

## Diseño de un medio para la producción de un co-cultivo de bacterias fosfato solubilizadoras con actividad fosfatasa

Jimena Paola Angulo-Cortés<sup>1\*</sup>, Anamaría García-Díaz<sup>1</sup>, Aura Marina Pedroza<sup>2</sup>,  
María Mercedes Martínez-Salgado<sup>1</sup>, Viviana Gutiérrez-Romero<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro Avanzado de Gestión, Innovación y Tecnología para la Agricultura (CATA). Departamento de Industrias. Universidad Técnica Federico Santa María. Avenida Santa María 6400. Vitacura. Santiago de Chile, Chile.

<sup>2</sup>Unidad de Investigaciones Agropecuarias (UNIDIA). Laboratorio de Microbiología Ambiental y Suelos. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Carrera 7 No. 43-82. Edificio 50. Bogotá, Colombia.

<sup>3</sup>Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI). Laboratorio de Microbiología Ambiental y Suelos. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Carrera 7 No. 43-82. Edificio 50. Bogotá, Colombia.

\* [jimena.angulo@usm.cl](mailto:jimena.angulo@usm.cl)

Recibido: 21-10-2011; Aceptado: 26-12-2011

### Resumen

**Objetivo.** Diseñar un medio de cultivo complejo para la producción de biomasa y fosfatasas ácidas a partir de bacterias solubilizadoras de fosfatos aisladas de suelo. **Materiales y métodos.** A partir de muestras de suelo de cultivos de palma de aceite se realizaron los aislamientos y la selección de bacterias fosfato solubilizadoras (BFS) en agar SMRS1, las cuales fueron sometidas a pruebas de antagonismo con el fin de verificar su aptitud para la formación de co-cultivos. Posteriormente, se realizó un diseño experimental Box-Behnken para evaluar el efecto de cada uno de los componentes del medio de cultivo sobre la producción de biomasa y enzimas fosfatasas a escala de laboratorio. Finalmente se realizaron curvas de crecimiento y de producción de enzima para determinar los tiempos de producción. **Resultados.** Se obtuvieron 5 bacterias fosfato solubilizadoras, de las cuales 3 fueron seleccionadas con base en el índice de solubilización; dichas cepas, de morfología bacilar Gram negativa, fueron identificadas como A, B y C, cuyos índices de solubilización correspondieron a 2,03, 2,12 y 2,83, respectivamente. De acuerdo con los análisis de ANOVA para el diseño experimental de Box Behnken, el factor que tuvo efecto significativo sobre la actividad fosfatasa ( $p < 0,01$ ), fue el hidrolizado de levadura, y el formulado que generó la mayor concentración de biomasa y actividad fosfatasa ( $p < 0,01$ ) fue el que contenía 10, 15 y 2,5 gL<sup>-1</sup> de roca fosfórica sacarosa e hidrolizado de levadura, respectivamente, obteniendo valores máximos de biomasa y actividad fosfatasa de 11,8 unidades logarítmicas de UFC y 12,9 unidades fosfatasa con incubación por 24 horas a 100 rpm. **Conclusión.** Se determinó que el medio con formulación 10gL<sup>-1</sup> de roca fosfórica, 2,5gL<sup>-1</sup> de hidrolizado de levadura y 15gL<sup>-1</sup> de sacarosa comercial, fue ideal para la producción de biomasa y enzimas fosfatasas a partir de las cepas evaluadas. Así mismo, se comprobó que el hidrolizado de levadura fue el único factor significativamente influyente en la producción de enzimas fosfatasas.

**Palabras clave:** bioinoculantes, microorganismos fosfato solubilizadores, actividad fosfatasa, diseño Box Behnken.

### Abstract

**Design of a culture media for the production of a phosphate-solubilizing bacteria co-culture. Objective.** To design a complex culture media for the production of biomass and acid phosphatases from phosphate-solubilizing bacteria isolated from soil. **Materials and methods.** Phosphate-solubilizing bacteria were isolated from oil palm crop soil samples and selected on SMRS1 agar, which were then assessed with antagonism tests to verify their aptitude to form a co-culture. A Box-Behnken experimental design was applied to evaluate the effect of each one of the culture media components on the production of biomass and phosphatase enzymes at a laboratory scale. Finally, microbial growth and enzyme production curves were carried out in order to determine their production times. **Results.** Five phosphate-solubilizing bacterial strains were isolated and three of them were selected based on their solubilization indices.

These Gram negative strains with bacillus morphology were identified as A, B and C; their solubilization indices were 2.03, 2.12, and 2.83, respectively. According to the ANOVA analyses for the Box-Behnken design, the only factor which had a significant effect on the phosphatase activity ( $p < 0.01$ ) was hydrolyzed yeast, and the formulation that generated the highest biomass concentration and phosphatase activity ( $p < 0.01$ ) contained 10, 15 and 2.5  $\text{gL}^{-1}$  of phosphoric rock, sucrose and hydrolyzed yeast, respectively. After 24 hours of incubation at 100 rpm, the highest values of biomass and phosphatase activity were obtained: 11.8 logarithmic units of CFU and 12.9 phosphatase units. **Conclusion.** We determined that the culture media based on phosphoric rock 10  $\text{gL}^{-1}$ , hydrolyzed yeast 2.5  $\text{gL}^{-1}$  and commercial sucrose 15  $\text{gL}^{-1}$  was ideal for the production of biomass and phosphatases by the strains evaluated; likewise, we proved that the hydrolyzed yeast was the only factor significantly influential for the production of phosphatases.

**Key words:** bio-inoculants, phosphate solubilizing microorganisms, phosphatase activity, Box Behnken design.

## Resumo

### Desenho de um meio para a produção de uma co-cultura de bactérias solubilizadoras de fosfato com atividade da fosfatase.

