



**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA  
Y PARASITOLOGÍA**



**“Caracterización de los géneros *Burkholderia* y *Pseudomonas*  
solubilizadoras de fosfato aisladas de *Zea mays* L. en el distrito  
de Reque en Lambayeque, Marzo-mayo, 2014”**

**TESIS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN  
BIOLOGÍA MICROBIOLOGÍA – PARASITOLOGÍA**

**PRESENTADO POR:**

**Br. Pamela Lizeth Alvarado Montalvo**

**Br. Mayra Yajayda Valderrama Ayén**

**LAMBAYEQUE, PERÚ**

**2014**

**“Caracterización de los géneros *Burkholderia* y *Pseudomonas* solubilizadoras de fosfato aisladas de *Zea mays* L. en el distrito de Reque en Lambayeque, Marzo-mayo, 2014”**

**TESIS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN  
BIOLOGÍA MICROBIOLOGÍA – PARASITOLOGÍA**

**APROBADO POR:**

Dr. Eduardo Julio Tejada Sánchez

**PRESIDENTE**

\_\_\_\_\_

Dra. Consuelo Rojas Idrogo

**SECRETARIO**

\_\_\_\_\_

Dra. Gianina Llontop Barandiaran

**VOCAL**

\_\_\_\_\_

Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán

**PATROCINADORA**

\_\_\_\_\_

**LAMBAYEQUE, PERÚ**

**2014**

## Índice

I.	INTRODUCCIÓN .....	1
II.	ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS .....	3
	2.1 Antecedentes de la investigación .....	3
	2.2 Marco teórico.....	7
III.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	10
	3.1 Material .....	10
	3.1.1 Material biológico .....	10
	3.1.2 Población y muestra de estudio .....	10
	3.2 Métodos .....	10
	3.2.1 Variables en estudio .....	10
	3.2.2 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis .....	11
	3.2.3 Lugar de muestreo .....	11
	3.2.4 Obtención de muestras de suelo rizosférico .....	11
	3.2.5 Aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfato .....	18
	3.2.6 Identificación y mantenimiento de <i>Burkholderia</i> y <i>Pseudomonas</i> spp. .	18
	3.2.7 Determinación del índice de solubilización de fosfato en medio sólido.	25
	3.2.8 Cuantificación de fósforo soluble en medio líquido .....	30
	3.2.9 Análisis de datos .....	30
IV.	RESULTADOS.....	33
	4.1 Bacterias solubilizadoras de fosfato aisladas .....	33
	4.2 Especies de <i>Burkholderia</i> y <i>Pseudomonas</i> identificadas.....	40
	4.3 Índice de solubilización en agar NBRIP con tres fuentes de fósforo inorgánico .....	40

4.4 Fósforo soluble en medio NBRIP líquido.....	45
V. DISCUSIÓN.....	51
VI. CONCLUSIONES.....	57
VII. RECOMENDACIONES.....	58
VIII. RESUMEN.....	59
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
X. ANEXOS.....	67

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b>	Posición de los puntos de muestreo de suelo rizosférico de <i>Zea mays</i> L. en Reque, durante marzo-mayo de 2014.....	13
<b>Tabla 2.</b>	Análisis físico- químico de suelo rizosférico de cultivos de <i>Zea mays</i> L. en Reque, Lambayeque, 2014.....	17
<b>Tabla 3.</b>	Diámetro (mm) del halo de solubilización de fosfato de bacilos Gram negativos después de dos subcultivos en agar SRSM-fosfato dicálcico.....	37
<b>Tabla 4.</b>	Diámetro (mm) del halo de solubilización de fosfato de bacilos Gram negativos después de dos subcultivos en agar NBRIP-fosfato tricálcico .....	38
<b>Tabla 5.</b>	Características diferenciales de especies de <i>Burkholderia</i> y <i>Pseudomonas</i> spp. solubilizadoras de fosfato, identificadas en suelo rizosférico de <i>Zea mays</i> L. en Lambayeque, 2014.....	41
<b>Tabla 6.</b>	Frecuencia de especies de <i>Burkholderia</i> y <i>Pseudomonas</i> solubilizadoras de fosfato identificadas en suelo rizosférico de <i>Zea mays</i> L.....	42
<b>Tabla 7.</b>	Rango del área de solubilización por <i>Burkholderia</i> y <i>Pseudomonas</i> spp. nativas en agar NBRIP – fosfato dicálcico .....	44
<b>Tabla 8.</b>	Rango del área de solubilización por <i>Burkholderia</i> y <i>Pseudomonas</i> spp. nativas en agar NBRIP – fosfato tricálcico .....	44

<b>Tabla 9.</b>	Rango del índice de solubilización por <i>Burkholderia</i> y <i>Pseudomonas</i> spp. nativas en agar NBRIP – fosfato dicálcico .....	44
<b>Tabla 10.</b>	Rango del índice de solubilización por <i>Burkholderia</i> y <i>Pseudomonas</i> spp. nativas en agar NBRIP – fosfato tricálcico.....	44
<b>Tabla 11.</b>	Prueba de kruskal Wallis del índice de solubilización de fosfato por <i>Burkholderia</i> y <i>Pseudomonas</i> spp. aisladas de la rizósfera de <i>Zea mays</i> L.....	46
<b>Tabla 12.</b>	Rango de fósforo soluble en caldo NBRIP cultivado con <i>Burkholderia</i> y <i>Pseudomonas</i> spp. ....	47
<b>Tabla 13.</b>	Prueba de kruskal Wallis del fósforo soluble en caldo NBRIP cultivado con <i>Burkholderia</i> y <i>Pseudomonas</i> spp. aisladas de la rizósfera de <i>Zea mays</i> L.....	48
<b>Tabla 14.</b>	Fósforo soluble (ppm) en medio líquido cultivado con <i>Burkholderia</i> y <i>Pseudomonas</i> spp. seleccionadas por alcanzar los mayores índices de solubilización .....	49
<b>Tabla 15.</b>	Índice de solubilización de <i>Burkholderia</i> y <i>Pseudomonas</i> spp. seleccionadas por alcanzar las mayores concentraciones (ppm) de fósforo soluble.....	50

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b>	Ubicación del lugar de muestreo en el distrito de Reque, provincia de Chiclayo, región Lambayeque, mayo, 2014 ( <a href="https://www.google.com.pe/maps/">https://www.google.com.pe/maps/</a> ).....	12
<b>Figura 2.</b>	Ubicación de los puntos de muestreo de suelo rizosférico de <i>Zea mays</i> L. en Reque, durante marzo – mayo de 2014. ....	14
<b>Figura 3.</b>	Cultivo de <i>Zea mays</i> L. en floración.....	15
<b>Figura 4</b>	Extracción de suelo rizosférico de <i>Zea mays</i> L.....	15
<b>Figura 5.</b>	Muestras de suelo rizosférico de <i>Zea mays</i> L.....	16
<b>Figura 6.</b>	Deshidratado de muestras de suelo rizosférico de <i>Zea mays</i> L.....	19
<b>Figura 7.</b>	Pesado de muestra de suelo rizosférico de <i>Zea mays</i> L..	19
<b>Figura 8.</b>	Diluciones $10^{-1}$ de suelo rizosférico en solución salina....	20
<b>Figura 9.</b>	Agitación manual de diluciones de suelo rizosférico.....	20
<b>Figura 10.</b>	Diluciones $10^{-2}$ de suelo rizosférico.....	21
<b>Figura 11.</b>	Siembra de dilución de suelo rizosférico en agar NBRIP.....	21
<b>Figura 12.</b>	Colonias de bacterias con zonas transparentes alrededor.....	22
<b>Figura 13.</b>	Observación microscópica (1000x) de bacilos Gram negativos.....	22
<b>Figura 14.</b>	Cultivos de bacilos Gram negativos solubilizadores de fosfato.....	23

<b>Figura 15.</b>	Bacterias cultivadas por segunda vez en agar NBRIP....	23
<b>Figura 16.</b>	Prueba de oxidasa en tira reactiva.....	24
<b>Figura 17.</b>	Motilidad de bacterias en medio SIM.....	24
<b>Figura 18.</b>	Prueba de fermentación de carbohidratos en TSI.....	26
<b>Figura 19.</b>	Prueba de susceptibilidad a la polimixina-B de <i>Pseudomonas</i> sp.....	26
<b>Figura 20.</b>	Pigmentos fluorescentes de <i>Pseudomonas</i> spp.....	27
<b>Figura 21.</b>	Cultivos de <i>Burkholderia</i> y <i>Pseudomonas</i> spp. solubilizadoras de fosfato.....	27
<b>Figura 22.</b>	<i>Pseudomonas</i> spp. cultivadas en agar NBRIP con fosfato dicálcico (a), tricálcico (b) y roca fosfórica de Bayóvar (c).....	28
<b>Figura 23.</b>	Medición del diámetro de la colonia bacteriana y halo de solubilización.....	29
<b>Figura 24.</b>	Inoculación de <i>Pseudomonas</i> sp. en caldo NBRIP con fosfato tricálcico.....	31
<b>Figura 25.</b>	Centrifugación de submuestra de caldo NBRIP con fosfato tricálcico.....	31
<b>Figura 26.</b>	Coloración observada en la cuantificación de fósforo soluble por el método colorimétrico del molibdato.....	32
<b>Figura 27.</b>	Bacterias Gram positivas y Gram negativas solubilizadoras de fosfato aisladas de suelo rizosférico de <i>Zea mays</i> L.....	34

<b>Figura 28.</b>	Bacterias solubilizadoras de fosfato aisladas en agar NBRIP con fosfato tricálcico.....	34
<b>Figura 29.</b>	Bacterias solubilizadoras de fosfato aisladas en agar SRSM con fosfato dicálcico.....	35
<b>Figura 30.</b>	Bacilos y cocos Gram negativos solubilizadores de fosfato aislados de suelo rizosférico de <i>Zea mays</i> L.....	35
<b>Figura 31.</b>	Frecuencia de bacilos y cocos Gram negativos solubilizadores de fosfato aislados en agar NBRIP y SRSM.....	36
<b>Figura 32.</b>	Halos de solubilización de <i>Pseudomonas</i> spp. en agar NBRIP con fosfato dicálcico.....	42
<b>Figura 33.</b>	Halos de solubilización de <i>Pseudomonas</i> spp. en agar NBRIP con fosfato tricálcico.....	43
<b>Figura 34.</b>	Colonias de <i>Pseudomonas</i> spp. en agar NBRIP con roca fosfórica de Bayóvar.....	43

## I. INTRODUCCIÓN

El fósforo es un nutriente inorgánico esencial para los vegetales (Coyne, 2000). Los suelos agrícolas contienen reservas de fósforo; no obstante, su disponibilidad para las plantas es limitada, debido a los procesos que “fijan” el fósforo soluble en formas insolubles, no aptas para la nutrición vegetal. En suelos con pH inferior a 5,5 se establece un enlace con las arcillas a través de puentes catiónicos y precipitan los fosfatos de aluminio y hierro, mientras que en suelos alcalinos (pH 7,5 - 8,5), precipitan los fosfatos de calcio (Lara *et al.*, 2011). La deficiencia de fósforo en los cultivos se manifiesta con escaso vigor, retraso y falta de crecimiento, floración tardía y deficiente, fallas en la fecundación y cuajado de frutos, retraso en la maduración y escasa calidad de frutos (Gonzales, 2001).

Para satisfacer los requerimientos de P de los cultivos agrícolas como *Zea mays* L. “maíz” se aplican fertilizantes químicos fosforados; sin embargo, los costos de producción se incrementan porque las reservas mundiales no renovables se encuentran en agotamiento (Cordero *et al.*, 2008), la eficiencia de recuperación o porcentaje del nutriente aplicado que es absorbido por la planta es un promedio 30% (SAGARPA, 2010) y el fertilizante no utilizado se pierde por los procesos de fijación (Cordero *et al.*, 2008). El término “fijación” hace referencia a la transformación de los fosfatos del suelo a formas no asimilables a través de dos mecanismos: El primero incluye la formación de fosfato de calcio y adsorción a la superficie de las partículas del suelo y el segundo, que es el más importante es la

adsorción por óxidos de hierro, hidróxidos, minerales y diversos complejos de aluminio y hierro (Aguado, 2012).

Los fosfatos inorgánicos insolubles pueden ser incorporados al ecosistema, a través del proceso microbiano de solubilización de fosfatos. Las bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) como *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. mediante la acción quelante de ácidos orgánicos, reducción de hierro y acidificación, desestabilizan los minerales, liberando fósforo soluble, que puede ser aprovechado (Cordero *et al.*, 2008; Becerra *et al.*, 2011; Alvarez, 2012). El estudio de estas bacterias requiere en un inicio su aislamiento y caracterización en condiciones de laboratorio, para después determinar su efecto en invernadero y campo, con la perspectiva de obtener un inoculante comercial.

*Burkholderia* y *Pseudomonas* son bacterias ubicuas, que sobreviven en condiciones adversas y se desarrollan rápidamente en sustratos fácilmente disponibles y económicos, características que permiten su incremento masivo para su aplicación en los cultivos agrícolas. Los cultivos de maíz serán favorecidos con la aplicación de *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. solubilizadoras de fosfato, incrementándose el desarrollo vegetativo y rendimiento con prácticas amigables con el ambiente.

Por lo expuesto, se planteó el siguiente problema: ¿Cuáles son las características de los géneros *Burkholderia* y *Pseudomonas* solubilizadores de fosfato aisladas de *Zea mays* L. “maíz” en el distrito de Reque en Lambayeque?. Para resolver este problema el objetivo general fue: Determinar las características de *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. solubilizadoras de fosfato, aisladas de suelo rizosférico de cultivos de maíz. Los objetivos específicos fueron: aislar bacterias solubilizadoras de fosfato, identificar fenotípicamente los géneros *Burkholderia* y *Pseudomonas*, determinar el índice de solubilización en agar NBRIP con tres fuentes de fósforo inorgánico y cuantificar el fósforo soluble en medio NBRIP líquido. La hipótesis planteada fue: *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. aisladas de suelo rizosférico de maíz solubilizan fosfato *in vitro*, obteniéndose índices de solubilización en medio sólido y fósforo soluble en medio líquido.

## II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

### 2.1 Antecedentes de la investigación

Considerando la importancia del fósforo para el óptimo desarrollo de las plantas se realizó una investigación para caracterizar microorganismos solubilizadores de fosfato. Se tomaron muestras de rizósfera, rastros, malezas y materia orgánica en descomposición, las cuales previa dilución en solución salina (NaCl 0,85%, p/v) se sembraron en medio SMRS1. Después de la incubación a 30°C, por 72 horas, se seleccionaron 61 colonias bacterianas con halo de solubilización, de las que 93% correspondió a bacilos Gram negativos. En medio NBRIP, después de 7 días, se determinó un rango de 1,5-4,2 mm en el índice de solubilización (IS), presentando los mayores valores *Burkholderia cepacia*, *Pantoea* sp., *Pseudomonas putida*, *P. luteola*, *Aeromonas hydrophila* y *Enterobacter* sp. (Lara et al., 2011).

En raíces de *Avicennia germinans* “manglares negros” y *Laguncularia racemosa* “manglares blancos” se aislaron bacterias solubilizadoras de fosfato identificadas como *Paenibacillus macerans*, *Vibrio proteolyticus*, *Xanthobacter agilis*, *Enterobacter aerogenes*, *E. taylorae*, *E. asburiae*, *Kluyvera cryocrescens*, *Chryseomonas luteola* y *Pseudomonas stutzeri*. La actividad solubilizadora se demostró por halos transparentes formados alrededor de las colonias desarrolladas en medio sólido con fosfato tribásico de calcio. El

análisis de cromatografía de gases de cultivos libres de células demostró la presencia de once ácidos orgánicos volátiles y no volátiles, entre los que mayoritariamente se identificaron los ácidos láctico, succínico, isovalérico, isobutírico y acético. Asimismo, se determinó que la mayoría de las bacterias sintetizaron más de un ácido orgánico, concluyéndose que su producción por las bacterias rizosféricas de manglares es el mecanismo involucrado en la solubilización de fosfatos insolubles (Vázquez *et al.*, 2000).

Con el objetivo de aprovechar eficientemente el fósforo del suelo, se seleccionaron microorganismos solubilizadores de fosfato en suelos calcáreos. Se colectaron muestras de los primeros 30 cm de suelos cultivados con papa, cebada, avena y leguminosas, manejados bajo un sistema de rotación. Los microorganismos se aislaron en agar Pikovskaya con  $1000 \text{ mgL}^{-1}$  de P inorgánico, correspondientes a  $5 \text{ gL}^{-1}$  de fosfato tricálcico o  $7,6 \text{ gL}^{-1}$  de roca fosfórica de Bayóvar. Se obtuvieron 13 bacterias y 7 hongos, cuyos rangos fueron de 1,13 – 3,05 en el índice de solubilización y  $1,2 - 310,4 \text{ mm}^2$  en el área del halo de solubilización. Los microorganismos con los mayores valores se identificaron como *Bacillus*, *Clostridium* y *Pseudomonas* sp. En medio líquido *Clostridium* sp. alcanzó  $429 \text{ mg P L}^{-1}$ ;  $31,69 \text{ meq L}^{-1}$  de acidez titulable y el pH disminuyó de 6,9 a 4,1 (Alvarez, 2012).

La especie nativa *Bactris gasipaes kunth* está adaptada a condiciones de alta acidez y deficiencia de nutrientes, especialmente fósforo, por lo que constituye una fuente de aislamiento de microorganismos solubilizadores de fosfato, que suplen entre otros, los requerimientos de las plantas. En plantas con edad productiva se colectaron muestras de suelo rizosférico, se diluyeron y se sembraron en medio Pikovskaya, obteniéndose 22 bacterias solubilizadoras de fosfato tricálcico. El 31,8% de los aislados conservaron su capacidad solubilizadora, después de cinco subcultivos, alcanzando 1,65-8,01 en el índice de eficiencia de solubilización de fosfato. El análisis filogenético demostró similitud con *Burkholderia ambifaria*, *Burkholderia* sp. y *Pseudomonas putida* (Patiño & Sánchez, 2012).

Se realizó un estudio para caracterizar 36 bacterias solubilizadoras de fosfato, BSP, aisladas de la rizósfera y rizoplano de maíz. La eficiencia de solubilización de fosfato se investigó en medio NBRIP-BPB con fosfato tricálcico, alcanzando los valores máximos 326,67% con *B. gladioli*; 220% con *B. cepacia*; 330% con *E. cloacae*; 260% con *P. fluorescens*, 141% con *P. agglomerans* y 310% con una bacteria no identificada. Para la caracterización genética, se seleccionaron las tres bacterias con los mayores valores. El dendograma indicó la existencia de una diversidad bacteriana y la secuencia del gen ARNr 16S de los aislados BUAp29 y BUA p36 mostró 99% de identidad con las secuencias del ARNr 16S reportadas por “Genbank” para *Bulkholderia* sp. y *B. gladioli* y para CP08 con *Advenella incenata*, una nueva especie de la familia Alcaligenacea, reportada por primera vez como solubilizadora de fosfato (Espinoza et al., 2009).

La capacidad solubilizadora de fosfato se investigó en *Pantoea* sp, una bacteria endofítica aislada del tallo de caña de azúcar. En el centro de placas de Petri con medio NBRIP sólido se inocularon 10  $\mu$ L de una suspensión de células de *Pantoea* sp. ( $10^8$  ufc mL<sup>-1</sup>). Después de la incubación a 30°C, los halos de solubilización presentaron un tamaño máximo de 6 mm, a las 172 horas. A su vez, en medio líquido se determinó que la concentración de P solubilizado fue 1128  $\mu$ g P mL<sup>-1</sup> a las 167 horas de cultivo y el pH disminuyó de 7 a 4,65. Esta bacteria sobrevivió durante 35 días en un sustrato preparado con mezcla de vermiculita y suelo ferralítico rojo, alcanzando  $3,3 \times 10^{18}$  ufc g<sup>-1</sup>, resultado, que se suma a su potencial como promotora del crecimiento de plantas (Cordero et al., 2008).

El género *Azotobacter* y actinomicetos aislados de cultivos de *Solanum tuberosum* L. “papa” de zonas altoandinas fueron investigados en su capacidad promotora del crecimiento vegetal. Se colectaron muestras de suelo rizosférico, se diluyeron en agua peptonada y se sembraron en medio mineral suplementado con púrpura de bromocresol y agar almidón caseína, obteniéndose 62 cultivos de *Azotobacter* spp. y 45 de actinomicetos. La solubilización de fosfato se investigó en medio NBRIP con fosfato tricálcico. En medio sólido se

seleccionaron las colonias con halo transparente alrededor y en medio líquido se midió el pH durante 12 días. El 46,7% de *Azotobacter* spp. y el 11% de actinomicetos solubilizaron fosfato, con halos que presentaron áreas de 0,11-5,43 y 0,13-0,35 cm<sup>2</sup>, respectivamente. En medio líquido el pH inicial de 7 disminuyó hasta 4,4 en *Azotobacter* sp. y 5,5 con los actinomicetos (Rico, 2009).

