

Solubilización de fosfatos por bacterias nativas aisladas en tres agroecosistemas del Valle del Cauca (Colombia).

Phosphate solubilizing bacteria isolated from three agroecosystems of Valle del Cauca (Colombia)

Oscar E. Sanclemente^{1*}, Viviana Yacumal², Carlos Patiño³

Recibido para publicación: Noviembre 20 de 2016 - Aceptado para publicación: Mayo 18 de 2017

RESUMEN

El fósforo (P) interviene en procesos de transferencia de energía y en reacciones químicas esenciales del metabolismo de las plantas, que lo toman del suelo en forma de fosfatos. La disponibilidad de P en el suelo, está limitada por procesos de fijación que incluyen su adsorción a la fracción mineral y reacciones de precipitación, siendo importante su solubilización. Esta investigación tuvo como objetivo evaluar la solubilización de fosfatos por bacterias nativas de tres agroecosistemas contiguos: monocultivo de caña de azúcar (CAÑ), pastizal (PAST) y guadua (GUAD), localizados en la hacienda Cantaclaro de Palmira (Colombia), con el fin de identificar las más eficientes. Se tomaron cinco submuestras de 100 g de suelo (0- 20 cm), en cada uno de los agroecosistemas. Para el aislamiento de las bacterias, se hicieron diluciones seriadas e inoculaciones en medio Pikovskaya (PVK), con fosfato de calcio como única fuente de P. Posteriormente, se evaluó la capacidad solubilizadora de P (CSF) de los aislados, midiendo los halos generados durante 20 días, finalmente, se realizó identificación molecular de las más eficientes. Se encontraron cinco aislados con alta CSF, dos en PAST, dos en GUAD y una en CAÑ. La cepa GUAD7 (*Escherichia vulneris*), que presentó CSF significativamente alta ($p < 0,05$) durante toda la evaluación, no ha sido descrita como solubilizadora de fósforo hasta ahora. Los aislados GUAD5 (*Pseudomonas fluorescens*), PAST7 (*Acinetobacter oleivorans*), PAST8 (*Acinetobacter calcoaceticus*) y CAÑ6 (*Pseudomonas entomophila*), presentaron CSF intermedia durante la evaluación.

Palabras clave: Fósforo del suelo, manejo y conservación del suelo, Servicios ecosistémicos, sustentabilidad.

ABSTRACT

Phosphorus (P) plays a role in energy transfer processes and chemical reactions in plant metabolism. Phosphorus is found in soils both in an organic form and a mineral form. Phosphorus availability in soils is limited by fixation processes, which include both its adsorption to mineral fraction and the precipitation reactions. In this work, the phosphate solubilization by native bacterial was evaluated in order to identify the most efficient bacterial, in three agro-ecosystems: sugarcane monoculture (CAÑ), grassland (PAST), and guadua ecosystem (GUAD) located in Palmira, Colombia. Five soil samples were assessed by treatment. First, the phosphorus-solubilizing bacteria were isolated by using Pokovskaya (PVK) assay. Then, phosphorus solubilizing capacity (CSF, Spanish acronym) was determined by measuring the halo generated in the isolated sample by 20 days. High CSF was found in five isolated samples: two in PAST, two in GUAD and one in CAÑ. In the literature reviewed was not reported the CSF of GUAD7 strain (*Escherichia vulneris*) as significantly high CSF ($p < 0.05$). The strains with intermediate CFS (GUAD5 (*Pseudomonas fluorescens*), PAST7 (*Acinetobacter oleivorans*), PAST8 (*Acinetobacter calcoaceticus*) y CAÑ6 (*Pseudomonas entomophila*) have been reported in the literature as beneficial bacteria to soil.

Key words: Soil phosphate, soil management and conservation, ecosystem services, sustainability.