**Objetivo.** Desenhar um meio de cultura complexo para a produção de biomassa e fosfatase ácida a partir de bactérias solubilizadoras de fosfato isoladas do solo. **Materiais e métodos.** De amostras de solo de plantações de dendzeiros foram isoladas e selecionadas bactérias solubilizadoras de fosfato (BFS) em ágar SMRS1, que foram testadas em provas de antagonismo para verificar sua capacidade de formar co-culturas. Subsequentemente, foi realizado um desenho experimental do tipo Box-Behnken para avaliar o efeito de cada um dos componentes do meio de cultura na produção de biomassa e de enzimas fosfatase a escala de laboratório. Finalmente foram realizadas curvas de crescimento e de produção da enzima para determinar os tempos de produção. **Resultados.** Foram obtidas 5 bactérias solubilizadoras de fosfato, das quais 3 foram selecionadas com base no índice de solubilização, tais cepas, de morfologia bacilar Gram negativas, foram identificadas como A, B e C, cujos índices de solubilização corresponderam a 2,03, 2,12 e 2,83, respectivamente. De acordo com a análise ANOVA para o desenho experimental do tipo Box Behnken, o fator que teve efeito significativo na atividade da fosfatase ( $p < 0,01$ ), foi o hidrolisado de levedura, e o formulado que gerou a maior concentração de biomassa e atividade da fosfatase ( $p < 0,01$ ) foi aquele que contive 10, 15 e 2,5  $\text{gL}^{-1}$  de rocha fosfato sacarose e hidrolisado de levedura, respectivamente, obtendo-se valores máximos de biomassa e atividade de fosfatase de 11,8 unidades log de UFC e 12,9 unidades de fosfatase com incubação durante 24 horas a 100 rpm. **Conclusão.** Foi determinado que o meio com formulação 10  $\text{gL}^{-1}$  de rocha fosfórica, 2,5  $\text{gL}^{-1}$  de hidrolisado de levedura e 15  $\text{gL}^{-1}$  de sacarose comercial, foi ideal para a produção de biomassa e enzimas fosfatase a partir das cepas avaliadas. Da mesma forma, verificou-se que o hidrolisado de levedura foi o único fator significativo influente na produção de enzimas fosfatase.

**Palavras-chave:** bioinoculantes, microrganismos solubilizadores de fosfato, atividade fosfatase, desenho do tipo Box Behnken.

## Introducción

El Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) en la resolución N° 00375 del 27 de febrero del 2004, definió inoculante biológico como: “Un producto elaborado con base en una o más cepas de microorganismos benéficos que, al aplicarse al suelo o a las semillas, promueve el crecimiento vegetal o favorece el aprovechamiento de los nutrientes en asociación con la planta o su rizósfera”. Incluye entre otros los productos elaborados con micorrizas, rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, entre los que se destacan microorganismos miembros de los géneros *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Bradyrhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Frankia*, *Beijerinckia* (1).

El uso de inoculantes biológicos en sistemas agrícolas favorece el desarrollo de las plantas mediante diferentes mecanismos, tales como la fijación de nitrógeno, inducción de resistencia frente a patógenos, promoción de rizogénesis y síntesis de fitohormonas estimuladoras del crecimiento vegetal, como el ácido indol acético (AIA); dentro de los géneros reportados como promotores del crecimiento vegetal

(PGPR) se encuentran *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium* sp. y *Bradyrhizobium* sp., entre otros (2-4).

Otros tipos de actividades promotoras del crecimiento vegetal, asociadas a la disponibilidad de P en el suelo, son la solubilización ácida del P inorgánico y la mineralización del P orgánico. La solubilización de los compuestos inorgánicos insolubles como los fosfatos de calcio, se llevan a cabo por la producción de ácidos orgánicos (ácido glucónico, ácido 2-cetoglucónico, ácido glicólico, oxálico, malónico y succínico), productos del catabolismo microbiano, y la consecuente sustitución del  $\text{Ca}^{++}$  por iones  $\text{H}^{+}$  (5-6). Por su parte, el proceso de mineralización se lleva a cabo mediante la acción de fosfatasas ácidas y alcalinas, las cuales se producen en función del pH del suelo (5); algunos de los géneros reportados para estas dos actividades son *Pseudomonas* sp., *Mycobacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Bacillus* sp. y *Flavobacterium* sp. (4, 7-8).

Con el fin de potenciar la actividad microbiana en suelos, se producen desde hace años, en distintos países inoculantes microbianos con base en bacterias u hongos con capacidad

fosfato solubilizadora (9). Sin embargo, para lograr alta producción de biomasa microbiana y de metabolitos específicos, a un costo razonable, es necesario diseñar medios de cultivo, bien sean definidos (constituidos por compuestos químicamente definidos y en una cantidad precisa) o complejos (contiene elementos orgánicos cuya composición nutricional no está completa y precisamente descrita) (10), mediante en el manejo de variables independientes tales como concentración de nutrientes, agitación, pH, temperatura o inyección de oxígeno, que van a tener un efecto sobre variables dependientes o de respuesta tales como producción de biomasa, enzimas o determinado metabolito (11). Para lograr este objetivo, existen modelos clásicos basados en probar cada factor con los demás factores constantes, los cuales, además de demandar tiempo y material, no toman en cuenta las interacciones que puedan tener las variables independientes entre sí; por lo tanto, los diseños estadísticos con base en modelos matemáticos de superficie de respuesta, permiten valorar las interacciones que tienen las variables de respuesta entre ellas y con ello obtener resultados con un mejor soporte, facilitando a su vez aspectos técnicos a nivel de laboratorio al minimizar el tiempo y cantidad de combinaciones en el diseño. Dentro de los modelos de respuesta de superficie más conocidos se encuentra el diseño Plakett Burman, diseño de compuestos centrales, cuadrados Graeco-Latinos y Box Behnken (12).

El objetivo del presente estudio fue diseñar un medio de cultivo a partir de fuentes nutricionales económicas, mediante el modelo estadístico Box Behnken para la producción de un co-cultivo de microorganismos solubilizadores de P y productores de fosfatasas, teniendo como base el efecto de dichas fuentes sobre la producción de biomasa y actividad fosfatasa. Igualmente, se buscó verificar que el inoculo constituyera un verdadero co-cultivo, mediante la evaluación de parámetros cinéticos y pruebas de antagonismo, que permiten evidenciar un efecto sinérgico y no competitivo entre las cepas que lo conforman.

