

■ Beneficios de microorganismos solubilizadores de P y K en la recuperación y mantenimiento de suelos agrícolas

A.Velázquez-Gurrola¹ y M.P. Ramos-Alegría¹

¹. Applied Biotechnology South America, S.A. de C.V., México. armenia@abiosamexico.com

En la agricultura moderna se aplican altos niveles de fertilizantes minerales y otros agroquímicos, con el fin de incrementar la producción y cubrir la creciente demanda de alimentos. Aunque el uso de estos insumos presenta ventajas inmediatas en el rendimiento de los cultivos, es bien sabido que su uso puede afectar negativamente la calidad y productividad de los suelos agrícolas. Debido a esta situación, el uso de microorganismos benéficos ha cobrado importancia como alternativa a la fertilización química y se han aislado cepas de bacterias (*Pseudomonas fluorescens*) y hongos capaces de solubilizar fósforo (*Paecilomyces lilacinus*), movilizar potasio (*Trichoderma harzianum*) y azufre (*Bacillus* sp), además de las ya conocidas bacterias fijadoras de nitrógeno (*Azospirillum brasilense*). Al consumarse la relación planta-microorganismo se puede reducir la degradación de los suelos y optimizar el retorno de energía a los sistemas de producción. El incremento en la productividad a base de grandes cantidades de energía no puede ser mantenido indefinidamente. Existe un límite en la capacidad de producción y se encuentra regulado por los costos externos de la energía que se introducen en los agroecosistemas, y la microbiología del suelo figura como una pieza clave, sobre todo en los suelos empobrecidos y sistemas de producción intensivos.

Palabras clave: Fertilidad, Suelo, Microbiología, Potasio, Fósforo.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos de la rizosfera han mantenido una relación estrecha con las plantas desde que éstas últimas iniciaron la colonización de la tierra (Selosse y Le Tacon, 1998) y han contribuido al mantenimiento, funcionamiento y la estabilidad de los ecosistemas mediante su influencia en la diversidad de las especies en las comunidades vegetales (Read, 1998). Esta relación ha favorecido un mecanismo de asociación simbiótica para la adquisición de nutrimentos y agua por parte de la planta y de carbono por parte del microsimbionte. Sin embargo, las actividades agropecuarias han alterado las comunidades naturales para lograr una mayor productividad por unidad de área y, como consecuencia de esta actividad antropocéntrica, se ha acelerado la degradación de los sistemas agrícolas, como el caso de la diversidad genética de *Rhizobium* que por causa de algunas prácticas agrícolas o bien, por la fertilización química a base de NPK, se ha observado una disminución de la diversidad genética en la población de nódulos de algunos cultivares de *Phaseolus vulgaris* (Caballero-Mellado y Martínez-Romero, 1998).

La necesidad de reducir el uso de fertilizantes químicos y productos fitosanitarios de síntesis ha dado paso a la práctica de la inoculación (Ezziyani *et al.*, 2006) y al uso de los llamados biofertilizantes, los cuales se formulan a partir de microorganismos que habitan en el suelo y que están involucrados en la nutrición y crecimiento de las plantas. En la actualidad se ha extendido ampliamente el estudio y aplicación de biofertilizantes a partir de microorganismos solubilizadores de fosfatos, así como también de bacterias promotoras del crecimiento vegetal y bacterias fijadoras de nitrógeno, sin embargo, aunque existen estudios sobre microbios movilizadores de potasio, aún continúa siendo un tema poco desarrollado en la práctica.

El principal propósito del presente estudio fue aislar, purificar e identificar microorganismos fijadores de nitrógeno y solubilizadores de fósforo y potasio, para ser inoculados en conjunto, como un biofertilizante que fomente la mejor asimilación de NPK en los cultivos agrícolas y contribuya a la recuperación y conservación de los suelos mediante la reducción del uso de sales inorgánicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de suelo: Durante octubre del 2013 y mayo del 2015 se colectaron muestras de suelo de aguacate, palma de aceite, uva, hule, cacao, papaya, tomate y sandía de México y Guatemala. La toma de muestra de suelo se realizó entre los 5 y 30 cm de profundidad, en la zona de crecimiento radical (rizosfera) de las plantas, debido a que es donde se encuentra la mayor densidad de microorganismos fitobenéficos. Cada muestra de suelo estuvo constituida por 8 a 10 submuestras y cada muestra fue etiquetada de acuerdo a los datos de la finca, localidad, fecha de recolección, cultivo y colector; para posteriormente asignarle un número de identificación.

