

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATOS (BSF) ASOCIADAS A LA RIZÓSFERA DE *Vanilla* spp.

Zeneth Vanessa García Marulanda^{1,2}, Nicola Sian Flanagan¹ y Ana T. Mosquera Espinosa¹.

¹Departamento de Ciencias Naturales y Matemáticas, Pontificia Universidad Javeriana-Cali, Colombia

² Author for correspondence: vanessagm15@javerianacali.edu.co

Resumen

Los suelos de la región biogeográfica del Choco en la costa pacífica colombiana son altamente ácidos, lo que conduce a una baja disponibilidad de nutrientes para las plantas, en particular el fósforo. Una estrategia adoptada por las plantas a los suelos ácidos es la asociación con microorganismos de la rizósfera, tanto hongos como bacterias, que contribuyen a mejorar la disponibilidad de los nutrientes. La estrategia adoptada por las bacterias rizosféricas solubilizadoras de fosfato contribuyen a mejorar la eficiencia de utilización del mismo. En la presente investigación se evaluó el aislamiento e identificación de bacterias solubilizadoras de fosfato asociadas a la rizósfera de plantas silvestres de *Vanilla* spp. Para lo cual, se planteó como objetivos: **1)** Identificar el mejor medio de cultivo selectivo y la mejor dilución para el aislamiento de Bacterias Solubilizadoras de Fosfato (BSF); **2)** Estandarizar la metodología para la preservación y reactivación de BSF; **3)** Identificar a nivel molecular, las especies bacterianas presentes en la rizósfera de algunas especies silvestre de *Vanilla*. De seis especies de *Vanilla* colectadas en dos municipios del Valle del Cauca fue posible obtener un total de 612 aislamientos, de los cuales 100 fueron seleccionados por morfotipo y de estos 65 fueron identificados hasta especie.. Para considerar el mejor medio de cultivo selectivo y dilución se realizó la prueba de Regresión de Poisson, la cual indicó el medio Pikovskaya (PVK) y la dilución 10^{-4} como las mejores

condiciones para el aislamiento de BSF. La estandarización de la metodología de preservación y reactivación de las BSF mediante el análisis de prueba de Fisher permitió identificar que se pierde el 25% de la población total preservada seis (6) meses después de su preservación. De igual forma, la identificación de los aislamientos se realizó mediante la secuenciación de la región ribosomal 16S y búsquedas BLAST en GenBank predominando géneros como *Burkholderia* y *Bacillus*.

Introducción

Colombia es uno de los países más biodiversos de la familia *Orchidaceae*, reportando aproximadamente 4300 especies dentro de las cuales se encuentra incluido el género *Vanilla*. (Flanagan y Mosquera 2016; Molineros et al. 2014). Después del azafrán, la vainilla es la segunda especie de mayor valor a nivel mundial, siendo aprovechables por la industria culinaria, medicinal y cosmética (Flanagan y Mosquera 2016; Molineros 2012).

Uno de los aspectos claves para la producción comercial de vainilla es la nutrición, dado a que presentan una estrecha relación con la floración y la producción de frutos. Las plantas desarrollan sistema radical superficial y se desarrolla sobre la capa de materia orgánica en descomposición, la cual proporciona muchos de los nutrientes requeridos (Alvares 2014; Alvares 2012; Vessey 2003).

Sin embargo, en Colombia más del 80% del territorio presenta suelos ácidos con baja disponibilidad de nutrientes para las plantas, principalmente fósforo, elemento esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Serna et al. 2017; Rico 2009; Zaidi et al. 2009). Como respuesta evolutiva a este déficit de nutrientes, las plantas han desarrollado estrategias al interactuar con microorganismos del suelo, principalmente bacterias capaces de regular el ciclaje de los diferentes nutrientes, permitiendo incrementar la adquisición y mejorar la eficiencia de utilización del fósforo (Patiño y Sanclemente 2014; Beneduzi et al. 2012; Chen et al. 2006).