## Materiales y métodos

### Muestreo de suelo

El muestreo se realizó en el cultivo de Palma Africana de Aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) Palmar de Oriente S.A. ubicado en Villanueva Casanare, Colombia, cuyas coordenadas geográficas corresponden a 4° 29' de latitud norte y 72° 50' 26,85'' de longitud Oeste del meridiano de Greenwich, sobre los 300 metros sobre el nivel del mar y presenta una temperatura promedio de 25,7°C.

Las muestras se obtuvieron de tres lotes: zona definitiva con plantación de palmas adultas, zona de vivero y zona definitiva con palmas jóvenes. De cada una de ellas se recolectaron 20 sub-muestras de 50 gramos cada una, tomadas aleatoriamente de la zona cercana a las raíces de la planta, utilizando un patrón no sistemático ("X"), a una profundidad aproximada de 20 cm. Posteriormente, las muestras fueron transportadas y preservadas en refrigeración (4°C) en el Laboratorio de Microbiología Ambiental, Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI), de la Pontificia Universidad Javeriana hasta el momento de su análisis (13).

### Aislamiento y selección de las cepas

El aislamiento se realizó por medio de la técnica de dilución decimal hasta 10<sup>-8</sup> y siembra en superficie de 0,1 ml en agar SMRS1 cuya composición en gL<sup>-1</sup> fue: Sulfato de amonio 0,5 gL<sup>-1</sup>, cloruro de potasio 0,2 gL<sup>-1</sup>, sulfato de magnesio 0,3 gL<sup>-1</sup>, sulfato de manganeso 0,004 gL<sup>-1</sup>, sulfato de hierro heptahidratado 0,002 gL<sup>-1</sup>, cloruro de sodio 0,2 gL<sup>-1</sup>, glucosa gL<sup>-1</sup>, extracto de levadura 0,5 gL<sup>-1</sup>, purpura de bromocresol 0,1 gL<sup>-1</sup>, fosfato tricálcico 5 gL<sup>-1</sup>, agar 20 gL<sup>-1</sup> y pH 7. Las cajas se incubaron por 5 días a 32°C. La selección de las cepas solubilizadoras de fósforo se realizó determinando el índice de solubilización (IS) (**Ecuación 1**); las cepas con mayores IS fueron aisladas por sub cultivos en el mismo agar (14).

$$IS = \frac{DH}{DC} \quad [1]$$

**Donde:** DH: Diámetro del halo de solubilización en mm, DC: Diámetro de la colonia en mm (14).

### Pruebas de interacción para la selección del co-cultivo

Se realizaron pruebas de antagonismo mediante la prueba de difusión en agar nutritivo (AN) usando suspensiones celulares de cada cepa ajustadas al tubo 1 de Mc Farland (3x10<sup>8</sup> UFC ml<sup>-1</sup>); cada cepa fue sembrada de forma masiva en una placa diferente y las cepas restantes fueron inoculadas en sensi-discos (20µl de suspensión por disco). Tras incubación a 32°C por 24 horas, se observó la presencia (inhibición positiva) o ausencia (inhibición negativa) de halo de inhibición del crecimiento, con lo cual se determinó si los aislamientos no eran antagónicos entre sí (15).

## Diseño del medio de cultivo

Se realizó un diseño experimental de Box Behnken con tres factores a dos niveles y cinco puntos centrales para evaluar el efecto de la roca fosfórica como fuente inorgánica de fósforo ( $X_1$ ), hidrolizado de *Saccharomyces cerevisiae* como fuente compleja de macronutrientes y micronutrientes ( $X_2$ ) y sacarosa como fuente de carbono ( $X_3$ ), sobre la producción de biomasa expresada como logaritmo 10 de unidades formadoras de colonias y actividad fosfatasa en Unidades Fosfatasa (UP= $\mu\text{mol } p\text{-nitrofenol } \text{min}^{-1} \text{L}^{-1}$ ). Los factores y niveles se observan en la tabla 1. La combinación de tratamientos generó una matriz de 15 experimentos realizados por triplicado. Para un sistema de tres factores el polinomio de segundo orden que describió el modelo fue:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_1 x_1 x_2 + \beta_2 x_1 x_3 + \beta_3 x_2 x_3 + \beta_1 x_1^2 + \beta_2 x_2^2 + \beta_3 x_3^2 \quad [2]$$

**Donde:**  $y$ , corresponde al valor predicho de actividad fosfatasa ó biomasa,  $\beta_0$  es el intercepto,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$  son los coeficientes lineales de regresión para cada factor, y son los coeficientes cuadráticos y  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  son las variables independientes ó factores.

Para el montaje del experimento se emplearon matraces Erlenmeyer de 100 ml que contenían 45 ml de medio y fueron inoculados con 5 ml del inóculo mixto, el cual se obtuvo mediante la mezcla de 1,6 ml de suspensión de cada

microorganismo en solución salina, cada una ajustada al tubo 1 de Mc Farland. Cada tratamiento se realizó por duplicado, usando como control positivo caldo SMRS1 sin indicador de pH; las condiciones de incubación fueron 32°C, 100 rpm y 24 horas. Las variables de respuesta fueron viabilidad ( $\text{Log}_{10}$  de UFC  $\text{ml}^{-1}$ ), medida por la técnica de micro gota (16) y actividad fosfatasa (UP= $\mu\text{mol } p\text{-nitrofenol } \text{min}^{-1} \text{L}^{-1}$ ) medida mediante la técnica de  $p$ -nitro fenol (17).

