

**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGRÓNOMA
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
BIPROSPECCIÓN DE RIZOBACTERIAS
SOLUBILIZADORAS DE FOSFORO Y SU POTENCIAL
USO EN LA PRODUCCIÓN DE *Coffea arabica* L.**

Autor: Lleyner Roman Peña

Asesor:

Registro (.....)

CHACHAPOYAS – PERÚ

2025

1. Título

Bioprospección de rizobacterias solubilizadoras de fosforo y su potencial uso en la producción de *Coffea arabica* L.

2. Planteamiento del problema

¿Cuáles son las cepas de bacterias rizosféricas solubilizadoras de fósforo con potencial uso en la producción de *Coffea arabica* L.?

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Realizar el análisis de bioprospección y evaluación del impacto de bacterias rizosféricas solubilizadoras de fósforo en la producción de *Coffea arabica* L.

3.2. Objetivos específicos

- Aislar microorganismos de muestras representativas de suelo rizosférico de parcelas del cultivo de café en el distrito de Bagua Grande.
- Identificación molecular de rizobacterias solubilizadoras de fósforo asociadas a la rizosfera del cultivo de café.
- Evaluar el efecto de rizobacterias solubilizadoras de fosforo en la producción de *Coffea arabica* L.

4. Antecedentes de la investigación

El fósforo es un macroelemento que generalmente se encuentra de manera abundante en el suelo como P inorgánico (Pi) y orgánico (Po), predominando en formas químicas no disponibles para las plantas por lo que es incorporado en los cultivos como fertilizante (Restrepo-Franco *et al.*, 2015). Sin embargo, solo una pequeña parte del P es asimilada por las plantas mientras que el resto se insolubiliza y pierde debido a diversos factores bioquímicos que hacen a la fertilización química una forma ineficiente de suplementar las necesidades nutricionales del cultivo (Bargaz *et al.*, 2021).

Entre el microbiota asociado a las plantas, se encuentra el grupo de bacterias que promueven el crecimiento vegetal (PGPR) las cuales, mediante mecanismo directos e indirectos, como la producción de fitohormonas y promover la

absorción de nutrientes, respectivamente; mejoran la biomasa y el crecimiento de las plantas (Ali & Pati, 2023).

Dentro de las PGPR de mecanismos indirecto se encuentran en especial las rizobacterias solubilizadoras de fósforo (PSB), conformada por bacterias de simbiosis mutualista con las plantas que equilibran el ciclo biogeoquímico del P en las reacciones bioquímicas de solubilización, mineralización e inmovilización de P en el suelo, aumentando la disponibilidad de fósforo por medio de diversos mecanismos entre ellas el de ejercer como sumidero inmovilizador de diferentes formas de P, incorporación a sus constituyentes microbianos (ésteres de P_o , P_i libre, coenzimas y polifostatos), liberación mineralizada por acción de enzimas fitasas y fosfatasas, y solubilización de P_i por acción de ácidos orgánicos a P extraíble en agua, P en resina y P microbiano en formas disponibles a largo plazo para las plantas (Bargaz *et al.*, 2021).

Las PSB juegan un papel muy importante al liberar parte del fósforo almacenado no disponible mediante procesos de solubilización y mecanismo: 1) liberando ácidos orgánicos, sideróforos, aniones, protones, iones hidroxilo, 2) excretando algunas enzimas extracelulares (solubilización bioquímica del P) y 3) liberando P durante la descomposición de los sustratos (Reis Jr *et al.*, 2023). El crecimiento considerado de las plántulas de café se puede atribuir a muchos mecanismos a través de los cuales las bacterias y hongos rizosféricos contribuyen a la producción sostenible, la solubilización microbiana de fosfato su eficacia y aplicación en la agricultura están recibiendo mayor interés debido a su bajo costo (Abawari *et al.*, 2021).

Así mismo, Bargaz *et al.* (2021), indican que las PSB tienen además la capacidad de promover el desarrollo de raíces por modulación del sistema radicular para una mayor absorción, mejor adquisición de fuentes de P y aumentar la disponibilidad de P_i en ubicaciones cercanas a la rizosfera. Entre los mecanismos se incluyen la producción de reguladores de crecimiento principalmente auxinas en gradientes que regulan el alargamiento celular, señalización de emergencia y crecimiento de la raíz en las que también intervienen enzimas como la 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa de manera indirecta en las modificaciones arquitectónicas y funcionales del sistema radicular (Fitriatin *et al.*, 2020).

