



Revista Colombiana de Biotecnología

ISSN: 0123-3475

revcbib_bog@unal.edu.co

Universidad Nacional de Colombia

Colombia

Prieto-Correal, Gloria Carolina; Prada-Salcedo, Luis Daniel; Cuervo Patiño, Claudia
Liliana; Franco- Correa, Marcela

Evaluación de la producción de ácidos orgánicos por *Streptomyces* spp. y solubilización
de tres fuentes de fósforo por la cepa T3A

Revista Colombiana de Biotecnología, vol. XVII, núm. 1, junio, 2015, pp. 111-1121

Universidad Nacional de Colombia

Bogotá, Colombia

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77639196014>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Evaluación de la producción de ácidos orgánicos por *Streptomyces* spp. y solubilización de tres fuentes de fósforo por la cepa T3A

Evaluation of organic acid production by *Streptomyces* spp. and solubilization of three phosphorus sources by strain T3A

Gloria Carolina Prieto-Correal^{*}, Luis Daniel Prada-Salcedo^{**},
Claudia Liliana Cuervo Patiño^{***}, Marcela Franco- Correa^{****}

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.41667

Resumen

Quince aislamientos de actinobacterias solubilizadoras de fósforo obtenidas a partir de suelos de los andes orientales colombianos fueron identificadas por sus características morfológicas y por la secuenciación del gen 16S ADN. El análisis BLASTN de las 15 secuencias obtenidas mostró que los aislamientos pertenecían al género *Streptomyces*. Paralelamente, los aislamientos fueron sometidos a la detección de ácidos orgánicos, durante el proceso de solubilización de fósforo con la presencia mayoritaria de los ácidos oxálico, cítrico y glucónico. Dentro de las cepas evaluadas *Streptomyces* sp. T3A fue seleccionada para ser evaluada bajo diferentes fuentes de fósforo inorgánico debido a los resultados de evaluaciones cualitativas y cuantitativas realizadas previamente, en las cuales mostró una actividad solubilizadora de fósforo significativamente alta. Los resultados evidenciaron la capacidad de ésta actinobacteria para solubilizar diferentes fuentes de fosfatos insolubles con valores de 122 mgP·L⁻¹ para Ca₃(PO₄)₂, 14 mgP·L⁻¹ para AlPO₄ y 19,6 mgP·L⁻¹ para roca fosfórica. También los ensayos revelaron que la actividad se mantiene en un rango de pH de 5 a 8 con las mismas fuentes de fosfatos evaluadas. Los resultados presentados contribuyen al avance en la caracterización de estas bacterias como promotoras de crecimiento vegetal con el fin de presentarlos como un recurso clave a nivel de biotecnología agrícola.

Palabras clave: *Streptomyces*, Solubilización de fósforo, ácidos orgánicos, actinobacteria, HPLC.

Abstract

Fifteen isolates of Eastern Cordillera of the Colombian Andes were identified by morphological characteristics and 16S rDNA gene sequence. The BLAST analysis of 15 sequences shows that isolates belong to *Streptomyces*. Also we detected the organic acids in the solubilization process mainly oxalic acid, citric acid and gluconic acid. *Streptomyces* sp. (T3A) was selected in preliminary qualitative and quantitative assays by the high phosphorus solubilizing activity; in this work we evaluate this strain with different forms of inorganic phosphate. The results evidenced the capacity of this actinobacteria to solubilize phosphorous showed 122 mgP·L⁻¹ Ca₃(PO₄)₂, 14 mgP·L⁻¹ AlPO₄ and 19,6 mgP·L⁻¹ for rock phosphate. Also the assays revealed that the activity was maintained between a pH range of 5 to 8 with the same sources of insoluble phosphates evaluated. These results contribute to characterize these strains as plant growth promotion bacteria and as key source in agricultural biotech.

Key words: *Streptomyces*, phosphate solubilization, organic acids, actinobacteria, HPLC.

Recibido: octubre 10 de 2014

Aprobado: abril 28 de 2015

* Microbióloga Industrial, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. g.prieto@javeriana.edu.co

** Microbiólogo Industrial, M.Sc. en Microbiología, Facultad de Ciencias, Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. lprada@javeriana.edu.co

*** Bióloga, Ph.D. en Ciencias Biológicas, Docente Facultad de Ciencias, Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. claudia.cuervo@javeriana.edu.co

**** Microbióloga, Ph.D. en Biología Agraria, Docente Facultad de Ciencias, Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. franco@javeriana.edu.co

El aporte a este trabajo fue realizado de igual manera.

Introducción

El fósforo es uno de los tres macronutrientes esenciales, componente clave de moléculas como ácidos nucleicos, fosfolípidos y ATP, adicionalmente forma parte de la mayoría de los procesos fisiológicos de los organismos; sin embargo, en la nutrición vegetal es un elemento que limita el crecimiento de las plantas debido a que se encuentra en formas poco disponibles para estas (White y Hammond, 2008; Boschetti et al., 2003).

Colombia, al ser un país agrícola requiere técnicas novedosas que eleven en forma considerable la productividad y disminuyan el uso intensivo de fertilizantes químicos que suplen la cantidad de nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo de las plantas. En el caso del fósforo, se reportan deficiencias hasta del 98% de fósforo para las plantas, consecuentemente, una gran porción de los fosfatos inorgánicos aplicados como fertilizantes son inaccesibles para la planta debido a la rápida formación de complejos insolubles a causa de los diferentes tipos de suelo Andisol, Inceptisol, Mollisol, Oxisol, Ultisol y Vertisol caracterizados por pH bajos y una alta fijación de P (Galvis, 2001; Sierra, 2002; Rao et al., 2004; Vyas et al., 2007; Oberson et al., 2011; Reed et al., 2011; Botiva, 2012). Por tal motivo la práctica común en el país es la adición de abonos o fertilizantes químicos u orgánicos, suplementados con enmiendas fosfóricas, con el objetivo de compensar las deficiencias de este elemento (Burbano y Silva, 2010). La producción tradicional de fertilizantes químicos fosforados incluye tratamientos con efectos negativos al medio ambiente, como consecuencia de la extracción de fosfatos con ácidos a altas temperaturas y, paralelo a esto, con las aplicaciones de los fertilizantes químicos, se observan procesos de eutrofización y erosión (Vassilev y Vassileva, 2003; Son et al., 2006; Hamdali et al., 2008a; 2008b; 2008c).

