

**Aislamiento y caracterización de poblaciones bacterianas solubilizadoras de fosfatos en tres agroecosistemas del Valle del Cauca**

**Trabajo de grado para optar al título de Agrónoma**

**Estudiante:**

**Viviana Yacumal Fernández**

**Director:**

**Oscar Eduardo Sanclemente Reyes. Ph D.**

**Universidad Nacional Abierta y a Distancia  
Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente  
Programa de Agronomía  
Palmira, 2015**

## **Agradecimientos**

Gracias a:

Mi familia por su confianza y apoyo constante.

A la Universidad Nacional Abierta y a Distancia, institución que me permitió realizar esta investigación a través de los recursos otorgados para la financiación del proyecto PS- 16- 14 de Convocatoria 04 de 2014 para Semilleros de Investigación.

A mi tutor, Dr. Oscar Sanclemente, por su confianza, su tiempo, orientación y guía en este proceso.

A la Biol. Johanna Gutiérrez, por su apoyo, consejos, tiempo, y, por disponer y facilitarme muchas herramientas necesarias para la consecución de esta investigación.

Al Ing. Pablo Gallo por su interés, apoyo constante, por sus enseñanzas, sus correcciones, sus consejos y su tiempo.

A todas las personas que han aportado su granito de arena para la realización de este trabajo.

¡Mil gracias!

## Índice

1. Introducción	11
2. Objetivos del proyecto	13
2.1 objetivo general:	13
2.2 objetivos específicos:	13
3. Marco conceptual y teórico.	14
3.1 importancia del fósforo para el desarrollo fisiológico de las plantas.	14
3.2 disponibilidad del fósforo en los suelos.	15
3.3 mecanismos de transformación y movilidad del p en el suelo.	17
3.3.1 adsorción – desorción	17
3.3.2 mineralización – inmovilización	17
3.3.3 precipitación – disolución	17
3.4 uso de fosfatos inorgánicos en la agricultura.	18
3.5 microorganismos solubilizadores de fosfatos.	19
3.6 agroecosistemas elegidos para realizar los aislamientos	21
3.6.1 cultivo de caña de azúcar ( <i>saccharum officinarum</i> L.)	21
3.6.2 bosque seco tropical	22
3.6.3 pastizal	23
3.7 uso de bio-inoculantes en la agricultura.	23
3.8 evaluación de la eficiencia de solubilización de fosfatos en laboratorio.	24
4. Metodología	26
4.1 localización	26
4.2 muestreo	26
4.3 aislamiento de bacterias	27
4.4 caracterización morfológica de las cepas	30
4.4.1 observación macroscópica.	30
4.4.2 observación microscópica.	31
4.5 evaluación de la eficiencia de solubilización de p	32
4.6 análisis estadístico de la información	33

5. Resultados y discusión	34
5.1 análisis de suelos de los agroecosistemas evaluados	34
5.2 aislamiento de bacterias	36
5.3 resiembra de bacterias para evaluar eficiencia de solubilización de p.	37
5.4 caracterización morfológica de las cepas	38
5.4.1 observación macroscópica	38
5.4.2 observación microscópica	39
5.5 evaluación de la eficiencia de solubilización	40
5.6 análisis estadístico de la información	41
6. Conclusiones	46
7. Recomendaciones	47
8. Bibliografía	48
anexos	55

## Lista de tablas

Tabla 1. Compuestos más comunes de fósforo en el suelo.	16
Tabla 2. Análisis de suelos de los tres agroecosistemas evaluados.	34
Tabla 3. Parámetros cualitativos del análisis de suelos, a partir del contenido de elementos (B: bajo, M: medio y A: alto) en los tres Agroecosistemas.	35
Tabla 4. Colonias que durante la incubación presentaron halo de solubilización en medio PVK-Ca.	36
Tabla 5. Colonias que presentaron diámetro mayor a 10mm.	37
Tabla 6. Cepas que continúan presentando halo después de las resiembras.	37
Tabla 7. Características macroscópicas de las colonias	38
Tabla 8. Características morfológicas de las cepas, observadas al microscopio (100X).	39
Tabla 9. Cepas y su capacidad solubilizadoras de fosfatos (en mm)	40

## Lista de figuras

Figura 1. Procesamiento y secado de muestras de suelo.	27
Figura 2. Diluciones seriadas hasta $10^{-6}$	28
Figura 3. Siembra de diluciones $10^{-4}$ hasta la $10^{-6}$ en PVK Ca, Fe y Al.	28
Figura 4. Colonias con presencia de halos, sembradas en medio PVKCa.	29
Figura 5. Siembra de colonias por agotamiento en superficie, a partir de muestras de Bosque.	30
Figura 6. Apreciación de características macroscópicas de las cepas bacterianas aisladas.	30
Figura 7. Apreciación de forma del borde y elevación de las colonias vista al estereoscopio 4x.	31
Figura 8. Ilustraciones de Colonias Gram negativas.	31
Figura 9. Halos formados por diferentes cepas bacterianas en la última siembra.	32
Figura 10. Conservación de cepas bacterianas en viales eppendorf.	33
Figura 11. Diámetro de halo solubilizador de P en mm, para las 17 cepas seleccionadas, durante los cuatro periodos de evaluación (día 8, 12, 16 y 20).	41
Figura 12. Características macroscópicas de la cepa Bos7.	42
Figura 13. Cepas POT7, POT8, BOS5, CAÑ16, sembradas en medio King B.	43

## Lista de anexos

Anexo 1. Medio de cultivo Pikovskaya (PVK) en g L-1.	55
Anexo 2. Colonias que presentaron halo en medio PVK con fosfato tricálcico, pasados 24 y 48 horas de incubación.	55
Anexo 2.1. Colonias de la muestra del suelo de bosque que presentaron halo en medio PVK con fosfato tricálcico.	55
Anexo 2.2. Colonias de la muestra del cultivo de caña que presentaron halo en medio PVK con fosfato tricálcico,	56
Anexo 2.3. Colonias de la muestra del suelo de pastizal que presentaron halo en medio PVK con fosfato tricálcico,	56
Anexo 3. Análisis de Varianza ANDEVA para las 17 bacterias seleccionadas.	56
Anexo 3.1. ANDEVA para la variable diámetro de solubilización durante el primer periodo de evaluación (8 días después de siembra en medio PVK).	56
Anexo 3.2. ANDEVA para la variable diámetro de solubilización durante el primer periodo de evaluación (12 días después de siembra en medio PVK).	57
Anexo 3.3. ANDEVA para la variable diámetro de solubilización durante el primer periodo de evaluación (16 días después de siembra en medio PVK).	57
Anexo 3.4. ANDEVA para la variable diámetro de solubilización durante el primer periodo de evaluación (20 días después de siembra en medio PVK).	57
Anexo 4. Prueba de promedio de DUNCAN ( $p < 0.05$ ) para la variable diámetro de solubilización en las 17 bacterias seleccionadas.	58
Anexo 4.1. Prueba de promedio de DUNCAN ( $p < 0.05$ ) para la variable diámetro de solubilización en las 17 bacterias seleccionadas, durante el primer periodo de evaluación (8 días después de siembra en medio PVK).	58
Anexo 4.2. Prueba de promedio de DUNCAN ( $p < 0.05$ ) para la variable diámetro de solubilización en las 17 bacterias seleccionadas, durante el primer periodo de evaluación (12 días después de siembra en medio PVK).	59

Anexo 4.3. Prueba de promedio de DUNCAN ( $p < 0.05$ ) para la variable diámetro de solubilización en las 17 bacterias seleccionadas, durante el primer periodo de evaluación (16 días después de siembra en medio PVK).	60
Anexo 4.4. Prueba de promedio de DUNCAN ( $p < 0.05$ ) para la variable diámetro de solubilización en las 17 bacterias seleccionadas, durante el primer periodo de evaluación (20 días después de siembra en medio PVK).	61



## Resumen

El fósforo (P) interviene en todos los procesos de transferencia de energía y en las reacciones químicas que son esenciales dentro del metabolismo de la planta, siendo fundamental para el desarrollo de los cultivos. Generalmente los cultivos demandan altas cantidades de P que son suministradas por el suelo, debiendo suplementar parte de este, vía fertilizantes de síntesis química; sin embargo gran porcentaje de este P no es absorbido y se pierde ocasionando problemas ambientales. La presente investigación, tuvo como objetivo aislar y caracterizar poblaciones bacterianas solubilizadoras de fosfatos bajo tres agroecosistemas contiguos: 1. cultivo de caña de azúcar con manejo convencional (CAÑ), 2. Pastizal con pastoreo bovino (POT), y 3. Un relicto de bosque secundario (BOS), con el fin de aislar las más eficientes. El estudio se localizó en la hacienda "Cantaclaro", Aguacalara, corregimiento de Palmira, coordenadas (03° 29'52.523" N y 0.76° 14'03.750" W). La metodología de muestreo de suelos, consistió en un diseño completamente aleatorio, se tomaron cinco submuestras de 100g, a una profundidad de 0 a 20 cm, en cada uno de los sistemas a evaluar. Para el aislamiento se procedió a hacer diluciones seriadas e inoculación en medios de cultivo selectivos para bacterias solubilizadoras de fosfatos (Pikovskaya), conteniendo fosfatos de calcio, hierro y aluminio. Posteriormente, se evaluó su eficiencia midiendo los halos de solubilización generados durante cuatro periodos (8, 12, 16 y 20 días). Se encontraron cinco cepas con alta capacidad solubilizadora y una de ellas de tipo bacilar Gram negativa (BOS7) significativamente alta ( $p < 0.05$ ) para los cuatro periodos evaluados, siendo una alternativa viable para su posterior evaluación en trabajos en invernadero o campo. Estos resultados, contribuyen al conocimiento de poblaciones bacterianas nativas con capacidad solubilizadora de fosfatos en el Valle del Cauca.

**Palabras clave:** Servicios ecosistémicos, ciclaje de fósforo, sustentabilidad, manejo y conservación del suelo.

## Abstract

Phosphorus (P) is involved in all processes of energy transfer and also in the chemical reactions that are essential in plant metabolism, therefore, being fundamental to the development of crops. Crops usually require high amounts of P which is supplied by the soil, part of this supplement must be fertilized via chemical synthesis; however large percentage of this P is not absorbed and is lost causing environmental problems. This research aimed to isolate and characterize bacterial populations that solubilize phosphate under three contiguous agroecosystems: 1. A sugar cane cultivation with conventional management (CAÑ), 2. Bovine Grazing land (POT), and 3. A remnant of secondary forest (BOS). The above was done in order to isolate the most efficient one. The study was located in the hacienda "Cantaclaro" Aguacalara, Township Palmira, coordinates (03° 29'52.523" N y 0.76° 14'03.750" W). The soil sampling methodology consisted of a completely random design. Five sub-samples of 100g were taken at a depth of 0-20 cm of each of the systems to be evaluated. For isolation, serial dilutions and inoculation on selective media for phosphate solubilizing bacteria (Pikovskaya) containing calcium phosphates, iron phosphates and aluminum phosphates, were made. Subsequently, their efficiency was evaluated by measuring the solubilization halos generated during four periods (8, 12, 16 and 20 days). Five strains with high solubilizing capacity were found. One of this strains was a Gram negative bacilli (BOS7) significantly higher ( $p < 0.05$ ) for the four periods evaluated, being this a viable alternative for further evaluation in field or in greenhouse. These results contribute to the knowledge of native bacterial populations with phosphate solubilizing capacity in Valle del Cauca.

**Keywords:** Ecosystem Services, phosphorus cycle, sustainability, management and soil conservation.

## 1. Introducción

Los procesos fisiológicos de las plantas, están influenciados por la absorción y posterior asimilación de los nutrientes presentes en la solución del suelo. El fósforo (P) como elemento esencial, interviene en procesos tales como: la fotosíntesis, producción energética en forma de Adenosín Trisfosfato ATP, formación de aminoácidos, construcción de proteínas, la reproducción de las plantas, entre otros, siendo un elemento fundamental en los agroecosistemas. Sin embargo, aunque el elemento se encuentra en grandes cantidades en el suelo en forma de fosfatos, las proporciones disponibles para las plantas son mínimas. Esto se debe a que el P es altamente fijado por los minerales constituyentes del suelo, en formas químicas no disponibles para los cultivos (Lozano *et al.*, 2012).