Aislamiento y purificación de microorganismos: Para el aislamiento de microorganismos se utilizó el método de conteo viable de células vivas por siembra en superficie (Madigan *et al.* 2004) a partir de las muestras de suelo previamente colectadas. Se realizaron diluciones seriadas con base en 10; se diluyeron 10 g de suelo en 90 ml de agua estéril, hasta 1/107 [ISO_6887-1983(E) y NOM-110-SSA1-1994]. Se tomó 0.1 ml de cada dilución y se colocó en el centro de la caja Petri con medios de cultivo sólidos específicos (Tabla 1), distribuyéndose con perlas de vidrio estériles.

El procedimiento se realizó por duplicado para cada una de las diluciones cultivadas. Las cajas fueron incubadas a 31°+1°C durante 24 horas para el conteo de bacterias y a 27°+1°C por 72 horas para el conteo de hongos. La cuantificación de células viables se efectuó contando las unidades formadoras de colonias (UFC) que crecieron en la superficie del medio de cultivo de la caja Petri, luego se transformó a UFC g⁻¹ de suelo.

Tabla 1. Relación de medios de cultivo utilizados para los cultivos microbianos

Nombre	Uso	Fórmula (1L)	Referencia
Agar Pikovskaya	Aislamiento de solubilizadores de fósforo	Ext. Lev. 0.5 g; C ₆ H ₁₂ O ₆ -10g; Ca ₃ (PO ₄) ₂ -5g; (NH ₄) ₂ SO ₄ -0.5g; KCl-0.2g; MgSO ₄ -0.1g; MnSO ₄ -0.0001g; FeSO ₄ -0.0001g; Agar-15g.	SIGMA, P1602
Agar Pikovskaya Modificado	Aislamiento de solubilizadores de potasio	Ext. Lev. 0.5 g; C ₆ H ₁₂ O ₆ -10g; KNO ₃ -5g; (NH ₄) ₂ SO ₄ -0.5g; KCl-0.2g; MgSO ₄ -0.1g; MnSO ₄ -0.0001g; FeSO ₄ -0.0001g; Agar-15g; Azul de Bromocresol-0.002g.	Correa, 2008
Rojo Congo	Aislamiento de <i>Azospirillum</i> sp	K ₂ HPO ₄ -0.5 g; MgSO ₄ ·7H ₂ O-0.2 g; NaCl-0.1 g; Extracto de levadura-0.5 g; FeCl ₃ ·6H ₂ O-0.15g; Ácido málico-5 g; KOH-4.8g; Agar 20 g; 15 ml sol. Rojo Congo 1:400.	Rodríguez-Cáceres, 1982
Agar Ashby	Aislamiento de fijadores de Nitrógeno	Manitol-5g; K ₂ HPO ₄ -0.2g; MgSO ₄ -0.2g; NaCl-0.2g; K ₂ SO ₄ -0.1g; CaCO ₃ -5g; Agar-15g	Rao, 1999

Para la identificación de bacterias se realizó la tinción de Gram y observación directa al microscopio. Para descartar que las bacterias aisladas fueran fitopatógenas, se realizó la prueba de pudrición de tubérculo de papa, la cual se realizó mediante el siguiente procedimiento: con un tubérculo de papa de la variedad alpha, se lavó, se secó y se desinfectó superficialmente con etanol al 70% seguido de un flameado. Posteriormente se cortaron rebanadas de aproximadamente 5 mm de grosor adicionándole etanol al 70% seguido de un flameado y se colocaron en cajas Petri con papel filtro (previamente esterilizado). A dos rebanadas se les hizo una incisión superficial, una de ellas se inoculó con la bacteria a evaluar, mientras que a otra se le adicionó agua destilada estéril y sirvió como testigo. Finalmente se adicionaron unos 2-3 ml de agua destilada estéril sólo para humedecer el papel y crear un ambiente húmedo que favoreciera el desarrollo del microbio. Los cortes de papa se incubaron a 28°C durante 24-72 h. Después de las primeras 24 horas se prosiguió a palpar con un asa bacteriológica el tejido de cada una de las rebanadas. La prueba resulta positiva si en el lapso de tiempo la rebanada que ha sido inoculada se siente blanda, lo cual indica que la bacteria probada sintetiza enzimas pectolíticas y es muy probable que sea fitopatógena.