## Curvas de crecimiento

Se llevaron a cabo curvas de crecimiento por duplicado para cada cepa y para el co cultivo mediante fermentación discontinua en el medio previamente seleccionado a través el Diseño Box Behnken, usando un volumen efectivo de trabajo de  $\frac{1}{2}$  en matraces Erlenmeyer de 100 ml y un pre inóculo del 10% (v/v) del volumen final, obtenido mediante suspensiones de los microorganismos en solución salina, cuya concentración fue ajustada al tubo 1 de Mc Farland ( $3 \times 10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ ). Las condiciones de incubación fueron de 32°C y 100 rpm durante 48 horas. A lo largo del proceso, cada 6 horas se realizó el seguimiento de la concentración de biomasa viable mediante siembra en microgota en agar nutritivo (16), comportamiento de la actividad fosfatasa mediante la técnica de  $p$ -nitrofenil fosfato (17) y concentración de sustrato residual mediante la técnica de DNS de sacarosa hidrolizada (18). Con ello, se calcularon los parámetros cinéticos de velocidad de crecimiento ( $\mu$  en  $\text{h}^{-1}$ ), tiempo de duplicación (td en h) y productividad de la enzima fosfatasa (UP  $\text{h}^{-1}$ ). Finalmente, en el tiempo en el cual hubo la mayor

**Tabla 1. Tratamientos evaluados con base en las diferentes combinaciones de los tres factores (fuentes nutricionales) a tres niveles de concentración**

Tratamientos	$X_1$	$X_2$	$X_3$
	Roca fosfórica	Hidrolizado de levadura	Sacarosa
1	1	0,5	10
2	10	0,5	10
3	1	5	10
4	10	5	10
5	1	2,5	5
6	10	2,5	5
7	1	2,5	15
8	10	2,5	15
9	5	0,5	5
10	5	2,5	5
11	5	0,5	15
12	5	5	15
Puntos medios	5	2,5	10

concentración de biomasa, se tomaron 10µl de cada cultivo para ser sembrados en agar SMRS1 y calcular el IS.

## Análisis estadístico

Para el diseño del medio de cultivo, inicialmente se realizó un ANOVA para evaluar la significancia el modelo, de cada uno de los factores y de la interacción entre los mismos. Así mismo, se realizó ANOVA y comparación de medias por Tukey para determinar las diferencias en producción de biomasa y actividad fosfatasa entre los tratamientos y el control. Por su parte, para el análisis de los parámetros cinéticos e índices de solubilización, se realizó ANOVA y comparación de medias por Tukey. El análisis estadístico se realizó empleando el programa Desing expert 6.0.

## Resultados

### Aislamiento y selección de las cepas

A partir de las muestras de suelo utilizadas para la selección de los microorganismos, se obtuvieron los recuentos, cantidad de morfo tipos e índices de solubilización registrados en la tabla 2. De las 5 cepas halladas en los recuentos, se seleccionaron las 3 cepas que mostraron IS mayores a 1,

las cuales correspondieron a bacterias Gram negativas de morfología coco-bacilar, y su codificación correspondiente fue A, B y C (**Tabla 2**).

### Prueba de antagonismo

Los resultados obtenidos en la prueba de antagonismo pusieron de manifiesto que las cepas bacterianas seleccionadas fueron compatibles, ya que no se presentó halo de inhibición de crecimiento entre ninguna de las 3 cepas. Una vez comprobada la aptitud de las cepas para crecer en co cultivo sin problemas de inhibición, se procedió a continuar con el diseño del medio y las curvas de crecimiento, tanto individuales como en co-cultivo.

### Diseño del medio de cultivo

De acuerdo con los resultados de la prueba ANOVA, para actividad fosfatasa, los factores que tuvieron un efecto significativo fueron  $X_2$  y  $X_2^2$  ( $p=0,0026$  y  $0,0259$ ). Por su parte, para la formación de biomasa se observó que ningún factor a ningún nivel presentó un efecto significativo ( $p=0,602$ ) (**Tabla 3**). La ecuación que describió el modelo para actividad fosfatasa en términos del intercepto, coeficiente lineal y cuadrático fue:

**Tabla 2. Recuentos, cepas de bacterias fosfato solubilizadoras (BFS) y sus respectivos índices de solubilización (IS)**

Muestra de suelo	Recuento de BFS ( $\text{Log}_{10}\text{UFC g}^{-1}$ )	Denominación de la cepa representativa <sup>a</sup>	Características morfológicas en agar SMRS1	IS
Vivero	6,00	A	Colonias de color naranja pálido, cremosas y planas	1,03
Zona definitiva, palmas jóvenes	3,00	C	Colonias de color naranja intenso, brillantes y cremosas	1,83
Zona definitiva, palmas adultas	4,95	B	Colonias pequeñas, de color naranja intenso, brillantes y cremosas	1,12
		D	Colonias de color naranja oscuro (pardo), brillantes cremosas	0,34
		E	Colonias amarillas, pequeñas, planas y opacas	0,53

