



Evaluación de la solubilización del fósforo mediante el uso de bacterias del género *Bacillus spp* en condiciones de laboratorio

Jilberth Ferney Alzate Castaño

Trabajo de investigación presentado para optar al título de Ingeniero Agropecuario

Asesor

Claudia Patricia Londoño Serna, Magíster (MSc) en Ejemplo Ciencia de la Información

Universidad de Antioquia
Facultad de Ciencias Agrarias
Ingeniería Agropecuaria
El Carmen de Viboral, Antioquia, Colombia
2023

Cita	(Alzate Castaño, 2023)
Referencia	Alzate Castaño, F. (2023). Evaluación de la solubilización del fósforo mediante el uso de bacterias del género <i>Bacillus</i> spp en condiciones de laboratorio, 1997 - 2003 [Trabajo de grado profesional].
Estilo APA 7 (2020)	Universidad de Antioquia, El Carmen de Viboral, Colombia.



Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Agradecimientos

Quiero agradecer especialmente a mi familia por acompañarme, apoyarme y tenerme la paciencia suficiente para que yo lograra culminar mi carrera profesional, agradezco igualmente a los maestros por tener la pasión de transmitir sus conocimientos, en especial a mi tutora Claudia, por tranquilizarme y darme ánimos de seguir cuando quería renunciar, agradezco a Natalia, carolina y valentina, por ayudarme con los procedimientos en el laboratorio y por ultimo a Karen por orientarme con los procedimientos.

Tabla de contenido

Resumen.....	7
Introducción	8
Objetivos	10
Objetivo General	10
Objetivos Específicos:.....	10
Hipótesis.....	11
Área de estudio y Metodología	12
Prueba cualitativa	12
Prueba cuantitativa	12
Resultados	14
Análisis cualitativo.....	14
Cuantitativo	15
Discusión.....	16
Conclusiones	16
Recomendaciones.....	16
Referencias Bibliográficas	17

Tabla de ecuaciones

Ecuación 1 índice de solubilización..... 12

Tabla de figuras

Gráfico 1 índice de solubilización por tratamiento transcurrido dos días.....	14
Gráfico 2 índice de solubilización por tratamiento transcurrido siete días.....	15
Gráfico 3 fósforo disuelto por tratamiento en distintas concentraciones de RFF	15

Resumen

Los *Bacillus spp* son microorganismos muy estudiados gracias a su capacidad de solubilizar elementos, esta podría ser usada para elaborar compuestos sustitutos a los fertilizantes fosforados comerciales que generan un gran impacto en los suelos donde se aplican, en esta investigación se elaboró dos estudios de solubilización de fósforo siendo la primera en medio sólido en medio Nbrp y en medio líquido Nbrp remplazando el fosfato tricalcico por roca fosfórica (RFF); se analizó posteriormente su capacidad para solubilizar fosforo con el índice de solubilización y con el método de colorimetría para el medio líquido.

Palabras clave: Bacillus spp, fosfato tricalcico, roca fosfórica, índice de solubilización

Introducción

Actualmente en el mundo encontramos diversos enigmas que continúan creciendo constantemente como los problemas climáticos, causados por el constante crecimiento demográfico y los desechos generados por los seres humanos; esto trae como consecuencia la necesidad de producir más alimento con los mismos recursos y cada vez en menor extensión de tierra, por lo anterior, es indispensable buscar alternativas de producción y nuevas formas de optimizar los procesos ya existentes como una forma de transición a cultivos que logren satisfacer las necesidades actuales y permitan la sostenibilidad de los recursos.

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, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, 2013)

Las reservas de fósforo se están agotando, se estima que para el 2030 estemos trabajando con los últimos residuos de fósforo para aplicación en cultivos, por lo que es fundamental convertir en disponible el fósforo atrapado en los agregados del suelo y que las plantas no pueden absorber, siendo los microorganismos un eslabón primordial en la tarea de solubilizar este valioso recurso, el fósforo. “Una insuficiencia de fósforo en el suelo puede influir en el retraso de la cosecha, la madurez, el desarrollo de la planta, disminuyendo el rendimiento en la cosecha” (Bobadilla Henao & Rincón Vanegas, 2008)

Se tiene conocimiento científico que el fósforo es uno de los elementos principales en el desarrollo óptimo de las plantas, por lo que se procura que el cultivo cuente con la cantidad suficiente de este nutriente en forma disponible. “En los suelos del trópico, el fósforo (P) es el nutriente que limita la producción, debido a la alta reactividad del elemento que le permite interactuar químicamente con la materia orgánica, con la superficie mineral de los coloides y con las formas activas de algunos cationes presentes en la solución del suelo” (Martins et al., 2012).