En cuanto a la identificación de hongos benéficos, se realizaron cultivos monospóricos a partir de las cepas en estudio, y una vez que se tuvieron los cultivos purificados se procedió a la observación directa al microscopio y su identificación a nivel género, apoyados de claves taxonómicas especializadas. Se puso especial énfasis en hongos solubilizadores de fósforo y solubilizadores de potasio.

Evaluación de la efectividad biológica de un consorcio microbiano como biofertilizante: A partir de los microorganismos aislados se procedió a la preparación de un inoculante que combinara bacterias fijadoras de nitrógeno, solubilizadores de potasio y fósforo para ser empleado como biofertilizante en forma líquida estabilizados por actividad del agua y aplicados en una dosis de 1 L/Ha/aplicación vía sistema de riego o drench. Los estudios se llevaron a cabo en diversos cultivos, climas y regiones de México y Guatemala durante el período 2014 – 2015. Se determinaron parámetros de desarrollo vegetativo y análisis nutricional del tejido vegetal en cada caso.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento y purificación de microorganismos: Se analizaron en total 122 muestras de suelo de aguacate, palma de aceite, uva, hule, cacao, papaya, tomate y sandía de México y Guatemala. De todos los microorganismos que se desarrollaron en los medios de cultivo específico, se seleccionaron 10 cepas con potencial aplicación en la fijación de nitrógeno y solubilización de fósforo y potasio (Tabla 2). Entre los microorganismos purificados predominan las *Pseudomonas* sp que solubilizan fósforo y potasio, además de una cepa de *Bacillus* sp, *Azospirillum* sp y *Azotobacter* sp como fijadoras de nitrógeno. Como caso particular, se reporta el aislamiento de dos cepas de *Trichoderma* sp que mostraron capacidad solubilizadora de potasio.

Tabla 2. Microorganismos con potencial aplicación como biofertilizantes

Cultivo	Microorganismo	Actividad Biológica	Lugar de Colecta
Aguacate	<i>Pseudomonas</i> sp	Solubiliza potasio	Michoacán, México
Palma de aceite	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Trichoderma harzianum</i>	Solubiliza fósforo Solubiliza potasio	Petén, Guatemal
Banano	<i>Pseudomonas</i> sp	Solubiliza potasio	Chiapas, México
Sandía	<i>Pseudomonas</i> sp <i>Azotobacter</i> sp <i>Trichoderma</i> sp <i>Paecilomyces</i> sp	Solubiliza fósforo Fija nitrógeno Solubiliza potasio Solubiliza fósforo	Sonora, México
Tomate	<i>Azospirillum</i> sp <i>Pseudomonas</i> sp <i>Penicillium</i> sp <i>Bacillus</i> sp	Fija nitrógeno Solubiliza potasio Solubiliza potasio Solubiliza fósforo	Sinaloa, México

Los resultados obtenidos concuerdan con estudios previos, en los cuales se ha determinado existe un importante número de microorganismos con capacidad solubilizadora de fósforo, incluyendo bacterias, hongos, actinomicetos e incluso algas (Sharma *et al.*, 2013). Además de *Bacillus* y *Pseudomonas*, se han reportado otras bacterias y hongos que no pierden su capacidad solubilizadora al transferirlos repetidamente de un medio de cultivo a otro (Kucey, 1983). Venkateswarlu y colaboradores (1984), determinaron que los hongos solubilizadores de fósforo producen una mayor proporción de ácidos que las bacterias y consecuentemente exhiben una mayor capacidad para solubilizar nutrientes.

