

Preliminares en aislamiento de microorganismos solubilizadores de fósforo en suelo del Jardín Botánico de la Universidad Libre, Pereira.

Álvarez María del Mar¹, Ceballos Valeria¹, López Franco Rodolfo²

Resumen:

Introducción: El fósforo es uno de los elementos más críticos para la producción agropecuaria; pero su disponibilidad es cada vez más limitada debido a la progresiva insuficiencia de fuentes naturales, su relativa escasez edáfica, la elevada retención por parte del suelo, la falta de reposición natural y su baja movilidad. Como mecanismo para aumentar la disponibilidad y solubilidad del fósforo inorgánico en el suelo, los vegetales y microorganismos que habitan en él, liberan enzimas fosfatasa capaces de liberar y solubilizar el fósforo; lo cual se logra al liberar protones, iones OH, CO₂ y aniones de ácidos orgánicos. **Metodología:** aislar microorganismos solubilizadores de fósforo a partir de muestras de suelo del Jardín Botánico de la Universidad Libre, Pereira. Las muestras de suelo se llevaron a condiciones de laboratorio, donde inicialmente se homogenizaron para mayores posibilidades de éxito en el aislamiento. Allí se realizaron diluciones seriadas hasta 10⁻⁸. La inoculación se realizó en medio de cultivo SMRS1, selectivo para microorganismos solubilizadores de fósforo. **Conclusiones:** Luego de tres semanas de cultivo, se tomaron las cajas que presentaron cambio de color característico del medio, producto de la acción de bacterias solubilizadoras de fósforo; de ellas se obtuvieron colonias pequeñas y puntiformes de color naranja, características de presuntas bacterias solubilizadoras de fósforo.

Palabras clave: Suelo, agentes de control de microorganismos.

Abstract

Introduction: Phosphorus is one of the most critical elements for agricultural production; but its availability is increasingly limited due to the progressive insufficiency of natural sources, its relative edaphic scarcity, the high retention by the soil, the lack of natural replacement and its low mobility. As a mechanism to increase the availability and solubility of inorganic phosphorus in the soil, the plants and microorganisms that inhabit it, release phosphatase enzymes capable of releasing and solubilizing phosphorus; This is achieved by releasing protons, OH ions, CO₂ and anions of organic acids. **Methodology:** isolate phosphorus solubilizing microorganisms from soil samples from the Botanical Garden of the Free University, Pereira. The soil samples were taken to laboratory conditions, where they were initially homogenized for greater chances of success in isolation. There serial dilutions were made up to 10⁻⁸. The inoculation was carried out in SMRS1 culture medium, selective for phosphorus solubilizing microorganisms. **Conclusions:** After three weeks of cultivation, the boxes were taken that presented a characteristic color change of the medium, product of the action of phosphorus solubilizing bacteria; from them small, punctilious orange colonies were obtained, characteristic of presumed phosphorus solubilizing bacteria.

1 Auxiliares de Investigación- Semillero MEFIS (Microorganismos Eficientes del Suelo).

2 Profesor Investigador, Programa de Microbiología, Universidad Libre Pereira.

Keywords: Soil, microorganism control agents.

Introducción

El fósforo (P) es un macronutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de todos los seres vivos, ya que forma parte de la composición de las moléculas orgánicas esenciales para la vida. Las mayores reservas en el suelo son las rocas y los depósitos como las apatitas primarias y otros minerales formados durante otras eras geológicas que se encuentran formando parte de un estrato rocoso cuya principal característica es la insolubilidad. La disponibilidad de P para las plantas está relacionada con su concentración en la disolución de suelo. La mayoría de los suelos tropicales y subtropicales son deficientes en P biodisponible por lo que éste elemento debe ingresarse al agroecosistema como fertilizante. Sin embargo, este no es un recurso renovable y las reservas mundiales se agotan rápidamente. Se estima que las reservas actuales de P disminuirán a la mitad entre los años 2040 y 2060, lo que, unido al hecho de que los precios de los fertilizantes fosfóricos se incrementan constantemente, hace necesaria la búsqueda de estrategias sostenibles de fertilización (1).

