

# CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS DE PLANTAS DE VAINILLA CON POTENCIAL COMO BIOFERTILIZANTES<sup>1</sup>

Claudia Álvarez-López<sup>2</sup>, Walter Osorio-Vega<sup>2</sup>, María Claudia Díez-Gómez<sup>3</sup>, Mauricio Marín-Montoya<sup>2</sup>

## RESUMEN

**Caracterización bioquímica de microorganismos rizosféricos de plantas de vainilla con potencial como biofertilizantes.** El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad bioquímica *in vitro* con potencial biofertilizante en microorganismos rizosféricos de plantas de vainilla. Se realizó una confirmación fenotípica de la identidad taxonómica de los microorganismos más eficientes en las diferentes pruebas. Los aislamientos se llevaron a cabo durante el año 2011 en cultivos de vainilla bajo cobertizos de techo-sombra en el municipio de Sopetrán (Antioquia, Colombia). Los solubilizadores de fosfato inorgánico más efectivos correspondieron a dos bacterias, una del género *Serratia* y la otra identificada como *Pseudomonas koreensis*. Entre los microorganismos solubilizadores de fosfato orgánico el más eficiente fue el hongo *Plectosphaerella cucumerina*. Los celulolíticos más efectivos fueron los hongos *Penicillium griseofulvum* y *Aspergillus fumigatus*; por su alta actividad proteolítica/amonificante se identificaron las bacterias del complejo *Bacillus cereus* y *Serratia* sp. Finalmente, entre las bacterias asimbióticas fijadoras de nitrógeno tres cepas de *Pseudomonas koreensis*, crecieron rápida y abundantemente en el medio selectivo libre de nitrógeno. Para estas bacterias, mediante PCR específico se detectó, la presencia del gen *NifH* responsable de esta actividad metabólica. La diversidad funcional de los microorganismos encontrados, abre la posibilidad de ser empleados como biofertilizantes en el cultivo de vainilla.

**Palabras claves:** microorganismos celulolíticos, microorganismos proteolíticos, solubilización de fosfato, fijación de nitrógeno.

## ABSTRACT

**Biochemical characterization of rhizosphere microorganisms from vanilla plants with potential as biofertilizers.** The objective of this study was to evaluate *in vitro* biochemical activity of rhizosphere microorganisms from vanilla plants with potential as biofertilizers. The taxonomic identity of the most efficient microorganisms was confirmed using phenotypic methods. Isolates were obtained from vanilla plants grown under shade house conditions in the municipality of Sopetrán (Antioquia department, Colombia) during 2011. The most effective solubilizers of inorganic phosphate were bacteria identified as *Serratia* sp. and *Pseudomonas koreensis*. The most effective organic-phosphate solubilizing microorganism was the fungus *Plectosphaerella cucumerina*. In terms of cellulose-hydrolytic activity *Penicillium griseofulvum* and *Aspergillus fumigatus* stood out as the most effective organisms. Bacteria belonging to the *Bacillus cereus* complex and to *Serratia* sp. showed the highest proteolytic/ammonifying activity. Finally, three isolates from *Pseudomonas koreensis* exhibited the highest nitrogen fixation ability. Moreover the presence of the *NifH* gene, responsible for this metabolic activity, was confirmed for these bacteria through PCR. The functional diversity of the microorganisms here presented suggests that there is potential for their use as biofertilizers in the vanilla crop.

**Keywords:** cellulytic microorganisms, proteolytic microorganisms, phosphate solubilizers, asymbiotic N<sub>2</sub>-fixers.

<sup>1</sup> Recibido: 5 de marzo, 2013. Aceptado: 30 de junio, 2014. Parte de la Tesis de Maestría de la primera autora, desarrollada en el marco del proyecto 082-2008V6151-3701, financiado por Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia.

<sup>2</sup> Laboratorios de Microbiología Industrial y Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín. Calle 59A No 63 - 20, Medellín, Colombia. klauvalvarez@gmail.com, nwsorio@unal.edu.co, mamarinm@unal.edu.co

<sup>3</sup> Departamento de Ciencias Forestales, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín. Calle 59A No 63 - 20, Medellín, Colombia. mcdiez@unal.edu.co



## INTRODUCCIÓN

La vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks) es una orquídea tropical altamente promisorio para ser cultivada en las tierras bajas y valles interandinos de Suramérica tropical (Moreno y Díez, 2011). En países como Colombia se presentan poblaciones nativas de vainilla (Misas, 2005; Ledezma et al., 2006); sin embargo, el área cultivada comercialmente con esta planta no supera las 100 ha y los rendimientos son bajos (1 a 1,5 kg/planta/año), resultado de las pocas floraciones y del desconocimiento de su manejo agronómico (Soto-Arenas, 2006; Moreno y Díez, 2011).

La nutrición de este cultivo es uno de los aspectos más críticos para su exitosa producción comercial, ya que el sistema radicular de la vainilla es superficial y se desarrolla sobre la capa de materia orgánica del suelo. Por lo mencionado anteriormente, los microorganismos rizosféricos juegan un papel clave al descomponer los diversos sustratos orgánicos utilizados para su establecimiento (Castro, 2008). Desafortunadamente, se conoce poco sobre los microorganismos que habitan la rizosfera de la vainilla y de las funciones específicas que ellos pueden cumplir para facilitar la disponibilidad de nutrientes (Murthy et al., 2010).

La nutrición vegetal orgánica es muy apreciada por los consumidores internacionales de vainilla y podría generar un valor agregado adicional para la producción de esta especie en países latinoamericanos. Esta aproximación se ha utilizado en diferentes lugares del mundo, con resultados interesantes que han llevado a recomendar el uso de biofertilizantes en los sustratos orgánicos empleados en las plantaciones de vainilla. Dichos biofertilizantes incluyen formulaciones de *Pseudomonas fluorescens*, *Azospirillum* sp. y diferentes bacterias solubilizadoras de fósforo que promueven el crecimiento de las plantas (Anilkumar, 2004). Surendra et al. (2009) encontraron que la asociación de especies de *Azotobacter* y diferentes *Pseudomonas* fluorescentes actúan como PGPR's (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) en plantas de vainilla; mientras que Wilkinson et al. (1994) expresaron que los géneros de bacterias más abundantes, asociados a la rizosfera de diferentes especies de orquídeas tropicales, corresponden a *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Kurthia*, *Arthrobacter* y en menor cantidad, a miembros

de la familia Enterobacteriaceae. En forma similar, Tsavkelova et al. (2007) reportaron la presencia de *Burkholderia*, *Bacillus*, *Erwinia*, *Flavobacterium* y *Pseudomonas* como microorganismos productores de auxinas que promovieron la formación y el crecimiento de raíces de orquídeas tropicales.

Además de la acción como PGPR's de los microorganismos rizosféricos, estos también pueden ejercer control biológico de enfermedades en el cultivo de vainilla, siendo destacados para tal fin *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma harzianum*, *Rhizoctonia* sp. y *Paecilomyces* sp. (He, 2007; Naik et al., 2010).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad bioquímica *in vitro* de microorganismos rizosféricos de plantas de vainilla en procesos de transformación de nutrientes y confirmar la identidad de aquellos más eficientes para su utilización como biofertilizantes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de microorganismos

Este estudio se realizó a partir de 32 aislamientos obtenidos en 2011 en un trabajo previo de identificación molecular de microorganismos asociados a la rizosfera de plantas de vainilla en el municipio de Sopetrán (Antioquia, Colombia) (Álvarez et al., 2012). Las coordenadas geográficas del cultivo fueron 6°29'52,94" N y 75°43'42,71" O, altitud 1052 msnm, temperatura promedio 26,8 °C y precipitación promedio 1243 mm/año. Dicho trabajo utilizó la secuenciación de las regiones ribosomales del ADN ribosomal (ADNr) ITS (hongos) y 16S (bacterias) para la identificación a nivel genérico o de complejo de especies de los microorganismos. Además, sirvió de base para la selección en el presente estudio de once aislados de solubilizadores de fosfato inorgánico y cuatro de fosfato orgánico (PSM y FIT, respectivamente), ocho aislados degradadores de celulosa (CEL), trece proteolíticos/amonificantes (PROT) y tres bacterias asimbióticas fijadoras de nitrógeno atmosférico (FBN) (Cuadro 1). Los hongos se mantuvieron en medio papa dextrosa agar (PDA) y extracto de malta (EM) y las bacterias en agar nutritivo (AN).

**Cuadro 1.** Microorganismos aislados de la rizosfera de plantas de vainilla y su función en la disponibilidad de nutrientes. Antioquia, Colombia. 2011.