Con el objetivo de aislar y caracterizar microorganismos solubilizadores de fosfato, se colectaron muestras de suelo cultivado con *Physalis peruviana* L. “uchuwa”. Las muestras se enriquecieron en caldo SRSM, se diluyeron en agua peptonada 0,1% (p/v) hasta 10<sup>-8</sup> y se sembraron en la superficie de agar SRSM por el método de microgota. Con los microorganismos aislados se realizó la prueba cualitativa de solubilización de fosfato, para lo cual 50 µL de cada cultivo fueron depositados en anillos de 5 mm de diámetro sobre agar SRSM incubándose a 35°C por 48 horas. Se consideraron solubilizadores de fosfato aquellos microorganismos con índice de solubilización mayor de 2,3 y mediante sistemas API se identificaron *Candida famata*, *Aeromonas hydrophila* y *Rohnella aquatilis* (Becerra et al., 2011).

Con el objetivo de seleccionar microorganismos con potencial biofertilizante, se aislaron 15 bacterias acidolácticas y 30 actinomicetos en suelos cultivados con *Musa paradisiaca* “plátano”. Se investigó la solubilización de fosfato en agar SRSM y agar Pikovskaya, con fosfato tricálcico, Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, como fuente de fósforo inorgánico. En medio sólido, se observaron halos de solubilización o zonas transparentes alrededor de las colonias y halos de acidificación, con viraje del indicador. A su vez, en medio líquido, se determinó la concentración de fósforo solubilizado, siendo de 2,718 – 340,769 ppm con las bacterias acidolácticas y 3,1 – 95,4 ppm con los actinomicetos. La secuenciación del gen ARNr16S identificó *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Streptomyces ansochromogenes*, *S. bikiniensis*, *S. hygroscopicus* y *S. diastatochromogenes* (Otero, 2011).

El fósforo es uno de los nutrientes más limitantes en el crecimiento de las plantas, por la que se realizó una investigación de *Bacillus* solubilizadores de

fosfatos asociados al cultivo de arroz. Para el aislamiento, según el modelo Microcosmos, se tomaron raíces y parte aérea de plántulas de arroz de 14 días. Con el suelo rizosférico se obtuvieron diluciones, así como también, con raíces y hojas previamente desinfectadas y maceradas. En ambos casos, las diluciones se calentaron a 80°C, se sembraron en agar tripticosa soya y se incubaron a 37°C, por 24 horas. Se aislaron 58 morfotipos de *Bacillus*, 36 de la rizósfera y 20 endófitos de raíces y hojas. El 29,31 % de las bacterias solubilizó fosfato en el medio sólido NBRIP, observándose una zona clara alrededor de las colonias. En medio líquido las concentraciones de fósforo soluble fue de 0,23 – 11,58 mg L<sup>-1</sup>, determinándose el potencial de *Bacillus* spp. para la estimulación del crecimiento vegetal (Tejera *et al.*, 2013).

## **2.2 Marco teórico**

### **a. Fósforo como nutriente elemental**

El fósforo es elemento estructural de ácidos nucleicos y fosfolípidos, componentes esenciales de la membrana celular. En las plantas, el fósforo (P) es uno de los 17 nutrientes esenciales para su crecimiento, promueve el desarrollo de raíces, índice de área foliar (IAF), floración y adelanta la maduración. Su deficiencia imposibilita a la planta completar normalmente los procesos metabólicos. Los dos momentos críticos para su aplicación son la germinación, para favorecer un rápido crecimiento radicular y la pre-floración, cuando comienza la actividad metabólica asociada a la fecundación y se inicia el llenado de los granos. El fósforo junto con el zinc, son en definitiva, los que regulan la cantidad y calidad de la floración (Gaspár & Tejerina, 2012).

En general, los suelos agrícolas contienen buenas reservas de fósforo como consecuencia de la aplicación regular de fertilizantes, pero su disponibilidad para la planta es escasa debido a los procesos químicos que "fijan" el fósforo soluble de los fertilizantes en formas insolubles no aptas para la nutrición vegetal. El fósforo se encuentra en los suelos tanto en formas orgánicas como inorgánicas. Las plantas absorben el fósforo casi exclusivamente en la forma soluble,

representadas por aniones fosfatos, generalmente  $\text{HPO}_4^{-2}$  y  $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$  (Fernández & Rodríguez, 2005). Cuando el fósforo disponible es limitado, el aspecto de las hojas y la morfología se modifican, observándose hojas más pequeñas y densas, con mayor concentración de carbohidratos de reserva, especialmente almidón, menor crecimiento de la raíz y tallos más delgados con menos ramificaciones (Apáes *et al.*, 2013).

Cuando se aplica un fertilizante químico al suelo, el P soluble puede o no llegar a la fracción de fósforo en solución. En el primer caso, la fracción de P en solución se incrementa, promoviendo el flujo hacia la fracción lábil, en la cual prácticamente queda adsorbido todo el P incorporado a la solución. Paralelamente se produce una gradiente de concentración con la fracción no lábil, comenzando un flujo lento de difusión vía intrapartículas vinculado a procesos de adsorción. Asimismo, dependiendo del pH y de la concentración de iones en la solución suelo, otra parte del P aplicado se precipita. Finalmente, una tercera parte del fósforo es inmovilizado, al pasar a la materia orgánica como mecanismo propio de los microorganismos (Tisdale *et al.*, 1993).

#### **b. Solubilización microbiana de fosfato**

La disminución del pH es el principal mecanismo microbiológico por el cual los compuestos fosfatados son solubilizados (Lara *et al.*, 2011). La acidificación se produce por liberación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, cuyas propiedades quelantes favorecen la formación de complejos insolubles con los metales, con la consecuente liberación del fosfato (Fernández *et al.*, 2005).

Los ácidos orgánicos de bajo peso molecular provienen del metabolismo de compuestos de alto peso molecular como carbohidratos, péptidos y lípidos (Baziramakenga *et al.*, 1995; Paredes *et al.*, 2010). Esos ácidos son producidos en el periplasma de muchas bacterias Gram negativas a través de la ruta de oxidación directa de la glucosa (DOPG, por sus siglas en inglés direct oxidation pathway of glucose), cuyo papel fisiológico es aún desconocido (Pérez *et al.*, 2007). Las enzimas de esta ruta, la quinoproteína glucosa deshidrogenasa (GDH) y la gluconato deshidrogenasa (GADH) están orientadas en la cara exterior de la

membrana citoplasmática, los ácidos orgánicos difunden libremente hacia el exterior de las células y liberan fósforo soluble a partir de fosfatos minerales (Pérez *et al.*, 2007).

Se ha determinado que la limitación de P resulta en la inducción de la glucosa deshidrogenasa (GDH), enzima involucrada en el metabolismo oxidativo de la glucosa, la cual se cree que conduce el proceso de solubilización en bacterias Gram negativas (Muleta *et al.*, 2013). La actividad de la GDH aumenta cinco veces en limitación de P y se correlaciona con una disminución del pH del medio de cultivo. Se ha reportado al ácido glucónico como el agente más frecuente en la solubilización de fosfatos, producido por *Pseudomonas* spp. y *Burkholderia cepacia*. Otro ácido orgánico producido por bacterias solubilizadoras de fosfato es el ácido 2-cetoglucónico sintetizado por *Rhizobium leguminosarum* y *Rhizobium meliloti*, entre otras bacterias (Paredes *et al.*, 2010).

La capacidad de solubilización también depende de la naturaleza de la fuente de nitrógeno usada en el medio de cultivo. Con sales de amonio como fuente de nitrógeno, las tasas de solubilización de fosfato son mayores a los alcanzados con nitrato, debido a la extrusión de protones que compensan la toma de amonio, disminuyendo el pH extracelular por acidificación del medio (Gyaneshwar *et al.*, 2002; Scervino *et al.*, 2010).

En los suelos, la solubilización de fosfato por los ácidos orgánicos depende del pH y la mineralogía del mismo. Existen dos mecanismos para que esto ocurra, el primero es un intercambio del ácido, por ejemplo, los H<sup>+</sup> provenientes del citrato se intercambian por el fósforo ligado a la superficie de los cristales del Al(OH)<sub>3</sub> o Fe(OH)<sub>3</sub>, reduciéndolos y liberando el fósforo (Paredes *et al.*, 2010). El segundo mecanismo depende de la concentración de los ácidos orgánicos producidos por los microorganismos solubilizadores de fosfato, MSF. La cantidad y tipo de ácidos orgánicos liberados dependen del tipo de microorganismo. El efecto quelante de estos ácidos en la solubilización consiste en que a través de sus grupos hidroxil y carboxil quelan los cationes unidos al fosfato convirtiéndolo a formas solubles (Chen *et al.*, 2006).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Material biológico**

El material biológico estuvo constituido por muestras de suelo rizosférico de maíz y cultivos de *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. solubilizadoras de fosfato.

##### **3.1.2 Población y muestra de estudio**

Se consideró como población las bacterias de los géneros *Burkholderia* y *Pseudomonas* del suelo rizosférico de cultivos de maíz, en campos comerciales del distrito de Reque y como muestra se investigaron las bacterias provenientes de 150 unidades de muestreo, colectadas durante marzo – mayo de 2014. El número de muestras fue calculado según la fórmula mencionada por Alvitres (2000), tomando en cuenta una prevalencia de 50% (Anexo 1), determinada por los autores en un muestreo piloto.

#### **3.2 Métodos**

##### **3.2.1 Variables en estudio**

Las variables cuantitativas fueron el índice de solubilización en medio sólido y fósforo soluble en medio líquido, cultivado con *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. aisladas de suelo rizosférico de maíz.

### **3.2.2 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis**

El trabajo de investigación fue descriptivo y transeccional (Hernández *et al.*, 2003) y para contrastar la hipótesis se utilizó el diseño de una sola casilla de Goode y Hatt (Alvitres, 2000).

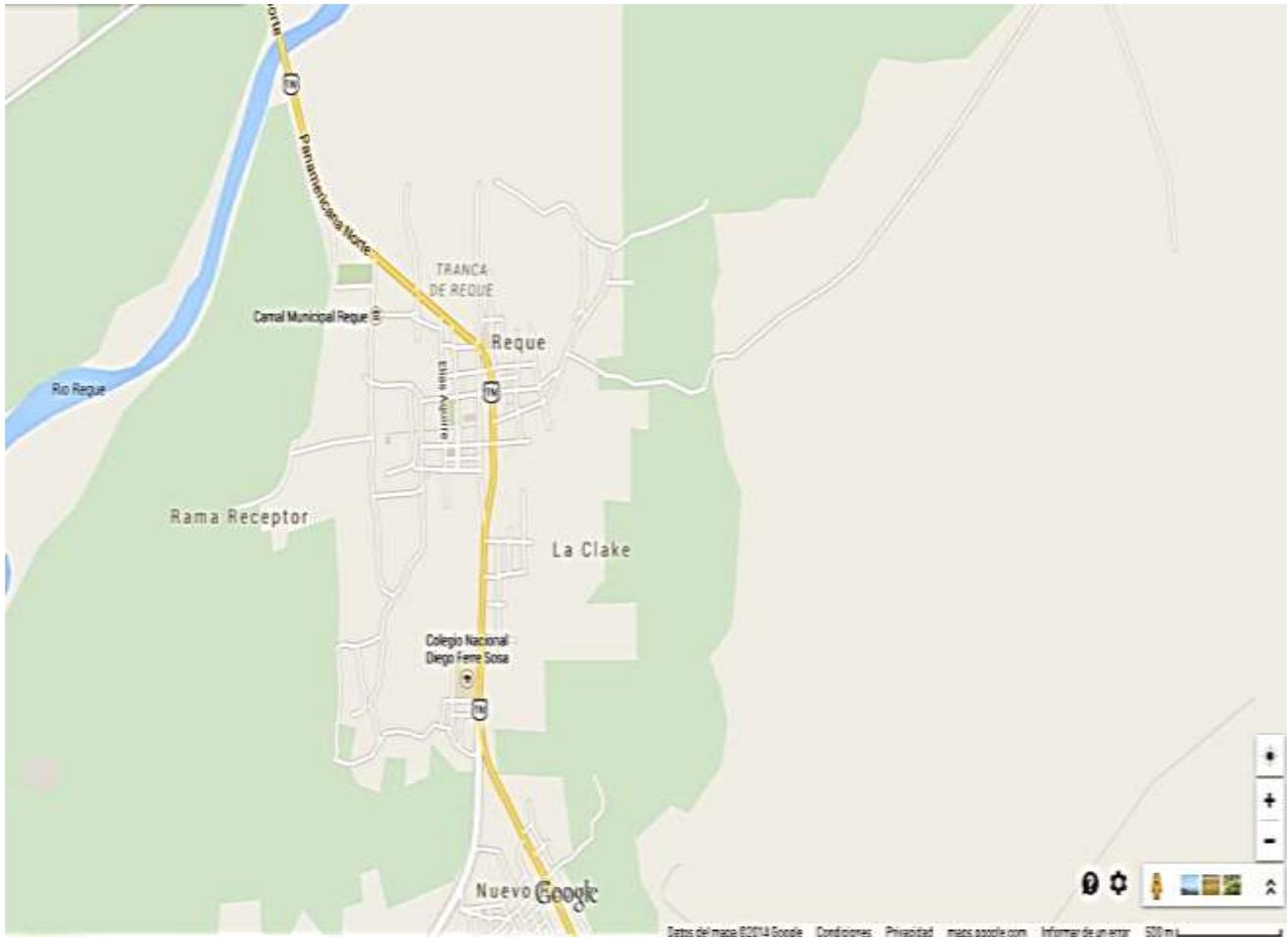
### **3.2.3 Lugar de muestreo**

Se colectaron 150 muestras de suelo rizosférico de cultivos de maíz, establecidos en 25 campos comerciales del distrito de Reque, región Lambayeque (Figura 1), determinando la posición de los puntos de muestreo (Tabla 1, figura 2) con un GPS GARMIN e Trex Vista HCx. El distrito de Reque tiene una superficie de 47,03 Km<sup>2</sup> y se ubica entre los paralelos 06° 52' 00" latitud sur y 79° 49' 27" longitud oeste (Municipalidad de Reque, 2013).

### **3.2.4 Obtención de muestras de suelo rizosférico**

En cultivos de maíz en fase pre-floración y floración (Figura 3), se colectaron aproximadamente 50 g de raíces y suelo adherido (Figura 4), se depositaron en bolsas plásticas de polietileno debidamente etiquetadas (Figura 5), e inmediatamente se transportaron en una caja térmica (10±1°C), para su procesamiento en el laboratorio de Microbiología y Parasitología, Sección Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas, en la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

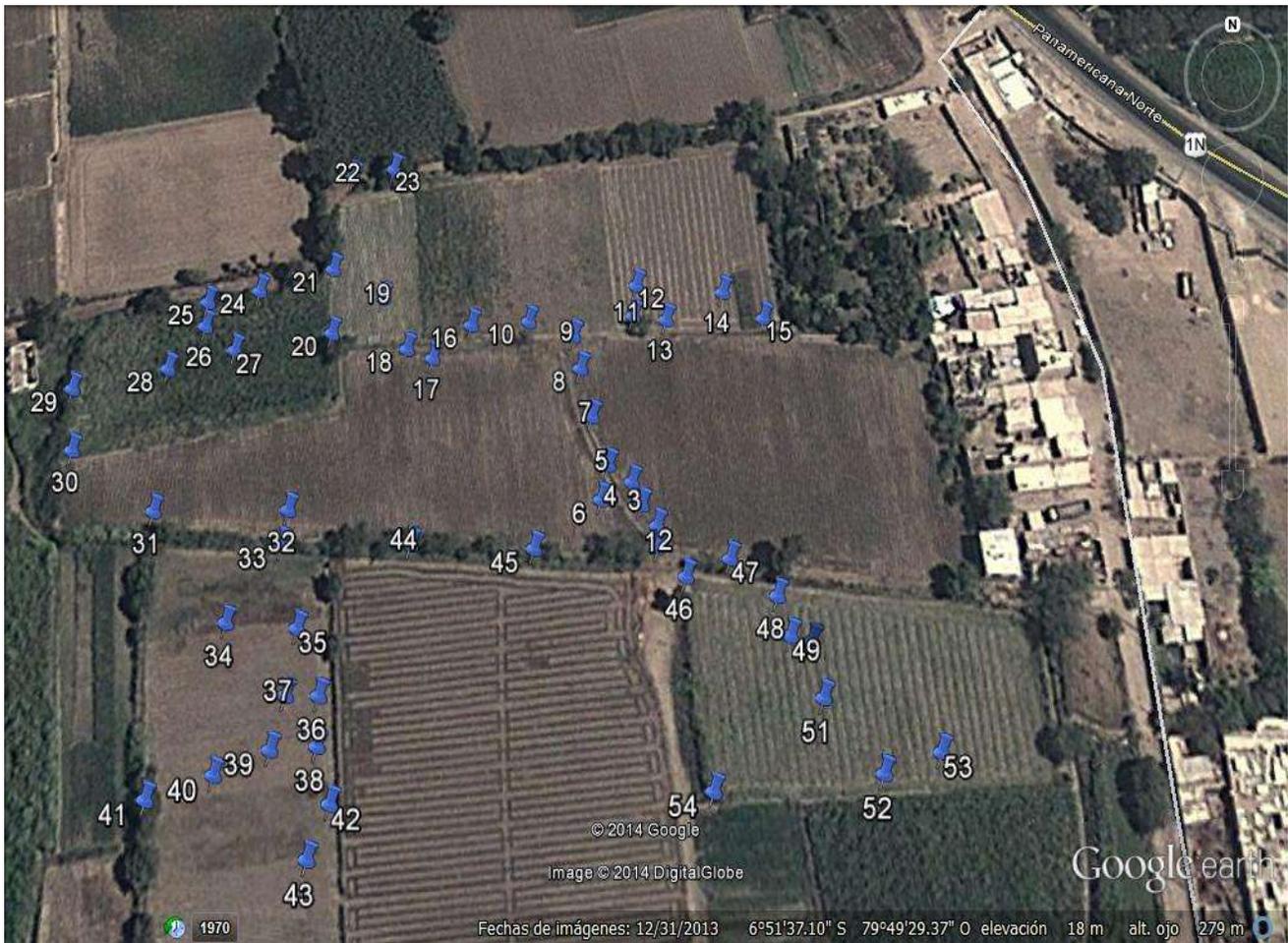
En simultáneo al muestreo de suelo rizosférico, se colectó una muestra adicional, representativa, de 1 Kg de suelo para realizar el análisis físico-químico en el Instituto Nacional de Innovación y Extensión Agraria, Estación Experimental Vista Florida de Chiclayo. Según los resultados (Tabla 2), el suelo es medianamente alcalino (pH 7,6) y ligeramente salino (CE 2,24 dSm<sup>-1</sup>), con textura franco arenoso-arcilloso, niveles bajos de materia orgánica (2,3%), nitrógeno (0,103%) y fósforo disponible (5,9 ppm), así como un contenido medio de potasio (300,0 ppm).



**Figura 1.** Ubicación del lugar de muestreo en el distrito de Reque, provincia de Chiclayo, región Lambayeque, mayo, 2014  
(<https://www.google.com.pe/maps/>)

**Tabla 1.** Posición de los puntos de muestreo de suelo rizosférico de *Zea mays* L. en Reque, durante marzo-mayo de 2014

<b>Campo agrícola</b>	<b>Punto</b>	<b>Posición (UTM)-17M</b>	<b>msnm</b>	<b>Campo agrícola</b>	<b>Punto</b>	<b>Posición (UTM)-17</b>	<b>msnm</b>
1	1	620649 9258720	28	3	28	629703 9241540	27
2	2	633481 9255412	45	4	29	629701 9241554	27
3	3	629854 9241441	29	5	30	629725 9241559	26
4	4	629862 9241466	29	6	31	629741 9241563	27
5	5	629915 9241474	29	7	32	629733 9241569	27
6	6	629901 9241470	29	8	33	629733 9241575	27
7	7	629888 9241485	28	9	34	629746 9241578	26
8	8	629886 9241497	28	10	35	629779 9241610	27
9	9	629881 9241498	28	11	36	629768 9241608	28
10	10	629878 9241506	28	12	37	629765 9241584	27
11	11	629867 9241515	28	13	38	629766 9241568	27
12	12	629856 9241511	27	14	39	629778 9241577	27
13	13	629819 9241517	28	15	40	629785 9241564	25
14	14	629789 9241518	28	16	41	629792 9241562	27
15	15	629770 9241454	27	17	42	629801 9241570	27
16	16	629774 9241464	27	18	43	629877 9241571	27
17	17	629732 9241465	27	19	44	629867 9241577	28
18	18	629747 9241470	28	20	45	629852 9241571	28
19	19	629760 9241475	27	21	46	629844 9241579	28
20	20	629770 9241476	27	22	47	629844 9241572	27
21	21	629762 9241486	27	23	48	629816 9241571	27
22	22	629770 9241486	27	24	49	629828 9241567	27
23	23	629763 9241500	28	25	50	629830 9241559	26
24	24	629746 9241501	27	1	51	629833 9241547	27
25	25	629758 9241518	27	2	52	629836 9241528	27
1	26	629758 9241526	27	3	53	629837 9241536	26
2	27	629725 9241526	27	4	54	629843 9241532	27



**Figura 2.** Ubicación de los puntos de muestreo de suelo rizosférico de *Zea mays* L. en Reque, durante marzo – mayo de 2014.