Para suplir las deficiencias del elemento en los agroecosistemas, se aplican continuamente fertilizantes fosfatados que implican altos costos para los productores, que ocasionalmente generan impactos ambientales como la degradación del suelo y/o contaminación de cuerpos de agua, dando lugar a procesos como la eutrofización (Cueto y Figueroa, 2012). En el Valle del Cauca, existen reportes que relacionan la aplicación de fertilizantes, entre ellos los fosfatados, con la salinización de suelos cultivados con caña de azúcar (Zúñiga *et al.*, 2011). De igual forma, existe afectación en el departamento por la acumulación de sales en cuerpos de agua superficiales y subterráneas, que en muchos casos se recirculan en el suelo por irrigación de los cultivos de caña de azúcar, agravando la problemática.

Debido a esto, se hace necesario explorar nuevas alternativas tecnológicas para mitigar estos impactos negativos, enfocadas al uso eficiente de los recursos disponibles. Una alternativa biotecnológica, consiste en emplear microorganismos capaces de solubilizar los fosfatos presentes en el suelo y, así mejorar la disponibilidad del elemento para las plantas. Sin embargo, en la actualidad hay

poca investigación de las poblaciones bacterianas nativas en su verdadero potencial solubilizador de fosfatos, que permita desarrollar insumos, para ser usados como bio-inoculantes en distintos agroecosistemas, como el de la caña de azúcar.

A pesar de que la literatura reporta diversidad de grupos de microorganismos con capacidad solubilizadora de fosfatos, esta investigación se centró en la caracterización de bacterias nativas con esta cualidad en tres agroecosistemas cercanos: Cultivo de caña de azúcar, relicto de bosque seco tropical y Pastizal. A partir del aislamiento y evaluación de su capacidad solubilizadora en laboratorio, se logró seleccionar varias cepas bacterianas con alto potencial solubilizador de fosfatos. De esta forma, los resultados de esta investigación servirán de referencia para el desarrollo y mejoramiento de productos biotecnológicos para incrementar sus poblaciones en el suelo, a fin de mejorar vía biológica la disponibilidad del P en el suelo.

Esta investigación se presenta como trabajo de grado para optar al título de Agrónomo, contó con recursos de financiación del proyecto PS- 16- 14 de Convocatoria 04 de 2014 para Semilleros de Investigación de la Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Los productos de este trabajo corresponden al grupo de investigación Producción Sostenible de la Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente, reconocido y categorizado por Colciencias.

## **2. Objetivos del proyecto**

### **2.1 Objetivo general:**

- Evaluar cualitativamente la capacidad de solubilización de fosfatos de las bacterias aisladas de tres agroecosistemas del Valle del Cauca.

### **2.2 Objetivos específicos:**

- Aislar y purificar bacterias con potencial solubilizador de fosfatos de Ca, Al y Fe, en muestras de suelo recolectadas en los tres agroecosistemas estudiados.
- Estimar en laboratorio la capacidad de solubilización de fosfatos de las bacterias aisladas del suelo.
- Caracterizar y almacenar las bacterias con mayor capacidad de solubilización de fosfatos.

### **3. Marco conceptual y teórico.**

#### **3.1 Importancia del fósforo para el desarrollo fisiológico de las plantas.**

El fósforo (P) es uno de los nutrientes esenciales para el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Siendo el segundo elemento más importante para la nutrición vegetal después del nitrógeno, el P juega un papel importante en varias funciones clave, incluyendo la fotosíntesis, la respiración, la transferencia de energía, la transformación del azúcar y el almidón, y la translocación de nutrientes (Lee, 2013). Adicionalmente, El P es componente clave de moléculas como: ácidos nucleicos, fosfolípidos, el Adenosin Trisfosfato (ATP) y coenzimas, en consecuencia, las plantas no expresan su potencial genético sin un suministro fiable. Sin embargo, el P es el macronutriente más limitante en el suelo para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Valenzuela, 2010).

Del P total en el suelo, aproximadamente entre 30 y 85% está presente en la fracción orgánica. Entre 30 y 40% se presenta como ácido fítico, almacenado en las semillas, que constituyen el principal reservorio de P; 3% se encuentra en los ácidos nucleicos y 1% está presente en fosfolípidos. El P orgánico debe ser mineralizado por los microorganismos para su posterior absorción por las plantas (Corrales., et al. (2014). En el proceso de nutrición vegetal, las plantas absorben el P en forma inorgánica de la solución del suelo, las formas asimilables en que el P inorgánico puede ser absorbido por las plantas son:  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$  (Berrocal, 2009).

### 3.2 Disponibilidad del fósforo en los suelos.

El P es uno de los nutrientes menos móviles y más limitantes en la nutrición de las plantas. Las plantas absorben el P en forma inorgánica de la solución del suelo, sin embargo su disponibilidad está restringida debido a su capacidad de formación de compuestos fosfatados, altamente fijados por la fracción mineral en formas no disponibles para las plantas (Munera y Meza. (2014).

El P se puede presentarse en dos formas en los suelos, de forma orgánica e inorgánica, esta última es la que puede ser absorbida por las plantas. El fósforo que se presenta en los suelos en forma orgánica se puede presentar como humus y materia orgánica fresca, estos componentes deben ser mineralizados por parte de algunos microorganismos para su asimilación por las plantas (Pereira *et al.*, 2011).

La fracción de fósforo disponible en solución para ser absorbida por las raíces y utilizada por la planta para su crecimiento y desarrollo durante su ciclo de vida, se conoce como P lábil. De la cantidad total de fósforo del suelo aproximadamente tan solo entre el 0.05 y el 0.1% se encuentra en solución, por lo que este nutriente debe ser continuamente suministrado por la fracción de P lábil para asegurar la adecuada nutrición de las plantas. Sin embargo la concentración de P lábil en el suelo siempre tiende a ser baja debido a que su absorción por la planta es continua y su reposición en el suelo es lenta (Sánchez & Velázquez, 2008).

Uno de los procesos que causa baja disponibilidad del elemento es la unión de los aniones fosfato con otros elementos constituyentes del suelo; en suelos ácidos predominan los fosfatos de hierro:  $(\text{FePO}_4)$  o aluminio:  $(\text{AlPO}_4)$  y, en suelos alcalinos predominan los fosfatos de calcio:  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (Ojekami *et al.*, 2011). Los compuestos químicos fosforados más comunes en el suelo se presentan en la Tabla 1.

El suelo también está sujeto a pérdidas de este nutriente por vías como: la erosión del suelo que arrastra cantidades de P a razón de 0.1 A 10 kg por hectárea al año. El lavado o escurrimiento superficial a razón de 0.01 a 3 kg ha/año. Y el P que sale del sistema en las plantas cosechadas, calculando una absorción de P de 5 a 60 kg por ha/año. De esta manera, la aplicación de fertilización fosfórica se hace necesaria, pues la capacidad de reposición del P en los suelos baja constantemente (Camas et al., (2012).

**Tabla 1.** Compuestos más comunes de fósforo en el suelo.

	Denominación	Composición	Características
Fosfatos de calcio	hidroxiapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \text{Ca}(\text{OH})_2$	mayor abundancia
	oxiapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \text{CaO}$	
	fluorapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \text{CaF}_2$	mayor abundancia
	carbonatoapatita	$3\text{Ca}(\text{PO}_4)_2 \text{CaCO}_3$	
	fosfato tricálcico	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	
	fosfato bicálcico	$\text{CaHPO}_4$	mayor solubilidad
	fosfato monocálcico	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	mayor solubilidad
Fosfatos de hierro	vivianita	$\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	
	estrengita	$\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	
Fosfatos de Al	variscita	$\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	

**Fuente:** Tomada de Montecinos (1995) adaptado de Mui Tsai y Rossetto (1992).



### **3.3 Mecanismos de transformación y movilidad del P en el suelo.**

#### **3.3.1 Adsorción – desorción**

La adsorción es el proceso por el cual el P es atrapado por los compuestos minerales del suelo; los iones ortofosfato de P son atraídos por las cargas positivas de las arcillas como las caolinitas y minerales como óxidos e hidróxidos de Fe y Al, que tienen poder de fijación más alto que las arcillas. Esta adsorción de tipo aniónica depende del pH del suelo, en pH ácidos, aumentan las cargas positivas de los coloides y por esta razón aumenta la adsorción. La desorción por su parte, es el proceso inverso por el cual se libera el P de estas superficies hacia la solución del suelo (Silva, 2011).

#### **3.3.2 Mineralización – Inmovilización**

La mineralización es el proceso por el cual el P contenido en la materia orgánica es transformado en P inorgánico, este se da mediante la ruptura de enlaces orgánicos por acción de enzimas producidas por algunos microorganismos, denominadas fosfatasas. El proceso de inmovilización, consiste en la entrada activa del P inorgánico a las células microbianas para convertirse a formas de P orgánico (Patiño y Sanclemente, 2014).

#### **3.3.3 Precipitación – disolución**

En el proceso de precipitación, el P forma compuestos con cationes como: Al, Ca y Fe; que gracias a sus características moleculares le permiten sedimentar por acción de la gravedad, en forma de minerales. La precipitación dependerá de la solubilidad de los minerales conformados y la concentración de sus iones, que mantienen la solución en condiciones de equilibrio (Restrepo *et al.*, 2015).

### **3.4 Uso de fosfatos inorgánicos en la agricultura.**

Los fosfatos inorgánicos son aplicados a los cultivos como fertilizantes químicos, para suplir las necesidades de P en las plantas, sin embargo gran parte de estos son inmovilizados en el suelo, sin llegar a ser aprovechados en su proceso de nutrición. Se calcula que la eficiencia de fertilizantes fosfatados en todo el mundo es de alrededor de 10 - 25% (Lozano *et al.*, 2012).

Los fosfatos contenidos en los fertilizantes inorgánicos son rápidamente inmovilizados en el suelo, dependiendo del pH y el tipo de arcillas presentes. Los iones fosfato ( $\text{PO}_4^-$ ) son muy reactivos y se unen a óxidos e hidróxidos hidratados de Al y Fe en suelos ácidos. En suelos alcalinos, los iones fosfatos se unen al Ca y Mg, dando lugar a fosfatos insolubles. De aquí que la eficiencia de los fertilizantes fosfóricos sea muy baja (Valenzuela, (2010).

Los fertilizantes fosfóricos usados con mayor frecuencia en la agricultura son: superfosfatos simples y triples, fosfatos amoniacales: monoamonio fosfato (MAP) y diamonio fosfato (DAP). La roca fosfórica de mejor calidad para la producción de estos fosfatos está disminuyendo a nivel global y, adicionalmente, la producción de fosfatos solubles a partir de esta fuente mineral requiere de altas cantidades de energía e insumos, siendo ambientalmente ineficiente. Esto ha hecho que en los últimos años, los precios de los fertilizantes fosforados estén en alza, debido principalmente a los altos costos de extracción, y al incremento en el precio del petróleo y el gas (Consejo Nacional de Política Económica y Social, CONPES, 2009).

La utilización directa de rocas fosfóricas ha sido considerada como una alternativa más económica para la fertilización de los cultivos en países donde la disponibilidad de materia prima para la producción de fosfatos solubles es escasa, sin embargo se ha demostrado que estas tienen bajo contenido de fósforo soluble

en agua (Patiño, 2010). Debido a los altos costos que tiene la producción de fertilizantes fosfatados inorgánicos, la baja efectividad agronómica de la roca fosfórica, y las bajas cantidades de P disponible en los suelos, se hace necesaria la búsqueda de opciones que permitan incrementar la disponibilidad de P para los cultivos (Patiño, 2010).

