
Biodiversidad de la disolución microbiana de los fosfatos minerales

Biodiversity of mineral phosphate microbial solubilization

Isbelia Reyes

Laboratorio de Biofertilizantes, Decanato de Investigación. Universidad Nacional Experimental del Táchira (UNET). isreyes@unet.edu.ve

RESUMEN

La interacción entre plantas y microorganismos capaces de liberar iones de las superficies minerales del suelo permite la biodisponibilidad del P en los ecosistemas. Entre los mecanismos microbianos de la disolución de los fosfatos se ha demostrado el efecto de la protonación, la acción quelatante de sustancias orgánicas, y la acción de mecanismos reductores de los cationes. La variación, *in vitro*, de las fuentes de C, N y P moduló tanto la cantidad como el tipo de sustancias fosfodisolventes producidas en hongos como *Penicillium rugulosum* IR94MF1 y de algunas cepas bacterianas diazotróficas de vida libre como *Azotobacter*, provenientes de suelos de la mina de fosfatos Monte Fresco del estado Táchira. Las moléculas biodisolventes de

ABSTRACT

Interactions between plants and microorganisms releasing ions from mineral surfaces, allow the bioavailability of P in the ecosystems. There are different microbial mechanisms of phosphate solubilization such as protonation, chelating action of organic substances and the reducing mechanisms of cations. *In vitro*, changes of C, N y P sources modulated both the quantity and type of solubilizing substances in fungi such as *Penicillium rugulosum* IR-94MF1 and some strains of *Azotobacter* isolated from soils of Monte Fresco phosphate mine from Táchira State. The microbial biosolubilizing molecules have a distinct effect on the different types of mineral phosphates and consequently, the microbial rhizosphere colonization is also altered. In the rhizospheric aggregates the microbial life is 10-100

origen microbiano afectan diferentemente la disolución de distintos tipos de fosfatos minerales por lo que la colonización rizosférica microbiana se ve igualmente alterada. A nivel de los agregados rizosféricos, donde la vida microbiana es 10-100 veces mayor a la del suelo adyacente, las poblaciones de microorganismos disolventes de fosfatos actúan en la movilización y disponibilidad del P permitiendo no solo un incremento de la actividad biológica del suelo sino también la promoción del crecimiento vegetal. Se discute que los sustratos orgánicos e inorgánicos que sean utilizados como fuentes de C, N y P deben ser considerados en la evaluación de los microorganismos disolventes de fosfatos como biotransformadores de minerales o biofertilizantes.

Palabras Claves: Disolución de fosfatos, biofertilizantes, rizósfera, *Penicillium* spp., *Azotobacter* spp

times higher than in the bulk soil and the microbial solubilizing populations acting in the mobilization and availability of P allow both the increase of the soil biological activity and the plant growth promotion. The organic and inorganic substrates to be used as C, N and P sources should be considered while evaluating phosphate solubilizing microorganisms as mineral biotransformers or biofertilizers.

Key Words: Phosphate solubilization, biofertilizers, rhizosphere, *Penicillium* spp., *Azotobacter* spp

INTRODUCCIÓN

En el ecosistema suelo-planta, los factores ambientales regulan el crecimiento de los vegetales, los cuales al morir pasan por procesos de transformación realizados por la fauna del suelo y por la descomposición microbiana. Estas interacciones entre fauna, microorganismos y los materiales biológicos de origen vegetal y animal permiten la liberación de los nutrimentos en concomitante interacción con los factores ambientales del suelo.

Considerando todos los elementos nutritivos que conforman la materia orgánica, después del N, el P es uno de los elementos de mayor demanda en el ecosistema al participar en la transmisión de genes (ADN y ARN), en la producción de energía química (ATP), en la estructura de los tejidos (fosfolípidos, dientes, huesos) y en la productividad de los ecosistemas naturales y agrícolas como componente molecular de la biomasa. En la producción vegetal, el P esta disponible en las formas de ortofosfatos solubles (HPO_4^- y H_2PO_4^-), los cuales provienen de complejas reacciones bioquímicas del suelo, por lo que en la producción agrícola la alta demanda de este elemento, al exceder la capacidad de liberación del suelo, hace necesario su aplicación en forma de fertilizantes químicos de alta solubilidad, los cuales no son solo costosos sino que también provocan la eutroficación de los cuerpos de agua a pesar de su baja movilidad en el suelo. Normalmente, solo cerca de 10% del P aplicado en un fertilizante químico es aprovechado por la planta y un 1% del P (0,03-3 mM) presente en el suelo esta disponible para ser absorbido (Goldstein, 1986).