**Figura 3.** Cultivo de *Zea mays* L. en floración.



**Figura 4.** Extracción de suelo rizosférico de *Zea mays* L.



**Figura 5.** Muestras de suelo rizosférico de *Zea mays* L.

**Tabla 2.** Análisis físico-químico de suelo rizosférico de cultivos de *Zea mays* L. en Reque, Lambayeque, 2014\*

Clase textural	pH	CE (dSm <sup>-1</sup> )	MO (%)	N (%)	P (ppm)	K (ppm)
Fr.Ar.Ao	7,69	2,24	2,3	0,103	5,9	300,0

\*Laboratorio de Suelos, Estación experimental Vista Florida

Instituto Nacional de Innovación y Extensión agraria, Lambayeque

### 3.2.5 Aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfato

Las muestras de raíces con suelo rizosférico adherido se depositaron en bandejas de polietileno, bajo sombra (Figura 6), a temperatura ambiente, por 72 horas. Después, se cortaron en fragmentos de aproximadamente 5 cm, aleatoriamente se tomaron submuestras de 10 g de raíces junto con el suelo adherido y se depositaron en frascos de 250 mL de capacidad (Figuras 7,8), conteniendo 90 mL de solución salina esterilizada (NaCl 0,85%, p/v).

Después de agitar el contenido de los frascos ( $10^{-1}$ ) manualmente (Figura 9), durante 10 minutos, se realizó una segunda dilución,  $10^{-2}$  (Figura 10), de la que se tomaron alícuotas y se sembraron (Figura 11) por duplicado en agar Sundara, Rao & Sinha Medium (SRSM) y agar National Botanical Research Institute (NBRIP) con  $1 \text{ g PL}^{-1}$ , correspondiente a  $5,6 \text{ gL}^{-1}$  de fosfato dicálcico y  $5,0 \text{ gL}^{-1}$  de fosfato tricálcico, respectivamente, como fuentes de fósforo inorgánico insoluble (Vázquez *et al.*, 2000). Ambos medios de cultivo fueron suplementados con 45 mg de Fluconazol para inhibir el crecimiento de hongos (Anexo 2).

Las placas de Petri sembradas fueron incubadas a  $30^{\circ}\text{C}$ , durante 96 horas y las colonias de bacterias desarrolladas que presentaron halozonas, zonas transparentes alrededor o halos de solubilización (Figura 12), se consideraron solubilizadoras de fosfato (Vázquez *et al.*, 2000). Se realizaron tinciones de Gram para seleccionar bacilos Gram negativos (Figuras 13, 14), con los que se verificó la estabilidad de la actividad solubilizadora, cultivándolos dos veces consecutivas en el mismo agar de procedencia (Figura 15) y después de la incubación, se midió el diámetro del halo de solubilización.

### 3.2.6 Identificación y mantenimiento de *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp.

La identificación de los géneros *Burkholderia* y *Pseudomonas* según Brenner *et al.* (2005) y Barba & Bravo (2013), se realizó con base a las características fenotípicas, mediante las pruebas de oxidasa (Figura 16), motilidad en medio semisólido, SIM (Figura 17), fermentación de carbohidratos en agar



**Figura 6.** Deshidratado de muestras de suelo rizosférico de *Zea mays* L.



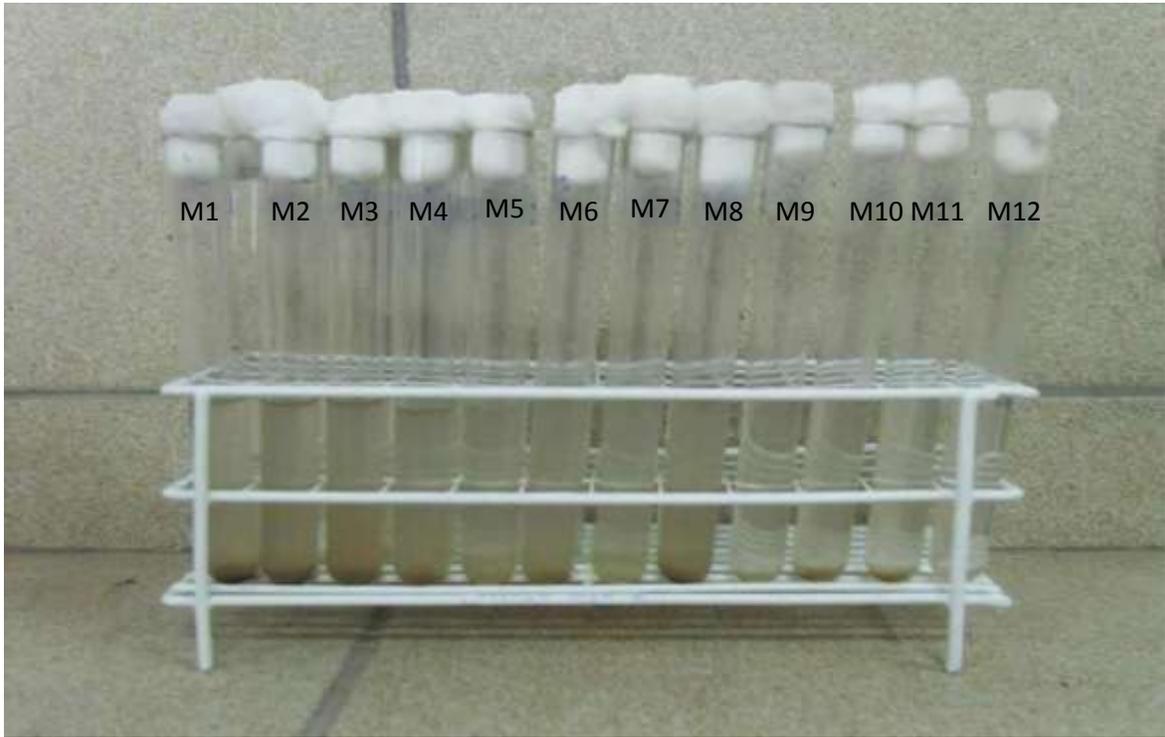
**Figura 7.** Pesado de muestra de suelo rizosférico de *Zea mays* L.



**Figura 8.** Diluciones  $10^{-1}$  de suelo rizosférico en solución salina.



**Figura 9.** Agitación manual de diluciones de suelo rizosférico.



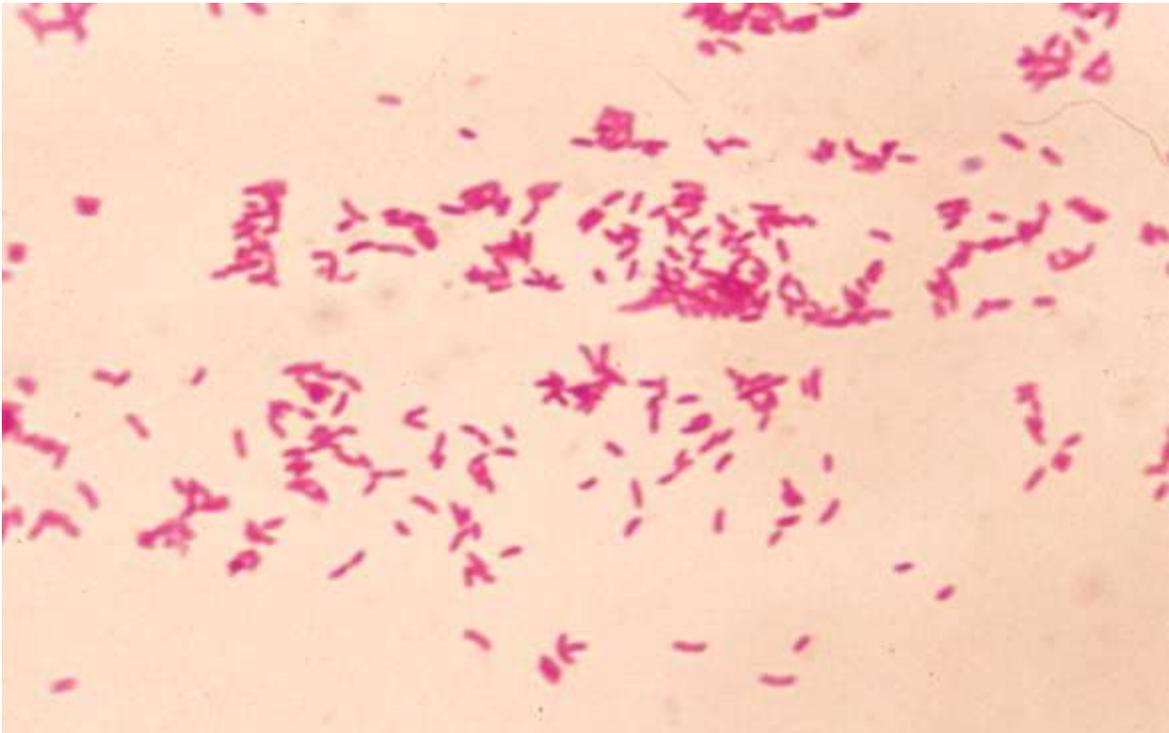
**Figura 10.** Diluciones  $10^{-2}$  de suelo rizosférico.



**Figura 11.** Siembra de dilución de suelo rizosférico en agar NBRIP.



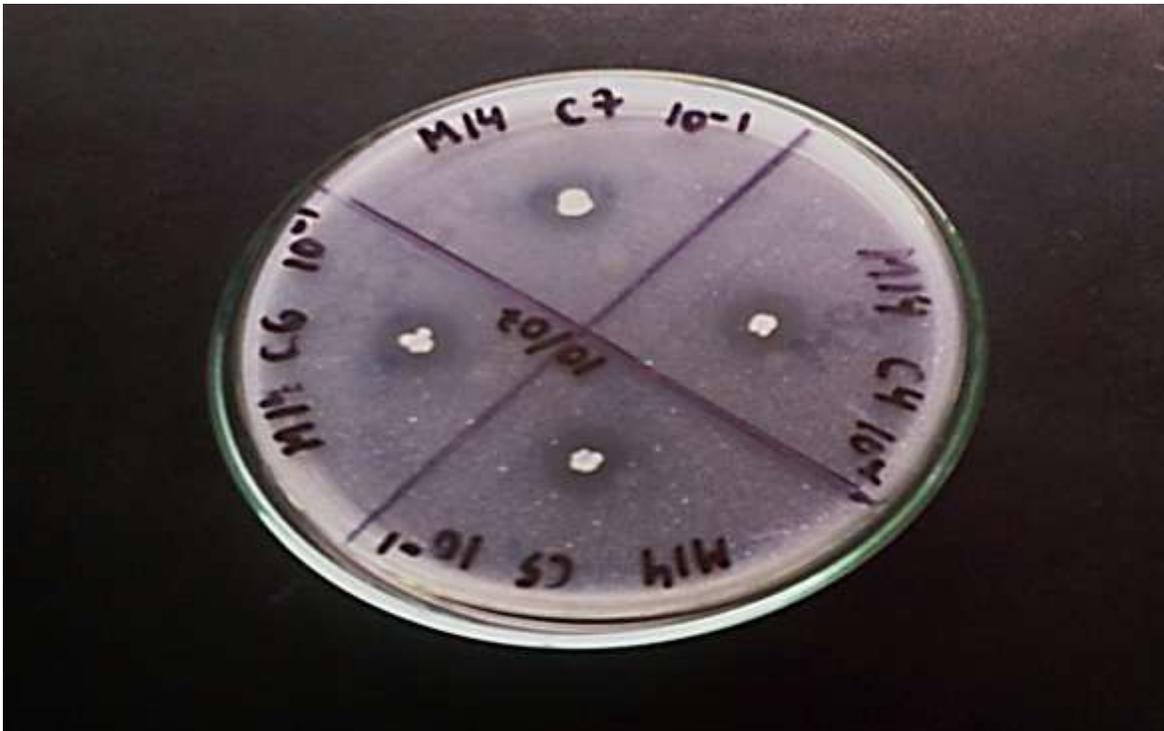
**Figura 12.** Colonias de bacterias con zonas transparentes alrededor.



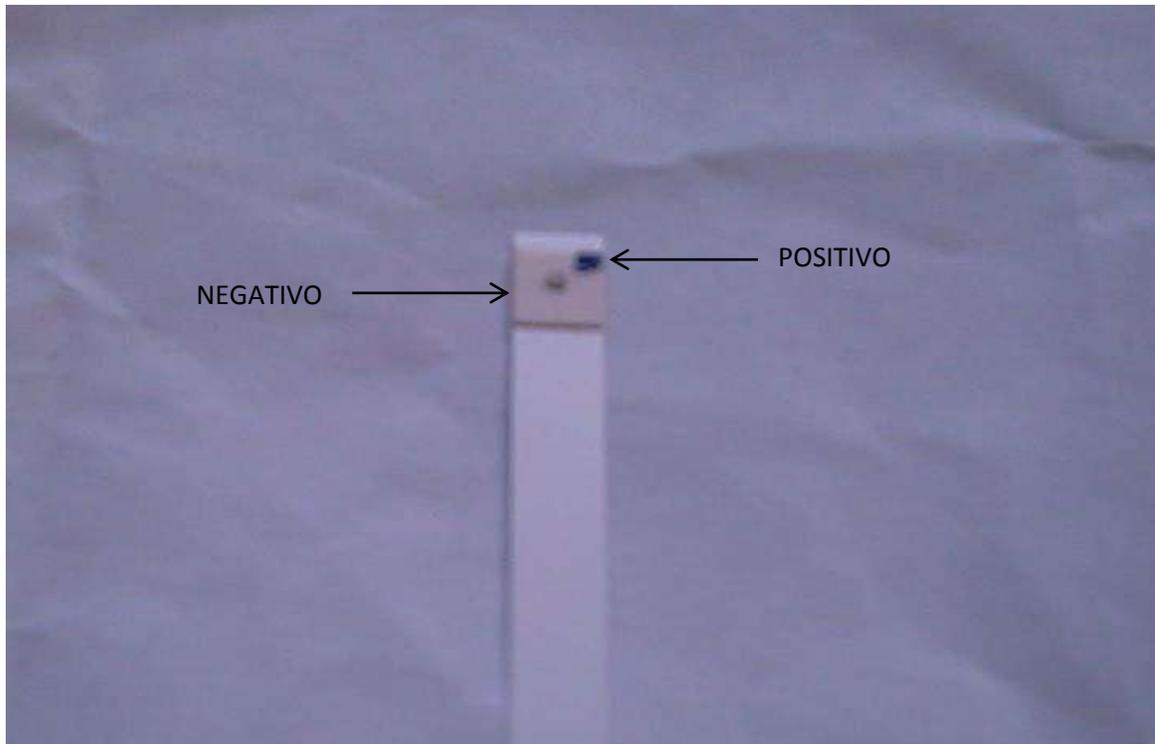
**Figura 13.** Observación microscópica (1000x) de bacilos Gram negativos.



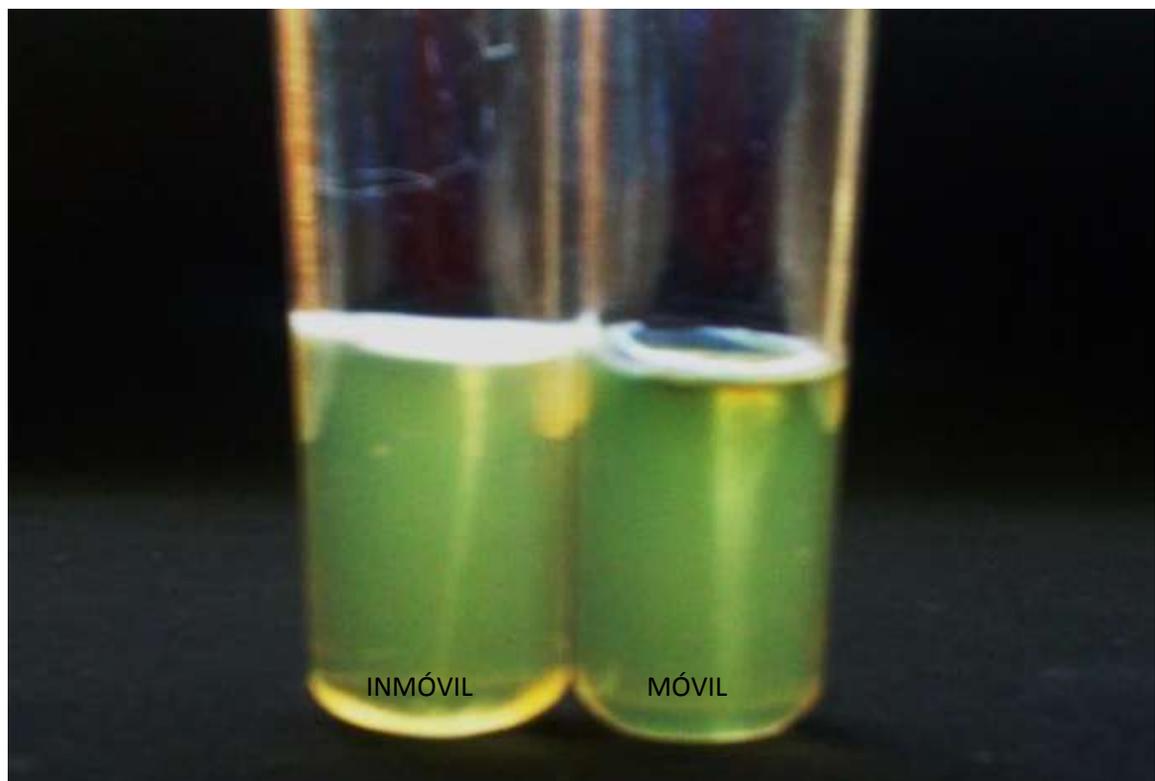
**Figura 14.** Cultivos de bacilos Gram negativos solubilizadores de fosfato.



**Figura 15.** Bacterias cultivadas por segunda vez en agar NBRIP.



**Figura 16.** Prueba de oxidasa en tira reactiva.



**Figura 17.** Motilidad de bacterias en medio SIM.

hierro triple azúcar, TSI (Figura 18), susceptibilidad a la polimixina-B, 300 UI, (Figura 19) y producción de pigmentos fluorescentes en agar King B (Figura 20). Para su mantenimiento, las bacterias fueron sembradas en agar tripticasa soya (Figura 21), durante 24 horas y luego fueron llevadas a refrigeración (8°C), realizándose subcultivos cada 30 días.

### 3.2.7 Determinación del índice de solubilización de fosfato en medio sólido

Para la determinación del índice de solubilización de fosfato en medio sólido según Lara *et al.* (2011), las bacterias del género *Burkholderia* y *Pseudomonas* cultivadas en agar tripticasa soya (TSA) durante 24 horas, se sembraron por triplicado, mediante la técnica de puntura superficial en agar NBRIP (Figura 22) con 1 gL<sup>-1</sup>P inorgánico, como fosfato dicálcico, fosfato tricálcico y roca fosfórica de Bayóvar. Para alcanzar las concentraciones requeridas se agregaron 5,6 g de fosfato dicálcico; 5,0 g de fosfato tricálcico y 7,6 g de roca fosfórica de Bayóvar (Anexo 3).