Grupo funcional	Microorganismos
Solubilizadores de fosfato inorgánico	35MA158 ( <i>Plectosphaerella</i> sp.), 15MA247 ( <i>Pseudomonas</i> sp.), 90SEP35 ( <i>Acinetobacter</i> sp.), 77SEP29 (Complejo <i>Bacillus cereus</i> ), 51SEP40 ( <i>P. cucumerina</i> ), 52SEP41 ( <i>Plectosphaerella</i> sp.), 79SEP31 (Complejo <i>B. megaterium</i> ), 40MA190 ( <i>Pseudomonas</i> sp.), 75MA194 ( <i>Serratia</i> sp.), dos hongos (NI)
Solubilizadores de fosfato orgánico	108MA163 ( <i>Aspergillus</i> sp.), 35MA158 ( <i>Plectosphaerella</i> sp.), 49MA159 ( <i>Penicillium</i> sp.), 52SEP41 ( <i>Plectosphaerella</i> sp.)
Degradadores de celulosa	59BMA249 ( <i>Curtobacterium</i> sp.), 58SEP25 ( <i>Pseudomonas</i> sp.), 55MA248 ( <i>Rhodococcus</i> sp.), 87MA197 (Complejo <i>Bacillus megaterium</i> ), 82SEP32 ( <i>Bacillus</i> sp.), 82BMA196 ( <i>Bacillus</i> sp.), 108MA163 ( <i>Aspergillus</i> sp.), 49MA159 ( <i>Penicillium</i> sp.)
Proteolíticos/amonificantes	15MA247 ( <i>Pseudomonas</i> sp.), 96MA199 ( <i>Acidovorax</i> sp.), 76SEP28 ( <i>Acinetobacter</i> sp.), 95MA198 (Complejo <i>Bacillus cereus</i> ), 53SEP54 ( <i>Penicillium</i> sp.), 68MA225 ( <i>Pseudomonas</i> sp.), 31SEP22 ( <i>Pseudomonas</i> sp.), 43MA191 (Complejo <i>Bacillus cereus</i> ), 28SEP21 ( <i>Bacillus</i> sp.), 75MA194 ( <i>Serratia</i> sp.), 174MA251 (Complejo <i>Bacillus cereus</i> ), 77SEP29 (Complejo <i>Bacillus cereus</i> ), 71MA226 (Complejo <i>Bacillus cereus</i> )
Fijadores biológicos de nitrógeno	20SEP14 ( <i>Pseudomonas</i> sp.), 21SEP15 ( <i>Pseudomonas</i> sp.), 33MA221 ( <i>Pseudomonas</i> sp.)

NI: no identificado.

Fuente: Álvarez et al. (2012).

## Pruebas bioquímicas de eficacia *in vitro*

### *Solubilización de fosfato inorgánico*

Los microorganismos con capacidad para solubilizar fosfato inorgánico se evaluaron mediante el método desarrollado por Osorio y Habte (2001) libre de agar (Cuadro 2). La fuente de P que se utilizó fue roca fosfórica del departamento del Huila (Colombia) tamizada a 0,5 mm; este material es bastante insoluble, su contenido de P es de 12% y su composición es  $\text{Ca}_{9,6}\text{Na}_{0,22}\text{Mg}_{0,09}(\text{PO}_4)_{5,14}(\text{CO}_3)_{0,86}\text{F}_{2,34}$  (Chien y Hammond, 1978).

De cada uno de los once aislamientos previamente identificados como PSM (Cuadro 1), se tomaron fragmentos de 0,5 cm de diámetro del medio de cultivo con colonias microbiales y se transfirieron asépticamente a erlenmeyers de 250 ml que contenían 75 ml del medio selectivo para PSM. Se incluyó un control no inoculado. Los erlenmeyers se incubaron a 28 °C durante cinco días, en un agitador orbital a 150 rpm. Al final del periodo de incubación, una alícuota

de 30 ml se centrifugó a 2000 rpm durante 10 min y posteriormente se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa de 0,22  $\mu\text{m}$ . En los filtrados se determinó el pH con un electrodo selectivo y se midió la concentración de fósforo en solución mediante el método de azul de fosfomolibdato (Murphy y Riley, 1962).

### *Solubilización de fosfato orgánico*

Para evaluar la actividad de los microorganismos productores de fitasas, se utilizó el medio de Tabatabai (1982) (Cuadro 2), libre de agarosa. El fitato de sodio (myo-inositol 1,2,3,4,5,6 hexakisfosfato de sodio;  $\text{C}_6\text{H}_{18}\text{O}_{24}\text{P}_6$  con 28,2% P) fue la única fuente de P utilizada. El medio (50 ml) se inoculó individualmente con los cuatro aislados microbiales seleccionados (Cuadro 1) y se incluyó un control. Adicionalmente, se probó como referencia el hongo *Mortierella* sp., el cual fue utilizado por su capacidad para solubilizar P orgánico (Ocampo et al., 2012). La concentración de fósforo en el medio se determinó por el método

**Cuadro 2.** Composición de los medios de cultivo selectivos (g/l) utilizados para evaluar microorganismos de cada grupo funcional aislados de la rizosfera de plantas de vainilla. Antioquia, Colombia. 2011.

Fijadores biológicos de nitrógeno <sup>a</sup>		Solubilizadores de fosfato inorgánico <sup>b</sup>		Degradadores de celulosa <sup>c</sup>		Proteolíticos/ amonificantes <sup>d</sup>		Solubilizadores de fosfato orgánico <sup>e</sup>	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4	NaCl	1,0	Carboximetil celulosa	5	Caseína	10	CaCl <sub>2</sub>	2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,2	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1	Extracto de levadura	0,1	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,4	Solución salina 0,85% (ml)	50	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5	KCl	0,5
NaCl	0,1	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,0	Agar-Agar	15	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5
CaCl <sub>2</sub>	0,02	Glucosa	10			Solución salina 0,85% (ml)	50	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,01
FeCl <sub>3</sub>	0,01	Agar-Agar	8			Agar-Agar	15	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01
MoO <sub>4</sub> Na·2H <sub>2</sub> O	0,002	Roca fosfórica	3,5					Glucosa	20
Ácido málico	5							Fitato de Na	4
Azul de bromotimol (ml)	5							Agarosa	10
Agar-Agar	15								

<sup>a</sup>Döbereiner y Day (1976), <sup>b</sup>Osorio y Habte (2001), <sup>c</sup>Wood (1980), <sup>d</sup>Matsumoto et al. (2005), <sup>e</sup>Tabatabai (1982).

de azul de fosfomolibdato (Murphy y Rillely, 1962), incubándose bajo agitación constante a 150 rpm y 30 °C por siete días.

#### *Degradación microbiana de celulosa*

La actividad enzimática de los microorganismos degradadores de celulosa se cuantificó con una prueba de respirometría en cámara estática, herméticamente cerrada (Tate et al., 1993). La cámara presentaba una capacidad de 300 ml y en su interior se dispuso una caja de Petri (5 cm de diámetro) con 6 ml del medio selectivo para microorganismos celulolíticos (Wood, 1980) (Cuadro 2); además de un beaker con 20 ml de una solución de NaOH 0,01 M, que sirve como trampa para el CO<sub>2</sub> producido (Hopkins, 2007), siendo este calculado estequiométricamente luego de realizar una titulación con HCl 0,1 M. Cada caja de Petri se inoculó asepticamente por triplicado, con cada uno de los ocho aislamientos, incubándose por cuatro días en la oscuridad a temperatura ambiente (Cuadro 1). Para la incubación de los hongos, se utilizaron fragmentos de 0,5 cm de diámetro de colonias fungosas tomadas del

medio (EM). Para el caso de las bacterias, se inoculó mediante siembra con asa metálica estéril. Para efectos de comparación se incluyó un control no inoculado.

#### *Capacidad microbiana para producción de amonio*

En el caso de los microorganismos con actividad proteolítica/amonificante, cada aislado se transfirió asepticamente a un erlenmeyer de 250 ml, que contenía 75 ml de medio selectivo para proteolíticos, sin agar, desarrollado por Wood (1980) (Cuadro 2). La única fuente de nitrógeno fue la caseína (Merck 1022450500). Se inocularon individualmente trece aislamientos por triplicado bajo condiciones asepticas. Los medios de cultivo se incubaron a temperatura ambiente por ocho días y se dejaron en agitación constante a 150 rpm. Posterior al periodo de incubación, se centrifugaron alícuotas del medio a 5000 rpm por 10 min y el sobrenadante se filtró con una membrana de nitrocelulosa de 0,22 µm; en los filtrados se midió la concentración de amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) como una medida de la capacidad para realizar la amonificación. La concentración de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> se midió en el Laboratorio

de Biogeoquímica de la Universidad Nacional de Colombia, mediante un electrodo selectivo (Thermo Scientific, USA) acoplado a un potenciómetro (Hanna pH-211, USA) previa adición de ISA (*Ion Strong Adjuster*, NaOH 10 M) para aumentar la fuerza iónica de la solución. Por cada 50 ml de filtrado se adicionó 1 ml de ISA.

### Capacidad microbial para fijar nitrógeno

De los aislamientos bacteriales obtenidos en el medio de FBN (Döbereiner y Day, 1976) (Cuadro 2), se seleccionaron los tres que presentaron más rápido crecimiento y capacidad de sobrevivir a los repiques sucesivos en medios de cultivo (Cuadro 1). En este caso no se cuantificó la capacidad fijadora de  $N_2$ , sino que se determinó la presencia del gen *NifH* que codifica para la enzima nitrogenasa responsable de la fijación de  $N_2$ , en los tres aislamientos, utilizando los cebadores Rosch nifHF (AAA GGY GGW ATC GGY AAR TCC ACC AC) y nifHRb (TGS GCY TTG TCY TCR CGG ATB GGC AT), siguiendo el protocolo presentado por Rösch y Bothe (2005).

### Identificación de los aislamientos

Los microorganismos con los mejores resultados en las pruebas *in vitro*, se caracterizaron morfológica (hongos) y bioquímicamente (bacterias) con el fin de avanzar en su identificación taxonómica, a partir de las inferencias filogenéticas y secuencias del ADN reportadas por Álvarez et al. (2012). Para el caso de los hongos, se realizó la observación de las estructuras microscópicas de los aislamientos que crecieron en EM y PDA. Las colonias fueron evaluadas a los 15, 30 y 90 días después de su siembra con el fin de determinar la presencia de estructuras de resistencia. Los caracteres estudiados incluyeron el micelio, cuerpos fructíferos, forma, color y ornamentación de las esporas, presencia de estructuras estériles y características de conidióforos, entre otros aspectos.