1* Ph.D., profesor Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Palmira, Colombia, osedusancl20@hotmail.com

2 Estudiante tesista programa de Agronomía UNAD Palmira

3 Ph.D., profesor asociado Facultad de Ingeniería Agronómica Universidad del Tolima

INTRODUCCIÓN

El adecuado desarrollo de las plantas está condicionado en gran medida por la eficiencia en la absorción y asimilación de los nutrientes presentes en la solución del suelo. El fósforo (P), por ejemplo, es considerado nutriente esencial en la fotosíntesis, la producción de Adenosín Trisfosfato (ATP), la reproducción vegetal, la formación de aminoácidos y proteínas, entre otros aspectos fisiológicos de las plantas, siendo fundamental en la dinámica interna de los agroecosistemas (Ojekami et al. 2011). No obstante, aunque el P se encuentra en cantidades altas en la mayoría de los suelos, la fracción disponible para absorción por las plantas, es baja. Esto se debe a la fijación química del elemento en el suelo, lo que disminuye notablemente su disponibilidad en solución para los cultivos (Fernández et al. 2005).

Para incrementar la disponibilidad de P en el suelo, se aplican continuamente enmiendas minerales y fertilizantes de síntesis química, que implican altos costos para los productores y ocasionan impactos como la degradación del suelo y la contaminación de cuerpos de agua, con consecuencias negativas como la eutrofización (Cueto y Figueroa 2012). En el departamento del Valle del Cauca (Colombia), existen reportes que relacionan la aplicación de fertilizantes, entre ellos los fosfatados, con la salinización de suelos cultivados con caña de azúcar y frutales (Zúñiga et al. 2011; Cuero 2012), poniendo en riesgo su sostenibilidad.

Lo anterior, justifica la investigación en la búsqueda de alternativas tecnológicas para mitigar estos impactos negativos, enfocadas al uso eficiente de los recursos disponibles. A nivel ecológico, es bien conocida la acción de grupos de microorganismos (bacterias y hongos) con capacidad para solubilizar el P fijado en la fracción mineral del suelo, por liberación de ácidos orgánicos o por acidificación del medio, entre otros mecanismos (Zaidi and

Ahmad 2014; Patiño y Sanclemente 2014), sin embargo, el uso intensivo de fertilizantes y mecanización agrícola, reducen estas poblaciones microbianas benéficas y el servicio ecosistémico que proveen (Restrepo et al. 2015). Por consiguiente, el aislamiento, caracterización y evaluación de estos microorganismos bajo condiciones agroecosistémicas específicas, permitiría fortalecer el desarrollo biotecnológico de inoculantes para el aprovechamiento del P presente en el suelo en favor de la nutrición vegetal. La presente investigación, tuvo como objetivo evaluar la solubilización de fosfatos por bacterias nativas en tres agroecosistemas contiguos del Valle del Cauca, e identificar su afiliación taxonómica, con fines de aprovechamiento biotecnológico futuro.

MATERIALES Y MÉTODOS

El muestreo de suelos para aislamiento bacteriano se llevó a cabo en la Hacienda Cantaclaro ubicada en el corregimiento de Aguaclara, municipio de Palmira- Valle del Cauca (Colombia). Se tomaron al tresbolillo cinco sub-muestras de 100 g de suelo (0 - 20 cm), en tres agroecosistemas contiguos: monocultivo de caña de azúcar *Saccharum officinarum* L., pastura *Brachiaria decumbens* c.v. y guadua *Guadua angustifolia* Kunth. Las sub-muestras se fragmentaron en dos partes, una para análisis físico-químico (Tabla 1) y la otra, para aislamiento de las bacterias.

Las muestras de suelo seco a la sombra se homogenizaron con tamiz No. 10 (Ø 2 mm) y con estas se hicieron diluciones seriales hasta 10⁻⁶ con agua peptonada estéril. De las diluciones 10⁻⁴ hasta 10⁻⁶, se tomaron muestras para siembra en superficie por duplicado en cajas de Petri, usando el medio específico PVK (Medio Pikovskaya), que contenía fosfato tricálcico Ca₃(PO₄)₂ (PVK-Ca), como única fuente de P.

Las muestras se incubaron a 28 °C durante 48 horas. Las colonias que presentaron halo,

Tabla 1. Caracterización físico-química de tres suelos procedentes de la hacienda Cantaclaro, corregimiento de Agua Clara (Palmira, Valle del Cauca). Muestras tomadas en febrero de 2015.