Algunos microorganismos, especialmente los asociados con las raíces, tienen la habilidad de incrementar el crecimiento de las plantas y su productividad; estos son reconocidos como PGPM por sus siglas en inglés (Plant growth promoting microorganisms). Los microorganismos solubilizadores de fosfato (MSF) constituyen un grupo importante de PGPM, pues están involucrados en un amplio rango de procesos que afectan la transformación del fósforo, siendo componentes integrales del ciclo edáfico de este nutriente. Los organismos involucrados en las transformaciones del P en el suelo incluyen bacterias, hongos,

protozoos y algunos nematodos (2). En general, los microorganismos del suelo dinamizan el ciclo del P a través de procesos de mineralización, inmovilización y solubilización, los cuales están relacionados con su metabolismo nutricional. A partir del año 2000, el conocimiento sobre los microorganismos solubilizadores de fósforo ha aumentado significativamente. Dentro de este grupo funcional se encuentran las bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) que incluyen algunos géneros de actinomicetos (3).

La solubilización del P como una capacidad bacteriana se reconoció ya hace más de un siglo. Varios estudios reportan la capacidad solubilizadora de fosfatos de algunas bacterias, como: *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Arthrobacter*, *Rhodobacter*, *Pantotea* y *Klebsiella*, entre las bacterias (4). Pero también se reportan hongos con capacidad solubilizadora de P: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Sclerotium*, *Syrialidium*, *Trichocladium* (5).

Debido a que las fuentes orgánicas no son utilizadas directamente para la nutrición microbiana, éstas deben primero hidrolizarse por la acción de enzimas fosfatasa, producidas y secretadas al suelo por los microorganismos. La revisión de Nannipieri *et al.* (2011) analiza la naturaleza y roles de las fosfatasas en el suelo. Entre los factores que influyen la mineralización e inmovilización del Po en el suelo se incluyen la naturaleza química de la materia orgánica y su reactividad asociada, la cantidad de Po, la proporción C: P y N: P de los materiales orgánicos, la temperatura, la humedad, la aireación, el pH, la intensidad de cultivo y la fertilización con

P. Es importante considerar que, además de mediar varios procesos clave en el ciclo biogeoquímico del P, los microorganismos constituyen en sí mismos una importante reserva de P en el suelo (6).

Los mecanismos más ampliamente aceptados como responsables de la solubilización microbiana del P mineral son:

- a) la producción de ácidos orgánicos.
- b) la producción de protones (normalmente asociada a la asimilación de NH_4^+ y/o a los procesos respiratorios).
- c) la producción de ácidos inorgánicos y CO_2 .

Se ha demostrado que algunos microorganismos pueden solubilizar fosfatos insolubles, sin producir cualquier tipo de ácidos orgánicos. En estos casos, se ha propuesto que el mecanismo principal responsable de la solubilización es la producción de protones durante la asimilación del NH_4^+ , o resultantes de las actividades respiratorias, pues la reducción concomitante del pH de la solución del suelo favorece la solubilización de los fosfatos precipitados. En otro estudio se demostró que la producción de exopolisacáridos por los aislados *Enterobacter* sp. Hy-401, *Arthrobacter* sp. ArHy505 y *Azotobacter* sp. AzHy-510, confería a estos microorganismos mayor capacidad de solubilización de fosfatos insolubles en relación con la cepa *Enterobacter* sp. Hy-402, la cual no produce exopolisacáridos. Otros mecanismos propuestos como responsables de la solubilización de fosfatos insolubles son la producción de ácidos inorgánicos como el ácido nítrico y el ácido sulfúrico, generados, respectivamente, por las bacterias nitrificantes y *Thiobacillus* sp. durante la oxidación de compuestos nitrogenados o del azufre inorgánico, los cuales reaccionan con los fosfatos insolubles tornándolos biodisponibles.

Las BSP pueden ser de vida libre en el suelo o establecer relaciones de asociación con las plantas; en este último caso, son capaces de colonizar y persistir en la rizósfera del vegetal y favorecer su crecimiento y desarrollo, al tiempo que se benefician con las sustancias de carbono liberadas por las raíces como exudados. En tal sentido es que se las identifica como bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPB, por sus siglas en inglés (7). Las bacterias solubilizadoras de fosfatos inorgánicos desempeñan un importante papel en el suplemento de fósforo para las plantas. Este hecho despierta la atención para la utilización de esos microorganismos como inoculante comercial, o el manejo de sus poblaciones como forma de promover una mejor utilización del fósforo existente en el suelo o el adicionado como fertilizante (8).

Metodologías de aislamiento

Para el aislamiento y selección de Bacterias Solubilizadoras de fósforo (BSP), se han informado en la literatura diferentes medios de cultivos que incluyen en su composición variadas fuentes de P, tanto de origen orgánico como inorgánico. Uno de los más antiguos es el Pikovskaya (PVK) desarrollado en 1948 (9), el medio Sperber (10) que presenta en su composición $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y se utiliza para aislar BSP a partir de muestras de suelo, raíces y rizosfera. En 1992, se diseñó un nuevo medio de cultivo con igual fuente de P_i y finalmente, en 1999, se formuló el medio NBRIP o National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium desarrollado por Nautiyal (11), que ha sido uno de los más usados por su eficiencia para seleccionar microorganismos con alta capacidad para solubilizar fuentes de P_i . En cualquier caso, la característica distintiva de todos ellos es que permiten identificar a las cepas solubilizadoras a partir del halo traslúcido que se desarrolla

en torno a las colonias correspondientes (12).