Por lo anterior, se realizan actualmente en varios lugares del mundo, investigaciones con el propósito de encontrar microorganismos que sean potenciales solubilizadores de fósforo. “Los organismos involucrados en las transformaciones del P en el suelo incluyen bacterias, hongos, cromista, protozoos y algunos nematodos” (Awasthi et al., 2011). Uno de estos microorganismos que es un posible solubilizador del fósforo son las bacterias del genero *Bacillus spp*, esta genero bacteriano puede ser encontrada en diversos ambientes; ha sido aislada de medios tanto terrestres como acuáticos y se destaca por su capacidad para sobrevivir en condiciones hostiles, por lo que puede ser una interesante especie que al ser usada en la agricultura pueda ser resiliente ante los fenómenos del cambio climático, por ejemplo, sequías o inundaciones.

Dentro de este género de bacterias encontramos un amplio espectro pero similares entre sí “Se ha registrado más del 99 % de similitud de la secuencia de la estructura primaria del RNAr16S entre *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides* y *Bacillus thuringiensis*”(Portuondo, 2012)

Objetivos

Objetivo General

Evaluar la solubilización del fósforo mediante el uso de bacterias del género *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus* tanto de manera individual como combinada, en condiciones de laboratorio.

Objetivos Específicos:

1. Evaluar el efecto de *Bacillus subtilis* sobre la solubilidad del fósforo en condiciones de laboratorio.
2. Evaluar el efecto de *Bacillus cereus* sobre la solubilidad del fósforo en condiciones de laboratorio.
3. Evaluar el efecto de *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus* de manera combinada, sobre la solubilidad del fósforo en condiciones de laboratorio.

Hipótesis

Se espera una solubilización por parte de ambas cepas y aun mayor con el tratamiento combinando ambas cepas de *Bacillus spp*, este con el fin de impulsar nuevas investigaciones para productos aplicables al suelo para mejorar sus componentes y lograr óptimos desarrollos de los cultivos.

Área de estudio y Metodología

El estudio fue realizado en los laboratorios de la universidad de Antioquia sede seccional oriente a una altura aproximada de 2100 msnm. Se realizó un lavado previo de las cajas de Petri y demás vidriería con HCl durante 24 horas para eliminar posibles rastros de P, luego se hizo el respectivo enjuague con agua destilada

Prueba cualitativa

Se preparó 1.28L del medio de cultivo N-brip de la siguiente forma: 12.8 gr de glucosa, 6.4 gr de cloruro de magnesio ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), 0.32 gr de sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), 0.256 gr (KCl), 0.128 gr sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$), 20 gr agar, 0.128 gr rojo de fenol; esta preparación se dividió en cuatro Erlenmeyer para posteriormente adicionar el fosfato tricalcico ($Ca_3(PO_4)_2$) en cuatro concentraciones 0 gr/L, 0.93 gr/L, 1.87 gr/L, 2.81 gr/L respectivamente para ser llevado a placas de agitación y calentamiento para su homogeneización.

Con el medio listo se procedió a él servido en cajas de Petri y fueron llevadas a un autoclave para su esterilización, se esperó la correcta gelificación y se hizo la respectiva inoculación de las bacterias en una cámara de flujo laminar como se planteó en el diseño experimental, Este fue completamente al azar 4x4; 4 variables y 2 factores, que constaba de 4 tratamientos que variaban en la concentración del fosfato tricalcico; estas fueron inoculadas con *B. subtilis*, con *B. cereus*, con la combinación de ambos y el control sin bacterias; se realizaron 4 repeticiones para un total de 64 muestras en cajas de Petri, las cuales fueron puestas en una cámara de incubación a 37°C.

