allium cepa* in vitro:

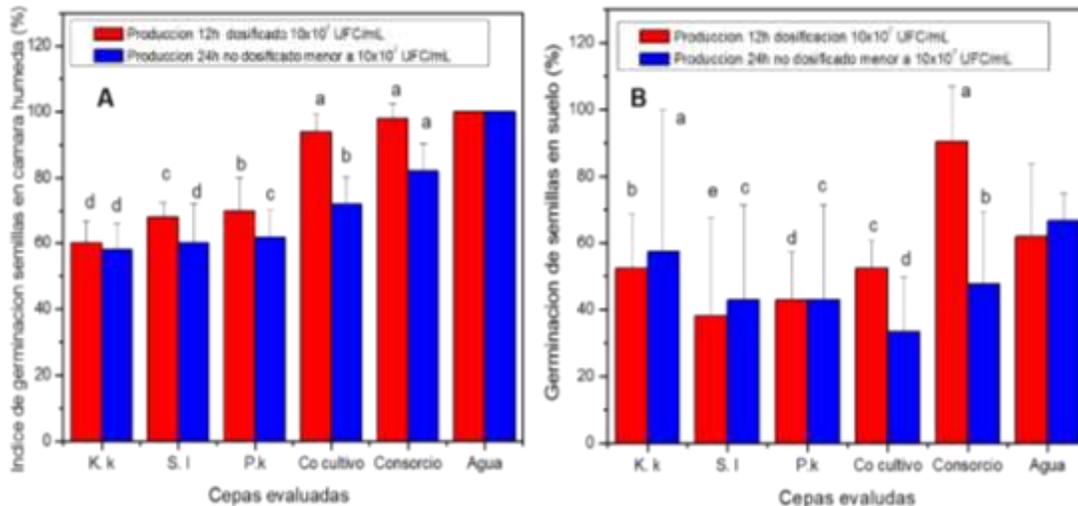


Figura 15. (A) % de índice de germinación de semillas de *Allium cepa* en cámara húmeda a escala de laboratorio. (B) Germinación de semillas de *Allium cepa* en suelo a escala de invernadero, promedio de 5 réplicas en cámara húmeda y promedio de 3 replicas con 7 semillas en suelo.

Como se observa en la Figura 15A el índice de germinación expresado como porcentaje en cámara húmeda, fue significativamente superior con el consorcio a las 12 y 24 horas ($p < 0.0001$), obteniendo porcentajes superiores al 80 % y similares al control con agua destilada, esto significa que el mejor tratamiento fue el consorcio, seguido por el co cultivo, en donde el índice de germinación expresado como porcentaje fue mayor al 70 %, al evaluar las cepas individualmente, se puede observar en la Figura 15A, que *Pseudomonas koreensis* y *Serratia liquefaciens* obtuvieron resultados muy similares con porcentajes de índice de germinación superiores al 60 % a las 12 y 24 horas, mientras que *Kosakonia cowanii* fue la cepa cuyo índice de germinación fue menor del 60 %, estos resultados sugieren que es mejor trabajar con más de una cepa, ya que se pueden potencializar las actividades de las cepas favoreciendo la germinación in vitro.

Con relación a las diferencias en los resultados obtenidos con respecto a los tiempos de producción (12 y 24 horas), en todos los tratamientos se evidencia que en el inóculo producido por 24 horas el índice de germinación de la semilla de *Allium cepa* es menor que en el inóculo producido por 12 horas, esto se debe principalmente a que el inóculo de 12 horas tiene una concentración mayor a $7 \text{ Log}_{10} \text{UFC/ml}$, mientras que en el inóculo producido por 24 horas la concentración de biomasa es menor, ya que como se ha mencionado anteriormente la viabilidad de las cepas después de 12 horas empieza a decrecer; en esta prueba un factor importante fue la concentración de las bacterias ya que estas bacterias, tienen alto potencial de promotoras de crecimiento vegetal y entre mayor sea su población mejor será el efecto que puedan tener sobre las semillas, lo dicho anteriormente concuerda con el estudio de [Morgado et al., 2015](#), en el cual evaluaban el efecto de diferentes bacterias promotoras de crecimiento vegetal en plantas de caña de azúcar, iniciando con una concentración de $7 \text{ Log}_{10} \text{UFC/ml}$, los resultados obtenidos sugieren que la cepa que mostro un mejor efecto en el crecimiento de las plántulas fue *Pseudomonas* sp., este mismo resultado se vio reflejado en el índice de germinación de semillas en cámara húmeda al evaluar las cepas por separado, ya que como se mencionó anteriormente esta bacteria incrementa el desarrollo de la raíz y la disponibilidad de fósforo para la planta ([Viruel et al., 2011](#)).

7.11.2 Pruebas de germinación y crecimiento de las plántulas de *Allium cepa* en invernadero

Las pruebas de índice de germinación de la semilla de *Allium cepa* se realizaron en suelo estéril y sin fertilización, el suelo se inoculó con las bacterias producidas en el medio MT11B, por lo tanto se valoró el efecto de las bacterias individualmente, en consorcio y co cultivo, los ácidos orgánicos y otros metabolitos producidos por estas cepas. Los resultados obtenidos en la prueba sugieren que el mejor tratamiento fue el consorcio producido por 12 horas con un porcentaje de índice de germinación mayor al 80 %, mientras que para el mismo consorcio producido por 24 horas el porcentaje fue de 50 %, es decir se presentó una diferencia significativa con respecto a los tiempos de producción del consorcio, en donde el inoculo producido por 12 horas tiene un porcentaje más alto que el inoculo producido por 24 horas, esta misma diferencia se evidencia en el co cultivo en donde el inoculo de 12 horas presentó un porcentaje de índice de germinación mayor al 50 %, mientras que en el de 24 horas el porcentaje fue menor al 40 %, siendo este resultado el más bajo obtenido en la prueba.

Por otro lado, al evaluar las cepas individualmente, la cepa que mostró mejores resultados fue *Kosakonia cowanii*, cuyos resultados de porcentaje de índice de germinación fueron mayores al 50% para el inoculo producido por 12 y 24 horas, por parte de *Serratia liquefaciens* y *Pseudomonas koreensis* ambas cepas mostraron resultados muy similares, teniendo porcentajes superiores al 40 %, en los inóculos cuyo tiempo de producción fue de 12 y 24 horas.

Los resultados obtenidos fueron muy similares a las pruebas realizadas en cámara húmeda, ya que se evidencia que el mejor tratamiento es el consorcio producido durante 12 horas, y al igual que en las pruebas realizadas en el laboratorio los tratamientos tenían mejores porcentajes de índices de germinación cuando los inóculos fueron producidos por 12 horas, las diferencias en los porcentajes del índice de germinación en cada tratamiento, entre las pruebas realizadas en el laboratorio y las realizadas en el invernadero en las cuales el porcentaje fue menor, pueden deberse a que en el invernadero las cepas y las semillas se encontraban expuestas a diferentes condiciones medioambientales como el cambio de clima, la lluvia, entre otras condiciones que pudieron afectar su viabilidad, por esta razón también se veía afectado el índice de germinación de las semillas, esto se ve reflejado en el estudio de [Agbodjato et al., 2016](#), en el cual tenían tres bacterias promotoras de crecimiento vegetal y evaluaban la germinación de la semilla y el crecimiento de la planta de maíz al utilizar las cepas por separado y las cepas en co cultivo y consorcio, el estudio de germinación se realizó in vitro y en invernadero mostrando resultados similares en donde la germinación fue mayor in vitro que en invernadero, y cuando se tenía el consorcio de las tres bacterias evaluadas, esto se debe a que los efectos de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal en combinación inducen el crecimiento de las raíces y aumentan la disponibilidad de nutrientes y la superficie de intercambio entre el suelo y las plantas, como consecuencia de una mejor superficie de intercambio, es que se presenta una mejor nutrición de la planta y por lo tanto un mejor desarrollo de la misma ([Strani et al., 2009](#)).