Además de los medios de cultivo anteriores, un medio bastante usado es SMRS1 (13) que contiene púrpura de bromocresol como indicador de pH, sulfato de amonio y extracto de levadura como fuente de nitrógeno, cloruro de sodio y potasio para regular la presión osmótica y otros componentes como sulfato de magnesio, sulfato de hierro como cofactores enzimáticos (14) (Tabla 2).

Componente	G/L (Sindra y Raul)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5
KCl	0.2
MgSO ₄ .H ₂ O	0.3
Fe SO ₄ .7H ₂ O	0.004
NaCl	0.2
Glucosa	10
Extracto de levadura	0.5
Púrpura de Bromocresol	0.1
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5
Agar	15

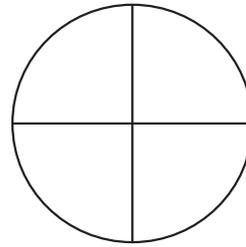
El objetivo de este trabajo consistió en la evaluación de una metodología adecuada para el aislamiento de microorganismos solubilizadores de fósforo a partir del jardín botánico de la Universidad Libre seccional Pereira.

Materiales y métodos

Luego de seleccionar el nicho ecológico para la toma de muestra de suelo, se dispuso de una pala previamente lavada; se tomó la muestra a una profundidad de 10 cm aprox., en la rizosfera de plantas seleccionadas, tomando una muestra de suelo de 100 g.

La muestra se depositó en una bolsa estéril tipo Ziploc y se llevó al laboratorio de Microbiología de la Universidad Libre, Pereira.

Seguidamente la muestra se homogenizó mediante cuarteo en caja de Petri así:



- Se toma 1 cajas Petri y se llena con la muestra.
- Cada una se cuartea

De la muestra homogenizada se pesaron 10 g de la caja, y se depositó en una probeta previamente esterilizada; luego se aforó a 100 ml con agua peptona estéril.

Se realizaron las siguientes diluciones seriadas: 10-1, 10-2, 10-3, 10-4, 10-5, 10-6, 10-7y 10-8.

A partir de ellas se tomaron 100 µl de las 3 últimas diluciones (10-6, 10-7 y 10-8) y se sembraron por superficie en medio de cultivo SMSR (Figura 1).

Se dejaron las cajas inoculadas a temperatura ambiente y se evaluó a las 3 semanas.

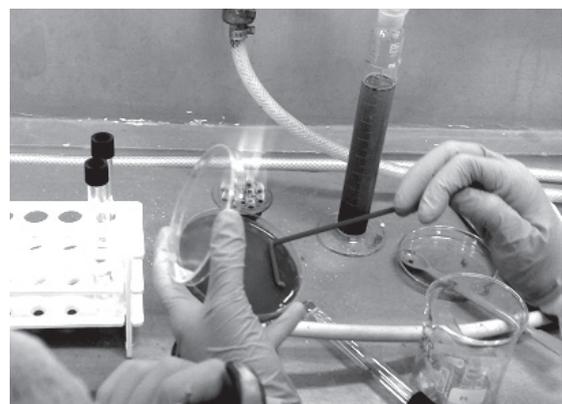


Figura 1. Siembra en medio de cultivo selectivo SMSR. Obsérvese el color del medio de cultivo.

Resultados y discusión

Existen muchos microorganismos con capacidad para solubilizar fosfatos, pertenecientes a diversos géneros, entre los cuales pueden encontrarse bacterias y hongos con diferentes mecanismos para realizar dicha solubilización, como son la producción de ácidos orgánicos, la producción de enzimas fosfatasas y la producción de enzimas fitasas. Así mismo, se han descrito algunos genes involucrados como el gen *phoD*, *phoA*, *phoB*, *ykoI*, *PhyC* (15).

En este estudio se obtuvo un tipo de colonias representativas de microorganismos solubilizadores de fósforo, de color naranja, pequeñas y puntiformes, de textura suave y babosa como se observa en las Figuras 2 y 3. Se pudieron apreciar las características macroscópicas pero el resultado no se confirmó microscópicamente por lo que no se logró determinar de qué microorganismo se trataba; sin embargo, las colonias descritas son representativas de bacterias solubilizadoras de fósforo.