Agroecosistema	pH	MO	P	Ca	Mg	K	Al	Na	CIC	Cu	Zn	MN	Fe	S	B	Textura
		g kg ⁻¹	mg kg ⁻¹	cmol/kg					mk kg ⁻¹							
Caña de azúcar*	5,56	34,67	10,94	9,24	9,10	0,57	0,00	0,07	17,65	1,13	1,80	26,67	17,44	17,28	0,85	FArA
Pastizal	5,22	56,89	3,90	7,11	6,36	0,13	0,11	0,00	14,00	0,70	2,03	23,06	31,65	16,89	1,03	F
Guadual	5,27	35,68	9,80	8,32	5,16	0,15	0,10	0,00	12,90	0,76	0,88	23,30	22,83	18,26	0,72	F

Fuente: Laboratorio de Servicios Analíticos del CIAT (2015).. *Monocultivo

y con potencial capacidad para solubilizar fosfatos, fueron resembradas transfiriendo una mínima cantidad con aguja de asa al centro de cada caja de Petri. Transcurridos 10 días de incubación, se seleccionaron las colonias con diámetros (colonia + halo) mayores a 10 mm. Las colonias seleccionadas se inocularon en medio de cultivo agar nutritivo, por el método de agotamiento en superficie, con el fin de purificarlas y proceder a su caracterización.

Mediante los descriptores: brillo, color, forma, consistencia, tipo de borde y elevación, se realizó en estereoscopio (4X) la caracterización macroscópica de los aislados bacterianas. La caracterización microscópica (100X) de los aislados, se llevó a cabo mediante tinción de Gram y tinción negativa.

Los aislados fueron sembrados por triplicado en cajas de Petri con medio PVK-Ca, y posteriormente, se evaluó la capacidad de solubilización de P midiendo la diferencia entre los diámetros de halos y colonias formados (Figura 1).

Las evaluaciones se realizaron a los días 8, 12, 16 y 20 después de la siembra. Posteriormente, se seleccionaron los cinco (5) aislados más eficientes, conservándolos a -10 °C en viales Eppendorf que contenían 1,5 ml de medio de cultivo TSB-glicerol al 50% estéril. Este inóculo se utilizó posteriormente en las pruebas de identificación molecular.

La extracción del ADN genómico de los aislados bacterianos se hizo empleando el kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ de Zymo Research, siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN genómico fue resuspendido en 30 µL de buffer de elución para la posterior amplificación del gen DNAr 16S por PCR, utilizando los cebadores bacterianos universales 8UAF y 1492R, en un volumen total de reacción de 30 µl. La amplificación por PCR y posterior secuenciación de los amplicones se llevó a cabo el Servicio de Secuenciación y Análisis Molecular del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia.

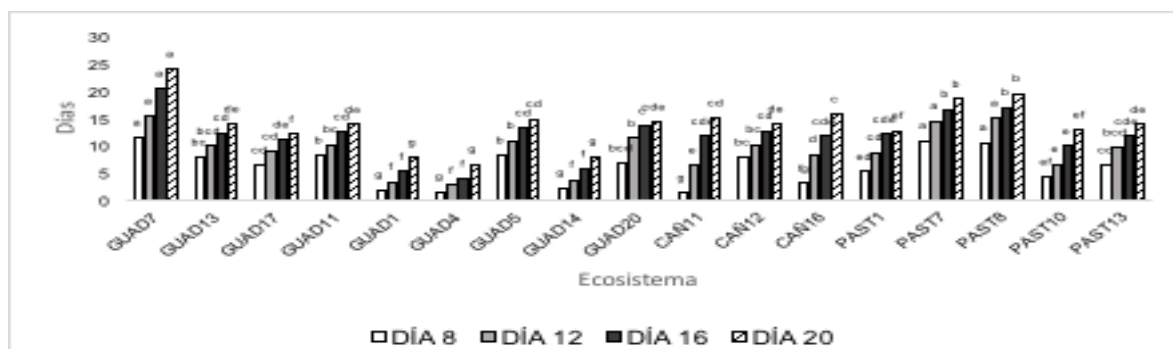


Figura 1. Capacidad de solubilización de fósforo en mm, de 17 aislados seleccionados de los agroecosistemas Guadual (GUAD), Caña de azúcar (CAÑ) y Patizal (PAST), durante los cuatro periodos de evaluación (8, 12, 16 y 20 días de siembra). Las letras en las barras corresponden a la prueba de medias de Duncan ($p < 0,05$), en cada periodo.

