

Aislamiento e identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos y su potencial para disolver fosfato tricálcico

GAYOSSO-BARRAGÁN, Odilon*†, RODRÍGUEZ-HERRERA, Sergio Alfredo, LÓPEZ-BENÍTEZ, Alfonso y LUEVANOS-ESCAREÑO, Miriam Paulina

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Escuela de ciencias biológicas, Universidad Autónoma de Coahuila, Torreón Coahuila, México

Recibido Enero 4, 2017; Aceptado Marzo 16, 2017

Resumen

El objetivo de este estudio fue aislar e identificar bacterias solubilizadoras de fosfatos de la rizósfera de plantas de *Solanum rostratum* Dunal y evaluar su potencial para disolver fosfato tricálcico en medio Pikovskaya. Se tomaron muestras de suelo rizosférico para realizar diluciones seriales hasta 10^{-5} , las muestras se sembraron en cajas Petri con medio de cultivo Pikovskaya (PVK), se evaluó el índice de eficiencia solubilizadora de fosfatos (ISF) y el cambio de pH durante siete días. Se aislaron y purificaron 20 cepas bacterianas mediante diluciones seriadas, de las cuales solo cinco conservaron su capacidad solubilizadora al momento de realizar reaislamientos. Se registraron índices de solubilización con valores de 2.25, 2.22 y 2.17 con diferencias significativas. Las cinco cepas de bacterias estudiadas disminuyeron el pH del medio PVK en comparación con el control estéril no inoculado incubado durante siete días. El pH disminuyó gradualmente durante los primeros días de incubación hasta valores en el rango de 4.35 y 3.10. Las cepas evaluadas a nivel de laboratorio mostraron potencial para disolver fosfato tricálcico y se sugiere realizar evaluaciones posteriores a nivel de campo.

Rizosfera, índice de solubilización, diluciones seriadas, medio Pikovskaya

Abstract

The objective of this study was to isolate and identify phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of *Solanum rostratum* Dunal plants and to evaluate their potential to dissolve tricalcium phosphate in Pikovskaya medium. Samples of rhizospheric soil were sampled for serial dilutions up to 10^{-5} , samples were seeded in Petri dishes with Pikovskaya culture medium (PVK), the phosphate solubilizing efficiency index (ISF) and pH change were evaluated for seven days. Twenty bacterial strains were isolated and purified by serial dilutions, of which only five retained their solubilizing capacity at the time of re-inoculation. Solubilization rates were recorded with values of 2.25, 2.22 and 2.17 with significant differences. The five bacterial strains studied decreased the pH of the PVK medium compared to the uninoculated sterile control incubated for seven days. The pH gradually decreased during the first days of incubation to values in the range of 4.35 and 3.10. The strains evaluated at the laboratory level showed potential to dissolve tricalcium phosphate and it is suggested to carry out subsequent evaluations at the field level.

Rhizosphere, solubilization index, serial dilutions, Pikovskaya medium

Citación: GAYOSSO-BARRAGÁN, Odilon, RODRÍGUEZ-HERRERA, Sergio Alfredo, LÓPEZ-BENÍTEZ, Alfonso y LUEVANOS-ESCAREÑO, Miriam Paulina. Aislamiento e identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos y su potencial para disolver fosfato tricálcico. *Revista de Investigación y Desarrollo* 2017, 3-7: 33-37

* Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: gayosso_0188@yahoo.com.mx)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

Introducción

Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) benefician el desarrollo de las plantas a través de mecanismos como la producción de fitohormonas, el antagonismo contra fitopatógenos por producción de sideróforos y la solubilización de fosfato mineral. Las bacterias solubilizadoras de fosfato constituyen un grupo importante de PGPR, son capaces de adaptarse y colonizar la rizósfera y de favorecer su desarrollo por medio de la solubilización de compuestos como fosfato tricálcico y rocas fosfóricas (Buono y Ulla, 2016).

