

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATOS, HABITANTES DE LA RIZÓSFERA DE CHONTADURO (*B. gassipaes kunth*)

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PHOSPHATE-SOLUBILIZING BACTERIA INHABITING THE RIZHOSPHERE OF PEACH PALM (*B. gassipaes kunth*)

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DA FOSFATO, HABITANTES DA RIZÓSFERA DE CHONTADURO (*B. gassipaes kunth*)

CARLOS PATIÑO TORRES¹, MARINA SÁNCHEZ DE PRAGER²

RESUMEN

El chontaduro o pejiyabe (Bactris gasipaes Kunth) es una especie nativa de las selvas húmedas del pacífico colombiano, adaptada a condiciones de alta acidez y deficiencia de nutrientes, especialmente fósforo (P), características dominantes en los suelos de esta zona tropical. Los microorganismos rizosféricos solubilizadores de P, entre ellos las bacterias (BSP), contribuyen a mejorar la disponibilidad de este nutriente, por ello, la necesidad de aislarlos, reconocerlos e identificarlos en la rizosfera, como uno de los mecanismos de adaptación de esta especie. Una vez aisladas y purificadas en medio libre de fuentes de fósforo orgánico e inorgánico solubles, las poblaciones bacterianas se identificaron mediante la utilización del análisis de las secuencias DNAr 16S y la técnica BOX-PCR, estableciendo que

Recibido para evaluación: 25/01/2012. **Aprobado para publicación:** 29/07/2012

1 Ph.D. Docente auxiliar ECAPMA – Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD
2 Ph. D. Profesora titular Universidad Nacional de Colombia sede Palmira

Correspondencia: cpatinot@yahoo.com

en el sitio de estudio, las poblaciones dominantes fueron *Burkholderia ambifaria* y *Burkholderia* sp. 383, seguidas por *Pseudomonas putida*, especies reconocidas globalmente por su actividad solubilizadora, y como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR).

ABSTRACT

The chontaduro or pejiyabe (Bactris gasipaes Kunth), is a species native of rainforest of Colombian's Pacific Coast, adapted to soils with high acidity and depleted in nutrients, especially phosphorus. The phosphate solubilizing microorganisms, including bacteria (BSP), improve the availability of this nutrient, therefore, the need to isolate, recognize and identify those in the rhizosphere, as one of the mechanisms of adaptation of this species. Once isolated and purified in medium free of sources of soluble phosphorus, bacterial populations were identified using sequence analysis of 16S rDNA and molecular genotyping by BOX-PCR, stating that in the study site, the dominant populations were Burkholderia ambifaria and B. sp. 383, followed by Pseudomonas putida, species recognized globally for its solubilizing activity, and as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR).

RESUMO

Do chontaduro ou pejiyabe (Bactris gasipaes Kunth) é uma espécie nativa da florestas úmidas do pacífico colombiano, adaptados às condições de alta acidez e deficiência de nutrientes, especialmente fósforo (P), características dominantes no solo de esta zona tropical. Microrganismos do solo com capacidade de solubilizar fosfatos naturais, incluindo as bactérias, contribuir para melhorar a disponibilidade de nutrientes presente, por conseguinte, não existe necessidade de isolar as, reconhecer e identificar-los na rizosfera, como um dos mecanismos de adaptação do presente espécies. Uma vez que tenham sido isoladas e purificadas em meio livre de fontes de P orgânicos e inorgânicos solúveis, populações bacterianas foram identificadas pela utilização da análise das sequências do extracromossomo DNA r 16S e a técnica BOX-PCR, que estabelece que a área de estudo, a população dominante foram: Burkholderia ambifaria e B. sp. 383, seguido por Pseudomonas putida, espécies reconhecidas mundialmente para sua atividade solubilizadora, e como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP).

PALABRAS CLAVE:

Solubilización de fosfatos, Fósforo del suelo, PGPR, Biofertilizantes.

KEY WORDS:

Phosphate solubilization, Soil phosphorus, Rhizosphere.

PALAVRAS-CHAVE:

Solubilização de fosfatos, Fósforo do solo, RPCP, Biofertilizantes.

INTRODUCCIÓN

En el mundo, los suelos ácidos ocupan cerca de 3.95 billones de hectáreas, correspondientes al 30% de la superficie terrestre [1, 2], mientras en Colombia, representan más del 80% del territorio [3]. En general, estos suelos son deficientes en fósforo (P) disponible para los cultivos, debido a

su elevada capacidad de fijación, determinada por: a) los altos contenidos de hierro y aluminio, los cuales al combinarse con el P precipitan como sales insolubles, y b) por la presencia de hidróxidos y sesquióxidos, sobre cuyas superficies se adsorbe el elemento.

La baja disponibilidad de P en el suelo conlleva una mala nutrición de las plantas, por cuanto el nutriente se supe normalmente con la aplicación de fertilizantes de síntesis química y roca fosfórica. Sin embargo, los impactos ambientales de esta práctica y el agotamiento inminente de las reservas globales de la roca fosfórica [4, 5], son razones que impulsan la búsqueda de alternativas sostenibles que permitan satisfacer los requerimientos de P de los cultivos en la agricultura moderna.