En este aspecto, se considera la solubilización de distintas rocas fosfatadas y de otras fuentes de P inorgánico por los microorganismos del suelo, como una alternativa viable para incrementar la cantidad de nutrientes disponible para las plantas (Sánchez et al., 2012).

### **3.5 Microorganismos solubilizadores de fosfatos.**

Los microorganismos son parte integral del ciclo de fósforo en el suelo y como tal desempeñan un papel importante en la mediación de la disponibilidad de P para las plantas. La comprensión de la contribución microbiana para la nutrición fosfórica de las plantas, y las oportunidades de la manipulación de microorganismos específicos para aumentar la disponibilidad de P en el suelo ha sido de considerable interés por muchas décadas (Ojekami *et al.*, 2011).

Los microorganismos participan activamente en la dinámica del P del suelo influyendo en sus ciclos y su disponibilidad para las plantas de la siguiente manera: a) interviniendo en los procesos de mineralización, es decir el paso del P orgánico a inorgánico. B) solubilización, diluyendo o disolviendo el P que se encuentra fijado en compuestos de Ca, Fe o Al. C) inmovilización, mediante la incorporación del P en sus tejidos (Osorno, 2013).

Algunos microorganismos dependiendo de la fuente de P que usan y del mecanismo que utilizan para su solubilización, pueden transformar el fósforo de compuestos inorgánicos u orgánicos. De esta manera la solubilización de P

inorgánico se da mediante la síntesis de ácidos orgánicos y la disolución del P orgánico se da mediante la producción de enzimas como las fosfatasa (Selvakumar *et al.*, 2013).

Los microorganismos están involucrados en procesos que afectan la transformación del fósforo del suelo, participando en la solubilización del fosfato inorgánico y en la mineralización del fosfato orgánico, así como su inmovilización (Rotaru & Sinclair, 2009). Los mecanismos utilizados por los microorganismos para solubilizar el fósforo inorgánico son: la modificación del pH del medio que los rodea mediante la secreción de ácidos orgánicos (cítrico, láctico, glicólico, maleico, entre otros) elaborados por el metabolismo microbiano y la exudación de sustancias quelatantes (como sideróforos) especialmente (Pérez *et al.*, 2012).

La eficacia de la actividad de los microorganismos en el ciclo del P, se debe a que estos contienen un alto porcentaje del elemento por peso seco en sus tejidos. Las bacterias presentan entre 1.5 y 2.5% y los hongos 0.5 y 1.0%, a diferencia de las plantas que solo poseen entre 0.1 y 0.5% de P por peso seco (Pérez *et al.*, 2012). Las poblaciones bacterianas son más efectivas en los procesos de solubilización de P, ya que representan del 1 al 50% en comparación con las poblaciones de hongos solubilizadores que solo representan de 0.1 al 0.5% de la población (Ali *et al.*, 2009). Entre las comunidades de bacterias del suelo, las pertenecientes a los géneros *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Rhizobium sp.*, *Agrobacterium sp.*, *Burkholderia sp.*, *Achromobacter sp.*, *Micrococcus sp.*, *Aerobacter sp.*, *Flavobacterium sp.*, y *Erwinia sp.*, han sido descritas como solubilizadoras eficaces de fosfatos (Paredes y Espinosa, 2010).

La presencia de diferentes poblaciones de bacterias solubilizadoras de fosfatos depende de las condiciones agroecológicas de los suelos, sus características físicas y químicas, contenido de materia orgánica, contenido de fósforo y

actividades culturales. En la zona de la rizósfera es donde parece existir un efecto preferencial sobre los organismos solubilizadores del P (Guzmán, 2011).

### **3.6 Agroecosistemas elegidos para realizar los aislamientos**

#### **3.6.1 Cultivo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.)**

La caña de azúcar es una gramínea tropical perenne, se cultiva entre los 0 y 1000 m.s.n.m. y requiere de temperaturas entre los 20 y 30 grados centígrados. Su demanda de requerimientos nutricionales es alta, debido a su alta producción de materia verde y seca; la alta capacidad de extracción de nutrientes de la caña de azúcar agota los suelos y por esto se hace preciso un adecuado programa de fertilización (Quezada, 2013).

La caña de azúcar es el cultivo más importante en el Valle del Cauca, aproximadamente existen 223.905 ha cultivadas actualmente. Este cultivo representa una importante materia prima de la cual se obtienen diferentes productos como el azúcar, la panela, alcoholes carburantes y muchos otros de importancia económica (Pérez et al., 2011).

Las prácticas de manejo implementadas en este cultivo como la aplicación de fertilizantes químicos, herbicidas, la excesiva mecanización y las quemadas, ocasionan cambios en las características y funciones de los suelos, afectando la cantidad y biodiversidad de microorganismos del suelo (Molina *et al.*, 2012).

La caña tiene altos requerimientos nutricionales, y el fósforo es indispensable en las transformaciones de azúcares simples a sacarosa, el P estimula el desarrollo radical, el macollamiento, y la formación de tallos, y este es requerido

esencialmente en los primeros meses de crecimiento de la caña. Este nutriente también influye en el proceso de maduración, y es necesario para la formación de almidones. Cuando el contenido de P es deficiente para el cultivo, la caña no puede utilizar todo el nitrógeno que es absorbido y por ende, se retarda la maduración (Centro de Investigación de la Caña de Azúcar- CENICAÑA, 1995).

### **3.6.2 Bosque seco tropical**

El bosque seco tropical, es una formación vegetal que se da entre los 0 y los 1000 msnm, presenta precipitaciones entre los 700 a 2000 mm anuales, la temperatura media anual es de 25°C. En estos ecosistemas, predominan árboles y muchas especies de plantas y, animales que son endémicas (Castilla, 2010).

El bosque seco tropical es considerado uno de los ecosistemas más amenazados. La ampliación de las fronteras agrícolas ha significado la disminución de áreas de bosques del país; debido a la tala indiscriminada, muchas hectáreas de bosques han pasado a convertirse en pastizales o zonas agrícolas. En el Valle del Cauca, la ampliación del cultivo de caña de azúcar es la principal causa de la pérdida de bosques en la región. Como consecuencia se ve afectada la biodiversidad asociada a estos ecosistemas y disminuyen los servicios que presta un bosque, como lo es la regulación del clima, el sostenimiento de los regímenes de lluvias, la captura de carbono, entre otros (Balam, 2013).

Los bosques funcionan como hábitat de un sinnúmero de especies que intervienen en los flujos de energía y ciclaje de nutrientes que se dan dentro del ecosistema. Las acciones antrópicas sobre los bosques como la tala de árboles ocasiona el rompimiento de estos flujos y ciclos, por ende se ven afectadas todas las especies que en él habitan (Franco *et al.*, 2011). En el Valle del Cauca, existen relictos de bosque secundario entre los cultivos de caña de azúcar, convirtiéndose en parte

del agroecosistema, ya sea como vegetación protectora o de regulación hídrica. Así mismo, en el caso de los guaduales la madera es aprovechada para suplir necesidades estructurales y de demarcación de suertes cultivadas.

### **3.6.3 Pastizal**

Los potreros o pastizales son zonas dedicadas al pastoreo animal, ocupan gran cantidad de hectáreas en el país, estas zonas en su mayoría han sido deforestadas para dedicarlas a la ganadería extensiva. Además, estos suelos han sido utilizados inadecuadamente durante décadas lo que ha ocasionado su degradación a causa del sobrepastoreo (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO, 2006).

La deforestación y los cambios del uso del suelo han ocasionado transformaciones drásticas en las propiedades físicas y biológicas de los suelos, a su vez el pisoteo constante por los animales ocasiona compactación, modificando las propiedades físicas, disminuyendo su porosidad y afectando los flujos de agua y aire (Escudero y Paredes, 2013).

### **3.7 Uso de Bio-inoculantes en la agricultura.**

Los bioinoculantes son productos hechos a base de microorganismos eficientes (bacterias y/o hongos) que tienen la capacidad de cumplir alguna función beneficiosa para la agricultura. Estos bioinoculantes tienen la capacidad de: solubilizar nutrientes, producir sustancias promotoras del crecimiento vegetal, fijación biológica del nitrógeno, inducir resistencia sistémica en la plantas, secretar metabolitos anti fúngicos, entre otros (Mantilla *et al.*, 2011).

Actualmente, existe un crecimiento en la adopción de tecnologías de producción que buscan reducir los impactos negativos de la agricultura sobre el medio ambiente. El uso de bioinoculantes permite minimizar la aplicación de fertilizantes de síntesis química, reduciendo los impactos ambientales negativos, manteniendo la productividad de los cultivos, mejorando la relación beneficio/costo de producción, ya que al no depender de estos fertilizantes, se incrementan los beneficios económicos (Carvajal y Mera, 2010).

Algunas prácticas agrícolas como el uso de fertilizantes, herbicidas y pesticidas, afectan continuamente la cantidad y diversidad de microorganismos del suelo, reduciendo sus poblaciones. De aquí que la aplicación de bioinoculantes, se consolide como una alternativa viable de recuperación de poblaciones benéficas de microorganismos (Cuervo, 2010). Por ejemplo, la aplicación de bacterias solubilizadoras de fosfatos inorgánicos como inoculantes en los cultivos, promueve un mejor aprovechamiento del P en los suelos, aumentando la disponibilidad de este nutriente para las plantas (Pérez et al., 2012).

### **3.8 Evaluación de la eficiencia de solubilización de fosfatos en laboratorio.**

La evaluación realizada en laboratorio, permite estimar cualitativamente la capacidad de solubilización de fosfatos que presentan algunas bacterias. Para esta evaluación se usa el medio de cultivo específico Pikovskaya (**Anexo1**) que contiene P insoluble, donde se siembran las bacterias con capacidad solubilizadora, dando como resultado la formación de halo alrededor de las colonias (coloración clara) e indicando la presencia de P solubilizado (Patiño, 2010).

El tamaño de los halos formados permite calcular el índice de capacidad de solubilización mediante la fórmula: diámetro del halo – diámetro de la colonia



(Cordero, 2008), (Ávila et al., 2015).

Para determinar la capacidad solubilizadora de las cepas, al medio específico se le agrega diferentes fuentes de fosfatos insolubles como fosfato tricalcico,  $(Ca_3(PO_4)_2)$ , fosfato de hierro  $(FePO_4)$  o de aluminio  $(AlPO_4)$ , (Hernández *et al.*, 2011).

## 4. Metodología

### 4.1 Localización

El aislamiento de las bacterias solubilizadoras de fosfatos se llevó a cabo en la Hacienda Cantaclaro ubicada en el corregimiento de Aguaclara, Municipio de Palmira. ( $3^{\circ} 29'52.523''$  N y  $76^{\circ} 14'03.750''$  W). El muestreo se realizó en tres diferentes agroecosistemas: Caña de azúcar, pastizal y bosque.

### 4.2 Muestreo

La metodología para el muestreo de suelos consistió en un diseño completamente aleatorio, tomando cinco sub-muestras de 100g cada una, a una profundidad de 0 a 20 cm, en cada uno de los sistemas a evaluar: Cultivo de caña de azúcar, Pastura para ganadería, y Bosque secundario. Las submuestras se tomaron en tresbolillo, para consolidar muestras compuestas en cada uno de los tres agroecosistemas. Las muestras se almacenaron en bolsas plásticas negras debidamente etiquetadas, se transportaron en nevera de icopor a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  hacia el laboratorio "Hongos de Colombia, Fungicol SAS" ubicado en el corregimiento de La Buitrera, Palmira, para su procesamiento (**Figura 1**). Una vez en el laboratorio, las muestras se dispusieron en mesas donde se sometieron al proceso de secado al aire durante 48 horas bajo sombra. Posteriormente, a las muestras se les pasó un rodillo para homogenizar las, se tamizaron con un tamiz No. 10 con diámetro de 2mm.