El fósforo (P) es el segundo elemento clave importante después del nitrógeno como nutriente mineral en términos de requerimiento cuantitativo de la planta. Aunque es abundante en suelos, tanto en formas orgánicas como inorgánicas, su disponibilidad es restringida, ya que se presenta principalmente en formas insolubles (Sharma *et al.* 2013).

Las bacterias que solubilizan fosfatos asociadas a las raíces de las plantas (PSB) han sido consideradas como una de las posibles alternativas para reducir la aplicación de fertilizantes fosfatados inorgánicos y promover el crecimiento de las plantas, se sabe que mejoran la solubilización del fósforo fijo del suelo y de los fosfatos aplicados, lo que da como resultado un mayor rendimiento de los cultivos agrícolas (Islam *et al.* 2007).

Los principales mecanismos de solubilización de P empleados por microorganismos del suelo incluyen: (1) liberación de compuestos complejantes o disolventes minerales (Aniones de ácidos orgánicos, sideróforos, protones, iones hidroxilo, (2) liberación de enzimas extracelulares (mineralización bioquímica de P) y (3) liberación de P durante la degradación del sustrato (mineralización biológica P) (McGill y Cole 1981).

Existen diversos tipos de PSB caracterizados que pertenecen a diferentes grupos filogenéticos: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Mesorhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Erwinia* (Rodríguez y Fraga, 1999).

El objetivo de este estudio fue aislar e identificar bacterias solubilizadoras de fosfatos de la rizósfera de plantas de *Solanum rostratum* Dunal y evaluar su potencial para disolver fosfato tricálcico en medio Pikovskaya

Materiales y métodos

Aislamiento y purificación de poblaciones bacterianas

A partir de las raíces de plantas de *Solanum rostratum* Dunal, seleccionadas aleatoriamente y crecidas en zonas agrícolas de Buenavista Saltillo, Coahuila, se tomaron muestras de suelo rizosférico, las cuales se mezclaron y homogenizaron para conformar una muestra de 200 g de suelo, se recogieron en bolsas plásticas, se almacenaron en una nevera y se transportaron al Laboratorio de Patosistemas Agrícolas de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

De la muestra original se tomó 1 gramo de suelo y en agua destilada estéril se efectuaron diluciones seriales de la muestra hasta 10^{-5} . A partir de las diluciones 10^{-3} a 10^{-5} se agregó 10 μ l de cada solución a cajas Petri con medio de cultivo Pikovskaya (PVK) (en g L⁻¹: glucosa, 10; Ca₃(PO₄)₂, 5; (NH₄)₂SO₄, 0,5; NaCl, 0,2; MgSO₄·7H₂O, 0,1; KCl, 0,2; extracto de levadura, 0,5; MnSO₄·H₂O, 0,002; FeSO₄·7H₂O, 0,002; agar, 15) (Pikovskaya, 1948).

El halo transparente que se formó alrededor de las colonias, en la medida que ocurrió la solubilización, constituyó el indicador de actividad.

Índice de solubilización de fosfatos (ISF)

En las cepas que presentaron un halo transparente alrededor de las colonias se evaluó el índice de eficiencia solubilizadora de fosfatos (ISF), esta variable hace referencia a la capacidad relativa de los microorganismos de utilizar como sustrato las fuentes insolubles de este nutriente, tornándolas disponibles en el medio. Para ello, los aislamientos obtenidos fueron reaislados en medio PVK inoculados mediante punción directa e incubadas a 28°C, la evaluación se realizó a los cinco días después de la siembra. La medida de ISF se hizo con cuatro repeticiones por cepa en un diseño completamente al azar. El ISF se calculó por la relación: (Zona del halo de solubilización + Diámetro de la colonia) / (Diámetro de la colonia) (Susilowati y Syekhfani, 2014), con los resultados se realizó análisis de varianza con el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System) y comparación de medias utilizando la prueba de Duncan ($P \leq 0,05$).

