

# CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS DE INTERÉS AGRÍCOLA FRENTE A DIFERENTES FUENTES DE FÓSFORO.

Yoania Ríos Rocafull, Noel Arozarena, Bernardo Dibut, Marisel Ortega, Katia Cañizares, Janet Rodríguez, Alfredo Lino, Grisel Tejeda, Hipólito Ramos, Jesús Fernández, Bismark Creagh, María Elena Simanca, Rosa García, Ulises Socas y Luis Fey.

*Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt”*

**INIFAT**

[yoania@inifat.co.cu](mailto:yoania@inifat.co.cu)

## Resumen

La combinación de fuentes de fósforo y microorganismos solubilizadores y/o estimuladores del crecimiento abre un nuevo espacio de investigación en el campo de la biofertilización y la nutrición vegetal. El comportamiento en condiciones de placas petri de *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus megatherium* var *phosphaticum* y *Penicillium bilaii*, demostró que los tres microorganismos se mantienen viables frente a cuatro fuentes de fósforo: superfosfato triple, roca fosfórica marroquí y roca fosfórica cubana acidulada y sin acidular, con un crecimiento superior a los 0.5 cm diámetro. En iguales condiciones *B.megatherium* y *P.bilaii* son capaces de solubilizar fósforo en presencia de estos sustratos, al observarse halos de solubilización de entre 0.1 y 0.5 cm. La concentración de los microorganismos solubilizadores en sus productos puros y en todas las combinaciones posibles entre ellos y con la bacteria *A.chroococcum*, corroboró la posibilidad de su empleo en sistemas agrícolas en conjunto con fuentes de fósforo, pues ambas bacterias presentan concentraciones superiores a las  $10^8$  UFC/ml tras mantenerse 168 horas a temperatura ambiente, frente a los diferentes sustratos en estudio. El hongo, por su parte, muestra un abundante crecimiento micelial que demuestra su supervivencia bajo esta condiciones. Se destaca por sus resultados la combinación de *A.chroococcum* y *B.megatherium* (AZOMEG), así como los productos puros de *B.megatherium* y *P.bilaii*, por lo que los mismos constituyen las bases para realizar estudios posteriores.

**Palabras Claves:** fuentes de fósforo, crecimiento microbiano, microorganismos biofertilizantes.

## Abstract

Phosphorus sources, phosphate solubilizing organisms and growth promoting bacteria combination open a new space on biofertilization researches and vegetal nutrition. *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus megatherium* var *phosphaticum* and *Penicillium bilaii* behavior on Petri box condition showed the capacity of these organisms to growth against Marroquí phosphoric rock, Cuban phosphoric rock with and without acid treatment and SST. In same conditions *B.megatherium* and *P.bilaii* are able to solubilize phosphorous. They showed solubilization inhibition zone between 0.1 and 0.5 cm. The solubilizing microorganism's concentration also showed the possibility to mix it and phosphoric rock. *B.megatherium* and *A.chroococcum* concentration after 168 hour on atmospheric conditions was  $10^8$  UFCxmL<sup>-1</sup>. *P. bilaii* has a good micelial growth. *A.chroococcum* and *B.megatherium* (AZOMEG) combination as well as *B.megatherium* and *P.bilaii* products presented the best results. That is why they are the bases for future studies.

**Key words: phosphorus sources, microbial growth, biofertilizers microorganisms.**

## Introducción

El fósforo es un elemento esencial para la planta (Ehrlich, 1990). En el ecosistema suelo gran parte del mismo se encuentra formando compuestos no solubles, por lo que no puede ser utilizado por los cultivos en su nutrición (Goldstein, 1986).

No obstante, muchos microorganismos, dentro de los que se incluyen bacterias y hongos, son capaces de solubilizar el fósforo inutilizable por la excreción de ácidos orgánicos e inorgánicos y enzimas, transformándolo a formas asimilables por los cultivos (Dibut, 2005).