**Figura 1.** Procesamiento y secado de muestras de suelo.

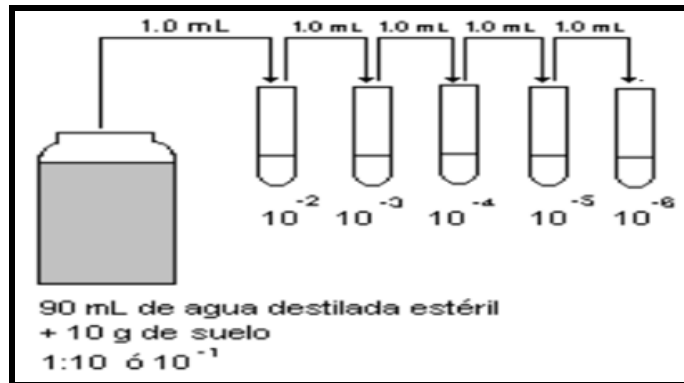


**Fuente:** Yacumal V. (2015).

### **4.3 Aislamiento de bacterias**

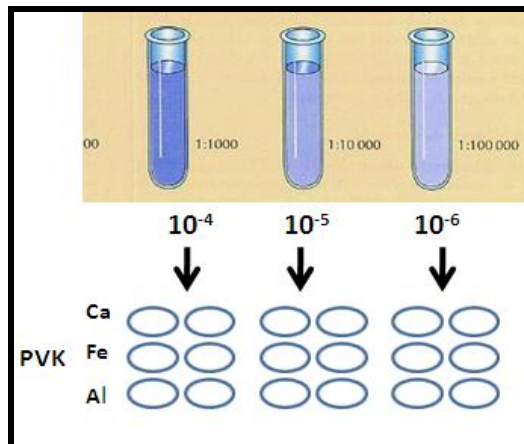
Una vez procesadas las muestras, se procedió a llevar a cabo el aislamiento de las bacterias solubilizadoras de P, presentes en dichos suelos. De cada muestra se tomó 10g de suelo debidamente tamizado y se disolvió cada una en 90 ml de agua peptonada estéril, se agitó en agitador magnético por media hora, de cada suspensión se tomó 1ml y se disolvió en 9ml de agua destilada estéril, hasta llegar a la dilución  $10^{-6}$  (**Figura 2**). Posteriormente, se sembraron en cajas de Petri por duplicado las diluciones  $10^{-4}$  hasta la  $10^{-6}$ , por el método de superficie, en 3 medios específicos PVK (Medio Pikovskaya) que contenía 3 fuentes de fosfatos cada uno: a. fosfato tricalcico  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (PVK Ca) b. fosfato de hierro ( $\text{FePO}_4$ ) (PVK Fe) c. fosfato de aluminio ( $\text{AlPO}_4$ ) (PVK Al) (**Figura 3**).

**Figura 2.** Diluciones seriadas hasta  $10^{-6}$



**Fuente:** Santana (2011).

**Figura 3.** Siembra de diluciones  $10^{-4}$  hasta la  $10^{-6}$  en PVK Ca, Fe y Al.

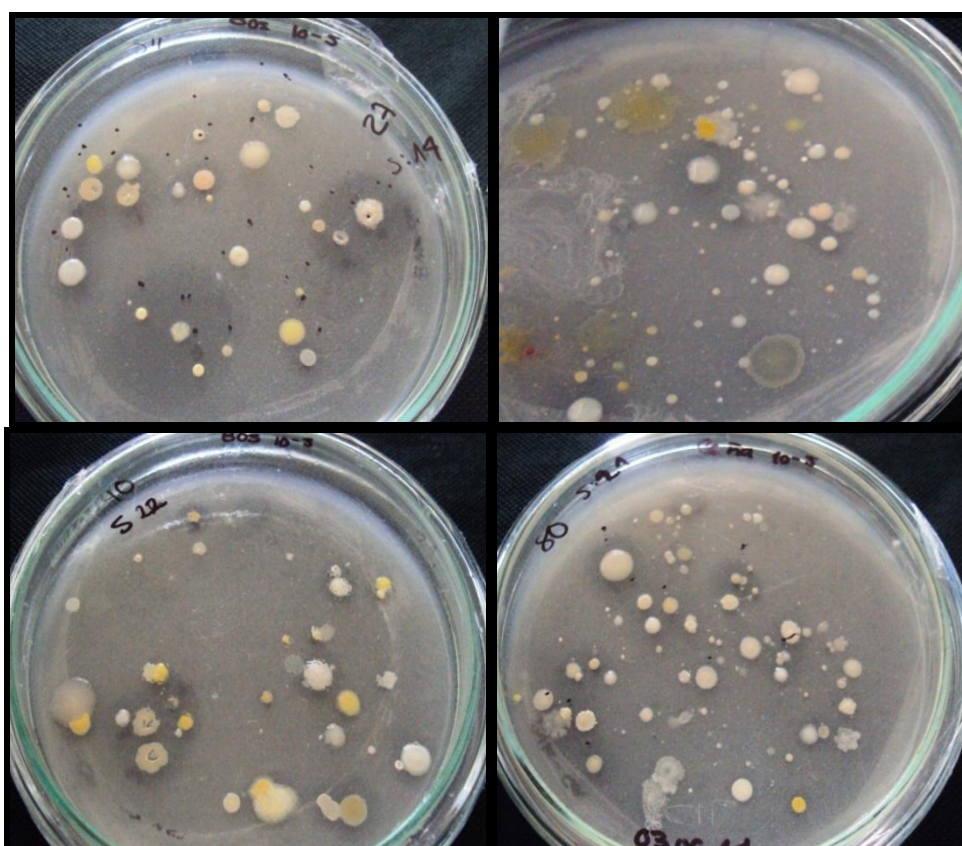


**Fuente:** Yacumal V. (2015).

Estas muestras se incubaron a  $28^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. Las colonias que presentaron halo (**Figura 4**), y que potencialmente tienen capacidad para solubilizar fósforo se resembraron en medio de cultivo PVKCa, transfiriendo una cantidad mínima con la aguja de asa al centro de cada caja de petri, pasados 10 días de incubación se seleccionaron las colonias que presentaban diámetros (colonia + halo) mayores a 10 mm, y se sembraron nuevamente en medio de

cultivo PVKCa. Las colonias seleccionadas se inocularon en el medio de cultivo AN por el método de agotamiento en superficie (**Figura 5**), con el fin de purificarlas y garantizar la pureza de las cepas.

**Figura 4.** Colonias con presencia de halos, sembradas en medio PVKCa.



**Fuente:** Yacumal V. (2015).

**Figura 5.** Siembra de colonias por agotamiento en superficie, a partir de muestras de Bosque.



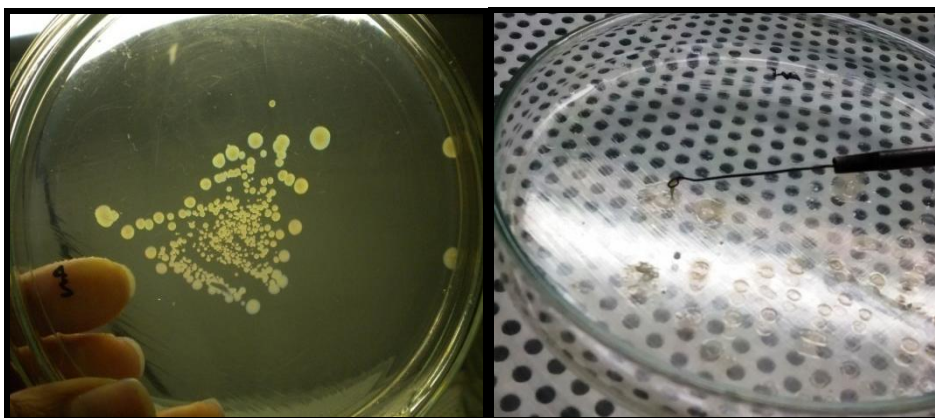
**Fuente:** Yacumal V. (2015).

#### **4.4 Caracterización morfológica de las cepas**

##### **4.4.1 Observación Macroscópica.**

Esta se llevó a cabo mediante la descripción de las características morfológicas de las colonias, como: brillo, color, forma, consistencia (**Figura 6**) tipo de borde y elevación visto al estereoscopio 4x (**Figura 7**).

**Figura 6.** Apreciación de características macroscópicas de las cepas bacterianas aisladas.



**Fuente:** Yacumal V. (2015).

**Figura 7.** Apreciación de forma del borde y elevación de las colonias vista al estereoscopio 4x.

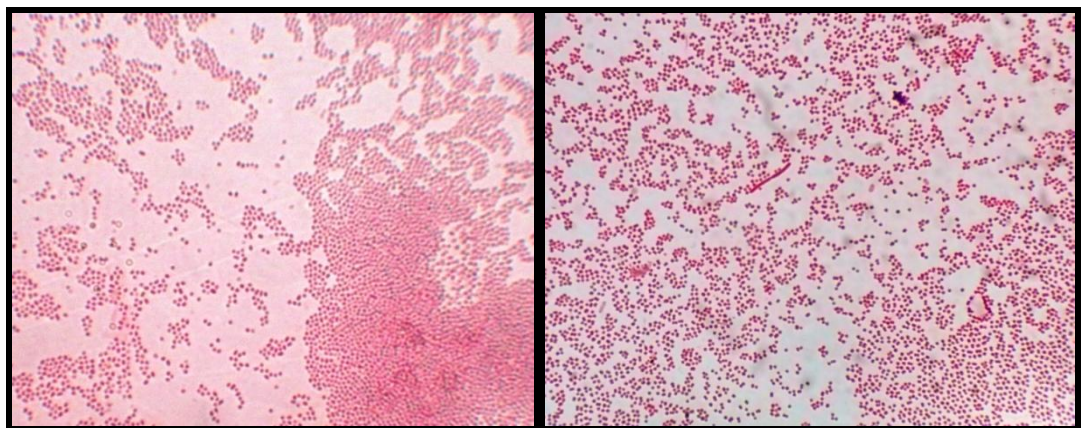


**Fuente:** Yacumal V. (2015).

#### **4.4.2 Observación Microscópica.**

Se llevó a cabo mediante la tinción de Gram y tinción negativa, con lo cual se determinó que las bacterias aisladas con mayor capacidad de solubilización de fosfatos son Gram negativas (Gram-), observando además una tipología bacilar en la mayoría de las muestras. Estas observaciones se realizaron en el microscopio a 100X (**Figura 8**).

**Figura 8.** Ilustraciones de Colonias Gram negativas.



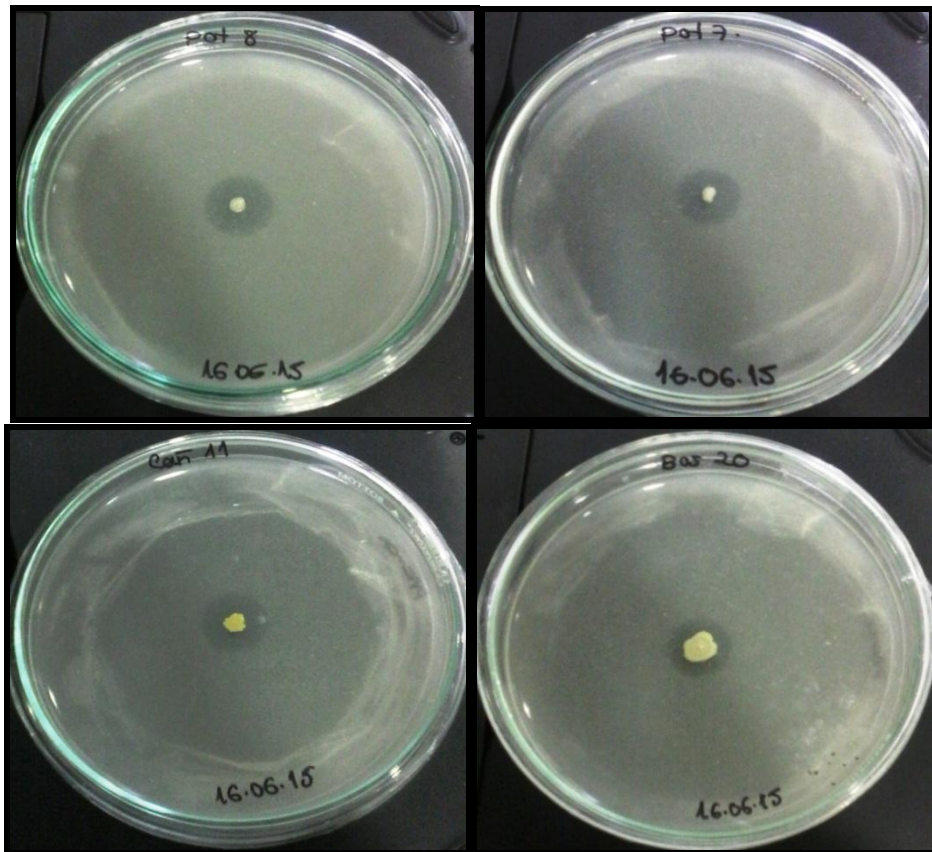
**Fuente:** Yacumal V. (2015).