Para las bacterias, la caracterización incluyó la descripción macroscópica de las colonias (borde, tamaño, consistencia, color), la realización de tinciones de Gram y la aplicación de una serie bioquímica tendiente a evaluar la presencia de las siguientes enzimas: nitrato reductasa, lisina descarboxilasa, tiosulfato reductasa, glucasa,  $\beta$ -galactosidasa, sacarasa, citrato reductasa, ureasa, triptofanasa oxidasa, catalasa y citocromo

oxidasa (Cappuccino y Sherman, 2007). Para evaluar la especie identificada molecularmente como asociada al complejo *Bacillus cereus*, se sembraron las colonias en agar Mossel, determinándose la presencia de lecitinasa y la fermentación del manitol, así como también la hemólisis en agar-sangre (Cappuccino y Sherman, 2007). Finalmente, a partir de los resultados obtenidos en las series bioquímicas, se seleccionó molecularmente uno de los aislamientos, identificado como *Pseudomonas* sp. (40MA190), para ser evaluado con el kit API 20NE (Biomérieux, Francia).

### Análisis estadístico

Cada prueba, por grupo funcional, consistió en un experimento separado y organizado con un diseño completamente al azar. Los tratamientos consistieron en la inoculación individual en cada medio, con los microorganismos seleccionados; se incluyeron controles no inoculados en cada caso. Cada tratamiento tuvo tres repeticiones y las diferencias en las actividades de los microorganismos se analizaron a través de ANOVA (prueba F) y comparación de medias (Prueba de Duncan, t-test). En ambos casos, se utilizó un nivel de significancia  $P \leq 0,05$ . Los análisis se realizaron con el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurion XV.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Solubilización de fosfato inorgánico

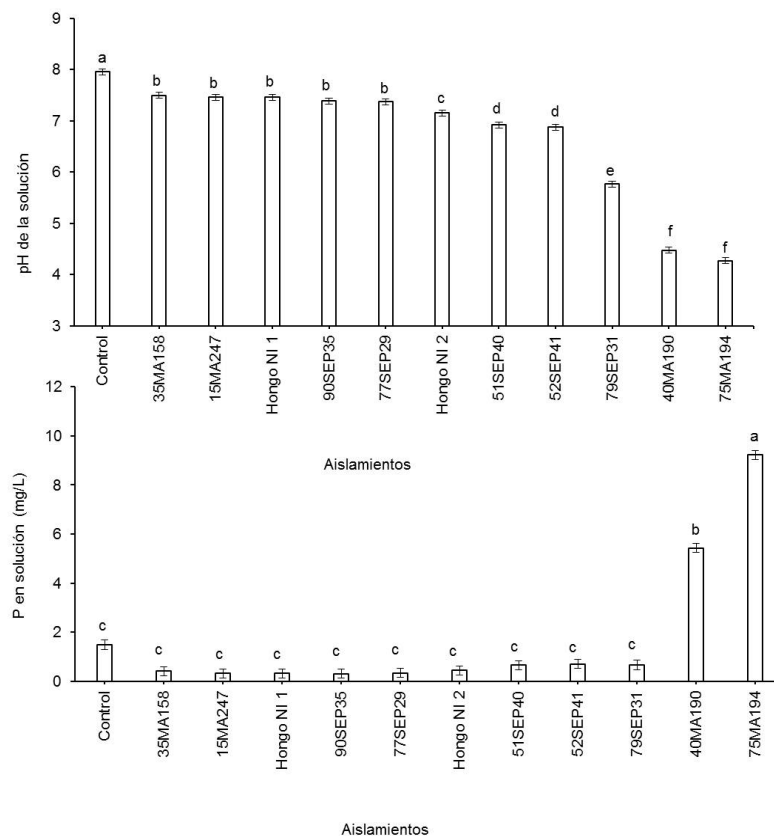
La disolución microbial de fosfato inorgánico estuvo asociada con la producción de acidez; los ácidos orgánicos producidos (ácido cítrico, ácido oxálico, ácido glucónico, entre otros) atacan la estructura de la roca fosfórica y liberan iones fosfato que pueden llegar a estar disponibles para los microorganismos o para ser absorbidos por las raíces de las plantas (Osorio, 2011). Esta situación fue inicialmente reportada por Bar-Yosef et al. (1999) quienes encontraron una relación inversa entre los cambios en el pH y la actividad solubilizadora de P por *Pseudomonas cepacia*, proponiendo la adopción de dicha práctica para la industria de fertilizantes fosfóricos. Whitelaw (2000), en su revisión de hongos solubilizadores de P, plantea que además de los ácidos orgánicos generados por los microorganismos, la liberación de protones en

respuesta a la absorción de amonio por parte de las plantas y de los microorganismos rizosféricos, es otro mecanismo que explica dicho efecto solubilizador. En adición, Osorio y Hatbe (2001) en una investigación tendiente a evaluar el efecto de la aplicación de microorganismos solubilizadores de P sobre plantas de *Leucaena leucocephala* con y sin asociaciones micorrícicas, encontraron que la inoculación conjunta del hongo *Mortierella* sp. y *Glomus aggregatum* incrementó en 13% el contenido de P en las plantas cultivadas en suelos no fertilizados con ninguna fuente de P y en 73% de aquellas fertilizadas con roca fosfórica, lo que claramente representaba una interacción sinérgica entre ambos microorganismos.

En el presente estudio se destacaron dos aislados bacteriales (75MA194 y 40MA190) por su capacidad

para reducir el pH de la solución. El aislado 75MA194, relacionado filogenéticamente con *Serratia* sp., fue el más eficaz para disminuir el pH del medio desde un valor inicial de 7,9 a un pH de 4,3, generando así la más alta concentración de P en solución (9,2 mg/l). Este fue seguido por el aislamiento 40MA190, una bacteria identificada previamente como miembro del grupo de las *Pseudomonas* fluorescentes, la cual disminuyó el pH a 4,5 y llevó la concentración de P a 5,4 mg/l. Aunque otros aislados microbiales redujeron el pH de la solución por debajo del valor del control (pH 7,9), no pudieron disolver la roca fosfórica y, por tanto, no se aumentó significativamente la concentración de P en la solución (Figura 1).

En general, se ha detectado que en los sustratos que se utilizan comúnmente para el establecimiento



**Figura 1.** pH (arriba) y concentración de P en solución (abajo) en el medio inoculado con diferentes microorganismos aislados de la rizosfera de vainilla. La fuente de P fue roca fosfórica. Antioquia, Colombia. 2011. Letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de Duncan,  $P \leq 0,05$ ).

de cultivos de vainilla (fibra de coco, residuos de madera, corteza de árboles, hojarasca), el contenido de P fue muy bajo ( $\leq 0,11\%$ ), siendo una limitante para la nutrición y el crecimiento de las plantas (Osorio, 2012). Una alternativa para mejorar la nutrición con P de la vainilla es la aplicación de fertilizantes fosfóricos de alta solubilidad; pero se corre el riesgo de perder buena parte por lixiviación, dado el desarrollo superficial de las raíces de esta planta. Por otro lado, dichos fertilizantes son costosos y su uso en agricultura orgánica, como la desarrollada para el cultivo de vainilla, no es permitido. Otra alternativa, es la aplicación de la roca fosfórica, un material de origen natural, más económico que fertilizantes de síntesis química, pero que es poco soluble. Tal como se indicó, los PSM tienen la capacidad de producir ácidos orgánicos que disuelven la roca fosfórica y de esta forma aumentan la disponibilidad de P soluble para las plantas. Adicionalmente, la ausencia de arcillas o de óxidos (adsorbentes de fosfato no-disponible) en el sustrato de crecimiento de las plantas de vainilla, permite plantear que los microorganismos seleccionados en este estudio pueden generar suficiente P soluble para las plantas de vainilla.