El P se encuentra en la naturaleza en los minerales naturales como rocas fosfóricas y en forma orgánica en la biomasa, donde el fitato conforma entre el 50 al 80% del P orgánico (Richardson, 1994). Los fosfatos minerales o fosfatos primarios son transformados por la acción ambiental y biológica de los suelos en fosfatos secundarios como son las apatitas [$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F}, \text{Cl}, \text{OH})$], presentes principalmente en suelos neutros y alcalinos; y las estrengitas ($\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y las varsicitas ($\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) presentes principalmente en suelos ácidos (Banfield *et al.* 1999). Estos fosfatos inorgánicos se caracterizan por su baja solubilidad en el suelo por lo que reacciones químicas y bioquímicas inherentes a cada tipo de suelo tienen lugar para permitir la disponibilidad del fosfato en los procesos de construcción y mantenimiento del ecosistema. Por lo tanto, la microbiota del suelo juega un rol preponderante al movilizar el P de los

diferentes compartimientos del sistema suelo mediante actividades enzimáticas, producción de metabolitos y cambios físico-químicos del sustrato.

En este trabajo se reseña la importancia de la biodiversidad de los microorganismos del suelo en la disolución de los fosfatos naturales como las rocas fosfóricas. A partir de estudios *in vitro* de la fisiología microbiana de la disolución de diferentes tipos de fosfatos inorgánicos y del uso de marcadores moleculares se intenta comprender los mecanismos microbiológicos de la movilización del P que permitan la selección de cepas microbianas con potencial como biofertilizantes fosforados

MATERIALES Y MÉTODOS

Microflora rizosférica fosfodisolvente

Se realizó un muestreo microbiológico del suelo rizosférico de cuatro especies vegetales: *Iresine herbstii*, *Ageratum conyzoides*, *Braccharis* sp., *Mimosa* sp., las cuales se presentaron como plantas colonizadoras del suelo disturbado y alterado de una zona de explotación abandonada, desde hace varios años, en la mina de roca fosfórica de Monte Fresco, Táchira, Venezuela. Se comparó el suelo de las rizósferas con el suelo de una zona cercana (150 m) no explotada y conformada por un pastizal arbustivo. El suelo rizosférico se separó del suelo no rizosférico mediante sacudidas del sistema radical, como se reseña en Reyes *et al.* (en prensa), se colocó en agitación en una solución salina isotónica, se realizó las diluciones seriadas de las muestras, se sembró en placas de petri conteniendo PDA para el conteo de hongos totales, agar nutritivo para bacterias totales y para hongos y bacterias fosfodisolventes se utilizó el medio mínimo compuesto por litro de agua destilada de: 0,4 g de NH_4Cl ; 0,78 g de KNO_3 ; 0,1 g de NaCl ; 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,5 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,56 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 1,40 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2 μg de vitamina B_{12} ; 10 g de glucosa y 20 g de agar (Reyes *et al.* 1999a). El fósforo se agregó al medio en la forma de hidroxapatita (HA) a razón de $2,5 \text{ g L}^{-1}$ y el pH fue ajustado a 6,5. Se incubó a 28°C y se contó las poblaciones microbianas totales entre 2 y 4 días y las fosfodisolventes entre 3 y 7 días, utilizando como criterio para estas últimas la expresión del fenotipo Mps^+ conformado por la producción de un halo de clarificación alrededor de las colonias microbianas. Finalmente, se expresó el conteo microbiano en UFC g^{-1} de suelo rizosférico seco.