Pasados los 2 y 7 días se fotografió las muestras, con el software image J se calculó los diámetros de la cepa y el halo generado para poder hallar el índice de solubilización como lo indica (Kalayu, 2019) con la formula

$$IS = \frac{\text{diametro de la colonia} + \text{diametro del halo}}{\text{diametro de la colonia}}$$

Ecuación 1 índice de solubilización

Con el programa statgraphics 18 a estos resultados se les aplicó un análisis ANOVA con un p de 0.05

Prueba cuantitativa

Para el medio liquido se ajustó el volumen a 1.6 L de N-brip así: 16 gr de glucosa, 8 gr de cloruro de magnesio ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), 0.4 gr de sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), 0.32 gr

(KCl), 0.16 gr sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄), al ser medio líquido se obvió el agar, se dividió en 4 Erlenmeyer y se usó roca fosfórica como sustituto del fosfato en cuatro concentraciones 0 gr/L, 12.5 gr/L, 25 gr/L, 37.5 gr/L respectivamente.

Se sirvió en envases de vidrio y posteriormente fue llevada a un autoclave para su esterilización se hizo la respectiva inoculación de las bacterias en una cámara de flujo laminar como se planteó en el diseño experimental, este fue 4x4 totalmente al azar que constaba de 4 tratamientos que variaban en la concentración de RFF; estas fueron inoculadas con *B. subtilis*, con *B. cereus*, con la combinación de ambos y el control sin bacterias; se realizaron 4 repeticiones para un total de 64 muestras en envases de vidrio.

Se procedió a llevar las muestras a un shaker de 3 niveles a 100 rpm y 37°C, pasados los 7 días se aplicó prueba colorimétrica siguiendo el protocolo según (Vásquez, B & Arcos, A, 2017) para la identificación de fósforo disponible en medios líquidos.

Con la siguiente curva de calibración $y = 0,6718x - 0,0395$ y $R^2 = 0,995$ se calculó concentración de fósforo disuelto en las muestras, posteriormente a los resultados se aplicó un análisis ANOVA con un p de 0.05

Resultados

Análisis cualitativo

Gracias al análisis ANOVA realizado encontramos que transcurridos dos días el mayor índice de solubilización es atribuido a *Bacillus Subtilis* con la concentración 2, más sin embargo no encontramos diferencias significativas entre tratamientos como muestra la tabla 1

Índice de solubilización vs tratamientos pasados 2 días

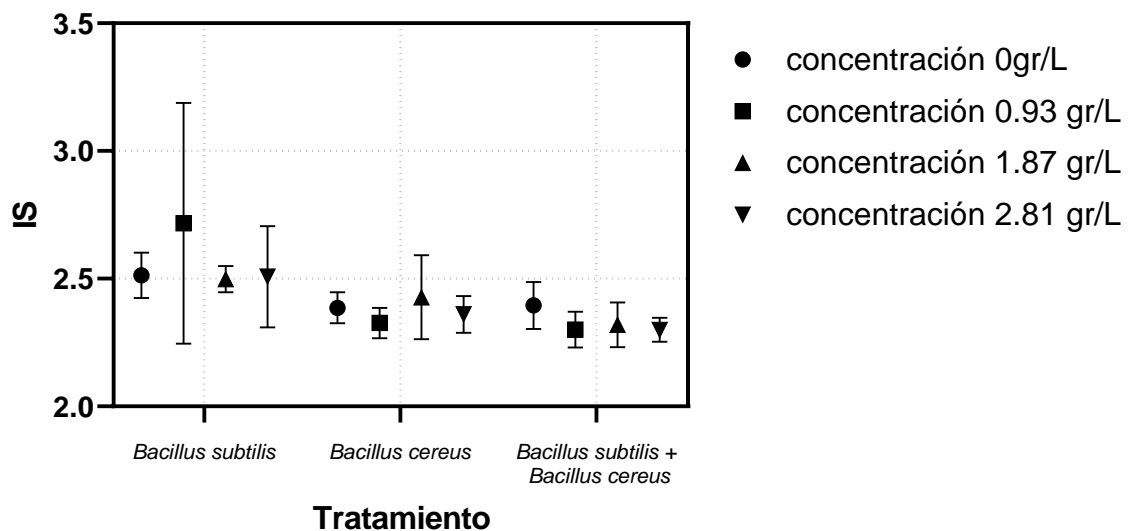


Gráfico 1 índice de solubilización por tratamiento transcurrido dos días

Transcurrido 7 días se obtuvo como resultado que el tratamiento con *Bacillus subtilis* cuenta con mejor solubilización que los demás mas no cuenta con una diferencia estadística significativa, igualmente encontramos que los tratamientos con *Bacillus cereus* y *Bacillus cereus + Bacillus subtilis* cuentan con un comportamiento similar, estando ambas por debajo del tratamiento mencionado anteriormente como lo muestra la tabla 2