#### 4.5 Evaluación de la Eficiencia de solubilización de P

Las cepas fueron sembradas por triplicado en medio PVKCa depositando una cantidad mínima de inóculo en el centro de cada una de las placas de Petri, para medir la eficiencia de solubilización de P de cada cepa.

Una vez comprobada la formación de halos en cada una de las repeticiones de la última siembra (**Figura 9**), se procedió a determinar la capacidad de solubilización, midiendo los diámetros de los halos y de las colonias, y se estimó la relación: (diámetro del halo – diámetro de la colonia). Las medidas se tomaron durante los días 8, 12, 16 y 20 después de la siembra y, finalmente, se seleccionaron las cepas con mayores valores para su conservación.

**Figura 9.** Halos formados por diferentes cepas bacterianas en la última siembra.



**Fuente:** Yacumal V. (2015).



Las cepas con mayor capacidad solubilizadora de fosfatos, se conservaron en medio de cultivo TSB-glicerol al 50% estéril, en viales eppendorf conteniendo 1,5 ml de medio, a los cuales se les agregó una asada de cada cultivo puro de la respectiva cepa bacteriana. Estas muestras se almacenaron en congelador a -10°C (**Figura 10**).

**Figura 10.** Conservación de cepas bacterianas en viales eppendorf.



**Fuente:** Yacumal V. (2015).

#### **4.6 Análisis estadístico de la información**

El análisis de los datos de eficiencia de solubilización de fosfatos para cada una de las bacterias, se realizó mediante estadística univariada para diseño completamente al azar, usando análisis de varianza y pruebas de promedios de Duncan ( $p < 0.05$ ). Los datos se organizaron en tablas y figuras que ilustraron la fluctuación de las variables de respuesta para cada agroecosistema evaluado.

## 5. Resultados y discusión

### 5.1 Análisis de suelos de los agroecosistemas evaluados

A partir de los resultados suministrados por el Laboratorio de Servicios Analíticos del CIAT<sup>1</sup>, de las muestras para cada agroecosistema (**Tabla 2**), se observó que los tres agroecosistemas presentan suelos de textura franca. El suelo cultivado con caña de azúcar se categorizó como ácido (pH: 5.5), y los suelos de bosque y pastizal como muy ácidos (pH: 5,22 y 5,27 respectivamente). Los tres agroecosistemas presentaron altos contenidos de materia orgánica (entre 3.4 y 5.6%), siendo esto un buen indicador de actividad biológica del suelo.

**Tabla 2.** Análisis de suelos de los tres agroecosistemas evaluados.

No Muestra	Descripción	pH (Un)	MO (g/kg)	P-Brayll (mg/kg)	Ca (cmol/kg)	Mg (cmol/kg)	K (cmol/kg)	Al (cmol/kg)	Na (cmol/kg)	CIC (cmol/kg)	Cu (mg/kg)	Zn (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Fe (mg/kg)	S (mg/kg)	B (mg/kg)	Arcilla (%)	Arena (%)	Limo (%)	Textura (Tex)
	<b>LCM (mg/L)</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	CULTIVO DE CAÑA (0-20 cm)	5.56	34.67	10.94	9.24	9.10	0.57	0.00	0.07	17.65	1.13	1.80	26.67	17.44	17.28	0.85	22.79	53.11	24.10	11.00
2	PASTIZAL (0-20 cm)	5.22	56.89	3.90	7.11	6.36	0.13	0.11	0.00	14.00	0.70	2.03	23.06	31.65	16.89	1.03	22.65	45.73	31.62	2.00
3	BOSQUE (0-20 cm)	5.27	35.68	9.79	8.32	5.16	0.15	0.10	0.00	12.90	0.76	0.88	23.30	22.83	18.26	0.72	22.51	43.52	33.97	2.00

**Fuente:** Laboratorio de Servicios Analíticos del CIAT<sup>1</sup> (2015).

A nivel de bases intercambiables se presentaron niveles intermedios, sin embargo la relación Ca/Mg fue inferior a 2, indicando deficiencias de Ca a nivel general en los tres agroecosistemas evaluados, teniendo relación con el bajo pH. El K presentó valores bajos en el suelo de pastizal y bosque, sin embargo estos contenidos fueron altos en el cultivo de caña de azúcar, pudiendo deberse a la aplicación periódica de fertilizantes (**Tabla 3**). El Na presentó valores intermedios en el cultivo de caña de azúcar y estuvo ausente en los agroecosistemas de

<sup>1</sup> Centro Internacional de Agricultura Tropical. Kilómetro 17 recta Cali- Palmira (Valle del Cauca).

pastizal y bosque, pudiendo deberse esto a la aplicación de fertilizantes y su efecto sobre la formación de sales.

**Tabla 3.** Parámetros cualitativos del análisis de suelos, a partir del contenido de elementos (B: bajo, M: medio y A: alto) en los tres Agroecosistemas.

	pH	MO	P	Ca	Mg	K	Na	CIC	Cu	Zn	Mn	Fe	S	B	Tex
<b>Caña</b>	Moderadamente ácido	A	M	A	A	A	M	M	M	M	A	B	A	A	Franco arcilloso arenoso
<b>Pastizal</b>	Muy ácido	A	B	A	A	B	M	M	B	M	A	M	A	A	Franco
<b>Bosque</b>	Muy ácido	A	M	A	A	B	M	M	B	B	A	B	A	A	Franco

**Fuente:** Yacumal V. (2015).

El P tanto en el cultivo de caña de azúcar y bosque, presentó valores entre 9.8 y 11 mg.kg<sup>-1</sup>, adecuados para la nutrición vegetal. Sin embargo, este elemento fue deficitario en el pastizal donde su ciclaje puede ser más lento. En cuanto a micronutrientes, los tres agroecosistemas presentaron altos valores de Mn, S y B, siendo importantes como cofactores enzimáticos y de proteínas. En Cu, presentó baja concentración en el pastizal y el bosque, e intermedio en el cultivo de caña de azúcar, pudiendo deberse a la aplicación de fungicidas en el cultivo para el control de hongos fitopatógenos. Los contenidos de Zn fueron intermedios en el cultivo de caña de azúcar y el pastizal y, bajos en el bosque. Por último, el Fe presentó bajos contenidos en los suelos de bosque y caña de azúcar e intermedios en el pastizal, lo que puede deberse a la alta absorción de las gramíneas para el desarrollo de procesos fisiológicos asociados a la fotosíntesis.

## 5.2 Aislamiento de bacterias

Pasado el tiempo de incubación entre 24 y 48 horas, se encontraron 101 colonias que presentaban halo en medio PVK con fosfato tricálcico (**Anexo 2**). Sin embargo, esto no se observó en los medios PVK con fosfatos de Hierro y Aluminio, donde los halos fueron escasos. Esto indica que el crecimiento de las colonias en medios de cultivo artificiales bajo condiciones de laboratorio, las cepas presentaron mayor afinidad y solubilización de fosfatos ligados al calcio, como puede ocurrir en el suelo (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Colonias que durante la incubación presentaron halo de solubilización en medio PVK-Ca.

Muestra	Colonias con halo en PVK (Ca)
Caña	41
Bosque	38
Pastizal	22
Total	101

**Fuente:** Yacumal V. (2015).

Adicionalmente, se observó que las bacterias aisladas de suelos cultivados con caña de azúcar presentaron mayor cantidad de halos, seguidas de las aisladas en el Bosque y Pastizal. Sin embargo, al evaluar el tamaño de los halos formados, se encontró que nueve (9) de las colonias aisladas del bosque presentaron diámetros mayores a 10 mm, seguidas de siete (7) aisladas del pastizal y finalmente, cinco (5) aisladas en el cultivo de caña (**Tabla 5**). Estos resultados indican que a pesar de que existe diversidad de bacterias con potencial genético para solubilizar fosfatos de calcio en los suelos evaluados, sólo un pequeño grupo presenta alta eficiencia para solubilizar fosfatos.

**Tabla 5.** Colonias que presentaron diámetro mayor a 10mm.

<b>Muestra</b>	<b># Cepas con halo</b>
Bosque	9
Caña	5
Pastizal	7
Total	21

**Fuente:** Yacumal V. (2015).

### **5.3 Resiembra de bacterias para evaluar eficiencia de solubilización de P.**

La resiembra consecutiva de las 21 bacterias con potencial solubilizador de fosfatos, permitió determinar que 4 de ellas perdieron dicha cualidad, finalmente quedando 17 bacterias (**Tabla 6**) con alto potencial solubilizador. Cabe resaltar, que las bacterias aisladas del suelo de Bosque conservan su potencial solubilizador de fosfatos, posiblemente por mayor potencial genético de solubilización frente a las aisladas en los otros dos agroecosistemas.

**Tabla 6.** Cepas que continúan presentando halo después de las resiembras.

<b>Muestra</b>	<b># Cepas con halo</b>
Bosque	9
Pastizal	5
Caña	3
Total	17

**Fuente:** Yacumal V. (2015).

## 5.4 Caracterización morfológica de las cepas

### 5.4.1 Observación Macroscópica

Se observó que todas las colonias presentaron superficie plana, la mayoría de consistencia lisa y sólo dos de tipo mucosa. Adicionalmente, se encontraron colonias de formas irregulares y circulares, con aspecto del borde ondulado y entero, así como decolores variados entre amarillo claro, blanco y beige (**Tabla 7**).

**Tabla 7.** Características macroscópicas de las colonias

Cepa	Forma	Aspecto Del Borde	Brillo	Color	Consistencia O textura	Superficie
BOS5	Circular	Ondulado	Brillante	Amarillo claro	No mucosa	Convexa
BOS7	Irregular	Ondulado	Brillante	Amarillo claro	Mucosa	Convexa
BOS11	Irregular	Ondulado	Brillante	Beige	No mucosa	Convexa
BOS13	Circular	Entero	Brillante	Beige	No mucosa	Plana
BOS20	Circular	Entero	Brillante	Beige	No mucosa	Plana
BOS17	Circular	Ondulado	Brillante	Amarillo claro	No mucosa	Plana
BOS 1	Irregular	Ondulado	Brillante	Amarillo claro	Mucosa	Plana
BOS4	Circular	Entero	Opaca	Blanco	No mucosa	Plana
BOS14	Irregular	Entero	Opaca	Blanco	No mucosa	Plana
CAN11	Irregular	Ondulado	Brillante	Amarillo claro	No mucosa	Convexa
CAN12	Circular	Entero	Brillante	Beige	No mucosa	Plana
CAN16	Circular	Ondulado	Brillante	Amarillo claro	No mucosa	Convexa
POT7	Circular	Ondulado	Brillante	Amarillo claro	No mucosa	Convexa
POT8	Circular	Ondulado	Brillante	Amarillo claro	No mucosa	Convexa
POT10	Irregular	Ondulado	Brillante	Amarillo claro	No mucosa	Plana
POT1	Circular	Ondulado	Brillante	Amarillo claro	No mucosa	Plana
POT13	Circular	Ondulado	Brillante	Amarillo claro	No mucosa	Convexa

**Fuente:** Yacumal V. (2015).

### 5.4.2 Observación Microscópica

De acuerdo con la observación microscópica de las cepas aisladas, se encontró que la mayoría de ellas con CSF corresponden a bacilos (12) y solo dos (2) a cocobacilos (forma intermedia entre cocos y bacilos pequeños). Luego de realizada la tinción de Gram, se pudo establecer que la totalidad de cepas pertenecen al grupo de Gram negativas (**Tabla 8**).