La incorporación en sistemas agrícolas de fuentes de fósforo en combinación con microorganismos solubilizadores y/o estimuladores del crecimiento, posibilitaría el diseño de nuevas estrategias de manejo nutrimental que permitan un mejor aprovechamiento de los nutrientes con un menor daño al ecosistema. De esta forma la planta podría disponer de elementos como el nitrógeno y el fósforo, a la vez que se beneficiaría por el efecto de las diferentes sustancias promotoras del crecimiento producida por los microorganismos (Martínez Viera y Dibut., 2003).

Este trabajo tuvo como objetivo estudiar el efecto sobre el crecimiento de *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus megatherium* var *phosphaticum* y *Penicillium bilaii*, de cuatro fuentes de fósforo que pueden utilizarse como portadores de este elemento en el manejo de la nutrición vegetal.

## Materiales y Métodos

Las fuentes de fósforo utilizadas en el estudio fueron las siguientes: roca fosfórica cubana natural (RFN) y acidulada (RFA), superfosfato triple (SST) y roca fosfórica marroquí (RFM), reconocida esta última por su excelente calidad.

Para determinar el efecto que estos sustratos producen sobre el crecimiento de *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus megatherium* var *phosphaticum* y *Penicillium bilaii* en condiciones de placas Petri, se utilizó el medio sólido agar base, al que se le adicionó 2

g/L de cada roca fosfórica para el caso de *A.chroococcum* y *P.bilaii* y 5 g/L para *B.megatherium*, según la cantidad de fósforo que establecen los medios descritos para el crecimiento de cada uno de ellos (Subba Rao, 1982; BIOCEN, 2001).

Las fermentaciones de los microorganismos se realizaron en condiciones de zaranda rotatoria (200 r.p.m y 32°C de temperatura, durante 48 horas). Se utilizó el medio Dimargón (Dibut *et al.*, 1994) para *A.chroococcum*, caldo nutriente (BIOCEN, 2001) para *B.megatherium* y Chapeck (BIOCEN, 2001) para *P.bilaii*. Al medio agarizado se le abrieron pozos con un sacabocados de 7 mm, los que se rellenaron con los productos finales de la fermentación. Igualmente se sembraron, para cada caso, placas con una estría central. La respuesta microbiana se determinó a partir de la medición del halo de crecimiento y del halo de solubilización, en caso de estar éste presente.

La cinética del crecimiento de los microorganismos se realizó mediante el conteo de UFC/mL (ISO 488: 1991 e ISO 6887: 1993) al finalizar el proceso fermentativo y a las 12, 24, 48, 72, 120 y 168 horas de incubación a temperatura ambiente. Para ello, por cada 100 mL de volumen final de producto, tanto de los microorganismos solubilizadores puros, como de las posibles combinaciones entre ellos y con *A.chroococcum* (tabla 1), se adicionó 1 gramo de roca fosfórica.

Tabla 1. Variantes microbianas evaluadas en el estudio.

Variante	Combinación microbiana
1	<i>Penicillium bilaii</i>
2	<i>Bacillus megatherium</i>
3	<i>P.bilaii</i> + <i>A.chroococcum</i>
4	<i>B.megatherium</i> + <i>A.chroococcum</i>
5	<i>P.bilaii</i> + <i>B.megatherium</i>
6	<i>B.megatherium</i> + <i>A.chroococcum</i> + <i>P.bilaii</i>

## Resultados y Discusión

Según los valores de los halos de crecimiento que se muestran en la Tabla 2, ninguna de las fuentes de fósforo utilizadas impiden el desarrollo de *A.chroococcum*, *P. bilaii* y *B.megatherium*.

Para ambas determinaciones (estrias o pozos) los resultados alcanzados al utilizar roca fosfórica de procedencia nacional y marroquí son muy similares, lo que indica que puede emplearse la primera como portador de fósforo en el manejo agrícola, en combinación con estos microorganismos, sin necesidad de importaciones por problemas de compatibilidad.