Índice de solubilización vs tratamientos pasados 7 días

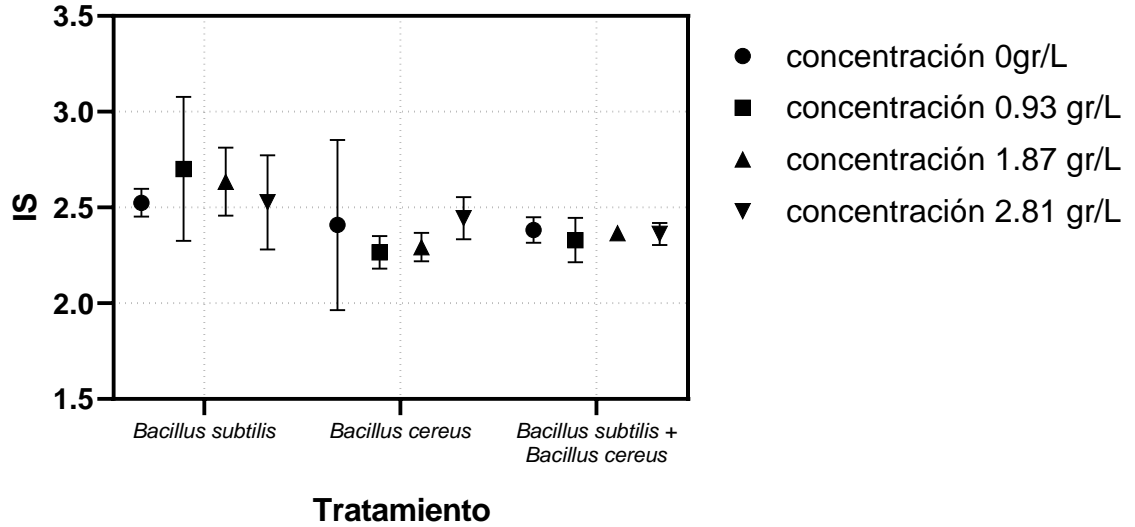


Gráfico 2 índice de solubilización por tratamiento transcurrido siete días

Cuantitativo

Se encontró que la mejor respuesta fue con *Bacillus cereus* y con la concentración de 37.5 gr RFF/L