Colombia tiene el 14% de la biodiversidad mundial y presenta el mayor número de especies/área del planeta, lo que sugiere que esa diversidad en fauna y flora pudiera estar representada también en los suelos colombianos a nivel microbiológico (Ghazanfar et al., 2010). Lo anterior permite proponer el uso de este tipo de organismos como biofertilizantes, tecnología acorde con el medio ambiente para contribuir a solucionar las deficiencias de este elemento en suelos de uso agrícola (Rodríguez y Fraga, 1999; Vassilev et al., 2006; Vyas et al., 2007; Xiao et al., 2008; Bhattacharyya y Jha, 2012). Por lo cual el presente estudio evaluó la solubilización de fósforo *in vitro* de *Streptomyces* sp. bajo tres fuentes de fósforo insoluble, diferentes condiciones de pH inicial e identificó los ácidos orgánicos involucrados en el proceso de solubilización presentados por estos aislamientos.

Materiales y métodos

Identificación de los aislamientos

15 aislamientos de actinobacterias fueron valoradas en este estudio, los aislamientos fueron seleccionados previamente de suelos en los andes orientales colombianos por sus características fenotípicas y la capacidad solubilizadora de fosfatos según lo descrito por Salcedo (2014). Los aislamientos fueron obtenidos a partir de rizosfera de plantas nativas y purificados en medio avena suplementado con nistatina (0.1% v/v), La identificación se basó en sus características morfológicas y en la secuenciación del gen 16S ADNr.

El ADN se obtuvo según el procedimiento descrito por Kumar et al. (2010), con algunas modificaciones. La extracción del ADN se realizó a partir de un inóculo de biomasa de cultivo puro homogenizado en 15 ml de TE 1X (Tris 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8). 500 µl de la biomasa fueron lisados por adición de lisozioma (20 mg·ml⁻¹) e incubados a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, se adicionó SDS al 1% (p/v) y proteinasa K (0.1 mg·ml⁻¹) e incubó nuevamente a 55°C por 30 minutos. Luego de la lisis celular el ADN fue extraído por la adición de igual volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), procedimiento realizado dos veces; posteriormente se realizó un lavado con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) (v/v). La precipitación se llevó a cabo con el doble de volumen de etanol puro. Finalmente, la madeja de ADN obtenida se lavó con etanol al 70 % (v/v) y se resuspendió en 50 µl de H₂O destilada grado molecular.

Los fragmentos de ADN del gen 16S ADNr fueron amplificados por PCR a partir de la extracción de ADN acorde al método modificado de Kumar et al. (2010). Haciendo uso de los oligonucleótidos fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y rP2 (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') reportados por Weisburg et al. (1991) se realizó la amplificación. La reacción se llevó en volumen final de 25 µL conteniendo aproximadamente 150 ng de ADN genómico, 1X de buffer de reacción (10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTPs, 20 pMol de cada oligonucleótido y 2,6 unidades de la Taq ADN polimerasa "expand high fidelity enzyme" (Roche®). El perfil de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos: a 95°C por 45 segundos, 58°C por 45 segundos y 72°C por 2 minutos. Finalmente una extensión a 72°C por 10 minutos.

Identificación de los ácidos orgánicos por HPLC

La detección de ácidos orgánicos fue realizada por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en un Prominence LC20AT Shimadzu® con detector de arreglo de diodos SPD-M20A y horno de columna CTO-20A. La separación se realizó en forma isocrática en una co-

lumna Phenomenex de referencia Rezex™ (250 x 4,6 mm, 8 µm ROA-Organic Acid H+ (8%), modo de separación por exclusión iónica) empleando como fase móvil H₂SO₄ (0,01 N) a una velocidad de flujo de 0,2 mL·min⁻¹ y temperatura de 30°C. La detección se realizó a una longitud de onda de 210 nm y el volumen de inyección de los patrones y muestras fue de 20 µL. La identificación de los ácidos orgánicos producidos por las actinobacterias, se llevó a cabo por comparación de los tiempos de retención de estándares de ácidos orgánicos con los tiempos de retención de los picos del cromatograma de cada muestra, proveniente de filtrados de las fermentaciones cuya biomasa había sido eliminada previamente.

Microorganismos y cultivo

La actividad solubilizadora de fosfatos fue evaluada en curvas de crecimiento bajo diferentes fuentes de fósforo inorgánico. El aislamiento, tamizaje, identificación morfológica de las actinobacterias y su selección como mejor aislamiento solubilizador de fósforo se realizó según lo reportado por Salcedo (2014). El aislamiento *Streptomyces* sp. T3A presentó una alta eficiencia para solubilizar fosfatos a partir de Ca₃(PO₄)₂ y AlPO₄ con valores de 500 µg/ml y 25 µg/ml respectivamente hecho que lo convirtió en un candidato interesante para una caracterización más detallada.

Evaluación de *Streptomyces* sp. T3A bajo diferentes fuentes de fósforo inorgánico

Para evaluar la actividad de solubilización de fósforo de *Streptomyces* sp. T3A con múltiples fuentes de fosfato inorgánicos (Ca₃(PO₄)₂, AlPO₄ y roca fosfórica), se preparó un inóculo de 10 ml (10% del VET, concentración 1 x 10⁷ células·ml⁻¹) que fue adicionado a 90 ml de medio NBRIP suplementado con cada fuente de fósforo insoluble y se llevó a incubación a 23°C y 120 rpm, por 7 días. Se tomaron muestras cada 24 horas durante el cultivo, para cada muestra se evaluó la producción de biomasa por peso seco; A partir de la fermentación líquida se tomó el volumen total de cultivo (100 ml). Este volumen de cada medio de cultivo con las diferentes fuentes de fósforo se sometió a centrifugación por 15 minutos a 5.000 rpm. El sobrenadante fue separado y se realizaron tres lavados con solución salina (0.85%), el sobrenadante fue descartando y finalmente se llevaron a un horno a 60°C por tres días, registrando el peso de los tubos cada 24 horas hasta peso seco constante. El consumo de sustrato se determinó por el método de DNS, fósforo soluble liberado por el método de fosfomolibdeno a través del test SPECTROQUANT de Merck® y el pH fue medido con potenciómetro (Miller, 1959; Murphy y Riley, 1962; Ramírez y Coha, 2003).

Evaluación de *Streptomyces* sp. T3A bajo diferentes condiciones de pH

El inóculo correspondiente a *Streptomyces* sp. T3A fue adicionado a 20 mL de medio NBRIP suplementado con fosfato tricálcico, fosfato de aluminio y roca fosfórica como fuente de fósforo insoluble, evaluando un pH inicial de 4, 5, 6 y 8 para cada uno de los tratamientos a evaluar. Para cada muestra la cantidad de fósforo soluble liberado fue determinada mediante el método de fosfomolibdeno a través del test SPECTROQUANT de Merck® (Murphy y Riley, 1962).

Análisis estadísticos

Todos los experimentos fueron realizados con cuatro repeticiones. Los datos fueron analizados por ANOVA y test de Duncan para determinar diferencias significativas entre grupos < 0,05. Todos los análisis estadísticos fueron realizados en el programa SPS 11,0 para software de Windows®.