En un estudio, se evaluó el efecto de 2 cepas de bacterias (*Kocuria* sp. y *Bacillus subtilis*) en las concentraciones de fósforo del suelo y su absorción para el desarrollo de plántulas de café en invernadero, en tratamientos bajo 3 tipos de sustratos en combinaciones de: suelo, pulpa de café descompuesta, roca fosfórica y fertilizante fosfato diamónico; y demostraron que la aplicación de sustrato con pulpa de café descompuesta más microorganismos favorece la mayor fracción de fósforo disponible evidenciado en el mejor desarrollo radicular de las plántulas (Cisneros-Rojas *et al.*, 2016).

En la investigación realizada por Alvarado y Gutiérrez (2020), se aisló y seleccionó bacterias solubilizadoras de fósforo de la rizosfera muestreada en *Theobroma cacao*, mediante el aislamiento primario por diluciones seriadas - siembra en medio PCA, selección secundaria en medio Pikovskaya y consecutivamente la evaluación cuantitativa de la solubilización de fosfatos de las cepas, obteniendo como resultados en cultivo puro aislado en cajas petri la formación de halos de disolución de fosfatos e Índice de Solubilización (IS) > 3 en dos cepas (CC01 y CC02), valor que indica la potencial capacidad solubilizadora de fósforo de las cepas para la elaboración de bioformulantes.

En la búsqueda de PSB que incrementen el desarrollo vegetativo-reproductivo de tomate, Bazan y Garboza (2019), realizaron la bioprospección de 15 bacterias solubilizadoras de fosfatos (géneros *Burkholderia* y *Pseudomonas*) de la rizosfera de espárrago (*Asparagus officinalis* L.) y analizaron en 2 ensayos las cepas de PSB en el desarrollo vegetativo y reproductivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) durante 60 días. Las cepas presentaron resultados positivos al incrementar el avance vegetativo en índices de efectividad (IE) de 5,48 a 53,81 % en altura y 8,27 a 109,47% tamaño de raíces; e IE en el desarrollo reproductivo de 4,28 a 42,85 % emergencia; 1,93 a 29,16 % altura; 4,34 a 39,13% en el número de frutos y 38,02 a 68,96 % peso de los frutos (Bazan & Garboza, 2019).

5. Hipótesis

5.1. Hipótesis alterna

Las bacterias solubilizadoras de fósforo aisladas de la rizosfera del cultivo de café tienen un efecto potencial en la producción de *Coffea arabica* L.

5.2. Hipótesis nula

Las bacterias solubilizadoras de fósforo aisladas de la rizosfera del cultivo de café no tienen un efecto significativo en la disponibilidad de fósforo ni en la productividad de *Coffea arabica* L..

6. Metodología

6.1. Entorno de trabajo

La presente investigación involucrará actividades en campo y laboratorio. Los microorganismos se aislarán de muestras representativas de suelo rizosférico de manera aleatoria en parcelas representativas productoras de café (*Coffea arabica* L.) en el distrito de Bagua Grande; de la provincia de Utcubamba, región de Amazonas.

El Laboratorio de Investigación en Sanidad Vegetal (LABISANV) de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, en el departamento de Amazonas, con coordenadas geográficas de latitud: -6.233678, Longitud: -77.853778 y una altitud de 2338 m.s.n.m.

6.2. Población, muestra, muestreo

Población: La población estará compuesta por el conjunto de parcelas productoras de café del distrito de Bagua Grande.

Muestra: Estará compuesta por 3 muestras de suelo rizosférico de plantas de café por parcela.

Muestreo: El muestreo será probabilístico, debido a que tomará muestras de suelo rizosférico al azar de las parcelas representativas de producción de café para la recuperación de bacterias solubilizadoras de fósforo (PSB).

6.3. Variables de estudio

6.3.1. Variables independientes

- **Bacterias solubilizadoras de fósforo (PSB):** Las PSB son microorganismos que se encuentran presentes en la rizosfera de las plantas con mecanismos capaces en solubilizar formas insolubles de P y volverlas asimilables para las plantas, generalmente mediante la producción de ácidos orgánicos y enzimas que reaccionan liberando el P fijado en compuestos minerales (Pan & Cai, 2023).