Fósforo disuelto vs tratamiento

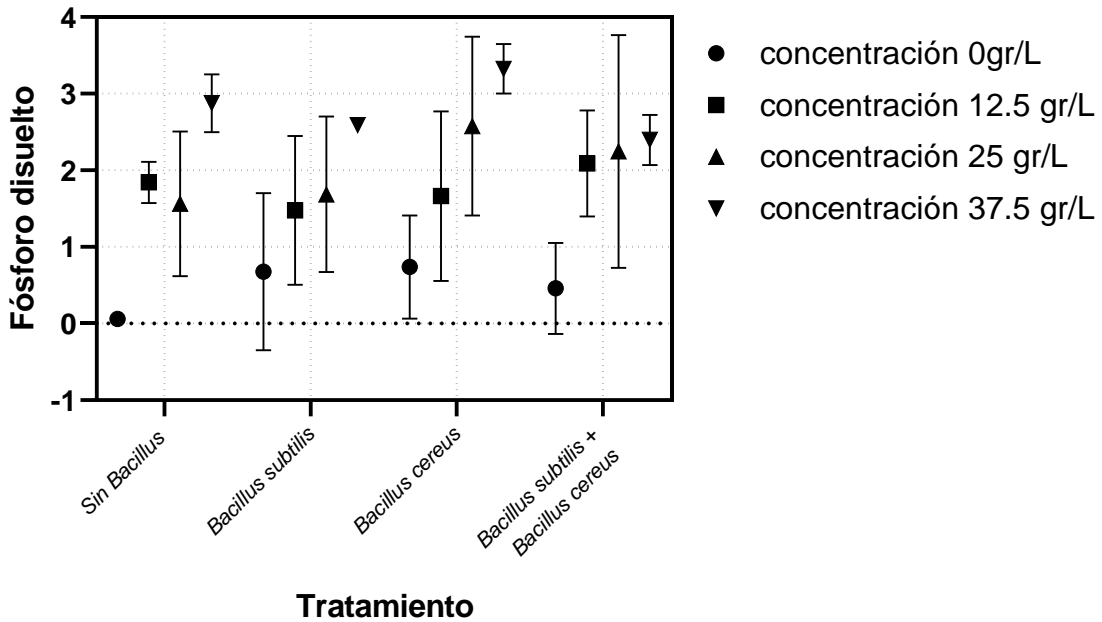


Gráfico 3 fósforo disuelto por tratamiento en distintas concentraciones de RFF

Discusión

Se logra apreciar que el *Bacillus subtilis* tiene mejor solubilización de fósforo en el estado fosfato tricalcico en comparación a los otros tratamientos con *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis*+ *Bacillus cereus*

Las cepas de *Bacillus cereus* tienen un mejor rendimiento siendo este el mejor solubilizador de fósforo en estado de roca con una diferencia significativa con respecto al tratamiento *Bacillus subtilis* y *Bacillus subtilis* + *Bacillus cereus*

Al contrario de lo que se creía en la hipótesis original al combinar la cepa uno con la cepa dos no encontramos resultados de que tengan mejor solubilización, esto puede ser debido a que compiten por el fósforo para esto es recomendado más estudios que evalúen la compatibilidad de estas diferentes especies de *Bacillus spp*

Encontramos que a mayor concentración de fósforo mayor solubilización de fósforo en cualquiera de los tres tratamientos con *Bacillus spp*, es recomendable un estudio posterior para encontrar el punto de saturación.

Conclusiones

Se encontró que las cepas de *Bacillus spp* evaluadas logran solubilizar el fósforo de manera satisfactoria

- Las cepas de *Bacillus subtilis* cuenta con gran solubilización del fosfato tricalcico
- Las cepas de *Bacillus cereus* cuenta con una buena respuesta a la hora de solubilizar roca fosfórica
- Las cepas combinadas de *Bacillus spp* logran una solubilización menor que los tratamientos de manera individual

Recomendaciones

Es recomendado que para futuras investigaciones sea modificado y ajustadas las concentraciones, las especies de bacilos y los tiempos, con el fin de encontrar la mayor eficacia; en lo posible usar otro indicador distinto al rojo de fenol que permita una mejor visión del halo generado; para el medio liquido es recomendado usar otros protocolos de colorimetría que se ajuste a este estudio.

Referencias Bibliográficas

- Awasthi, R., Tewari, R., & Nayyar, H. (2011). Synergy between Plants and P-Solubilizing Microbes in soils: Effects on Growth and Physiology of Crops. *International Research Journal of Microbiology (IRJM)*, 2(12), 484–503.
- Bobadilla Henao, C., & Rincón Vanegas, S. C. (2008). *Aislamiento y producción de bacteria fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza*. 87p. <http://hdl.handle.net/10554/8433>
- Kalayu, G. (2019). Phosphate solubilizing microorganisms: Promising approach as biofertilizers. *International Journal of Agronomy*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4917256>
- Martins, L. D., Tomaz, M. A., Amaral, J. F. T. do, Bragança, S. M., Rodrigues, W. N., & Reis, E. F. dos. (2012). Nutritional Efficiency in Clones of Conilon Coffee for Phosphorus. *Journal of Agricultural Science*, 5(1). <https://doi.org/10.5539/jas.v5n1p130>
- Portuondo, I. P. (2012). Bacillus cereus and food poisoning. *Revista Cubana de Salud Publica*, 38(1), 98–108. <https://doi.org/10.1590/s0864-34662012000100010>
- Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M. H. . (2013). Algaemia due to Prototheca wickerhamii in a patient with myasthenia gravis. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(12), 3305–3307. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.12.3305-3307.1997>
- Vásquez , B, E., & Arcos, A, Y. (2017). Guías de laboratorio de microbiología. *Universidad de Antioquia Colombia*, 6–18.