Resultados

Identificación molecular de actinobacterias

El Análisis BLASTN de las 15 secuencias obtenidas mostró que los aislamientos correspondían al género *Streptomyces* sp., la tabla 1 presenta los resultados de identificación molecular y caracterización morfológica de las cepas evaluadas.

Identificación de los ácidos orgánicos producidos por los aislamientos de *Streptomyces* spp.

Las cepas evaluadas fueron sometidas a la detección de ácidos orgánicos por medio de la comparación con estándares comerciales. En la figura 1 se observan los estándares comerciales de ácidos usados y la presencia de ácidos orgánicos en las muestras evaluadas al finalizar el tiempo de fermentación para el caso particular de *Streptomyces* sp. T3A. En algunos casos fue posible evidenciar la presencia de compuestos desconocidos en los extractos, probablemente ácidos que no estaban dentro de los estándares usados (figura 1).

Se identificaron los ácidos oxálico, cítrico y glucónico como los más predominantes, también fue posible observar que la intensidad de las señales eran diferentes en los cromatogramas con las diferentes fuentes de fósforo inorgánico, por lo cual se puede deducir que las concentraciones y el tipo de ácidos orgánicos producidas por las actinobacterias también varían con la fuente de fósforo a la que se expuso el microorganismo, la tabla 2 presenta de manera detallada los resultados de los aislamientos de todas las localidades estudiadas.

Tabla 1. Identificación molecular y caracterización morfológica de los aislamientos evaluados.

Aislamiento	Número acceso GenBank	% Identidad en Blast	Género	Macroscopía	Microscopía
T1B	JX312298.1	99	<i>Streptomyces</i>	Colonias blancas puntiformes pulverulentas de color blanco	Filamentos de formación tortuosa, con cadenas de conidios
T1C	JX312308.1	99	<i>Streptomyces</i>	Colonias pequeñas secas, con coloración café	Micelio no tortuoso, con ramificaciones verticiladas
T3A	JX312299.1	100	<i>Streptomyces</i>	Colonias secas pulverulentas de color verde-grisáceo	Filamentos fragmentados y alta cantidad de conidios
T3B	JX312300.1	99	<i>Streptomyces</i>	Colonias blancas que se tornan de color gris	Formaciones en espiral y presencia de conidios redondos
T3C	JX312301.1	99	<i>Streptomyces</i>	Colonias de coloración oscura verde-grisácea	Filamentos fragmentados con baja producción de conidios
T3D	JX312302.1	99	<i>Streptomyces</i>	Colonias blancas con leve color gris	Filamentos simples y conidios ovalados.
P2R	JX312312.1	99	<i>Streptomyces</i>	Colonias grises, pulverulentas, de color amarillo pálido	Micelio aéreo fragmentado, conidios ovalados en cadena.
P3E	JX312307.1	99	<i>Streptomyces</i>	Colonia color café oscuro con conidiación de color blanco, reverso café	Micelio aéreo, conidios redondos
F1A	JX312309.1	99	<i>Streptomyces</i>	Colonias color crema grisáceo, pigmento difusible anaranjado oscuro	Micelio fragmentado, presenta conidios ovalados en cadena corta,
F2A	JX312304.1	100	<i>Streptomyces</i>	Colonias gris, color reverso marrón grisáceo	Micelio con espirales y gran cantidad de conidios
F2C	JX312305.1	100	<i>Streptomyces</i>	Colonias amarillas crema reverso marrón. Pigmento difusible al medio color marrón claro	Micelio levemente tortuoso y conidios organizados en cadenas cortas.
L4C	JX312317.1	99	<i>Streptomyces</i>	Colonia de color gris claro y reverso negro	Filamentos largos, fragmentados de micelio tortuoso y con conidios esféricos
V1B	JX312313.1	99	<i>Streptomyces</i>	Colonias de color azul verdoso con el tiempo de color plata, reverso crema	Micelio fragmentado y cadenas largas de conidios con forma esféricas
V1E	JX312314.1	100	<i>Streptomyces</i>	Colonias de color rosado con borde blanco, de color crema al reverso	Micelio no tortuoso y escaso, con cadenas largas de conidios ovalados.
V2B	JX312306.1	100	<i>Streptomyces</i>	Colonias rosadas de borde blanco	Filamentos largos de micelio sencillo, con cadenas cortas de conidios esféricos

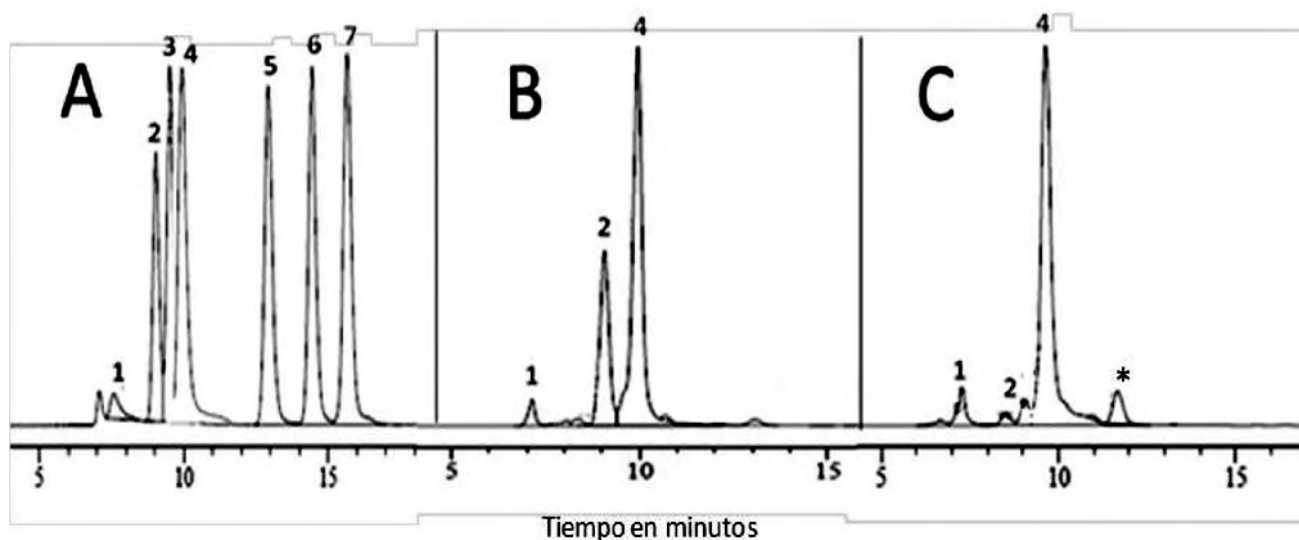


Figura 1. (A) Perfil cromatográfico para los estándares de ácidos orgánicos: 1. Ácido oxálico (7,15 minutos), 2. Ácido cítrico (9,02 minutos) 3. Ácido tartárico (9,49 minutos), 4. Ácido glucónico (9,62 minutos), 5. Ácido succínico (12,94 minutos), 6. Ácido fórmico (14,45 minutos), 7. Ácido acético (15,71 minutos). * desconocido. (B) Cromatograma de *Streptomyces* sp. (T3A) con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5 g · L⁻¹ como fuente de fósforo. (C) Cromatograma de *Streptomyces* sp. (T3A) con AlPO_4 1 g · L⁻¹ como fuente de fósforo.

