

Desarrollo de un biofertilizante solubilizador del fósforo y estimulador del crecimiento vegetal.

B. Rosa García, R. Martínez, B. Dibut, Grisel Tejeda, C. Álvarez, Lissett Gutiérrez, Marisel Ortega, Janet Rodríguez, Ma. E. Simanca y Luis Fey.

**Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical
“Alejandro de Humboldt” INIFAT. Calle 2 esq. 1 Santiago de las Vegas, C. de
La Habana.**

INTRODUCCIÓN

El fósforo es uno de los elementos imprescindible para las plantas; se puede plantear que en el momento en que las plantas han acumulado cerca del 25% de la máxima cantidad de materia seca, ellas han asimilado cerca del 75% del fósforo (Dinchev 1972). Su importancia principal está en la activa participación en los procesos de transformación y utilización de energía. Actúa en la fotosíntesis, la respiración, el almacenamiento y transferencia de energía, interviene en la división celular, la reproducción y en muchos otros procesos. (Taíz y Zeiger, 1991; Barceló et al 1992 y Gill, 1995)

Alrededor del 90% del fertilizante fosforado que se aplica a los suelos se convierte en formas insolubles no disponibles por las plantas. (Borie, 1991). Dinchev (1972) plantea que cuando el P se aplica superficialmente gran parte de este no es utilizado por las plantas, que por lo general, solamente utilizan una pequeña cantidad (10 – 30%), y el resto queda retenido en la capa superficial del suelo. El contenido total del P en los suelos varía generalmente en los límites entre 0,05 y 0,2% de P_2O_5 .

La retención del fósforo en los suelos depende de varios factores, entre ellos es de particular interés el pH, pues los fosfatos están asociados a Fe, Al y Mn en los suelos ácidos (pH 3.5 y 5.5), mientras que en suelos alcalinos (pH 8) se combina con el Ca y en los ligeramente ácidos o neutros (pH 6–7) aumenta la disponibilidad

de fosfatos solubles, entrando a dominar el proceso de adsorción a las partículas de arcilla frente a los procesos de quelación del fósforo. (Prasad y Power, 1997, citado por Bohorquez, P. 2001)

El fósforo orgánico es de carácter insoluble y se halla contenido en la materia orgánica y la biomasa en un porcentaje estimado del 20 al 80% del fósforo presente en la superficie del suelo: se encuentra en forma de inositol (aporta del 1 al 62% del P orgánico del suelo), ácidos nucleicos (aporta entre 0.2 hasta 1.8%), fosfolípidos y otras moléculas (representan menos del 5% del fósforo orgánico). Del 30% al 50% restante probablemente forme parte estructural de los microorganismos. De ellos, el hexafosfato de inositol es dominante, mientras que los restantes penta, tetra, etc., están en menos cuantía. (Alexander, 1980).

Muchos microorganismos del suelo, incluyendo bacterias, hongos y actinomicetos, son capaces de solubilizar el fósforo inorgánico inutilizable mediante la excreción de ácidos orgánicos e inorgánicos que transforman los compuestos de fósforo mediante la complejación del calcio, aluminio y hierro, dejando así al ion fosfato en estado soluble (Montecinos, 2000). Estos microorganismos solubilizadores de fósforo están presentes en el suelo en números variables y en gran parte viven en la zona de la rizosfera de las plantas. .

La primera especie solubilizadora de fósforo fue identificada por Pikovskaya en 1948 y denominada inicialmente como "Bacteria P", posteriormente identificada como *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* con alta capacidad de solubilización de fósforo y habilidad para tomar este elemento de compuestos como lecitina y ácidos nucleicos (Tsai y Rosetto, 1992).

En 1992, Cunningham y Kuiack, evalúan un aislamiento de *Penicillium bilaii* previamente reportado como solubilizador de fósforo. En el trabajo de Rokade y Patil (1992) se hace una revisión del tema, estableciendo que los géneros de hongos *Aspergillus* y *Penicillium* son los solubilizadores por excelencia. (citado por Vera, 1999).

La inoculación con esta especie, que también sintetiza sustancias activas estimuladoras del crecimiento, permitió incrementar en Canadá el desarrollo vegetativo, el contenido de fósforo y el rendimiento del trigo, frijol, guisantes, canola y alfalfa. (Gleddie y col., 1991; Gleddie y col., 1993; Schlechte y col., 1993, citado por Martínez Viera, 1999).