Después del nitrógeno y el fósforo, el potasio es el nutriente vegetal de mayor importancia ya que es esencial para el desarrollo de la planta y juega un papel fundamental en la síntesis proteica, fotosíntesis, activación enzimática, así como en la resistencia a enfermedades e insectos (Rehm y Schmitt, 2002). Gran cantidad de microorganismos en el suelo son capaces de solubilizar formas “no disponibles” de potasio mediante la liberación de ácidos orgánicos (Groudev, 1987; Ullman *et al.*, 1996). Dentro de los géneros de hongos y bacterias con capacidad solubilizadora de potasio se han mencionado *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium* y *Aspergillus* (Prajapat *et al.*, 2013), lo cual es acorde a los resultados obtenidos en el presente trabajo, a excepción del género *Trichoderma*, cuya capacidad solubilizadora de potasio no había sido descrita anteriormente. En este caso, se aislaron dos cepas de *Trichoderma* de los cultivos de aguacate y palma de aceite, con potencial aplicación en la solubilización de potasio. En la Figura 1 puede observarse el efecto de *Trichoderma* en la solubilización de potasio a las 24 y 72 horas posterior a su cultivo *in vitro* (Agar Pikovskaya Modificado, adicionado con fosfato de potasio dibásico y colorante púrpura de bromocresol).

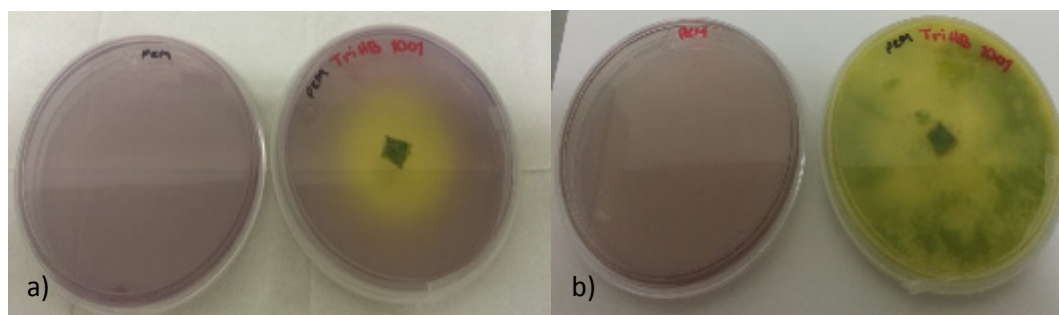


Figura 1. Efecto de *Trichoderma harzianum* en la solubilización de potasio a) a las 24 horas y b) 72 horas de cultivo *in vitro*.

En la figura puede observarse cómo el medio de cultivo agar Pikovskaya modificado que adicionado con el indicador púrpura de bromocresol luce un color morado, al transcurrir 24 horas de cultivado el hongo empieza a virar la coloración a amarillo, producto del cambio de pH debido a la liberación de ácidos orgánicos por parte del microorganismo. A las 72 horas el hongo ha virado en su totalidad el color del medio de cultivo al extender su crecimiento micelial a lo largo de toda la caja Petri.

Evaluación de la efectividad biológica de un consorcio microbiano como biofertilizante:

Se formuló una mezcla microbiana con el fin de utilizarla como biofertilizante al inocular diversos cultivos agrícolas. Un litro de la mezcla utilizada contiene los siguientes microorganismos en la concentración especificada:

Microorganismo	Concentración
<i>Azospirillum brasilenses</i>	1 X 10 ⁸ UFC/L
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1 X 10 ⁹ UFC/L
<i>Pseudomonas</i> sp	1 X 10 ⁹ UFC/L
<i>Bacillus subtilis</i>	1 X 10 ⁸ UFC/L
<i>Glomus intraradices</i>	3000 propágulos/ml

El *Trichoderma harzianum* se inoculó en polvo a razón de 1 Kg/Ha/aplicación con una concentración de 1 X 10⁸ UFC/Kg. La frecuencia de aplicación del consorcio microbiano líquido más el *Trichoderma* fue de 15 – 30 días dependiendo del cultivo, hasta completar 3 – 6 aplicaciones por año.