Materiales y métodos

Especies de *Vanilla* que crecen de forma silvestre en el departamento del Valle del Cauca-Colombia, fueron muestreadas en cuatro (4) épocas diferentes de los años 2017 y 2018. Se tomaron cinco (5) submuestras de material orgánico y suelo rizosférico alrededor de cada planta, para conformar una muestra compuesta homogénea de 100 gr aproximadamente de material orgánico y suelo rizosférico, rotuladas, almacenadas y conservadas a temperatura ambiente para su posterior procesamiento en un tiempo no mayor a 48 horas (Varón de Agudelo y Castillo 2001).

Aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfato – BSF

Para el aislamiento de BSF se siguió la metodología de diluciones seriadas base diez, descritas en Madigan et al. (2010).

Los microorganismos solubilizadores de fosfato inorgánico crecen tanto en **PSM**, donde la fuente de fósforo es **Fosforita Huila** (Osorio y Habte 2001; Bernal 2009), como en **PVK** – Pikovskaya,

donde la fuente de fósforo es **Fosfato Tricálcico** (Patiño 2010); mientras que los microorganismos mineralizadores de fósforo orgánico crecen en **FIT**, cuya fuente de fósforo es **Fitato de Sodio** (Tabatabai 1982) (tabla 1). El indicador de la presencia de BSF en el medio FIT y PVK es la formación de un halo transparente alrededor de las colonias, que indica actividad de mineralización o solubilización de fosfatos respectivamente (Álvarez et al. 2014; Patiño 2010). En el caso del medio PSM, posee un indicador de pH (verde bromocresol) que cambia de azul a verde al disminuir el pH debido a la producción de ácidos orgánicos por parte de las bacterias (Bernal 2009).

Preservación de bacterias solubilizadoras de fosfatos –BSF

Para la preservación de BSF, se siguió la metodología de Castellanos et al. (2011) modificada por Mosquera-Espinosa (2018).

Reactivación de bacterias solubilizadoras de fosfatos –BSF

Para la reactivación de las BSF se siguió la metodología de Castellanos et al. (2011) modificada por Mosquera-Espinosa (2018). Para el presente estudio se trabajó con inóculo preservado de durante tres (3) y seis (6) meses los cuales fueron reactivados en Agar Nutriente (AN) como el medio selectivo donde se expresaron originalmente las BSF (FIT, PVK o PSM).

Amplificación y secuenciación de regiones ribosomales para identificación hasta especie

Para la amplificación y secuenciación de la región ADNr 16S se utilizaron los primers bacterianos universales fD1 (5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTT

TGATCCTGGCTCAG-3') y rD1 (5'-CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGG TGATCCAGCC-3') efectuando la PCR en un volumen de reacción de 20µl, conteniendo donde 2µl corresponden a inóculo bacteriano siguiendo la metodología de Weisburg *et al.* 1991 y Patiño 2010.

Resultados

Mejor medio de cultivo selectivo y dilución para aislar BSF

En los tres medios selectivos evaluados fue posible aislar BSF. Sin embargo, en términos absolutos al seleccionar al azar 100 colonias que representaron la diversidad de morfotipos expresados en los cuatro (4) muestreos mostraron en el análisis estadístico que la media aritmética de aislamientos no varió significativamente entre los medios B (FIT) y C (PSM) con respecto al medio A (PVK): $t = -1.535$, $P = 0.1255$ y $t = -1.343$, $P = 0.1801$, respectivamente (Fig. 1).

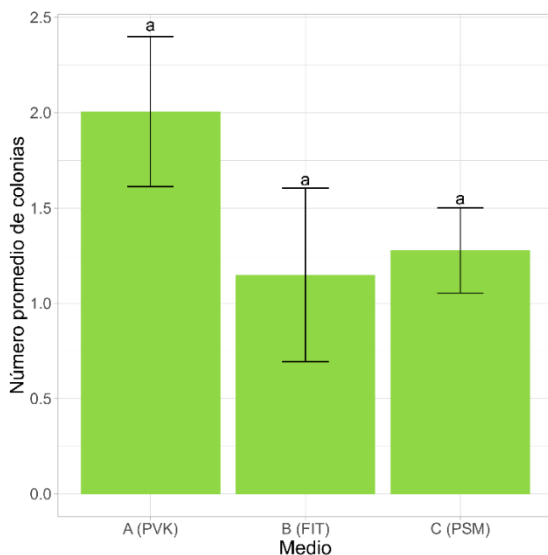


Figura 1. Media aritmética de bacterias solubilizadoras de fósforo aisladas en los tres medios selectivos. Las barras con la misma letra no fueron significativamente diferentes ($P \leq 0,05$), de acuerdo con la prueba de Regresión de Poisson. Líneas verticales indican el error estándar de la media.