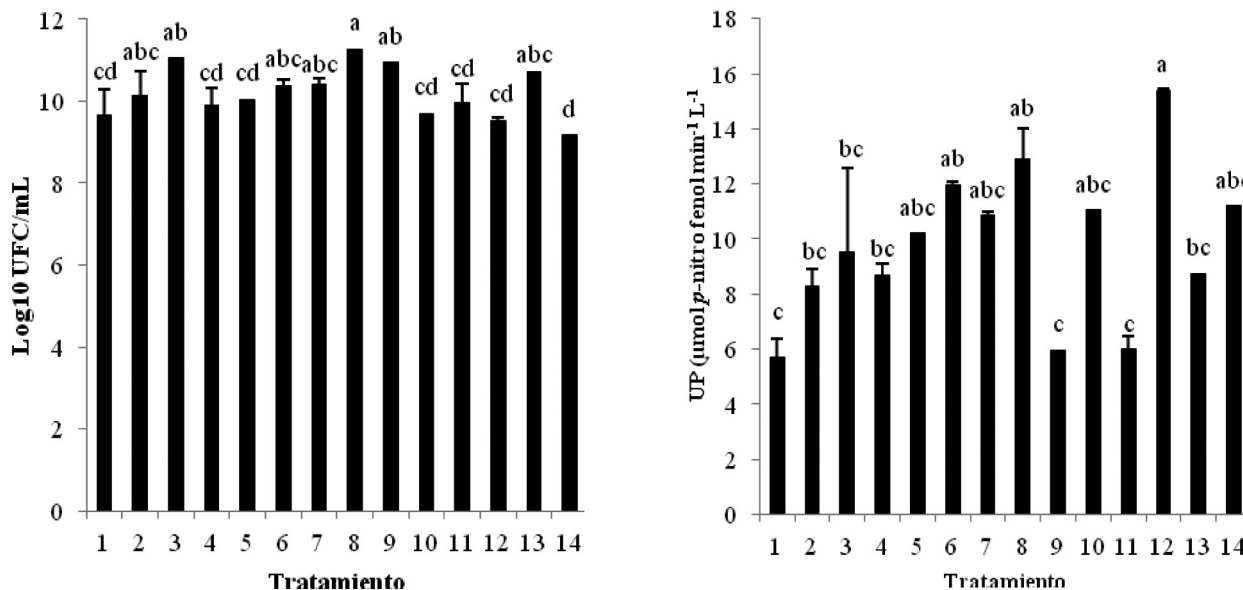
<sup>a</sup>Se tomaron como cepas representativas, aquellas que presentaran halo de solubilización y mostraran una morfología macroscópica diferente entre sí.

$$AP(UP) = 10,16 + 0,0026X_2 + 0,0259X_2^2 \quad [3]$$

**Donde:** AP(UP) corresponde a la actividad fosfatasa y X2 a la concentración de levadura inactiva.

Dada la necesidad de encontrar un medio que favoreciera la producción de un inóculo doble propósito se realizó otro tipo de análisis estadístico sin entrar a optimizar el

polinomio ni generar gráficas de superficie de respuesta. Para esto se compararon todos los tratamientos con respecto al control y de acuerdo con los resultados de la prueba estadística se observó que en los tratamientos 2, 3, 8, 9 y 14 se presentó la mayor producción de biomasa ( $p < 0,01$ ) y en los tratamientos 5, 6, 7, 8, 10, 12, y 14 se cuantificó la mayor actividad fosfatasa ( $p < 0,01$ ) (**Figura 1**). No obstante, en el tratamiento 8 se evidenciaron los valores más altos para



**Figura 1.** Comparación de los resultados obtenidos del diseño Box Behnken. Biomasa ( $p < 0,01$ ) y actividad fosfatasa ( $p < 0,01$ ). Los tratamientos 1-12 corresponden a los obtenidos en la matriz, el 13 a los puntos medios y el 14 es el control en caldo SMRS1.

**Tabla 3. Resultados estadísticos para las variables actividad fosfatasa y biomasa, obtenidos a partir del análisis de Box Behnken realizado a los diferentes tratamientos.**

Parámetro	Valor <i>p</i> para biomasa	Valor <i>p</i> para actividad fosfatasa
Modelo	0,6023	0,0309
X <sub>1</sub>	0,6335	0,2160
X <sub>2</sub>	0,3654	0,0026*
X <sub>3</sub>	0,9498	0,1902
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0,9330	0,8760
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0,1219	0,0259*
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0,5178	0,0811
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,2255	0,2772
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0,8251	0,9249
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0,4482	0,1799

X<sub>1</sub>: Roca fosfórica. X<sub>2</sub>: Levadura inactiva. X<sub>3</sub>: Sacarosa.

las dos variables de respuesta, por esta razón se realizaron las curvas con dicha formulación (roca fosfórica 10 gL<sup>-1</sup>, levadura 2,5 gL<sup>-1</sup> y sacarosa 15 gL<sup>-1</sup>),

### Curvas de crecimiento

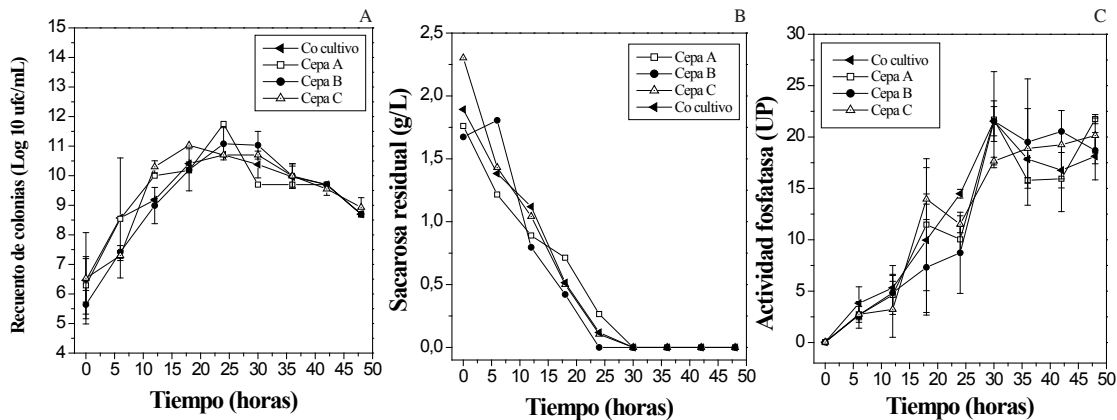
Las curvas de crecimiento para cada cepa y co-cultivo, fueron realizadas en el medio 8 seleccionado en el diseño. Para cada una de las curvas realizadas (cepas y co-cultivo) se evidenciaron las diferentes fases de crecimiento bacteriano (**Figura 2**), con una relación típica inversamente proporcional entre el valor de biomasa y la sacarosa residual. Así mismo, se determinó que, para todos los casos, la mayor producción de biomasa se produjo a las 24 horas de fermentación (A: 11,4; B: 11,2; C: 10,7; co-cultivo: 10,7 Log<sub>10</sub> UCF ml<sup>-1</sup>) con máximos valores de actividad fosfatasa entre la hora 30 y 48 de fermentación (A: 21,7 ± 4,7; B: 21,5 ± 1,4; C: 20,1 ± 1,7; co-cultivo: 21,5 ± 2,0 UP). Los parámetros cinéticos no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las cepas individuales y el co-cultivo (**Tabla 4**), por lo cual es posible suponer que las 3 cepas, al tener iguales características cinéticas, no van a competir entre sí por

fuentes nutricionales. Por su parte, la cepa C mostró un IS significativamente mayor a los que mostraron las cepas A y B (**Tabla 4**), lo cual no representa un factor de supresión sobre las demás cepas, sino que al ser un factor aditivo, le otorga mayor capacidad solubilizadora al co-cultivo.