Los resultados de la germinación de semillas de *Allium cepa* tanto en cámara húmeda como a escala de invernadero muestran un buen porcentaje de índice de germinación, ya que como se puede evidenciar ninguna cepa sola, en consorcio o co cultivo, resulta tóxica para las semillas, esto quiere decir que ninguna cepa produce metabolitos que puedan inhibir el desarrollo de la semilla, esto se debe principalmente a que estas bacterias están reportadas por diferentes autores como promotoras de crecimiento vegetal (PGPR), según un estudio realizado por [Gusain et al., 2014](#), en el cual

buscaban evaluar el potencial de diferentes cepas aisladas de suelos cultivables como promotoras de crecimiento vegetal, teniendo en cuenta tres parámetros de evaluación para determinar qué tan buena era cada cepa, dentro de estos parámetros se encontraba la producción de sideroforos, la capacidad de solubilización de fósforo, y la producción de la fitohormona ácido indolacético (IAA), una de las cepas halladas en este estudio fue *Pseudomonas koreensis*, la cual tubo excelentes resultados en los tres parámetros evaluados en el estudio, esta bacteria puede liberar hasta 98,5 mg/L de fósforo disponible, fue positiva para la producción de sideroforos y adicionalmente en cuanto a la producción de IAA obtuvo 55,67µg/ml de esta fitohormona, los resultados indican que esta bacteria tiene gran potencial como promotora de crecimiento vegetal (Chaiarn *et al.*, 2011) lo cual concuerda con los resultados obtenidos tanto en cámara húmeda en donde el índice de germinación fue cercano al 60% y en las pruebas de invernadero donde el índice de germinación de las semillas fue de 40%.

Por otro lado *Serratia liquefaciens* también mostro buenos resultados, esta bacteria fosfato solubilizadora se encuentra igualmente dentro del grupo de PGPR, esto se debe a que además de solubilizar muy algunos nutrientes como el P o el Zn (Jamil *et al.*, 2015), también ha demostrado que tiene una alta capacidad de colonización tanto en la rizosfera como en la raíz (Dashti *et al.*, 2000), por último la cepa *Kosakonia cowanii* también reportada como PGPR por su capacidad de producir IAA, y por su capacidad de solubilizar fósforo (Kruasuwan *et al.*, 2016).

7.11.3 Variables de crecimiento vegetal en invernadero:

Por otro lado los resultados obtenidos posterior a los dos meses de prueba se evidencian en la Figura 16, en esta prueba se evaluó el peso aéreo, el peso de la raíz y plántula y el pH del suelo en cada uno de los tratamientos, correspondientes a cada cepa por separado, las cepas en consorcio y en co cultivo, de igual manera se tenían diferencias entre el tiempo de producción de las bacterias, el consorcio y el co cultivo a 12 horas, cuando su concentración era de 10×10^7 UFC/ml y la producción a 24 horas cuando se sabe que la viabilidad ha disminuido.

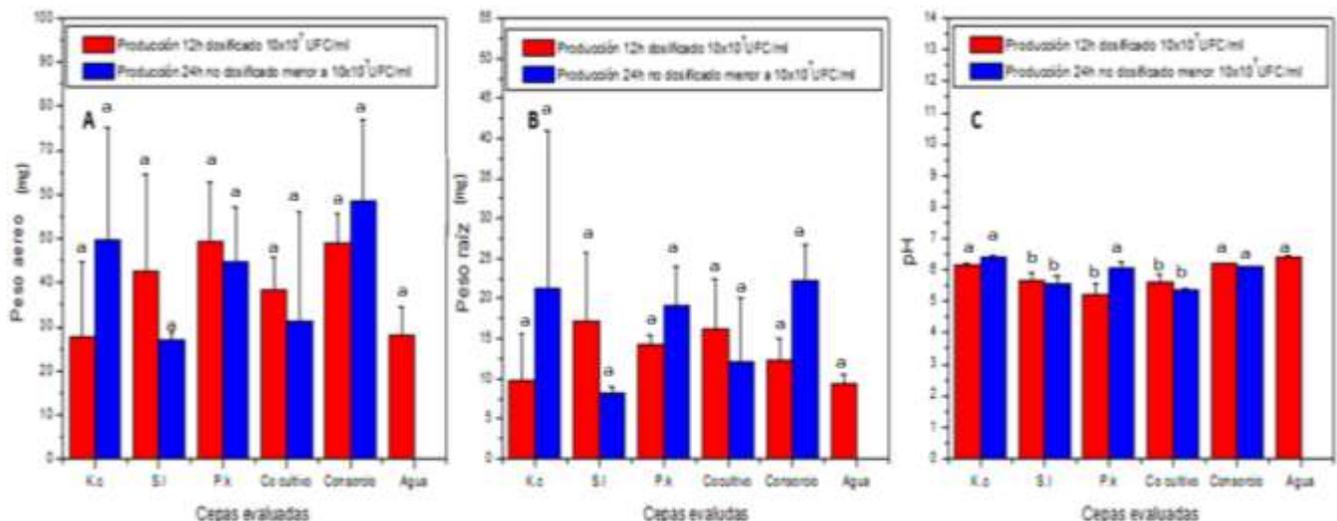


Figura 16. (A) Peso aéreo de las plantas de *Allium cepa* en invernadero después de dos meses. (B) Peso raíz y plántula de *Allium cepa* en invernadero posterior a los dos meses de prueba. (C) pH del suelo en el que se realizó la prueba en invernadero después de dos meses de prueba. Los resultados con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$) de acuerdo al análisis estadístico Post-Hoc de Tukey, con un promedio de tres replicas con siete semillas en el suelo.

Los resultados que se muestran en la Figura 16 sugieren que el mejor tratamiento es el consorcio, pues como se puede evidenciar en el peso aéreo y en el peso de la raíz y la plántula, en el consorcio fue donde se obtuvieron los mejores resultados, en ambos casos también se puede observar que a diferencia de lo que sucedió con la germinación de las semillas, en este caso la mayoría de los tratamientos fue más efectivo en los inóculos producidos por 24 horas, esto puede estar relacionado con los que ha dicho anteriormente, ya que a las 24 horas la viabilidad ha disminuido, pero al disminuir la viabilidad aumenta la producción de ortofosfatos es decir fósforo disponible, y como lo mencionan diferentes autores el fósforo es un macronutriente esencial para el desarrollo de la planta ya que es un componente primario de los sistemas responsables de la captación, almacenamiento y transferencia de energía y es un componente básico en las estructuras de macromoléculas como ácidos nucleicos y fosfolípidos, las raíces de la planta absorben el fósforo principalmente en forma de ión ortofosfato primario (H_2PO_4^-), o como ortofosfato secundario (HPO_4^{2-}), la baja disponibilidad de fósforo en el suelo puede causar trastornos fisiológicos en la planta como el no sintetizar proteínas inhibiéndose la síntesis de ARN, en cuanto a algunos signos físicos de deficiencia de fósforo se evidencia coloración morada en las márgenes de las hojas, enrollamiento de las hojas y crecimiento lento y retraso en la maduración (Fernández., 2007).

De acuerdo a los resultados que se presentan en la Figura 16A y 16B para el peso seco de la parte aérea y el de la raíz de *Allium cepa*, se puede evidenciar que todos los tratamientos presentaron resultados más altos con respecto al control realizado con agua, en el caso del peso aéreo el tratamiento con los resultados más altos fue el consorcio en el cual el peso aéreo fue de 50 mg para el inóculo producido por 12 horas y 60 mg en el inóculo producido por 24 horas, mostrando un aumento de peso de aproximadamente 25mg con respecto al control, dentro de este consorcio se encuentra *Pseudomonas koreensis*, esta cepa fue la que mejores resultados mostro al evaluarse cada cepa por separado, el peso aéreo de la planta de *Allium cepa* al ser inoculada con esta bacteria fue mayor a 45 mg, con una diferencia de más de 15 mg con respecto al control, en el caso del peso seco de la raíz se presentan resultados muy similares para *Pseudomonas koreensis*, ya que fue la cepa que presento mayor incremento en el peso de la raíz de *Allium cepa* con valores mayores a 15 mg, con una diferencia de 6 mg con respecto al control, estos resultados son similares a los obtenidos por Sánchez et al., 2012, en donde evaluaron el peso aéreo y el peso radicular de una hortaliza en función de diferentes bacterias promotoras de crecimiento vegetal, teniendo como resultado que *Pseudomas* sp. fue la bacteria que mejores resultados en el incremento del peso aéreo y del peso de la raíz mostro con respecto al control que al igual que en el presente estudio fue agua fue agua estéril.