6.3.2. Variables dependientes

- **Parámetros morfofisiológicos:** comprenden características tanto estructurales como funcionales que reflejan el estado de crecimiento y desarrollo de *Coffea arabica* L. (Raíces, Área foliar, Altura de la planta, Clorofila, Peso seco) (Lisboa *et al.*, 2021).
- **Índice de solubilización de fosforo:** El ISF mide la capacidad de una cepa bacteriana para solubilizar fosfatos en un medio de cultivo, por lo que un mayor índice representa mayor eficiencia en la solubilización (Casique, 2018).

6.3.3. Operacionalización de variables

Hace referencia al proceso mediante el cual se traduce un concepto abstracto en indicadores medibles y observables dentro de una investigación científica. Este proceso incluye identificar dimensiones, indicadores y herramientas que permitan analizar cada variable con claridad y precisión (**Véase Tabla 01**). Según Arias Gonzáles (2021), la operacionalización es fundamental para garantizar la relación entre la teoría y práctica de la investigación, facilitando la medición adecuada de los fenómenos estudiados.

Tabla 01: Caracterización de variables de estudio

| VARIABLE | DEFINICIÓN CONCEPTUAL | DEFINICIÓN OPERACIONAL | DIMENSIONES | INDICADORES | INSTRUMENTO/ ESCALA |
|--|---|--|---|--|--|
| Bacterias solubilizadoras de fósforo (PSB) | Microorganismos de la rizosfera con capacidad de solubilizar fósforo insoluble mediante la producción de ácidos orgánicos y enzimas que liberan fósforo fijado en compuestos minerales (Pan & Cai, 2023). | Se medirá la producción de ácidos orgánicos, la actividad enzimática y la eficiencia en la movilización de fósforo en cepas bacterianas aisladas de la rizosfera. | Producción de ácidos orgánicos | Concentración de ácidos orgánicos (mg/L) | Pruebas de laboratorio específicas para cada indicador. |
| | | | Actividad enzimática | Unidades enzimáticas (U/mL) | |
| | | | Eficiencia en la movilización de fósforo. | % de P disponible | |
| Parámetros morfofisiológicos | Características estructurales y funcionales que reflejan el estado de crecimiento y desarrollo de <i>Coffea arabica</i> L. (Lisboa <i>et al.</i> , 2021). | Se evaluarán aspectos como la longitud de raíces, área foliar, altura de planta, contenido de clorofila y peso seco de las plantas sometidas a tratamientos con PSB. | Raíces | Longitud de raíces (cm) | Instrumentos de medición morfológica; SPAD; balanza analítica. |
| | | | Área foliar | Área (cm ²) | |
| | | | Altura de planta | Altura (cm) | |
| | | | Clorofila | Índice SPAD | |
| | | | Peso seco | Peso (kg) | |

| | | | | | |
|---|--|---|-------------------------------------|---------------------------|---|
| Índice de solubilización de fósforo (ISF) | Capacidad de una cepa bacteriana para solubilizar fosfatos en un medio de cultivo; un mayor índice indica mayor eficiencia en la solubilización (Casique, 2018). | Se evaluará el diámetro del halo de solubilización y el diámetro de la colonia bacteriana en medios específicos de cultivo. | Diámetro del halo de solubilización | Halo (mm) | Medición directa en medios de cultivo con regla o calibrador. |
| | | | Diámetro de la colonia. | Diámetro de colonia (mm). | |

6.4. Métodos

6.4.1. Primera fase: Bioprospección de bacterias solubilizadoras de fosforo (PSB)

- **Colectas de campo**

La recolección de muestras de suelo rizosférico de cada parcela seleccionada al azar se tomará utilizando un barreno desinfectado antes de cada muestreo y se descartará los primeros 5 centímetros superficiales para luego tomar la muestra representativa (500 g) en bolsas herméticas. Codificando cada muestra con datos necesarios para su identificación y traslado a Laboratorio de Investigación en Sanidad Vegetal (LABISANV).

- **Aislamiento**

Se tomarán 10 gramos de suelo de cada muestra previamente homogenizada, a los cuales se añadirán 90 ml de solución salina fisiológica al 0.85%. A partir de esta mezcla, se prepararán diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-5} . Además, se procederá a realizar la siembra en superficie utilizando Agar cuenta colonias (PCA) en cajas Petri, las cuales serán incubadas a 35 °C durante 48 horas.(Alvarado & Gutiérrez, 2020).