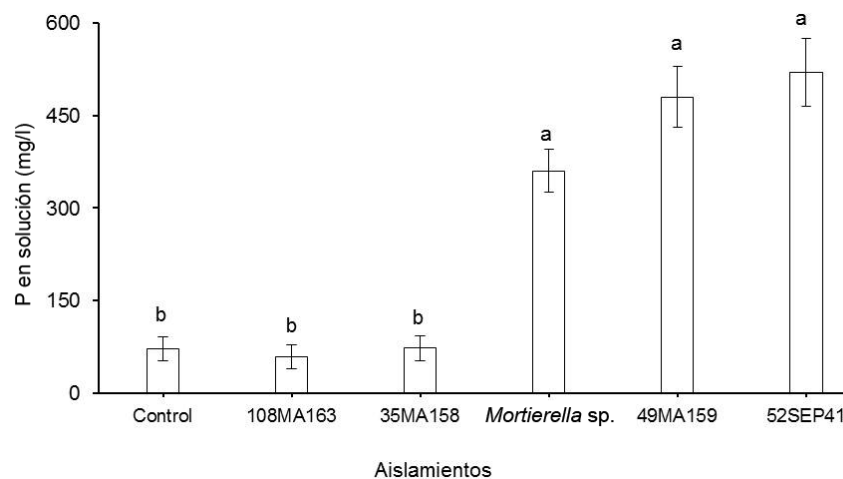
Los PSM tienen la capacidad de producir ácidos orgánicos que disuelven la roca fosfórica gracias al incremento en la liberación de protones hacia la solución del suelo y de esta forma aumentan la disponibilidad de P soluble para las plantas (Osorio, 2011; Singh y Reddy, 2011). Dicha situación ha sido encontrada en estudios de restauración ecológica en antiguas minas de roca fosfórica, en donde la interacción rizosférica de plantas y PSM ha conducido no sólo al cambio del pH de la solución del suelo y de las formas solubles de P para las plantas, sino también a un mayor conocimiento de los procesos de mineralización de este elemento en el suelo y de sus interacciones con diferentes fuentes de nitrógeno (Reyes et al., 2007). Recientemente en Colombia se realizó un estudio tendiente a evaluar la efectividad del hongo micorrízico arbuscular *Glomus fasciculatum* y del hongo solubilizador de P *Mortierella* sp. sobre la disponibilidad de este elemento y el crecimiento de plantas de caupí (*Vigna unguiculata*), con adición de tres niveles de roca fosfórica (0, 100 y 300 mg de P/kg suelo). El efecto del hongo micorrízico fue estadísticamente significativo para las variables de biomasa seca, diámetro medio, altura de la planta

y P foliar; mientras que la aplicación del hongo solubilizador representó un incremento significativo del P soluble en todos los tratamientos en los que se aplicó roca fosfórica, confirmando su efecto como PSM (Ramírez et al., 2013).

### Solubilización de fosfato orgánico

Se presentaron diferencias significativas en la concentración de P en el medio en función de la inoculación con los diferentes hongos evaluados (Figura 2). Los microorganismos que fueron más efectivos para incrementar la concentración de P en la solución, fueron aquellos identificados inicialmente como *Plectosphaerella* sp. (52SEP41) y *Penicillium* sp. (49MA159). Cabe mencionar que el hongo *Mortierella* sp., utilizado como control positivo, también fue efectivo para solubilizar fosfato a partir del fitato de sodio, tal como fue establecido por Ocampo et al. (2012). El aislamiento de *Aspergillus* sp. (108MA163) no fue efectivo en incrementar la concentración de P en la solución, a pesar de que diferentes especies de este género son ampliamente reconocidas como productoras de fitasas (Vats y Banerjee, 2004). Sin embargo, se observó que este aislamiento tuvo un notable crecimiento en el medio, lo cual indica posiblemente una solubilización parcial del fitato de Na y su absorción posterior para su propio crecimiento y desarrollo, sin que se acumularan cantidades detectables de P en solución. Ya que entre los miembros del género *Aspergillus* se presenta un gran nivel de variación con respecto a la expresión de fitasas y a su eficiencia sobre diferentes sustratos orgánicos (Ocampo et al., 2012), dicho hallazgo no resulta inesperado.

El P es un elemento limitante en el cultivo de vainilla (Domínguez, 2005) y su aporte a través de la descomposición de la hojarasca, si bien es bajo, es fundamental para la nutrición de este cultivo. Una de las alternativas de almacenamiento del fosfato en los tejidos orgánicos es en forma de fitato, el cual posteriormente es degradado por algunos microorganismos mediante la producción de fitasas (Raboy, 2003). Aunque los resultados de esta evaluación *in vitro* deben ser probados en campo, son bastante promisorios, especialmente si se consideran, en el futuro, materiales orgánicos, compostados ricos en fosfatos orgánicos como la pulpa de café, gallinaza, porcínaza, bovinaza, etc., cuyos contenidos



**Figura 2.** Concentración de P en solución en el medio inoculado con diferentes microorganismos aislados de la rizosfera de vainilla. La fuente de P utilizada fue fitato de sodio. Antioquia, Colombia, 2011. Letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de Duncan,  $P \leq 0,05$ ).

de P fluctúan entre 0,2 a 2% (Sadeghian, 2010). Recientemente Monsalve et al. (2012) encontraron que la pulpa de café compostada indujo un crecimiento de plántulas de vainilla significativamente superior al obtenido con otros materiales con concentraciones menores de P. El uso de este material y la inoculación con los hongos identificados en este estudio podría representar un importante mejoramiento de los sistemas de nutrición fosfórica de los cultivos de vainilla.

### Actividad celulolítica

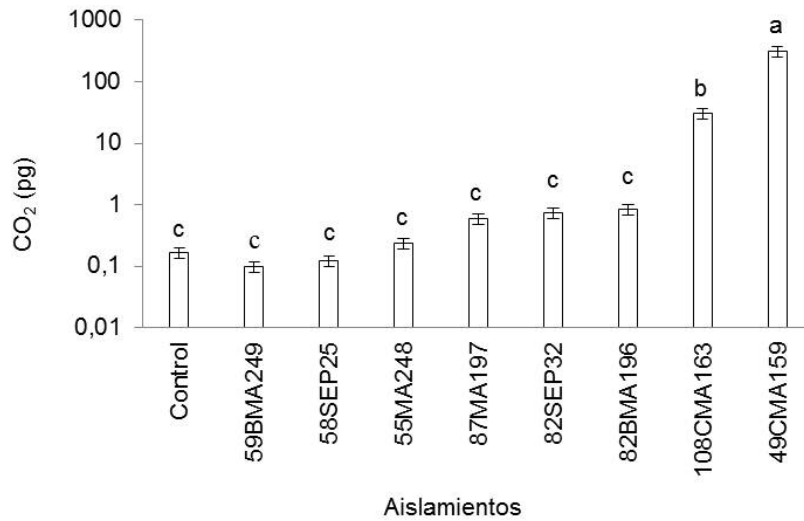
Se encontraron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) en la producción de  $\text{CO}_2$  en función de los microorganismos inoculados (Figura 3). El aislado 49MA159 (*Penicillium* sp.) fue el más efectivo degradador de celulosa seguido por el aislado 108MA163 (*Aspergillus* sp.). Diferentes especies de estos dos géneros se destacan entre los hongos más abundantes encontrados en el suelo, especialmente en ambientes ricos en materia orgánica (Atlas y Bartha, 1997).

Estos hongos son ampliamente conocidos por su capacidad de producir grandes cantidades de enzimas extracelulares (Webster y Weber, 2007) y, por tanto, no es sorprendente su alto desempeño en las pruebas

de actividad celulolítica realizadas. Por otra parte, los aislamientos 59BMA249, 58SEP25, 55MA248, 87MA197, 82SEP32 y 82BMA, resultaron poco efectivos para degradar celulosa (Figura 3).

La disponibilidad de azúcares libres en el suelo es un factor limitante para la actividad microbiana dada la fuerte competencia entre los microorganismos por este recurso. La degradación de celulosa es un proceso clave en la descomposición de materia orgánica, debido a que proporciona azúcares simples y energía fácilmente utilizable por los microorganismos (Atlas y Bartha, 1997). Esta alta disponibilidad de azúcares favorece la actividad de otros microorganismos responsables de cumplir con otras funciones como la solubilización de fósforo, la amonificación y la fijación de  $\text{N}_2$  (Uphoff et al., 2006). Adicionalmente, es importante destacar que los aislados 49MA159 y 108MA163, también exhibieron capacidad para solubilizar fósforo orgánico, lo cual les confiere una actividad sobresaliente en la rizosfera. Lo anterior, permite considerarlos como microorganismos promisorios para ser usados como biofertilizantes en cultivos de vainilla, más aún cuando existen reportes en otras orquídeas, de la formulación como bioinoculantes comerciales de aislamientos de las especies *P. bilaii* (Whitelaw, 2000) y *A. awamori* (Shashidhar et al., 2009).



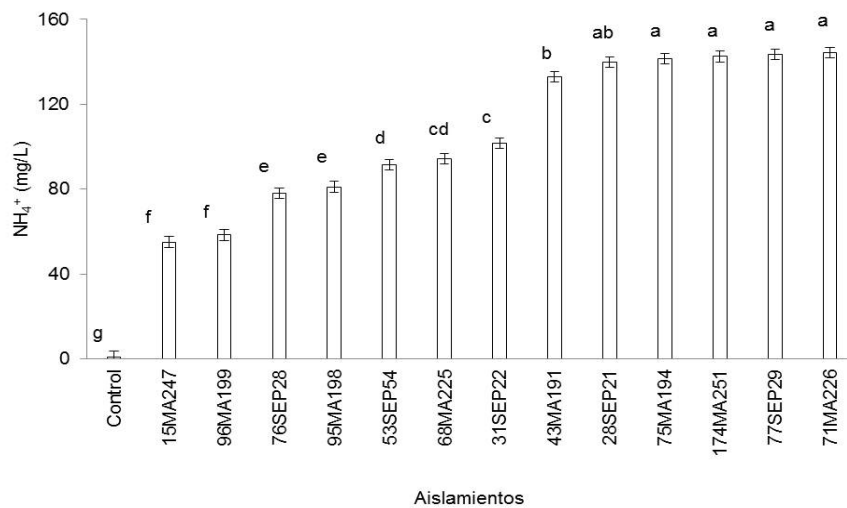


**Figura 3.** Producción de CO<sub>2</sub> como resultado de la inoculación de un medio con diferentes microorganismos aislados de la rizosfera de vainilla. La fuente de C fue carboximetil-celulosa. Antioquia, Colombia. 2011. Letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de Duncan, P<0,05).