OBJETIVO

Desarrollar un biofertilizante a base de un hongo solubilizador de fósforo que permita disminuir la fertilización mineral y/o incrementar los rendimientos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1) Aislamiento y selección de cepas

El primer trabajo consistió en el aislamiento de cepas de hongos a partir de rizosfera de diferentes cultivos y en varios agro-sistemas, utilizando el medio Pikovskaya (1958 citado por Barea 1970).

A todos los aislados se les volvió a sembrar en placas con medio Pikovskaya para poder comparar la solubilización y seleccionar los más eficientes.

2) Determinación de la solubilización del P por la metodología del Fósforo 32.

Fue determinada la solubilización según la metodología del trazador radioactivo P-32, porque este método permite cuantificar con exactitud el fósforo solubilizado del suelo y asimilado por el cultivo, así como determinar el fósforo asimilado a partir de fuentes suministradas como fertilizantes. El trabajo se desarrolló en el grupo de trazadores isotópicos del INIFAT.

Se utilizaron macetas de 1 Kg con suelo Ferralítico Rojo (Ferralsol) (Instituto de Suelos 200, FAO-UNESCO 1988) con muy bajo contenido de P asimilable, 7.45 mg/100g de suelo (32,53 ppm) y un contenido de P total equivalente a 237.7 mg/100 g suelo (1038 ppm), el contenido de materia orgánica era bajo (1,96%), el pH en agua fue de 7.64 y en KCl de 7.03.

A cada maceta se le aplicó 2 mg de P ($\text{KH}_2^{32}\text{PO}_4$) con una actividad de 3,7 MBq (100 micoci) de P-32, además se aplicaron portadores y el hongo según las

variantes del experimento; todo lo adicionado fue homogenizado con el suelo; se replicaron 5 veces. El cultivo de prueba fue tomate C-28V y las plantas se dejaron crecer durante 60 días con todas las atenciones necesarias. Después de la cosecha se realizaron los análisis correspondientes de planta y suelo.

Las variantes experimentales fueron:

1- C A (Control absoluto)	2- Hongo
3- SFT a 5,6	4- Hongo + SFT 5,6
5- SFT a 30	6- Hongo + SFT a 30
7- RF a 150+ SFT a 5,6	8-Hongo+ RF a 150 + SFT a 5,6

Hongo Penicillium SFT= Superfosfato Triple RF= Roca Fosfórica

Las cantidades están expresadas en Kg P/Ha

La roca fosfórica fue de Trinidad y tenía 8% de P.

El % de solubilización se determinó según la formula

$$\% \text{ solubilización} = \frac{\text{Valor L del tratamiento} - \text{Valor L del control absoluto}}{\text{Valor L del Control Absoluto}} \times 100$$

El valor L es la cantidad de P asimilable del suelo, determinado por la técnica del P-32.

3) producto sólido y su viabilidad.

Se trabajó con sustratos sólidos donde el hongo pudiera reproducirse con facilidad. Se ensayó con turba y cachaza, Se seleccionó la cachaza para el proceso posterior, el cual consistió en secarla al sol aproximadamente 5 días, molinarla, tamizarla por 200 mesh y esterilizarla o desinfectarla por flujo de vapor durante 10 minutos. Después de determinar la capacidad de retención de agua, se prepararon

cultivos líquidos del hongo para la inoculación del sustrato y se le adicionó otras sustancias. Esta formulación no se explica por estar en trámites de patente. El período de incubación de las bolsas fue de 15 días, luego del cual se realizó un conteo de viables y las bolsas fueron divididas y colocadas en cámara fría ($6\pm 2^{\circ}\text{C}$) o a temperatura ambiente, realizándoles conteos de viables mensualmente.

4) Experimento en cultivos en Cuba

Los experimentos con cultivos se realizaron áreas del INIFAT sobre un suelo ferralsol (FAO 1988) con bajo contenido de P asimilable (27.64 ppm) y alto contenido de P total (1105 ppm), se emplearon las variedades frijol negro Cueto 25-9 y tomate INIFAT 28. Se hicieron 4 repeticiones y las variantes empleadas fueron:

A- Control Absoluto (CA)

B- Hongo (H)

C- Superfosfato triple (SFT)

La aplicación del *Penicillium bilaii* fue por aspersión del formulado sólido en el momento de la siembra en frijol, y en el momento del trasplante en el tomate a razón de 2 Kg/Ha. La fertilización con el SFT fue a 20 Kg/Ha en el momento de la siembra. Las atenciones al cultivo se realizaron según las normas establecido para los mismos.

Frijol: Se realizó la cosecha de las vainas antes de que la planta se secase por completo para poder realizar un conteo de los nódulos. Se pesaron los granos y se calcularon los rendimientos.