Los aislamientos obtenidos se purificaron y conservaron sobre el mismo medio, para análisis posteriores. En todos los casos, los cultivos microbianos se mantuvieron en incubadora a 28 °C y luz artificial.

Cambio de pH. Se añadió 1 mL de cultivo de tres días en agua destilada estéril (que contenía aproximadamente 1×10^3 UFC) a 100 mL medio estéril de caldo Pikovskaya (PVK) en matraz cónico de 250 mL y se mantuvo en agitación durante siete días. El medio esterilizado no inoculado sirvió como control. El pH inicial y el cambio en el pH se observaron cada día durante una semana.

Resultados y discusión

Aislamiento y purificación de poblaciones bacterianas. Se aislaron y purificaron 20 cepas bacterianas de la rizosfera de plantas de *Solanum rostratum* Dunal mediante diluciones seriadas en medio de cultivo Pikovskaya (PVK). Inicialmente, se ensayaron todos los aislamientos para determinar su actividad solubilizadora de fosfatos, sin embargo, al momento de realizar reaislamientos en medio PVK muchas perdieron la capacidad de solubilización. Al final se realizó determinación de índice de solubilización de fosfatos usando fosfato tricálcico como fuente única de P en cinco cepas de bacterias las cuales se observaron en el microscopio características macro y microscópicas (Tabla 1)

Cepa	Microscópica	Macroscópica
P01	Bacilos cortos Gram negativos	Colonias grandes, cremosas, blancas
P02	Bacilos cortos Gram negativos	Colonias grandes, cremosas, amarillo oscuro
P03	Bacilos cortos Gram negativos	Colonias grandes, cremosas, brillantes
P04	Bacilos cortos Gram negativos	Colonias pequeñas, cremosas blancas
P05	Bacilos cortos Gram negativos	Colonias pequeñas, cremosas amarillo claro

Tabla 1 Aislamientos de cepas con características solubilizadoras de fosfato

Índice de solubilización de fosfatos.

La capacidad de PSB para disolver P inorgánico (fosfato tricálcico como fuente única de P) en medio PVK fue estimada con el índice de solubilización P (Zona de halo + diámetro de colonia / diámetro de colonia). Se observaron diferencias significativas con índice de solubilización de fosforo (ISP) de 2.25, 2.22 y 2.17 (Tabla 2). Susilowati y Syekhfani (2014), evaluaron el índice de solubilización de fosforo en cepas bacterias solubilizadoras de fosfatos, encontraron diferencias significativas con ISP de 2.87, 2.43 y 1.98 en *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.* y *Actinomyces sp.*

Ce pa	Diámetro halo + Diámetro de la colonia (mm)	Diámetro de la colonia (mm)	Índice de solubilización de P*
P01	12	10.5	2.2 ab
P02	8.5	7.5	2.1 b
P03	8.5	7	2.2 ab
P04	8.25	7.25	2.1 b
P05	7.5	5.75	2.3 a

*Después de incubación por 4 días. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tabla 2 Zona de halo y diámetro de colonia, índice de solubilización P en agar Pikovskaya (PVK)

En el presente estudio, el índice de solubilización observado en las cepas evaluadas fue diferente, lo anterior sugiere una capacidad diferente de las cepas para la solubilización de P en medio PVK. El mayor índice se observó para P05 seguido de P02 y P03.

A partir de rizosfera de chontaduro (*Bactris gasipaes* Kunth) crecido naturalmente en la Costa Pacífica del Valle del Cauca Colombia, se obtuvieron 22 aislamientos bacterianos con capacidad solubilizadora de fósforo, el género bacteriano con mayor frecuencia dentro de las BSP aisladas correspondió a *Burkholderia*, también se aisló una cepa de *Pseudomonas putida* (Patiño y Sánchez, 2012). Por su parte Reyes *et al.* (2008) mediante pruebas bioquímicas caracterizaron ocho rizobacterias no-diazotróficas y 17 diazotróficas pertenecientes a los géneros *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Rhizobium*, en condiciones de invernadero las cepas incrementaron significativamente el % de N y P en el tejido foliar de plantas de maíz.