### Discusión

#### Aislamiento y selección de cepas

Los suelos de la zona Oriental de Colombia, dedicados al cultivo de la palma de aceite, son suelos que han sido sometidos por más de 30 años a un monocultivo extensivo e intensivo, condiciones propias de los sistemas productivos de la palma de aceite. Esto ha generado cambios en los recursos minerales del suelo, que reducen paulatinamente la diversidad microbiológica y edáfica del sustrato; esto ha favorecido la selección natural de los grupos microbianos presentes en la rizósfera, debido a que los exudados propios de una misma planta perenne condicionan el desarrollo de grupos microbianos específicos, por lo cual la diversidad de microorganismos fosfatos solubilizadores fue baja.



**Figura 2.** Curva de crecimiento de las cepas y el co-cultivo microbiano. A. Comportamiento de la biomasa a lo largo del tiempo. B. Concentración de sacarosa residual en el medio a lo largo del proceso. C. Actividad fosfatasa registrada a lo largo del tiempo.

**Tabla 4.** Parámetros de cinética de crecimiento obtenidos en para cada una de las cepas y el co-cultivo evaluados.

CEPA	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	td (h)	Productividad (UP/h)	IS
A	0,48 ± 0,07	1,46 ± 0,23	0,72 ± 0,16	1.03 ± 0,10 <sup>b</sup>
B	0,47 ± 0,04	1,48 ± 0,12	0,72 ± 0,05	1.12 ± 0,13 <sup>b</sup>
C	0,65 ± 0,14	1,10 ± 0,25	0,42 ± 0,04	1.83 ± 0,30 <sup>a</sup>
Co-cultivo	0,43 ± 0,08	1,63 ± 0,32	0,72 ± 0,07	ND
Valor <i>p</i> ( $\alpha=0,05$ )	0,25	0,28	0,44	0,03

(19). No obstante, considerando la estimación de los IS, fue posible establecer que las cepas estudiadas poseen una actividad solubilizadora de fósforo alta, en comparación con los IS reportados por Faccini *et al.* (1996) para cepas aisladas de cultivos de papa y por Martínez y Martínez (2003) para cepas aisladas de caña de azúcar (**Tabla 2**) (20-22).

## Diseño del medio de cultivo

La concentración óptima de los nutrientes de un medio de cultivo depende de la composición celular de los microorganismos, es decir de la demanda de cada uno de los elementos necesarios para sintetizar sus estructuras; así, para encontrar un balance adecuado entre lo requerido para formar biomasa, teniendo en cuenta co-factores enzimáticos y fuentes de energía, es necesario contar con fuentes nutricionales adecuadas bajo determinadas concentraciones y así estimar la formulación que genere una mayor producción de biomasa (23). Así mismo, las condiciones de cultivo tales como el pH, concentración de oxígeno, temperatura y conductividad eléctrica, influyen fuertemente en la productividad de biomasa; sin embargo, unos de los parámetros más influyentes son la disponibilidad y concentración de nutrientes, ya que determinan la máxima cantidad de biomasa que puede ser producida (24).

En el presente estudio se evidenció que en cuanto a la producción de biomasa, ninguno de los componentes nutricionales evaluados, bajo los niveles contemplados, mostró tener influencia sobre la producción de biomasa ( $p=0.6203$ ; **Tabla 3**). Lo cual supone que las concentraciones utilizadas en el modelo no fueron lo suficientemente diferentes como para que fuera evidente el efecto que tienen sobre la biomasa, especialmente la sacarosa y la levadura inactiva, ya que éstas, al ser las fuentes de macro elementos (C, N, P, K) son fuentes que limitan o promueven fuertemente la síntesis de biomasa (23). No obstante, el análisis de Tukey puso de manifiesto que la mayoría de las formulaciones evaluadas mostraron una mayor producción de biomasa respecto al medio de referencia SMRS1 ( $p<0,01$ ; **Figura 1**); lo cual indica que la sacarosa, la levadura inactiva y la roca fosfórica utilizadas como fuentes nutricionales en el ensayo, constituyen fuentes óptimas para el crecimiento de los MFS en estudio, y teniendo en cuenta que estas son fuentes económicas en comparación con los componentes del caldo SMRS1, la formulación de un medio de cultivo con dichos componentes constituye en una ventaja comercial, ya que reduce costos de producción a la vez que maximiza la productividad de biomasa durante el proceso.

Por su parte, la actividad fosfatasa estuvo correlacionada positivamente con la concentración de levadura inactiva ( $p<0,01$ ; **Tabla 3**), ya que esta constituye el sustrato

inductor de la enzima, debido a que es fuente de fósforo orgánico (40%) al contener ácidos nucleicos, fosfolípidos y los mono, di y tri ésteres contenidos en la biomasa de la levadura (9, 25).

Finalmente, la formulación 8 (roca fosfórica  $10 \text{ gL}^{-1}$ , levadura  $2,5 \text{ gL}^{-1}$  y sacarosa  $15 \text{ gL}^{-1}$ ) al contener niveles de los tres componentes que promueven tanto la producción de biomasa como la producción de fosfatasa, representa una ventaja a la hora de producir un inoculante de doble propósito, como en este caso que es la solubilización de P inorgánico y la producción de enzimas fosfatasa, con la adicional potenciación de la producción de biomasa.