Tabla 2. Ácidos orgánicos liberados por los aislamientos en los ensayos de fermentación con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y AlPO_4 .

Aislamiento	Ácido producido en fosfato tricálcico	Ácido producido en fosfato de aluminio
T1B	O, G, CD2	G,S
T1C	O, C, G,	O, G, S
T3A	O, C, G, CD3	O, C, G, CD3
T3B	O, C, G	G, S
T3C	O, C, G, CD3	O, C, G, S
T3D	G	O, G
P2R	O, C, G	O, G
P3E	O, G, CD1, CD3	O, G, CD3
F1A	O, C, G	O, C, G, CD1
F2A	O	O, C
F2C	O, C, G, CD1, CD2	O, C, G
L4C	O, C, G	O, G
V1B	O, C, G	O, G, CD1
V1E	O, C, G	O, C, G
V2B	O, C, G, CD3	O, G, CD3

Ácido oxálico (O), ácido cítrico (C), ácido tartárico (T), ácido glucónico (G), ácido succínico (S), ácido fórmico (F), ácido acético (A), compuesto desconocido 1 (CD1), compuesto desconocido 2 (CD2), compuesto desconocido 3 (CD3).

Comportamiento de *Streptomyces* sp. (T3A) bajo diferentes fuentes de fósforo insoluble

El comportamiento de *Streptomyces* sp. T3A bajo diferentes fuentes de fósforo insoluble ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 y roca fosfórica) es mostrado en la figura 2.

La figura 2 muestra que el fósforo soluble liberado por *Streptomyces* sp. T3A con fosfato tricálcico como fuente de fósforo alcanza un máximo de 122 mgP·L⁻¹ en el cuarto día de cultivo donde paralelamente se presentó el valor de pH más bajo (4,05). Consecuentemente, el comportamiento de la glucosa presenta una rápida disminución (8,22 a 3,21 g·L⁻¹) durante los primeros cuatro días y luego decrece lentamente; a partir del cuarto día se presenta una disminución en la cantidad de fósforo soluble que es liberado (78,7 mgP·L⁻¹) y se da un aumento significativo en la producción de biomasa por parte de la actinobacteria (1,2 a 2,2 g·L⁻¹).

En el caso de fosfato de aluminio se observa que la cantidad máxima de fósforo soluble liberado (14 mgP·L⁻¹) se alcanza al día cinco de incubación con una concentración de biomasa de 0,98 g·L⁻¹, siendo un valor inferior si se comparan con la solubilización del fosfato tricálcico, así mismo se observa que el consumo de glucosa por parte del microorganismo fue más lento. Con respecto al pH, se presentaron valores menores descendiendo hasta 2,3 y 2,5; se observa también que existe un periodo de tiempo en el que aunque hay valores bajos de pH, no se liberan formas de fósforo soluble al medio; sin embargo, a medida que se observa un aumento de consumo de glucosa, de forma paralela aumentan las concentraciones de fósforo soluble.

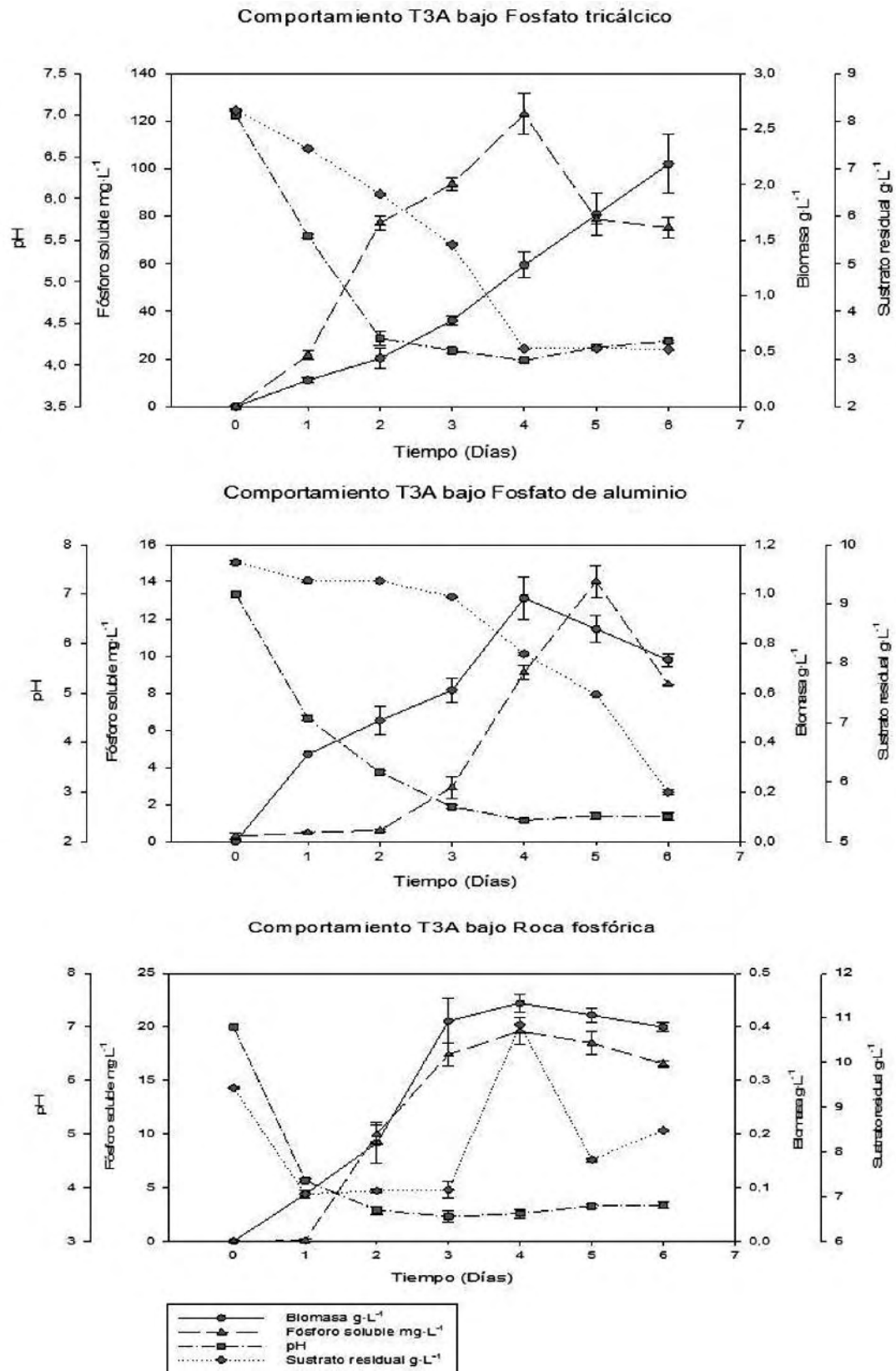


Figura 2. Comportamiento de *Streptomyces* sp. (T3A) bajo tres fuentes de fósforo inorgánico (a: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, b: AlPO_4 , c: roca fosfórica)

Finalmente, los resultados observados durante el ensayo con roca fosfórica muestran que el valor máximo de fósforo soluble fue obtenido el día cuatro de crecimiento alcanzando una concentración de 19,6 mgP·L⁻¹, con lo cual se evidencia la capacidad de las actinobacterias para solubilizar este tipo de fuentes minerales de fosfatos.