Tomate: Se realizó la cosecha escalonada de los frutos considerando el dato del total de la misma. Se extrajo la planta completa para determinar el peso seco.

5) Aplicación en producción en Colombia.

Como resultado de un Convenio se realizaron pruebas con biofertilizantes producidos por un especialista del INIFAT en 25 haciendas arroceras de 4 municipios de la República de Colombia. Se aplicó a 1 L/Ha, el hongo *Penicillium bilaii* con formulación cubana, cuya marca es FOSFOSOL, y se redujo la fertilización mineral fosfórica al 70%. El resto de las atenciones al cultivo se realizaron según las normas técnicas vigentes para el arroz en ese país.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1) Selección de cepas según su potencial solubilizador de fósforo

Mediante el crecimiento en placas con medio Pikovskaya se obtuvieron 8 cepa de hongos, de los cuales se seleccionaron por su actividad una cepa de *Aspergillus* y una de *Penicillium*, aunque como se observa en la tabla siguiente el *Penicillium* dio un halo de solubilización mucho mayor, por lo que se seleccionó para continuar los trabajos.

Tabla 1: Zona de solubilización a los 5 días de sembrados los hongos

Aislado	Zona de solubilización (cm)
<i>Aspergillus</i>	0.85
<i>Penicillium</i>	1.63

La cepa de *Penicillium* fue identificada como *Penicillium bilaii* cepa INIFAT P1 y por sus resultados se seleccionó para continuar los ensayos.

Figura 1 Crecimiento del *P. bilaii* sobre medio Czapek modificado.



En la foto se muestra la producción de sustancias producidas por el hongo *Penicillium bilaii* en medio Czapek modificado tanto en el medio (ver cambio de coloración) como sobre el micelio.

2) Determinación de la solubilización mediante la metodología del trazador radioactivo P-32 de la cepa seleccionada de *Penicillium*:

Al observar en la tabla siguiente los tratamientos pares que contienen aplicación del hongo se constata que hay una influencia positiva en todos los casos, pues hay una extracción mayor de fósforo (comparando en la columna 3 los tratamientos pares con los impares) por una mayor solubilización, pero hay además, un aumento en masa seca que está dado por el aporte de sustancias estimuladoras del crecimiento secretadas por el microorganismo, pues si comparamos la columna 2 con la 3 se observa claramente que el aumento en materia seca no equivale a una acumulación mayor de fósforo en el tejido vegetal, sino a un mayor crecimiento de las plantas, por ejemplo, en la columna 1 las variantes con el hongo tienen mayores valores de materia seca que sus respectivas variantes impares sin embargos los valores de los mg de P por g de materia seca son menores donde

está el hongo que en las variantes que no lo tienen, esto es importante porque la planta toma el fósforo que necesita y no hay acumulación de P en el tejido vegetal. Se observa que el hongo produce un incremento en la solubilización por su acción sobre los fosfatos

Tabla 2 Resultados de los estudios isotópicos con P-32 realizados a una cepa de Penicillium

Tratamiento	Rendimiento Materia Seca (g/maceta)	mg P/ g ms	mg de P extraído/ Kg del suelo	Valor L ppm de P	% de Solubilización
1- C A	0.85	1.35	1.15	17	—
2- H	1.86	0.56	1.04	49	188.23
3- SFT 5.6	0.44	1.08	0.48	19	11.76
4- H +SFT 5.6	2.12	0.57	1.21	23	94.11
5- SFT 30	1.19	0.78	0.93	20	17.74
6- H + SFT 30	2.88	0.54	1.56	36	111.76
7- RF+ SFT 5.6	0.49	2.05	1.00	9	-47.05
8- H + RF+ SFT 5.6	2.52	0.56	1.41	42	147.05

Los valores relativos calculados para cada uno de los índices demuestran un marcado incremento en todos ellos a causa del hongo como elemento distintivo entre las variantes, La extracción del P por el cultivo, tanto del suelo como de las fuentes fueron altos, aunque el hongo solo aportó más de lo que la planta extrajo, como se observa en la tabla siguiente:

Tabla 3 Incrementos relativos entre los tratamientos con y sin aplicación de hongo.

Relación entre tratamiento	Materia seca %	P extraído (%)	Solubilización de P del suelo. Valor L (%)
H-CA (2-1)	118.82	- 9.56	188.23
SFT 5.6 cH-sH (4-3)	381.81	152.08	73.68
SFT 30 Kg cH-sH (6-5)	142.01	67.64	80.00
SFT 5.6+RF cH-sH (8-7)	414.28	41.00	366.66

Después de la cosecha se realizó análisis de P asimilable al suelo de los diferentes tratamientos por el método Oniani y se encontraron los resultados que se exponen en la siguiente tabla, (tabla 4):

Tabla 4 Fósforo asimilable en los suelos después de la cosecha.