**Proteolíticos/amonificantes**

La prueba *in vitro* utilizada para evaluar los microorganismos PROT, demostró que los aislados 71MA226, 77SEP29, 174MA251 y 75MA194 fueron

significativamente más eficientes para liberar amonio a partir de caseína (Figura 4). Los tres primeros aislados están filogenéticamente relacionados con el complejo *Bacillus cereus*, mientras que el último está relacionado con el género *Serratia* (Álvarez et



**Figura 4.** Concentración de amonio en el medio inoculado con diferentes microorganismos aislados de la rizosfera de vainilla. La fuente de N fue caseína. Antioquia, Colombia. 2011. Letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de Duncan, P<0,05).

al., 2012). Los demás microorganismos evaluados presentaron una capacidad intermedia de liberación de amonio a partir de la proteína (Figura 4).

En el suelo la amonificación es un proceso clave para mejorar la disponibilidad de nitrógeno. Los microorganismos proteolíticos son capaces de degradar proteínas extracelularmente, por lo tanto, participan en los procesos de mineralización del N proteínico de los residuos orgánicos (Robertson y Groffman, 2007); este grupo de microorganismos es importante porque inician el ciclaje del N en el suelo a partir de residuos orgánicos; además su actividad permite la liberación de aminoácidos y amonio que pueden ser utilizados directamente por las plantas o microorganismos del suelo, o en el proceso de nitrificación (Hofmockel et al., 2010).

En la rizosfera de vainilla, Osorio (2012) reportó los siguientes microorganismos con actividad amonificante: *Serratia* sp., *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus cereus*. Por otra parte, Anilkumar (2004) indica que los sustratos orgánicos donde se cultiva vainilla pueden ser inoculados con PGPR's como *P. fluorescens*; mientras que Naik et al. (2010), mencionaron que diferentes aislados de estas especies han sido utilizadas como antagonistas en el suelo de patógenos de este cultivo (*Fusarium* sp.).

Es de destacar que el aislamiento 75MA194 (*Serratia* sp.) no sólo presentó la capacidad como amonificante, sino también como solubilizador de fosfato inorgánico. La combinación de ambas actividades en este microorganismo es bastante atractiva para su potencial uso como biofertilizante, ya que ambos elementos (N y P) son usualmente limitantes del crecimiento vegetal. Sin embargo, a pesar de lo promisorio de esta bacteria, es necesario verificar su inocuidad y eficiencia en pruebas de campo, antes de ser utilizado como biofertilizante.

### Fijadores asimbióticos de N<sub>2</sub>

La utilización de los cebadores Rosch nifHF/Rb, permitió detectar la presencia del gen *nifH* en las tres bacterias originalmente aisladas en el medio selectivo para FBN (20SEP14, 21SEP15, 33MA221), e identificadas molecularmente como *Pseudomonas* sp. Las bacterias fijadoras de N<sub>2</sub> son uno de los grupos funcionales más importantes del suelo, estas contienen la enzima nitrogenasa que reduce el N<sub>2</sub> a amonio

(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), nutriente asimilable directamente por las plantas (Barea et al., 2005). Para que este proceso se realice las bacterias necesitan compuestos carbonáceos en la rizosfera, los cuales no siempre están disponibles debido a la alta demanda que existe en este ambiente (Zuberer, 1999). Debido a que algunas especies de *Pseudomonas*, como *P. stutzeri* y *P. azotifigens*, se han registrado entre las bacterias con capacidad para fijar N<sub>2</sub> (Desnoues et al., 2003; Hatayama et al., 2005), es predecible que los tres aislados de *Pseudomonas* seleccionados en el estudio dieran positivos en la detección por PCR del gen *nifH*.

Es bien conocido que las bacterias asimbióticas fijadoras de N<sub>2</sub> no son tan efectivas como las bacterias simbióticas (Zuberer, 1999), y por tanto, es posible que no satisfagan la totalidad de los requerimientos de N de las plantas. La importancia de estas bacterias para fijar N<sub>2</sub> en la rizosfera de vainilla, puede no ser significativa si además dentro del manejo de este nutriente también se suministran sustratos orgánicos ricos en N (vermicompost, compost, estiércol de animales y hojarasca de leguminosas), o si se aplican cantidades moderadas de fertilizantes nitrogenados. Sin embargo, es posible que el efecto positivo de estos microorganismos sea evidente si el sustrato de crecimiento presenta materiales orgánicos con relaciones C/N >30, es decir, pobres en fuentes nitrogenadas y con altos contenidos de polisacáridos estructurales, como los chips de madera, fibra de coco y residuos de cortezas de árboles, que son elementos comúnmente aplicados en nuestro medio al sustrato para el establecimiento de la vainilla (Moreno y Díez, 2011).

### Identificación de los aislamientos

La identidad de los microorganismos más eficientes en las pruebas bioquímicas de eficacia *in vitro* (Cuadro 3), fue confirmada a partir de su caracterización morfológica (hongos) y mediante series bioquímicas (bacterias).

#### *Pseudomonas koreensis*

Las pruebas de las series bioquímicas evaluadas y el API 20NE, confirmaron la identidad de las bacterias determinadas molecularmente por Álvarez et al. (2012), como miembros de la especie *P. koreensis*

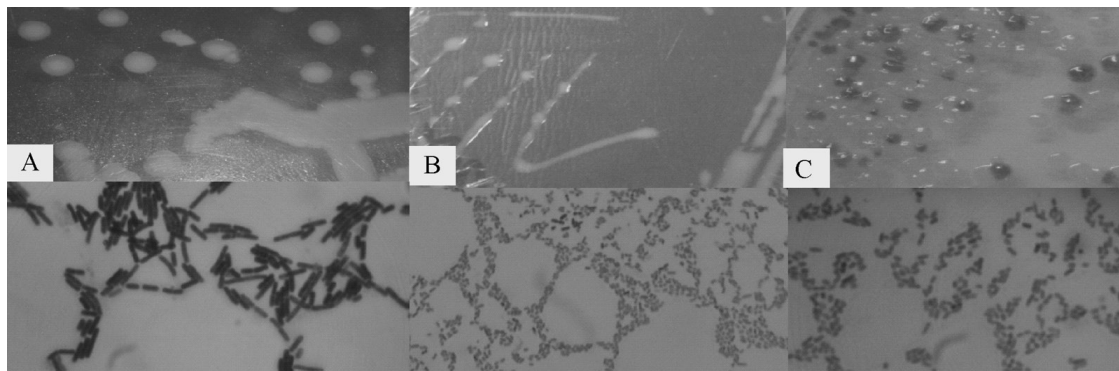
**Cuadro 3.** Microorganismos obtenidos de la rizosfera de plantas de vainilla que resultaron altamente eficientes en diferentes actividades funcionales evaluadas bajo condiciones *in vitro*. Antioquia, Colombia. 2011.

Grupo funcional	Aislamientos más eficientes
Solubilizadores de fosfato inorgánico	40MA190 ( <i>Pseudomonas koreensis</i> ), 75MA194 ( <i>Serratia</i> sp.)
Solubilizadores de fosfato orgánico	49MA159 ( <i>Penicillium griseofulvum</i> ), 52SEP41 ( <i>Plectosphaerella cucumerina</i> )
Degradadores de celulosa	108MA163 ( <i>Aspergillus fumigatus</i> ), 49MA159 ( <i>Penicillium griseofulvum</i> )
Proteolíticos/amonificantes	75MA194 ( <i>Serratia</i> sp.), 174MA251 (Complejo <i>Bacillus cereus</i> ), 77SEP29 (Complejo <i>Bacillus cereus</i> ), 71MA226 (Complejo <i>Bacillus cereus</i> )
Fijadores biológicos de Nitrógeno	20SEP14 ( <i>Pseudomonas koreensis</i> ), 21SEP15 ( <i>Pseudomonas koreensis</i> ), 33MA221 ( <i>Pseudomonas koreensis</i> )

(Kwon et al., 2003). Este género fue inicialmente definido como un taxón conformado por bacterias Gram negativas, con forma de bacilos móviles mediante flagelos polares y estrictamente aeróbicos. Estudios fenotípicos y genotípicos posteriores, delimitaron su extensión al incluir en su definición la reacción oxidasa positiva, la ausencia de endosporas y la presencia (en algunas especies) de sideróforos fluorescentes de color amarillo-verdoso (Anzai et al., 1997). Posteriormente, Anzai et al. (2000) al analizar las relaciones filogenéticas de un gran número de especies putativas de *Pseudomonas*, con base en secuencias 16S del ADNr, identificaron 57 especies y definieron a *P. aeruginosa* como la especie tipo del género.