No obstante, en la mayoría de investigaciones, la presencia de halos de inhibición alrededor de las colonias es lo que permite la determinación de la capacidad de solubilización y la selección semicuantitativa de los microorganismos con capacidad solubilizadora de fosfato (16), característica que no fue posible observar en este caso.

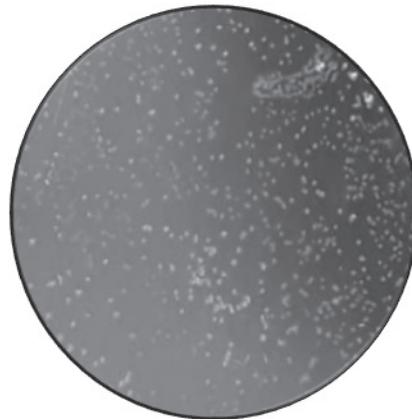


Figura 2. Morfología macroscópica de presuntas Bacterias Solubilizadoras de Fósforo. Se puede observar el cambio de tonalidad del medio de púrpura a amarillo debido a la liberación de ácidos y a la disminución del pH.

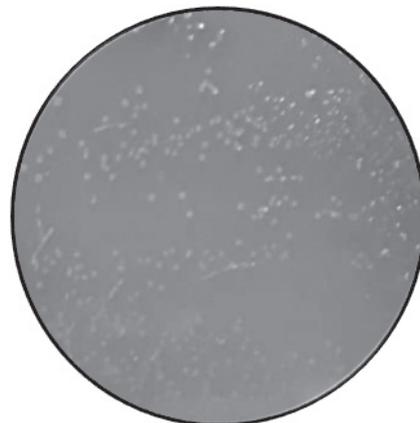


Figura 3. Morfología macroscópica de presuntas Bacterias Solubilizadoras de Fósforo.

Teniendo en cuenta la composición del medio de cultivo utilizado para el aislamiento de bacterias Solubilizadoras de Fósforo (Tabla 2), se identificó como principal compuesto para cumplir con este objetivo el Fosfato de Calcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) ya que actúa como su única fuente de fosfato. Por tal motivo se sugiere realizar va-

riaciones en la cantidad utilizada de este compuesto.

Como se muestra en la Tabla 1 de componentes del medio, para preparar 1 L se adicionaron 5 g de $(Ca_3(PO_4)_2)$, por lo que se propone variar entre cantidades menores y mayores a este para descubrir cuál es la cantidad ante la cual reaccionan mejor las bacterias solubilizadoras de fósforo; se proponen las siguientes cantidades: 2.5 g, 7.5 g y 10 g para facilitar el análisis de los resultados que se obtengan. Al evaluar la adición de estas nuevas cantidades se debe ser muy cuidadoso de agregar la cantidad exacta, ya que este compuesto puede afectar el pH del medio y el indicador del mismo, ya que en otros estudios ha ocurrido que en vez de virar de un color púrpura a amarillo una vez empiezan a actuar las bacterias y a liberar ácidos orgánicos, lo que ocurre es que vira de amarillo a púrpura, afectando el fundamento del método.

Por otra parte, es posible que las bacterias solubilizadoras de fósforo posean ciertos requerimientos específicos respecto al sulfato de hierro ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$), por lo que también se podrían variar las cantidades de este compuesto en la preparación del medio de cultivo, probando con a la mitad o el doble de la cantidad que se adicionó inicialmente. Igualmente puede hacerse necesario utilizar un agente secuestrante como el EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) para encapsular el hierro, ya que el ser un elemento con alto potencial reactivo puede afectar la composición del medio.

Igualmente, es importante resaltar que la concentración de microorganismos solubilizadores de fósforo puede variar de un lugar a otro, por lo que también se recomienda variar los lugares de toma de muestras, ya que los cultivos, la humedad, el pH, la temperatura, la presencia de ma-

cro y mesofauna, la materia orgánica entre otros factores químicos y ambientales influyen en la presencia, ausencia o cantidad presente de un determinado microorganismo en el suelo.

Coincidiendo con lo anterior, varios autores señalan que la variabilidad en el número de microorganismos solubilizadores de fósforo puede responder a múltiples causas como el clima, la historia de cultivo del suelo, el tipo de suelo y los cultivos. Sin embargo, es importante mencionar que el método de enumeración utilizado por cada investigador también podría ser causa de la variabilidad (17).