Tratamiento	P asimilable (ppm)	Incremento relativo del P asim. (%)
1- C A	103.49	—
2- H	354.58	242.6
3- SFT 5.6	292.57	182.7
4- H +SFT 5.6	308.77	198.3
5- SFT 30	278.42	169.0
6- H + SFT 30	270.08	160.9
7- RF+ SFT 5.6	289.25	179.5
8- H + RF+ SFT 5.6	439.25	324.2

Con este método quedó demostrada la capacidad de la cepa del hongo de solubilizar el fósforo dejando en el suelo cantidades considerables del elemento para ser utilizado por el próximo cultivo a plantar. En la variante 2 hay una solubilización a partir del fósforo insoluble en el suelo, mientras que en las otras variantes, especialmente en la 8 hay 4 veces más P asimilable que en el control y

1.5 veces más que su control (variante 7), por la acción del hongo sobre las fuentes agregadas.

3) Preparación de producto sólido y conservación del mismo.

Para lograr un producto de fácil manipulación y económico se trabajó en una formulación sólida para el biofertilizante; se seleccionó la cachaza porque en ella se logra una mayor reproducción del hongo. En la cachaza estéril las poblaciones del hongo llegaron a 10^{11} UFC/g después de la incubación durante 15 días a 30-32 °C y la viabilidad lograda por el sustrato estéril conservado en frío ($6^{\circ}\text{C} \pm 2^{\text{a}}$) es de 6 meses ya que las poblaciones desciende muy lentamente y a los 180 días aún mantiene 10^8 UFC/g. A temperatura ambiente la viabilidad baja rápidamente por la elevación de la temperatura dentro de la bolsa y a los 30 días el conteo fue de 10^9 UFC/g, pero a los 60 fue de 10^7 UFC/g, por lo que se recomienda emplearlo hasta los 45 días después de lo cual no garantiza el efecto del producto. En el caso del material tratado con flujo de vapor las poblaciones descienden con mayor rapidez por la competencia de otros microorganismos, a temperatura ambiente se puede emplear hasta 30 días y en frío hasta 4 meses.

4) Experimentos en diferentes cultivos conducidos en las condiciones de Cuba

A continuación se muestra la influencia que ejerce el *Penicillium bilaii* sobre los cultivos de frijol y tomate en áreas de bajo P asimilable y alto P total.

Tabla 5 Efecto de la inoculación de P. bilaii en frijol

Tratamiento	Materia seca (g / planta)	No. de nódulos /planta	Rendimiento (Kg/Ha)	Incremento (%)
Testigo	4.71	4.2	548	--
Penicillium	6.38	5.1	650	12
SFT	6.8	6.3	676	23
SFT + Penicillium	7.63	6.3	712	29

Tabla 6 Efecto de la inoculación de *P. bilaii* en tomate.

Tratamiento	Materia seca (g/planta)	Rendimiento (T/Ha)	Incremento (%)
Testigo	3.20	9.6	--
Penicillium	4.47	12.0	26
SFT	3.96	10.8	12
SFT + Penicillium	4.96	13.1	

Es evidente al observar dichas tablas, la influencia beneficiosa del *Penicillium* sobre el desarrollo de la planta, las que aumentan el rendimiento y la materia seca, con respecto al testigo absoluto, lo que quiere decir que hubo un aporte de fósforo que permitió un crecimiento y la formación de un tejido consistente. La aplicación conjunta de Superfosfato triple y el hongo permite un mayor suministro de fósforo a la planta que es sumamente importante en el cultivo del frijol. Es de señalar el incremento que ocurre en la nodulación cuando la fuente de P es conveniente pues este elemento interviene en el transporte de energía tan necesaria la fijación del nitrógeno, además de participar activamente en todos los procesos que ocurren en el crecimiento y desarrollo de las plantas.

5) Aplicación en producción en Colombia.

Tabla 7 Rendimientos producidos por el biofertilizante FOSFOSOL sobre arroz en 25 haciendas de 4 municipios de la República de Colombia.