No solo *Pseudomonas koreensis* mostro buenos resultados, las cepas *Serratia liquefaciens* y *Kosakonia cowanii* también mostraron un incremento en el peso aéreo y el peso de la raíz de la planta *Allium cepa*, esto se atribuye a que como se ha mencionado anteriormente todas estas cepas tienen una alto potencial de promotoras de crecimiento vegetal.

Con respecto al pH se evidencia que todos los tratamientos acidificaron el suelo, unos en mayor proporción que otros, los tratamientos que menor acidificación mostraron fueron el consorcio y la cepa *Kosaconia cowanii* con unos valores de pH que oscilaban entre 6,0 a 6,3, *Serratia liquefaciens* mostro valores de pH entre 5,5 y ,60; los tratamientos que mayor acidificación presentaron fueron el co cultivo y *Pseudomonas koreensis* con valores de pH entre 5,0 a 5,5, la acidificación del medio se debe a la presencia de ácidos orgánicos producidos por procesos metabólicos llevados a cabo por estas bacterias (Wei et al., 2018).

Los cultivos de cebolla presentan un desarrollo adecuado a lo largo de 148 días aproximadamente, en la primera etapa de desarrollo, es decir durante los primeros 30 días, el tamaño del bulbo es inferior a 1 cm, se presentan alrededor de 3 hojas por planta de cebolla y el peso seco de la planta es bajo, a los 60 días la cantidad de hojas es el doble, sin embargo el tamaño del bulbo sigue siendo pequeño, mientras que el peso seco empieza a aumentar, finalmente las plantas de *Allium cepa* al ser cosechadas después de mínimo 120 días de cultivo y máximo 150 días, muestran un incremento en los parámetros anteriormente mencionados, alcanzando hasta 12 hojas por planta, un tamaño de bulbo de 8 a 9 cm y un peso seco de 40 g (Morales *et al.*, 2016), este incremento se evidencia al presentarse las condiciones adecuadas para tener un buen desarrollo fenológico del cultivo de cebolla *Allium cepa*.

La cebolla es una variedad vegetal que está fuertemente influenciada por factores ambientales, uno de los principales es el fotoperiodo, pues esta planta necesita estar expuesta a largos periodos de luz solar para desarrollarse de manera adecuada, ya que la luz es un factor limitante para la formación del bulbo (Costa *et al.*, 2007), otro aspecto importante es la absorción de nutrientes a lo largo del tiempo de crecimiento, en la producción de hortalizas como la cebolla es indispensable realizar un estudio de absorción de nutrientes a lo largo del periodo de desarrollo, este estudio es una herramienta que permite conocer los periodos de aumento de las necesidades nutricionales de las plantas de cebolla en un cultivo (Porto *et al.*, 2007).

Con respecto a lo mencionado anteriormente acerca de los nutrientes, uno de los nutrientes esenciales para el adecuado desarrollo de la cebolla es el fósforo (P), en el cultivo se necesitan altas cantidades de P disponible, sin embargo la cebolla no requiere grandes cantidades de este nutriente, durante los primeros días de desarrollo se requieren 2mg/planta de P, ya que durante esta etapa están germinando las raíces de las semillas y estas raíces son la parte de la planta que menos acumula fósforo, la raíz acumula un 2% del fósforo absorbido, el bulbo acumula un 48% y las hojas un 50%, las hojas necesitan entre 5 a 6 mg/planta este valor se mantiene constante durante el crecimiento de la planta, mientras que el bulbo al inicio de su desarrollo necesita 1 mg/planta y termina requiriendo de 4 a 5 mg/planta, es decir que a medida que avanza el desarrollo de la planta de cebolla, específicamente del bulbo de la cebolla, la planta va a necesitar una mayor cantidad de fósforo disponible, dado que para el engrosamiento del bulbo uno de los macronutrientes principales es el fósforo, se estima que la cantidad adecuada de P en los últimos días de desarrollo es alrededor de 9 mg/planta (Morales *et al.*, 2016), generalmente para suplir los requerimientos nutricionales de P en los cultivos de cebolla se utilizan fertilizantes químicos que resultan no ser amigables con el medio ambiente y tóxicos al usarse en grandes cantidades, por esta razón una de las estrategias que se puede implementar en estos cultivos es el uso de biofertilizantes a base de microorganismos fosfato solubilizadores, ya que estos microorganismos juegan un papel clave en el ciclo del fósforo solubilizando P inorgánico y poniéndolo a disposición de las plantas (Prabhu *et al.*, 2018).

7.11.4 Estabilidad de las cepas del consorcio y co cultivo durante la prueba de germinación en invernadero

Uno de los factores más importantes en un inoculo es la viabilidad y la estabilidad, para asegurarnos que las cepas se encontraban viables a los dos meses de prueba se realizaron recuentos de la biomasa presente en el suelo, en cada tratamiento y para verificar que el consorcio y el co cultivo

fueran estables se realizó el recuento de cada morfotipo dentro de estos dos tratamientos, los resultados que se obtuvieron se muestran en la Figura 17.