Cambio de pH. Las cinco cepas de bacterias solubilizantes de fósforo estudiados disminuyeron el pH del medio PVK en comparación con el control de PVK estéril no inoculado incubado durante siete días bajo condiciones de inoculación (Tabla 3).

Cepas	Cambio de pH a través de siete días						
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
Control	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
P01	7.0	4.9	3.8	3.6	3.5	3.4	3.4
P02	7.0	5.2	4.7	4.5	4.4	4.3	4.3
P03	7.0	4.7	4.5	4.2	3.6	3.3	3.2
P04	7.0	4.3	3.7	3.7	3.7	3.7	3.2
P05	7.0	6.8	5.5	4.9	4.6	3.8	3.1

Tabla 3 Cambio de pH a través de siete días de cepas de bacterias solubilizadoras de fosfatos

Los resultados obtenidos muestran que el pH de los medios de cultivo de las cinco cepas bacterianas seleccionadas, disminuyó gradualmente durante los primeros días de incubación hasta valores en el rango 4.35 y 3.10. Los estudios mostraron una caída de pH de 7,01 (control) a 3.10 (P05). Resultados similares fueron observados por Khalil y Sultan (2000), Alam *et al.* (2002) y Mardad *et al.* (2013), Susilowati y Syekhfan, (2014).

La magnitud del cambio del pH del medio de cultivo se atribuyó a la tasa de concentración y tipo de ácidos orgánicos liberados por las cepas evaluadas.

Referencias

- Alam, S., Khalil, S., Ayub, N. and Rashid, M. (2002). In vitro solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) from Maize rhizosphere. *Int. J. Agri. Biol.*, 4(4), 454-458.
- Buono, N.I. y Ulla, E.L. (2016). Efectos de la inoculación con bacterias solubilizadoras de fósforo en tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) y pimiento (*Capsicum annum* L.) en condiciones controladas. *Rev. agron. noroeste arg.*, 36(2),45-54.
- Islama, T., Deora, A., Hashidokoa, Y., Rahmana, A., Itoa, T., Taharaa, S. (2007). Isolation and identification of potential phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of *Oryza sativa* L. cv. BR29 of Bangladesh. *Z Naturforsch C.*, 62(1-2), 103-110.

Khalil, S. and Sultan, T. (2000). Phosphorus solubilizing microorganisms potential improve P availability from unavailable sources. *8th Int. Soil Sci. Cong.* Islamabad.

Mardad, I., Serrano A. and Soukri A. (2013). Solubilization of inorganic phosphate and production of organic acids by bacteria isolated from a Moroccan mineral phosphate deposit. *African Journal of Microbiology Research*, 7(8), 626-635.

McGill, W.B., Cole, C.V. (1981) Comparative aspects of cycling of organic C, N, S and P through soil organic matter. *Geoderma*, 26, 267-268.

Patiño, T.C. y Sánchez, P.M. 2012. Aislamiento e identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos, habitantes de la rizósfera de chontaduro (*B. gassipaes* kunth). *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 10(2), 177-187.

Pikovskaya, R.I. (1948) Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Microbiology*, 17, 362-370.

Reyes, I., Alvarez, L., Ayoubi, H. y Valery A. (2008). Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. *Bioagro*, 20(1), 37-48.

Rodríguez, H, and Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.*, 17, 319-339.

Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H, Gobi, T.A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2, 587.

Susilowati, L.E. and Syekhiani. (2014). Characterization of phosphate solubilizing bacteria isolated from Pb contaminated soils and their potential for dissolving tricalcium phosphate. *Journal of degraded and mining landsmanagemen* 1(2), 57-62.