Fisiología de la disolución de los fosfatos

El hongo *Penicillium rugulosum* IR.94MF1 con alta capacidad de disolución de HA se aisló del suelo de una zona de afloramiento natural de la mina de roca fosfórica de Monte Fresco. El tipo salvaje de este hongo fue sujeto a un proceso de mutagénesis con luz UV con el fin de obtener mutantes fisiológicos para la disolución de los fosfatos (Reyes *et al.* 1999a). Para medir la disolución de fosfatos de calcio (HA), fosfato de hierro y fosfato de aluminio se realizó cultivos monofásicos mediante el uso de un inóculo conformado por micelio de 3 días y un medio basal (Reyes *et al.* 1999b), que permitió la modificación de las fuentes de nitrógeno y de fósforo. Como fuentes de nitrógeno se utilizaron la arginina, el amonio, el nitrato y el nitrato+amonio a una concentración de 0,025 % N y como fuentes de fósforo se utilizaron la HA, el fosfato de hierro y el fosfato de aluminio a una concentración de 30 mM P y fosfato de potasio a 3 mM P. Para evitar contaminación de origen bacteriano se utilizó los antibióticos cloranfenicol y estreptomycin, se incubó durante 7 días y se determinó el fosfato en solución mediante determinación colorimétrica utilizando el método de vanado-molibdato (Tandon *et al.* 1986) como descrito por Reyes *et al.* (1999b).

Las bacterias con poder fosfodisolvente se aislaron de la rizósfera de las plantas colonizadoras de la zona de explotación de la mina de Monte Fresco, se caracterizaron mediante pruebas bioquímicas y de diferenciación del género de *Azotobacter*, y a éstas últimas se les estudió el metabolismo fosfodisolvente de la hidroxapatita variando las fuentes de nitrógeno (amonio o nitrato) y de carbohidratos (glucosa, sucrosa o manitol) como reportado por Reyes *et al.* (en prensa).

Colonización de la rizosfera mediante el uso de un marcador molecular

P. rugulosum IR-94MF1 se transformó mediante electroporación utilizando el plásmido pPS57 de 5,38 kb portador del gen de acetiltransferasa de *Escherichia coli*, el origen de replicación M13 y el promotor de isopenicilina N sintetasa de *P. chrysogenum* fusionado con el gen de resistencia a la higromicina B, *hph*, de *E. coli*. Los transformantes obtenidos se analizaron mediante hibridación Southern, se caracterizaron fisiológicamente mediante el crecimiento, producción de acidez y la disolución de fosfatos como reportado en Reyes *et al.* (2002).

Se realizó un ensayo en microcosmos utilizando un suelo de baja fertilidad de pH 6,25 (Reyes *et al.* 2002) y un diseño experimental bifactorial al azar con 20 tratamientos y tres repeticiones. Se usó cinco tratamientos de inoculación: *P. rugulosum* IR-94MF1 tipo salvaje, el transformante w-T3, los mutantes Mps^- y Mps^{++} (obtenidos por mutagénesis, como ya señalado), y un control no inoculado; y cuatro fuentes de fosfatos: un control sin fosfatos, el mineral de apatita de Florida, la roca fosfórica de Navay, y el superfosfato simple (SPS) a una concentración de 46 mg P kg⁻¹ de suelo. Igualmente se agregó 60 mg de N como nitrato de amonio y 48 mg de K como KCl por kg⁻¹ de suelo y se utilizó la planta indicadora *Zea mays* durante un tiempo de crecimiento de cinco semanas, al final del cual se evaluó el peso seco producido y el contenido de P en el tejido vegetal (Tandon *et al.* 1968). La preparación del experimento, la aplicación del inóculo fúngico, la detección de éste en la rizósfera del maíz mediante el conteo de UFC g⁻¹ de suelo rizosférico y el resto de detalles del experimento están reportados en Reyes *et al.* (2002).

Análisis de resultados

Se determinó la homogeneidad de la varianza (ANOVA) y la comparación de medias entre los tratamientos por la mínima diferencia significativa (LSD). Cuando fue necesario se aplicó la transformación [$\log(UFC + 1)$] para la normalización de los datos microbiológicos. Todos los valores son medias de tres réplicas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Disolución de los fosfatos por efectos bióticos y abióticos

Los fosfatos minerales se caracterizan por poseer una baja solubilidad en agua, < 0,1% (Leon *et al.* 1986), sin embargo, la actividad de los microorganismos del suelo afecta la biodisponibilidad de los metales. La interacción microorganismos-minerales actúa en la disolución de los fosfatos naturales mediante ligandos naturales tipo ácidos orgánicos y otros agentes acomplejantes y a través de la protonación por ácidos inorgánicos, orgánicos y excreción celular. Welch *et al.* (2002) mostraron por microscopía electrónica de barrido las alteraciones que sufren los cristales de apatita al hacerlas reaccionar con HCl, y el efecto disolvente que los polímeros de origen microbiano causan a estas apatitas.

