

Artículo Original

Bacterias solubilizadoras de fósforo inorgánico aislados de la rizósfera de *Coffea americana* en Rioja – Perú

Isolated inorganic phosphorus solubilizing bacteria from the rhizosphere of *Coffea americana* in Rioja – Peru

Julio Hipólito Soto Lovon^{1,a}, Mario Alcarraz Curi^{1,b}

Recibido: 10/03/2022 Aceptado: 01/07/2022 Publicado: 31/08/2022

Resumen

El fósforo es uno de los macronutrientes para el crecimiento de cultivos vegetales, su baja disponibilidad en los suelos merma el crecimiento y el rendimiento de los cultivos de café, si bien, el uso de fertilizantes fosforados suple el problema a corto plazo, a largo plazo aumentan los costos de producción y tienen un impacto significativo en el ambiente. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar y seleccionar microorganismos con capacidad de solubilizar fosfato de la rizosfera en plantaciones de café (Rioja) a fin de obtener un banco de microorganismos con potencial de fertilizante biológico. Se llevó a cabo un proceso de cribado de los aislados bacterianos, 15 bacterias codificadas de la rizosfera de cultivos de *Coffea americana*, en los medios SMRS1, NBRIP y Pikovskaya para evaluar pruebas semicuantitativas de solubilización de fosfatos, teniendo como componente principal fosfato tricálcico y fosfato monocálcico, obteniendo valores de Índice de Solubilización (IS) entre 0.1 hasta valores de 1.33. Posteriormente se realizó una medición cuantitativa utilizando kit de detección de ortofosfatos, obteniendo valores de hasta 2.867 mg/L.

Palabras clave: Solubilización de fosfatos; biofertilizantes; ortofosfatos.

Abstract

Phosphorus is one of the macronutrients for the growth of vegetable crops, its low availability in the soil reduces the growth and yield of coffee crops, although the use of phosphorus fertilizers supplies the problem in the short term, in the long term they increase production costs and have a significant impact on the environment. The objective of this study was to evaluate and select microorganisms capable of solubilizing phosphate from the rhizosphere in coffee plantations (Rioja) to obtain a bank of microorganisms with biological fertilizer potential. A screening process of bacterial isolates, 15 codified bacteria from the rhizosphere of *Coffea americana* cultures, was carried out in SMRS1, NBRIP and Pikovskaya media to evaluate semi-quantitative tests of phosphate solubilization, having as main component tricalcium phosphate and phosphate monocalcium, obtaining values of Solubilization Index (IS) between 0.1 to values of 1.33. Subsequently, a quantitative measurement was made using an orthophosphate detection kit, obtaining values of up to 2,867 mg/L.

Keywords: Phosphate solubilization; Biofertilizers; orthophosphates.

¹ Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Bioprocesos Industriales. Lima, Perú

a E-mail: lovonsc@gmail.com - ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6526-2878>

b Autor para correspondencia: malcarrazc@unmsm.edu.pe - ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5262-2969>

Citar como:

Soto Lovon, J., & Alcarraz Curi, M. (2022). Bacterias solubilizadoras de fósforo inorgánico aislados de la rizósfera de *Coffea americana* en Rioja – Perú. *Ciencia e Investigación* 2022 25(1):11-15. doi: <https://doi.org/10.15381/ci.v25i1.23466>

© Los autores. Este artículo es publicado por la Ciencia e Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original.

I. INTRODUCCIÓN

El crecimiento vertiginoso de las poblaciones demanda cada vez más la producción de mayores volúmenes de alimentos y estos a su vez incrementan la demanda de fertilizantes para las tierras de cultivo. Lamentablemente la crisis internacional que afronta el mundo, sumado a esto los conflictos bélicos entre países ha desencadenado un incremento en el costo de los fertilizantes sintéticos y su consecuente escasez en los mercados internacionales.