## Curvas de crecimiento

Durante el proceso de fermentación no se evidenció una fase de adaptación para ninguna de las cepas, ni para el cultivo, es decir no fue evidente aquel intervalo de tiempo en que no se presenta incremento en la concentración celular producto de una adaptación a las condiciones del sistema de cultivo (23); dicho comportamiento, pudo estar asociado a que los microorganismos cultivados provenían de un pre-inoculo obtenido a partir de células cultivadas bajo las mismas condiciones pero en medio sólido.

La sacarosa, es el principal carbohidrato involucrado en la síntesis de los constituyentes de la pared celular y en donde interviene la enzima invertasa, enzima extracelular que permite la disociación de la sacarosa a glucosa y fructosa, carbohidratos fácilmente asimilables por los microorganismos (26). La reducción sustancial de la sacarosa residual en los cultivos evaluados demuestra el uso del compuesto para la generación de biomasa, lo cual es evidente hasta la hora 24, en donde se registra escasez de la fuente y por ende el comienzo de la fase de muerte (**Figura 2**).

Por otro lado, el comportamiento de la actividad fosfatasa registró un aumento paulatino en la fase exponencial de crecimiento (0-24 horas), en donde, su actividad máxima se obtuvo en la fase final de crecimiento (hora 24); sin embargo, al agotarse la sacarosa, disminuyó la producción de ácidos orgánicos que estimulaban la solubilización del P a partir de la roca fosfórica (**Figura 2 B y C**). En consecuencia, los microorganismos inician la mineralización de fósforo orgánico presente en la levadura inactiva, aumentando así la actividad fosfatasa, la cual permaneció constantemente elevada hasta el final del ensayo. Dicho comportamiento de la actividad fosfatasa coincide con el trabajo realizado por Pawar y Thaker (2009), quienes demuestran que la máxima actividad de fosfatasa de *Aspergillus niger* se produce al finalizar la fase de crecimiento (27).



Ante este hecho, se hace evidente la importancia del presente estudio, el cual desarrolla un medio de cultivo a base de fuentes nutricionales económicas, en donde es posible el crecimiento óptimo de microorganismos benéficos para la agro industria, ya que promueven la disponibilidad de P en el suelo por medio de dos mecanismos, solubilización y mineralización, lo cual se traduce en una mayor capacidad de absorción de este elemento por parte de las plantas (28). Así, el desarrollo de co cultivos, tal como lo afirman Viruel *et al.* (2011) y Madhaiyan *et al.* (2010), se constituyen en herramientas biotecnológicas de gran importancia para la agricultura, que generan beneficios a bajos costos que permiten minimizar el uso de agroquímicos (29, 30).

En el presente estudio, la evaluación de las características metabólicas, las curvas de crecimiento y parámetros cinéticos de las bacterias y co-cultivo, permitió determinar que las tres cepas conformaron un co-cultivo real al no tener efecto antagónico ni competitivo entre sí, reflejado en la igualdad de los parámetros cinéticos de cada cepa (**Tabla 3**). Por su parte, cada una contribuye a la mineralización y solubilización de P del co-cultivo mediante el aporte aditivo de enzimas fosfatasas y ácidos orgánicos que solubilizan el P inorgánico (30,31). En este contexto, el desarrollo de este co-cultivo, se constituye en una herramienta biotecnológica de aplicación útil, puesto que su uso podría maximizar y potenciar la disponibilidad del P en el suelo mediante dos procesos desarrollados en un solo producto, el cual es elaborado a bajo costo.

## Conclusión

Se diseñó un medio de cultivo a partir de fuentes nutricionales económicas para la producción de un inoculante de bacterias solubilizadoras de P, cuya formulación fue: levadura 2,5 gL<sup>-1</sup>, roca fosfórica 10 gL<sup>-1</sup> y sacarosa 15 gL<sup>-1</sup>, el cual promovió eficientemente la producción de biomasa (11,8 Log<sub>10</sub> UFC ml<sup>-1</sup>) y la actividad fosfatasa (12,9 UP) de un co-cultivo conformado por 3 cepas de microorganismos fosfato solubilizadores. De igual forma, fue posible verificar que el inoculante se conformó por un verdadero co-cultivo, mediante el análisis de parámetros cinéticos y pruebas de antagonismo, con un doble efecto benéfico sobre la disponibilidad de P.

## Agradecimientos

Los autores presentan sus agradecimientos a La Pontificia Universidad Javeriana, Palmar de Oriente S.A., BioAgrícola del Llano S.A.E.S.P. y a la Federación Internacional de Universidades Católicas (FIUC).

## Financiación

Esta investigación fue realizada gracias al apoyo de la Empresa Palmar de Oriente S.A. y la Federación Internacional de Universidades Católicas FIUC y el Centro Coordinador de la Investigación CCI-FIUC, en el marco del proyecto “Formación de técnicos para mejorar la calidad de suelos en países en vía de desarrollo: empleo de compost mejorado biotecnológicamente en cultivos orgánicos”. ID: 000158.

## Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés en la publicación de estos resultados.

## Referencias

1. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). 27 de Febrero de 2004. Resolución No. 00375 Por la cual se dictan las disposiciones sobre Registro y Control de los Bioinsumos y Extractos Vegetales de uso agrícola en Colombia. Bogotá, Colombia.
2. Borda D, Pardo J, Martínez M, Montaña J. Producción de un biofertilizante a partir de un aislamiento de *Azotobacter nigricans* obtenido en un cultivo de *Stevia rebaudiana* Bert. *Universitas Scientiarum* 2009; **14** (1), 71-78.
3. Tsavkelova E, Cherdyntseva T, Klimova S, Shetakov A, Botina S, Netrusov A. Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin. *Archives of Microbiology* 2007; **188**, 655-664.
4. Boiero L, Perrig D, Masciarelli O, Penna C, Cassán F, Luna V. Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. *Applied Microbiology Biotechnology* 2007; **74**, 874-880.
5. Nahas, E. Phosphate solubilizing microorganisms: Effect of carbon, nitrogen, and phosphorus sources. *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*. Springer. 2007; 111-115.
6. Reyes I, Valery A, Valduz Z. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizospheric and bulk soils of colonizer plants at an abandoned rock phosphate mine. *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*. 2007; 69-75.
7. Nahas E. Phosphate solubilizing microorganisms: Effect of carbon, nitrogen, and phosphorus sources. *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*. 2007; 111-115.