En el presente estudio se identificó un alto número de aislamientos de la rizosfera de plantas de vainilla de la especie *P. koreensis*, los cuales presentaron una gran

versatilidad metabólica al ser aislados de pruebas de FBN, PROT, PSM, CEL y FIT (Figura 5). *P. koreensis* fue inicialmente registrada a partir de aislamientos de suelos agrícolas de Corea del Sur (Kwon et al., 2003); pero actualmente se ha registrado en diferentes países Europeos (Francia, Grecia, Portugal, etc.), Americanos (México, Argentina, EEUU) y Asiáticos (Japón y China). Consiste de bacilos Gram negativos con tamaños de  $1 \times 2 \mu\text{m}$  y móviles por sus múltiples flagelos polares. Sus colonias son circulares con colores blancos a amarillos en LB y con capacidad de producir pigmentos fluorescentes en el medio de cultivo *King B*. Esta bacteria es catalasa y oxidasa positiva, no hidroliza almidón, y no acidifica los medios de cultivo a partir de glucosa. No reduce nitrato a nitrito, produce lecitinasa y su utilización de la urea es variable. No produce indol a partir de triptófano y asimila glucosa, caprato, malato y citrato,



**Figura 5.** Colonias (arriba) y micromorfología (abajo) de bacterias aisladas de la rizosfera de plantas de vainilla en Colombia. (A) *Bacillus cereus*, (B) *Pseudomonas koreensis* y (C) *Serratia* sp. Antioquia, Colombia. 2011.

pero no maltosa, adipato, o fenilacetato (Kwon et al., 2003). Recientemente, se ha reportado que diferentes linajes de esta especie bacteriana tienen la capacidad de producir biosurfactantes del tipo lipopéptidos cíclicos, con actividad antimicrobiana frente a bacterias como *Exiguobacterium aurantiacum* y *Bacillus subtilis* (Toribio et al., 2011), y oomycetes fitopatógenos como *Pythium ultimum* y *Phytophthora infestans* (Hultberg et al., 2010). En este último caso, diferentes estudios han confirmado la utilidad de aplicaciones de extractos crudos de biosurfactantes producidos por *P. koreensis* sobre zoosporas de oomycetes de importancia agrícola, al inducir su lisis y, por tanto, disminuir el inóculo primario de estos patógenos en el suelo (Hultberg et al., 2010; Toribio et al., 2011). En adición, en dichos estudios se ha concluido que la utilización de biosurfactantes producidos por esta bacteria no afecta la microflora nativa de la rizosfera. Por esto, la detección de *P. koreensis* en este trabajo no solo representa un potencial como biofertilizante, sino también como agente de biocontrol fitosanitario de varias especies de *Phytophthora* reportadas atacando raíces y cuello de las plantas de vainilla (Bhai y Dhanesh, 2008).

#### *Serratia* sp.

El género *Serratia* (Enterobacteriaceae) está conformado por un grupo de bacterias anaeróbicas facultativas Gram negativas, con forma bacilar provista de flagelos. Estas bacterias producen ácido a partir de maltosa, manitol, salicina, trehalosa y presentan reacciones negativas para ureasa, H<sub>2</sub>S, β-glucuronidasa y no asimilan L-sorbosa, triptamina, histamina y glutarato, entre otras fuentes de carbono. Algunas especies de *Serratia* producen un pigmento rojo no difusible denominado prodigiosina (Figura 5). La especie tipo *S. marcescens* es la más prolífica en la producción de este pigmento, aunque algunos de sus biogrupos (A3, A4, A5/8) no lo generan (Grimont y Grimont, 2006). Los miembros del género *Serratia* comparten muchas de las características definidas para la familia Enterobacteriaceae, aunque claramente se pueden diferenciar de *Klebsiella* spp., *Enterobacter aerogenes* y *E. cloacae* por la producción de gelatinasa, lipasa, DNasa y su crecimiento, utilizando caprato o caprilato como única fuente de carbono. Ecológicamente, las especies de *Serratia* se

encuentran como habitantes de aguas, suelos, plantas y diferentes vertebrados, incluyendo humanos. *S. marcescens* es una reconocida especie nosocomial oportunista (Grimont y Grimont, 2006).

Con la información disponible no fue posible identificar inequívocamente las cepas de *Serratia* a nivel de especie, y por esto será necesario en el futuro ampliar el rango de pruebas bioquímicas, especialmente aquellas relacionadas con la asimilación de diferentes fuentes de carbono. Esto a pesar de que el análisis de secuencias 16S del ADNr realizado por Álvarez et al. (2012), arrojó un nivel de identidad de 1 con respecto a cepas reportadas en GenBank de *S. marcescens* (JF937055), pero también con cepas no identificadas a nivel de especie de *Serratia* (JN400353).

#### *Bacillus cereus*

En esta investigación se obtuvieron cinco aislamientos relacionados con el complejo de especies *B. cereus*, siendo confirmada su identidad como *B. cereus sensu stricto* con las pruebas de crecimiento en Agar Mossel. Las colonias presentaron color rosado, con un halo algodonoso relacionado con la producción de lecitinasa y sin capacidad de degradación de manitol; la determinación del tipo de hemólisis presentó un halo transparente en el crecimiento en medio Agar-sangre, características típicas de esta especie bacteriana (Logan y De Vos, 2009).

El género *Bacillus* (especie tipo: *Bacillus subtilis*) se caracteriza por bacterias con forma bacilar individuales, o agrupadas en pares o en cadenas (Figura 5). Generalmente forman endosporas (una por célula) que son altamente resistentes a condiciones adversas. Tienen reacción Gram positiva y movilidad por flagelos peritricos, aunque algunas especies no son móviles. El género incluye bacterias aeróbicas, anaeróbicas facultativas e incluso algunas especies son anaeróbicas estrictas. Generalmente, son catalasa positiva, pero la reacción oxidasa es variable. La mayoría de especies son habitantes del suelo o de ambientes que han sido contaminados directa o indirectamente; también se encuentran algunas especies en aguas, alimentos y en ambientes clínicos; estas últimas son consideradas patógenos débiles, con excepción de *B. anthracis*. Además, la especie *B. thuringiensis* es un patógeno de invertebrados, comúnmente utilizado en control

biológico de plagas agrícolas e insectos vectores de enfermedades. La especie tipo del género es *B. subtilis* (Logan y De Vos, 2009).

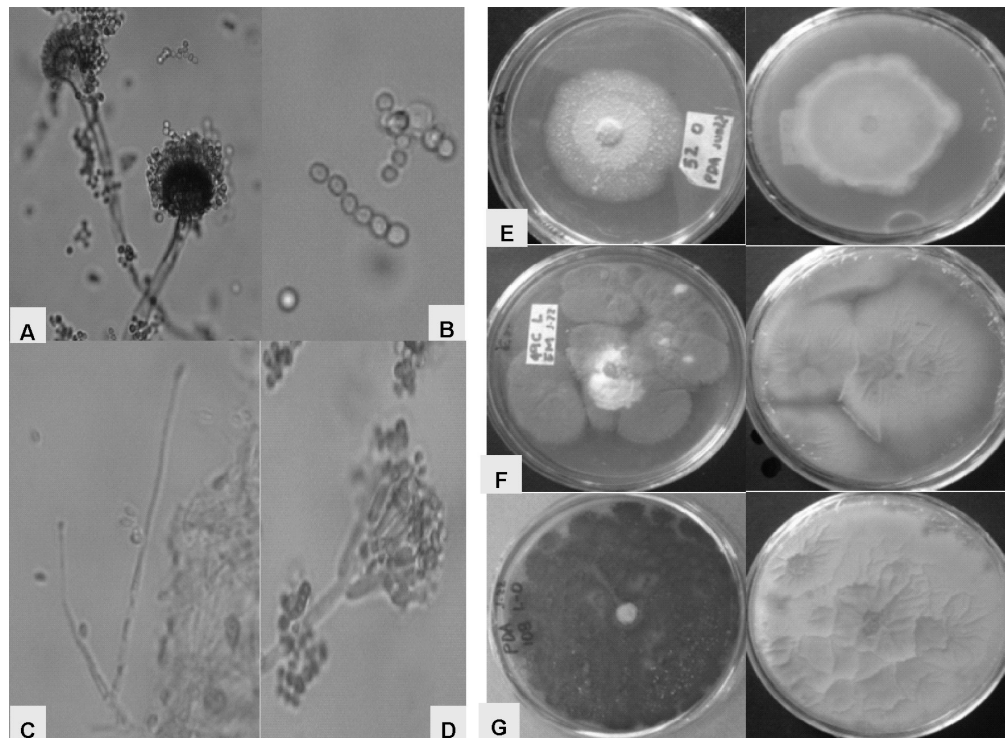
*B. cereus* interactúa con otros microorganismos en la rizosfera de algunas plantas; estas se benefician de su presencia debido a la capacidad que tiene de inhibir el ataque de algunos patógenos y de promover su crecimiento (Jensen et al., 2003). Naturalmente produce los antibióticos zwittermicina A y kanosamina que inhiben el crecimiento de patógenos de plantas, como oomicetes, algunos hongos y diferentes especies de bacterias (Silo-Suh et al., 1994).

#### *Aspergillus fumigatus*

Se identificó el aislamiento 108MA163 como perteneciente a la especie *A. fumigatus*. El aislamiento

presentaba múltiples conidióforos de 300  $\mu\text{m}$  de largo x 3-8  $\mu\text{m}$  de ancho, con pared lisa, de color café claro, sin tabiques ni ramificaciones. Al final de los conidióforos se presentan vesículas ensanchadas (20 a 30  $\mu\text{m}$  de diámetro), cubiertas parcialmente en su perímetro por esterigmas de 6-8  $\mu\text{m}$  y sin métulas visibles. Las conidias son unicelulares, redondas o subsféricas (2-3  $\mu\text{m}$  de diámetro) con colores verdosos y forman cadenas no ramificadas lateralmente. Las colonias presentan un crecimiento rápido, son compactas y blancas al comienzo, pero se tornan rápidamente a un color verde grisáceo, de aspecto aterciopelado. El dorso de las colonias al envejecer presenta tintes amarillos o pardos (Figura 6).