Las placas de Petri se incubaron a 30°C, durante 96 horas y cada 24 horas, se midió el diámetro de la colonia bacteriana y diámetro de colonia más halo de solubilización (Figura 23). Con los valores obtenidos a las 96 horas, se calculó el área e índice de solubilización, de fosfato según las fórmulas mencionadas por García y Alvarez (2012).

$$\text{Área de solubilización} = \pi \cdot r^2$$

$$\text{Índice de solubilización} = \frac{\emptyset \text{ colonia+halo}}{\emptyset \text{ colonia}}$$

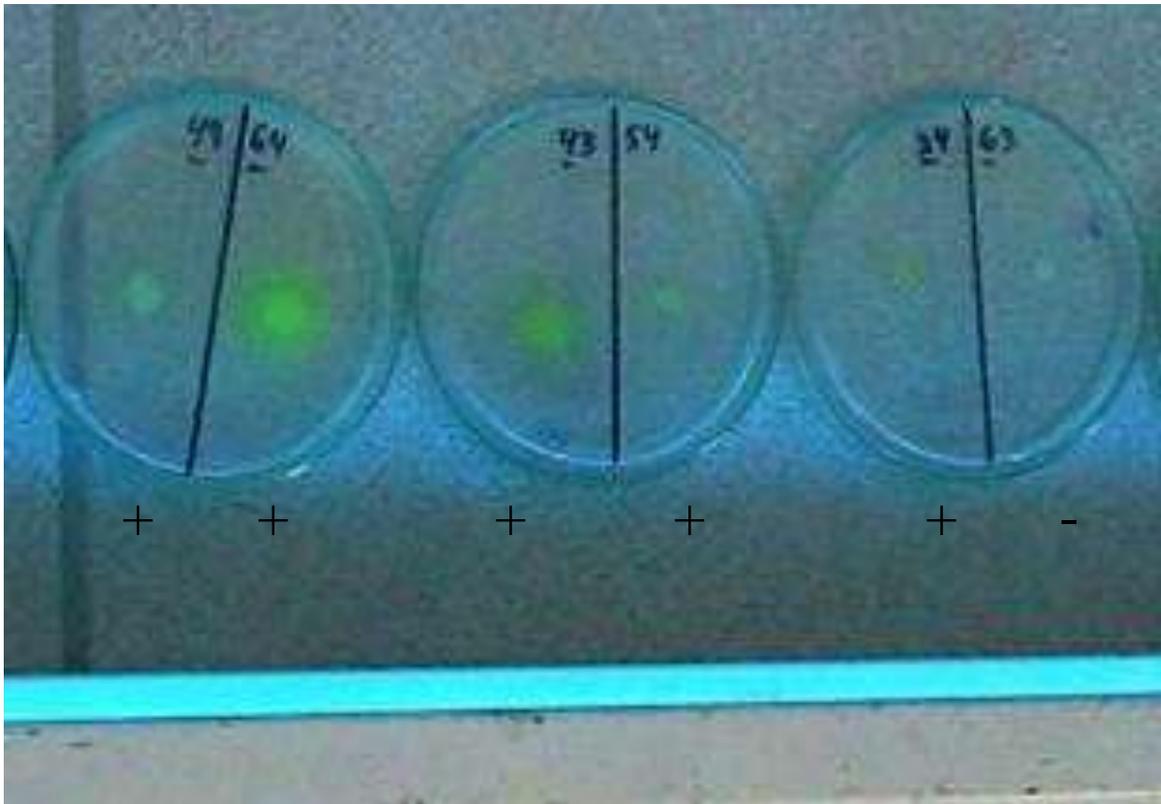
Para la cuantificación del fósforo soluble en medio líquido, se seleccionó la fuente de fósforo inorgánico, con la que se alcanzó el mayor índice de solubilización.



**Figura 18.** Prueba de fermentación de carbohidratos en TSI.



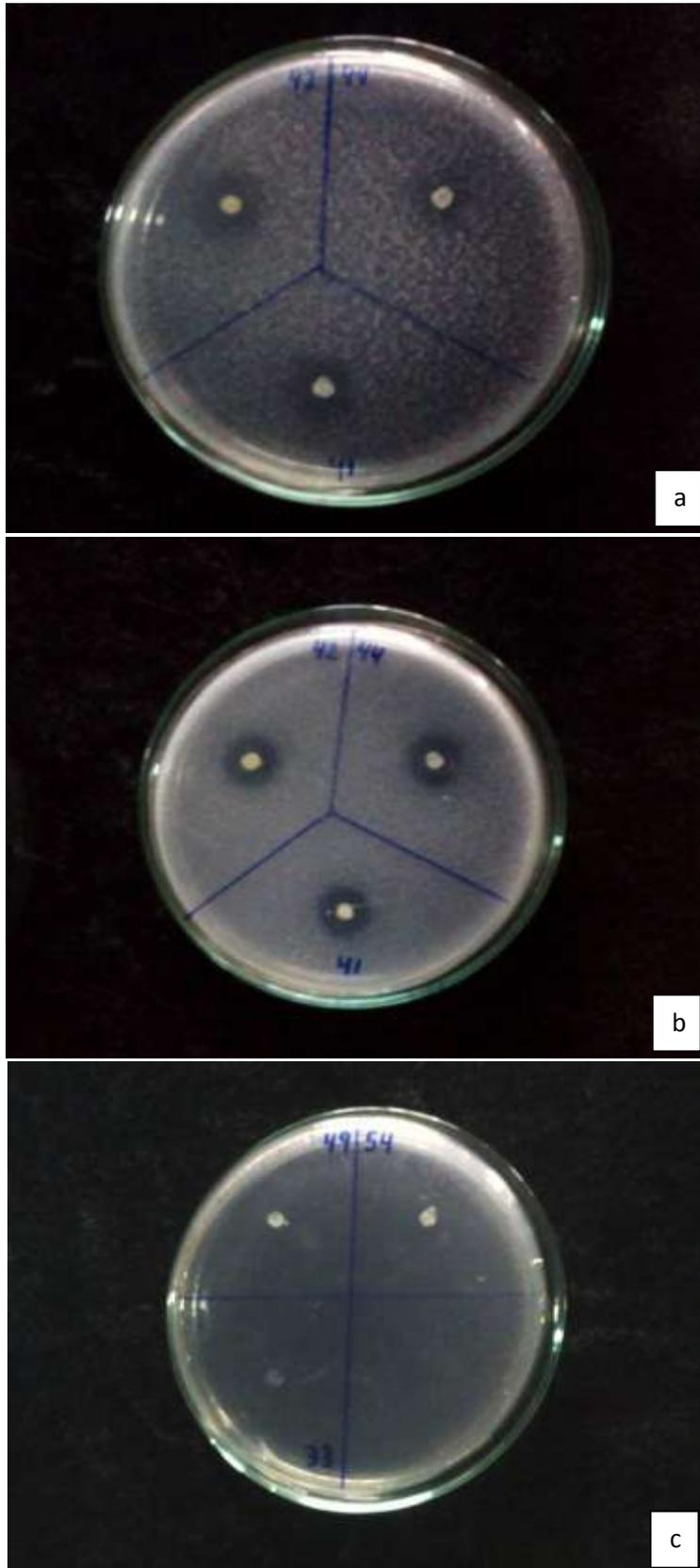
**Figura 19.** Prueba de susceptibilidad a la polimixina-B de *Pseudomonas* sp.



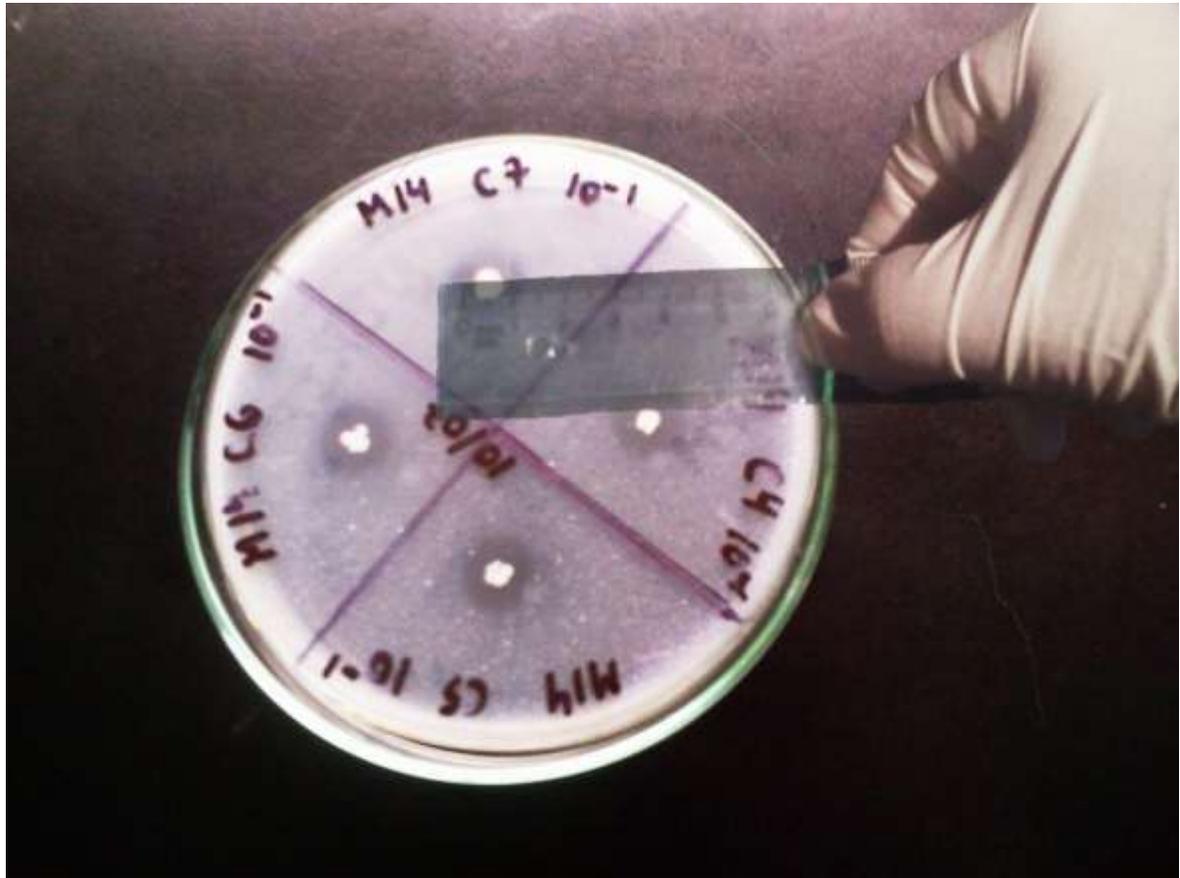
**Figura 20.** Pigmentos fluorescentes de *Pseudomonas* spp.



**Figura 21.** Cultivos de *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. solubilizadoras de fosfato.



**Figura 22.** *Pseudomonas* spp. cultivadas en agar NBRIP con fosfato dicálcico (a), tricálcico (b) y roca fosfórica de Bayóvar (c).



**Figura 23.** Medición del diámetro de la colonia bacteriana y halo de solubilización.

### 3.2.8 Cuantificación de fósforo soluble en medio líquido

Para la cuantificación de fósforo soluble en medio líquido por *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp., según Vázquez *et al.* (2000), cada bacteria fue cultivada en caldo NBRIP con fosfato tricálcico, hasta alcanzar  $10^5$  ufc mL<sup>-1</sup>. A continuación, cada cultivo bacteriano fue inoculado por triplicado en frascos con 50 mL de caldo NBRIP e incubado a 30°C (Figura 24), con agitación constante (150 rpm), por 7 días. Después, se tomaron submuestras de 4 mL de caldo NBRIP que fueron centrifugadas a 3000 rpm, durante 5 minutos (Figura 25) y con el sobrenadante se cuantificó el fósforo soluble, mediante el método colorimétrico del molibdato (Rodier & Rodi, 2005). La positividad a la solubilización de fosfato se evidenció por una coloración azul (Figura 26) y las concentraciones se calcularon en una recta patrón, obtenida con diluciones crecientes de fosfato monopotásico (Anexo 4). Los resultados se expresaron como fósforo soluble (ppm).

### 3.2.9 Análisis de datos

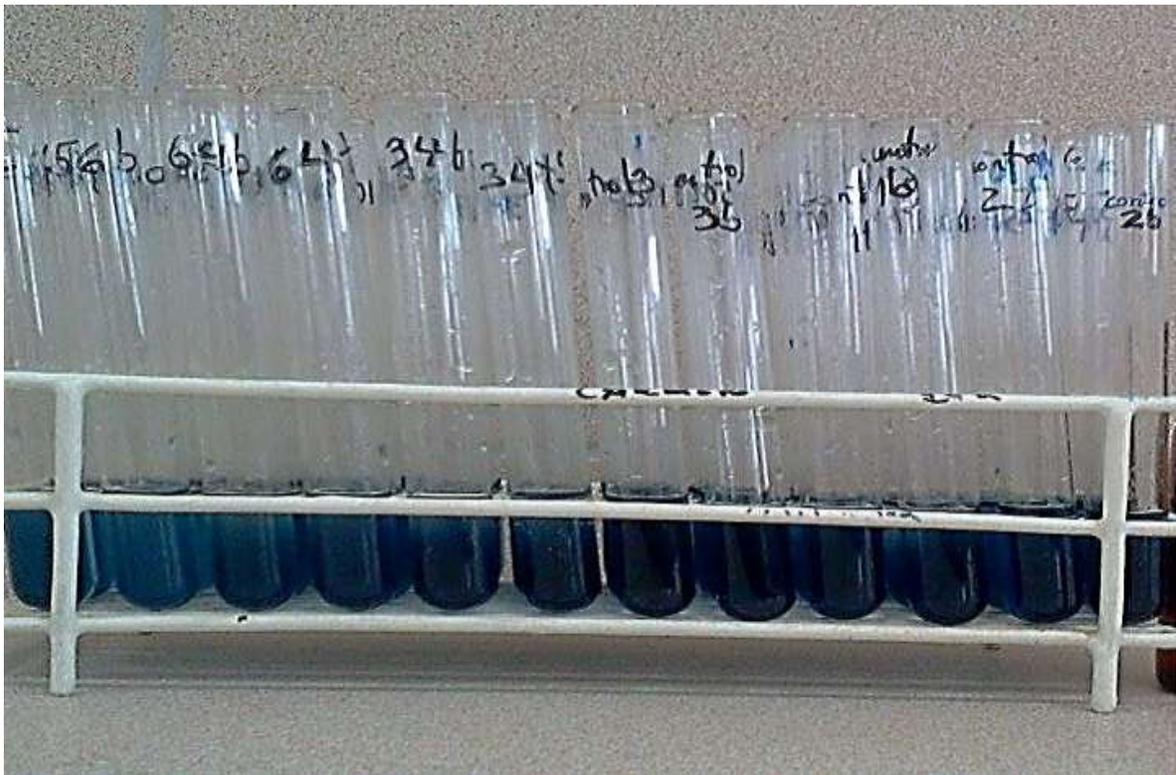
Los datos obtenidos fueron ordenados en tablas y figuras, para analizar las características de *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. solubilizadoras de fosfato. Con los valores del índice de solubilización de fosfato y fósforo soluble se realizaron las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas. Según los resultados, se consideró adecuado el análisis no paramétrico de Kruskal Wallis. Se utilizó el software estadístico SPSS versión 15.0, así como los programas Microsoft Office Word 2010, Excel versión 2010 y Minitab 15.



**Figura 24.** Inoculaci3n de *Pseudomonas* sp. en caldo NBRIP con fosfato tricàlcico.



**Figura 25.** Centrifugaci3n de submuestra de caldo NBRIP con fosfato tricàlcico.



**Figura 26.** Coloración observada en la cuantificación de fósforo soluble por el método colorimétrico del molibdato.

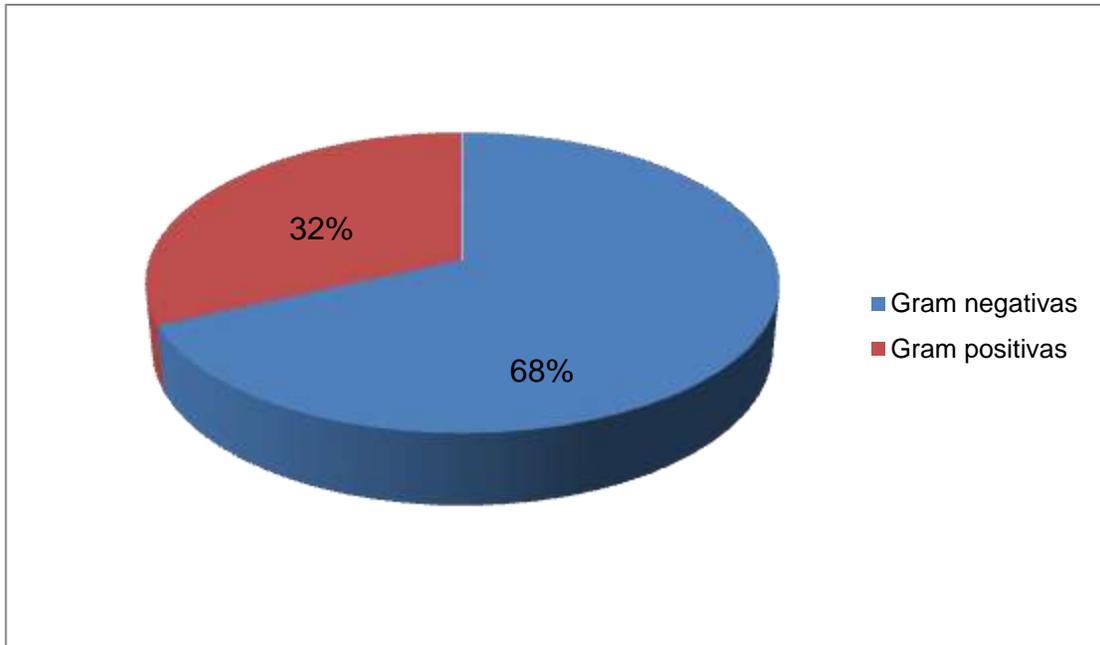
## IV. RESULTADOS

### 4.1 Bacterias solubilizadoras de fosfato aisladas

En 150 muestras de suelo rizosférico de *Zea mays* L. “maíz” se aislaron 311 bacterias solubilizadoras de fosfato, entre las que 31,8% (99) correspondió a bacterias Gram positivas y 68,2% (212) a bacterias Gram negativas (Figura 27). Las bacterias solubilizadoras de fosfato se aislaron en agar con fosfato insoluble como fuente de fósforo y se reconocieron por una zona transparente alrededor de las colonias (Figuras 28, 29).

La forma de las bacterias Gram negativas fue bacilar en el 99,5% (211) y cocoide en el 0,5% (Figura 30). El 65,6% (140) de bacterias se aislaron en agar NBRIP con fosfato tricálcico y 34,4% en agar SRSM con fosfato dicálcico. En ambos medios, los bacilos Gram negativos predominaron frente a los cocos (Figura 31).

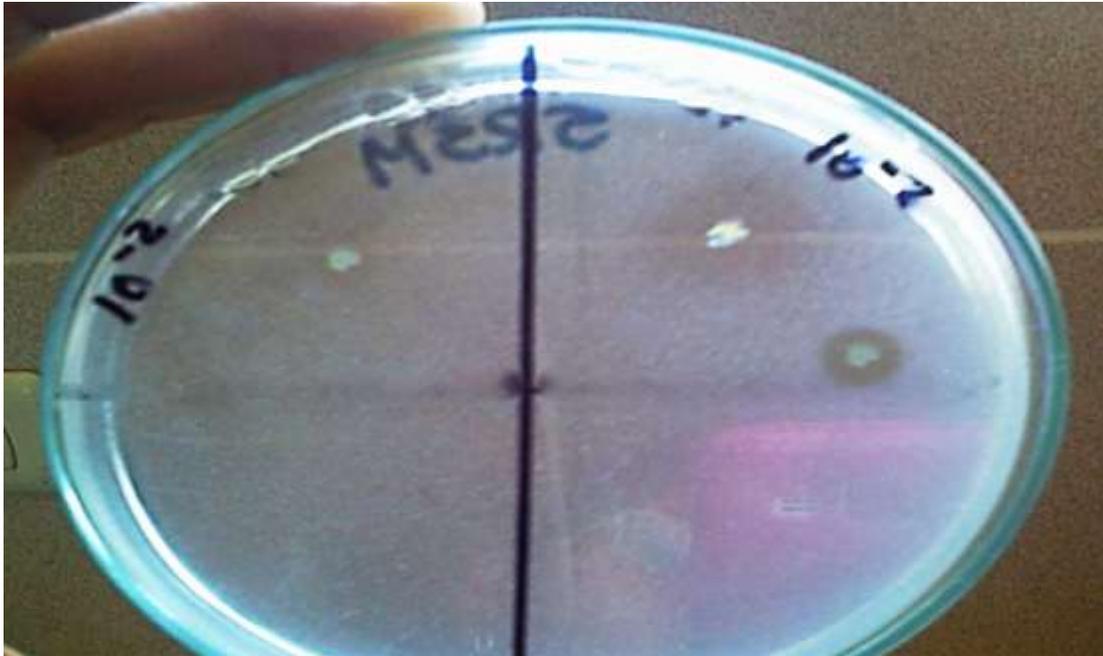
El diámetro de los halos de solubilización en el primer y segundo subcultivo osciló entre 0,5 y 11,0 mm en agar SRSM (Tabla 3) y 0,5 y 13,0 mm en agar NBRIP (Tabla 4), Después de los dos subcultivos la actividad solubilizadora de fosfato se mantuvo en todos los bacilos Gram negativos; sin embargo, en algunas bacterias el diámetro disminuyó o aumentó, en relación al primer subcultivo.