Los amplicones obtenidos de cada uno de los siete aislados se secuenciaron en los dos sentidos 5' a 3' y 3' a 5' y las secuencias se ensamblaron utilizando el software Geneious® v.4,8.4. La secuencia ensamblada se analizó utilizando la herramienta BLAST (Blastn, Megablastn) en varias bases de datos disponibles en Internet.

Utilizando el software SAS v. 9.2 se analizaron los datos de eficiencia de solubilización de fosfatos de los aislados bacterianos evaluados utilizando un diseño experimental completamente al azar y tres repeticiones por tratamiento. El análisis de varianza ANDEVA ($p < 0,05$) incluyó dos fuentes de variación: tipo de cepa y periodo de evaluación. En aquellos casos donde se marcaron diferencias significativas ($p < 0,05$) se aplicó prueba de medias de Duncan ($p < 0,05$), para identificar las bacterias con mayor capacidad solubilizadora.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de suelo de la hacienda Cantaclaro en los tres agroecosistemas evaluados, indicó la presencia de texturas francas, con predominio de arenas en el monocultivo de caña de azúcar (Tabla 1).

A nivel general, esta condición física permite la adecuada movilidad de agua y circulación de gases, favoreciendo la nutrición vegetal. El suelo se categorizó como ligeramente ácido, con moderado a alto contenido de materia orgánica. A nivel de macronutrientes, el suelo presentó niveles intermedios de bases intercambiables, sin embargo, baja relación

Tabla 2. Número de aislados solubilizadores de fósforo obtenidos en los agroecosistemas Guadalupe (GUAD), Caña de azúcar (CAÑ) y Pastizal (PAST).

Agroecosistema	No. total de aislados solubilizadores de P	No. aislados solubilizadores de P con Ø de halo \geq 10 mm
Caña de azúcar	41	3
Pastizal	22	5
Guadalupe	38	9
Total	101	17

Fuente: SSIQMol- Instituto de Genética. Universidad Nacional de Colombia (2015).

Ca/Mg, indicando deficiencias de Ca en los tres agroecosistemas. En los suelos del monocultivo de caña de azúcar y del guadalupe, el P presentó valores entre 9,8 y 10,9 mg kg⁻¹, adecuados para la nutrición vegetal, lo que no ocurrió en el pastizal donde el elemento fue deficitario. En relación con los micronutrientes, los tres agroecosistemas presentaron altos valores de Mn, S y B. El Cu presentó baja concentración en el pastizal y el guadalupe, e intermedio en el monocultivo de caña de azúcar, lo cual podría asociarse a la excesiva aplicación de fungicidas en el cultivo para el control de hongos fitopatógenos. Los contenidos de Zn fueron intermedios en el cultivo de caña de azúcar y pastizal y bajos en el guadalupe. Por último, el Fe presentó bajos contenidos en los suelos de guadalupe y monocultivo de caña de azúcar e intermedios en el pastizal. La siembra en medio PVK-Ca de diluciones seriales de suelo para los tres agroecosistemas evaluados, produjo un total de 101 aislados con capacidad solubilizadora de P, como lo muestra la tabla 2. El suelo con monocultivo de caña de azúcar produjo la mayor cantidad de aislamientos, seguido de los suelos de guadalupe y pastizal. Se obtuvieron diecisiete aislados con diámetro de halo mayor a 10 mm, de lo cual se infiere un alto potencial de capacidad solubilizadora. En esta medición, se destacó la presencia de nueve aislados obtenidos a partir del suelo del guadalupe, comparadas con cinco provenientes del suelo del pastizal y tres del monocultivo de caña de azúcar, lo cual podría deberse al menor grado de especialización de los aislamientos solubilizadores de P, bajo condiciones de baja perturbación y suministro de nutrientes externos, propias del primer agroecosistema. Es de esperar que la adición continua de fertilizantes fosfóricos al suelo, como ocurre en los suelos sembrados con caña, genere condiciones de presión evolutiva que conlleven a la pérdida de genes relacionados con la capacidad de solubilización de fosfatos, cuya expresión, metabólicamente costosa, no conferirían ventajas adaptativas a los microorganismos