En el caso del cultivo de aguacate se llevó a cabo un ensayo en Michoacán, México, donde se observó un efecto positivo en la corrección de problemas de clorosis y deficiencias después de 15 días de la primera aplicación. El cultivo tratado mostró un mejor desarrollo vegetativo después de la segunda aplicación del consorcio microbiano. Adicionalmente los parámetros microbiológicos del suelo mejoraron considerablemente, específicamente los índices de diversidad biológica en comparación con el testigo no inoculado (Tabla 3). El suelo inoculado muestra una mayor diversidad de acuerdo al índice de Shannon aunque, no se observaron diferencias significativas en el índice de riqueza de especies y la relación hongos:bacterias. Estos resultados sugieren que la inoculación de microorganismos podría contribuir al mejoramiento de la biología del suelo, especialmente aquellos con bajos índices de materia orgánica o, agotados.

Tabla 3. Efecto de la inoculación de microorganismos en los índices de diversidad del suelo en el cultivo de aguacate.

Índice	Tratado	Testigo	Rango
Diversidad de especies	0.53	0.38	0.5 – 3
Riqueza de especies	0.035	0.034	0 – 1
Hongos:Bacterias	0.001	0.001	0.1 – 0.01

En plantas de café catimor en vivero en Guatemala, se realizaron pruebas incorporando microorganismos y reduciendo la cantidad de fertilizante añadido (12-8-16+3Mg y 16-8-12+2MgO+5S+ME) para observar el efecto en desarrollo vegetativo. Los tratamientos fueron 100% fertilizante + microbios, 75% fertilizante + microbios, 50% fertilizante + microbios y 100% fertilizante como tratamiento testigo. El tratamiento con fertilizante al 100% sin inocular mostró un menor desarrollo vegetativo que cualquiera de los tres tratamientos que combinaron microbios + fertilizantes. No se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento con 100% y 50% de fertilizante más microbios, lo cual sugiere que al inocular microorganismos podría reducirse considerablemente el aporte mineral (Figura 2 y 3).

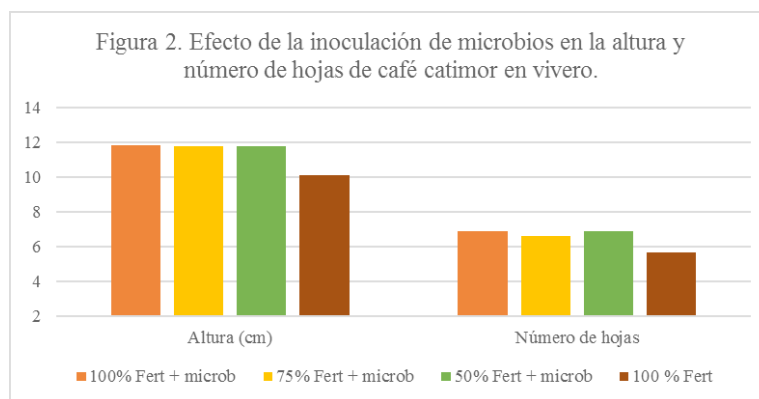


Figura 3. Desarrollo vegetativo de plantas de café catimor en vivero.

Se inoculó con microorganismos solubilizadores un cultivo de palma africana de 21.6 meses de edad, y después de 55 días después de la primera aplicación se observó que la cantidad de racimos se incrementó en un 89.2% y la cantidad de flores hembras en un 27.65%; la cantidad de flores macho disminuyó en un 73.3% y las flechas nuevas se incrementaron en un 17% (Tabla 4). La fertilización del cultivo se había llevado a cabo 60 días antes de la prueba en dosis de 400 g x planta/mezcla física.

Tabla 4. Parámetros de desarrollo vegetativo de palma africana inoculada con microorganismos (Tratado) y sin inocular (Testigo)

Parámetro	Tratado	Testigo
Total de hojas	3,263	3,196
Promedio de hojas	32.96	32.28
Total de racimos	70	37
Flor tesis hembra	217	170
Flor macho	4	15
Flechas nuevas	231	198

Los resultados obtenidos en los diversos cultivos estudiados indican que al inocular microorganismos, estos contribuyen a la liberación y movilización de nutrientes incidiendo directamente en el desarrollo vegetativo y productividad del cultivo. Estos resultados plantean la posibilidad de reducir el aporte de fertilizantes químicos sin detrimento del desarrollo del cultivo, lo cual contribuiría a reducir costos de fertilización y mejorar las condiciones microbiológicas del suelo a través de la inoculación periódica de microbios benéficos.