- **Conservación de cepas**

Los cultivos de las cepas en medio de siembra se conservarán a -70 °C para su posterior identificación de aquellas de actividad solubilizadora.

- **Genotipificación**

Consistirá en el primer criterio de selección, mediante ejecución de la técnica molecular de identificación fingerprinting, llamada BOX-PCR, para detectar la diversidad genética de las cepas e identificar poblaciones bacterianas y la selección de aquellas genéticamente distintas.

- **Test fenotípico**

Se inoculará la bacteria en medio de cultivo selectivo NBRID que contenga fosfato inorgánico insoluble para testear aquellas de mayor actividad solubilizadora, donde aquellas que formen halos de disolución de fosfato transparente con Índice de solubilización ($IS > 3$) indicará el potencial de solubilización de fosforo inorgánico.

El tamaño de los halos se calculó según el Índice de solubilización (IS), según el estudio de Alvarado y Gutiérrez (2020):

$$IS = \frac{A}{B}$$

Donde:

A: Diámetro de la colonia + diámetro del halo.

B: Diámetro de la colonia.

Para la cuantificar el fosforo solubilizado se realizará por el método colorimétrico: Técnica colorimétrica del azul de molibdeno (2do criterio de selección).

- **Identificación taxonómica** (biología molecular).

6.4.2. Segunda fase: Evaluación del efecto de las PSB en las plantas de café (*Coffea arabica* L.) en bolsas.

El efecto de las bacterias solubilizadoras de fosforo (PSB) en el cultivo de café se determinará mediante ensayo bajo condiciones de invernadero.

El ensayo consistirá en determinar el efecto de las 3 cepas con mayor IS de cultivos de bacterias solubilizadoras de fosfato de mayor actividad solubilizadora seleccionadas en la primera fase.

Con respecto al análisis físico-químico del suelo se realizará previo a inocular de cultivo de PSB, en el Laboratorio de Investigación en Suelos y Aguas (LABISAG).

Las plántulas de café serán inoculadas con inóculos de las bacterias solubilizadoras PSB, al trasplantar del germinador en etapa de fosforito a las bolsas de 11 cm de ancho x 13 cm de alto utilizadas en etapa de vivero. Iniciando con las mediciones a la visualización del primer par de hojas hasta todo el periodo que una plántula de café permanece en vivero antes de ser instalada en campo definitivo.

6.5. Cronograma

| Etapas | Duración (meses) | Periodo | |
|--------------------------|---------------------|------------|------------|
| | | Inicio | Termino |
| Elaboración del proyecto | 1 | 01/08/2025 | 01/09/2025 |

| | | | |
|------------------------------------|-----|------------|------------|
| Revisión y corrección del proyecto | 1 | 01/09/2025 | 01/10/2025 |
| Recolección de muestras | 2 | 01/10/2025 | 01/12/2025 |
| Recolección de datos | 6 | 01/12/2025 | 01/01/2026 |
| Análisis de datos | 1 | 01/01/2026 | 01/02/2026 |
| Elaboración de informe | 2 | 01/02/2026 | 01/04/2026 |
| Revisión y corrección de informe | 1 | 01/05/2026 | 01/06/2026 |
| Presentación y sustentación | - | | |
| Total de años (inicio-fin) | 1,6 | 01/01/2025 | 01/06/2026 |

6.6. Diseño experimental

En la investigación se trabajará con un diseño factorial completamente al azar (DCA) con 2 factores y 3 niveles de cada factor: Cepas de PSB (Cepa A, Cepa B, Cepa C) y Concentración de PSB (10^6 , 10^7 , 10^8 UFC/mL). Con 5 repeticiones de cada tratamiento, los tratamientos serán 9 mas 1 tratamiento testigo (sin inóculo de PSB). Haciendo un total de 50 unidades experimentales.

6.6.1. Modelo aditivo lineal

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (A * B)_{ij} + E_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Representa la observación correspondiente al nivel (i) del factor A (cepas) y al nivel (j) del factor B (concentración).

μ = Efecto medio verdadero de la media total

A_i = Efecto producido por el nivel i – ésimo del factor A (cepas)

B_j = Efecto producido por el nivel j – ésimo del factor B (concentración).

$(AB)_{ij}$ = Efecto producido por la interacción del nivel i – ésimo del factor A (cepas) con el nivel j – ésimo del factor B (concentración).

Eijk = Efecto producido por el error.