Comportamiento de *Streptomyces* sp. T3A bajo diferentes condiciones de pH

La actividad solubilizadora de fósforo para *Streptomyces* sp. T3A fue evaluada bajo diferentes condiciones de pH (4, 5, 6 y 8) para el inicio de la fermentación, con el fin de evaluar la habilidad de las actinobacterias para solubilizar fósforo frente a diferentes rangos de pH, teniendo en cuenta que los microorganismos del suelo están principalmente afectados por diferentes condiciones ambientales, dentro de ellas el pH de los suelos. Los resultados de la solubilización usando fosfato tricálcico como fuente de fósforo se encuentran en la figura 3.

Los resultados revelan que la solubilización de fósforo como se menciona anteriormente está fuertemente ligada a la fuente de fosfatos, sin embargo para el caso de este ensayo fue posible observar como en el medio con pH 4 la liberación de fosfatos solubles se ve negativamente afectada en comparación con los otros pH evaluados, en los cuales continúa presentando una buena actividad solubilizadora de fósforo, siendo esta una característica importante teniendo en cuenta que muchos de los suelos de uso agrícola en el país presentan pH ácido y algunos se encuentran cercanos a 8 (Burbano y Silva, 2010).

En cuanto a los resultados de la solubilización del fósforo usando como fuente de fósforo insoluble roca fosfórica, se observa una disminución en las cantidades de fósforo soluble liberado cuando el microorganismo se encuentra en pH 4 con respecto a los otros pH. Dado que las características de las rocas fosfóricas pueden variar dependiendo su tipo, no es claro en que pH se puede establecer la mejor actividad solubilizadora de fósforo; sin embargo, para el tipo de roca fosfórica usada en este trabajo los resultados obtenidos demuestran la eficiencia del aislamiento *Streptomyces* sp. T3A para actuar sobre enmiendas de uso tradicional como las rocas fosfóricas bajo un amplio rango de pH.

Discusión

Identificación molecular de actinobacterias

Basados en un porcentaje de identidad del 99% o mayor, los aislamientos de actinobacterias identificados pertenecen al género *Streptomyces* spp., un género de fácil aislamiento debido a la gran capacidad adaptativa que tiene frente a diferentes fuentes nutricionales, lo cual se relaciona con su alta densidad poblacional en

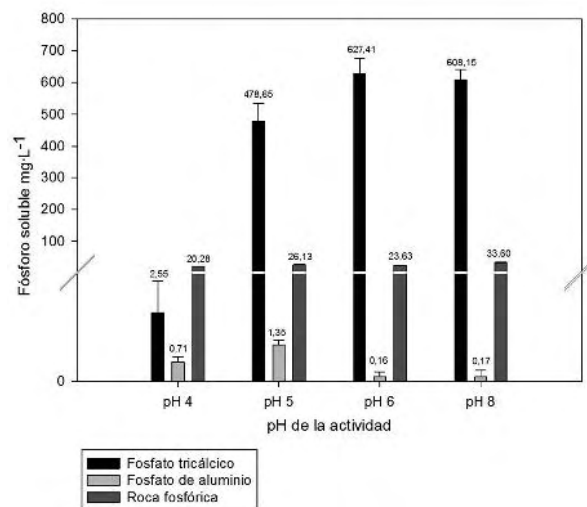


Figura 3. Actividad solubilizadora de fósforo de *Streptomyces* T3A bajo diferentes condiciones de pH

diferentes tipos de suelos representando del 1 al 20% del total de los recuentos de células viables (Schrenpf, 2001). Adicionalmente, el aislamiento en medios orgánicos sencillos, como el medio avena o los denominados ISP (International *Streptomyces* Project), favorecen la presencia de las especies de *Streptomyces* frente a otros géneros de actinobacterias, consecuencia de la secreción de una diversidad de enzimas hidrolíticas. Este hecho no sucede en medios de cultivo con fuentes complejas a nivel estructural (quitina, hidrolizado de pelo y ácido húmico) las cuales estimulan el crecimiento de actinobacterias con tasas de crecimiento más lentas, diferentes a *Streptomyces* (Kurtböke et al., 1992; Seong et al., 2001; Hayakawa, 2008). La importancia de estos aislamientos pertenecientes a este género radica en que debido a la capacidad de reproducirse por conidios, presentar un crecimiento filamentosos y producir una diversidad de enzimas y metabolitos secundarios, les permite tener una adaptación a diferentes condiciones medioambientales y de esta forma, pueden mantener una alta población, adherirse fuertemente a sustratos, descomponer variedad de compuestos y competir por espacio y sustratos, al compararse con otros grupos de microorganismos, estas características los hace buenos candidatos para la producción de biofertilizantes involucrados en los procesos de liberación de formas solubles de fosfatos (Waksman, 1950; Perlman, 1953; Goodfellow y Williams, 1983; Janssen, 2006; Zhang y Xu, 2008).

Identificación de los ácidos orgánicos producidos por los aislamientos de *Streptomyces* spp.

El hecho de haber detectado la presencia de ácidos orgánicos en las diferentes muestras, sugiere que estos compuestos están involucrados en la liberación de ortofosfatos a partir de fuentes no solubles. La

capacidad de secretar ácidos al medio por parte de los aislamientos puede deberse a que la mayoría de especies del phylum Actinobacteria aunque son de naturaleza aerobia, mantienen la capacidad genética de fermentación, propia de sus antecesores (*Cellulomonas*, *Mycobacterium*, *Corinebacteria*), lo cual apoya su amplia diversidad metabólica (Stackebrandt, 1991; Embley y Stackebrandt, 1994).