En el trópico, a pesar de la baja disponibilidad del P, los ecosistemas naturales mantienen una enorme y diversa biomasa vegetal, que sugiere la existencia de mecanismos capaces de regular el ciclo biogeoquímico de los nutrientes, en particular el P. Tales mecanismos incluyen las funciones metabólicas de los microorganismos del suelo y/o de las mismas plantas, a través de interacciones complejas que ocurren en la rizósfera [6, 7, 8]. De hecho, es amplio el registro de la diversidad de bacterias [9], incluidas actinobacterias [10], y de hongos [11], asociados o no a las raíces de las plantas, que hacen disponibles las diferentes formas químicas del P del suelo mediante procesos de solubilización de las fuentes minerales y/o mineralización de las formas orgánicas [11, 12].

Desde 1903, cuando se registró que algunos microorganismos tenían capacidad de solubilizar el P en el suelo y se sugirió que ellos podrían jugar papel importante en la nutrición fosfórica de las plantas, se han hecho numerosos avances en la comprensión de los mecanismos responsables del proceso y en el conocimiento de la biodiversidad microbiana con tal capacidad [1, 11, 12]. Actualmente, se considera la solubilización de fosfatos como una característica clave de los microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPR).

En relación con los mecanismos, la mineralización del P orgánico depende de la secreción de enzimas fosfatasa (principalmente fitasas), mientras la solubilización a partir de fuentes minerales como fosfatos mono y dibásicos (especialmente del tipo de las apatitas), está ligada a la producción de ácidos inorgánicos, ácidos

orgánicos y/o a la liberación de protones, productos del metabolismo primario del organismo solubilizador [1, 7].

Como tecnología aplicada, las primeras aplicaciones masivas en campo de inoculantes con capacidad solubilizadora de P se efectuaron en la antigua Unión Soviética en los años cincuenta, con resultados sorprendentes. La aplicación de kaolinita impregnada con esporas de *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* llevó a incrementos de hasta 70% en la producción de los cultivos. Con la aplicación de fosfobacterina, nombre dado a este bioinoculante, también se obtuvieron resultados positivos en suelos de la India deficientes en P, pero fueron negativos en los Estados Unidos [1]. En Cuba, Fosforina® es un bioinoculante a base de *Pseudomonas fluorescens* aplicado principalmente en tomate [13]. En Colombia, actualmente se comercializa Fosfosol®, producto de la investigación que sobre microorganismos solubilizadores de P (MSP) se hace en la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, cuyo ingrediente activo es *Penicillium janthinellum*. Está dirigido especialmente al cultivo del arroz, produciendo incrementos del rendimiento entre el 5 y el 38% con respecto a cultivos no inoculados [14].

No obstante, y a pesar de las potencialidades ambientales y económicas implícitas en el uso de los MSP como biofertilizantes, aún son escasos los estudios básicos que respalden la tecnología, especialmente en el trópico [1, 13]. Tampoco es amplia su adopción por parte de los productores, campesinos y técnicos.

El presente trabajo busca contribuir al conocimiento de la diversidad bacteriana solubilizadora de P asociada a la rizósfera del chontaduro, cultivo de importancia en la región tropical del Pacífico colombiano. Las posibilidades de establecimiento de un proceso biotecnológico a partir del conocimiento de las BSP, requiere que se genere información acerca de la eficiencia, estabilidad genotípica de los microorganismos objeto de estudio y su identificación filogenética. Por ello, la evaluación de estas tres variables, bajo condiciones *in vitro*, constituyen el objetivo de este trabajo, como paso previo a la estimación de su eficacia en condiciones de invernadero y campo.

MÉTODO

A partir de las raíces de cuatro plantas de chontaduro (*B. gassipaes* Kunth) en edad productiva, seleccionadas

aleatoriamente y crecidas bajo condiciones de bosque natural en un suelo del corregimiento del Bajo Calima, en el municipio de Buenaventura (Valle del Cauca), se tomaron submuestras de suelo rizosférico (partículas adheridas al rizopiano), las cuales se mezclaron y homogenizaron para conformar una muestra de 200 g de suelo, recogida en bolsas plásticas, almacenada en nevera de icopory transportada al Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira.

En agua destilada estéril se efectuaron diluciones seriales de la muestra de suelo hasta 10^{-5} . En medio de cultivo Pikovskaya (PVK) (en g L⁻¹: glucosa, 10; Ca₃(PO₄)₂, 5; (NH₄)₂SO₄, 0,5; NaCl, 0,2; MgSO₄·7H₂O, 0,1; KCl, 0,2; extracto de levadura, 0,5; MnSO₄·H₂O, 0,002; FeSO₄·7H₂O, 0,002; agar, 15), a partir de las diluciones 10^{-3} a 10^{-5} se hicieron aislamientos por estría sobre 4 placas de Petri/dilución. El halo transparente que se formó alrededor de las colonias, en la medida que ocurrió la solubilización, constituyó el indicador de actividad. Los aislamientos obtenidos se purificaron y conservaron sobre el mismo medio, para análisis posteriores. En todos los casos, los cultivos microbianos se mantuvieron en incubadora a 28 °C y luz artificial.