En el Perú, como en muchos otros países, la agricultura es dependiente del suministro de fertilizantes sintéticos, cuya escasez y altos costos ha impactado en la agricultura y por consiguiente la producción de alimentos. Esta situación nos hace reflexionar respecto a la dependencia de los abonos sintéticos y ha impulsado la búsqueda de alternativas innovadoras para la fertilización de los suelos. Por otro lado, el uso y abuso de los fertilizantes sintéticos conlleva a una serie de desventajas en la estructura y fisiología de los suelos, afectándose de esta forma la calidad del suelo. Por lo expuesto, la sostenibilidad de las tierras agrícolas enfrenta crecientes dificultades para producir los requerimientos de alimentos y fibras necesarios para la creciente población mundial, especialmente a los países en vías de desarrollo^{1,2}.

Los principales problemas concernientes a la degradación de suelos son la erosión, la compactación y la pérdida de fertilidad por un desmedido uso de agroquímicos, además del inadecuado manejo de los suelos el cual también podría conllevar a producir efectos indirectos, como los riesgos crecientes de inundaciones, sedimentaciones, deslizamientos de tierra, etc., con características que pueden llegar a ser muy preocupantes así como disminución de la biodiversidad, deterioro de la suplencia de agua en cantidad y calidad, y efectos en el cambio climático global y sus consecuencias³.

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO) dentro del programa “La agricultura sostenible” sustenta una eficaz estrategia para contrarrestar el progresivo deterioro de nuestro ecosistema⁴; es en ese contexto es que el rol de los microorganismos biofertilizantes cobra importancia como una novedosa alternativa a la fertilización química que además permite un aprovechamiento eficiente de los minerales incorporados a los suelos, bajo la forma de abono.

Esta situación ha motivado la investigación científica de nuevas o complementarias alternativas biotecnológicas para la fertilización de los suelos, lo que ha permitido el descubrimiento de microorganismos que tienen la capacidad de solubilizar diversos minerales haciéndolos disponibles a las plantas. Considerando que el fósforo es un elemento fundamental en el desarrollo de las plantas, su aprovisionamiento y disponibilidad es clave en el manejo de la fertilidad de los suelos. No todos los microorganismos tienen la capacidad de solubilizar los fosfatos inmovilizados en los suelos en el transcurso del tiempo; por lo que es necesaria la selección de microorganismos nativos con mejores capacidades solubilizadoras de fosfato, para que, luego de incrementar sus poblaciones

significativamente, se puedan incorporar a ecosistemas donde no hay disponibilidad de fósforo. Para lograr tal fin es necesario conocer las condiciones requeridas en el proceso de propagación masiva.⁵

La presente investigación estuvo enmarcada en la búsqueda de bacterias nativas de la rizósfera de plantaciones de café para seleccionar al mejor microorganismo solubilizador de fosfatos y catalogarlo en el grupo de microorganismos promotores de crecimiento vegetal, para posteriormente evaluar su potencial de uso como parte del consorcio microbiano promotor de crecimiento vegetal del café en cultivos de Rioja Perú.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

a. Aislamiento de microorganismos solubilizadores de fosfatos

Muestreo

Las muestras de suelo fueron colectadas en la región de Rioja, provincia del departamento de San Martín, para una efectiva colecta se segmentó el área muestreada (1 hectárea) en 20 submuestras siguiendo un patrón de zig-zag, se tomó 100 g de suelo rizosférico (área superficial del suelo y a 40 cm de profundidad) por cada sub muestra⁶. Las muestras fueron colectadas con la ayuda de espátulas y bolsas estériles siendo almacenadas entre 2–5°C para su traslado al laboratorio y su posterior procesamiento en el laboratorio de Bioprocesos Industriales de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Pre-enriquecimiento

El suelo muestreado se tamizó a través de mallas de 200 micras con el fin de evitar los residuos innecesarios. Posteriormente, se pesaron 10 g de rizósfera de cada muestra tamizada, las cuales se homogeneizaron en frascos de Erlenmeyer conteniendo 90 ml de agua peptonada 0.1% y se adicionaron 5 g de fosfato tricálcico, incubando a 30°C en agitación en shaker a 150 rpm por 72 h.⁷