Las diferencias entre el halo de crecimiento de *A.chroococcum* al utilizar la roca fosfórica nacional acidulada y sin acidular puede deberse a que, en el segundo caso, el material presenta gran cantidad de compuestos cálcicos. Este tipo de sustancias, según Martínez Viera y Dibut., (2003) y Dibut (2005), estimulan el crecimiento de la especie.

Se demuestra además que los microorganismos solubilizadores (*B.megatherium* y *P.bilaii*) son capaces de transformar al menos una parte del fósforo que portan los

sustratos en estudio, teniendo en cuenta la presencia de halos de solubilización en ambos casos. Igualmente existe gran similitud entre los valores que se obtienen al utilizar la roca fosfórica nacional y la marroquí, lo que ratifica la posibilidad de su empleo en la agricultura con buenos resultados.

Tabla 2. Comportamiento de *A.chroococcum*, *P. bilaii* y *B.megatherium*, en condiciones de placas Petri, frente a diferentes fuentes de fósforo.

Microorganismo		Fuentes de fósforo (halo (cm±σ))			
		RFN	RFA	RFM	SST
<i>A.chroococcum</i>	Pozo	0.75 ± 0.15	0.5 ± 0.15	0.64 ± 0.16	0.41 ± 0.03
	Estría	0.7	0.55 ± 0.05	0.65 ± 0.05	0.45 ± 0.05
	Solubilización	-	-	-	-
<i>B.megatherium</i>	Pozo	0.52 ± 0.05	0.4 ± 0.08	0.6 ± 0.12	2.5 ± 0.35
	Estría	0.45 ± 0.05	0.45 ± 0.05	0.45 ± 0.05	2.75 ± 0.25
	Solubilización	0.2	0.1	0.1	0.5
<i>P.bilaii</i>	Pozo	0.65 ± 0.05	0.66 ± 0.07	0.76 ± 0.09	0.64 ± 0.07
	Estría	0.7	0.5	0.7	0.45 ± 0.05
	Solubilización	0.1	0.1	0.1	0.1