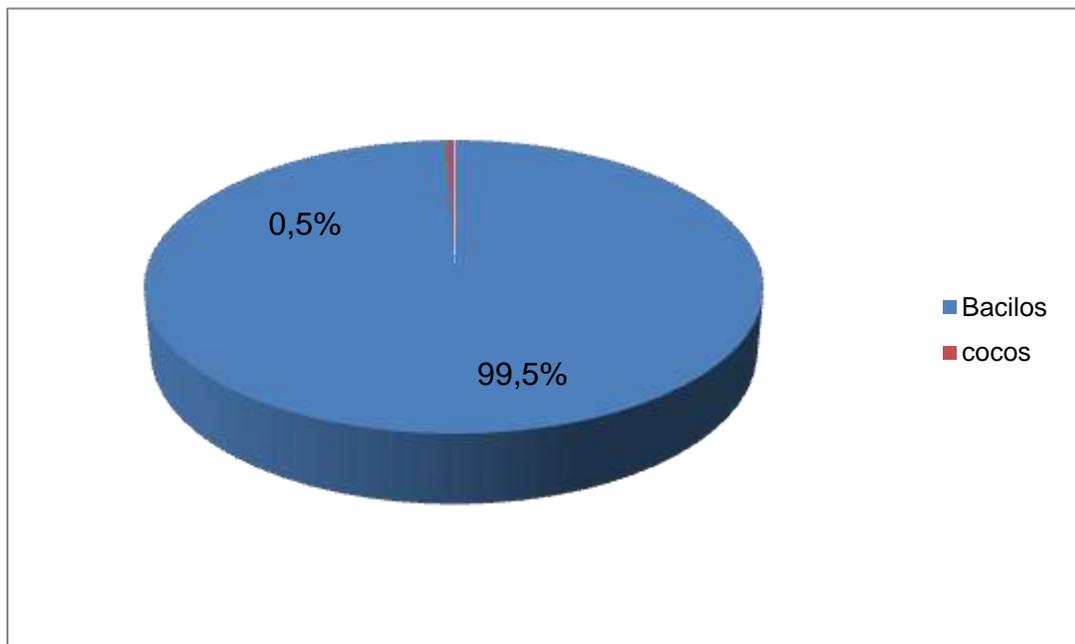
**Figura 27.** Bacterias Gram positivas y Gram negativas solubilizadoras de fosfato aisladas de suelo rizosférico de *Zea mays* L.



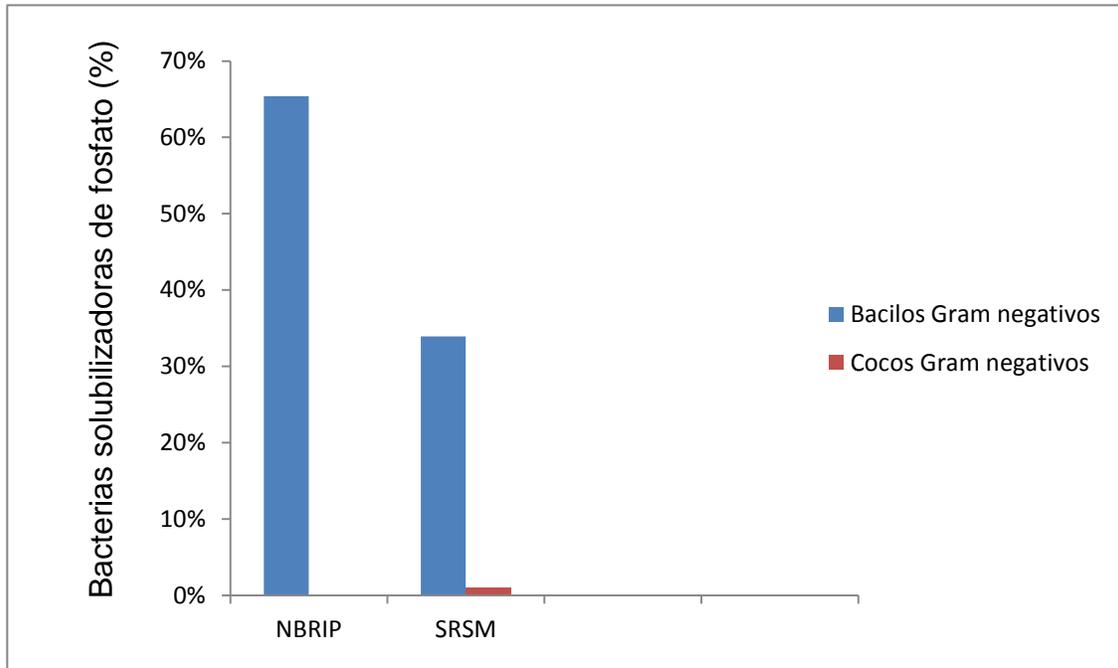
**Figura 28.** Bacterias solubilizadoras de fosfato aisladas en agar NBRIP con fosfato tricálcico.



**Figura 29.** Bacterias solubilizadoras de fosfato aisladas en agar SRSM con fosfato dicálcico.



**Figura 30.** Bacilos y cocos Gram negativos solubilizadores de fosfato aislados de suelo rizosférico de *Zea mays* L.



**Figura 31.** Frecuencia de bacilos y cocos Gram negativos solubilizadores de fosfato aislados en agar NBRIP y SRSM.

**Tabla 3.** Diámetro (mm) del halo de solubilización de fosfato de bacilos Gram negativos después de dos subcultivos en agar SRSM-fosfato dicálcico

Bacilo código	Halo de solubilización (mm)		Bacilo código	Halo de solubilización(mm)	
	Subcultivo 1	Subcultivo 2		Subcultivo 1	Subcultivo 2
140	3,5	3,5	176	9,5	9,0
141	1,0	0,8	177	4,0	3,5
142	4,0	3,9	178	5,9	5,9
143	6,0	5,5	179	7,0	6,4
144	2,5	2,2	180	3,5	2,9
145	8,0	7,5	181	7,5	7,2
146	9,0	8,8	182	6,6	6,9
147	3,0	2,6	183	11,0	10,3
148	2,5	2,5	184	5,8	5,2
149	1,0	0,6	185	4,9	4,5
150	4,5	4,2	186	6,3	5,8
151	6,0	5,8	187	6,5	6,1
152	3,0	2,9	188	7,0	6,5
153	4,0	3,9	189	8,9	8,9
154	3,0	2,5	190	2,0	2,0
155	1,5	1,1	191	7,0	6,9
156	2,5	2,2	192	7,0	6,9
157	5,0	4,9	193	8,5	8,5
158	4,0	3,9	194	4,8	4,2
159	3,0	2,9	195	6,0	6,0
160	5,0	4,9	196	8,6	8,0
161	4,0	3,9	197	5,0	4,5
162	4,0	3,5	198	6,0	6,5
163	3,0	2,9	199	11,0	11,0
164	3,5	3,3	200	2,0	1,9
165	10,0	9,5	201	4,5	4,5
166	6,0	5,5	202	3,5	3,0
167	5,0	4,9	203	4,0	3,9
168	3,0	2,6	204	8,0	7,5
169	2,0	1,6	205	3,5	3,0
170	3,0	2,4	206	7,0	6,5
171	3,0	2,8	207	4,0	3,5
172	1,0	0,5	208	9,0	8,5
173	0,5	0,5	209	6,0	5,5
174	2,5	2,2	210	3,0	2,5
175	7,5	7,2	211	7,0	7,0

**Tabla 4.** Diámetro (mm) del halo de solubilización de fosfato de bacilos Gram negativos después de dos subcultivos en agar NBRIP-fosfato tricálcico

Bacilo código	Halo de solubilización (mm)		Bacilo código	Halo de solubilización (mm)	
	Subcultivo 1	Subcultivo 2		Subcultivo 1	Subcultivo 2
1	3,5	3,5	36	6,0	5,8
2	8,5	8,0	37	8,0	7,9
3	6,0	5,8	38	8,0	7,9
4	5,5	5,5	39	9,5	9,2
5	4,0	4,0	40	10,0	9,8
6	9,0	8,9	41	10,0	9,9
7	3,5	3,5	42	12,0	11,9
8	4,5	4,0	43	6,0	6,0
9	3,0	2,9	44	10,0	9,8
10	10,0	9,5	45	7,5	7,5
11	9,0	9,7	46	3,5	3,2
12	7,0	6,8	47	7,0	6,9
13	9,0	8,8	48	5,0	4,8
14	8,0	7,8	49	4,0	4,0
15	9,0	9,0	50	2,0	1,9
16	2,0	1,9	51	3,0	3,2
17	9,0	9,5	52	1,0	1,3
18	3,5	3,3	53	4,0	3,7
19	6,0	6,5	54	4,0	3,9
20	2,0	1,8	55	13,0	13,0
21	2,0	2,0	56	6,0	6,3
22	3,5	3,2	57	3,0	2,9
23	3,0	2,9	58	5,0	4,8
24	6,0	5,7	59	2,0	1,8
25	3,0	2,8	60	3,5	3,0
26	0,5	0,2	61	6,5	6,2
27	4,5	4,0	62	3,0	2,9
28	7,0	6,8	63	2,0	1,9
29	5,5	5,1	64	12,0	12,2
30	7,5	7,5	65	1,0	0,9
31	3,5	3,5	66	6,0	5,9
32	5,0	4,6	67	7,0	6,8
33	6,5	6,3	68	9,0	8,8
34	6,0	5,9	69	4,0	3,5
35	6,5	6,2	70	3,5	3,2

Continuación...

Bacilo còdigo	Halo de solubilización (mm)		Bacilo còdigo	Halo de solubilización(mm)	
	Subcultivo 1	Subcultivo 2		Subcultivo 1	Subcultivo 2
71	6,0	5,8	106	3,0	2,9
72	10,0	9,9	107	4,5	4,2
73	5,0	4,5	108	9,0	8,9
74	3,0	2,9	109	8,0	7,5
75	2,0	1,8	110	2,5	2,1
76	4,0	3,9	111	4,0	3,9
77	4,0	3,5	112	4,5	4,2
78	5,0	4,4	113	6,0	5,8
79	3,5	3,5	114	7,0	6,5
80	11,0	10,8	115	3,0	2,8
81	4,0	4,0	116	4,0	3,5
82	4,5	4,2	117	1,0	0,9
83	2,0	1,9	118	3,0	3,0
84	5,5	5,0	119	6,0	5,4
85	3,0	2,9	120	3,5	3,5
86	1,0	0,9	121	4,5	4,2
87	5,0	4,5	122	3,0	2,9
88	4,0	3,5	123	2,5	2,2
89	2,5	2,2	124	5,0	4,8
90	6,0	5,9	125	8,5	8,5
91	4,5	4,2	126	3,0	2,9
92	7,0	6,8	127	3,0	2,9
93	10,0	9,9	128	2,0	1,6
94	4,0	3,5	129	1,5	1,9
95	4,5	4,2	130	3,5	3,2
96	5,0	4,9	131	4,0	3,6
97	4,0	3,5	132	5,0	4,9
98	6,0	5,6	133	0,5	0,5
99	8,5	8,0	134	4,0	3,7
100	3,0	2,6	135	2,0	1,9
101	6,0	5,9	136	2,5	2,1
102	7,0	7,0	137	1,4	1,1
103	8,0	7,9	138	10,0	9,8
104	4,0	3,8	139	2,0	1,8
105	8,0	7,5			

## 4.2 Especies de *Burkholderia* y *Pseudomonas* identificadas

La caracterización fenotípica de los bacilos Gram negativos solubilizadores de fosfato (Tabla 5), identificó el 13,3% (28) como *Pseudomonas* spp. y el 1% (2) como *Burkholderia* spp. De esta manera, el 55% de las muestras de suelo rizosférico de maíz resultó positivo al aislamiento de *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. En los 30 cultivos de bacilos Gram negativos solubilizadores de fosfato aislados de maíz (Tabla 6) se identificó *P. aeruginosa* (56,7%), *P. fluorescens* (13,3%), *P. stutzeri* (13,3%), *P. putida* (10%) y *B. cepacia* (6,7%).

## 4.3 Índice de solubilización en agar NBRIP con tres fuentes de fósforo inorgánico

En medio sólido con fosfato dicálcico y tricálcico se observaron halos de solubilización por *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. (Figuras 32, 33), calculándose el área e índice de solubilización. Con roca fosfórica de Bayóvar, las bacterias formaron colonias, pero no zonas transparentes alrededor (Figura 34).

El área de solubilización de fosfato dicálcico osciló entre 12,6 mm<sup>2</sup> con *B. cepacia* 60 y 78,5 mm<sup>2</sup> con *P. aeruginosa* 64 (Anexo 5). El 33,3% de bacterias de *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. alcanzó un rango de 12,0-24,0 mm<sup>2</sup> y el 16,7% un área mayor a 60,0 mm<sup>2</sup> (Tabla 7). El área de solubilización de fosfato tricálcico osciló entre 0,2 mm<sup>2</sup> con *B. cepacia* 60 y 78,5 mm<sup>2</sup> con *P. aeruginosa* 42 (Anexo 6). El 46,7% de las bacterias alcanzaron un rango de 0,2-15,2 mm<sup>2</sup> y el 13,3% un área mayor de 60,2 mm<sup>2</sup> (Tabla 8).

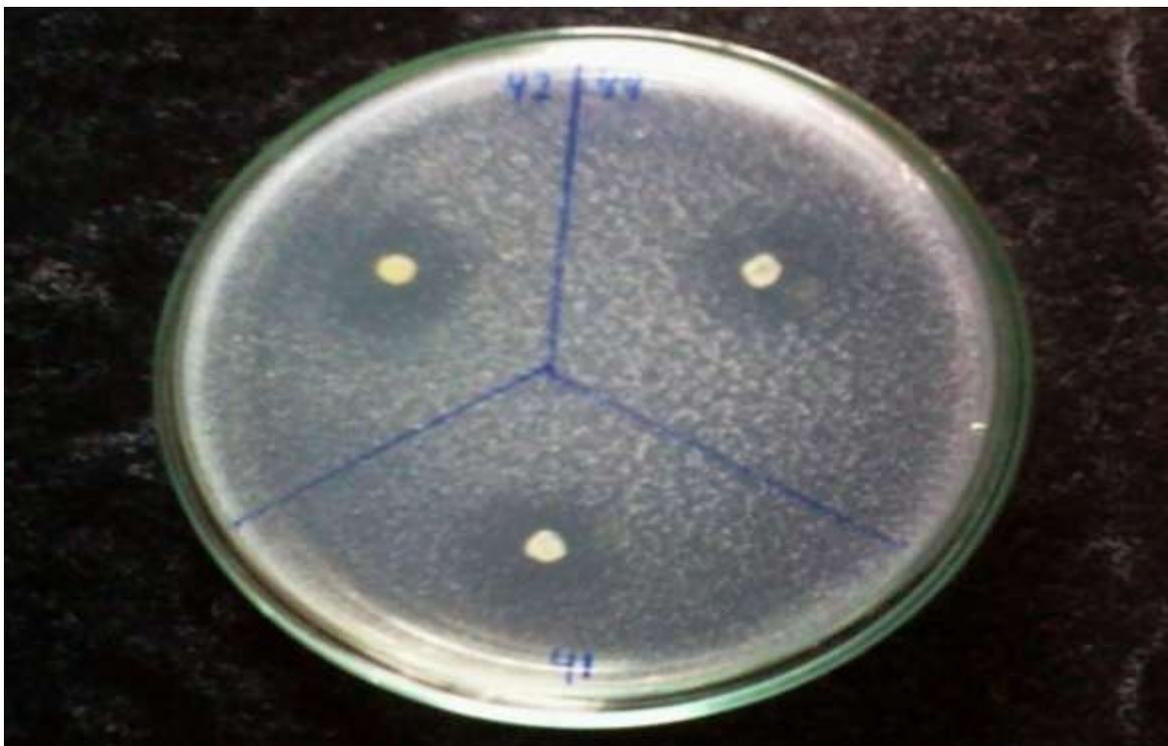
El índice de solubilización, IS, de fosfato dicálcico osciló entre 2,0 con *B. cepacia* 60 y 3,5 con *P. aeruginosa* 64 (Anexo 7). El 8,3% de *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. alcanzaron un rango de 2,0-2,15 y el 8,3% un IS mayor de 3,0 (Tabla 9). El IS de fosfato tricálcico osciló entre 1,10 con *P. aeruginosa* 59 y 3,50 con *P. fluorescens* 33 (Anexo 8). El 60% de las bacterias alcanzaron un rango de 1,0-1,5 y el 6,7% un IS mayor de 3,0 (Tabla 10).

**Tabla 5.** Características diferenciales de especies de *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. solubilizadoras de fosfato, identificadas en suelo rizosférico de *Zea mays* L. en Lambayeque, 2014

<b>Características diferenciales</b>	<b><i>P. aeruginosa</i></b>	<b><i>P. fluorescens</i></b>	<b><i>P. putida</i></b>	<b><i>P. stutzeri</i></b>	<b><i>B. cepacia</i></b>
Catalasa	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+
Fluoresceína en agar King B	+	+	+	-	-
Crecimiento a 4° C	-	+	-	-	-
Crecimiento a 42°C	+	-	-	-	+
Utilización del citrato	+	+	+	+	+
Descarboxilación de la lisina	-	+	+	-	+
Suceptibilidad a la polimixina	S	S	S	S	R
Producción de indol	-	-	-	-	+

**Tabla 6.** Frecuencia de especies de *Burkholderia* y *Pseudomonas* solubilizadoras de fosfato identificadas en suelo rizosférico de *Zea mays* L.

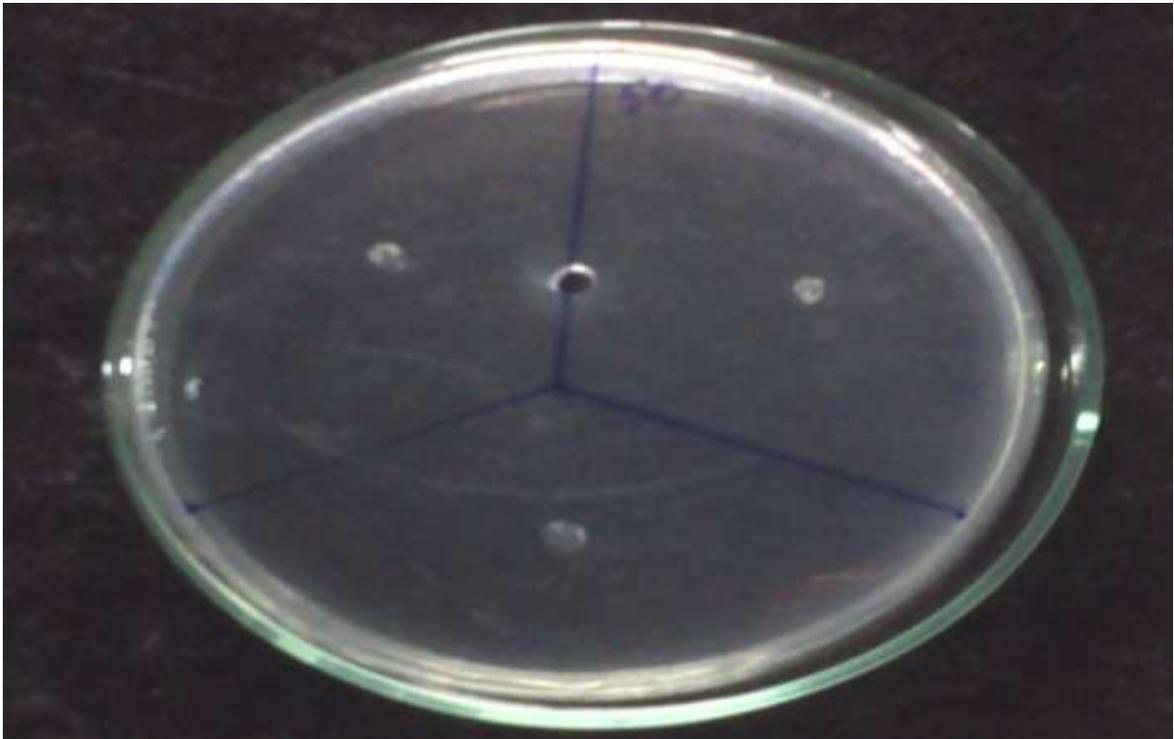
Bacterias	Cultivos	
	N°	%
<i>P. aeruginosa</i>	17	56,7
<i>P. fluorescens</i>	4	13,3
<i>P. stutzeri</i>	4	13,3
<i>P. putida</i>	3	10,0
<i>B. cepacia</i>	2	6,7



**Figura 32.** Halos de solubilización de *Pseudomonas* spp. en agar NBRIP con fosfato dicálcico.



**Figura 33.** Halos de solubilización de *Pseudomonas* spp. en agar NBRIP con fosfato tricálcico.



**Figura 34.** Colonias de *Pseudomonas* spp. en agar NBRIP con roca fosfórica de Bayóvar.

**Tabla 7.** Rango del área de solubilización por *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. nativas en agar NBRIP – fosfato dicálcico

Área de solubilización (rango, mm <sup>2</sup> )	Cultivos de bacterias	
	N°	%
12,0 - 24,0	4	33,3
24,1 - 36,0	4	33,3
36,1 - 48,0	1	8,3
48,1 - 60,0	1	8,3
>60,0	2	16,7

**Tabla 8.** Rango del área de solubilización por *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. nativas en agar NBRIP – fosfato tricálcico

Área de solubilización (rango, mm <sup>2</sup> )	Cultivos de bacterias	
	N°	%
0,2 - 15,2	14	46,7
15,3 - 30,2	8	26,7
30,3 - 45,2	1	3,3
45,3 - 60,2	3	10,0
>60,2	4	13,3

**Tabla 9.** Rango del índice de solubilización por *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. nativas en agar NBRIP – fosfato dicálcico

Índice de solubilización (rango)	Cultivos de bacterias	
	N°	%
2,00 - 2,15	1	8,3
2,16 - 2,30	3	25,0
2,31 - 2,75	7	58,3
2,76 - 3,00	0	0,0
>3,0	1	8,3

**Tabla 10.** Rango del índice de solubilización por *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. nativas en agar NBRIP – fosfato tricálcico

Índice de solubilización (rango)	Cultivos de bacterias	
	N°	%
1,0 - 1,5	18	60,0
1,6 - 2,0	1	3,3
2,1 - 2,5	8	26,7
2,6 - 3,0	1	3,3
>3,0	2	6,7

Los valores del índice de solubilización de fosfato tricálcico no presentaron distribución normal. La prueba no paramétrica de Kruskal Wallis (Anexo 9) demostró que el mayor valor se alcanzó con *P. fluorescens* 33, sin diferencias significativas con *B. cepacia* 56,60, *P. aeruginosa* 44, 41, 64, 43, 39, 42, 67, 54, 40, *P. fluorescens* 157 y *P. putida* 37 (Tabla 11).