que los poseen, si el fósforo está disponible en cantidad suficiente. En este sentido, Chuang et al. (2007) y Sharan et al. (2008) señalaron que el ciclaje natural de nutrientes en el suelo, entre ellos el P, se reduce por la adición de fertilizantes de síntesis y la labranza mecanizada, que llegan incluso a inhibir el proceso. De acuerdo con Chuang et al. (2007), la formación microbiana de halos de solubilización en medios suplementados con Ca-P, como la evidenciada en este estudio, se debe principalmente a la liberación de ácido glucónico, permitiendo la disolución y disponibilidad del P, como ocurre en el suelo. De otra parte, Sharan et al. (2008) indican que la capacidad de solubilización de P por microorganismos del suelo se ve afectada por factores adversos como el estrés hídrico, el pH (mayor a 8 y menor a 5) y, el alto contenido de sales.

Todos los aislados con alto potencial de solubilización de fosfatos presentaron reacción Gram negativa, resultados que coinciden con los encontrados por Lara et al. (2011), quienes aislando bacterias con capacidad solubilizadora de fosfatos en suelos de Montería (Colombia), cultivados con guayaba agria *Psidium araca*, encontraron que la mayoría (93%) correspondían a bacilos Gram negativos, entre ellas *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter cloacae*, *Pantoea sp.*, *Aeromonas hydrophila* y *Enterobacter nakasaki*. El análisis de varianza de la CSF (diámetro del halo – diámetro de la colonia), mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre periodos de evaluación y tipo de aislados evaluados. Luego de 20 días de evaluación, la prueba de medias de Duncan ($p < 0,05$) para los 17 aislados evaluados, demostró que GUAD7 presentó la mayor CSF (24 mm), siendo su promedio significativamente mayor al de los demás. Por su parte, GUAD4 presentó la menor CSF (6,5 mm), durante los cuatro periodos de evaluación. PAST7, PAST8, GUAD5 y CAÑ16, presentaron valores intermedios de CSF. Los valores de CSF registrados en esta investigación, fueron similares a los obtenidos por aislamientos

bacterianos de suelos de la región sojera de Argentina, donde los halos fluctuaron entre 4 y 15 mm (Fernández et al. 2005). En esta misma investigación, la cepa comercial *Pseudomonas fluorescens* obtuvo un halo de 10 mm. Lara et al. (2013), evaluando el impacto de bacterias nativas con CSF en el desarrollo de plantas de rábano cultivadas en el departamento de Sucre (Colombia), registraron en laboratorio diámetros de halo entre 2 y 16 mm, siendo *Enterobacter cloacae* y *Klebsiella oxytoca*, las más eficientes. De otra parte, los genes de ARNr 16s de los aislados con alta CSF, presentaron niveles de homología con los genes correspondientes de cepas registradas en el GenBank que variaron entre 85 y 99%, como lo muestra la tabla 3.

Tabla 3. Identidad filogenética de los aislados con mayor capacidad de Solubilización de fósforo obtenidos de los agroecosistemas Guadal (GUAD), Caña de azúcar (CAÑ) y Patizal (PAST)

Cepa	Nombre Blast	Max Identificación	No. Acceso
GUAD5	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	98%	NC016830.1
GUAD7	<i>Escherichia vulneris</i>	85%	NZbbm201000044.1
PAST7	<i>Acinetobacter oleivorans</i>	96%	NC014259.1
PAST8	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	96%	NC016603.1
CAÑ16	<i>Pseudomonas entomophila</i>	94%	NC008027.1

*Monocultivo

La cepa con mayor CSF en esta investigación (GUAD7), mostró similaridad nucleotídica con *Escherichia vulneris* (DNAr con 85% de similitud). Brenner et al. (1982) basados en estudios genómicos, clasificaron a *E. vulneris* como una nueva especie perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Desde esa época, existen diversos registros de *E. vulneris* como especie patógena vinculada con infecciones en heridas humanas (Brenner et al. 1982), osteomielitis (Levine and Goldberg 1994), urosepsis (Awsare and Lillo 1991), bacteriemia (Spaulding and Rothman, 1996), meningitis (Mohanty et al. 2005), entre otras. A nivel agronómico, existen reportes de *E. vulneris* como rizobacteria promotora de crecimiento en el cultivo de Coliflor (Babaloa and Akindolire 2012) y hospedera endófito en nódulos radicales de algunas leguminosas (Dubey and Gupta 2012), sin embargo, a la fecha son pocos los

reportes que vinculan directamente a *E. vulneris* con solubilización de P en suelos cultivados.