Aislamiento y conservación

A partir de las muestras pre-enriquecidas, se realizaron diluciones seriadas desde 10^{-1} a 10^{-7} en tubos de ensayo con 9 ml de solución salina 0.85%, homogeneizando con un vortex. Se sembraron 100 μ l de las últimas diluciones (-4, -5, -6 y -7) mediante diseminación en placas con agar SMRS y se incubaron a 30°C por 24 -48h.⁸

Se seleccionaron todas las colonias bacterianas que presentaron un halo de color amarillo como presuntivas solubilizadoras de fosfato. Estas colonias bacterianas se purificaron por la técnica de agotamiento en placas con agar nutritivo, luego se incubaron a 30°C durante 48 h, con el objetivo de obtener cepas puras y poder conservarlas en el cepario.⁹

b. Evaluación semi cuantitativa de la actividad de solubilización de fosfatos

Pruebas semicuantitativas en medio sólido

Para las pruebas semicuantitativas de solubilización de fosfato se inició con la reactivación de las cepas en caldo

tripticasa de soja por 18 - 24 h a fin de tener células viables en plena fase exponencial o inicio de la estacionaria. Luego, se procedió a su inoculación en 10µl del caldo en una placa con agar SMRS, cada inoculo por triplicado, por un periodo de 72 h hasta evidenciar un halo de color amarillo debido al viraje por acidez del medio, de igual manera se procedió para los medios NBRIP¹¹ y PIKOVSKAYA¹², con la diferencia de un período de incubación mayor (16 y 14 días respectivamente) y un halo de solubilización translucido en ambos medios. Las placas de agar inoculadas se dejaron secar a temperatura ambiente por 15 minutos sin invertir; posteriormente se llevaron a incubar a 30°C hasta la aparición de los respectivos halos de solubilización de fosfatos alrededor de las colonias, este halo se midió para cada colonia con un criterio de selección según el índice de solubilización (IS).^{11, 13}

$$IS = \frac{(\text{Diámetro de la colonia} + \text{halo})}{\text{Diámetro de la colonia}}$$

Siendo:

D: diámetro de la colonia + halo

d: diámetro de la colonia

Cuantificación de ortofosfatos en medio líquido

Se reactivó la cepa en medio tripticasa de soja 18-24 h a 30°C, se inoculó en medio líquido de Pikovskaya, incubando a 30°C en agitación constante a 150 rpm por 14 días, finalizado el tiempo se realizó la lectura con un Test de cuantificación directa de Orthophosphate HACH model PO-19, evidenciando la lectura positiva con un viraje a color azul, la intensidad es dependiente de la concentración de ortofosfatos en el medio.

III. RESULTADOS

Se evidenció aislamiento en el medio SMSR, obteniéndose 85 colonias bacterianas, de las cuales se seleccionaron

36 colonias (42%), que se caracterizaron por presentar halos amarillos, debido al cambio de pH del medio por la solubilización de fosfato. Durante los siguientes pasajes las 36 cepas permanecieron viables y se les realizó la descripción de características macroscópicas.

Se comparó los diámetros de solubilización y de las 36, se seleccionaron 15 bacterias que presentaron medidas de halo con mayor diferencia significativa. Las 15 bacterias seleccionadas se evaluaron en su totalidad en medio SMRS, la lectura se realizó a las 72 h. Los índices de solubilización de fosfatos (IS) de las bacterias obtuvieron un rango entre 3.48 a 7.74. Siendo la cepa AC31 la que obtuvo el índice de solubilización más alto (7.74), en comparación a la cepa WC3C que obtuvo el índice de solubilización más bajo (3.48) dentro de los ensayos. Los resultados estadísticos muestran una diferencia significativa entre los índices de solubilización respecto a la prueba de Tukey con un $\alpha=0.05$ (figura 1 y tabla 1)

Finalmente, se evaluaron las cepas en medio Pikovskaya líquido registrando su lectura a los 16 días de la siembra, los resultados muestran las concentraciones de ortofosfatos en mg/L (figura 2), se observa los promedios de las mediciones por triplicado con el test de orthophosphate HACH 224800 (PO-19)