**Tabla 8.** Características morfológicas de las cepas, observadas al microscopio (100X).

Cepa	Gram+	Gram-	Forma
BOS5		x	Bacilos cortos
BOS7		x	Bacilos medianos
BOS11		x	Bacilos cortos
BOS13		x	Bacilos cortos
BOS20		x	Bacilos cortos
BOS17		x	Bacilos cortos
BOS 1		x	Bacilos cortos
BOS4		x	Bacilos cortos
BOS14		x	Bacilos cortos
CAÑ11		x	Bacilos cortos
CAÑ12		x	Bacilos cortos
CAÑ16		x	Bacilos cortos
POT7		x	Cocobacilos
POT8		x	Cocobacilos
POT10		x	Bacilos cortos
POT1		x	Bacilos cortos
POT13		x	Bacilos cortos

**Fuente:** Yacumal V. (2015).

## 5.5 Evaluación de la Eficiencia de solubilización

Al calcular la capacidad de solubilización de cada cepa (diámetro del halo – diámetro de la colonia), se determinó que a los 20 días la cepa BOS7 presento mayor CSF (24 mm), seguida de POT8 (19,5 mm) y POT7 (18,5 mm) y la de menor CSF fue BOS4 (6,5 mm). **(Tabla 9).**

**Tabla 9.** Cepas y su capacidad solubilizadoras de fosfatos (en mm)

	DÍA 8	DÍA 12	DÍA 16	DÍA 20
BOS7	11,5	15,3	20,5	24,0
BOS13	7,8	9,8	12,3	14,0
BOS17	6,3	9,0	11,2	12,0
BOS11	8,2	10,2	12,5	13,8
BOS1	1,8	3,3	5,2	7,8
BOS4	1,5	2,7	3,8	6,5
BOS5	8,2	10,8	13,2	14,8
BOS14	2,2	3,7	5,7	8,0
BOS20	6,8	11,3	13,7	14,3
CAÑ11	1,3	6,3	11,7	15,0
CAÑ12	7,8	10,2	12,7	14,0
CAÑ16	3,0	8,3	11,7	15,8
POT1	5,2	8,7	12,0	12,7
POT7	10,8	14,5	16,7	18,5
POT8	10,5	15,0	17,0	19,5
POT10	4,2	6,5	9,8	12,8
POT13	6,3	9,7	11,7	13,8

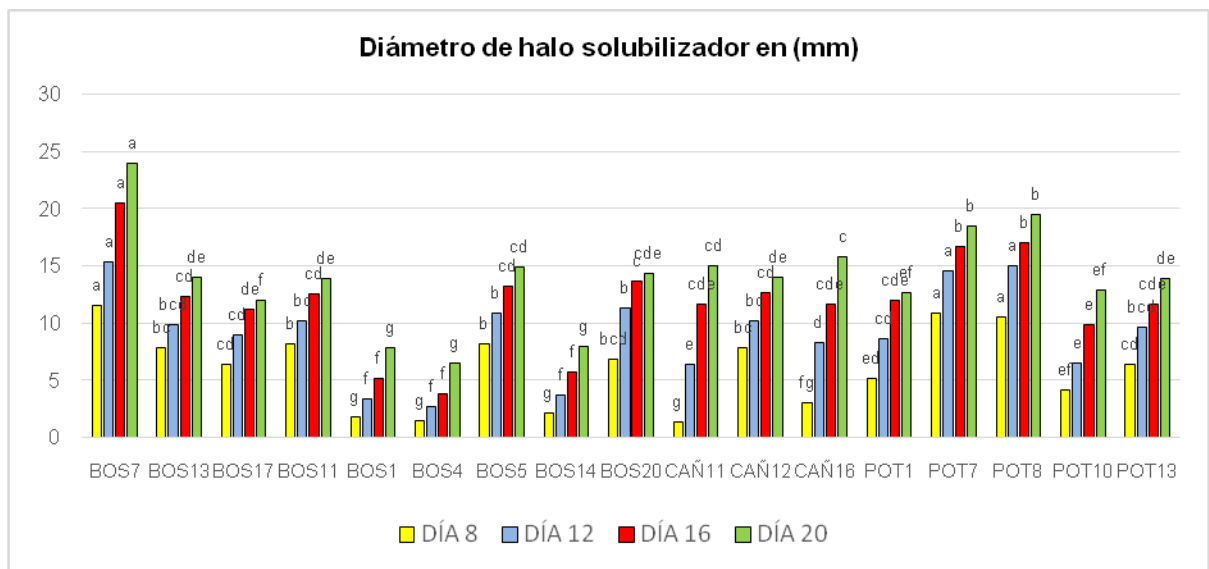
**Fuente:** Yacumal V. (2015).



## 5.6 Análisis estadístico de la información

A partir del análisis de Varianza ANDEVA, para las 17 bacterias seleccionadas con potencial de solubilización de P, se marcaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) para la relación de diámetros de halo durante los cuatro periodos evaluados (**Anexo 2**). Luego de realizar la prueba de medias de Duncan ( $p < 0.05$ ), se encontró que las cepas con mayor capacidad de solubilización de fosfatos CSF en su orden, fueron: BOS7 significativamente alta en los cuatros periodos, seguida de POT8, POT7, BOS5 y CAÑ16 (**Anexo 3**). La Figura 8 ilustra cómo se distribuyó la variable CSF, a partir de la diferencia entre el diámetro del halo y el diámetro de la colonia, en las 17 cepas seleccionadas.

**Figura 11.** Diámetro de halo solubilizador de P en mm, para las 17 cepas seleccionadas, durante los cuatro periodos de evaluación (día 8, 12, 16 y 20).



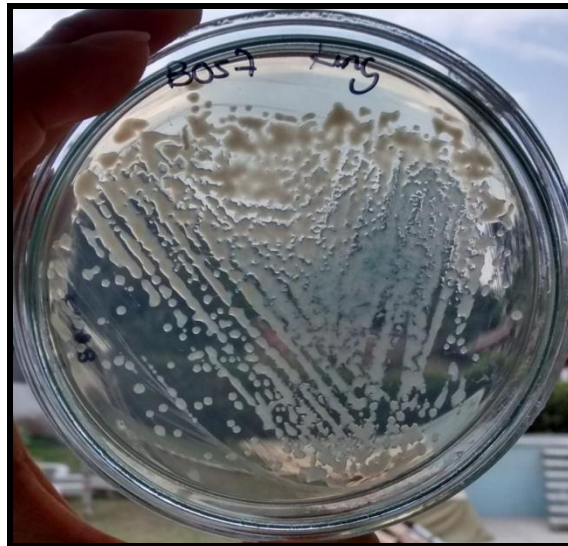
**Fuente:** Yacumal V. (2015).

Según los resultados estadísticos, la cepa BOS7 siempre conservó el mayor nivel de solubilización en los cuatro periodos evaluados, iniciando con un nivel de 11.5mm y terminando con 24mm. POT8 y POT7 también se mantuvieron como segunda y tercera cepa con mejores niveles, POT8 iniciando con 10.5mm y

finalizando con 19.5mm. POT7 iniciando con 10.8mm y finalizando con 18.5mm. BOS5 y CAÑ16 presentaron comportamiento diferentes a lo largo del periodo de medición, BOS5 iniciando con 8.2mm y finalizando con 14.8mm y, CAÑ16 iniciando con 3mm y finalizando con 15.8mm.

La cepa más eficiente (BOS7) corresponde, según sus características microscópicas y macroscópicas a bacilos medianos Gram negativos, con colonias irregulares, borde ondulado, color amarillo claro brillante y textura mucosa (**Figura 12**).

**Figura 12.** Características macroscópicas de la cepa Bos7.

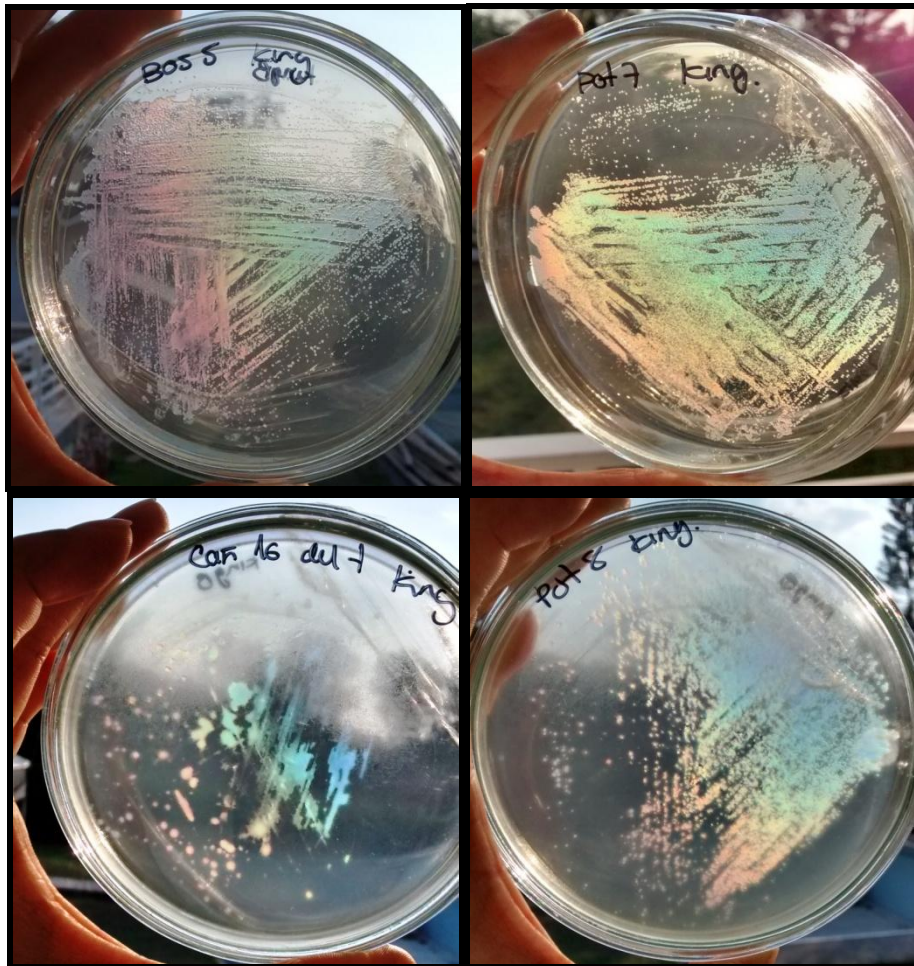


**Fuente:** Yacumal V. (2015).

Las cepas POT8 y POT7, corresponden según sus características microscópicas a cocobacilos Gram negativos y las cepas BOS5 y CAÑ16 a bacilos cortos Gram negativos, presentando las cuatro cepas las mismas características macroscópicas: colonias circulares, borde ondulado, color amarillo claro brillante, textura no mucosa y elevación convexa. Estas cepas por las características presentadas, podrían pertenecer al género *Pseudomonas sp.*, que ha sido reportado como solubilizador en varios trabajos investigativos (Fernández, 2005;

Patiño, 2010; Paredes, 2010; Restrepo, 2015). Por esta razón, se decidió sembrarlas en medio King B (**Figura 13**), para comprobar la producción de pigmentos característicos de estas bacterias como: pioverdina, compuesto fluorescente; piocianina, pigmento fenazínico azul; piorrubina (rojo) y la piomelanina (marrón) (Merino, 2007).