En el suelo disturbado por explotación minera de la mina de roca fosfórica de Monte Fresco, la rizósfera de *Iresine herbstii*, *Ageratum conyzoides*, *Braccharis* sp. y *Mimosa* sp., arrojaron poblaciones cultivables de hongos fosfodisolventes de 0 a 29% y de 3 a 13% de bacterias fosfodisolventes. Kucey *et al.* (1989) reportan poblaciones de microorganismos disolventes de fosfatos en un rango entre <1 a 38% en relación a la población microbiana cultivable total. Al compararse la relación rizósfera:suelo (R:S) para las poblaciones cultivables, microbianas totales y fosfodisolventes de las cuatro diferentes plantas colonizadoras se encontró que si bien las bacterias totales presentaron una mayor relación R:S que los hongos totales, 44 y 22, respectivamente, las bacterias y hongos fosfodisolventes mostraron valores muy similares, 16 y 15, respectivamente; lo que señala la importancia de los hongos fosfodisolventes en estos suelos altamente perturbados y de explotación de los fosfatos naturales (Reyes *et al.* en prensa). Otros microorganismos fosfodisolventes de hidroxiapatita como hongos de los géneros *Aspegillus* y *Penicillium*, cinco de ellos con un fenotipo similar a *P. rugulosum* IR-94MF1 y 15 bacterias Gram-negativas, entre ellas cinco diazotróficas del género *Azotobacter*, fueron posteriormente aislados del suelo y de la rizósfera de las plantas colonizadoras. Al comparar químicamente la zona de explotación

de la mina con una zona adyacente no explotada se encontró que los valores de pH, P soluble y Ca^{+2} fueron mayores para el primero (Reyes *et al.* 2005) probablemente debido a la liberación de los fosfatos, del calcio y otros cationes a partir de la disolución de la roca. Las diferentes cepas de hongos fosfodisolventes encontradas en estos suelos de la mina corroboran la importancia de los mismos en los procesos de disolución de la roca fosfórica de Monte Fresco. Se ha señalado en la literatura una gran variedad de microorganismos implicados en la disolución de los fosfatos en el suelo, tales como bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Azotobacter* (Kucey *et al.* 1989; Rodríguez y Fraga 1999) y hongos de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, entre otros (Kucey *et al.* 1989; Illmer *et al.* 1995; Vassilev *et al.* 1996). En general, puede decirse que las poblaciones de microorganismos cultivables fosfodisolventes varían en función del tipo de suelo, del tipo de vegetación y de las condiciones ambientales.

Biodiversidad de los mecanismos de la disolución de los fosfatos

Del hongo fosfodisolvente de fosfatos, *P. rugulosum* cepa IR-94MF1, se desarrolló dos mutantes únicos, Mps^- y Mps^{++} (Reyes *et al.* 1999a), caracterizados por un fenotipo reducido y otro incrementado, respectivamente, para la disolución de los fosfatos de calcio y de hierro (Fig.1)