IV. DISCUSIÓN

Las bacterias solubilizadoras de fosfato juegan un rol importante en la composición y mineralización del suelo, conservando la materia utilizable y disponible para las plantas. En el presente trabajo se aislaron 15 microorganismos con resultados que superan a los encontrados por Llanos (2017)¹⁵ quien obtuvo solo 5 bacterias del total de aisladas como solubilizadoras de fosfatos, poniendo en evidencia la eficiencia de aislamiento en estos suelos de cafetaleros con respecto a otros suelos agrícolas, uno de los aspectos más influyentes es la concentración de fósforo en el suelo o el lugar de muestreo. Llanos

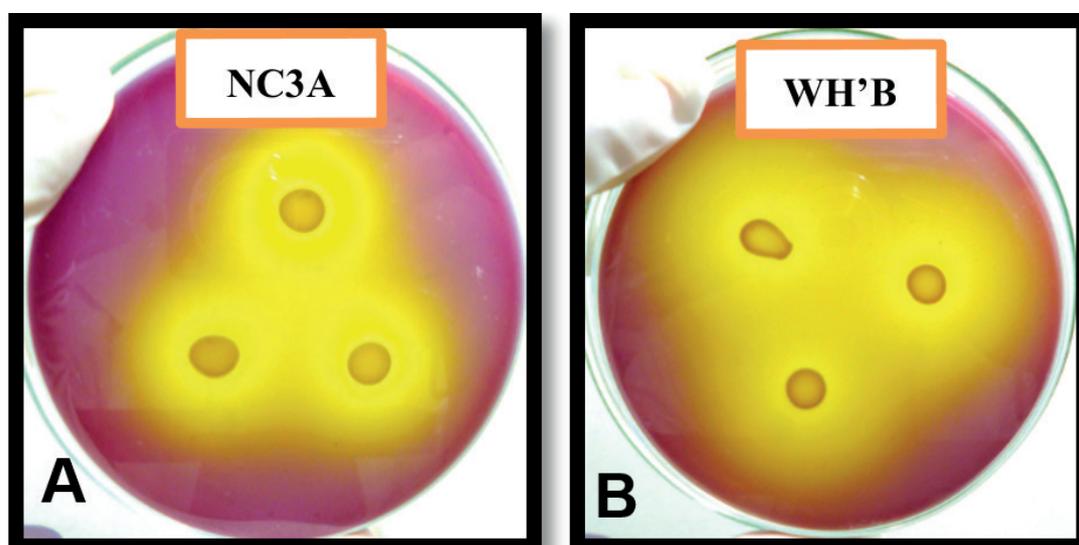


Figura 1. Solubilización de fosfato tricálcico en medio SMRS, se observa la producción de halos a los 3 días. (A) Halo de NCE3A (B) Halo de WH'B.

Tabla 1. Índices de solubilización de fosfato en medios MSRS, NBRIP y Pikovskaya de 15 cepas.

CEPAS	MSRS (3 días)	NBRIP (16 días)	PKV (14 días)
WC3C	3.48 ± 0.62 ^(a)	1.68 ± 0.04 ^(d)	0.57 ± 0.18 ^(g)
WH'B	7.00 ± 0.22 ^(b)	1.7 ± 0.06 ^(d)	0.60 ± 0.04 ^(h)
AC35	5.91 ± 0.2 ^(c)	1.3 ± 0.10 ^(d)	0.39 ± 0.06 ^(f)
AC2C	6.04 ± 0.31 ^(c)	0.17 ± 0.04 ^(f)	0.56 ± 0.41 ^(g)
AC31	7.74 ± 0.13 ^(b)	0.31 ± 0.02 ^(f)	0.43 ± 0.21 ^(g,i)
AC1B	5.48 ± 0.36 ^(c)	ND	0.48 ± 0.25 ^(g)
AC2	5.08 ± 0.2 ^(c)	0.26 ± 0.03 ^(f)	0.67 ± 0.11 ^(h)
NC1D	5.59 ± 0.19 ^(c)	ND	ND
NC3A	5.85 ± 0.28 ^(c)	0.31 ± 0.06 ^(f)	0.56 ± 0.06 ^(g)
TC2B	6.95 ± 0.3 ^(b)	0.2 ± 0.03 ^(f)	0.57 ± 0.08 ^(g)
TC2D	5.77 ± 0.26 ^(c)	0.17 ± 0.06 ^(f)	0.45 ± 0.1 ^(g)
TC3B	5.92 ± 0.64 ^(c)	0.32 ± 0.06 ^(e,f)	0.59 ± 0.13 ^(g)
TC26A	5.27 ± 0.69 ^(c)	0.25 ± 0.03 ^(f)	0.75 ± 0.13 ^(h)
TC3F	6.74 ± 0.7 ^(b,c)	0.48 ± 0.05 ^(e)	0.77 ± 0.1 ^(h)
TC3A	5.82 ± 0.32 ^(c)	0.48 ± 0.06 ^(e)	ND