En cuanto a los reportes de ácidos orgánicos producidos por este phylum, Chen *et al.* (2006) en suelos subtropicales muestran la presencia de ácido glucónico y un ácido desconocido para diferentes aislamientos de *Rhodococcus erythropolis*, así mismo con cepas del género *Arthrobacter* se publicó la presencia de ácido cítrico y dos ácidos desconocidos. En el trabajo realizado por El-Tarabily *et al.* (2008) se reportan diferentes géneros de actinobacterias solubilizadoras de fosfatos inorgánicos como *Micromonospora*, *Nocardia*, *Actinomadura*, *Rhodococcus* y *Streptosporangium*, la solubilización de estas bacterias estaba mediada por ácidos como oxálico, cítrico, málico, glucónico, acético y láctico además de ácidos desconocidos.

Aún cuando los resultados de este trabajo proponen la producción de ácidos como principal mecanismos de liberación de formas disponibles de fosfatos en ensayos *in vitro*, autores como Hamdali *et al.* (2008, 2009, 2012) reportan que la actividad solubilizadora de actinobacterias se debe a la presencia de sideróforos o iones queladores, contrario a los ácidos orgánicos que producen una alcalinización del medio de cultivo. Los resultados del mecanismo de solubilización usado por las actinobacterias de esta investigación pueden variar con respecto a los de Hamdali *et al.* (2008, 2009, 2012), hecho que se ve reflejado en el descenso del pH generado durante los procesos de fermentación (figura 2), además los resultados de este trabajo presentan la producción de ácidos orgánicos como el principal mecanismo de solubilización, debido a que no se evidenció otro tipo de compuesto que pudiese causar el efecto solubilizador al realizar análisis a otras longitudes de onda en los análisis cromatográficos (datos no mostrados). La tabla 1 reporta la presencia de los ácidos succínico, ácido fórmico, ácido acético y los más predominantes ácido oxálico, cítrico y glucónico a partir de las dos fuentes de fosfato evaluadas, estos últimos tres concuerdan con los reportes bibliográficos en donde son los que más contribuyen a la liberación de fósforo (Paredes-Mendoza y Espinosa-Victoria, 2009; Walpola y Yoon, 2012).

Comportamiento de *Streptomyces* sp. T3A bajo tres diferentes fuentes de fósforo inorgánico.

En este documento se reporta que la actinobacteria *Streptomyces* sp. T3A, aislada de suelos en los andes orientales colombianos, es capaz de solubilizar fosfato tricálcico, fosfato de aluminio y roca fosfórica como fuente de fósforo insoluble. De acuerdo a los resulta-

dos presentados en la figura 2 para fosfato tricálcico, hay un aumento del fósforo soluble en el medio mientras el pH decrece, lo anterior puede ser explicado porque hay una mayor producción de ácidos orgánicos que contribuyen a liberar el fósforo de la fuente inorgánica no soluble. Adicionalmente, el comportamiento de la glucosa apoya este hecho, sugiriendo que la glucosa en los primeros días de fermentación se orienta a la liberación de ácidos orgánicos en el medio de cultivo; este proceso se presentó en simultánea con la disminución de la cantidad de fósforo soluble y un aumento en la formación de biomasa que ocurre posiblemente porque el microorganismo al encontrarse en fase exponencial requiere un mayor consumo de nutrientes que pueden ser limitantes (en este caso el fósforo), de acuerdo a lo anterior es posible inferir que los excesos de nutrientes como fosfatos puedan ser acumulados en la biomasa (Franco, 2008; Hamdali *et al.*, 2010; Chaudhry y Nautiyal, 2011).

Las observaciones del comportamiento fisiológico de *Streptomyces* sp. T3A frente al fosfato de aluminio (figura 2) permitieron evidenciar un descenso de pH desde el momento de la inoculación del microorganismo, lo que seguramente se debe a la liberación de iones Al^{+3} , que acidifican el medio; los resultados también mostraron la relación directamente proporcional en el aumento del consumo de glucosa y la liberación de formas de fósforo solubles, como consecuencia de la producción de los ácidos orgánicos sintetizados por el microorganismo. Finalmente, cabe resaltar que las cantidades bajas de fósforo soluble liberadas, el tiempo en el que son alcanzadas y las tasas de crecimiento de *Streptomyces* sp. T3A con respecto al uso de fosfato tricálcico como fuente de fósforo, sugieren que la solubilización del fosfato de aluminio se da de forma más lenta debido a la estabilidad del complejo y a la toxicidad que puede causar al microorganismo afectando la solubilización; sin embargo, esta condición de ensayo *in vitro* puede generar resultados diferentes en evaluaciones *in vivo*, debido a que el fósforo se encuentra en una matriz diferente, lo que influye en su movilidad generándose otros procesos como inmovilización, adsorción o precipitación (Whitelaw, 2000; Oliveira *et al.*, 2009).

Los resultados presentados para la solubilización de roca fosfórica demostraron la presencia de actinobacterias solubilizadoras de roca fosfórica y son comparables con lo presentado por Hamdali *et al.* (2008) que investigaron la solubilización de diferentes tipos de rocas fosfóricas en aislamientos de *Streptomyces* spp., los cuales liberaban cantidades de fósforo soluble en un rango de 8,34 a 29,67 mgP·L⁻¹, contrario a lo encontrado por los autores, en este trabajo, se observó la acidificación del medio producto de la liberación de ácidos orgánicos por el consumo de sustrato, esto confirma que seguramente este es el mecanismo de solubilización que se esté llevando a cabo para solubilizar roca fosfórica. Los valores altos de este elemento

pueden estar disponibles en el medio o ser almacenados por *Streptomyces* sp. T3A en forma de polifosfatos, de igual manera el estado fisiológico de la cepa, las condiciones de cultivo y otros minerales presentes en la roca pueden variar los resultados de solubilización. Paralelo a esto se presume que el consumo de glucosa no pudo ser determinado de manera muy precisa debido a silicatos, u otro tipo de compuestos dentro de la composición de la roca fosfórica, los cuales pueden interferir en la medición de azúcares reductores (Dighe et al., 1985; Hamdali et al., 2008; Schneider et al., 2010).

Comportamiento de *Streptomyces* sp. T3A bajo diferentes condiciones de pH

El comportamiento que fue observado por *Streptomyces* sp. T3A bajo pH 4 en comparación a los otros pH evaluados (figura 3) puede deberse posiblemente porque al adicionar ácido para ajustar el pH del medio, este ácido puede estar llevando a cabo el proceso de solubilización, por tal motivo al inocular el microorganismo no hay formas insolubles de fósforo para que desarrolle su actividad, por el contrario es posible que la actinobacteria haga uso de este para su crecimiento. Estos resultados no concordaron con lo encontrado por Park et al. (2011), los cuales evaluaron la actividad solubilizadora de fósforo de *Burkholderia cepacia* bajo diferentes condiciones de estrés, dentro de estas el pH, encontrando que este microorganismo es capaz de solubilizar fósforo en un rango de pH de 2 a 11. Este hecho también permitió evidenciar que no solo es necesario un descenso de pH para liberar formas solubles de fósforo sino la presencia de ácidos orgánicos producidos por los microorganismos y que su alcance de solubilización depende del tipo de ácido orgánico, así como del tipo de suelo (Liu et al., 2001; Park et al., 2011).