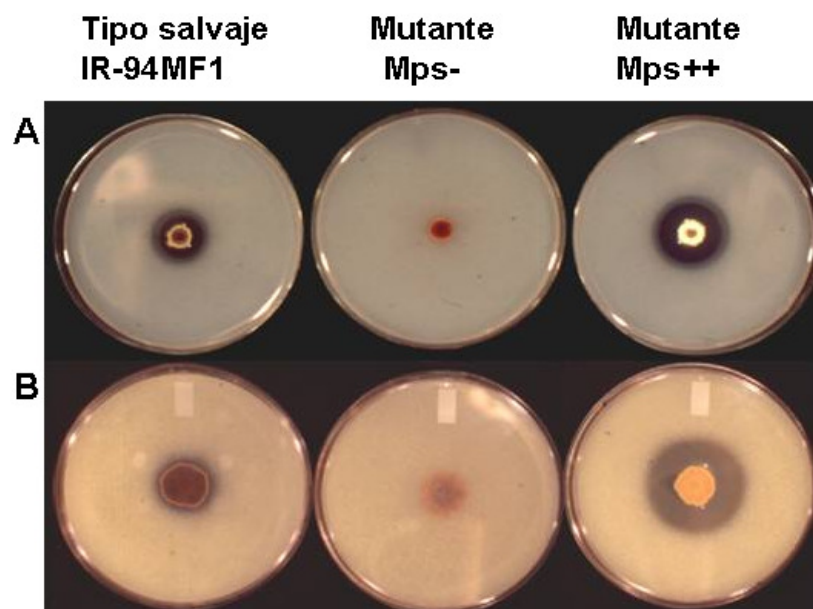


Figura 1. Disolución de fosfatos por las cepas salvaje y mutantes del hongo tropical *P. rugulosum* IR-94MF1. A: disolución de la hidroxiapatita a los 5 días de incubación. B: disolución del fosfato de hierro a los 10 días de incubación.

Los mutantes permitieron comprender los tres mecanismos de acción de la disolución de fosfatos que posee la cepa salvaje *P. rugulosum* IR-94MF1. Se encontró que las fuentes de C, N y P juegan un efecto diferencial en la disolución de los fosfatos. Al evaluar la sucrosa, la maltosa y la glucosa en medio sólido se encontró que la sucrosa a una concentración de 30 g l^{-1} incrementó significativamente la disolución de la HA y del fosfato de hierro tanto en la cepa salvaje como en el mutante Mps^{++} (Reyes *et al.* 1999a). El amonio como única fuente de N ejerció un efecto negativo significativo en la disolución de la HA en medio líquido, comparado con la arginina, el nitrato y el amonio+nitrato, sin embargo, esta disminución no se observó al utilizar el fosfato de hierro y de aluminio como fuentes de P. El P presente en la solución de los cultivos de *P. rugulosum* al final de una semana de incubación en medio líquido con HA varió entre 7 y 83%, con el fosfato de hierro entre 0 y 62% mientras que con el fosfato de aluminio

entre 0 y 5%, tomando en consideración tanto las diferentes cepas como las fuentes de nitrógeno. Sin embargo, estos valores no muestran el P total disuelto ya que una parte de éste quedó inmovilizado en la biomasa microbiana, la cual varió en función de los diferentes tratamientos (Reyes *et al.* 1999b). Estos resultados señalaron que el fosfato de hierro fue mayormente disuelto por el mutante Mps^{++} en presencia de nitrato mientras que el fosfato de aluminio principalmente en presencia de arginina y de amonio; igualmente se destaca que el mutante Mps^{-} no presentó crecimiento en el medio con HA, sin embargo, presentó una disolución de fosfatos de aluminio presumiblemente mediante la liberación de protones que acompaña la respiración o la asimilación del amonio (Fig. 2). Es interesante reseñar que la disolución del fosfato de hierro por la cepa salvaje pareciera ser mas importante en medio sólido que en medio líquido (Figs. 1 y 2) al utilizar como fuente de nitrógeno nitrato+amonio.