Por otro lado, el análisis estadístico muestra que con respecto a la dilución 10^{-4} se obtuvo como promedio 76.9% menos colonias con la dilución 10^{-5} ($t = -3.898$, $P = 0.0001$) y 90.7% menos colonias con la dilución 10^{-6} ($t = -4.257$, $P = 0.0001$). Por lo tanto, la mejor dilución para el aislamiento de BSF es la de 10^{-4} , ya que permitió obtener un mayor número de colonias en los tres medios de cultivos selectivos evaluados (Fig. 2).

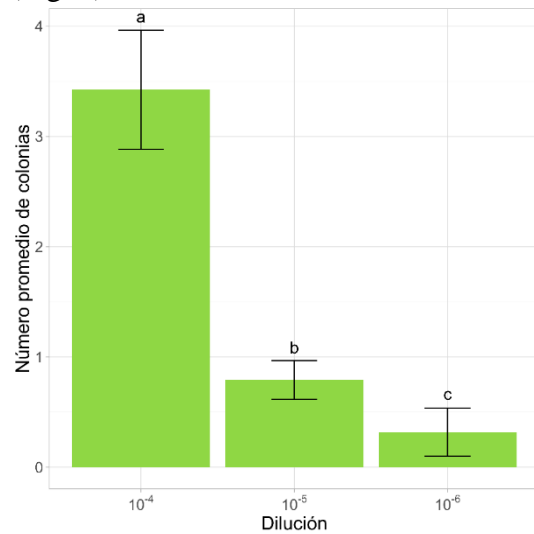


Figura 2. Media poblacional de colonias de bacterias solubilizadoras de fósforo obtenidas en cada una de las diluciones. Las barras con la misma letra no fueron significativamente diferentes ($P \leq 0,05$), de acuerdo con la prueba de Regresión de Poisson. Líneas verticales indican el error estándar.

Preservación y reactivación de BSF

A los tres (3) meses de aislar y preservar BSF, el 81% del total de la población creció tanto en medio Agar Nutriente (AN) como en el medio de cultivo selectivo original (PVK, FIT o PSM), conservando en su totalidad la capacidad de solubilizar o mineralizar fosfatos. Sin embargo, seis (6) meses después, la reactivación de la población preservada fue del 75% tanto en AN como en los medios de cultivo selectivos, además de conservar la capacidad de disponer el fósforo presente en los medios. En esta oportunidad, del otro 25% se observó que el 2% de las BSF reactivaron, pero perdieron la capacidad de solubilizar o

mineralizar fosfatos, y el 23% restante no reactivo (Fig. 3).

Diversidad de Bacterias

Solubilizadoras de Fosfato aisladas

De los cuatro (4) muestreos realizados, se obtuvieron un total de 612 aislamientos de BSF con variados morfotipos seleccionando los más representativos para su preservación, reactivación y análisis molecular para identificarlos hasta especie.

Los morfotipos fueron muy diversos entre muestreos, sin embargo, con poca frecuencia se expresaron en medio orgánico - FIT colonias amarillas brillantes, con margen lobulada, que generaron un amplio halo de solubilización y sólo asociadas a *V. trigonocarpa* exclusiva la dilución de 10^{-6} (Fig. 8A). También crecieron colonias purpuras brillantes, margen lobulada y halo de solubilización estrecho difícil de apreciar en la imagen en medio de cultivo PVK, expresadas en 10^{-5} asociadas a *V. rivassi* y *V. trigonocarpa* (Fig. 8B). No obstante, en todo el estudio el morfotipo de mayor aparición fue la colonia blanca brillante, margen discontinua y amplio halo de solubilización, las cuales estuvieron asociadas a todas las especies de vainilla, excepto *V. planifolia* (Fig. 8C). Para el medio PSM con fuente de fósforo inorgánico, la presencia de BSF se observó por el cambio de color en el medio de cultivo debido a la disminución del pH y no por el desarrollo de colonias (Fig. 8D). Cuando se formaron colonias, muy pocas veces, estas mostraron márgenes continuas de coloración verde brillante debido a que absorbieron el indicador verde bromocresol.