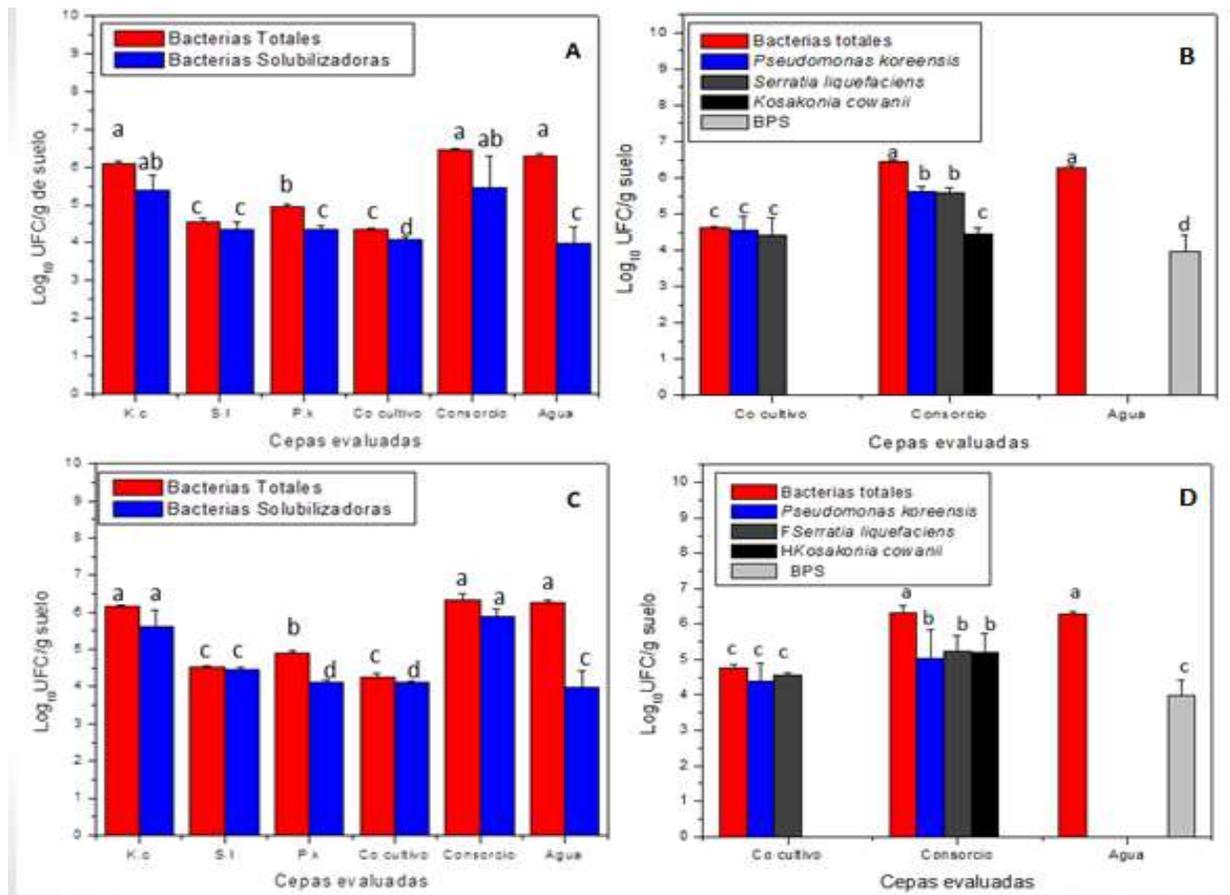


Figura 17. Viabilidad de las cepas (Log₁₀UFC/ml) evaluadas por separado y en consorcio y co cultivo, posterior a las pruebas realizadas en invernadero (A) Bacterias totales y solubilizadoras al realizar la producción por 12 horas con una dosis de 10x10⁷UFC/ml, (B) Concentración de cada cepa dentro del consorcio y co cultivo al realizar la producción por 12 horas con una dosis de 10x10⁷UFC/ml, (C)Bacterias totales y solubilizadoras al realizar la producción por 24 horas con una dosis menor a 10x10⁷UFC/ml, (D) Concentración de cada cepa dentro del consorcio y co cultivo al realizar la producción por 12 horas con una dosis de 10x10⁷UFC/ml.

En cuanto a la viabilidad que se presenta al finalizar los dos meses de prueba, se puede observar que los resultados de bacterias totales y de bacterias fosfato solubilizadoras son muy similares en el inoculo producido a 12 horas (Figura 17A) y en el que fue producido por 48 horas (Figura 17C), en los dos casos la población de bacterias es menor a 7 Log₁₀UFC/ml, sin embargo los resultados sugieren que a pesar de que la concentración de microorganismo si disminuyo, el valor más bajo en ambos casos concluidos los dos meses de prueba, fue mayor a 4 Log₁₀UFC/ml, valor aceptado por la NTC que se encuentra en consulta, a diferencia de las pruebas de estabilidad en donde la biomasa al mes decreció y se encontraba alrededor de 2 Log₁₀UFC/ml, esto se puede atribuir a que las bacterias además de encontrarse en un medio donde cuentan con las condiciones necesarias para la producción de biomasa y liberación de fósforo disponible, es decir el medio MT11B, también se encuentran en una matriz como el suelo cultivable en donde pueden tener una relación simbiótica con la planta manteniendo su población durante el tiempo (Reyes *et al.*, 2006).

Finalmente para asegurarnos de la estabilidad de cada cepa dentro del consorcio (*Pseudomonas koreensis*, *Serratia liquefancies* y *Kosakonia cowanii*) y el co cultivo (*Pseudomonas koreensis* y *Serratia liquefancies*) se realizó el recuento por morfotipos al culminar con los dos meses de prueba, los resultados obtenidos para los tratamientos producidos a 12 horas se evidencian en la Figura 17B y a 24 horas en la Figura 17D, al igual que en los resultados anteriores no se evidencian diferencias entre los inóculos producidos a las 12 horas y a las 24 horas, ya que para el consorcio la concentración de bacterias totales está cercana a una concentración de $6 \text{ Log}_{10}\text{UFC/ml}$, en ambas condiciones de prueba, dentro del consorcio producido por 12 horas los recuentos para *Pseudomonas koreensis* y *Serratia liquefancies* eran muy similares, estos recuentos se encontraban en valores cercanos a $5,5 \text{ Log}_{10}\text{UFC/ml}$, mientras que para *Kosakonia cowanii* el recuento fue de $4 \text{ Log}_{10}\text{UFC/ml}$, lo que significa que la población de esta última bacteria dentro del consorcio es menor que la de las otras dos presentes en este consorcio, sin embargo los resultados del consorcio producido a 24 horas muestran que las tres bacterias presentes en el consorcio tenían una concentración muy parecida, la cual se encuentra alrededor de $5 \text{ Log}_{10}\text{UFC/ml}$.

Por otro lado en el co cultivo la concentración de bacterias totales, en estas dos diferentes condiciones de producción evaluadas, se encontraba alrededor de $4,5 \text{ Log}_{10}\text{UFC/ml}$, del mismo modo los recuentos de *Pseudomonas koreensis* y *Serratia liquefancies* fueron muy parecidos entre estas dos bacterias, tanto a las 12 horas de producción como a las 24 horas, los valores de recuentos oscilaban entre $4 \text{ Log}_{10}\text{UFC/ml}$ y $4,5 \text{ Log}_{10}\text{UFC/ml}$, es decir que la población decreció pero se mantuvo igual para las dos cepas durante los dos meses de prueba. Los resultados anteriores sugieren que las cepas presentes en el consorcio y el co cultivo son estables al probarse en una matriz como el suelo, sin embargo sigue siendo necesario implementar un soporte que alargue la viabilidad de las bacterias alargando la vida útil de bioinoculante.

8. Conclusiones:

- En suelos de cultivos de *Allium cepa* se identificaron 3 cepas con capacidad para solubilizar roca fosfórica, además de caracterizarse por ser bacilos Gram negativos y no presentar antagonismo entre ellos, lo que permitió el diseño de un co cultivo y consorcio, donde la mayor actividad solubilizadora se evidencia en el consorcio.
- El diseño del medio MT11B favorece la mayor producción de biomasa de las cepas en consorcio y en co cultivo, lo que va a generar la producción de ácidos orgánicos y por ende la liberación de ortofosfatos.
- La estabilidad de las cepas en consorcio y en co cultivo en el medio MT11B disminuye en un 80% a partir del primer mes, lo que resulta en una baja estabilidad y en la necesidad de usar un soporte para aumentar la estabilidad de las cepas en consorcio y co cultivo.
- Se demostró el potencial de las tres bacterias seleccionadas como promotoras de crecimiento vegetal en las pruebas de germinación in vitro e invernadero debido al incremento en el índice de germinación, el peso seco de la parte aérea de la planta y de la raíz.

9. Recomendaciones:

- En cuanto a la estabilidad de las bacterias tanto en consorcio como en co cultivo, en un bioinoculante es necesario utilizar un soporte como aserrín, corteza de pino, polvos o aditivos que aseguren que la viabilidad se mantendrá estable a lo largo del tiempo, garantizando que la población de bacterias fosfato solubilizadoras se encuentre viable dentro del producto.
- El medio de cultivo diseñado MT11B puede ser optimizado mediante un diseño experimental Box-Behnken.
- Identificar la capacidad de solubilización de fósforo orgánico por medio de la actividad fosfatasa utilizando la técnica de *p*-nitrofenilfosfato de cada una de las cepas bacterianas.

10. Productos científicos derivados de este trabajo de grado.

- Participación en modalidad de poster en el evento: Bogotá Microbial Meeting 2017. Llevado a cabo en la Universidad de los Andes los días 18 y 19 de agosto del 2017, el poster recibió el nombre de “Selección y producción de bacterias solubilizadoras de fosfato empleando roca fosfórica como sustrato”, los autores fueron: Andrea Blanco Vargas, Natalia Sánchez Castro, Lina María Rodríguez Gacha, Aura Marina Pedroza Rodríguez, Raúl Alberto Poutou Piñales.