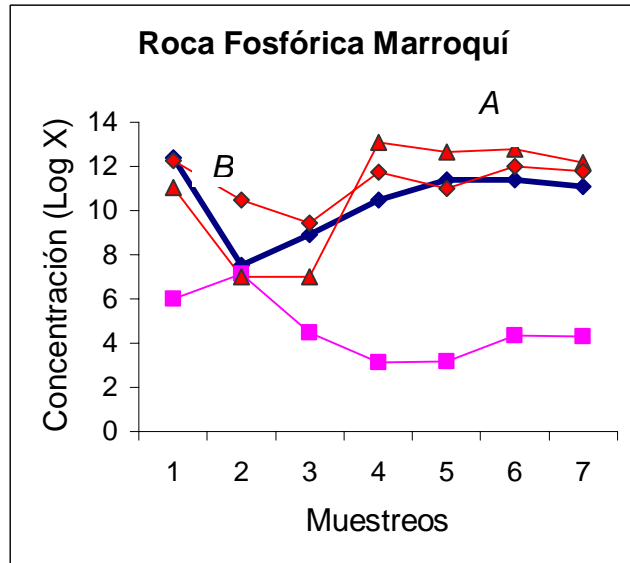
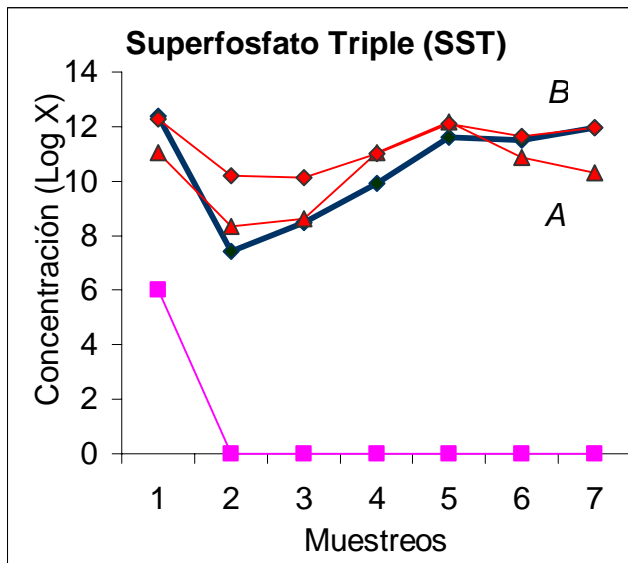
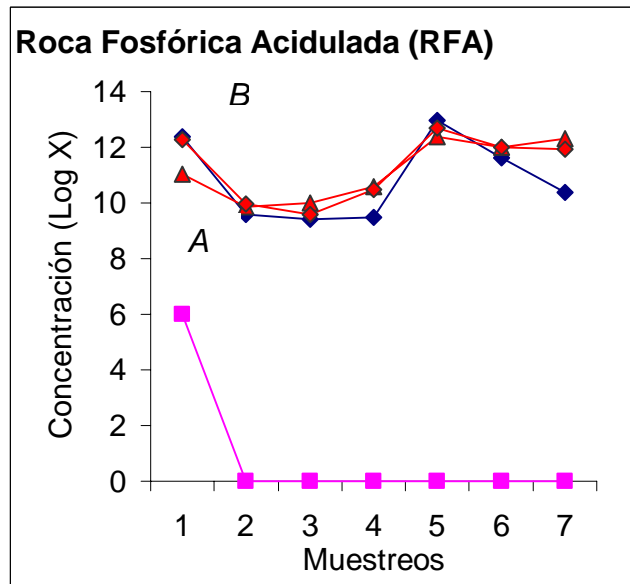
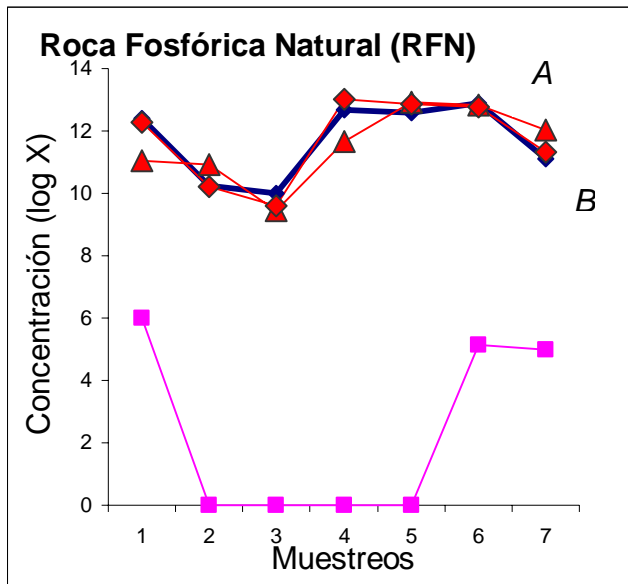
Los valores de concentración obtenidos en la cinética de crecimiento de los microorganismos hacen válido el empleo de las variantes estudiadas según las normas de la FAO (1991).

Las mejores variantes (gráfico 1) fueron las siguientes: *B.megatherium*, *P.bilaii* y la combinación de *A.chroococcum* y *B.megatherium*. Para este último caso, en la mayoría de los sustratos es notable la estimulación del crecimiento del microorganismo solubilizador, dada, probablemente, por la presencia en el medio del nitrógeno liberado por *A.chroococcum*.

Aunque se observa un decremento en la concentración de *P.bilaii* se debe tener en cuenta que en el gráfico se reflejan valores de UFCx $\text{mL}^{-1}$ , los cuales son inversamente proporcionales al crecimiento micelial. Al respecto, se pudo constatar que, a lo largo de todo el período de estudio, el hongo desarrolló una gran cantidad de micelio que avala su supervivencia bajo estas condiciones experimentales.