Identificación molecular hasta especie de BSF

De los 100 morfotipos de BSF seleccionadas como representantes del total de la población expresada, tan sólo se tuvo éxito con 65 aislamientos para obtener secuencias de nucleótidos confiables para llegar al análisis por BLAST hasta especie. De estos los géneros que predominaron fueron *Burkholderia* y *Bacillus*, seguido de *Chromobacterium*, *Paraburkholderia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rahnella*, *Tsukamurella*, *Ralstonia*, *Silvimonas*, *Enterobacter*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*. De acuerdo con el número de aislamientos obtenidos, la especie *V. trigonocarpa* es la que presenta un mayor número de BSF aisladas.

Al analizar los datos de BSF por especie de vainilla, *V. odorata* es la única que crece tanto en Atuncela-Dagua como en Buenaventura, y fue a la cual se asoció mayormente el género *Bacillus*. Sin embargo, las especies de BSF dentro de éste género son diferentes y con mayor diversidad en el bosque seco.

Discusión

Aun cuando no existe diferencia estadística al evaluar los medios selectivos para aislar BSF, en el medio Pikovskaya (PVK) siempre se expresaron bacterias asociadas a las seis especies de *Vanilla* del estudio. Estos resultados coinciden con otras investigaciones *in vitro*, lo cual indica la actividad de diversas BSF en disponer fósforo a partir de fuentes inorgánicas, en este caso a partir de fosfato tricálcico. Sin embargo, lo que ocurre *in situ* en suelos ácidos como los sitios del presente estudio, son procesos de meteorización y lavado de minerales de tal manera que aumentan fosfatos de Fe y Al, que es la forma como se acompleja el fósforo en dichas condiciones (Cisneros et al. 2017;

Barragán et al. 2017; Zhao et al. 2013; Patiño & Sánchez de Prager 2012; Patiño 2010).

En cuanto a la mejor dilución para aislar BSF, a nivel estadístico fue la dilución 10^{-4} (Fig. 5) no solo por la expresión de mayor población, sino también, por la mayor diversidad de morfotipos al momento de seleccionar representantes. Resultados similares fueron obtenidos al aislar BSF a partir de suelo rizosférico de guadua, caña de azúcar y pastizal de suelos agrícolas en el Valle del Cauca; así como también chontaduro en Buenaventura, en el mismo departamento (Sanclemente et al. 2017; Patiño y Sánchez de Prager 2012).

El protocolo de preservación de microorganismos desarrollado por Castellanos et al. (2011), fue trabajado para poblaciones de hongos y bacterias patógenas de cultivos agrícolas, y según sus resultados, reactivaron el 100% del material transcurridos hasta 10 años después. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta investigación con BSF, se muestra que después de 6 meses se pierde el 25% de la población total preservada. Además, en ocasiones si reactivan no disponen el fósforo o hasta cambian características morfológicas de colonia. No obstante, se debe reconocer que estos resultados se mantienen en el rango reportado en otros estudios, con valores entre 13% a 35% de pérdida de viabilidad en bancos liofilizados de microorganismos (Ortiz et al. 2016; Filippova et al. 2012).

En relación con los diferentes géneros de BSF asociadas a la rizósfera de *Vanilla* spp. se enfatiza en los géneros que predominaron. *Burkholderia* encontrada en las seis (6) especies de vainilla estudiadas en las dos localidades. Este género posee alto potencial para aportar en el establecimiento de la planta en cultivo comercial, ya que sus especies

presentan además de actividad como solubilizadoras de fosfatos, biocontrol sobre patógenos, biorremediación, fijación de nitrógeno y producción de sideróforos (Bolívar et al. 2016; Patiño y Prager 2013; Patiño & Sánchez de Prager 2012; Reis et al. 2004).