#### **4.4 Fósforo soluble en medio NBRIP líquido**

El fósforo soluble en medio NBRIP líquido cultivado con *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. osciló entre 1,89 ppm con *P. aeruginosa* 10 y 7,72 ppm con *B. cepacia* 56 (Anexo 10). El 30,0% de las bacterias alcanzaron un rango de 1,0-3,0 ppm y el 3,3% más de 7,0 ppm de fósforo soluble (Tabla 12). Los valores de fósforo soluble no presentaron distribución normal y la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis (Anexo 11) demostró que el mayor valor se alcanzó con *B. cepacia* 56, no diferenciándose significativamente de *P. stutzeri* 50, 51, 52, 63, *P. aeruginosa* 57, 40, 59, 43, 44, *B. cepacia* 60, *P. fluorescens* 21, 33 y 104 (Tabla 13).

El 65% (13) de las 20 bacterias seleccionadas por alcanzar los mayores índices de solubilización en medio sólido, también presentaron los mayores valores en la concentración de fósforo soluble en medio líquido (Tabla 14). A su vez, el 60% (12) de las bacterias seleccionadas por alcanzar los mayores valores en la concentración de fósforo soluble, también presentaron los mayores índices de solubilización (Tabla 15).

**Tabla 11.** Prueba de kruskal Wallis del índice de solubilización de fosfato por *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. aisladas de la rizósfera de *Zea mays* L.

Tratamientos	IS	Significancia
<i>P. fluorescens</i> 33	3,50	a
<i>B. cepacia</i> 56	3,43	a b
<i>P. aeruginosa</i> 44	3,25	a b c
<i>P. aeruginosa</i> 41	3,25	a b c
<i>P. aeruginosa</i> 64	3,12	a b c d
<i>P. aeruginosa</i> 43	3,00	a b c d e
<i>P. aeruginosa</i> 39	3,00	a b c d e
<i>P. aeruginosa</i> 42	3,00	a b c d e f
<i>B. cepacia</i> 60	2,75	a b c d e f g
<i>P. aeruginosa</i> 67	2,50	a b c d e f g h
<i>P. aeruginosa</i> 54	2,50	a b c d e f g h i
<i>P. aeruginosa</i> 40	2,37	a b c d e f g h i
<i>P. fluorescens</i> 157	2,25	a b c d e f g h i j
<i>P. putida</i> 37	2,25	a b c d e f g h i j
<i>P. aeruginosa</i> 89	2,20	b c d e f g h i j k
<i>P. aeruginosa</i> 10	2,15	b c d e f g h i j k
<i>P. aeruginosa</i> 66	2,00	c d e f g h i j k
<i>P. fluorescens</i> 104	2,00	d e f g h i j k
<i>P. aeruginosa</i> 49	2,00	e f g h i j k
<i>P. aeruginosa</i> 34	2,00	e f g h i j k
<i>P. putida</i> 110	1,80	f g h i j k
<i>P. putida</i> 136	1,70	g h i j k
<i>P. stutzeri</i> 63	1,50	h i j k
<i>P. aeruginosa</i> 20	1,50	h i j k
<i>P. stutzeri</i> 51	1,50	i j k
<i>P. stutzeri</i> 50	1,25	j k
<i>P. fluorescens</i> 21	1,25	j k
<i>P. aeruginosa</i> 57	1,20	k
<i>P. stutzeri</i> 52	1,17	k
<i>P. aeruginosa</i> 59	1,10	k

**Tabla 12.** Rango de fósforo soluble en caldo NBRIP cultivado con *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp.

<b>Fósforo soluble (rango, ppm)</b>	<b>Cultivos de bacterias</b>	
	<b>N°</b>	<b>%</b>
1,0-3,0	9	30,0
3,1-5,0	13	43,3
5,1-7,0	7	23,3
>7,0	1	3,3

**Tabla 13.** Prueba de kruskal Wallis del fósforo soluble en caldo NBRIP cultivado con *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. aisladas de la rizósfera de *Zea mays* L.

Tratamientos	P (ppm)	Significancia
<i>B. cepacia</i> 56	7,72	a
<i>P. stutzeri</i> 50	6,39	a b
<i>P. stutzeri</i> 51	6,36	a b
<i>P. stutzeri</i> 52	6,34	a b
<i>P. stutzeri</i> 63	6,21	a b c
<i>P. aeruginosa</i> 57	5,99	a b c d
<i>P. fluorescens</i> 21	5,82	a b c d
<i>P. fluorescens</i> 33	5,36	a b c d e
<i>P. aeruginosa</i> 59	4,80	a b c d e f
<i>P. aeruginosa</i> 43	4,69	a b c d e f g
<i>B. cepacia</i> 60	4,50	a b c d e f g
<i>P. aeruginosa</i> 44	4,38	a b c d e f g h
<i>P. aeruginosa</i> 40	4,35	a b c d e f g h
<i>P. fluorescens</i> 104	4,14	a b c d e f g h i
<i>P. aeruginosa</i> 41	4,04	b c d e f g h i
<i>P. aeruginosa</i> 34	3,66	b c d e f g h i j
<i>P. aeruginosa</i> 54	3,47	c d e f g h i j k
<i>P. aeruginosa</i> 39	3,37	c d e f g h i j k
<i>P. aeruginosa</i> 64	3,24	d e f g h i j k
<i>P. aeruginosa</i> 42	3,23	d e f g h i j k
<i>P. aeruginosa</i> 67	3,01	e f g h i j k
<i>P. putida</i> 136	2,87	f g h i j k
<i>P. aeruginosa</i> 20	2,66	g h i j k
<i>P. putida</i> 110	2,48	h i j k
<i>P. aeruginosa</i> 49	2,46	h i j k
<i>P. aeruginosa</i> 66	2,46	h i j k
<i>P. putida</i> 37	2,41	h i j k
<i>P. fluorescens</i> 157	2,22	i j k
<i>P. aeruginosa</i> 89	2,16	j k
<i>P. aeruginosa</i> 10	1,89	k

**Tabla 14.** Fósforo soluble (ppm) en medio líquido cultivado con *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. seleccionadas por alcanzar los mayores índices de solubilización

Bacterias	Medio sólido	Medio líquido
	IS	P(ppm)
<i>P. fluorescens</i> 33	3,50	5,36
<i>B. cepacia</i> 56	3,43	7,72
<i>P. aeruginosa</i> 44	3,25	4,38
<i>P. aeruginosa</i> 41	3,25	4,04
<i>P. aeruginosa</i> 64	3,12	3,24
<i>P. aeruginosa</i> 43	3,00	4,69
<i>P. aeruginosa</i> 39	3,00	3,37
<i>P. aeruginosa</i> 42	3,00	3,23
<i>B. cepacia</i> 60	2,75	4,50
<i>P. aeruginosa</i> 67	2,50	3,01
<i>P. aeruginosa</i> 54	2,50	3,47
<i>P. aeruginosa</i> 40	2,37	4,35
<i>P. fluorescens</i> 157	2,25	2,22
<i>P. putida</i> 37	2,25	2,41
<i>P. aeruginosa</i> 89	2,20	2,16
<i>P. aeruginosa</i> 10	2,15	1,89
<i>P. aeruginosa</i> 66	2,00	2,46
<i>P. fluorescens</i> 104	2,00	4,14
<i>P. aeruginosa</i> 49	2,00	2,46
<i>P. aeruginosa</i> 34	2,00	3,66

**Tabla 15.** Índice de solubilización de *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. seleccionadas por alcanzar las mayores concentraciones (ppm) de fósforo soluble

Bacterias	Medio líquido	Medio sólido
	P(ppm)	IS
<i>B. cepacia</i> 56	7,72	3,43
<i>P. stutzeri</i> 50	6,39	1,25
<i>P. stutzeri</i> 51	6,36	1,50
<i>P. stutzeri</i> 52	6,34	1,17
<i>P. stutzeri</i> 63	6,21	1,50
<i>P. aeruginosa</i> 57	5,99	1,20
<i>P. fluorescens</i> 21	5,82	1,25
<i>P. fluorescens</i> 33	5,36	3,50
<i>P. aeruginosa</i> 59	4,80	1,10
<i>P. aeruginosa</i> 43	4,69	3,00
<i>B. cepacia</i> 60	4,50	2,75
<i>P. aeruginosa</i> 44	4,38	3,25
<i>P. aeruginosa</i> 40	4,35	2,37
<i>P. fluorescens</i> 104	4,14	2,00
<i>P. aeruginosa</i> 41	4,04	3,25
<i>P. aeruginosa</i> 34	3,66	2,00
<i>P. aeruginosa</i> 54	3,47	2,50
<i>P. aeruginosa</i> 39	3,37	3,00
<i>P. aeruginosa</i> 64	3,24	3,12
<i>P. aeruginosa</i> 42	3,23	3,00

## V. DISCUSIÓN

Las muestras de rizósfera de maíz fueron adecuadas para el aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfato, debido a que en esta zona las plantas liberan carbohidratos, producidos durante la fotosíntesis, que al ser exudados por las raíces, al ambiente, constituyen una fuente de nutrientes para los microorganismos (Moreno, 2012). La rizósfera es el volumen de suelo, unido a las raíces de las plantas, que se extiende de 1-5 mm de la superficie radical, donde la población de bacterias es 10-100 veces mayor que en el suelo no rizosférico (Lugtenberg & Kamilova, 2009), porque las potencialidades de estos microorganismos están restringidas a las zonas donde se encuentra asegurado el suministro de fuentes carbonadas para su metabolismo (Carreño, 2009).

Las bacterias solubilizadoras de fosfato se aislaron en agar Sundara Rao & Sinha Medium (SRSM) y National Botanical Research Institute (NBRI- P) con fosfato dicálcico y tricálcico, respectivamente. Estas bacterias son detectadas en medios de cultivo líquidos y sólidos con fosfato insoluble en solución. En medios líquidos la positividad se evidencia por el aclaramiento del medio (Vázquez *et al.*, 2000) y en medios sólidos por una zona clara o halo formado alrededor de la colonia del microorganismo (Patiño & Sánchez, 2012; Tejera *et al.*, 2013). La producción microbiana de ácidos orgánicos es considerada el mecanismo fundamental de la solubilización del fosfato mineral. La oxidación periplasmática directa de glucosa a ácido glucónico y a menudo ácido 2-cetoglucónico, constituye

la base metabólica de este proceso en algunas bacterias Gram negativas (Cordero *et al.*, 2008). La síntesis de ácidos orgánicos se asocia al metabolismo de carbohidratos como la glucosa, vía glucólisis y ciclo de Krebs (Sánchez *et al.*, 2012).

El agar SRSM además del fosfato dicálcico contiene glucosa como fuente de carbono, sulfato de amonio y extracto de levadura como fuentes de nitrógeno, cloruro de amonio y potasio para regular la presión osmótica y otros compuestos como sulfato de magnesio y sulfato de hierro como cofactores enzimáticos (Bobadilla & Rincón, 2008). El fosfato dicálcico también fue utilizado por Carreño (2009), Barba & Bravo (2013), Dávila & Linares (2013) y León (2014), observando halos de solubilización por *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. aisladas de maíz, tomate, pallar, malezas, piñón blanco y tomate. El agar NBRIP, además del fosfato tricálcico, contiene glucosa, sulfato de amonio, cloruro de magnesio y cloruro de potasio (Beracochea, 2011). El fosfato tricálcico también fue utilizado por Vázquez *et al.* (2000); Bobadilla & Rincón (2008) y García & Alvarez (2012), observando halos de solubilización por *Pseudomonas* spp. aisladas de manglares, compost y suelos calcáreos.

Las bacterias Gram negativas predominaron frente a las Gram positivas, entre las bacterias solubilizadoras de fosfato nativas. De igual manera, Carreño (2009) obtuvo 122 aislados de maíz, entre los que 63,1% fue Gram negativo. Asimismo, Lara *et al.* (2011) determinaron 95% de bacilos Gram negativos en las bacterias solubilizadoras de fosfato aisladas de muestras de rizósfera, rastrojos, malezas y materia orgánica en descomposición.

El mayor porcentaje de bacterias Gram negativas solubilizadoras de fosfato y mayor diámetro en el halo de solubilización, correspondieron al agar NBRIP con fosfato tricálcico. La superioridad es explicada por la solubilidad en agua de la fuente de fósforo utilizada. Cuanto más insoluble, mayor es la visibilidad del halo de solubilización. El fosfato tricálcico tiene una solubilidad de 0,003% y el fosfato dicálcico de 0,02% (Boatella *et al.*, 2004). En agar SRSM, el diámetro máximo de los halos de solubilización fue de 11 mm, superando el rango 9-10 mm reportado

por Becerra & Gil (2009) y Cadena & Martínez (2011), para *Pseudomonas* spp. aisladas de maíz. En agar NBRIP, el diámetro máximo de los halos fue 13 mm, superando el rango reportado por Lara *et al.* (2011).

Después de dos subcultivos todas las bacterias Gram negativas conservaron su capacidad para solubilizar fosfato, superando el valor de 79,26% reportado por Carreño (2009) para bacterias aisladas de maíz, tomate y pallar. Este investigador explicó que como consecuencia de la pérdida de plásmidos asociados a la utilización de los azúcares no se sintetizaron los ácidos requeridos para la disolución del fosfato insoluble y tampoco se visualizó el halo transparente alrededor de las colonias. Similares resultados se observaron en bacterias aisladas de la rizósfera de maíz (Dávila & Lloclla, 2004).

Los bacilos Gram negativos fueron caracterizados fenotípicamente, coincidiendo con Barba & Bravo (2013), Dávila & Linares (2013) y León (2014). Inicialmente fueron agrupados como fermentadores y no fermentadores. Entre éstos últimos están incluidos mayoritariamente *Burkholderia* y *Pseudomonas* y además *Cupriavidus*, *Acinetobacter* y *Stenotrophomonas*, que también se aíslan de suelo rizosférico (Lisboa & Segura, 2012; Farro & Graus, 2013). *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. se diferencian porque en su mayoría son positivos en la prueba de oxidasa (Barba & Bravo, 2013), a diferencia de *Acinetobacter* y *Stenotrophomonas*, que son negativos (Farro & Graus, 2013).

*Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. fueron identificadas como solubilizadoras de fosfato, coincidiendo con Barba & Bravo (2013), Dávila & Linares (2013) y León (2014). Las especies identificadas fueron *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. stutzeri*, *P. putida* y *B. cepacia*, coincidiendo con Vázquez *et al.* (2000), Beracochea (2011), Sánchez *et al.* (2012) y Barba & Bravo (2013). Las bacterias identificadas como *Burkholderia* mostraron resistencia a la polimixina, descarboxilaron lisina y no formaron fluoresceína, a diferencia de las especies de *Pseudomonas* fluorescentes como *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. aureofaciens*, *P. chlororaphis* y *P. aeruginosa*. Los pigmentos pioverdina y fluoresceína son

sustancias hidrosolubles, que al ser expuestos a la luz, absorben longitud de onda corta y emiten luz fluorescente de onda larga (Botelho & Mendoca ; 2006).

Las especies fluorescentes se reconocieron en el medio King B o Agar Pseudomonas F, que contiene glicerina y fosfatos como potenciadores de la síntesis de fluoresceína (Cadena & Martínez, 2011). En este medio, los pigmentos no fluorescentes difusibles se observan con luz blanca y los pigmentos fluorescentes con luz ultravioleta (García & Álvarez, 2012). El género *Pseudomonas* predominó frente a *Burkholderia* spp. coincidiendo con Barba & Bravo (2013) y Dávila & Linares (2013) en aislados de bacterias Gram negativas de la rizósfera de malezas y piñón blanco, respectivamente. *Burkholderia* es un género relativamente nuevo, porque mediante el análisis de secuencias del ARNr 16S estas bacterias clasificadas antiguamente como *Pseudomonas*, ahora son agrupadas en los géneros *Burkholderia* y *Ralstonia* (Martín, 2011). La especie tipo es *B. cepacia*, de considerable atención por su diversidad genética y se le ha reportado como solubilizadora de fosfato asociada a maíz (Espinoza *et al.*, 2009).

*Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. se identificaron en los bacilos Gram negativos aislados de la rizósfera de maíz, coincidiendo con Aguado & Moreno (2008), Becerra & Gil (2009), Cadena & Martínez (2011). *Pseudomonas* junto a *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus* y *Streptomyces* forman parte de la comunidad microbiana de la rizósfera de los cultivos de maíz, siendo *Pseudomonas* el género predominante con  $7,3 \times 10^6$  ufc g<sup>-1</sup>. Las especies de *Pseudomonas* presentan características que les permiten adaptarse con facilidad en diferentes agroecosistemas, destacándose por su corto periodo de latencia, rápida velocidad de crecimiento y capacidad de metabolizar una amplia gama de sustancias carbonadas exudadas por las raíces de las plantas (Hernández *et al.*, 2003).

*Pseudomonas* spp. proliferan cerca de las raíces, pero también se comportan como endófitas, ingresando a los tejidos de las raíces, colonizando pelos radicales y células corticales, así como también el tejido vascular de los tallos (Shishido *et al.*, 1999 ; Botelho & Mendoca, 2006), pero las *Pseudomonas* fluorescentes son más abundantes en la rizósfera (Botelho & Mendoca, 2006).

*Pseudomonas* spp. interaccionan con la planta en cuatro zonas : superficie foliar colonizada por *Pseudomonas* epífitas, superficie radical con *Pseudomonas* rizosféricas, espacios intercelulares en hojas y raíces con *Pseudomonas* endofíticas (Preston, 2004).

Los valores del índice y área de solubilización de fosfato fueron diferentes en todas las especies de *Burkholderia* y *Pseudomonas*. Estas características fueron investigadas porque permiten seleccionar bacterias para la obtención de biofertilizantes (García & Álvarez, 2012). La variabilidad fue evidente inclusive en bacterias de la misma especie. En este contexto, Chen *et al.* (2006) observaron diferencias en el IS de dos cepas de *B. megaterium*, determinando que sólo uno de ellos presentaba el mecanismo de producción de ácidos orgánicos para la solubilización de fosfato.