Como se observó en la figura 3 la actividad solubilizadora de fosfato de aluminio se favorece en medios con pH bajos (4 y 5), esto se debe probablemente a que los fosfatos de aluminio en soluciones acuosas presentan una solubilidad mínima a pH altos, así que cuando los pH decrecen la solubilidad del fósforo tiende a incrementar, facilitando la disponibilidad del compuesto para que el microorganismo libere las formas disponibles (Whitelaw, 1999; Sayed et al., 2000).

Los resultados de la figura 3 presentan una tendencia similar a la investigación realizada por Vyas et al. (2007), los cuales evaluaron la solubilización de roca fosfórica en *Eupenicillium parvum*, demostrando que a medida que el microorganismo se somete a una condición de estrés (en este caso pH bajo), se reduce la actividad solubilizadora de fósforo; caso típico en hongos, microorganismos que metabólicamente tienen un comportamiento metabólico similar a las actinobacterias. Adicional a esto, las diferencias presentadas en los resultados entre estudios pueden atribuirse a las

características, composición y diversas formas de fósforo (solubles e insolubles) que pueden presentarse en las rocas fosfóricas, teniendo en cuenta que al variar el pH, estas pueden reaccionar de forma diferente influyendo en la solubilidad (Salas et al., 2006; Welch et al., 2002).

Se sabe que la adición de biofertilizantes aumenta de manera significativa la toma de fósforo por la planta, motivo por el cual las actinobacterias de este trabajo pueden jugar un papel fundamental en la solubilización del fosfatos presentes en los suelos, evitando la adición de más fósforo que rápidamente se ve absorbido por el suelo (Ahmed et al., 2008; Khan et al., 2009). Así mismo es importante señalar que los aislamientos pueden presentar más actividades que promuevan el crecimiento vegetal, lo que finalmente contribuiría a disminuir el uso de otros compuestos químicos que perjudican el medio ambiente.

Conclusión

Los hallazgos encontrados bajo el presente estudio permiten sugerir a las actinobacterias como microorganismos con el fenotipo solubilizador de fósforo, siendo este el primer reporte de una actinobacteria solubilizadora de fosfato de aluminio. Finalmente se espera que los resultados del presente trabajo conduzcan a la continuidad en la investigación de actinobacterias como PGPR para ser propuestas en el diseño y formulación de biofertilizantes en la industria agrícola.

Agradecimientos

Proyecto (ID 4566) financiado por la Vicerrectoría de Investigación de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Referencias bibliográficas

- Ahmed M.F., Kennedy I.R., Choudhury A., Kecskés M.L. & Deaker R. (2008) Phosphorus Adsorption in Some Australian Soils and Influence of Bacteria on the Desorption of Phosphorus. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 39, 1269-1294.
- Bhattacharyya P. N. & Jha D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal Microbiology and Biotechnology*. 28, 1327-1350.
- Boschetti N. G., Quintero C. E., Benavidez R. A. & Giuffrè L. (2003). Cuantificación de las fracciones orgánicas e inorgánicas de fósforo en suelos de La Mesopotamia Argentina. *Ciencia del suelo*. 21(1), 1-8.
- Botiva M. (2012). Perspectivas agropecuarias primer semestre de 2012. Bogotá D.C. Colombia: Ministerio de agricultura y desarrollo rural. 73 p.
- Burbano H. & Silva F., (2010). Ciencia del suelo: principios básicos. Colombia: Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo. Bogotá, D. C. 396 p.
- Chaudhry V. & Nautiyal C. S. (2011). A high throughput method and culture medium for rapid screening of phosphate accumulating microorganisms. *Bioresource Technology*. 102 (17), 8057-8062.
- Chen Y. P., Rekha P. D., Arun A. B., Shen F. T., Lai W. A. & Young C. C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*. 34, 33-41.