El otro género con mayor frecuencia de aparición fue *Bacillus*, con especies como *B. megaterium*, asociada a las especies de *V. trigonocarpa*, *V. odorata*, y el híbrido (*V. odorata x V. rivasii*). Esta especie de bacteria, ampliamente estudiada por demostrar capacidad para solubilizar fosfatos y relacionada con su actividad como PGPR, ha sido evaluada con éxito en diferentes cultivos de interés económico como arroz, chontaduro y vainilla (Álvarez et al. 2014; Tejera et al. 2013; Patiño & Sánchez de Prager 2012; Chen et al. 2006). Así mismo se menciona, por su eficaz capacidad para solubilizar fosfatos y promover el crecimiento en plantas de *Arabidopsis* (Zou et al. 2010) y en *Phaseolus vulgaris* (Álvarez et al. 2014).

Conclusiones

En los cuatro (4) muestreos realizados para suelo rizosférico en plantas silvestres de *Vanilla* spp. en dos localidades del departamento del Valle del Cauca, no existió diferencia significativa entre los tres (3) medios de cultivo selectivos evaluados para el aislamiento de BSF. Cada grupo de BSF asociada a las diferentes especies de vainilla responde de manera diferente a las fuentes de fósforo. Sin embargo, en el medio de cultivo selectivo PVK hubo mayor expresión de colonias de las seis (6) especies de *Vanilla* evaluadas.

La mejor dilución para el aislamiento de BSF *in vitro* fue de 10^{-4} , ya que se obtuvo mayor expresión de colonias y mayor

diversidad a nivel de morfotipos bacterianos.

El mejor periodo de reactivación para BSF es tres (3) meses después de la preservación, ya que seis (6) meses después se pierde el 25% de la población total preservada. Sin embargo, estos valores están dentro de los rangos de pérdidas según otros estudios científicos.

De 612 aislamientos de BSF obtenidos en cuatro (4) muestreos, fueron seleccionados 100 diferentes morfotipos. De estos, sólo 65 fueron identificados hasta especie por técnicas moleculares. Los géneros predominantes fueron *Burkholderia* con especies compartidas en las seis especies de *Vanilla* estudiadas, sin embargo en la especie *V. rivasii* se encuentra asociado un único representante de *B. phymatum*. En cuanto al género *Bacillus* se encontró mayor diversidad de especies asociadas a este género en la especie de *V. odorata* aislada en Dagua- Valle del Cauca.

Con actividad solubilizadora de fosfatos y pocos reportes en literatura científica se obtuvieron especies pertenecientes a: *Chromobacterium*, *Paraburkholderia*, *Rhizobium*, *Rahnella*, *Tsukamurella*, *Ralstonia*, *Silvimonas*, *Enterobacter* y *Streptomyces*. Lo anterior, soporta la alta diversidad bacteriana con variada actividad biológica que se asocia a la vainilla silvestre de este estudio.

Bibliografía

Álvarez, L. C., Vega, N. W. O., & Montoya, M. M. (2012). Identificación molecular de microorganismos asociados a la rizósfera de plantas de vainilla en Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 18(2), 293-305.

Álvarez, C., Vega, N. W. O., Díez, M. C., & Montoya, M. A. M. (2014). Caracterización bioquímica de microorganismos rizosféricos de plantas de vainilla con potencial como biofertilizantes. *Agronomía Mesoamericana*, 25(2), 225-241.

Barragán, D. S., Hernández, A. (2009). Comparación de dos métodos de conservación, liofilización y microsecado sobre tres especies bacterianas: elección del mejor método. (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and molecular biology*, 35(4), 1044-1051.

Bernal Pesca, L. (2009). Aislamiento de microorganismos solubilizadores de P (PSM) de las raíces de *Vanilla sp.* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana Bogotá, Colombia.

Bolívar, H. J., Contreras, M. L., & Teherán, L. G. (2016). *Burkholderia trópica* una bacteria con gran potencial para su uso en la agricultura. *Tip, Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 19(2), 102-108.

Castellanos, G., Jara, C. E., & Mosquera, G. (2011). Guías prácticas de laboratorio para el manejo de patógenos del frijol. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Publicación CIAT No. 375. 232 p.

Chen, Y. P., Rekha, P. D., Arun, A. B., Shen, F. T., Lai, W. A., & Young, C. C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied soil ecology*, 34(1), 33-41.

Cisneros, A. C., de Prager, M. S., & Flores, J. C. M. (2017). Identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos en un Andisol de la región cafetera colombiana. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(1), 21-28.

Flanagan, N. S. & Mosquera, A. T. (2016). An integrated strategy for the conservation and sustainable use of native *Vanilla* species in Colombia. *Lankesteriana*, 16(2): 201-218.