El índice de solubilización fue determinado con dos fuentes de fósforo: fosfato dicálcico y fosfato tricálcico. En el medio NBRIP con roca fosfórica de Bayóvar no se observaron halos de solubilización, pero si colonias de *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. Se coincide con LLenque & Melendez (2011) y Escobar & Horna (2013), quienes reportaron desarrollo de bacterias en agar SRSM y Pikovskaya con roca fosfórica de Bayóvar, observando viraje del indicador, pero no halo de solubilización. Al respecto, Quitral (2005) mencionó que las técnicas de agar fosfato precipitado son útiles para aislar microorganismos solubilizadores, pero tienen sensibilidad limitada, porque la tasa de difusión de los ácidos orgánicos excretados, tasa de crecimiento de la colonia, así como la solubilidad de fuente de fósforo afectan el tamaño del halo.

La constante de producto de solubilidad (Kps) determina la observación del halo, siendo la roca fosfórica más difícil de solubilizar. En este contexto, García & Álvarez (2012) aislaron bacterias solubilizadoras de fosfato, determinando que 9,25% solubilizó fosfato tricálcico y solo 0,55% solubilizó roca fosfórica. El índice de solubilización de fosfato máximo fue 3,5 con *P. fluorescens* 33 y 3,43 con *B. cepacia* 56, superando los IS reportados por Beracochea (2011) y García &

Álvarez (2012) para *P. fluorescens* (2,9), *Burkholderia* (1,4) y *Pseudomonas sp.* (3,05).

En cuanto al área de solubilización máxima fue 78,5 mm<sup>2</sup> con *P. aeruginosa* 42 y 56,7 mm<sup>2</sup> con *B. cepacia* 56, valores inferiores a 186,4 mm<sup>2</sup> registrado por García & Álvarez (2012) para *Pseudomonas sp.* Estos investigadores explicaron que el área de solubilización permite diferenciar bacterias con similares IS, es decir una colonia bacteriana de menor diámetro puede presentar el mismo IS que una colonia con mayor diámetro, seleccionándose la de mayor área como promisoría para ser utilizada en la biofertilización.

Con las bacterias aisladas de suelo rizosférico de maíz se cuantificó hasta 7,72 ppm de fósforo soluble con *B. cepacia* 56 y 6,39 ppm con *P. stutzeri* 50, superando 7,31 ppm registrado por León (2014) para *Pseudomonas sp.* aisladas de la rizósfera de tomate ; sin embargo, también se han registrado valores de 11,43-14,33 ppm (Barba & Bravo, 2013 y Dávila & Linares, 2013), e inclusive 74,55 ppm (García & Álvarez, 2012) en aislados de malezas, piñón blanco y suelos calcáreos, respectivamente.

Los mayores valores en el IS en medio sólido, no necesariamente correspondieron a las bacterias con las mayores concentraciones de fósforo soluble en medio líquido, coincidiendo con Carreño (2009) y Cadena & Martínez (2011). En este contexto, Cordero *et al.* (2008) mencionaron que se han encontrado resultados contradictorios entre el método de detección del halo en placas y cálculo del IS, con la solubilización de fosfato en medio líquido, tal que bacterias no productoras de halo, solubilizan fosfato en medio líquido. Por esta razón, se recomienda investigar la solubilización de fosfato en medio sólido y líquido, con la perspectiva de seleccionar bacterias para la obtención de biofertilizantes (Carreño, 2009; Cordero *et al.*, 2008).

## VI. CONCLUSIONES

- Las bacterias solubilizadoras de fosfato se aislaron de muestras de suelo rizosférico de maíz.
- Los géneros *Burkholderia* y *Pseudomonas* se identificaron en las bacterias solubilizadoras de fosfato, correspondiendo 56,7% a *P. aeruginosa*; 13,3% a *P. fluorescens*; 13,3% a *P. stutzeri*; 10% a *P. putida* y 6,7% a *B. cepacia*.
- Los índices de solubilización de fosfato en medio sólido fueron de 2,0-3,5 con fosfato dicálcico y 1,1-3,5 con fosfato tricálcico.
- El fósforo soluble en medio líquido fue 1,89-7,72 ppm.

## VII. RECOMENDACIONES

- Caracterizar a nivel molecular *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp.
- Determinar el efecto de *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. solubilizadoras de fosfato en el desarrollo vegetativo de maíz y otros cultivos agrícolas en condiciones de invernadero.
- Determinar el efecto de *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. solubilizadoras de fosfato en el desarrollo vegetativo de maíz y otros cultivos agrícolas en condiciones de campo.

## VIII. RESUMEN

El fósforo es un elemento esencial para las biomoléculas; sin embargo, en el suelo su disponibilidad es mínima, siendo limitante para los cultivos agrícolas. Con el objetivo de determinar las características de *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. solubilizadoras de fosfato se colectaron 150 muestras de suelo rizosférico de *Zea mays* L. “maíz”. Con el suelo rizosférico se realizaron dos diluciones decimales en solución salina esterilizada y alícuotas se sembraron en agar Sundara, Rao & Sinha Medium (SRSM) y agar National Botanical Research Institute (NBRIP) con  $1 \text{ g PL}^{-1}$ , correspondiente a  $5,6 \text{ gL}^{-1}$  de fosfato dicálcico y  $5,0 \text{ gL}^{-1}$  de fosfato tricálcico, respectivamente, como fuentes de fósforo inorgánico insoluble. Las bacterias solubilizadoras de fósforo se reconocieron por las zonas transparentes formadas alrededor de las colonias, determinándose el índice de solubilización con fosfato dicálcico, fosfato tricálcico y roca fosfórica de Bayóvar y el fósforo soluble en medio líquido NBRIP. Los géneros *Burkholderia* y *Pseudomonas* se identificaron en las bacterias solubilizadoras de fosfato, correspondiendo 56,7% a *P. aeruginosa*; 13,3% a *P. fluorescens*; 13,3% a *P. stutzeri*; 10% a *P. putida* y 6,7% a *B. cepacia*. Los índices de solubilización de fosfato en medio sólido fueron 2,0-3,5 con fosfato dicálcico y 1,1-3,5 con fosfato tricálcico. El fósforo soluble en medio líquido fue 1,89-7,72 ppm. Se demostró el potencial de *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. como biofertilizantes.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguado, S. (Ed.). (2012). *Introducción al Uso y Manejo de los Biofertilizantes en la Agricultura*. México. Recuperado de [www.inifap.gob.mx](http://www.inifap.gob.mx)
- Aguado, A. & Moreno, B. (2008). *Potencial de bioinoculantes microbianos como una alternativa para reducir costos de fertilización en maíz de temporal*. Primer Premio a la Innovación Tecnológica, Guanajuato, Memorias, Inifap.
- Alvarez, P. (2012). *Selección y evaluación de microorganismos solubilizadores de fosfatos en suelos calcáreos del valle del Mantaro*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.
- Alvitres, V. (2000). *Método Científico. Planificación de la Investigación*. 2da ed. Lambayeque: Editorial Ciencia.
- Apáes, P., Escalante, J., Ramírez, P., Sosa, E., Olalde, V. & Koch, S. (2013). Eficiencia agronómica de nitrógeno y fósforo en la Producción de frijol chino en espaldera de maíz. *Revista Brasileira de Agroecología*, 31(4) ,287-293.
- Barba, S. & Bravo, R. (2013). *Especies de Burkholderia y Pseudomonas aisladas de la rizósfera de malezas y su potencial como promotores del crecimiento de plantas en Lambayeque*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Baziramakenga, R., Simard, R. & Leroux, G. (1995). Determination of organic acids in soil extracts by ion chromatography. *Soil Biology & Biochemistry*, 27(3), 349-356.

- Becerra, M. & Gil, L. (2009). *Efecto de Pseudomonas spp. solubilizadoras de fósforo en el desarrollo vegetativo de "maíz" (Zea mays L.) en Ferreñafe, Lambayeque*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Becerra, J., Quintero, D., Martínez, M. & Matiz, A. (2011). Caracterización de microorganismos solubilizadores de fosfato aislados de suelos destinados al cultivo de uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 5(2), 195-208.
- Beracochea, M. (2011). *Respuesta de variedades comerciales de maíz (Zea mays L.) a la inoculación en bacterias endófitas-diazotrofas nativas*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- Boatella, J., Codony, R. & López, P. (2004). *Química y bioquímica de los alimentos II*. España: Publicacions I Edicions de la Universitat de Barcelona.
- Bobadilla, C. & Rincón, C. (2008). *Aislamiento y evaluación de fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenidos de residuos de plaza*. (Tesis de Licenciatura). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Botelho, G. & Mendoca-Hagler, L. (2006). Fluorescent Pseudomonads associated with the rhizosphere of crops-an overview. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37, 401-416.
- Brenner, D., Krieg, N. & Staley, J. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria*, 2(2).USA: Springer.
- Cadena, S. & Martínez, B. (2011). *Caracterización de cepas de Pseudomonas spp. y su efecto en la germinación y emergencia de Zea mays L. "maíz" en Lambayeque*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Carreño, C. (2009). *Efecto de la inoculación de bacterias nativas solubilizadoras de fósforo en el desarrollo y rendimiento de tres cultivos agrícolas en Mochumí, Lambayeque, Perú*. (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú.

- Chen, Y., Rekha, P., Arun, A., Shen, F., Lai, W. & Young, C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from tropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*, 34, 33 – 41.
- Cordero, J., Ortega, P. & Ortega, E. (2008). La inoculación de plantas con *Pantoea* sp., bacteria solubilizadora de fosfatos, incrementa la concentración de P en los tejidos foliares. *Revista Colombiana Biotecnología*, X (1), 11-120.
- Coyne, M. (2000). *Microbiología del suelo. Un enfoque exploratorio*. Madrid, España: Editorial Paraninfo.
- Dávila, J. & Linares, V. (2013). *Especies de Burkholderia y Pseudomonas aisladas de la rizósfera de Jatropha curcas L. piñón blanco y su potencial como promotoras del crecimiento de plantas en Lambayeque*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Dávila, A. & Lloclla, H. (2004). *Consortio microbiano solubilizadores de fósforo aislados de suelos agrícolas*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Escobar, C. & Horna, Y. (2013). *Caracterización de cepas nativas de Azotobacter spp. y su potencial como promotoras del desarrollo vegetativo de "tomate" (Lycopersicon esculentum Mill.)*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Espinoza, D., Lopez, L. & De la Cruz, A. (2009). Use of 16S rRNA gene for characterization of phosphate –solubilizing bacteria associated with corn. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32 (1), 31-37.
- Farro, O. & Graus, R. (2013). *Potencial como promotoras del crecimiento de plantas de las enterobacterias aisladas de la rizósfera de malezas asociadas a Zea mays L. "maíz" en Lambayeque*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Fernández, M. & Rodríguez, H. (2005). El papel de la solubilización de fósforo en los biofertilizantes microbianos. *ICIDCA*, 39(3), 27-34.
- Fernández, L., Zalba, P., Gómez, M. & Sagardoy, M. (2005). Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Ciencia Suelo*, 23(1).

- García, S., & Alvarez, P. (2012). *Selección y evaluación de microorganismos solubilizadores de fosfatos en suelos calcáreos del Valle del Mantaro*. Lima, Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Gaspár, L. & Tejerina, W. (2012). *Fertilización del cultivo de maíz*. Argentina. Recuperado de [www.agroestrategias.com](http://www.agroestrategias.com)
- Gonzales, J. (2001). *Efectos de la fertilización N-P-K en el rendimiento y calidad del choclo en la parte baja del valle Chancay*. (Tesis Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Gyaneshwar, P., Naresh, G., Kumar, L., Parekh, J. & Poole, P. (2002). Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil*, 245, 83–93
- Hernández, R., Fernández, C. & Baptista, P. (2003). *Metodología de la Investigación*. México: Mc Graw Hill Interamericana Editores S.A.
- Lara, C., Esquivel, L. & Negrete, J. (2011). Bacterias nativas solubilizadoras de fosfatos para incrementar los cultivos en el departamento de Córdoba-Colombia. *Revista Biotecnología Agropecuaria y Agroindustrial*, 9(2), 114-120.
- León, C. (2014). *Pseudomonas spp. aisladas de la rizósfera de Lycopersicon esculentum Mill. "tomate" y su potencial como promotoras del crecimiento de plantas en Lambayeque*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Lisboa, C. & Segura, S. (2012). *Rendimiento de polihidroxicanoatos de cepas de Cupriavidus necator aisladas de rizósfera de Zea mays "maíz", en Reque, Lambayeque*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Llenque, D. & Meléndez, P. (2011). *Efecto de bacterias nativas solubilizadoras de roca fosfórica de Bayóvar en el desarrollo de Zea mays L. "maíz" en invernadero*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Lugtenberg, B. & Kamilova, F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, 541–556.

- Martín, A. (2011). *Efecto de la inoculación del hongo de la micorrización *Tuber melanosporum* y la rizobacteria *Pseudomonas fluorescens* en la calidad de la plántula de *Pinus halepensis**. (Tesis de Licenciatura). Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, España.
- Moreno, B. (2012). La rizósfera y las relaciones entre las plantas y los microorganismos. En S. Aguado (Ed.). *Introducción al Uso y Manejo de los Biofertilizantes en la Agricultura* (pp. 23-30). Recuperado de [www.inifap.gob.mx](http://www.inifap.gob.mx)
- Muleta, D., Assefa, F., Börjesson, E. & Granhall, U. (2013). Phosphate solubilising rhizobacteria associated with *Coffea arabica* L. in natural coffee forests of southwestern Ethiopia. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 12, 73–84.
- Municipalidad Distrital de Reque. (2013). Recuperado de <http://www.munireque.gob.pe/>
- Otero, V. (2011). *Aislamiento, selección e identificación de actinomicetos, bacterias fotosintéticas no sulfurosas y bacterias ácido lácticas con potencial biofertilizante a partir de suelos asociados al cultivo de plátano en la Costa Atlántica Colombiana*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Paredes, M. & Espinoza, D. (2010). Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfatos: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana*, 28(1), 61-70.
- Patiño, C. & Sánchez, M. (2012). Aislamiento e identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos, habitantes de la rizósfera de chontaduro (*Bactris gassipaes kunth*). *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10(2), 177-187.
- Pérez, E., Sulbaran, M., Ball, M. & Yarzabal, L. (2007). Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. *Journal Soil Biology & Biochemistry*, 39, 2905–2914.

- Preston, G. (2004). Plant perceptives of plant growth-promoting *Pseudomonas*. *Proceedings of The Royal Society*, 359, 907-918.
- Quitral, A. (2005). *Solubilización de roca fosfórica por hongos rizosféricos aislados de especies forrajeras de importancia en la X Región de Chile*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Austral de Chile, Chile.
- Rico, M. (2009). *Capacidad promotora de crecimiento vegetal por bacterias del género Azotobacter y actinomicetos aislados de cultivos de Solanum tuberosum Linnaeus, 1753 (papa) cultivados en zonas altoandinas del Perú*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Rodier, J. & Rodi, L. (2005). *Análisis de aguas*. España: Ediciones Omega.
- Sánchez, D., Gómez, R., Garrido, M. & Bonilla, R. (2012). Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(7), 1401- 1415.
- Scervino, M., Prieto, M., Ivana, M., Recchi, M., Sarmiento, N. & Godeas, A. (2010). Soil fungal isolates produce different organic acid patterns involved in phosphate salts solubilization. *Biology and Fertility of Soils*, 46, 755–763.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SAGARPA. (2010). Uso de fertilizantes. México. Recuperado de <http://www.sagarpa.gob.mx/>
- Shishido, M., Breuil, C. & Chanway, C. (1999). Endophytic colonization of spruce by plant growth promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 29,191–196.
- Tejera, B., Heydrich, M. & Rojas, M. (2013). Aislamiento de *Bacillus* solubilizadores de fosfatos asociados al cultivo de arroz. *Agronomía Mesoamericana*, 24(2), 357-364.
- Tisdale, S., Nelson, W., Beaton, J. & Havlin, J. (1993). *Soil fertility and fertilizers*. 5 ed. New York, USA: Ediciones MacMilan.

Vázquez, P., Holguin, G., Puente, M., López, A. & Bashan, Y. (2000). Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biology and Fertility of Soils*, 30(1), 400-408.

## X. ANEXOS

## ANEXO 1

### Cálculo del número de muestras para el aislamiento de bacterias solubilizadoras de fósforo

Se tomó una prevalencia del 50% y se realizó el cálculo según la fórmula expuesta por Alvitres (2000).

$$n = \frac{Z^2 \cdot p \cdot q}{t^2}$$

$$n = \frac{(1,96)^2 (0,50 \cdot 0,50)}{(0,08)^2}$$

$$n = 150,06 \text{ muestras}$$

Dónde:

n = Tamaño de muestra

Z = 1,96 ( $\alpha = 0,05$ ); valor estándar

P = tasa de prevalencia (0,50). Presencia de *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. solubilizadoras de fosfato en rizósfera de maíz

q = 1-p, ausencia (0,50)

t = error estimado (0,08)

## ANEXO 2

### Medios de cultivo para el aislamiento, identificación y mantenimiento de bacterias solubilizadoras de fosfato

#### a. Agar Sundara Rao Sinha Medium, SRSM (en Vázquez *et al.*, 2000)

Componentes	g/L
Glucosa	10,0
Fosfato dicálcico	5,0
Sulfato de amonio	0,5
Cloruro de potasio	0,2
Sulfato de magnesio	0,3
Sulfato de manganeso	0,004
Sulfato de hierro	0,002
Cloruro de sodio	5,0
Extracto de levadura	0,5
Púrpura de bromocresol	0,1
Agar agar	15
Agua destilada en cantidad suficiente	1000 mL
pH	7,2

Como fuente de fósforo ( $1\text{gL}^{-1}$ ) se puede usar fosfato dicálcico, fosfato tricálcico y roca fosfórica de Bayóvar.

#### b. Medio de cultivo National Botanical Research Institute, NBRIP (en Beracochea, 2011)

Componentes	g/L
Glucosa	10,0
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	5,0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25
KCl	0,2
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5,0
Agar agar	15,0
Agua destilada en cantidad suficiente	1000 mL

El medio NBRIP así como el SRSM fueron suplementados con 45 mg de Fluconazol. Se disolvió una cápsula de 150 mg en 10 mL de alcohol al 95% y se agregaron 2 mL del antibiótico disuelto por litro de medio de cultivo.

**c. Agar tripticasa soya, TSA (en León, 2014)**

Componentes	g/L
Triptona	15,0
Peptona	5,0
Extracto de levadura	3,0
Glucosa	5,0
Cloruro de sodio	5,0
Agar agar	15,0
Agua destilada	1000 mL

### ANEXO 3

#### Cálculo de fosfato dicálcico, tricálcico y roca fosfórica de Bayóvar ( $1\text{gL}^{-1}$ de fósforo)

##### 3.1 Fosfato dicálcico $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

$$\text{PM} = 172$$

$$172 \longrightarrow 31 \text{ de P}$$

$$x \longrightarrow 1 \text{ de P}$$

$$x = 5,55 \text{ g}$$

Agregar 5,6 g de  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  para tener 1 g de fósforo por litro de medio de cultivo.

##### 3.2 Fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

$$\text{PM} = 310$$

$$310 \longrightarrow 62 \text{ de P}$$

$$x \longrightarrow 1 \text{ de P}$$

$$x = 5,0 \text{ g}$$

Agregar 5,0 g de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  para tener 1 g de fósforo por litro de medio de cultivo.

##### 3.3 Roca fosfórica de Bayóvar

a.

$$142 \text{ g P}_2\text{O}_5 \longrightarrow 62 \text{ g de P}$$

$$x \longrightarrow 1 \text{ g de P}$$

$$x = 2,290322 \text{ g P}_2\text{O}_5$$

b. Roca fosfórica tiene 30% de  $\text{P}_2\text{O}_5$

$$2,290322 \text{ g P}_2\text{O}_5 \longrightarrow 30 \text{ g}$$

$$x \longrightarrow 100 \text{ g}$$

$$x = 7,634408 \text{ g de roca fosfórica}$$

Agregar 7,634408 g de roca fosfórica a 1 L de medio para tener  $1\text{gL}^{-1}$  de fósforo.

## ANEXO 4

### Método colorimétrico del Molibdato para cuantificar fósforo soluble (Rodier & Rodi, 2005)

#### a. Fundamento

En medio ácido y en presencia de molibdato amónico, los ortofosfatos forman un complejo fosfomolibdico que, reducido por el ácido ascórbico, desarrolla una coloración azul susceptible de una determinación colorimétrica y cuya aparición se acelera utilizando el catalizador emético, tartrato doble de antimonio y potasio.

#### b. Limpieza de los recipientes de vidrio

Para la limpieza del material de vidrio no utilizar detergentes que contengan fosfato. Lavarlos con ácido clorhídrico diluido y enjuagarlos cuidadosamente con agua destilada.