Las letras a, b, c, d, e, f, g, h, i denotan agrupaciones según Tukey al $p < 0.05$ significativamente iguales. Los promedios se muestran con el límite de confianza al 95%.

ND: No determinado

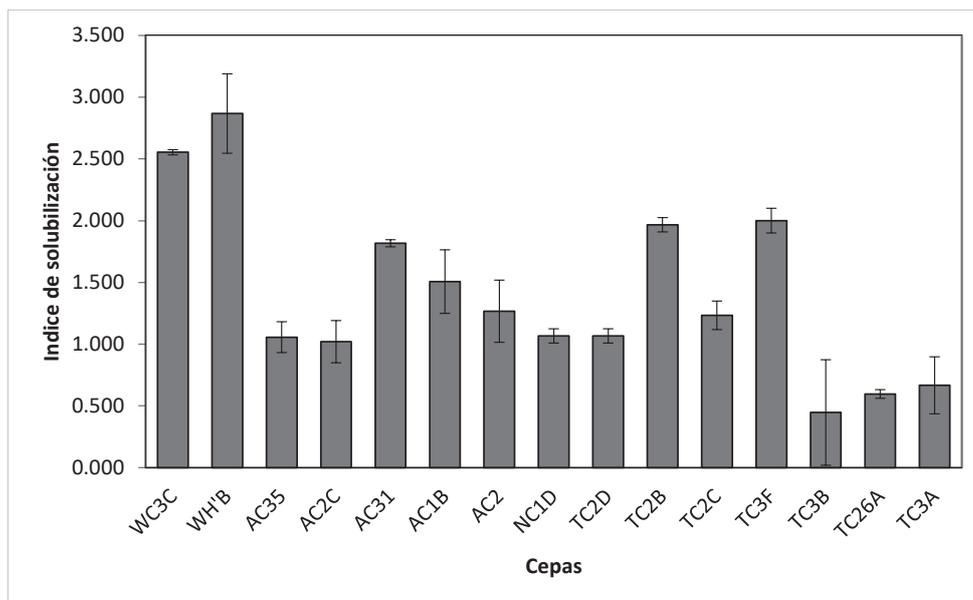


Figura 2. Concentraciones de ortofosfato (mg/L) cuantificado en medio líquido conteniendo fosfato tricálcico.

¹⁴ y Bobadilla ¹⁵ en sus análisis concluyeron una mayor concentración de Fósforo (ppm) en suelos amazónicos (San Martín, región selva).

La comparación de los índices de solubilización y la diferencia significativa que existen entre los diferentes microorganismos bacterianos codificados presentados en la tabla 1 corresponden a microorganismos solubilizadores de fosfato, que mostraron un mejor índice en el medio SMSR con respecto de los otros medios; sin embargo, el medio SMRS no indica precisamente la solubilización de fosfatos, pues la acidez generada por el metabolismo microbiano hace virar el indicador a un color amarillo,

a diferencia de los otros dos medios que son más específicos para la determinación de esta capacidad. Basado en estos resultados fue posible determinar el IS donde los microorganismos mostraron un mayor valor equivalente en sus respectivos medios sólidos empleados. Los resultados del IS obtenidos por las quince cepas seleccionadas tienen un valor similar en comparación con la mayoría de las cepas aisladas por Muleta *et al.*, (2012), donde obtuvo valores de hasta 5,82 a los 7 días de incubación, en otros estudios se obtuvieron IS de hasta 5. La cepa WH'B fue la mejor cepa nativa solubilizadora de fosfatos, mostrando esta virtud en los tres medios

ensayados, lo cual indica una gran versatilidad y flexibilidad metabólica de este microorganismo, característica muy útil para su adecuación a medios de cultivo industriales con fines de producción masiva. La segunda cepa a recomendar como posible biofertilizante sería la TC3F de acuerdo a lo evidenciado en el medio específico Pikovskaya.