- Redacción de artículo científico a someter a la revista colombiana de agronomía

11. Referencias

- Adhya, T. K., Kumar, N., Reddy, G., Podile, A. R., Bee, H., & Samantaray, B. (2015). Microbial mobilization of soil phosphorus and sustainable P management in agricultural soils. *Current Science*; 108(7), 1280–1287.
- Afanador, L., (2017) Biofertilizantes: conceptos, beneficios y su aplicación en Colombia. *Ingeciencia*; 65-76.
- Agbodjato, N.A., Noumavo PA, Adjanohoun A, Agbessi L, Baba-Moussa L., (2016). Synergistic Effects of Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Chitosan on In Vitro Seeds Germination, Greenhouse Growth, and Nutrient Uptake of Maize (*Zea mays* L.). *Biotechnology Research International*; 01/20:1-11.
- Alam, S., Khalil S, Ayub N, Rashid M., (2002). In vitro solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) from Maize Rhizosphere. *International Journal of Agriculture & Biology*; 4 (4): 454- 458.
- Alvarado, L., Barreto R., (2005). Minerales Naturales utilizados en Colombia como fuentes en fertilizantes o enmiendas de suelo. *CYTED*, Brasil.
- Arcand, M., Schneider K., (2006). Plant- and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review. *Anais da Academia Brasileira de Ciência*; 78(4): 791-807
- Anbu P., (2014) Characterization of an extracellular lipase by *Pseudomonas koreensis* BK-L07 isolated from soil. *Prep Biochem Biotechnol*; 44(3):266-280.
- Angulo-Cortés, J. P., García-Díaz, A., Pedroza, A. M., Martínez-Salgado, M. M., & Gutiérrez-Romero, V. (2012). Diseño de un medio para la producción de un co-cultivo de bacterias fosfato solubilizadoras con actividad fosfatasa. *Universitas Scientiarum*, 17(1), 43–52.
- Awais M, Tariq M, Ali A, Ali Q, Khan A, Tabassum B, et al., (2017). Isolation, characterization and inter-relationship of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of sugarcane and rice. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, (Supplement C):312-32.
- Babu-Khan S, Chia Yeo T, Martin W, Duron R, Goldstein, A., (1995). Cloning a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. *Applied and environmental microbiology* 61(3):972-978.
- Baliah, T., & Priya, A. (2017). Original research article in vitro characterization of phosphate solubilizing bacteria isolated from different agricultural fields. *International Journal of Development Research*: 07, 16911–16918.
- Bashan Y., (1998). Inoculants of plant growth promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol Adv*; 16:729–770.
- Behera B, Singdevsachan S, Mishra R, Dutta S, Thatoi H., (2014). Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove-A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*; 3(2):97-110.
- Behera B, Yadav H, Singh S, Mishra R, Sethi B, Dutta S, Thatoi H., (2017). Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* sp. isolated from mangrove soil of Mahanadi river delta, Odisha, India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*; 2-10.

Beltrán P., (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*; 15(1) 101-113.

Berger B., Patz S, Ruppel S, Dietel K, Faetke S, Junge H, et al., (2018). Successful Formulation and Application of Plant Growth-Promoting *Kosakonia radicincitans* in Maize Cultivation. *BioMed Research International*; 03/28:1

Bergottini B., Otegui D. A. Sosa D. Zapata M. Mulot M. Rebord J. Zopfi F. Wiss B. Benrey P., (2015). Bio-inoculation of yerba mate seedlings (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) with native plant growth-promoting rhizobacteria: a sustainable alternative to improve crop yield. *Biol Fertil Soils*; 749-755.

Berry BJ., Jenkins DG, Schuerger AC., (2010). Effects of simulated Mars conditions on the survival and growth of *Escherichia coli* and *Serratia liquefaciens*. *Appl Environ Microbiol*; 76(8):2377-2386.

Boyhan G., Torrance R, Hill R., (2007). Effects of Nitrogen, Phosphorus, and Potassium Rates and Fertilizer Sources on Yield and Leaf Nutrient Status of Short-day Onions. *Hort Science*; 42(3):653–660.

Brady C., Cleenwerck I, Venter S, Coutinho T, De Vos P., (2013). Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): Proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*. *Syst Appl Microbiol*; 36:309-319

Bünemann E., (2015). Assessment of gross and net mineralization rates of soil organic phosphorus – A review. *Soil Biology and Biochemistry*; 89:82-98.

Bustamante MA., Ceglie FG, Aly A, Mihreteab HT, Ciaccia C, Tittarelli F., (2016). Phosphorus availability from rock phosphate: Combined effect of green waste composting and sulfur addition. *Journal of Environmental Management*; 182:557-563.

Çao Y., Fu, D., Liu, T., Guo, G., & Hu, Z. (2018). Phosphorus Solubilizing and Releasing Bacteria Screening from the Rhizosphere in a Natural Wetland. *Water*.1–15

Cerón L., Aristizábal A., (2012). Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Revista Colombiana de Biotecnología*; 14(1):285-295

Chaiharn M. and S. Lumyong., (2011). Screening and optimization of indole-3acetic acid production and phosphate solubilization from rhizobacteria aimed at improving plant growth. *Curr Microbiol*; 62, 173–181.

Chien S., Prochnow L, Mikkelsen R., (2009). Uso agronómico de la roca fosfórica para aplicación directa. *Informaciones Agronómicas*; (1):13-16.

- Christiane, G., Ubiana, S., Ivanildo, M., Christiane, D. O., & Ubiraci, L. (2014). Rock phosphate solubilizing microorganisms isolated from maize rhizosphere soil. *Revista Brasileira de Milho*, 13(1), 69–81.
- Cisneros, R., Sánchez, M., Flores J. (2016). Efecto de bacterias solubilizadoras de fosfato sobre el desarrollo de plántulas de café. *Agron. Mesoam.* 28(1):149-158.
- Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM., (2013). Matrix-Assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: A fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clinical Microbiol Review* ;26(3):547–603
- Cortés J, García-Díaz A, Pedroza A, Martínez-Salgado M, Gutiérrez-Romero V., (2012). Diseño de un medio para la producción de un co-cultivo de bacterias fosfato solubilizadoras con actividad fosfatasa. *Universitas Scientiarum*; 17(1):43.
- Costa N, Cunha T, Resende G., (2007). Cultivo de la Cebolla en el Nordeste. *EMBRAPA Sistema Brasileño de Clasificación de suelos.*
- Dashti N, Prithviraj B, Hynes RK, Smith DL.,(2000). Root and Rhizosphere Colonization of Soybean [Glycine max (L.) Merr.] by Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria at Low Root Zone Temperatures and under Short-Season Conditions. *Journal of Agronomy & Crop Science*; 07;185(1):15-22.
- DeSantis T. Z., Hugenholtz P., Larsen N, Rojas M, Brodie E. L., Keller K., Huber T., Dalevi D., Hu P., Andersen G. L., (2006). Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology*; 72(7):5069-5072.
- Fayiga A, Nwoke O., (2016). Phosphate rock: origin, importance, environmental impacts, and future roles. *Environmental Reviews*; 24(4):403-415.
- Fernández M.,(2007). Fósforo: amigo o enemigo. *Instituto Cubano de Investigaciones*; 2:51-57.
- Ferreira S, Caires A, Borges T, Lima A, Silva L, Dos Santos W., (2017). Robustness evaluation in analytical methods optimized using experimental designs. *Microchemical Journal*; 131:163-169.
- Forber KJ, Ockenden MC, Wearing C, Hollaway MJ, Falloon PD, Kahana R, et al., (2017). Determining the Effect of Drying Time on Phosphorus Solubilization from Three Agricultural Soils under Climate Change Scenarios. *J Environ Qual*; 46(5):1131-1136.
- Gaind S, Gaur A., (1990). Shelf life of phosphate-solubilizing inoculants as influenced by type of carrier, high temperature, and low moisture. *Canadian Journal of Microbiology*, 36(12):846-849.
- García A, Lovaisa C, Ulla L., (2015). Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfatos del Noroeste Argentino y su efecto en la promoción de crecimiento en maíz (Zea mays L). *Revista agronómica del noroeste argentino*; 35(1), 13-28.
- Goljanian-Tabrizi S, Amiri S, Nikaein D, Motesharrei Z., (2016). The comparison of five low cost liquid formulations to preserve two phosphate solubilizing bacteria from the genera Pseudomonas and Pantoea. *Iranian Journal of Microbiology*; 12;8(6):377-382.
- Gopalakrishnan S, Humayun P, Kiran BK, Kannan IGK, Vidya MS, Deepthi K, Rupela O.,(2011). Evaluation of bacteria isolated from rice rhizosphere for biological control of charcoal rot of sorghum caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *World J Microbiol Biotechnol*; 27(6):1313–1321.