#### c. Reactivos

- **Solución de ácido sulfúrico 5N**

Ácido sulfúrico (d=1.84)	14 mL
Agua destilada hasta enrase	100 mL
  
- **Solución de molibdato amónico 4 %** 20 mL
  
- **Solución de ácido ascórbico**

Ácido ascórbico	1,76 g
Agua destilada hasta enrase	100 mL
  
- **Solución de emético (preparar al momento del uso)**

Tartrato doble de antimonio y potasio	0.0274
	g
Agua destilada hasta enrase	100 mL
  
- **Reactivo para determinación de ortofosfatos**

Ácido sulfúrico 5 N	40 mL
Solución de molibdato amónico	12 mL
Solución de ácido ascórbico	24 mL
Solución de emético	4 mL

- **Solución madre de 0,2 mgL<sup>-1</sup> de fósforo**  
Fosfato monopotásico previamente desecado en estufa a 877 g  
100 °C:  
Agua destilada hasta enrase 100 mL
- **Solución hija de 2 mgL<sup>-1</sup> de fósforo**  
Diluir 1 mL de solución madre en 99 de agua destilada (1/100)

#### d. Preparación de la curva de calibración

Colocar en una serie de matraces aforados de 25 mL:

Número de matraces	T	I	II	III
Solución salina de fósforo de 2 mgL <sup>-1</sup> (mL)	0	1	2	5
Agua bidestilada (mL)	20	19	18	15
Reactivo indicador (mL)	4	4	4	4
Agua destilada hasta enrase (mL)	25	25	25	25
Correspondencia de fósforo en mgL <sup>-1</sup>	0	0,1	0,2	0,5

Esperar 20 minutos y efectuar las lecturas en el espectrofotómetro a la longitud de onda de 690 nm en cubetas de 10 cm. Construir la curva de calibración. Los datos de la absorbancia corregida se analizan mediante regresión lineal con el programa Microsoft Excel 2010 para obtener la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) que deberá ser mayor a 0,9 para demostrar una dispersión homogénea de los valores sobre la recta.

#### e. Procedimiento para cuantificar fosfatos en la muestra

Introducir 20 mL de la muestra a analizar en un matraz aforado de 25 mL. Añadir 4 mL de reactivo indicador, completar el volumen a 25 mL con agua destilada. Esperar 20 minutos y efectuar la lectura en el espectrofotómetro de luz visible, con una longitud de onda de 690 nm. Tener en cuenta el valor leído para el testigo. Obtener los resultados en la curva de calibración. Para una muestra de 20 mL, la curva indica el contenido de fósforo expresado en miligramos por litro.

## ANEXO 5

### Área de solubilización (mm<sup>2</sup>) de *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. nativas en agar NBRIP-fosfato dicálcico

Bacteria código	Diámetro de halo (mm)	Área de solubilización (mm <sup>2</sup> )
<i>P. aeruginosa</i> 64	10,0	78,5
<i>P. aeruginosa</i> 42	10,0	78,5
<i>B. cepacia</i> 56	8,5	56,7
<i>P. aeruginosa</i> 41	7,5	44,2
<i>P. aeruginosa</i> 43	6,0	28,3
<i>P. aeruginosa</i> 44	6,0	28,3
<i>P. fluorescens</i> 33	6,0	28,3
<i>P. fluorescens</i> 157	6,0	28,3
<i>P. aeruginosa</i> 49	5,0	19,6
<i>P. aeruginosa</i> 54	5,0	19,6
<i>P. aeruginosa</i> 34	5,0	19,6
<i>B. cepacia</i> 60	4,0	12,6

## ANEXO 6

### Área de solubilización (mm<sup>2</sup>) de *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. nativas en agar NBRIP-fosfato tricálcico

Bacteria Código	Diámetro de halo (mm)	Área de solubilización (mm <sup>2</sup> )
<i>P. aeruginosa</i> 42	10,0	78,5
<i>P. fluorescens</i> 33	10,0	78,5
<i>P. aeruginosa</i> 41	9,0	63,6
<i>P. aeruginosa</i> 44	9,0	63,6
<i>B. cepacia</i> 56	8,5	56,7
<i>P. aeruginosa</i> 64	8,5	56,7
<i>P. aeruginosa</i> 43	8,0	50,2
<i>B. cepacia</i> 60	7,0	38,5
<i>P. aeruginosa</i> 67	6,0	28,3
<i>P. aeruginosa</i> 54	6,0	28,3
<i>P. aeruginosa</i> 40	5,5	56,7
<i>P. aeruginosa</i> 49	5,0	19,6
<i>P. fluorescens</i> 157	5,0	19,6
<i>P. putida</i> 37	5,0	19,6
<i>P. aeruginosa</i> 89	5,0	19,6
<i>P. aeruginosa</i> 10	4,8	18,1
<i>P. fluorescens</i> 104	4,0	12,6
<i>P. aeruginosa</i> 66	4,0	12,6
<i>P. aeruginosa</i> 34	4,0	12,6
<i>P. aeruginosa</i> 39	3,0	7,1
<i>P. putida</i> 110	2,2	3,8
<i>P. putida</i> 136	2,1	3,5
<i>P. aeruginosa</i> 57	1,0	0,8
<i>P. fluorescens</i> 21	1,0	0,8
<i>P. stutzeri</i> 51	1,0	0,8
<i>P. stutzeri</i> 52	1,0	0,8
<i>P. stutzeri</i> 50	1,0	0,8
<i>P. stutzeri</i> 63	1,0	0,8
<i>P. aeruginosa</i> 20	1,0	0,8
<i>P. aeruginosa</i> 59	0,5	0,2

## ANEXO 7

### Índice de solubilización (%) de *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. nativas en agar NBRIP-fosfato dicálcico

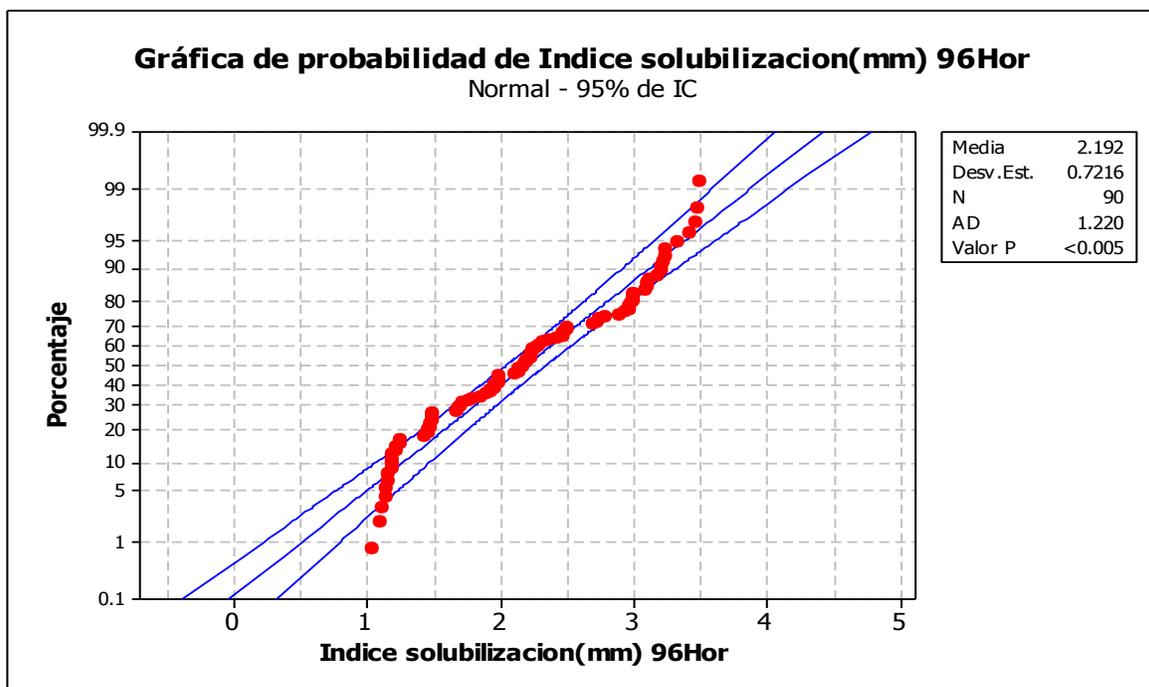
Bacteria código	Colonia + halo (diámetro, mm)	Colonia (diámetro, mm)	Índice de solubilización (%)
<i>P. aeruginosa</i> 64	14,0	4,0	3,50
<i>P. aeruginosa</i> 41	12,0	4,5	2,67
<i>B. cepacia</i> 56	14,0	5,5	2,55
<i>P. aeruginosa</i> 42	10,0	4,0	2,50
<i>P. aeruginosa</i> 43	10,0	4,0	2,50
<i>P. aeruginosa</i> 44	10,0	4,0	2,50
<i>P. fluorescens</i> 33	10,0	4,0	2,50
<i>P. fluorescens</i> 157	10,0	4,0	2,50
<i>P. aeruginosa</i> 49	9,0	4,0	2,25
<i>P. aeruginosa</i> 54	9,0	4,0	2,25
<i>P. aeruginosa</i> 34	9,0	4,0	2,25
<i>B. cepacia</i> 60	8,0	4,0	2,00

## ANEXO 8

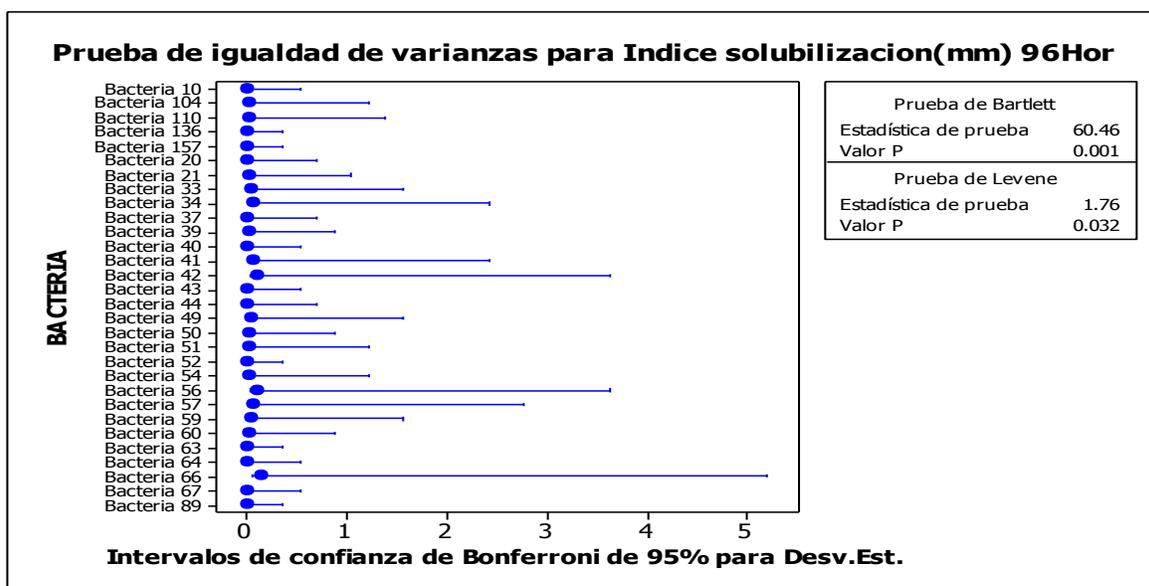
### Índice de solubilización (%) de *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. nativas en agar NBRIP-fosfato tricálcico

Bacteria código	Colonia + halo (diámetro, mm)	Colonia (diámetro, mm)	Índice de Solubilización (%)
<i>P. fluorescens</i> 33	14,0	4,0	3,50
<i>B. cepacia</i> 56	12,0	3,5	3,43
<i>P. aeruginosa</i> 41	13,0	4,0	3,25
<i>P. aeruginosa</i> 44	13,0	4,0	3,25
<i>P. aeruginosa</i> 64	12,5	4,0	3,12
<i>P. aeruginosa</i> 39	6,0	2,0	3,00
<i>P. aeruginosa</i> 42	15,0	5,0	3,00
<i>P. aeruginosa</i> 43	12,0	4,0	3,00
<i>B. cepacia</i> 60	11,0	4,0	2,75
<i>P. aeruginosa</i> 54	10,0	4,0	2,50
<i>P. aeruginosa</i> 67	10,0	4,0	2,50
<i>P. aeruginosa</i> 40	9,5	4,0	2,37
<i>P. putida</i> 37	9,0	4,0	2,25
<i>P. fluorescens</i> 157	9,0	4,0	2,25
<i>P. aeruginosa</i> 89	10,3	4,7	2,20
<i>P. aeruginosa</i> 10	10,1	4,7	2,15
<i>P. fluorescens</i> 104	8,0	4,0	2,00
<i>P. aeruginosa</i> 49	10,0	5,0	2,00
<i>P. aeruginosa</i> 66	8,0	4,0	2,00
<i>P. aeruginosa</i> 34	8,0	4,0	2,00
<i>P. putida</i> 110	6,0	3,4	1,80
<i>P. putida</i> 136	6,0	3,6	1,70
<i>P. stutzeri</i> 51	6,0	4,0	1,50
<i>P. aeruginosa</i> 20	6,0	4,0	1,50
<i>P. stutzeri</i> 63	6,0	4,0	1,50
<i>P. fluorescens</i> 21	5,0	4,0	1,25
<i>P. stutzeri</i> 50	5,0	4,0	1,25
<i>P. aeruginosa</i> 57	6,0	5,0	1,20
<i>P. stutzeri</i> 52	7,0	6,0	1,17
<i>P. aeruginosa</i> 59	5,0	4,5	1,10

## ANEXO 9



Prueba de normalidad para el índice de solubilización de fosfato dicálcico y tricálcico por *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. aisladas de suelo rizosférico de *Zea mays* L. en Reque, 2014



Prueba de homogeneidad de varianza para el índice de solubilización de fosfato dicálcico y tricálcico por *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. aisladas de suelo rizosférico de *Zea mays* L. en Reque, 2014

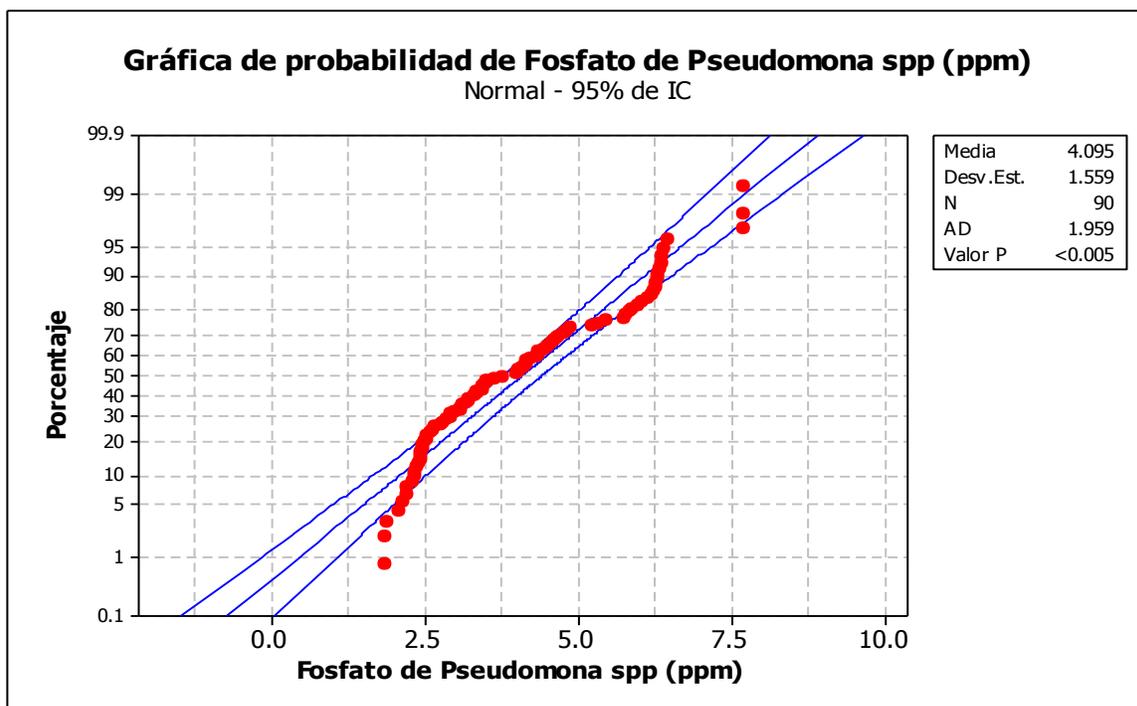
## ANEXO 10

### Fósforo soluble (ppm) de *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. nativas\* en caldo NBRIP- fosfato tricálcico

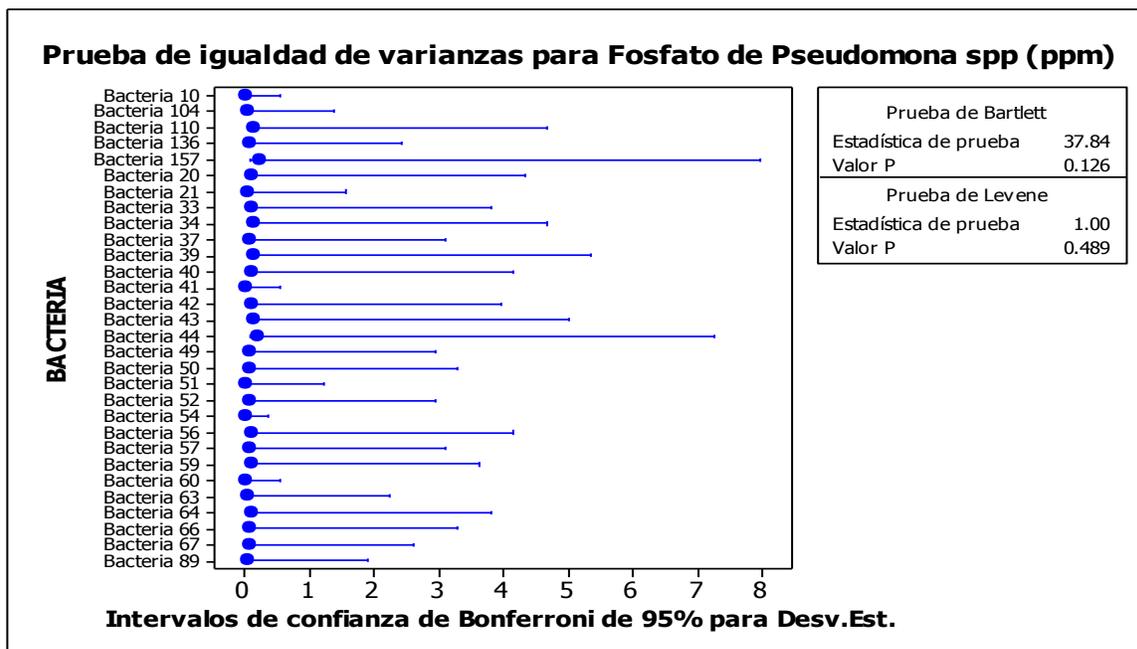
Bacteria	Fósforo (ppm)
<i>B. cepacia</i> 56	7,72
<i>P. stutzeri</i> 50	6,39
<i>P. stutzeri</i> 51	6,36
<i>P. stutzeri</i> 52	6,34
<i>P. stutzeri</i> 63	6,21
<i>P. aeruginosa</i> 57	5,99
<i>P. fluorescens</i> 21	5,82
<i>P. aeruginosa</i> 40	5,36
<i>P. aeruginosa</i> 59	4,80
<i>P. aeruginosa</i> 43	4,69
<i>B. cepacia</i> 60	4,50
<i>P. aeruginosa</i> 44	4,38
<i>P. fluorescens</i> 33	4,35
<i>P. fluorescens</i> 104	4,14
<i>P. aeruginosa</i> 41	4,04
<i>P. aeruginosa</i> 34	3,66
<i>P. aeruginosa</i> 54	3,47
<i>P. aeruginosa</i> 39	3,37
<i>P. aeruginosa</i> 64	3,24
<i>P. aeruginosa</i> 42	3,23
<i>P. aeruginosa</i> 67	3,01
<i>P. putida</i> 136	2,87
<i>P. aeruginosa</i> 20	2,66
<i>P. putida</i> 110	2,48
<i>P. aeruginosa</i> 49	2,46
<i>P. aeruginosa</i> 66	2,46
<i>P. putida</i> 37	2,41
<i>P. fluorescens</i> 157	2,22
<i>P. aeruginosa</i> 89	2,16
<i>P. aeruginosa</i> 10	1,89

\*Promedio de tres repeticiones

## ANEXO 11



Prueba de normalidad para el fósforo soluble en medio líquido cultivado con *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. aisladas de suelo rizosférico de *Zea mays* L. en Reque, 2014



Prueba de homogeneidad de varianza para el fósforo soluble cultivado con *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. aisladas de suelo rizosférico de *Zea mays* L. en Reque, 2014