V. CONCLUSIONES

Los suelos cafetaleros de la región Rioja presentaron microorganismos rizosféricos con capacidad de solubilización de fosfatos, donde la mejor cepa nativa solubilizadora de fosfato corresponde a WH'B con un índice de solubilización de 7.0, 0.60 y 1.70 en los medios SMRS1, Pikovskaya y NBRIP respectivamente.

La cepa WH'B es una bacteria promotora de crecimiento vegetal con una interesante versatilidad metabólica, lo cual le confiere un gran potencial para ser usada como biofertilizante en suelos cafetaleros de la región Rioja.

VI. REFERENCIAS

- Bautista Cruz A, Etchevers Barra J, del Castillo RF, Gutiérrez C. La calidad del suelo y sus indicadores. Ecosistemas. 2004; 13(2).
- Sentís, I. Problemas de degradación de suelos en América Latina: Evaluación de causas y efectos. En: X Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo. Quito, Ecuador. 2012
- Pineda MEB. La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. Ciencia & Amp; Tecnología Agropecuaria. 2015; 1: 101-13.
- FAO. Cuestiones claves relativas a los microorganismos y los invertebrados, En: Comisión de recursos genéticos para la alimentación y la agricultura. Roma; 2013.
- Corrales Ramírez L, Sánchez Leal L, Arévalo Falvez Z, Moreno Burbano V. Bacillus: género bacteriano que demuestra ser un importante solubilizador de fosfato. Nova, 2014; 12(22): 165-178.
- Frye A, Baquero J, Carvajal J, Villota M. Suelos y Fertilización en el cultivo de arroz en Colombia. 1993; 4:211.
- Muleta D, Assefa F, Börjesson E, Granhall U. Phosphate-solubilising rhizobacteria associated with *Coffea arabica* L. in natural coffee forests of southwestern Ethiopia. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences. 2013; 12:73–84.
- Nautiyal C. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiology Letters. 1999;170, 1:265–70.
- Vera DF, Pérez H, Valencia H. Aislamiento de hongos solubilizadores de fosfatos de la rizósfera de Arazá (*Eugenia stipitata*, Myrtaceae). Acta biol. Colomb. 2002;7(1):33-40.
- Sánchez D, García A, Romero F, Bonilla R. Efecto de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal solubilizadoras de fosfato en *Lactuca sativa* cultivar White Boston. Rev. colomb. biotecnol. 2014; 16(2): 122-128. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v16n2.41077>
- Chung H, Park M, Madhaiyan M, Seshadri S, Song J, Cho H, et al. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. Soil Biology and Biochemistry. 2005; 37:1970–4.
- Alam S, Khalil S, Ayub N, Rashid M. In vitro solubilization of inorganic phosphate by Phosphate Solubilizing Microorganisms (PSM) from Maize Rhizosphere. International Journal of Agriculture and Biology. 2002; 4:454–8.
- Kumar V, Narula N. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. Biology and Fertility of Soils. 1999; 28:301–305.
- Llanos M. Bacterias solubilizadoras de fosfato del género bacillus en suelos de la provincia del Collao (Puno) y su efecto en la germinación y crecimiento de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) en condiciones de invernadero. [Puno]: Universidad Nacional del Altiplano; 2017.
- Bobadilla C, Rincón S. Aislamiento y producción de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza: Pontificia Universidad Javeriana; 2008.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés en la publicación de este artículo.

Fuente de financiamiento

El presente trabajo fue financiado a través de recursos propios de los investigadores.