- Dighe A. S., Patel P. M. & Rao K. K. (1985). Effect of phosphate on the estimation of reducing sugars in biological media. *Biotechnology and Bioengineering*. 27, 1612-1615.
- El-Tarabily K. A., Nassar A. H. & Sivasithamparam K. (2008). Promotion of growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a calcareous soil by a phosphate-solubilizing, rhizosphere-competent isolate of *Micromonospora endolithica*. *Applied Soil Ecology*. 39, 161-171.
- Embley T. M. & Stackebrandt E., (1994). The molecular phylogeny and systematics of the Actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*. 48: 257-289.
- Franco-Correa M. (2008). *Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas*. Tesis Doctoral. Granada, España: Universidad de Granada. 260 p.
- Galvis L. A. (2001). ¿Qué determina la productividad agrícola departamental en Colombia? Cartagena, Colombia: Banco de la República de Colombia. 37 p.
- Ghazanfar S., Azim A., Ghazanfar M. A., Anjum M. I. & Begum I. (2010). Metagenomics and its application in soil community studies: Biotechnological prospects. *Journal of Animals and Plant Sciences*. 6 (2), 611-622.
- Goodfellow M. & Williams S. T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Annual Review Microbiology*. 37, 189-216.
- Guimarães E. P., Sanz J. I., Rao I. M., Amézquita M. C. & Amézquita E. (1999). Sistemas Agropastoriles en Sabanas Tropicales de América Latina. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 313 p.
- Hamdali H., Bouizgarne B., Hafidi M., Lebrihi A., Virolle M. J. & Ouhdouch Y. (2008a). Screening for rock phosphate solubilizing Actinomycetes from Moroccan phosphate mines. *Applied Soil Ecology*. 38, 12-19.
- Hamdali H., Hafidi M., Virolle M. J. & Ouhdouch Y. (2008b). Rock phosphate-solubilizing Actinomycetes: screening for plant growth-promoting activities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24, 2565-2575.
- Hamdali H., Hafidi M., Virolle M. J. & Ouhdouch Y. (2008c). Growth promotion and protection against damping-off of wheat by two rock phosphate solubilizing actinomycetes in a P-deficient soil under greenhouse conditions. *Applied soil ecology*. 40, 510-517.
- Hamdali H., Smirnov A., Esnault C., Ouhdouch Y. & Virolle M. J. (2010). Physiological studies and comparative analysis of rock phosphate solubilization abilities of Actinomycetales originating from Moroccan phosphate mines and of *Streptomyces lividans*. *Applied Soil Ecology*. 44, 24-31.
- Hamdali H., Moursalou K., Tchangbedji G., Ouhdouch Y. & Hafidi M. (2012) Isolation and characterization of rock phosphate solubilizing actinobacteria from a Togolese phosphate mine. *African Journal of Biotechnology*. 11, 312-320.
- Hayakawa M. (2008). Studies on the Isolation and Distribution of Rare Actinomycetes in Soil. *Actinomycetologica*. 22: 12-19.
- Janssen P. H. (2006). Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied Environmental Microbiology*. 72: 1719-1728.
- Khan A., Jilani G., Akhtar M., Saqlan S. & Rasheed N. (2009). Phosphorous Solubilizing bacteria: Occurrence, Mechanisms and their role in crop production. *Journal of Agriculture and Biological Sciences*. 1 (1), 48-58.
- Kumar A., Bhargava P. & Rai L. C. (2010). Isolation and molecular characterization of phosphate solubilizing Enterobacter and Exiguobacterium species from paddy fields of Eastern Uttar Pradesh, India. *African Journal of Microbiology Research*. 4, 820-829.
- Kürtboke D. I., Chen C. F. & Williams S. T. (1992). Use of polyvalent phage for reduction of *Streptomyces* on soil dilution plates. *Journal Applied Bacteriology*. 72, 103-111.
- León L. A. (1991). La experiencia del Centro Internacional para el desarrollo de fertilizantes en el uso de rocas fosfóricas en América Latina. *Revista de la Facultad de Agronomía*. 17 (1-4), 49-69.
- Liu H., Wu X. Q., Ren J. H. & Ye J. R. (2011). Isolation and Identification of Phosphobacteria in Poplar Rhizosphere from Different Regions of China. *Pedosphere*. 21, 90-97.
- Miller G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. 31, 426-428.
- Murphy J. & Riley J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*. 27, 31-36.
- Oberson A., Pypers P., Bünemann E. & Frossard E. (2011). Management Impact on Biological Phosphorus Cycling in Cropped Soils. Phosphorus in action. Vol 100. Berlin Heidelberg, Germany: Springer. 431-458 p.
- Oliveira C. A., Alves V. M. C. & Marriel I. E. (2009). Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biology and Biochemistry*. 41, 1782-1787.
- Paredes-Mendoza M. & Espinosa-Victoria M. (2010). Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: Una revisión crítica. *Terra Latinoamericana*. 28 (1), 61-70.
- Park J. H., Bolan N., Megharaj M. & Naidu R. (2011). Isolation of phosphate solubilizing bacteria and their potential for lead immobilization in soil. *Journal of Hazardous*. 185, 829-836.
- Perlman D. (1953). Physiological Studies on the Actinomycetes. *Botanical Review*. 19, 46-97.
- Ramírez P. & Cocha J. M. (2003). Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. *Revista Peruana de Biología*. 10 (1), 67-77.
- Rao I. M., Barrios E., Amézquita C. E., Friesen D. K., Thomas R. J., Oberson A. & Singh B. R. (2004). Soil phosphorus dynamics, acquisition and cycling in crop-pasture-fallow systems in low fertility tropical soils: A review from Latin America. Cali, Colombia: Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR); Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 126-134 p.
- Reed S., Townsend A., Taylor P. & Cleveland C. (2011). Phosphorus Cycling in Tropical Forests Growing on Highly Weathered Soils. Phosphorus in Action, Vol. 100. Berlin Heidelberg, Germany: Springer. 339-369 p.
- Rodríguez H. & Fraga R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*. 17, 319-339.
- Salas A., Rivero C. & Casanova E. (2006). Fuente de fósforo absorbido y efectividad agronómica en el maíz en un ultisol del estado de Cojedes, Venezuela. *Agronomía tropical*. 56 (1), 43-60.
- Salcedo L.D.P., Prieto C. & Correa MF. (2014). Screening phosphate solubilizing actinobacteria isolated from the rhizosphere of wild plants from the Eastern Cordillera of the Colombian Andes. *African Journal of Microbiology Research*. 8(8), 734-742.
- Sayed W. F., Mohaowad S. M. & El-Karim M. M. (2000). Effect of Al, Co and Pb ions on growth of *Frankia* spp. in a mineral medium. *Folia Microbiologica*. 45 (2), 153-156.
- Schneider K. D., Van Straaten P., De Orduna R. M., Glasauer S., Trevors J. & Fallow D.; Smith P. S. (2010). Comparing phosphorus mobilization strategies using *Aspergillus niger* for the mineral dissolution of three phosphate rocks. *Journal Applied Microbiology*. 108, 366-374.
- Schrempf H. (2001). Streptomycetaceae: Life Style, Genome, Metabolism and Habitats. Osnabruck, Germany: John Wiley & Sons, Ltd. 12 p.
- Stackebrandt E. (1991). Aspects on the evolution and phylogeny of the Actinomycetes. *Actinomycetologica*. 5 (2), 56-63.
- Seong C. N., Choi J. H., Baik K. S. (2001). An Improved Selective Isolation of Rare Actinomycetes from Forest Soil. *The Journal of Microbiology*. 39: 17-23.

- Sierra J. O. (2002). Fundamentos para el establecimiento de pasturas y cultivos forrajeros. Medellín, Colombia: Editorial Universidad de Antioquia. 152 p.
- Son H. J., Park G. T., Cha M. S. & Heo M. S. (2006). Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt- and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresource Technology*. 97, 204-210.
- Vassilev N. & Vassileva M. (2003). Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 61, 435-440.
- Vassilev N., Vassileva M. & Nikolaeva I. (2006). Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potential and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71, 137-144.
- Vyas P., Rahi P., Chauhan A. & Gulati A. (2007). Phosphate solubilization potential and stress tolerance of *Eupenicillium parvum*. *Mycological Research*. 111, 931-938.
- Walpole B. C. & Yoon M. H. (2012). Prospectus of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus availability in agricultural soils: A review. *African Journal of Microbiology Research*. 6 (37), 6600-6605.
- Waksman S. A. (1950). The actinomycetes: their nature, occurrence, activities, and importance. United States of America: Chronica Botanica Co., Waltham, Mass. 227 p.
- Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A. & Lane D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal Bacteriology*. 173, 697-703.
- Welch S. A., Taunton A. E. & Banfield J. F. (2002). Effect of microorganisms and microbial metabolites on apatite dissolution. *Geomicrobiology Journal*. 19, 343-367.
- White P. & Hammond J. (2008). The Ecophysiology of Plant-Phosphorus Interactions: Phosphorus nutrition of terrestrial plants. Springer Netherlands. 51-81 p.
- Whitelaw M. A. (1999). Growth Promotion of Plants Inoculated with Phosphate-Solubilizing Fungi. *Advances in Agronomy*. 69, 99-151.
- Xiao C. Q., Chi R. A., Huang X. H., Zhang W. X., Qiu G. Z. & Wang D. Z. (2008). Optimization for rock phosphate solubilization by phosphate-solubilizing fungi isolated from phosphate mines. *Ecological Engineering*. 33, 187-193.
- Zhang L. & Xu Z. 2008. Assessing bacterial diversity in soil. *Journal of Soils and Sediments*. 8, 379-388.