Conclusión

Después de implementar la metodología para el aislamiento de microorganismos solubilizadores de fósforo se determinó que si se logró el aislamiento de bacterias solubilizadoras de fósforo cómo pudo evidenciar en los resultados. Por este motivo se puede concluir que la metodología implementada dio resultados positivos; sin embargo se realizan ciertas sugerencias respecto al medio de cultivo utilizado en el aislamiento para así optimizar los resultados en un próximo estudio.

Agradecimientos:

Los autores manifiestan sus agradecimientos al Programa de Microbiología de la Universidad Libre, Pereira.

Referencias Bibliográficas

1. Lambers H, Shane MW, Cramer MD, Pearse SJ, Veneklaas EJ. Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits. *Ann Bot.* 2006 Oct; 98(4): 693-713. Disponible en: <https://>

- www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2806175/
2. Kucey R. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. *Can Journal Soil Sci.* 1983 Ene; 63: 671–678. Disponible en: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/pdf/10.4141/cjss83-068>
 3. Coyne M. Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio. Madrid: Editorial Panamericana; 2000. p.180 - 185.
 4. Patiño Torres CO; Sanclemente Reyes OE. Los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF): una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible. *Entramado.* 2014 Jul; 10(2): 288-297. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/2654/265433711018.pdf>
 5. Urbanek A. Technical report concerning phosphate fertilizers production from Tachira State rocks phosphate in Venezuela. Warsaw technical Univ. Varsovia. Polonia. 1987.
 6. Nannipieri P, Landi L, Giagnoni L, Renella G. Role of phosphatase enzymes in soil. En: Bunemann EK, Oberson A, Frossard E. Phosphorus in Action. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2011. p. 215-243. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/216036672_Role_of_Phosphatase_Enzymes_in_Soil
 7. Scattareggia JP. Aislamiento y selección de Bacterias Solubilizadoras de Fósforo de un suelo cultivado con tomate para industria (*Solanum lycopersicum* L.). Universidad Nacional de Cuyo. Facultad de Ciencias Agrarias. 2016. Disponible en: http://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitaes/8408/tesis-irnr-scattareggia-juan-pablo-2016.pdf
 8. García RA, Lovaisa NC, Ulla EL. Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfatos del Noroeste Argentino y su efecto en la promoción de crecimiento en maíz (*Zea mays* L.). *Rev Agron Noroeste Argent.* 2015; 35(1): 19-28. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/pdf/ranar/v35n1/v35n1a02.pdf>
 9. Pikovskaya RI. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiología.* 1948; 17: 362-70.28. Disponible en: [http://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkposzje\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1514468](http://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkposzje))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1514468)
 10. Sperber, J. 1958. Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. *Australian. J Agricul Res;* 9 (6): 782-787
 11. Nautiyal CS. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 1999; 170: 265-70. Disponible en <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x/epdf>
 12. Restrepo Franco GM, Marulanda Moreno S, de la Fe-Pérez Y, Díaz-de la Osa A, Lucía-Baldani V, Hernández-Rodríguez A. Bacterias Solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Ciencias Biológicas.* 2015, 46(1). Disponible en: <https://revista.cnice.edu.cu/revistaCB/articulos/bacterias-solubilizadoras-de-fosfato-y-sus-potencialidades-de-uso-en-la-promoci%C3%B3n-del>
 13. Sundara, R. y W. Sinha. 1963. Phosphate dissolving microorganisms in the soil and rhizosphere. *Indian J. Agric. Sci.* 33: 272–278
 14. Lara C, Esquivel Avila LM, Negrete Peñata JL. Bacterias nativas Solubi-

- lizadoras de fosfatos para incrementar los cultivos en el departamento de Córdoba-Colombia. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. 2011; 9(2): 114- 120. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v9n2/v9n2a13.pdf>
15. Corrales Ramírez LC, Arévalo Galvez ZY, Moreno Burbano VE. Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. NOVA – Publicación Científica en Ciencias Biomédicas. 2014; 12(21): 67-79. Disponible en: <http://unicolmayor.edu.co/publicaciones/index.php/nova/article/view/251/502>
16. Becerra JM, Quintero D, Martínez M, Matiz A. Caracterización de microorganismos solubilizadores de fosfato aislados de suelos destinados al cultivo de uchuva (*Physalis peruviana* L.). Rev Colom Cienc Hort. 2011; 5(2): 195-208. Disponible en: www.scielo.org.co/pdf/rcch/v5n2/v5n2a04.pdf
17. Fernández LA, Zalba P, Gómez MA, Sagardoy MA. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. Cienc suelo. 2005; 23(1): 31-37. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/pdf/cds/v23n1/v23n1a04.pdf>