Índice de eficiencia solubilizadora de fosfatos (ESF)

Esta variable hace referencia a la capacidad relativa de los microorganismos de utilizar como sustrato las fuentes insolubles de este nutriente, tornándolas disponibles en el medio. Para ello, los aislamientos obtenidos, se evaluaron a los cinco días después de sembrados. La medida del índice ESF se hizo sobre 4 repeticiones por cada aislamiento. El índice ESF se calculó por la relación (11) (Ec. 1):

$$ESF = \frac{\text{Área del halo de solubilización}}{\text{Área de crecimiento de la colonia}} \quad (\text{Ec. 1})$$

Estabilidad de la capacidad solubilizadora

Para verificar la permanencia en el tiempo de la capacidad solubilizadora, cada uno de los aislamientos obtenidos, se sometió a cinco resiembras consecutivas en PVK y evaluación de ESF en cada etapa (11). Los tratamientos generados a partir de cada uno de los aislamientos, se dispusieron en un diseño completamente al azar. El ANAVA se efectuó en el programa IBM SPSS Statistics 19. Para la comparación de medias se utilizó la prueba Tukey ($\alpha=0,05$).

Identificación filogenética de los aislamientos

Se hizo a través del análisis de las secuencias del gen ADNr 16S: Para el aislamiento y purificación del ADN genómico de los aislados se utilizó el Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA), utilizando los protocolos sugeridos por el fabricante. El gen ADNr 16S en cada uno de los aislados se amplificó con los primer bacterianos universales fD1 y rD1 (15): fD1: (5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), y, rD1: (5'-CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3').

En todos los casos, la PCR fue efectuada en un volumen de reacción de 15 μ l, conteniendo: 1 μ l de ADN genómico (como molde en concentración de 10 ng/ μ l), 7,5 μ l de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 1 μ l de cada primer (a una concentración de 10 pmoles/ μ l cada uno) y 4,5 μ l de agua libre de nucleasas. La reacción de termociclaje consistió de un paso de denaturalización de 95°C (2 min), seguido por 30 ciclos de 95°C (30 s), 50°C (aislados 1, 2, 4 y 6) o 65°C (aislados 3, 5 y 7) (30 s), 72°C (4 min), y un paso final de elongación de 72°C (5 min). Las temperaturas de los anillajes se determinaron como las más adecuadas por ensayos previos.

Para verificar la calidad del amplición, los productos de amplificación se corrieron en un gel de agarosa (0,8%) durante 40 min y un voltaje de 65 V. Una vez hecha la electroforesis los geles se visualizaron con ayuda de un transiluminador. Los amplicones obtenidos de cada uno de los siete aislamientos se secuenciaron en los dos sentidos 5' a 3' y 3' a 5' y las secuencias se ensamblaron utilizando el software Geneious® v.4,8.4. La secuencia ensamblada se analizó utilizando la herramienta BLAST (Blastn, Megablastn) en varias bases de datos disponibles en Internet (Database 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea), GenBank; 16S rRNA gene database, Greengenes; Pseudomonas Genome Database; Burkholderia Genome Database) (cuadro 2).

Perfilamiento molecular de las cepas

Con el objetivo de diferenciar las cepas adscritas a una misma clasificación filogenética, se efectuó un perfilamiento molecular a través de la técnica BOX-PCR [16].

Para obtener el ADN genómico de las diferentes cepas se utilizó el protocolo ya descrito. La reacción de amplificación del elemento BOX se hizo con la misma mezcla de reacción usada para la amplificación del gen RNA 16S, excepto que el cebador utilizado fue el BOX A1R (16): 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'. Las condiciones y tiempos del termociclaje fueron descritas por Seo and Tsuchiya (17). Los amplicones BOX se corrieron en un gel de agarosa (1,5%), durante 90 minutos y un voltaje de 75 V. Los patrones electroforéticos se visualizaron en un transiluminador, y se analizaron con ayuda del software TotalLab ® TL120 1D. Para comprobar la robustez y reproducibilidad de la técnica, la corrida de los amplicones BOX se efectuó dos veces, en días distintos, bajo las mismas condiciones experimentales.

RESULTADOS

Aislamiento de BSFy estimación de la eficiencia de solubilización

Se obtuvieron 22 aislamientos bacterianos con capacidad para hacer disponible el P a partir de fosfato tricálcico. Al establecer la estabilidad fenotípica de su capacidad solubilizadora se encontró que, a la quinta resiembra, sólo siete aislados conservaron esta cualidad, los cuales se escogieron para adelantar los ensayos de eficiencia solubilizadora. Estos se denominaron UNBS1 a UNBS7.

Los siete aislamientos presentaron diferencias estadísticas significativas en su valor de ESF y la prueba de Tukey permitió discriminar tres grupos (Cuadro1, Figura 1). Los aislados UNBS7, UNBS5 y UNBS2 no se diferenciaron estadísticamente y presentaron los mayores valores deESF, y por tanto mayor eficiencia solubilizadora, mientras la cepa UNBS1 fue la de menor halo de solubilización.Los aislamientos UNBS3 y UNBS4no se diferenciaron estadísticamente en su valor ESF del aislado UNBS1.