En el caso de las combinaciones de *B.megatherium* y *P.bilaii*, y de *A.chroococcum* y el hongo, se observa el establecimiento de una relación antagonica que afecta el desarrollo de la bacteria, la cual puede deberse a una competencia por los nutrientes o a la liberación de sustancias que detengan su crecimiento y multiplicación. Esta relación negativa se hace mucho más evidente para el segundo caso, donde el valor de la concentración decae, de  $10^{12}$  UFC/mL al iniciar el período de incubación, a  $10^6$  UFCx $\text{mL}^{-1}$  al finalizar el mismo (168 horas).

La combinación de los tres microorganismos tampoco arrojó resultados positivos, probablemente por la razón referida anteriormente.



Leyenda:

— *P.bilai*      — *B.megatherium*      — *B.megatherium* (B) + *A.chroococcum* (A)

Gráfico 1. Comportamiento de la concentración de las mejores variantes microbianas evaluadas frente a las cuatro fuentes de fósforo, durante todo el período de estudio.

Recomendamos, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, la realización de investigaciones posteriores donde se utilicen las fuentes de fósforo de factura nacional y los microorganismos *B.megatherium*, *P.bilai* y la combinación de *A.chroococcum* y *B.megatherium*.

## Conclusiones

1. El superfosfato triple, la roca fosfórica nacional acidulada y sin acidular, y la roca fosfórica marroquí, no inhiben el crecimiento de *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus megatherium* var phosphaticum y *Penicillium bilaii*.
2. *B.megatherium* y *P.bilaii* son capaces de solubilizar fósforo en presencia de las fuentes estudiadas.
3. *B.megatherium*, *P.bilaii* y la combinación de *A.chroococcum* y *B.megatherium* constituyen variantes promisorias para futuros trabajos que combinen fuentes de fósforo y microorganismos biofertilizantes.
4. Las rocas fosfóricas cubanas pueden utilizarse en combinación con microorganismos biofertilizantes, con la obtención de resultados microbiológicos similares a los de la roca fosfórica marroquí, reconocida internacionalmente por su calidad.

## Recomendaciones

Implementar diferentes estrategias de fertilización integral donde se incluyan las rocas fosfóricas cubanas y las mejores variantes microbianas obtenidas en este estudio.

## Bibliografía

- BIOCEN. (2001). Manual de Medios de Cultivo. La Habana. Centro Nacional de Biopreparados. BIOCEN.
- Dibut, B. (2005). INIFAT. Laboratorio de Microbiología. Comunicación personal.
- Dibut, B., Martínez Viera, R y González, R. (1994). Dimargón, nuevo medio de cultivo para la producción industrial de biopreparados a base de *Azotobacter chroococcum*. Cultivos Tropicales. 15 (1): 14-15.
- Ehrlich, H.L. (1990). Mikrobiologische und biochemische Verfahrenstechnik. In: Einsele A. Finn RH, Samhaber W, editors. Geomicrobiolgy. "nd ed. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft.
- FAO. (1991). Expert consultation on legume inoculant production and quality control, Roma, 144 pp.
- Goldstein, A.H. (1986). Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. Ann. J. Altern. Agri. 1: 51-57.
- ISO 4833: 1991 (e). (1991). Microbiology-general guidance for the enumeration of microorganism-colony count technique at 30°C.
- ISO 6887: 1993 (E). (1993). International Standard. Microbiologically-General guidance for the preparation of dilutions for microbiology examination.
- Martínez Viera, R. y B. Dibut (2003). Los biofertilizantes como pilares básicos de la agricultura sostenible. Publicación electrónica del FIRA del Banco de México, 36 pp
- Subba Rao, N.S. (1982). Biofertilizers in Agriculture. Oxford and IBN, publ. Co, New Delhi, 186 pp.