Esta especie también ha sido empleada en estrategias de bioremediación de suelos contaminados con metales pesados (Arunakumara et al. 2015).

De otra parte, existen diferentes registros sobre la CSF del género *Pseudomonas* sp., sobresaliendo la especie *P. fluorescens* (Fernández et al. 2005). Incluso, se ha reportado en varias investigaciones el uso de *P. fluorescens* como biofertilizante para incrementar la disponibilidad de P en el suelo (Fernández et al. 2005; Parani and Saha 2012). Para el caso de *Pseudomonas entomophila*, los resultados de algunas investigaciones ponen en evidencia su versatilidad, destacando propiedades entomopatógenas en moscas del género *Drosophila* sp., propiedades antifúngicas en el suelo (Vallet- Gely et al. 2010; Dieppois et al. 2015), capacidad de promoción de estados de resistencia vegetal (Kamala- Kannan 2010) y, producción de sideróforos (Vodovar et al. 2006), sin embargo, no existen reportes que vinculen directamente a *P. entomophila* a solubilización de fosfatos.

Al igual que *Pseudomonas* sp., el género *Acinetobacter* sp. se ha reportado recientemente como solubilizador de P (Collavino et al. 2010; Midekssa et al. 2015). La especie *Acinetobacter calcoaceticus* ha sido registrada como de alta CSF en el cultivo de maíz (Fan et al. 2011), al igual que en hortalizas como el pepino, donde la liberación rizosférica de ácidos orgánicos mejora la disponibilidad del P en el suelo (Kang et al. 2012). Adicionalmente, *A. calcoaceticus* se ha reportado como especie promotora del crecimiento vegetal, principalmente por su producción de giberelinas y fitohormonas (Kang et al. 2012). Por su parte, aislamientos de *Acinetobacter oleivorans* provenientes de suelos áridos cultivados con *Tylosema esculentum* (Burchell) en Namibia, han mostrado alta

CSF en laboratorio (Kandjimi et al. 2015). Además, los aislamientos de *A. oleivorans* registraron producción de enzimas promotoras de crecimiento (Kandjimi et al. 2015). A pesar de la cercanía entre los agroecosistemas evaluados, en la presente investigación se pudieron observar diferencias en la composición de las poblaciones de bacterias con CSF. Estas diferencias podrían deberse a la heterogeneidad heredada de la misma génesis del suelo, como a los cambios generados por el uso de diferentes tecnologías para la producción agrícola, en cada sistema de cultivo. La presencia de *Pseudomonas fluorescens* en el agroecosistema de gradual confirma su distribución cosmopolita, mientras el aislamiento de *E. vulneris* del mismo agroecosistema pone en evidencia nuevos nichos ecológicos para esta especie. Este último encuentro pone de relieve igualmente la necesidad de mayores estudios de riesgo biológico asociado al uso de inoculantes microbianos con fines agrícolas. En el pastizal, la uniformidad del sistema por monocultivo de *Brachiaria decumbens* c.v., al igual que la intervención animal, al parecer condicionan la biodiversidad bacteriana presente en los suelos con CSF, como se observó con las especies *Acinetobacter oleivorans* y *Acinetobacter calcoaceticus*, de alta cercanía genética. En este tipo de agroecosistema normalmente se emplea una mínima cantidad de fertilizantes y no se realiza labranza mecanizada. Por su parte, en el monocultivo de caña de azúcar, el uso tecnológico de agroinsumos y labranza mecanizada, al parecer tiene efecto sobre reducción en el número de especies con alta CSF.