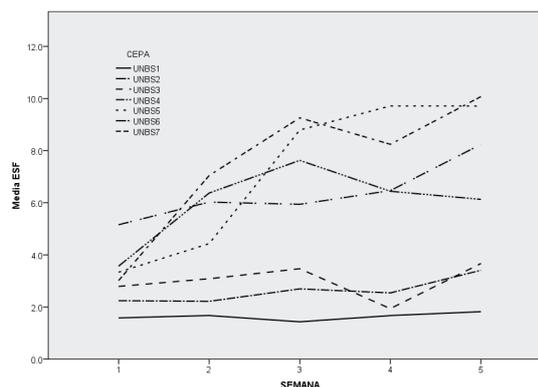
Se encontró que la resiembra sucesiva de los aislados durante cinco semanas llevó a un aumento en el valor de ESF en algunos de ellos (Figura 1), especialmente en UNBS7, UNBS5 y UNBS2.

Cuadro 1. Valores de Eficiencia Solubilizadora de Fosfatos (ESF) para los aislamientos bacterianos residentes de la rizósfera de chontaduro

AISLAMIENTO	N	Subconjunto		
		1	2	3
UNBS1	19	1,64718729		
UNBS4	19	2,57995969		
UNBS3	18	2,97467219		
UNBS6	17		5,90359738	
UNBS2	19		6,42917313	6,42917313
UNBS5	20		7,19740018	7,19740018
UNBS7	17			8,01584549

Medias de los grupos de subconjuntos homogéneos, obtenidas para cinco ciclos de resiembra.
 DHS de Tukey ($\alpha=0,05$)

Figura 1. Evolución de los valores ESF de los aislados durante cinco ciclos consecutivos de resiembra. Las fotos muestran el fenotipo solubilizador de fosfato de uno de los aislamientos, detectado por la presencia de halo.



Análisis de secuencias rDNA 16S de las BSF

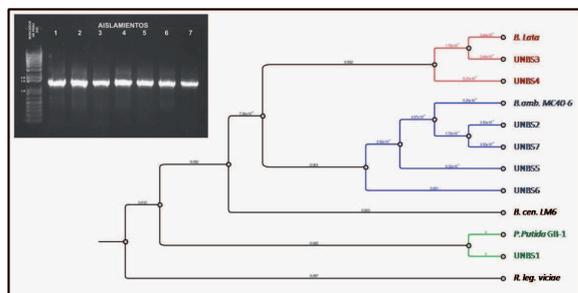
El análisis de las secuencias de ADNr 16S amplificadas (Figura 2) demostró muy alta similitudde secuencia entre los aislados UNBS2, UNBS5, UNBS6 y UNBS7 y las secuencias de ADNr 16s de *Burkholderiaambifaria* MC60-4 (>99%)(Cuadro 2),(Números de accesoión CP001025.1, CP001026.1 y CP001027.1 de la base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

Las secuencias ADNr 16S de los aislamientos UNBS3 y UNBS4 mostraron alta homología a las secuencias correspondientes de *Burkholderia* sp. 383 (>99%) (Números de accesoión CP00152.1, y CP00151.1 de la base de datos de secuencias del NCBI, cromosomas 2

Cuadro 2. Correspondencia taxonómica de los aislamientos según análisis BLAST en varias bases de datos

AISLAMIENTO	Mejor alineación	E value	Identidad nucleotídica (%)	Base de datos
UNBS1	<i>Pseudomonasputida</i> strain GB-1	0,0	96,00%	Database 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea), GenBank
	<i>Pseudomonasputida</i> strain GB-1	0,0	96,03%	16S rRNA gene database, Greengenes
	<i>Pseudomonasputida</i> strain GB-1	0,0	99,30%	PseudomonasGenomeDatabase
UNBS2	<i>Burkholderiaambifaria</i> MC40-6	0,0	99,52%	Database 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea), GenBank
	<i>Burkholderiaambifaria</i> MC40-6	0,0	99,66%	16S rRNA gene database, Greengenes
	<i>Burkholderiaambifaria</i> MC40-6	0,0	99,73%	http://genome.jgi-psf.org/
	<i>Burkholderiaambifaria</i> MC40-6	0,0	99,73%	BurkholderiaGenomeDatabase
UNBS3	<i>Burkholderiasp.</i> 383	0,0	99,66%	Database 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea), GenBank
	<i>Burkholderiasp.</i> 383	0,0	99,66%	16S rRNA gene database, Greengenes
	<i>Burkholderiasp.</i> 383	0,0	99,80%	http://genome.jgi-psf.org/
	<i>Burkholderiasp.</i> 383	0,0	99,80%	BurkholderiaGenomeDatabase
UNBS4	<i>Burkholderiasp.</i> 383	0,0	99,52%	Database 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea), GenBank
	<i>Burkholderiasp.</i> 383	0,0	99,66%	16S rRNA gene database, Greengenes
	<i>Burkholderiasp.</i> 383	0,0	99,79%	http://genome.jgi-psf.org/
	<i>Burkholderiasp.</i> 383	0,0	99,66%	BurkholderiaGenomeDatabase
UNBS5	<i>Burkholderiaambifaria</i> MC40-6	0,0	99,46%	Database 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea), GenBank
	<i>Burkholderiaambifaria</i> MC40-6	0,0	99,46%	16S rRNA gene database, Greengenes
	<i>Burkholderiaambifaria</i> MC40-6	0,0	99,79%	http://genome.jgi-psf.org/
	<i>Burkholderiaambifaria</i> MC40-6	0,0	99,66%	BurkholderiaGenomeDatabase
UNBS6	<i>Burkholderiaambifaria</i> MC40-6	0,0	99,72%	Database 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea), GenBank
	<i>Burkholderiaambifaria</i> MC40-6	0,0	99,73%	16S rRNA gene database, Greengenes
	<i>Burkholderiaambifaria</i> MC40-6	0,0	99,80%	http://genome.jgi-psf.org/
	<i>Burkholderiaambifaria</i> MC40-6	0,0	99,80%	BurkholderiaGenomeDatabase
UNBS7	<i>Burkholderiaambifaria</i> MC40-6	0,0	99,53%	Database 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea), GenBank
	<i>Burkholderiaambifaria</i> MC40-6	0,0	99,79%	16S rRNA gene database, Greengenes
	<i>Burkholderiaambifaria</i> MC40-6	0,0	99,79%	http://genome.jgi-psf.org/
	<i>Burkholderiaambifaria</i> MC40-6	0,0	99,79%	BurkholderiaGenomeDatabase

Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa (0,8%) de los amplicones del gen DNAr 16S de los aislamientos UNBS1 (1) a UNBS7 (7)



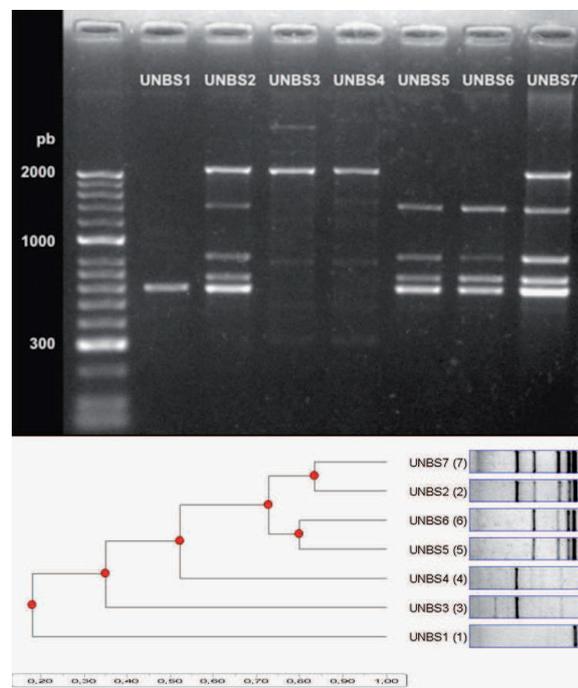
El dendrograma (Método UPGMA) se generó a partir de las secuencias DNAr 16S amplificadas, en Geneious® 4.8.4, y muestra las cepas tipo de referencia, cuyas secuencias se obtuvieron a partir del número de accesión en el GenBank.

y 1, secuencias completas). Los perfiles BOX-PCR de estos mismos aislados apoyan también su identidad como taxón distinto de las cepas de *B. ambifaria* MC60-4. Por su parte, el aislamiento UNBS1 mostró mayor homología de secuencia con *Pseudomonas putida* cepa GB-1 ($\approx 96\%$) (Número de accesión CP000926,1 de la base de datos de secuencias del NCBI, secuencia completa), y el perfil BOX-PCR demostró igualmente mayor nivel de divergencia taxonómica en relación con los demás aislados.

Aunque el análisis de la secuencia ADNr 16S no permitió distinguir como diferentes los aislados UNBS2, UNBS5, UNBS6 y UNBS7, el perfil BOX-PCR (Figura 3) demostró que los aislados UNBS2 y UNBS7 pertenecen a una misma cepa, mientras los aislados UNBS5 y UNBS6 corresponden a otra distinta, dentro de la especie *B. ambifaria* (Figura 3). Igual situación se presentó para los aislados UNBS3 y UNBS4, los cuales demostraron ser cepas diferentes de la especie *Burkholderia* sp. 383. A pesar de que la prueba de siembra en medio PVK permitió obtener 22 aislamientos en una primera oportunidad, 15 (quince) no fueron estables en su capacidad solubilizadora, como se demostró por la desaparición del halo de solubilización en las resiembras consecutivas. Este hecho corrobora la importancia, cuando se seleccionan cepas, de efectuar la confirmación de la estabilidad del fenotipo solubilizador por varios ciclos de siembra consecutivos, que garanticen una base genética que se exprese en el fenotipo.

Al evaluar la ESF de los siete aislados restantes,

Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa de patrones de perfiles moleculares BOX-PCR de ADN genómico de los aislados UNBS1 a UNBS7



El recuadro inferior muestra el dendrograma generado en TotalLab® TL120 utilizando el método UPGMA.

estables en su capacidad solubilizadora, se encontró un aumento en el índice de eficiencia de la solubilización a través de cinco ciclos de resiembra, lo que indicaría, probablemente, la selección positiva de una característica determinada genéticamente.