8. Rosas S, Rovera M, Andres J, Correa N. Effect of phosphorous solubilizing bacteria on the rhizobia-legume symbiosis. *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*. Springer. 2007; 125-128.
9. Chen Y, Rekha P, Arun A, Shen F, Lai W, Young C. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*. 2006; **34**, 33-41.
10. Martínez M, Gutierrez V, Novo R. Microbiología aplicada al manejo sustentable de suelos y cultivos. Editorial USM. Serie: Gestión, Innovación y Tecnología. Universidad Técnica Federico Santa María. Santiago, Chile. 2010, 182-235 p.
11. Merck. Microbiology Manual 12<sup>th</sup> Edition. Merck CGaA. Darmstadt, Germany. 2005. 130-131 p.
12. Cui F, Li Y, Xu Z, Xu H, Sun K, Ta, W. Optimization of the médium composition for production of mycelial biomass and exo.plymer by *Grifola frondosa* GF9801 using response surface methodology. *Bioresource Technology*. 2006; **97**, 1209-1216.
13. Kammoun R, Naili B, Bejar S. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). *Bioresource Technology*. 2008; **99**, 5602-5609.
14. Florez M, Conde J. Capítulo 1. Muestreo de Suelo. En: Técnicas Microbiológicas de suelos y lodos. Proyecto CIC-FIUC. Federación Internacional de Iglesias Católicas. Bogotá, Colombia. 2006; 11-29.
15. Takaki G, Martínez M. Capítulo II. Determinación de Microorganismos benéficos de suelo: Ausencia/presencia bacterias fosfato solubilizadoras (BFS). En: Técnicas Microbiológicas de suelos y lodos. Proyecto CIC-FIUC. Federación Internacional de Iglesias Católicas. Bogotá, Colombia. 2006; 39-41.
16. Martínez M, Pedroza A, Gutierrez V. Métodos microbiológicos, físicos y químicos con Aplicación Ambiental. Manual de microbiología ambiental. Editorial USM. Serie: Gestión, Innovación y Tecnología. Universidad Técnica Federico Santa María. Santiago, Chile. 2010, 239 p.
17. Collins C, Lyne P. *Métodos Microbiológicos*. Editorial Acirbia, S.A. Zaragoza, España. 1989; 155.
18. Calvo P, Rosatto S, Granjeiro P, Aoyama H, Kubota. Electroanalytical determination of acid phosphatase activity by monitoring *p*-nitrophenol. *Analytica Chimica Acta* 2001; **441**, 207-214.
19. Godoy R. *Método DNS para la determinación de azúcares reductores totales en melaza, sustrato de fermentación y vinos*. *Ingeniero Químico. Manual de Métodos Analíticos*. Universidad Nacional de Colombia. 2002; 67-73 p.
20. Ramachandra K, Srinivasan V, Hamza S, Anandaraj M. Phosphate solubilizing bacteria isolated from the rhizosphere soil and its growth promotion on black pepper (*Piper nigrum* L.) cuttings. *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*. Springer. 2007; 325-331.
21. Faccini G, Garzón P, Martínez M, Varela A. Evaluation of the effect of a dual inoculum of phosphate solubilizing bacteria and *Azotobacter chroococcum* in crops creoles potato. *Developments in Plant and Soil Sciences*. 2007; **102**, 301-308.
22. Martínez M, Bonilla R, Camelo M, Caballero T. Determinación de actividad fosfato solubilizadora por bacterias aisladas a partir de suelos algononeros en los departamentos del Cesar y Meta. *Suelos Ecuatoriales*. 2007; **37** (1): 94-100.
23. Kumar B, Trivedi P, Pandey A. *Pseudomonas corrugata*: A suitable bacterial inoculant for maize grown under rained conditions of Himalayan region. *Soil Biology and Biochemistry*. 2007; **39**, 3093-3100.
24. Stanbury P, Whitaker A, Hall, S. *Principles of Fermentation Technology*. Second Edition. Butterworth Heinemann. Great Britain. 2003, 1-9, 93-116 p.
25. Egli T, Zinn M. The concept of multiple-nutrient-limited growth of microorganisms and its application in biotechnological processes. *Biotechnology Advances*. 2003; **22**, 35-43.
26. Peralta M, Miazzo R, Nilson, A. Levadura de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*) en la alimentación de pollos de carne. *REDVET. Revista Electrónica Veterinaria*. 2008. **IX** (10): 1-11
27. Mathews C, Holde K, Ahern K. *Bioquímica Tercera Edición*. Pearson. España. 2004, 328 p.
28. Pawar V, Thaker V. Acid phosphatase and invertase activities of *Aspergillus niger*. *Mycoscience*. 2009; **50**, 323-330.
29. Garcia A, Angulo J, Gutierrez V, Martínez M. Evaluation of the fertilizing capacity of compost in nursery Oil Palm. *Acta Horticulturae*. En proceso de publicación.
30. Viruel, E., Lucca, M., Señeriz, F. Plant growth promotion traits of phosphobacteria isolated from Puna, Argentina. *Archives of Microbiology*. 2011; **193**, 489-496.
31. Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Kang, B. Effect of co.inoculation of methylotrophic *Methylobacterium oryzae* with *Azospirillum basiliense* and *Burkholderia pyrrocinia* on the growth and nutrient uptake of tomato, red pepper and rice. *Plan Soil*. 2010; **328**, 71-82.
32. Arora N, Khare E, Naraian R, Maheshwari D. Sawdust as a superior carrier for production of multipurpose bioinoculant using plant growth promoting rhizobial and pseudomonad strains and their impact on productivity or *Trifolium repense*. *Current Science*. 2008; **95** (1): 90-95