De las cinco especies con mayor CSF en esta investigación, en este agroecosistema se pudo identificar sólo una (*Pseudomonas entomophila*). La presencia *P. entomophila* en este agroecosistema, resultaría benéfica tanto para solubilizar fosfatos, como para controlar biológicamente poblaciones de insectos plaga que tienen parte de su ciclo vital en el suelo. Patiño y Sancllemente (2014), resaltan la

importancia de identificar microorganismos nativos con alta CSF en suelo, para el posterior desarrollo de alternativas de fertilización fosfórica basada en bioinsumos. Este tipo de alternativas, lograrían repoblar el suelo con microorganismos benéficos con CSF. Por su parte, Restrepo et al. (2015) indican que la elaboración de inoculantes a partir de estas bacterias permitiría reducir a largo plazo el uso de agroquímicos, así como desarrollar estrategias agronómicas que preserven el medio ambiente.

CONCLUSIONES

Los tres diferentes agroecosistemas evaluados, albergaron especies bacterianas solubilizadoras de fosfatos en el suelo. El uso tecnológico en estos sistemas, se considera un agente definitivo en la selección de especies y su CSF.

La especie genéticamente similar (en base a la secuencia del gen ADNr 16S) a *Escherichia vulneris* aislada del gradual, fue la más eficiente.

REFERENCIAS

- Arunakumara, K., Walpola, B. and Yoon, M. 2015.** Bioaugmentation- assisted phytoextraction of Co, Pb and Zn: an assessment with a phosphate-solubilizing bacterium isolated from metal- contaminated mines of Boryeong Area in South Korea. In *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* Vol. 19(2): 143- 152.
- Awsare, S. and Lillo, M. 1991.** A case report of *Escherichia vulneris* ureopsis. *Rev Infect Dis.* Vol.13: 1247- 1248.
- Babaloa, O. and Akindolire, A. 2012.** Identification of native rhizobacteria peculiar to selected food crops in Mmabatho municipality of South Africa. In *Journal Biological Agriculture & Horticulture.* Vol. 27(3): 294- 309.
- Brenner, D., Mc Whorter, A., Leete, J. and Steigerwalt, A. 1982.** *Escherichia vulneris*: a New Species of Enterobacteriaceae Associated with Human Wounds. In *Journal of Clinical Microbiology.* Vol. 15(6): 1133- 1140.
- Chuang, C., Kuo, Y., Chao, C. and Chao, W. 2007.** Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. In: *Biol. Fert. Soils.* Vol. 43: 575-584.
- Collavino, M., Sansberro, P., Mroginski, L. and Aguilar, O. 2010.** Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. In *Journal Biology and Fertility of Soils.* Vol. 46(7): 727-738.
- Cuero, R. 2012.** Hacia un sistema complementario de producción más limpia en suelos degradados por salinidad. En revista *Ambiente y Sostenibilidad.* Cali. Vol. 2: 59-68.
- Cueto, J. y Figueroa, U. 2012.** Impacto ambiental de la fertilización y recomendaciones para mejorar la eficiencia en el uso de nutrimentos INIFAP Querétaro, México.
- Dieppois, G., Opota, O., Lalucat, J. and Lemaitre, B. 2015.** *Pseudomonas entomophila*: A Versatile Bacterium with Entomopathogenic Properties. Chapter 2. *New Aspects of Pseudomonas Biology.* Edit. Springer. Pp. 25- 50.
- Dubey, H. and Gupta, G. 2012.** Synergistic and Antagonistic Interactions among Endophytic Bacterial Isolates of *Vigna mungo*(L.)Hepper Poonam Dubey and G.P. Gupta. In *Journal of current perspectives in Applied Microbiology.* Vol. 1(2): 1- 10.