Analizados filogenéticamente, los siete aislamientos presentaron alta similitud con *Burkholderia* (excepto UNBS1) y cuatro de ellos (UNBS2, UNBS5, UNBS6 y UNBS7) con *Burkholderia ambifaria*. UNBS1 mostró mayor homología de secuencia con *Pseudomonas putida* cepa GB-1.

Burkholderia es un género con alta versatilidad metabólica, que agrupa 58 especies reconocidas formalmente (18, 19, 20). En el presente estudio, *Burkholderia ambifaria* se registra por primera vez en la zona pacífica de Colombia, como habitante de la rizósfera de plantas silvestres de chontaduro, crecidas sin ningún tipo de manejo agronómico. Previamente, Marino *et al.*, [23], aislaron *Bacillus* sp. y *Gordonia* sp. como microorganismos BSP, a partir de las raíces de este cultivo, en un suelo de Brasil.

Los diferentes miembros del género *Burkholderia* registrados como organismos solubilizadores/mineralizadores de P en el suelo y la rizósfera de muchas plantas, deben su capacidad a distintos mecanismos. Caballero-Mellado *et al.* [21] señalaron a la producción de ácidos orgánicos por parte de varias cepas diazotróficas de *Burkholderia*, aisladas de la rizósfera y el rizoplasma de tomate, como la causada de la solubilización del fósforo mineral en ensayos *in vitro*. En el caso de *B. tropica*, los mismos investigadores presumen la existencia de un mecanismo desconocido, adicional a la producción de ácidos orgánicos, como responsable de la solubilización. Delvasto *et al.* [24], demostraron que *Burkholderia caribensis* FeGL03 produjo ácido glucónico como principal ácido orgánico en medios de cultivo que contenían fosfato tricálcico como única fuente de P, igualmente, Songet *al.* [25], identificaron ácido glucónico en un cultivo de *Burkholderia cepacia*, que contenía mineral triturado de hierro, proveniente de una mina, como fuente de P.

Además de su capacidad solubilizadora, el complejo *B. cepacia* tiene otras características que hacen de sus miembros alternativas promisorias como agentes PGPR. Actúan eficientemente como agentes de biocontrol, tienen alta capacidad degradativa de compuestos xenobióticos, son productores de compuestos reguladores del crecimiento vegetal, particularmente giberelinas y AIA [26, 27] y producen ACC deaminasa, enzima implicada en la hidrólisis del ACC, compuesto que sirve como precursor inmediato de la síntesis del etileno por las plantas [21, 27].

De especial relevancia para aplicaciones agrobiotecnológicas, es el hecho que varias especies de *Burkholderia* no incluidas [21, 28] y también pertenecientes [22] al complejo *B. cepacia*, tienen la capacidad de fijar N₂. Además, los miembros de *Burkholderia* compiten ventajosamente por los exudados radicales y de la semilla [22], lo cual les confiere ventajas competitivas en éste nicho, característica clave para que una cepa pueda considerarse un inoculante efectivo.

Al igual que *Burkholderia*, *Pseudomonas* ha sido aislado en todas partes del mundo, a partir de diferentes ambientes [29]. Presenta alta gama de capacidades metabólicas, que le hacen que compita con éxito en todos los nichos en que habita. En su interacción con las plantas, *Pseudomonas* puede

tener efectos perjudiciales, pero en la mayoría de los casos, su acción propicia el crecimiento y desarrollo vegetal [30]. Debido a que los exudados radicales y la superficie radical determinan un nicho que favorece las poblaciones altamente competitivas de *Pseudomonas*, la raíz de las plantas es un reservorio natural de este género [31].

Hay revisiones intensivas sobre los efectos de fitoestimulación, biocontrol y biofertilización, entre otros, que ejercen varias especies de *Pseudomonas* sobre diferentes cultivos [30,31, 32, 33], así como sus aplicaciones ambientales [34, 35]. Actividades registradas para miembros de las pseudomonadas fluorescentes son la producción de AIA, de ACC deaminasa, de sideróforos y de compuestos con actividad antifúngica, además de la secreción de quitinasas, celulasas y proteasas [36].

En términos de capacidad solubilizadora de fosfatos, *Pseudomonas* es uno de los géneros bacterianos más eficientes. Naiket *al.* [36], en un extenso estudio sobre la capacidad solubilizadora de fosfatos de 443 aislamientos de pseudomonadas fluorescentes, obtenidos a partir de la rizosfera de banano y arroz, encontraron que 80 fueron eficientes solubilizadores de P, incluyendo: *Pseudomonas montellii*, *P. putida*, *P. plecoglossicida*, *P. fluorescens*, *P. fulva*, *P. mosselii* y *P. aeruginosa*. Dentro de éstas, 12 (15%) se clasificaron como *P. putida*. El análisis de BOX-PCR determinó además, amplia diversidad intraespecífica entre los aislamientos. En un estudio similar, Naik *et al.* [37] no encontraron a *P. putida* en la rizosfera de banano, lo cual asociaron a posibles variaciones condicionadas por el genotipo del huésped. Browneet *al.* [38], encontraron mayor densidad de pseudomonadas fluorescentes en trigo en comparación con cebada, aunque las poblaciones de BSP no variaron significativamente entre los dos cultivos. En ambas plantas, la mayor tasa de solubilización estuvo asociada a aislados de la especie *P. fluorescens*.