*A. fumigatus* es un hongo saprófito cosmopolita que juega un papel fundamental en los ciclos del carbono y nitrógeno en los suelos. Se ha considerado



**Figura 6.** **Izquierda.** Características micromorfológicas de los hongos aislados de la rizosfera de plantas de vainilla en Colombia. (A) *Aspergillus fumigatus* conidióforos y vesículas (800X), (B) conidias (1200X). (C) *Plectosphaerella cucumerina*, conidióforos y conidias individuales (1200X). (D) *Penicillium griseofulvum*, conidióforos con verticilios (1200X). **Derecha.** Aspecto de las colonias de los hongos (dorso y reverso). (E) *Plectosphaerella cucumerina*. (F) *Penicillium griseofulvum*. (G) *Aspergillus fumigatus*. Antioquia, Colombia. 2011.

como una especie extremadamente variable a nivel cultural y en su micromorfología, aunque es bastante homogénea, produce diferentes perfiles de extrolitos tales como esfingofunginas, espinulosina y ferricrocina (Frisvad y Samson, 2004).

#### *Penicillium griseofulvum*

El aislamiento 49MA159 fue identificado con base en sus características morfológicas como *P. griseofulvum*, este presentó las siguientes estructuras: conidióforos aéreos de longitud variable, paredes lisas y de colores verdosos (Figura 6), predominantemente cuadri-verticiladas, pero con algunas ramificaciones tri-verticiladas, métulas en verticilos de 2-4  $\mu\text{m}$ , y fiálides de 5 a 12  $\mu\text{m}$  de longitud. Las conidias son ovadas a subsféricas de 2 a 3,5  $\mu\text{m}$ , lisas e inicialmente catenuladas; las colonias se presentan densas con algunas zonas cubiertas de micelio blanco y con abundantes conidias de color verde a verde-grisáceo. Su reverso es de color amarilloso a naranja luego de siete días de cultivo (Figura 6).

*P. griseofulvum* es una especie del subgénero *Penicillium* y de la Serie *Urticicolae* en conjunto con *P. dipodomycicola*, este hongo es un saprófito ubicuo ampliamente reconocido por ser un contaminante frecuente de alimentos, especialmente de granos y cereales. Ambas especies pueden ser diferenciadas con base en las disposiciones de sus verticilos, con *P. dipodomycicola* se presentan estructuras bi y ocasionalmente tri-verticiladas, mientras que en *P. griseofulvum* son de tri- a cuadri-verticiladas. *P. griseofulvum* produce los extrolitos griseofulvina, ácido ciclopiazónico y patulina (Frisvad y Samson, 2004).

#### *Plectosphaerella cucumerina*

Los caracteres morfológicos encontrados en el aislado 52SEP41 conducen a plantear que pertenece a la especie *P. cucumerina*. Las características morfológicas observadas para el aislamiento fueron: micelio hialino, ramificado, septado que da origen a conidióforos solitarios o poco ramificados (Figura 6), con paredes lisas, que terminan en fiálides solitarias rectas, aunque algunas veces pueden aparecer sinuosas, más amplias en la base y gradualmente reduciendo su tamaño hacia el ápice, de 10 a 30  $\mu\text{m}$  de longitud. Sus

conidias son hialinas, lisas, aseptadas, agregándose en cabezas y con dimensiones de 5-8  $\times$  2-4  $\mu\text{m}$ . Este aislamiento no presentó clamidosporas, a pesar de que sus cultivos se revisaron después de tres meses de incubación. Las colonias se presentaron planas con micelio inmerso en el medio, inicialmente son de colores blancos, se tornan rosadas y ocre, luego de siete días; después de un mes de incubación, los cultivos presentaron surcos a lo largo de las colonias (Figura 6).

*P. cucumerina* es un hongo de amplia distribución mundial, aunque su nicho ecológico natural es netamente rizosférico; se ha reportado en una gran cantidad de hospedantes y sustratos, incluyendo lodos marinos (Palm et al., 1995). Recientemente, se han identificado aislamientos de esta especie como potenciales controladores biológicos de nematodos de los géneros *Meloidogyne* y *Globodera* (Atkins et al., 2003). Este hongo se presenta principalmente en el suelo en su forma anamórfica *Plectosporium*, un nuevo género introducido por Palm et al. (1995) para sustituir la antigua denominación de su estado imperfecto, *Fusarium tabacinum*. Diferentes estudios han encontrado una notable variación en las características morfológicas de *P. cucumerina*, por lo que se ha considerado como un complejo de especies; dichas variaciones incluyen diferencias en la proporción de conidias septadas, presencia o ausencia de clamidosporas y diferencias en la forma y dimensiones conidiales. Adicionalmente, se han encontrado cambios considerables en las secuencias ITS del ADNr de diferentes aislamientos.

Inicialmente *P. cucumerina* fue reportada como miembro de la familia Hypocreaceae (Barr, 1990), pero más recientemente, Zare et al. (2007) propusieron la familia Plectosphaerellaceae para acomodar los miembros de los géneros *Acrostalagmus*, *Gibellulopsis*, *Musicillium*, *Plectosphaerella* (como *Plectosporium*) y *Verticillium*.

En resumen, los resultados de esta investigación indican que la rizosfera de las plantas de vainilla contiene una comunidad microbial con alto potencial para aumentar la disponibilidad de nutrientes en plantaciones comerciales de este cultivo. Además, algunos de los microorganismos aislados podrían ser usados en el manejo de fitopatógenos, en este cultivo y en otros que presentan problemas similares. De esta forma se abre la posibilidad de continuar

con una nueva fase experimental de evaluación de formulaciones de algunos de los microorganismos descritos, bajo condiciones controladas de campo, con miras a su utilización futura como biofertilizantes o agentes de control biológico de los cultivos de vainilla en Colombia y otros países latinoamericanos.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se realizó con recursos del proyecto “Manejo integrado de la nutrición del cultivo de vainilla” (contrato 082-2008V6151-3701), financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia, la Universidad Nacional de Colombia, Bioandes C. I. Ltda. y la Corporación Autónoma Regional del Centro de Antioquia. Se agradece al Laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias, por su apoyo en la identificación bioquímica de los aislamientos bacteriales.

## LITERATURA CITADA

- Álvarez, C., M. Marín, M.C. Díez, y N.W. Osorio. 2012. Molecular identification of microorganisms associated to the rhizosphere of vanilla and their potential use as biofertilizers. *Acta Hort.* 964:107-114.
- Anilkumar, A.S. 2004. Vanilla cultivation: A profitable agribased enterprise. *Kerala Calling* 1:26-30.
- Anzai, Y., Y. Kodo, y H. Oyaizu. 1997. The phylogeny of the genera *Chryseomonas*, *Flavimonas*, and *Pseudomonas* supports synonymy of these three genera. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 47:249-251.
- Anzai, Y., H. Kim, J.Y. Park, H. Wakabayashi, y H. Oyaizu. 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:1563-1589.
- Atkins, S.D., I.M. Clark, D. Sosnowska, P.R. Hirsch, y B.R. Kerry. 2003. Detection and quantification of *Plectosphaerella cucumerina*, a potential biological control agent of potato cyst nematodes, by using conventional PCR, Real-Time PCR, Selective Media, and Baiting. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4788-4793.
- Atlas, R., y R. Bartha. 1997. *Microbial ecology*. Benjamin Cummings, NY, EEUU.
- Bar-Yosef, B., R.D. Rogers, J.H. Wolfram, y E. Richman. 1999. *Pseudomonas cepacia* mediated rock phosphate solubilization in kaolinite and montmorillonite suspensions. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 63:1703-1708.
- Barea, J.M., M.J. Pozo, R. Azcón, y C. Azcón-Aguilar. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 56:1761-1778.
- Barr, M.E. 1990. Prodrómulo to nonlichenized, pyrenomycetous members of class Hymenozomycetes. *Mycotaxon* 39(1):43-184.
- Bhai, S., y J. Dhanesh. 2008. Occurrence of fungal diseases in vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) in Kerala. *JOSAC* 17:140-148.
- Capuccino, J.G., y N. Sherman. 2007. *Microbiology: a laboratory manual*. 9<sup>th</sup> ed. Benjamin Cummings, NY, USA.
- Castro, B.G. 2008. Evaluación del cultivo y producción de vainilla en la zona de Papantla, Veracruz, México. Tesis PhD. Ecología y Manejo de Recursos Naturales, Instituto de Ecología, A.C. México.
- Chien, S.H., y L.L. Hammond. 1978. A comparison of various laboratory methods for predicting the agronomic potential of phosphate crops for direct application. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 42:935-939.
- Desnoues, N., M. Lin, X. Guo, L. Ma, R. Carreño-López, y C. Elmerich. 2003. Nitrogen fixation genetics and regulation in a *Pseudomonas stutzeri* strain associated with rice. *Microbiology* 149:2251-2262.
- Döbereiner, J., y J.M. Day. 1976. Associative simbiose in subtropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. En: W.E. Newton, y C.J. Nyman, editores, *Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation*, Washington State University Press, Pullman. p. 518-538.
- Domínguez, R. 2005. Crecimiento y niveles nutrimentales en *Vanilla planifolia*. Tesis M.Sc. en Ciencias, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, México.
- Frisvad, J.C., y R.A. Samson. 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their myco-toxins. *Stud. Mycol.* 49:1-173.
- Grimont, F., y P.A.D. Grimont. 2006. The genus *Serratia*. En: M. Dworkin, editor, *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria*. 3<sup>rd</sup> ed. Springer, New York, EEUU.
- Hatayama, K., S. Kawai, H. Shoun, Y. Ueda, y A. Nakamura. 2005. *Pseudomonas azotifigens* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium isolated from a compost pile. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:1539-1544.