Filippova, S. N., Surgucheva, N. A. & Gal'chenko, V. F. (2012). Long-Term storage of collection cultures of Actinobacteria. *Microbiology*, 81(5), 630-637.

Madigan M. T, Martinko J.M., Stahl D. & Clark D.P. (2010). Brock Biology of microorganisms, 13th edition, UK, Pearson Benjamin Cummings. P.167.

Molineros, H. F. (2012). Caracterización morfológica y filogenia del género *Vanilla* en el distrito de Buenaventura-Valle del Cauca (Colombia). (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Colombia.

Molineros, H. F.; González, M. R.; Flanagan, S. N & Otero, J. T. (2014). *Vanilla rivasii* (Orchidaceae), a new species from the Colombian pacific region. *Lankesteriana* 13(3): 353-357.

Ortiz, T., Ocampo, V., Prada, L. D., & Franco-Corrae, M. (2016). Métodos de conservación para

- actinobacterias con actividad solubilizadora de fósforo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(2), 32-39.
- Patiño, C. O. (2010). Solubilización de fosfatos por poblaciones bacterianas aisladas de un suelo del Valle del Cauca. Estudio de biodiversidad y eficiencia. (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Colombia.
- Patiño, C. O. & Sánchez de Prager M. S. (2012). Aislamiento e identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos, habitantes de la rizósfera de chontaduro (*B. gassipaes* kunth). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10(2).
- Patiño, T. C. O., & Sanclemente, R. O. E. (2014). Los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF): una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible. *Entramado*, 10(2), 288-297.
- Reis, V. M., Estrada-De Los Santos, P., Tenorio-Salgado, S., Vogel, J., Stoffels, M., Guyon, S., & Balandreau, J. (2004). *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(6), 2155-2162.
- Rico, G., Angélica, M. (2009). Capacidad promotora de crecimiento vegetal por bacterias del género *Azotobacter* y *Actinomicetos* aislados de cultivos de *Solanum tuberosum* Linnaeus 1753 (Papa) cultivados en zonas altoandinas del Perú. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú, Lima.
- Sanclemente, O. E., Yacumal, V., & Patiño, C. (2017). Solubilización de fosfatos por bacterias nativas aisladas en tres agroecosistemas del Valle del Cauca (Colombia). *Temas Agrarios*, 22(2).
- Serna J; Sánchez-de Prager, M., & Cisneros-Rojas, C. A. (2017). Organic acids production by rhizosphere microorganisms isolated from a Typic Melanudands and its effects on the inorganic phosphates solubilization. *Acta Agronómica*, 66(2), 241-247.
- Tabatabai MA. (1982). Soil enzymes, En: Page AL, Miller RH, Kineey DR, editors. Methods of soil analysis, part two, chemical and microbiological properties. Madison: ASA-SSSA; 1982. p. 903-947.
- Tejera-Hernández, B., Heydrich-Pérez, M., & Rojas-Badía, M. M. (2013). Aislamiento de *Bacillus* solubilizadores de fosfatos asociados al cultivo del arroz. *Agronomía Mesoamericana*, 24(2), 357-364.
- Varón de Agudelo, F.; y Castillo, G. 2001. Seminario – Taller sobre identificación de nematodos de importancia agrícola. ICA-Palmira. *Asociación Colombiana de Fitopatología* (Ascolfi). 25 p.
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*, 255(2), 571-586.
- Weisburg, W. G.; Barns, S. M.; Pelletier, D. A. and Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2): 697-703.
- Zaidi, A., Khan, M., Ahemad, M., & Oves, M. (2009). Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 56(3), 263-284.
- Zhao, K., Penttinen, P., Zhang, X., Ao, X., Liu, M., Yu, X., & Chen, Q. (2014). Maize rhizosphere in Sichuan, China, hosts plant growth promoting *Burkholderia cepacia* with phosphate solubilizing and antifungal abilities. *Microbiological research*, 169(1), 76-82.
- Zou, C., Li, Z., & Yu, D. (2010). *Bacillus megaterium* strain XTBG34 promotes plant growth by producing 2-pentylfuran. *The Journal of Microbiology*, 48(4), 460-466.