Con relación a los posibles mecanismos de solubilización de fosfatos, varios estudios confirman que en *Pseudomonas*, incluyendo *P. putida*, están asociados a la producción de ácidos orgánicos, especialmente a través de la oxidación de glucosa a ácido glucónico por la ruta de oxidación directa, la que está a su vez relacionada directamente con la acidificación del medio de cultivo [36].

CONCLUSIONES

A partir de rizosfera de chontaduro crecido naturalmente en la Costa Pacífica del Valle del Cauca, se obtuvieron 22 aislamientos bacterianos con capacidad temporal de solubilización de P (BSP). Siete mostraron estabilidad en la característica solubilizadora.

El género bacteriano con mayor frecuencia dentro de las BSP aisladas correspondió a *Burkholderia*, incluyendo 3 cepas de *B. ambifaria* y dos de *Burkholderia* sp. 383, registradas en la literatura como eficientes PGPR, con actividades benéficas relacionadas con: control de fitopatógenos, producción de sustancias con acción hormonal, antibiótica, diazotrófica y enzimática. También se aisló una cepa de *Pseudomonas putida*.

El perfil molecular BOX-PCR de las cepas evidenció la ocurrencia de diversidad intraespecífica entre las cepas de *B. ambifaria*, indetectable con el análisis de las secuencias del ADNr 16S. Se considera necesario el uso complementario de las dos técnicas en análisis de biodiversidad microbiana asociada a la rizosfera de los cultivos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores manifiestan su agradecimiento a la Dra. Karina López y al profesor Jaime Muñoz, por su asesoría y por facilitar las instalaciones y recursos de los laboratorios de Microbiología y Biología Molecular, respectivamente, en la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira.

Agradecemos igualmente a la Vicerrectoría de Investigaciones de la misma universidad, por el apoyo financiero logrado por el proyecto como uno de los ganadores de la Convocatoria Nacional de Investigación, del año 2009.

REFERENCIAS

- [1] YARZABAL, L. A. En: Soil biology and agriculture in the Tropics. Soil Biology, vol. 21. Berlin (Germany): Springer-Verlag, 2010, p. 209 - 233.
- [2] FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C. Ameliorating soil acidity of tropical Oxisols by liming for sustainable crop production. *Adv. Agron.*, 99, 2008, p. 345-399.
- [3] MALAGÓN, D. Suelos de Colombia. Santafé de Bogotá D.C. (Colombia): Instituto Geográfico Agustín Codazzi, 1995, 632 p.
- [4] CORDELL, D.; DRANGERT, J. A. and WHITE, S. The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environment Change*, 19, 2009: p. 292 -305.
- [5] VACCARI, D. A. Phosphorus: A looming. *Scientific American*, June, 2009: p. 55 – 59.
- [6] MARSCHNER, P. Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants, Third Edition. Academic Press, 2011, 672 p.
- [7] MARSCHNER, P. En: Nutrient cycling in terrestrial ecosystems. Berlin (Germany): Springer-Verlag, 2007, p. 159 - 181.
- [8] BÜNEMANN, E. K.; CONDRON, L. M. En: Nutrient cycling in terrestrial ecosystems. Berlin (Germany): Springer-Verlag, 2007, p. 65-92.
- [9] RODRIGUEZ, H. AND FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv.*, 17, 1999: p. 319-339.
- [10] HAMDALI, H.; HAFIDI, M.; VIROLLE, M.J.; OUHDOUCH, Y. Rock phosphate-solubilizing Actinomycetes: screening for plant growth promoting activities. *World J Microbiol Biotechnol.*, 24, 2008: p. 2565–2575.
- [11] KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; AHMAD, M.; OVES, M.; WANI, P.A. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective. *Arch Agron Soil Scien.* 56(1), 2010: 73–98.
- [12] ZAIDI, A.; KHAN, M. S.; AHMAD, M.; OVES, M.; WANI, P. A. En: Microbial strategies for crop improvement. Berlin (Germany): Springer-Verlag, 2009: p. 23-50.
- [13] URIBE, D., SÁNCHEZ-NIEVES, J. et al. En: Soil Biology and Agriculture in the Tropics. Berlin (Germany): Springer-Verlag, 2010:235-250.
- [14] MORENO SARMIENTO, N.; URIBE VÉLEZ, D. Y MORENO L. En: Biofertilizantes en Iberoamérica: visión técnica, científica y empresarial. En: Uruguay, BIOFAG, 2007: p. 38 – 45.
- [15] WEISBURG, W. G., BARNS, S. M., PELLETIER, D. A. AND LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.*, 173, 1991: p. 697-703.
- [16] VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; de Bruijn, F.J.; Lupski, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria