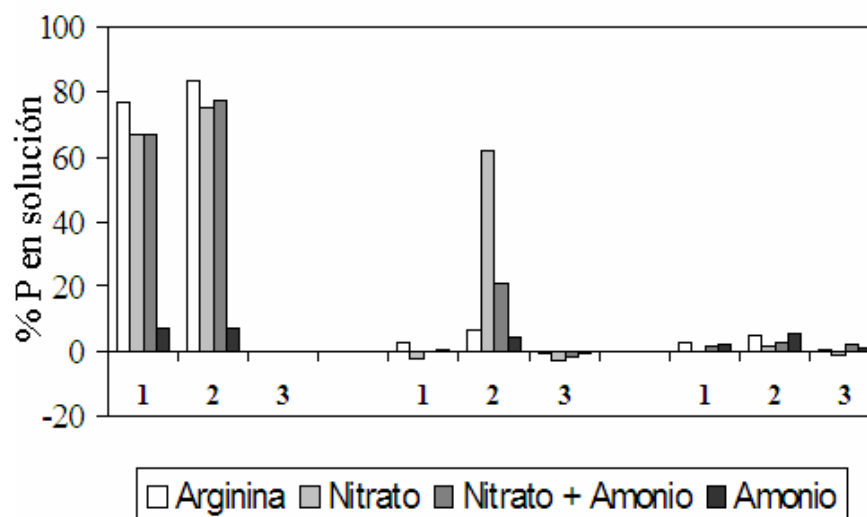


Figura 2. Disolución de fosfatos de calcio (hidroxiapatita), fosfato de hierro y fosfato de aluminio *in vitro* por las cepas salvaje (1), mutante Mps^{++} (2) y mutante Mps^{-} (3) de *P. rugulosum* IR-94MF1 en presencia de diferentes fuentes de nitrógeno. Los valores de P en solución fueron substraídos del control no inoculado. Los valores negativos corresponden a la inmovilización microbiana respecto a los valores del control no inoculado.

La sustancia implicada en la disolución de los fosfatos de calcio fue el ácido glucónico, el cual presentó correlaciones significativas positivas en los filtrados de los cultivos de la cepa salvaje ($r_s=0,762$, $P<0,05$) y del mutante Mps^{++} ($r_s=0,929$, $P<0,01$), midiéndose concentraciones entre 88-107 mM en los tratamientos de HA con arginina, nitrato y nitrato+amonio (Reyes *et al.* 1999b). La detección del ácido cítrico se correlacionó significativamente ($r_s=0,857$, $P<0,01$) con la disolución del fosfato de hierro al medirse las mayores concentraciones, entre 11 y 14 mM, en los tratamientos con el mutante Mps^{++} y nitrato; así mismo, este mutante, mostró una correlación significativa positiva ($r_s=0,774$, $P<0,05$) entre el aumento del P en solución a partir del fosfato de aluminio y la concentración del ácido glucónico en el medio, la cual se detectó entre 10,5 y 49 mM (Reyes *et al.* 1999b) con las diferentes fuentes de nitrógeno utilizadas. Igualmente, se encontró que la mineralogía y la composición química de las diferentes rocas fosfóricas modularon el crecimiento y la expresión del fenotipo fosfodisolvente del hongo *P. rugulosum* IR-94MF1, observándose que el ácido cítrico fue el agente más activo en la disolución de la variscita de Utah, el ácido glucónico en la disolución de la apatita de Florida y la roca fosfórica de Monte Fresco, mientras que ambos ácidos orgánicos parecieron estar implicados en la disolución de la roca fosfórica venezolana de Navay (Reyes *et al.* 2001). Finalmente, en el caso de *P. rugulosum* IR-94MF1 la produc-

ción de los ácidos glucónico y cítrico parecen estar sujetos a una inducción-represión catabólica bajo efecto de diferentes condiciones nutricionales como lo son, principalmente, las diferentes fuentes de C, N y P (Reyes *et al.* 1999b).

Al igual que para *P. rugulosum* IR-94MF1, todas las cepas microbianas aisladas de *Azotobacter* spp. presentaron diferencias en la capacidad fosfodisolvente de la HA al utilizar, en medio sólido, diferentes fuentes de carbono (dextrosa, sucrosa y manitol) y de nitrógeno (amonio y nitrato); observándose que todas ellas presentaron ausencia del halo característico de la disolución al utilizarse el tratamiento de manitol con nitrato. En el caso específico de la cepa de *Azotobacter* AV01MF1B la mayor disolución de la HA se encontró en el tratamiento con sucrosa y nitrato (Reyes *et al.* en prensa), como se detalla en la Fig. 3. Como señalado para el hongo *P. rugulosum* IR-94MF1, las cepas diazotróficas aisladas de *Azotobacter* spp. también presentaron una variación en la disolución de la HA en función de la fuente de C y de N.