Gusain YS, Kamal R, Mehta CM, Sharma AK.,(2015). Phosphate solubilizing and indole-3-acetic acid producing bacteria from the soil of Garhwal Himalaya aimed to improve the growth of rice. *J Environ Biol*;36(1):301-307.

Hajjam Y, Cherkaoui S., (2017). The influence of phosphate solubilizing microorganisms on symbiotic nitrogen fixation: Perspectives for sustainable agriculture. *Journal of Materials and Environmental Science*, 8(3), 801–808

Hayat R, Ali S, Amara U, Khalid R, Ahmed I., (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*; 60(4):579-598

Hariprasad P, Niranjana S., (2009). Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato. *Plant Soil*; 316 13–24.

Hernández J, Venegas S, Soto C, Chávez A, Zavala L., (2011). Uso de fertilizantes químicos y orgánicos en cebolla (*Allium cepa* L.) en Apatzingán , Michoacán , México. *Avances En Investigación Agropecuaria*, 15(2), 29–43.

Hinsinger P, Plassard C, Tang C, Jaillard, B., (2003). Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant Soil*; 248, 43–59.

Hinsinger P. (2001). Soil inorganic P in the rhizosphere as effected by root-induced chemical changes A review.pdf. *Plant and Soil*; 237, 173–195.

Hirota R, Kuroda A, Kato J, Ohtake H., (2010). Bacterial phosphate metabolism and its application to phosphorus recovery and industrial bioprocesses. *Journal of Bioscience and Bioengineering*; 109(5), 423–432.

Horneck D.A.,(2004). Manejo de nutrientes en cebolla. *Informaciones agronómicas*; 61; 9-10.

Huang L, Jia X, Zhang G, Shao M., (2017). Soil organic phosphorus transformation during ecosystem development: A review. *Plant and Soil*; 417(1-2):17-42.

Inoue K, Sugiyama K, Kosako Y, Sakazaki R, Yamai S., (2000). *Enterobacter cowanii* sp. nov., a new species of the family Enterobacteriaceae. *Microbiol*; 41, 417–420.

Iyanova R, Bojinova D, Nedialkova K., (2006). Rock Phosphate Solubilization By Soil Bacteria. *Chemical Technology*; 297–302.

Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), 4 de febrero de 2011. Resolución 0698. Por el cual se establecen los requisitos para el registro de departamentos técnicos de ensayos de eficacia, productores e importadores de bioinsumos de uso agrícola y se dictan otras disposiciones.

Jamil M, Sessitsch A, Abaid-Ullah M, Hassan MN, Jamil M, Hafeez FY, et al.,(2015). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: An Alternate Way to Improve Yield and Quality of Wheat (*Triticum aestivum*). *International Journal of Agriculture and Biology*;17(1):51-60.

José E. Posso S, Prager M., (2016). Production of organic acids by rhizosphere microorganisms isolated from a Typic Melanudands and its effects on the inorganic phosphates solubilization. *Acta Agronómica*; 66(2).

Karlicic V, Radic D, Jovicic-Petrovic J, Lalevic B, Jovanovic L, Kikovic D, et al.,(2016). Isolation and Characterization of Bacteria and Yeasts from Contaminated Soil. *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences*; 07;61(3):248.

Kataoka R, Nagasaka K, Tanaka Y, Yamamura H, Shinohara S, Haramoto E, Hayakawa M, Sakamoto Y., (2017). Hairy vetch (*Vicia villosa*), as a green manure, increases fungal biomass, fungal community composition, and phosphatase activity in soil. *Appl Soil Ecol*; 117:16-20.

Khan AR, Park G, Asaf S, Hong S, Jung BK, Shin J., (2017). Complete genome analysis of *Serratia marcescens* RSC-14: A plant growth-promoting bacterium that alleviates cadmium stress in host plants. *PLoS ONE*; 12(2):1-17.

Khan A, Jilani G, Saleem M, Navqi S, Rassheed M., (2012). Phosphorus solubilizing bacteria: Occurrence, mechanisms and their Role in crop Production. *Resources and Environment*, 2(1): 80-85.

Kim WI, Kim SN, Ryu KY, Park CS., (2011). Genetic diversity of cultivable plant growth-promoting rhizobacteria in Korea. *J Microbiol Biotechnol*;21(8):777-790.

Koch S, Majewski E, Schmeisky H, Schmidt F., (2012). Critical evaluation of phosphate solubilizing pseudomonas isolated from a partially recultivated potash tailings pile. *Current Microbiology*; 65(2), 202–206

Krishnaraj P, Dahale S., (2014). Mineral Phosphate Solubilization: Concepts and Prospects in sustainable Agriculture. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 80(2):389.

Kruasuwan W, Thamchaipenet A., (2016). Diversity of Culturable Plant Growth-Promoting Bacterial Endophytes Associated with Sugarcane Roots and Their Effect of Growth by Co-Inoculation of Diazotrophs and Actinomycetes. *J Plant Growth Regul*;4(4):1074

Kwak Y, Jung BK, Shin JH., (2015). Complete genome sequence of *Pseudomonas rhizosphaerae* IH5T (=DSM 16299T), a phosphate-solubilizing rhizobacterium for bacterial biofertilizer. *J Biotechnol*; 193:137–138.

Lara C, Esquivel L, Negrete L.,(2011). Bacterias Nativas Solubilizadores De Fosfatos Para Incrementar Los Cultivos En El Departamento De Córdoba-Colombia. *Biología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*;9(2):114-120.

Lara M, Negrete J., (2015). Effect of bio-inoculant from microbial consortia phosphate solubilizing. *Revista Colombiana de Biología*, 17(1), 122–130.

Lee J, Lee S., (2014). Correlations between soil physico-chemical properties and plant nutrient concentrations in bulb onion grown in paddy soil. *Scientia Horticulturae*; 179:158-162.

Legarraga P, Moraga M, Lam M, Geoffroy E, Zumaran C, García P., (2013). Impact of mass spectrometry by MALDI-TOF MS for the rapid identification of aerobic and anaerobic bacteria of clinical importance. *Revista chilena de infectología*; (2):30.

Lizarazo P, Gómez D., (2015). Rhizospheric Microbiota of *Espeletia* spp. From Santa Inés and Frontino-Urrao Paramos in Antioquia, Colombia. *Acta Biológica Colombiana*; 20(1): 175-182.

Ludueña M., Anzuay M, Magallanes C, Tonelli, Ibañez F, Angelini J, Taurian T., (2017). Effects of P limitation and molecules from peanut root exudates on pqqE gene expression and pqq promoter activity in the phosphate-solubilizing strain *Serratia* sp. S119. *Research in Microbiology*; 168(8), 710–721.

Maghraoui T., Bechtaoui N, Galiana A, Wahbi S, Duponnois R, Hafidi M, Oufdou K., (2016). Effect of inoculation by Moroccan rock phosphate-solubilizing rhizobia, Versus phosphorus fertilization, on the growth and the phosphorus uptake by *Vicia faba*. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*; 53(4), 817–826.

Mahanty T., Bhattacharjee S., Goswami M, Bhattacharyya P, Das B, Ghosh A, Tribedi P., (2016). Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. *Environmental Science and Pollution Research*; 24 (4), 3315-3335.

Maldonado N., Robledo C, Robledo J., (2018). La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Asociación Colombiana de Infectología*; 22(1): 35-45.