- using repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction. *Methods Mol Cell Biol.* 5, 1994: 25-40.
- [17] SEO, S. T. AND TSUCHIYA, K. Genotypic characterization of Burkholderiaceae strains by rep-PCR and PCR-RFLP of the *fliC* gene. *FEMS Microbiology Letters*, 245, 2005: p. 19-24.
- [18] WONG-VILLARREAL, A.; CABALLERO-MELLADO, J. Rapid identification of nitrogen-fixing and legume-nodulating *Burkholderia* species based on PCR 16S rRNA species-specific oligonucleotides. *Syst Appl Microbiol.* 33, 2010: p. 35-43.
- [19] COMPANT, S.; NOWAK, J.; COENYE, T.; CLÉMENT, C.; BARKA, E. A. Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. *FEMS Microbiol Rev.* 32, 2008: p. 607-626.
- [20] CHIARINI, L.; BEVIVINO, A.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S.; VISCA, P. *Burkholderiaceae* complex species: health hazards and biotechnological potential. *Trends Microbiol.* 14(6), 2006: p. 277-286.
- [21] CABALLERO-MELLADO, J.; ONOFRE L., J.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; MARTÍNEZ AGUILAR, L. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Appl Environ Microbiol.* 73(16), 2007: p. 5308-5319.
- [22] TABACCHIONI, S.; BEVIVINO, A.; DALMASTRI, C.; CHIARINI, L. *Burkholderiaceae* complex in the rhizosphere: a minireview. *Annals Microbiol.* 52, 2002: p. 103-117.
- [23] MARINO, W.; MARSCHNER, P.; GASPAROTTO, L. Phosphate Solubilizing Bacteria from the Rhizosphere of *Theobromagrandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum. and *Bactrisgasipaes* H.B.K.: Potential for Plant Growth Promotion. German-Brazilian Workshop on Neotropical Ecosystems – Achievements and Prospects of Cooperative Research, Hamburg, September 3-8, 2000. Recuperation of Degraded Areas – Summaries of Lectures, Session 5.
- [24] DELVASTO, P.; BALLESTER, A.; MUÑOZ, J.A.; GONZÁLEZ, F.; BLÁSQUEZ, M. L.; IGUAL, J. M.; VALVERDE, A. Mobilization of phosphorus from iron ore by the bacterium *Burkholderiacaribensis* FeGLO3. *Miner Eng.* 22, 2009: p. 1-9.
- [25] SONG, O. K.; LEE, S. J.; LEE, Y. S.; LEE, S. C.; KIM, K. K.; CHOI, Y. L. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderiaceae* DA23 isolated from cultivated soil. *Braz J of Microbiol.* 39, 2008: p. 151-156.
- [26] LUDOVIC, V.; GROLEAU, M. C.; DEKIMPE, V.; DEZIEL, E. *Burkholderia* diversity and versatility: an inventory of the extracellular products. *J Microbiol Biotechnol.* 17(9), 2007: p. 1407-1429.
- [27] SUN, Y.; CHENG, Z.; GLICK, B. R. The presence of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase deletion mutation alters the physiology of the endophytic plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN. *FEMS Microbiol Lett.* 296, 2009: p. 131-136.
- [28] SPRENT, J. I. 60Ma of legume nodulation. What's new? What's changing? *J Exp Bot.* 59(5), 2008: p. 1081-1084.
- [29] PEIX, A.; RAMÍREZBAHENA, M.; VELÁSQUEZ, E. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect Genet Evol.* 9, 2009: p. 1132-1147.
- [30] MILLER, S. H.; MARK, G. L.; FRANKS, A.; O'GARA, F. En: *Pseudomonas*. Model Organism, Pathogen, Cell Factory. Wiley – VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2008: p. 353 – 376 pp.
- [31] MERCADO BLANCO, J.; BAKKER, P. A. H. Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonie van Leeuwenhoek.* 92, 2007: p. 367-389.
- [32] HÖFTE, M.; ALTIER, N. Fluorescent pseudomonads as biocontrol agents for sustainable agricultural systems, *Res Microbiol.* 2010. doi: 10.1016/j.resmic.2010.04.007.
- [33] HAAS, D.; DÉFAGO, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat Rev Microbiol.* 3, 2005: p.307-319.
- [34] REHM, B. H. A. En: *Pseudomonas*. Model Organism, Pathogen, Cell Factory. Wiley – VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim., 2008: p. 377 – 395.
- [35] JIMÉNEZ, J. I.; NOGALES, J.; GARCÍA, J. L.; DÍAZ, E. En: *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, Springer-Verlag, Berlin, 2010: p. 1297-1325.
- [36] NAIK, P. R.; RAMAN, G.; NARAYANAN, K. B.; SAKTHIVEL, N. Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. *BMC Microbiol.* 8, 2008: p. 230.

- [37] NAIK, P.R.; SAHOO, N.; GOSWAMI, D.; AYYADURAI, N.; SAKTHIVEL, N. Genetic and functional diversity among fluorescent pseudomonads isolated from the rhizosphere of banana. *Microb Ecol.* 56, 2008: 492–504.
- [38] BROWNE, P.; RICE, O.; MILLER, S. H.; BURKE, J.; DOWLING, D. N.; MORRISSEY, J. P.; O'gara, F. Superior inorganic phosphate solubilization is linked to phylogeny within the *Pseudomonas fluorescens* complex. *Appl Soil Ecol.* 43(1), 2009: p. 131-138.