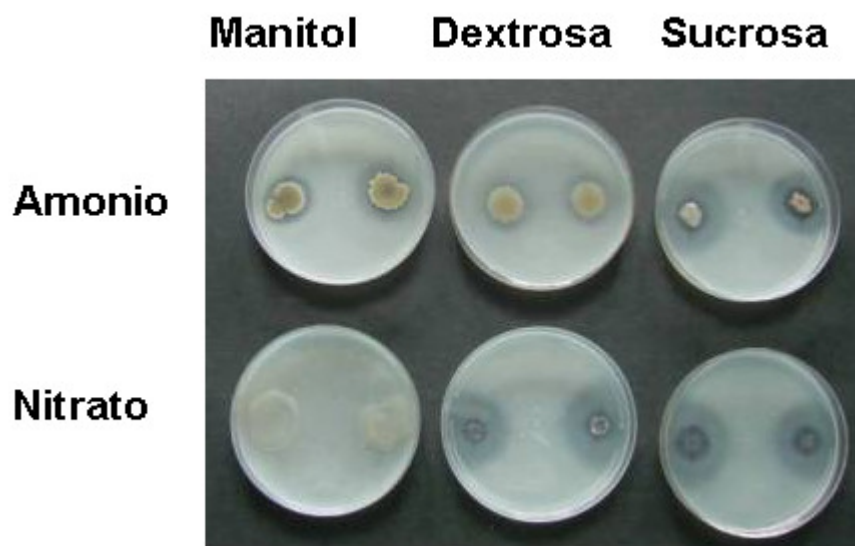


Figura 3. Disolución de la hidroxiapatita por la cepa *Azotobacter* AV01MF1B bajo diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno a dos semanas de incubación a 28 °C.

Efecto de la colonización rizosférica microbiana en la absorción de fosfatos por la planta

En el ensayo de microcosmos utilizando *Zea mays* como planta indicadora se encontró que *P. rugulosum* (cepa salvaje IR-94MF1, transformante w-T3, mutante Mps^{++} y mutante Mps^{-}) aumentó el crecimiento del maíz de 4 a 29%, dependiendo del tratamiento con la fuente de fosfatos. Sin embargo, sólo en presencia de la roca fosfórica de Navay las cepas tipo salvaje IR-94MF1 y w-T3 aumentaron significativamente la asimilación del P de 26 a 38%, respectivamente, en relación al testigo no inoculado tratado con la misma roca fosfórica (Reyes *et al.* 2002). Al evaluarse la colonización rizosférica de *P. rugulosum* utilizando la cepa transformante w-T3 como marcador molecular se encontró un valor en la relación R:S de 7,9 para el tratamiento con la roca fosfórica de Navay, mientras que para el control, la roca fosfórica de Florida y el SPS se presentaron menores valores (Cuadro 1); lo que indicó que la absorción de P por la planta se incrementó por el efecto de la colonización de *P. rugulosum* IR-94MF1 en la rizósfera del maíz. Cuando la concentración de P soluble fue alta en el suelo debido al tratamiento con SPS la colonización rizosférica por el hongo fue similar a la del suelo propiamente dicho, señalando una relación R:S baja e incluso < 1 ; mientras que en el control, compuesto de un suelo muy pobre en P soluble, el hongo *P. rugulosum* se alojó principalmente en la rizósfera, en forma similar que con la

fuelle de fosfato de Florida. Con esta última el maíz presentó una absorción de P intermedia entre el control y la roca fosfórica de Navay. Estos resultados señalan la importancia de la colonización rizosférica del inoculante en la fosfodisolución y del comportamiento de dicha colonización frente a la composición química de la fuente de fosfatos. Probablemente, la expresión del fenotipo fosfodisolvente del inoculante se modulará por efecto de las condiciones nutricionales presentes tanto en el suelo como en la fuente de fosfatos y por efecto de la fisiología de la planta a través de sus exudados radicales.

Cuadro 1. Población del transformante *P. rugulosum* w-T3 en la rizósfera y en el suelo de plantas de maíz de cinco semanas de crecimiento en microcosmos y fertilizadas con diferentes fuentes de fosfatos en condiciones de invernadero^a. (Reyes *et al.* 2002).

Fuente de Fósforo ^b	Rizósfera	Suelo	Relación R:S
	w-T3 UFC x 10 ³ g ⁻¹		
Control	8,7 ^b	1,9 ^b	4,6
Florida	12,3 ^b	5,4 ^{ab}	2,3
Navay	93,0 ^a	11,7 ^a	7,9
SFT	8,6 ^b	9,9 ^a	0,9

^a Los valores son medias de tres réplicas. Las medias de la misma columna seguidas por diferentes letras son diferentes significativamente ($P < 0,01$) en base al análisis de medias LSD.