6.7. Análisis de datos

Se realizará mediante el software R Studio, una herramienta de código abierto basada en el lenguaje de programación R, ampliamente reconocida por su capacidad para gestionar, analizar y visualizar datos de manera eficiente y reproducible. R Studio permite realizar análisis estadísticos avanzados, aplicar modelos de regresión, pruebas de hipótesis y análisis multivariado, lo cual es ideal para proyectos científicos que requieren un manejo robusto y preciso de grandes conjuntos de datos (Giorgi *et al.*, 2022).

7. Referencias

- Abawari, R. A., Assefa, F., & Muleta, D. (2021). Effect of phosphate solubilizing bio-inoculants and vermicompost application on mineral uptake and growth of coffee (*Coffea arabica* L.) seedlings under greenhouse condition. *SINET: Ethiopian Journal of Science*, 44(2). <https://doi.org/10.4314/sinet.v44i2.1>
- Ali, N., & Pati, A. M. (2023). PGPR mediated enhancement of saffron corm production in non-traditional area of Himachal Pradesh, India. *South African Journal of Botany*, 161. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.08.019>
- Alvarado Ibáñez, J. C., & Gutiérrez Araujo, M. K. (2020). Aislamiento y selección de rizobacterias solubilizadoras de fósforo a partir de cultivos de *Theobroma cacao* L. *Revista Científica Dékamu Agropec*, 1(1). <https://doi.org/10.55996/dekamuagropec.v1i1.21>
- Arias Gonzáles, J. L. (2021). Guía para elaborar la operacionalización de variables. *Espacio I+D: Innovación Más Desarrollo*, 10(28).
- Bargaz, A., Elhaisoufi, W., Khourchi, S., Benmrid, B., Borden, K. A., & Rchiad, Z. (2021). Benefits of phosphate solubilizing bacteria on belowground crop performance for improved crop acquisition of phosphorus. In *Microbiological Research* (Vol. 252). <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126842>
- Bazan Carrasco, R. J., & Garboza Chumpitaz, N. I. (2019). *Bacterias solubilizadoras de fosfato aisladas de Asparagus officinalis L. y su efecto en el desarrollo vegetativo de Lycopersicon esculentum Mill.*
- Casique. (2018). *Solubilización de fosfatos por bacterias aisladas de la rizósfera de leguminosas de cobertura creciendo en suelos degradados de la subcuenca del Cumbaza San Martín.*
- Cisneros-Rojas, C. A., Sánchez-de Prager, M., & Menjivar-Flores, J. C. (2016). Efecto de bacterias solubilizadoras de fosfatos sobre el desarrollo de plántulas de café. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1). <https://doi.org/10.15517/am.v28i1.22021>

- Fitriatin, B. N., Fauziah, D., Fitriani, F. N., Ningtyas, D. N., Suryatmana, P., Hindersah, R., Setiawati, M. R., & Simarmata, T. (2020). Biochemical activity and bioassay on maize seedling of selected indigenous phosphate-solubilizing bacteria isolated from the acid soil ecosystem. *Open Agriculture*, 5(1). <https://doi.org/10.1515/opag-2020-0036>
- Giorgi, F. M., Ceraolo, C., & Mercatelli, D. (2022). The R Language: An Engine for Bioinformatics and Data Science. In *Life* (Vol. 12, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/life12050648>
- Lisboa, L. A. M., Cunha, M. L. O., Nakayama, F. T., de Figueiredo, P. A. M., da Silva Viana, R., Ramos, S. B., & Ferrari, S. (2021). Morphophysiological characteristics of arabic coffee. *Nativa*, 9(1). <https://doi.org/10.31413/nativa.v9i1.11066>
- Pan, L., & Cai, B. (2023). Phosphate-Solubilizing Bacteria: Advances in Their Physiology, Molecular Mechanisms and Microbial Community Effects. In *Microorganisms* (Vol. 11, Issue 12). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11122904>
- Reis Jr, R. dos A., Pazzetti, G., & Guelfi, D. R. (2023). Enhanced Efficiency Phosphorus Fertilizer Impact on Physiological Characteristics of Coffee Seedlings. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 14(12). <https://doi.org/10.4236/abb.2023.1412034>
- Restrepo-Franco, G. M., Marulanda-Moreno, S., de la Fe-Pérez, Y., Díaz-de la Osa, A., Lucia-Baldani, V., & Hernández-Rodríguez, A. (2015). Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CENIC Ciencias Biologicas*, 46(1).