Mantilla C., Negrete J., (2015). Efecto de un bioinoculante a partir de consorcios microbianos nativos fosfato solubilizadores, en el desarrollo de pastos Angleton (*Dichantium aristatum*) / Effect of bio-inoculant from microbial consortia phosphate solubilizing natives in development of pastures (*Dichantium aristatum*). *Revista Colombiana de Biotecnología*; (1):122.

Manzoor M., Abbasi MK, Sultan T., (2017). Isolation of Phosphate Solubilizing Bacteria from Maize Rhizosphere and Their Potential for Rock Phosphate Solubilization–Mineralization and Plant Growth Promotion. *Geomicrobiol*; 01;34(1):81-95.

Matos A., Gomes S, Xavier A, Gomes W, Santos A, Pereira M., (2017). Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from banana trees. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*; 89(4), 2945–2954.

Merçado J., (2017). Validación de la metodología analítica para la determinación de fósforo en agua potable por espectrofotometría ultravioleta-visible-método. *Universidad de Cartagena, facultad de ciencias farmacéuticas*.

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

Moraes C., Araujo H, Factor T, Purquerio L., (2016). Fenología e acumulação de nutrientes por cebola de dia curto em semeadura direta / Phenology and nutrient uptake by short-day onion in direct seeding. *Revista de Ciências Agrárias*; (2):281.

Morgado A., Espinosa D, Gómez F., (2015). Efficiency of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in sugarcane / Eficiencia de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) en caña de azúcar. *Terra Latinoamericana*; (4):321

Motamedi H., (2016). Screening cabbage rhizosphere as a habitat for isolation of phosphate-solubilizing bacteria. *Environmental and Experimental Biology*; 14(4):173-181.

Murray P., (2012). What is new in clinical microbiology: microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry: A paper from the 2011 William Beaumont Hospital symposium on molecular pathology. *J Mol Diagnostics*; 14(5):419–23.

- Nandimath P, Karad D, Gupta G, Kharat A., (2017). Consortium inoculum of five thermo-tolerant phosphate solubilizing actinomycetes for multipurpose biofertilizer preparation. *Iranian Journal of Microbiology*; 9(5), 295–304.
- Negrulescu A, Patrulea V, Mincea MM, Ionascu C, Vlad-Oros B, Ostafe V., (2012). Adapting the Reducing Sugars Method with Dinitrosalicylic Acid to Microtiter Plates and Microwave Heating. *Journal of the Brazilian Chemical Society*; 2176-2182.
- Nishanth D, Biswas DR., (2008). Kinetics of phosphorus and potassium release from rock phosphate and waste mica enriched compost and their effect on yield and nutrient uptake by wheat (*Triticum aestivum*). *Bioresource Technology*;99(9):3342-3353.
- Norma Técnica Colombiana NTC 5843., Bioinsumos para uso agrícola. Inoculantes biológicos. Etiquetado
- Ntougias S, Besi MI, Papadopoulou KK, Kavroulakis N, Ntougias S, Katsou P, et al.,(2010). Antagonistic bacteria of composted agro-industrial residues exhibit antibiosis against soil-borne fungal plant pathogens and protection of tomato plants from *Fusarium oxysporum* f.sp *radicis-lycopersici*. *Plant Soil*; 333(1-2):233-247
- Oburger E, Jones DL, Wenzel WW., (2011). Phosphorus saturation and pH differentially regulate the efficiency of organic acid anion-mediated P solubilization mechanisms in soil. *Plant Soil* : 363.
- Ordoñez YM, Fernandez BR, Lara LS, Rodríguez A, Uribe-Vélez D, Sanders IR., (2016). Bacteria with Phosphate Solubilizing Capacity Alter Mycorrhizal Fungal Growth Both Inside and Outside the Root and in the Presence of Native Microbial Communities. *PLoS One*; 11(6):e0154438-e0154438.
- Ordoñez S, Rodríguez C, Rodríguez L., (2017). Determination of optimal conditions for obtaining phosphate fertilizer from cuban phosphoric rock. *Ingeniería y Competitividad*;19(2):131-142.
- Pagliari H, Kaiser E, Rosen C, Lamb A., (2009). The nature of phosphorus in soils. *University of Minnesota*; 1–5.
- Pande A, Pandey P, Mehra S, Singh M, Kaushik S., (2017). Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*;15(2):379-391.
- Paredes M, Espinosa D., (2010). Organic Acids Produced by Phosphate Solubilizing Rhizobacteria: A Critical Review; *Tierra latinoamericana*; 28: 61-70.
- Patiño C, Sánchez M., (2012). Aislamiento e identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos habitantes de la rizosfera de chontaduro (*B. gassipaes* kunth). *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*; 10(2), 177–187.
- Patiño C, SánchezM., (2014). Effect of rock phosphate application and inoculation with phosphate solubilizing bacteria on growth of. *Acta Agronómica*; 63(2), 136–144.
- Paul D, Sinha SN., (2017). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KUPSB12 with antibacterial potential from river Ganga, India. *Annals of Agrarian Science* ;15:130-136.

Paul R., Singh RD, Biswas DR, Patra AK, Bhattacharyya R, Arunkumar K., (2018) Phosphorus dynamics and solubilizing microorganisms in acid soils under different land uses of Lesser Himalayas of India. *Agrofor Syst* ;92(2):449-461.

Pinilla S., Sarmiento M., (2010). Aplicación de insumos biológicos: una oportunidad para la agricultura sostenible y amigable con el medioambiente. *Rev. Colomb.biotechnol*; 12(1), 4–7.

Pôrto D., Cecílio A, Mayo A, Vargas P.,(2007). La acumulación de macronutrientes por cultivar cebolla Superex establecida por siembra directa. *Ciencia Rural* ; 37: 949-955.

Posada R. H., Sánchez de Prager, M., Sieverding, E., Aguilar Dorantes, K. y Heredia Abarca, G., (2012). Relaciones entre los hongos filamentosos y solubilizadores de fosfatos con algunas variables edáficas y el manejo de cafetales. *Revista de Biología Tropical*; 60 (3), 1075-1096.

Posso S., Prager S., (2017). Production of organic acids by rhizosphere microorganisms isolated from a Typic Melanudands and its effects on the inorganic phosphates solubilization. *Acta Agronómica*; 66(2), 241–247.

Prabhu N., Garg S, Borkar S., (2018). Phosphate solubilization mechanisms in alkaliphilic bacterium *Bacillus marisflavi* FA7. *Current Science*; 114(4):845-853.

Ramírez L., Gálvez Z, Burbano V., (2014). Solubilization of phosphates: an important microbial function in plant development. *Nova*; 12(21).

Reyes I., Valery A, Valduz Z., (2006). Phosphate- solubilizing microorganism isolated of rhizospheric and bulk soils of colonizer plants at an abandoned rock phosphate mine. *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*; 102: 69-75.

Renneson M., Barbieux S, Colinet G., (2016). Indicators of phosphorus status in soils: significance and relevance for crop soils in southern Belgium. A review. *Biotechnology Agronomic Social Environ*; 6 20(S1), 257-272.

Resende M., Costa N, Yuri J., (2011). Efeito de doses de fósforo na produtividade e armazenamento pós-colheita de dois cultivares de cebola. *Ceres*;249–255.

Richardson A & Simpson R., (2011). Soil microorganisms mediating phosphorus availability. *Plant Physiol*; 156: 989–996.

Rodríguez H., Fraga R., (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*; 17(4-5):319-339.

Roy E., (2017). Phosphorus recovery and recycling with ecological engineering: A review. *Ecological Engineering*; 98:213-227.

Sánchez D., Gómez M, Garrido M, Bonilla R.,(2012). Inoculation with plant growth promoting bacteria on tomato under greenhouse conditions. *Revista Mexicana de ciencias agrícolas*; 3(7).

Satrani B., Ouadihi N, Guedira A, Frey-Klett P, Mustapha A, Garbaye J., (2009). “Effet de la bacterisation des graines ´ sur la croissance des plants de *Cedrus atlantica* Manetti,” *Biotechnologie, Agronomie, Societ ´ e et Environnement*; vol. 13, no. 3, pp. 367–372.