- Fan, D., Ren, Y., Zhu, X., Ma, P. and Liang, L. 2011.** Optimization of culture conditions for phosphate solubilizing by *Acinetobacter calcoaceticus* YC-5a using response surface methodology. In African Journal of Microbiology Research. Vol. 5(20): 3327- 3333.
- Fernández, L., Zalba, P., Gómez, M. y Sagardoy, M. 2005.** Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. En revista Ciencia del Suelo. Argentina. Vol. 23 (1): 31- 37.
- Kamala- Kannan, S., Lee, K., Park, S., Chae, J., Yun, B., Lee, Y., Park, Y. and Oh B. 2010.** Characterization of ACC deaminase gene in *Pseudomonas entomophila* strain PS-PJH isolated from the rhizosphere soil. In Journal of Basic Microbiology. Vol. 50(2): 200- 205.
- Kandjimi, O., Uzabakirho, J. and Chimwamurombe, P. 2015.** Isolation and characterization of culturable bacteria from bulk soil samples and the rhizosphere of arid- adapted *Tylosema esculentum* (Burchell). A. Schreiber (Marama bean) in Namibia. In African Journal of Biotechnology. Vol. 14(11): 944- 952.
- Kang, S., Khan, A., Hamayun, M., Shinwari, Z., Kim, Y., Joo, G. and Lee, I. 2012.** *Acinetobacter calcoaceticus* ameliorated plant growth and influenced gibberellins and functional biochemical. In Pakistan Journal Bot. Vol. 44(1): 365- 372.
- Lara, C., Esquivel, L y Negrete, J. 2011.** Bacterias nativas solubilizadoras de fosfatos para incrementar los cultivos en el departamento de Córdoba- Colombia. En revista Biotecnología del sector agropecuario y agroindustrial. Vol. 9(2): 114- 120.
- Levine, W. and Goldberg, M. 1994.** *Escherichia vulneris* osteomyelitis of the tibia caused by a wooden foreign body. Orthop Rev. Vol. 23: 262- 265.
- Midekssa, M., Loscher, C., Schmitz, R. and Assefa, F. 2015.** Characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria isolated from lentil growing areas of Ethiopia. In African Journal of Microbiology Research. Vol. 9(25): 1637- 1648.
- Mohanty, S., Chandra, S., Dhawan, B., Kapil, A. and Das, B. 2005.** Meningitis due to *Escherichia vulneris*. In Journal Neurology India. Vol. 53(1): 122-123.
- Ojekami, A., Ige, D., Hao, X., and Akinreml, O. 2011.** Phosphorus Mobility in a Soil with Long Term Manure Application. In Journal Agricultural Science. Vol. 3(3): 25- 38.
- Patiño, C. y Sancllemente, O. 2014.** Los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF): una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible. En revista Entramado. Cali. Vol. 10 (2): 288- 297.
- Parani, K. and Saha, B. 2012.** Prospects of Using Phosphate Solubilizing *Pseudomonas* as Bio Fertilizer. In European Journal of Biological Sciences. Vol. 4(2): 40- 44.
- Restrepo, G., Marulanda, S., De la Fe, Y., Díaz, A., Baldani, V. y Hernández, A. 2015.** Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. En revista CENIC Ciencias Biológicas. Vol. 46(1): 63- 76.
- Sharan, A., Darmwaln, S. and Gaur, S. 2008.** *Xanthomonas campestris*, a novel stress tolerant, phosphate-solubilizing bacterial strain from saline-alkali soils. World J Microbiol. Biotechnol. Vol. 24:753-759.
- Spaulding, A. and Rothman, A. 1996.** *Escherichia vulneris* as a cause of intravenous catheter-related bacteremia. Journal Clin. Infect Dis. Vol. 22: 728- 729.
- Vallet- Gely, I., Oputa, O., Boniface, A., Novikov, A. and Lemaitre, B. 2010.** A secondary metabolite acting as a signalling molecule controls *Pseudomonas entomophila* virulence. In Journal Cellular Microbiology. Vol. 12(11): 1666- 1679.

- Vodovar, N., Vallenet, D., Cruveiller, S., Rouy, Z., Barbe, V., Acosta, C., Cattolico, L., Jubin, C., Lajus, A., Segurens, B., Vacherie, B., Wincker, P., Weissenbach, J., Lemaitre, B., Médigue, C. and Bocard, F. 2006.** Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. In *Journal Nature Biotechnology*. Vol. 24: 673- 679.
- Zaidi, A. and Ahmad, M. 2014.** Eds. *Microphos: principles, production and application strategies*. In: M.S. Khan et al. (eds.), *Phosphate Solubilizing Microorganisms*, DOI 10.1007/978-3-319-08216-5_1, Springer International Publishing Switzerland. p. 1-30.
- Zúñiga, O., Osorio, J., Cuero, R. y Peña, J. 2011.** Evaluación de Tecnologías para la Recuperación de Suelos Degradados por Salinidad. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín* 64(1): 5769-5779.