**Figura 13.** Cepas POT7, POT8, BOS5, CAÑ16, sembradas en medio King B.



**Fuente:** Yacumal V. (2015).

Como resultado de la siembra en medio King B, se pudo observar que las cuatro cepas presentaron pigmentación fluorescente y coloraciones rojas, verdes y amarillas. Lo anterior, podría indicar que estas cepas pertenecen al género de

*Pseudomonas sp.* Sin embargo, para tener mayor grado de certeza se recomienda la realización de pruebas bioquímicas o moleculares que certifiquen con alto grado de confianza los resultados.

### **A manera de síntesis**

De acuerdo con los aislamientos realizados en los tres agroecosistemas, se pudo observar a nivel general que las bacterias presentaron mayor afinidad en la solubilización de fosfatos de calcio, que de aluminio y hierro. Esto se puede deber a que se han reportado mayor cantidad de microorganismos que solubilizan fosfatos de calcio y pocos los que solubilizan fosfatos de hierro y/o aluminio. Al parecer es más factible determinar la capacidad de solubilización de fosfatos de hierro y aluminio en medios líquidos.

De acuerdo con la metodología empleada para evaluar la CSF, se observó respuesta positiva en algunos aislamientos de los tres agroecosistemas estudiados, siendo ésta mayor en el bosque secundario. Esto puede deberse a que bajo condiciones de baja o nula disturbación del suelo, las bacterias presentes se especializan en el ciclaje de elementos importantes para la nutrición vegetal como el P, mientras que en suelos disturbados por labranza y con adición de fertilizantes, las bacterias con CSF reducen su actividad, siendo esto negativo para la sustentabilidad del agroecosistema.

A nivel de eficiencia de solubilización, de las bacterias aisladas con CSF se observó que las BOS7 fue la que presentó desempeño significativamente alto. A pesar de que los agroecosistemas evaluados son cercanos, la BOS7 no se encontró en los suelos de potrero o sembrado con caña de azúcar, lo que pudo señalar que las actividades intensivas del suelo limitan su presencia. De aquí, la importancia de rescatar este tipo de microorganismos en pro de conservar la

biodiversidad y su prestación de servicios ecosistémicos, como la solubilización de P en el suelo.

Del total de bacterias aisladas, se pudo observar que inicialmente se presentaron gran cantidad que mostraban potencial solubilizador. En el agroecosistema cultivado con caña se presentaron 41 bacterias, en bosque 38 y en pastizal 22, para finalmente quedar como las más eficientes 2 cepas de Bosque: BOS7 y BOS5, 2 cepas en pastizal: POT7 y POT8 y 1 cepa en caña: CAÑ16. Lo que muestra que inicialmente son muchas las bacterias que evidencian esta capacidad pero muy pocas la conservan en el tiempo y son realmente eficientes en la solubilización de fosfatos.

A nivel morfológico, las 5 cepas pertenecen al grupo de las bacterias Gram negativas, la cepa BOS7 es de tipo bacilar de mediano tamaño, las cepas BOS5 y CAÑ16 son bacilos pequeños y, POT7 y POT8 presentan formas entre bacilos y cocos, siendo estas de tipo cocobacilo. De acuerdo con los resultados obtenidos, las mejores bacterias con potencial de solubilización podrían ser usadas en trabajos aplicados, inicialmente bajo condiciones de invernadero para estimar su aporte a la nutrición de plantas de interés comercial. Este tipo de trabajos, permitirían aprovechar este valioso recurso a nivel biotecnológico para el mejoramiento de la fertilidad del suelo y la sustentabilidad agroecosistémica.

## 6. Conclusiones

- Las bacterias aisladas en los tres agroecosistemas, mostraron alto potencial de solubilización de fosfatos ligados al calcio. No se aislaron bacterias con capacidad para solubilizar fosfatos de hierro y aluminio.
- La metodología utilizada en el desarrollo del presente trabajo fue satisfactoria ya que permitió encontrar diferencias significativas entre las bacterias aisladas, según el análisis estadístico realizado.
- A pesar de aislarse inicialmente gran cantidad de bacterias con potencial solubilizador de fosfatos, se muestra que las cepas realmente eficientes y que conservan esta característica a través del tiempo son muy pocas.
- La cepa más eficiente encontrada, BOS7, según las características morfológicas presentadas, no es similar a ninguna otra de las cepas aisladas, mientras que POT7, POT8, BOS5 y CAÑ16 comparten características similares pudiendo presentar mayor acercamiento genético.
- La cepa más eficiente (BOS7) fue aislada en el agroecosistema bosque, que por alguna razón biológica no está presente en los demás agroecosistemas que han sido más intervenidos por el hombre.

## 7. Recomendaciones

- Se recomienda realizar estudios posteriores que permitan la identificación genética de las cepas más eficientes en la solubilización de fosfatos, con el fin de realizar aprovechamiento biotecnológico.
- Se sugiere avanzar en el estudio de estas cepas, mediante ensayos de invernadero y campo, para evaluar su verdadero potencial sobre la nutrición fosforada vegetal.
- En las evaluaciones posteriores en invernadero de estas bacterias, se recomienda estimar otras potencialidades como son la promoción de crecimiento vegetal, interacción con hongos micorrizicos, entre otras.
- Desde la academia, se precisa fomentar trabajos investigativos en este campo, a fin de desarrollar metodologías para la producción de bioinsumos que den respuesta a las necesidades del agro.

## 8. Bibliografía

Acuerdo 0015. (2012). Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Estatuto general. 16p. URL disponible en: [http://sgeneral.unad.edu.co/images/documentos/consejoSuperior/acuerdos/2012/COSU\\_ACUE\\_0015\\_30032012.pdf](http://sgeneral.unad.edu.co/images/documentos/consejoSuperior/acuerdos/2012/COSU_ACUE_0015_30032012.pdf)

Ali, A.,Jilani, G.,Saleem, M.,Saqlan,S. and Rasheed, M. (2009). Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production. J. AGRIC. BIOL. SCI. 1(1):48-58.

Ávila EG., Lizarazo LM., Cortés F. (2015). Promoción del crecimiento de *Baccharis macrantha* (Asteraceae) con bacterias solubilizadoras de fosfatos asociadas a su rizosfera. Acta biol. Colomb. 2015;20(3):121-131.

Balam L. (2013). Valoración económica del servicio ambiental: captura de carbono, en la reserva forestal Xilitla, San Luis Potosí, México. Universidad Nacional Autónoma de México.

Berrocal, E., Durango, J., Barrera, J., yDíaz,B. (2009). Evaluación de formas de fósforo en suelos cultivados con plátano. Grupo Agricultura Sostenible, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Córdoba, Colombia.

Camas R., Turrent A., Cortes J., Livera M., González A., Villar B., López J., Espinoza N., y Cadena P. (2012). Erosión del suelo, escurrimiento y pérdida de nitrógeno y fósforo en laderas bajo diferentes sistemas de manejo en Chiapas, México. Revista mexicana de ciencias agrícolas. vol.3 no.2 Texcoco mar./abr. 2012.

Carvajal J. y Mera A. (2010). Fertilización biológica: técnicas de vanguardia para el



desarrollo agrícola sostenible. Rev. Producción + Limpia.  
vol.5 no.2 Caldas July/Dec. 2010

Castilla, M. (2010). Identificación de variables de paisaje y variables de carácter florístico y estructural que explican la presencia-ausencia del *Saguinusoedipus* (titi cabeciblanco) en fragmentos de bosque seco tropical en el norte del departamento de Bolívar y sur del Atlántico. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.

Centro De Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia - CENICAÑA. (1995). El cultivo de la caña en la zona Azucarera de Colombia. Cali, Colombia. 412 p

CONPES 3577. (2009). Consejo Nacional de Política Económica y Social. República de Colombia. Departamento Nacional de Planeación. Política nacional para la racionalización del componente de costos de producción asociado a los fertilizantes en el sector agropecuario. Bogotá D.C. 34p.

Cordero, J., Ortega, E. y Ortega, E., (2008). La inoculación de plantas con *Pantoeasp.*, bacteria solubilizadora de fosfatos, incrementa la concentración de P en los tejidos foliares.

Corrales L., Arévalo Z., Moreno V. (2014) Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. NOVA - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas - IssN: 1794-2470 - Vol. 12 No. 21 Enero - Junio de 2014.

Cuervo, J. (2010). Aislamiento y caracterización de *Bacillus* spp. como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C

Cueto, J. y Figueroa, U. (2012). Impacto ambiental de la fertilización y recomendaciones para mejorar la eficiencia en el uso de nutrimentos INIFAP Querétaro.

Escudero, M. y Paredes, J. (2013). Reducción de la degradación de suelos agrarios. Programa Presupuestal Multisectorial. Ministerio De Agricultura, Perú.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. FAO. (2006). La ganadería amenaza el medio ambiente. <http://www.fao.org/newsroom/ES/news/2006/1000448/index.html>

Franco, L., Delgado, J., Andrade, G., Hernández, S. y Valderrama, J. (2011). Humedales Altoandinos frente al Cambio Climático Global. Evaluación de la vulnerabilidad y estrategia de adaptación en un complejo de humedales de la cordillera oriental colombiana: Lagunas de Fúquene, Cucunubá y Palacio. Ecopetrol – Fundación Humedales.

Guzmán, E. (2011). Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fósforo a partir de cuatro suelos de la provincia de Chimborazo. Escuela Superior Politécnica De Chimborazo, Riobamba – Ecuador. 102p.

Hernández, T., Carrión, G. y Heredia, G. (2011). Solubilización *in vitro* de fosfatos por una cepa de *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Agrociencia* 45: 881-892. 2011.

Lee, W. CH. (2013). Identification of phosphorus efficient potato cultivars. Master of Science thesis. University of Florida. United States of América. 103p.

Lozano Z., Hernández R., Bravo C., Rivero C., Toro M., Delgado M. (2012). Disponibilidad de fósforo en un suelo de las sabanas bien drenadas venezolanas, bajo diferentes coberturas y tipos de fertilización. *Rev. Interciencia*. Nov 2012, vol.

Mantilla, C., García, L. y Oviedo, L. (2011). Efecto biofertilizante del preparado: residuos vegetales-bacteria nativa diazótropa, sobre las variables biométricas en plántulas de *Rhapanussativus*. Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XIII No. 156-162

Merino, L. A. (2007). *Pseudomonas aeruginosa*: una bacteria con personalidades múltiples Revista Argentina de Microbiología, vol. 39. p. 143 Asociación Argentina de Microbiología Buenos Aires, Argentina

Molina, C., Molina, C., Molina, E. y Molina, J. (2012). Manejo agroecológico de caña de azúcar y sistemas silvopastoriles intensivos Alternativas sostenibles para el valle geográfico del río Cauca. Reserva Natural El Hatico. Revista Técnica No. 29,

Montecinos, C. (1995). Manejo Biológico del Fósforo en el Suelo. CET Temuco, Chile. Revista de CLADES Número Especial 8/9.

Munera G., Meza D. (2014). El fósforo elemento indispensable para la vida vegetal. Universidad Tecnológica De Pereira.

Ojekami, A., Ige, D., Hao, X., and Akinreml, O. (2011). Phosphorus Mobility in a Soil with Long Term Manure Application. In Journal Agricultural Science. Vol. 3(3): 25- 38.

Osorno, L. (2013). Bio-acidulación de roca fosfórica bajo condiciones in vitro. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias Medellín, Colombia.

Paredes, M. y Espinosa, D. (2010). Ácidos orgánicos producidos por Rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. Rev. Tierra Latinoamérica. Vol. 28 num.1. México.