Rendimiento de los testigos (Kg/Ha)	Menos de 6000	De 6 000 a 6 900	De 7 000 a 7 900	De 8 000 a 8 900	Más de 9 000
Incrementos por FOSFOSOL	17 %(1)	10 % (8)	11.5% (7)	6.5% (3)	7%(1)

El número entre paréntesis corresponde a las haciendas encuestadas

Se observan incrementos en los diferentes niveles de producción, principalmente cuando los rendimientos oscilan entre 6 000 y 7 900 Kg/Ha en un total de 15 haciendas. También es notable como los incrementos de los rendimientos son mayores cuando el valor de los rendimientos son menores ya que en producciones muy altas en las que las plantas logran expresar su potencial genético al máximo, es más difícil lograr grandes incrementos.

En la tabla y foto siguientes se expone una muestra de los resultados obtenidos en una de las haciendas colombianas.

Tabla 8 Efecto del biofertilizante FOSFOSOL sobre los componentes del rendimiento en arroz sembrado en la hacienda “El Puente” Municipio Armero, Colombia, en condiciones de producción.

Variante	FOSFOSOL	Testigo
Panícula/m ²	362	320
Espiguilla/panícula	12	10
Granos llenos/panícula	140	120
Granos vanos/panícula	5	9
Hoja bandera (cm)	32	30
Rendimiento Kg/Ha	9750	7062
Incremento	38	--



Figura 2- muestra el crecimiento de plantas de arroz tratadas con *Penicillium bilaii* (FOSFOSOL) en comparación con el testigo sin tratar. Obsérvese el crecimiento de la raíz y el tallo mucho mayor en la planta tratada.

CONCLUSIONES

- La cepa INIFAT P1 de *Penicillium bilaii* resultó ser un microorganismo solubilizador de fósforo, tanto en suelo con alto contenido total del elemento en formas insolubles como a partir de roca fosfórica, y al mismo tiempo deja una cantidad considerable de fósforo asimilable en el suelo, aprovechable por el próximo cultivo a sembrar
- Se ha logrado la producción de bioproductos a base de *P. bilaii* INIFAT P1 en sólido aplicable a 2 Kg/Ha y en líquido, que en arroz se emplea a 1 L/Ha en las condiciones Colombia

- La aplicación del P bilaii a los cultivos ensayados, tanto en condiciones de investigación como de producción, incrementa los rendimientos entre un 6 y un 30%, así como la materia seca en las plantas

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander, M. 1977. Introduction to Soil Microbiology. Wiley and Sons, New York, EEUU.
- Alexander, M. 1980. Introducción a la Microbiología del Suelo. Libros y editoriales S.A. México D.F. 491 p.
- Barea, J. M. 1970. Estudio "in vitro" de la Solubilización del Fósforo. Microbiología Española 23 (3): 257-260.
- Borie, F. 1991. Microbiología del fósforo. En: Jornadas de Fertilidad de Suelos en Cero Labranza. Sociedad de Conservación de Suelos de Chile e IILIA, Concepción, Chile.
- Bohorquez, Patricia 2001. Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfatos presentes en la rizosfera de Calamagrotis efusa y Espeletia grandiflora. Tesis de Grado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Bogotá.
- Eira, A. F. 1992. Solubilização microbiana do fosfatos. In: Microbiología do solo. Sociedade Brasileira de Ciencia do solo. Campinas. Brasil.
- FAO-UNESCO. 1988. Soil Map of the World. Revised Legend. World Soil Resources Reports 60, Roma, 142 pp.
- Gutiérrez, Lissett, C. Álvarez, Zoila Palacios Damaris Fonseca y Maité Torres. 1998. Evaluación del potencial solubilizador del fósforo de un hongo y una bacteria aisladas de suelos cubanos. Tesis para optar por el grado de Master en Ciencia. Universidad de La Habana.
- Instituto de Suelos. 2000. Nueva versión de la Clasificación Genética de los Suelos de Cuba. Ed. Agroinfor, La Habana, 64 pp.
- Martínez Viera, R. 1999. Los Biofertilizantes como Factor de Economía y Productividad en la Agricultura Tropical. En III Curso Internacional de Agricultura Tropical, La Habana, 117-127.
- Motecinos, Camila. 2003. Manejo Biológico del Fósforo en el Suelo. Artículo en Sitio internet: Agroecología y Desarrollo. Chile. 4 pp.
- Tsai, S.M. y R. Rosetto. 1992. Transformações microbianas do fósforo. In: Microbiología do solo. Sociedade Brasileira de Ciencia do solo. Campinas, Brasil.
- Vera, Diana Fernanda. 1999. Aislamiento y caracterización de Hongos Solubilizadores de Fosfatos de la Rizosfera de Arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh, Myrtaceae) en Dos Unidades Fisográficas del Departamento del Guaviare. Informa general presentado

en el Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas y la Universidad Nacional de Colombia.