CONCLUSIONES

Los microorganismos fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fósforo y potasio se encuentran ampliamente distribuidos en gran diversidad de suelos y cultivos agrícolas, sólo que algunos muestran mayor actividad que otros y sólo algunas especies pueden ser empleadas en la formulación de biofertilizantes con aplicación agrícola.

La inoculación de consorcios de microorganismos puede incrementar la diversidad microbiológica del suelo, en especial en suelos empobrecidos o agotados, permitiendo el aprovechamiento del acervo mineral de los mismos y mejorando las condiciones de desarrollo de los cultivos.

Trichoderma harzianum es una especie ampliamente utilizada por sus propiedades antagonistas que también contribuye a mejorar el estado general de salud de los suelos a través de la solubilización de nutrientes como el potasio. Este hongo podría ser un excelente complemento en los biofertilizantes microbianos para cultivos con alta demanda de potasio.

Para la formulación de un biofertilizante es importante considerar una mezcla microbiana diversa que se adapte a diferentes condiciones ambientales de modo que pueda emplearse en todo tipo de cultivo.

REFERENCIAS

- Caballero-Mellado, J. and E. Martínez-Romero. 1999. Soil fertilization limits the genetic diversity of *Rhizobium* in bean nodules. *Symbiosis*, 26: 111-121.
- Correa, M., 2008. Evaluación de caracteres PGPR en Actinomicetos e Interacciones de estas Rizobacterias con Hongos Formadores de Micorrizas. Granada. http://hera.ugr.es/tesisugr/17716093.pdf?origin=publication_detail
- Ezziyyani M., Sid-Ahmed A., Pérez-Sánchez C., Requena M.E. y Candela M.E. 2006. Control biológico por microorganismos antagonistas. *Revista Horticultura* 191: Marzo. P. 8-15.
- Groudev, S.N., 1987. Use of heterotrophic microorganisms in mineral biotechnology. *Acta Biotechnology* 7:299-306.
- Kucey RMN, 1983. Phosphate solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. *Can J. Soil Sci.* 63:671-678.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J, 2004 Brock. *Biología de los microorganismos*. 10ª. Ed. Rev. Pearson Educación, S.A. Madrid, Esp. 1096 p.
- Prajapat K., Sharma M.C. y Modi H.A., 2013. Growth promoting effect of potassium solubilizing microorganisms on okra (*Abelmoschus esculantus*). *Intl. Journal of Agr. Sci and Res (IJASR)*. ISSN 2250-0057 Vol. 3, Issue 1, Mar 2013, 181 – 188.
- Rao, N.S., 1999. *Soil microorganisms and plant growth*. Oxford and IBH Publ. New Delhi, India. 407 p.
- Read, D., 1998. Plants on the web. *Nature*. 396:22-23.
- Rehm, G. y Schmitt M., 2002. Potassium for crop production. Retrieved February 2, 2011, from Regents of the University of Minnesota website; <http://www.extension.umn.edu/distribution/cropsystems/dc6794.html>
- Rodríguez-Cáceres, E.A., 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 44, No. 4, p. 990-991.
- Selosse, M-A. y F. Le Tacon., 1998. The land flora: a phototroph-fungus partnership? *Trends in Ecology and Evolution* 13(1):15-20.
- Sharma S.B., Sayyed R.I., Trivedi M.H. y Gobi, T.A., 2013. Springer Plus 2:587. <http://www.springerplus.com/content/pdf/2193-1801-2-587.pdf>
- SIGMA – PN – P1602. <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Datasheet/4/p1602dat.pdf>
- Ullman W.J., Kirchner D.L. y Welch S.A., 1996. Laboratory evidence for microbially mediated silicate mineral dissolution in nature. *Chemical Geology* 132:11-17.
- Venkateswarlu B., Rao A.V., Raina P. y Ahmad N., 1984. Evaluation of phosphorus solubilization by microorganisms isolated from arid soil. *J. Indian Soc. Soil Sci.* 32:273-277.