Patiño, O. (2010). Solubilización de fosfatos por poblaciones bacterianas aisladas de un suelo del Valle del Cauca. Estudio de biodiversidad y eficiencia. Tesis doctoral. Universidad Nacional De Colombia, Palmira. 133p.

Patiño, C., y Sanclemente O.E. (2014). Los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF): una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible. Entramado, vol. 10, núm. 2, julio-diciembre, 2014, pp. 288-297. Universidad Libre. Cali, Colombia

Pereira, C., Maycotte C., Restrepo B., Mauro F., Calle A. y Esther M. (2011). Módulo: sistemas de producción vegetal. Primera Edición.

Pérez, A., De la Ossa, J. y Montes, D. (2012). Hongos solubilizadores de fosfatos en fincas ganaderas del departamento de Sucre. En revista colombiana de la Ciencia Animal. Vol. 4 (1): 35- 45.

Pérez M., Peña M., Alvarez P. (2011). Agroindustria cañera y uso del agua: análisis crítico en el contexto de la política de agrocombustibles en Colombia. Ambiente & Sociedad e. vol.14 no.2 São Paulo July/Dec. 2011

Quezada C. (2013). Analizar el rendimiento productivo de la caña de azúcar en el cantón huamboya, mediante la fundamentación teórica y práctica, con la finalidad de obtener excelentes resultados productivos y por ende reducir los costos de producción a los cañicultores”. Universidad Católica De Cuenca. Ecuador.

Restrepo, M., Marulanda, S., De la Fe, Y., Díaz, A., Baldani, V. y Hernández, A. (2015). Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, Vol. 46, No. 1, pp. 63-76.

Rockström, J., Steffen, W., Noone, K., Persson, A., Chapin, F. S., Lambin, E., Lenton, T. M., Scheffer, M., Folke, C., Schellnhuber, H., Nykvist, B., De Wit, C. A., Hughes, T., Van der Leeuw, S., Rodhe, H., Sörlin, S., Snyder, P. K., Costanza, R., Svedin, U., Falkenmark, M., Karlberg, L., Corell, R.W., Fabry, V. J., Hansen, J., Walker, B., Liverman, D., Richardson, K., Crutzen, P., and Foley, J. (2009). Planetary boundaries: exploring the safe operating space for humanity. In *Journal Ecology and Society*. Vol. 14(2): 32-41.

Rotaru, V. and Sinclair, T. (2009). Interactive influence of phosphorus and iron on nitrogen fixation by soybean. In *Journal Environmental and Experimental Botany*. Vol. 66: 94- 99.

Sánchez D., Gómez R., Garrido M y Bonilla R. (2012). Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. vol.3 no.7 Texcoco sep./oct. 2012

Sánchez de Prager, M. y Velásquez, D. (2008). Las micorrizas: el micelio externo de los hongos formadores de micorriza arbuscular (HMA). *Cuadernos ambientales número 12*. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. 15p.

Santana, L., Contreras, Z. y Acosta, P. (2011). *Manual de prácticas de microbiología ambiental*. Revisado por: Academia de Biología. Ciudad Juárez, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez 2011. 45p.

Selvakumar, G.,Joshi, P.,Suyal, P.,Kumar, P., Krishna, G.,Venugopalan, R.,Kumar, J.,Chandra, J. yShankar, H. (2013). Rock phosphate solubilization by psychrotolerant *Pseudomonas* spp. and their effect on lentil growth and nutrient uptake under polyhouse conditions. *Ann Microbiol* DOI 10.1007/s13213-012-0594-5.

Silva, M. (2011). Adsorción y desorción de fósforo en suelos del área central de la región pampeana. Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Agrarias Escuela para Graduados. Córdoba, Argentina.

Valenzuela J. (2010). Formas y distribución del fósforo en el perfil de suelo en diferentes condiciones de uso y manejo en un Andisol de Chiloé, Chile. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile

Zúñiga, O., Osorio, J., Cuero, R. y Peña, J. (2011). Evaluación de Tecnologías para la Recuperación de Suelos Degradados por Salinidad. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín* 64(1): 5769-5779.

## Anexos

### Anexo 1. Medio de cultivo Pikovskaya (PVK) en g L-1.

Glucosa	10
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5
NaCl	0.2
MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	0.1
KCl	0.2
extracto de levadura	0.5
MnSO <sub>4</sub> ,H <sub>2</sub> O	0.002
FeSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	0.002
Agar	15

Fuente: (Patiño, 2010)

### Anexo 2. Colonias que presentaron halo en medio PVK con fosfato tricálcico, pasados 24 y 48 horas de incubación.

#### Anexo 2.1. Colonias de la muestra del suelo de bosque que presentaron halo en medio PVK con fosfato tricálcico.

Muestra	Dilución	Repetición	Colonias presentes	Colonias solubilizadoras (Ca)
Bosque	10-5	1	27	14
		2	40	22
	10-6	1	6	1
		2	4	1
Total				<b>38</b>

Fuente: Yacumal V. (2015).

**Anexo 2.2.** Colonias de la muestra del cultivo de caña que presentaron halo en medio PVK con fosfato tricálcico,

<b>Muestra</b>	<b>Dilución</b>	<b>Repetición</b>	<b>Colonias presentes</b>	<b>Colonias solubilizadoras (Ca)</b>
Caña	10-5	1	88	9
		2	80	21
	10-6	1	12	2
		2	13	9
Total				<b>41</b>

**Fuente:** Yacumal V. (2015).

**Anexo 2.3.** Colonias de la muestra del suelo de pastizal que presentaron halo en medio PVK con fosfato tricálcico,

<b>Muestra</b>	<b>Dilución</b>	<b>Repetición</b>	<b>Colonias presentes</b>	<b>Colonias solubilizadoras (Ca)</b>
Pastizal	10-5	1	86	10
		2	67	7
	10-6	1	5	3
		2	14	2
Total				<b>22</b>

**Fuente:** Yacumal V. (2015).

**Anexo 3.** Análisis de Varianza ANDEVA para las 17 bacterias seleccionadas.

**Anexo 3.1.** ANDEVA para la variable diámetro de solubilización durante el primer periodo de evaluación (8 días después de siembra en medio PVK).

<b>Fuentes de Variación</b>	<b>GL</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Cuadrado Medio del Error</b>	<b>F Calculado</b>	<b>F Pr &gt;</b>
Cepas	16	533,68	33,36	35,81	<.0001
Error	34	31,66	0,93		
Total	50	565,34			

**Fuente:** Datos de salida del programa SAS versión 9.2.



**Anexo 3.2.** ANDEVA para la variable diámetro de solubilización durante el primer periodo de evaluación (12 días después de siembra en medio PVK).

<b>Fuentes de Variación</b>	<b>GL</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Cuadrado Medio del Error</b>	<b>F Calculado</b>	<b>Pr &gt; F</b>
Cepas	16	699,87	43,74	47.72	<.0001
Error	34	31,17	0,91		
Total	50	731,04			

**Fuente:** Datos de salida del programa SAS versión 9.2.

**Anexo 3.3.** ANDEVA para la variable diámetro de solubilización durante el primer periodo de evaluación (16 días después de siembra en medio PVK).

<b>Fuentes de Variación</b>	<b>GL</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Cuadrado Medio del Error</b>	<b>F Calculado</b>	<b>Pr &gt; F</b>
Cepas	16	848.16	53.01	39.04	<.0001
Error	34	46.16	1.35		
Total	50	894.32			

**Fuente:** Datos de salida del programa SAS versión 9.2.

**Anexo 3.4.** ANDEVA para la variable diámetro de solubilización durante el primer periodo de evaluación (20 días después de siembra en medio PVK).

<b>Fuentes de Variación</b>	<b>GL</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Cuadrado Medio del Error</b>	<b>F Calculado</b>	<b>Pr &gt; F</b>
Cepas	16	879.37	54.96	63.70	<.0001
Error	34	29.33	0,86		
Total	50	908.70			

**Fuente:** Datos de salida del programa SAS versión 9.2.

**Anexo 4.** Prueba de promedio de DUNCAN ( $p < 0.05$ ) para la variable diámetro de solubilización en las 17 bacterias seleccionadas.

**Anexo 4.1.** Prueba de promedio de DUNCAN ( $p < 0.05$ ) para la variable diámetro de solubilización en las 17 bacterias seleccionadas, durante el primer periodo de evaluación (8 días después de siembra en medio PVK).

<b>Agrupamiento de</b>				
<b>Duncan</b>	<b>Media</b>	<b>N</b>	<b>Tratamiento</b>	
A	11,50	3	BOS7	
A	10,83	3	POT7	
A	10,50	3	POT8	
B	8,16	3	BOS11	
B	8,16	3	BOS5	
BC	7,83	3	BOS13	
BC	7,83	3	CAÑ12	
BCD	6,83	3	BOS20	
CD	6,33	3	BOS17	
CD	6,33	3	POT13	
ED	5,16	3	POT1	
FE	4,16	3	POT10	
FG	3,00	3	CAÑ16	
G	2,16	3	BOS14	
G	1,83	3	BOS1	

**Fuente:** Datos de salida del programa SAS versión 9.2

**Anexo 4.2.** Prueba de promedio de DUNCAN ( $p < 0.05$ ) para la variable diámetro de solubilización en las 17 bacterias seleccionadas, durante el primer periodo de evaluación (12 días después de siembra en medio PVK).

<b>Agrupamiento de</b>				
<b>Duncan</b>	<b>Media</b>	<b>N</b>	<b>Tratamiento</b>	
A	15.33	3	BOS7	
A	15.00	3	POT8	
A	14.50	3	POT7	
B	11.33	3	BOS20	
B	10.83	3	BOS5	
BC	10.16	3	CAÑ12	
BC	10.16	3	BOS11	
BCD	9.83	3	BOS13	
BCD	9.66	3	POT13	
CD	9.00	3	BOS17	
CD	8.66	3	POT1	
D	8.33	3	CAÑ16	
E	6.50	3	POT10	
E	6.33	3	CAÑ11	
F	3.66	3	BOS14	

**Fuente:** Datos de salida del programa SAS versión 9.2

**Anexo 4.3.** Prueba de promedio de DUNCAN ( $p < 0.05$ ) para la variable diámetro de solubilización en las 17 bacterias seleccionadas, durante el primer periodo de evaluación (16 días después de siembra en medio PVK).

---

**Agrupamiento de**

<b>Duncan</b>	<b>Media</b>	<b>N</b>	<b>Tratamiento</b>
A	20.50	3	BOS7
B	17.00	3	POT8
B	16.66	3	POT7
C	13.66	3	BOS20
CD	13.16	3	BOS5
CD	12.66	3	CAÑ12
CD	12.50	3	BOS11
CD	12.33	3	BOS13
CDE	12.00	3	POT1
CDE	11.66	3	CAÑ11
CDE	11.66	3	POT13
CDE	11.66	3	CAÑ16
DE	11.16	3	BOS17
E	9.83	3	POT10
F	5.66	3	BOS14

---

**Fuente:** Datos de salida del programa SAS versión 9.2

**Anexo 4.4.** Prueba de promedio de DUNCAN ( $p < 0.05$ ) para la variable diámetro de solubilización en las 17 bacterias seleccionadas, durante el primer periodo de evaluación (20 días después de siembra en medio PVK).

---

**Agrupamiento de**

Duncan	Media	N	Tratamiento
A	24.00	3	BOS7
B	19.50	3	POT8
B	18.50	3	POT7
C	15.83	3	CAÑ16
CD	15.00	3	CAÑ11
CD	14.83	3	BOS5
CDE	14.33	3	BOS20
DE	14.00	3	BOS13
DE	14.00	3	CAÑ12
DE	13.83	3	POT13
DE	13.83	3	BOS11
EF	12.83	3	POT10
EF	12.66	3	POT1
F	12.00	3	BOS17
G	8.00	3	BOS14

---

**Fuente:** Datos de salida del programa SAS versión 9.2