- He, X.H. 2007. Biocontrol of root rot disease in *Vanilla*. Tesis Ph.D., University of Wolverhampton, Reino Unido.
- Hofmockel, K.S., N. Fierer, B.J. Colman, y R.B. Jackson. 2010. Amino acid abundance and proteolytic potential in North American soils. *Oecol.* 163:1069-1078.
- Hopkins, D.W. 2007. Carbon mineralization. En: M.R. Carter, y E.G. Gregorich, editores, *Soil sampling and methods of analysis*. 2<sup>nd</sup> ed. CRC Press, Ontario, Canadá.
- Hultberg, M., T. Alsberg, S. Khalil, y B. Alsanius. 2010. Suppression of disease in tomato infected by *Pythium ultimum* with a biosurfactant produced by *Pseudomonas koreensis*. *BioControl* 55:435-444.
- Jensen, G., B. Hansen, J. Eilenberg, y J. Mahillon. 2003. The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environ. Microbiol.* 5:631-640.
- Kwon, S.W., J.S. Kim, ICh. Park, S.H. Yoon, D.H. Park, Ch.K. Lim, y S.J. Go. 2003. *Pseudomonas koreensis* sp. nov., *Pseudomonas umsongensis* sp. nov. and *Pseudomonas jinjuensis* sp. nov., novel species from farm soils in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:21-27.
- Ledezma, E., G. Ramírez, y N. Pino-Benítez. 2006. Forest orchids of the Choco region. *Lyonia* 10(1):17-31.
- Logan, N.A., y P. de Vos. 2009. Genus I. *Bacillus*. En: P. de Vos et al., editores, *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer Science, NY, USA. p. 21-108.
- Matsumoto, L.S., A.M. Martines, M.A. Avanzi, U.B. Albino, C.B. Brasil, D.P. Saridakis, L.G.L. Rampazo, W. Zangaro, y G. Andrade, G. 2005. Interactions among functional groups in the cycling of, carbon, nitrogen and phosphorus in the rhizosphere of three successional species of tropical woody trees. *Appl. Soil Ecol.* 28(1):57-65.
- Misas, G. 2005. Orquídeas de la Serranía del Baudó. Editorial Chocó, Colombia.
- Monsalve, A., A. Osorio, y F.H. Moreno. 2012. Efecto de sustratos orgánicos compostados o frescos sobre el desarrollo de plántulas de vainilla. Trabajo de investigación, Universidad Nacional de Colombia, Medellín.
- Moreno, F., y M. Díez. 2011. Cultivo de vainilla. Contribuciones para el desarrollo de su cadena productiva en Colombia. Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.
- Murphy, J., y J.P. Riley. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 27:31-35.
- Murthy, G., K. Umsha, G.R. Smitha, y R. Krishnamanohar. 2010. Effect of growth regulators and bio-inoculants on rooting and growth of vanilla stem cuttings. *Indian J. Hort.* 67:90-93.
- Naik, G., B. Saifulla, R. Nagaraja, y M.K. Basavaraja. 2010. Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vanillae*, the causal agent of stem rot of *Vanilla in vitro*. *IJSN* 1:259-261.
- Ocampo, B.M., L.F. Patiño, M.A. Marín, M. Salazar, y P. Gutiérrez. 2012. Isolation and characterization of potential phytase-producing fungi from environmental samples of Antioquia (Colombia). *Rev. Fac. Nac.Agr. Medellín* 65:6291-6303.
- Osorio, N.W. 2011. Effectiveness of phosphate solubilizing microorganisms in increasing plant phosphate uptake and growth in tropical soils. En: D.K. Maheshwari, editor, *Bacteria in agrobiología: plant nutrient management (Volume III)*. Springer-Verlag, Berlin, Alemania. p. 65-80.
- Osorio, A. 2012. Efecto de materiales orgánicos, fertilizantes e inóculos microbiales sobre el crecimiento y nutrición de plántulas de vainilla. Tesis de Maestría en Bosques y Conservación Ambiental, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.
- Osorio, N.W., y M. Habte. 2001. Synergistic influence of an arbuscular mycorrhizal fungus and P solubilizing fungus on growth and plant P uptake of *Leucaena leucocephala* in an Oxisol. *Arid Land Res. Manag.* 15:263-274.
- Palm, M.E., W. Gams, y H. Nirenberg. 1995. *Plectosporium*, a new genus for *Fusarium tabacinum*, the anamorph of *Plectospharella cucumerina*. *Mycologia* 87:397-406.
- Raboy, V. 2003. myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. *Phytochemistry* 64:1033-1043.
- Ramírez, J.G., L. Osorno, N. Osorio, y J. Morales. 2013. Alternativas microbiológicas para mejorar el crecimiento del caupí. *Rev. Fac. Nac. Agr. Medellín* 66:7035-7044.
- Reyes, I., A. Valery, y Z. Valduz. 2007. Phosphate-solubilizing microorganisms isolated from rhizospheric and bulk soils of colonizer plants at an abandoned rock phosphate mine. En: E. Velásquez, y C. Rodríguez-Barrueco, editores, *Developments in plant and soil sciences (Volumen 102)*. Springer, Amsterdam, Holanda. p. 69-75.
- Robertson, G.P., y P.M. Groffman. 2007. Nitrogen transformations. En: E.A. Paul, editor, *Soil microbiology, ecology and Biochemistry*. Elsevier, Amsterdam, Holanda. p. 341-364.



- Rösch, C., y H. Bothe. 2005. Improved assessment of denitrifying, N<sub>2</sub>-fixing, and total-community bacteria by terminal restriction fragment length polymorphism analysis using multiple restriction enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:2026-2035.
- Sadeghian, S. 2010. La materia orgánica: componente esencial en la sostenibilidad de los agroecosistemas cafeteros. Cenicafé, Chinchiná, Colombia.
- Shashidhar, K.R., T.K. Narayanaswamy, R.N. Bhaskar, B.R. Jagadish, M. Mahesh, y K.S. Krishna. 2009. Influence of organic based nutrients on soil health and mulberry (*Morus indica* L.) production. *J. Biol. Sci.* 1:94-100.
- Silo-Suh, L., B. Lethbridge, S.J. Raffel, H. He, J. Clardy, y J. Handelsman. 1994. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2023-2030.
- Singh, H., y M. Reddy. 2011. Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. *Eur. J. Soil Biol.* 47(1):30-34.
- Soto-Arenas, M.A. 2006. La vainilla: retos y perspectiva de su cultivo. *Biodiversitas* 66:1-9.
- Surendra, G.K., S.K. Mathew, y P.A. Nazeem. 2009. Development of plant growth promoting microorganisms consortia technology for *ex vitro* establishment of micropropagated vanilla (*Vanilla planifolia* Andr.) and ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). <http://www.kauhort.in> (Consultado 20 mar. 2011)
- Tabatabai, M.A. 1982. Soil enzymes. En: A.L. Page, R.H. Miller, y D.R. Kineey, editores, *Methods of soil analysis. Chemical and microbiological properties.* ASA-SSSA, Madison, EEUU. p. 903-947.
- Tate, K.R., D.J. Ross, B.J. O'Brien, y F.M. Kelliher. 1993. Carbon storage and turnover, and respiratory activity, in the litter and soil of an old-growth southern beech (nothofagus) forest. *Soil Biol. Biochem.* 25:1601-1612.
- Toribio, J., A.E. Escalante, J. Caballero-Mellado, A. González-González, S. Zavala, V. Souza, y G. Soberón-Chávez. 2011. Characterization of a novel biosurfactant producing *Pseudomonas koreensis* lineage that is endemic to Cuatro Ciénegas Basin. *Syst. Appl. Microbiol.* 34:531-535.
- Tsavkelova, E.A., T.A. Cherdyntseva, S.Y. Klimova, A.I. Shestakov, S.G. Botina, y A.I. Netrusov. 2007. Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin. *Arch. Microbiol.* 188:655-664.
- Uphoff, N., A.S. Ball, E.C.M. Fernandes, H. Herren, O. Husson, Ch. Palm, J. Pretty, N. Sanginga, y J.E. Thies. 2006. Understanding the functioning and management of soil systems. En: N. Uphoff, editor, *Biological approaches to sustainable soil systems.* Taylor and Francis, Boca Raton, USA. p. 3-14.
- Vats, P., y U.C. Banerjee. 2004. Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. *Enzyme Microb. Tech.* 35:3-14.
- Webster, J., y R. Weber. 2007. *Introduction to fungi.* Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido.
- Whitelaw, M.A. 2000. Growth Promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Adv. Agron.* 69:99-151.
- Wilkinson, K.G., K. Sivasithamparam, K.W. Dixon, P.C. Fahy, y J.K. Bradley. 1994. Identification and characterisation of bacteria associated with Western Australian orchids. *Soil Biol. Biochem.* 26:137-142.
- Wood, P.J. 1980. Specify in the interactions of direct dyes with polysaccharides. *Carbohydr. Res.* 85:271-287.
- Zare, R., W. Gams, M. Starink-Willemse, y R.C. Summerbell. 2007. *Gibellulopsis*, a suitable genus for *Verticillium nigrescens*, and *Musicillium*, a new genus for *V. theobromae*. *Nova Hedwigia* 85:463-489.
- Zuberer, D.A. 1999. Biological dinitrogen fixation: introduction and non-symbiotic. En: D. Sylvia et al., editores, *Principles and applications of soil microbiology.* Prentice Hall, New Jersey, USA. p. 295-321.