- Sashidhar B, Podile R., (2010). Mineral phosphate solubilization by rhizosphere bacteria and scope for manipulation of the direct oxidation pathway involving glucose dehydrogenase. *Journal of Applied Microbiology*; 109(1), 1–12.
- Sharma S, Sayyed R, Trivedi M, Gobi T., (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*; 2(1):587.
- Sharon A, Hathwaik L, Glenn G, Imam S, Lee C., (2016). Isolation of efficient phosphate solubilizing bacteria capable of enhancing tomato plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*; 160–0.
- Shi K, Ma J, Liu L., (2017). Effects of phosphate-solubilizing bacteria application on soil phosphorus availability in coal mining subsidence area in shanxi. *Journal of Plant Interactions*; 12(1), 137–142.
- Siddiga A, Rehman Y, Hasnain S., (2016). Rhizoplane microbiota of superior wheat varieties possess enhanced plant growth-promoting abilities. *Frontiers in Biology*; 12;11(6):481.
- Silveston L, Budman H, Jervis E., (2008). Forced modulation of biological processes: A review. *Chemical Engineering Science*; 63: 5089 -5105
- Solanki P, Yadav H, Gothwal RK, Solanki PS, Nehra S, Sinha-Roy S, et al., (2015). Isolation and Characterization of Thermo- tolerant Phosphate- Solubilizing Bacteria From a Phosphate Mine and Their Rock Phosphate Solubilizing Abilities. *Geomicrobiol J*; 32(6):475-481.
- Someya N, Nakajima M, Akutsu K., (2005). Potential of an antagonistic bacterium *Serratia marcescens* strain B2 for the biological control of cucumber damping-off disease. *Biocontrol Sci*; 10:101–104
- Spain A, Krumholz L, Elshahed M., (2009). Abundance, composition, diversity and novelty of soil Proteobacteria. *ISME J*; 3:992-1000.
- Sreenivasulu B, Chalapathi K, Paramageetham C, Babu P., (2014). Original Research Article In Vitro phosphate solubilization abilities of three indigenous bacteria isolated from Muscovite mine, 3(8), 135–143.
- Stahr S, Graf-Rosenfellner M, Klysubun W, Mikutta R, Prietzel J, Lang F., (2017). Phosphorus speciation and C:N:P stoichiometry of functional organic matter fractions in temperate forest soils. *Plant Soil*: 1-17
- Sun H, Wu Y, Yu D, Zhou J., (2013). Altitudinal Gradient of Microbial Biomass Phosphorus and Its Relationship with Microbial Biomass Carbon, Nitrogen, and Rhizosphere Soil Phosphorus on the Eastern Slope of Gongga Mountain, SW China. *PLoS ONE*; 8(9):1-10
- Swati T, Das A, Chandra A, Varma A., (2015). Development of carrier-based formulation of root endophyte *Piriformospora indica* and its evaluation on *Phaseolus vulgaris* L. *World J Microbiol Biotechnol*; 31:337-344.
- Tamreihao K, Ningthoujam DS, Nimaichand S, Singh ES, Reena P, Singh SH, et al., (2016). Biocontrol and plant growth promoting activities of a *Streptomyces corchorusii* strain UCR3-16 and preparation of powder formulation for application as biofertilizer agents for rice plant. *Microbiological Research*; 192:260-270.

Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, Lomsadze A, Pruitt KD, Borodovsky M, Ostell J., (2016). NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res*;44(14):6614-24.

Thakur D, Kaushal R, Shyam V., (2014). Phosphate solubilising microorganisms: role in phosphorus nutrition of crop plants-A review. *Agricultural Reviews* ; 35(3):159.

Tiecher T, Santos R, Calegari A., (2012). Soil organic phosphorus forms under different soil management systems and winter crops, in a long term experiment. *Soil and Tillage Research*; 124, 57–67.

Torres O, Reyes O., (2014). Los microorganismos solubilizadores de fósforo (Msf): Una alternativa Biotecnológica para una agricultura Sostenible. *Revista Entramado*; 288-297.

Tyc O, Song C, Dickschat J, Vos M, Garbeva P., (2017). The Ecological Role of Volatile and Soluble Secondary Metabolites Produced by Soil Bacteria. *Trends in Microbiology*; 25(4), 280–292.

Van Dijk K, Nelson EB., (2000). Fatty acid competition as a mechanism by which *Enterobacter cloacae* suppresses *Pythium ultimum* sporangium germination and dampingoff. *Appl Environ Microbiol*; 66:5340–5347.

Vassilev N, Mendes G, Costa M, Vassileva M., (2014). Biotechnological Tools for Enhancing Microbial Solubilization of Insoluble Inorganic Phosphates. *Geomicrobiology Journal*; 31(9), 751–763.

Velineni S, Velineni S, Brahmaprakash P.,(2011). Survival and Phosphate Solubilizing Ability of *Bacillus megaterium* in Liquid Inoculants under High Temperature and Desiccation Stress. *Journal of Agricultural Science and Technology*;13(5):795-802.

Vessey JK., (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*; 255: 571–86.

Viruel E, Lucca M.E., Siñeriz F., (2011). Plant growth promotion traits of phosphobacteria isolated from Puna, Argentina. *Arch. Microbiol*; 193, 489-496.

Walpola C, Yoon M., (2013). In vitro solubilization of inorganic phosphates by phosphate solubilizing microorganisms. *African Journal of Microbiology Research*, 7(27), 3534–3541.

Wang C, Cui J, Yang L, Zhao C, Wang T, Yan L, Liu S., (2018). Phosphorus-Release Dynamics by Phosphate Solubilizing Actinomycetes and its Enhancement of Growth and Yields in Maize, 437–444.

Wang Q, Garrity, J. M. Tiedje, and J. R. Cole., (2007). Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl Environ Microbiol*; 73(16):5261-5267

Wang Y, Zhang H, Tang J, Xu J, Kou T, Huang H., (2015). Accelerated phosphorus accumulation and acidification of soils under plastic greenhouse condition in four representative organic vegetable cultivation sites. *Scientia Horticulturae*; 195(Supplement C):67-73.

Werra P, Péchy M, Keel C, Maurhofer M., (2009). Role of Gluconic Acid Production in the Regulation of Biocontrol Traits of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Applied and Environmental Microbiology*; 45:4162-4174.

Wei Y, Zhao Y, Shi M, Cao Z, Lu Q, Yang T, et al.,(2018). Effect of organic acids production and bacterial community on the possible mechanism of phosphorus solubilization during composting with enriched phosphate-solubilizing bacteria inoculation. *Bioresource Technology*;247:190-199

Xiao C, Chi R, Pan X, Liu F, He J., (2013). Rock phosphate solubilization by four yeast strains. *Ann Microbiol*; 63: 173--178.

Zambrano M, Bonilla R, Avellaneda L, Zambrano G., (2015). Análisis prospectivo de los bioinsumos agrícolas en Colombia: una consulta a expertos. *Revista Colombiana de Biotecnología*; 17(2), 103–113.

Zeng Q, Wu X, Wang J, Ding X., (2017). Phosphate solubilization and gene expression of phosphate-solubilizing bacterium *Burkholderia multivorans* WS-FJ9 under different levels of soluble phosphate. *J. Microbiol. Biotechnol*; 27(4), 844–855

Zhang Y, Zhao Y, Chen Q, Lu M, Li X, Wang Y, Wei X, Xie Z, Wei A.,(2016). Regulating method for reducing nitrogen loss based on enriched ammonia-oxidizing bacteria during composting *Bioresour. Technol*; 22; 276-283.

Zheng B, Muhammad I, Zhang D, Qing-Fang B, Li H, Zhou G, Ding K ,Peñuelas J, Zhu Y , Yang X., (2018). Identification and characterization of inorganic-phosphate-solubilizing bacteria from agricultural fields with a rapid isolation method. *AMB Express*; 8:47; 2-12.

Zhu J, Li M, Whelan M., (2018). Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review. *Science of The Total Environment* ; 612:522-537.