^b Florida, mineral de apatita; Navay, roca fosfórica venezolana; SFS superfosfato simple.

Adicionalmente, se ha encontrado, en trabajos de campo con maíz, que la introducción de bacterias benéficas fosfodisolventes aumenta, en algunos casos, la colonización rizosférica de la microflora autóctona cultivable y disolvente de fosfatos respecto al control no inoculado (datos no publicados), lo que podría interpretarse como una compatibilidad ecológica del inóculo frente a la microflora nativa fosfodisolvente rizosférica, en beneficio del crecimiento y estatus nutricional de la planta hospedera. Estas observaciones también pudiesen orientar la selección de cepas microbianas con potencial de uso como biofertilizantes.

CONCLUSIONES

A nivel de los agregados rizosféricos, donde la vida microbiana es 10-100 veces mayor a la del suelo adyacente, las poblaciones de microorganismos disolventes de fosfatos actúan en la movilización y disponibilidad del P permitiendo no solo un incremento de la actividad biológica del suelo sino también la promoción del crecimiento vegetal. En consecuencia, debido a la complejidad y la biodiversidad de los mecanismos de acción para la disolución de los fosfatos, propios de los microorganismos fosfodisolventes, es importante una caracterización fisiológica de estos mecanismos para la selección de aquellas cepas con potencial de uso como biofertilizantes. Esta estrategia enfoca planificar una selección más eficiente y racional del inóculo respecto al tipo de cultivo, suelo, substratos orgánicos y fuentes de fosfatos, al considerar la fisiología del inoculante como un aspecto previo de caracterización que resultará en un aumento de las posibilidades de éxito del biofertilizante en el suelo.

LITERATURA CITADA

Banfield, J. F., W.W. Barker, S. A. Welch y A. Taunton. 1999. Biological impact on mineral dissolution: application of the lichen model to understanding mineral weathering in the rhizosphere. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 38, 3404-3411.

- Goldstein, A.** 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. *Am. J. Alter. Agric.* Vol 1: 51-57.
- Illmer, P., A. Barbato y F. Schinner.** 1995. Solubilization of hardly-soluble $AlPO_4$ with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* 27:265-270.
- Kucey, R. M. N., H.H. Janzen y M.E. Leggett.** 1989. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. *Adv. Agron.* 42:199-228.
- León, L. A., W. E. Fenster y L. L. Hammond.** 1986. Agronomic potential of eleven phosphate rocks from Brazil, Colombia, Peru, and Venezuela. *Soil Sc. Soc. Am. J.* 50: 798-802.
- Reyes, I., L. Bernier, R.R. Simard, P. Tanguay y H. Antoun.** 1999a. Characteristics of phosphate solubilization by an isolate of a tropical *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microbiol. Ecol.* Vol. 28: 291-295.
- Reyes, I., L. Bernier, R.R. Simard y H. Antoun.** 1999b. Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microbiol. Ecol.* Vol. 28: 281-290.
- Reyes, I., R. Baziramakenga, L. Bernier y H. Antoun.** 2001. Solubilization of phosphate rocks and minerals by a wild-type strain and two UV-induced mutants of *Penicillium rugulosum*. *Soil Biol. Biochem.* Vol. 33: 1741-1746.
- Reyes, I., L. Bernier y H. Antoun.** 2002. Rock phosphate solubilization and colonization of maize rhizosphere by wild and genetically modified strains of *Penicillium rugulosum*. *Microbiol. Ecol.* Vol. 44: 39-48.
- Reyes, I., A. Valery y Z. Valduz.** Phosphate-solubilizing microorganisms isolated from rhizospheric and bulk soils of colonizer plants at an abandoned rock phosphate mine. *Plant and Soil* (en prensa).
- Richardson, A. E.** 1994. Soil microorganisms and phosphorus availability. In *Soil Biota, management in sustainable farming systems*, ed. C. E. Pankhurst, B. M. Doube, V. V. S. R. Gupts, P. R. Grace. pp. 50-62. CSIRO Victoria, Australia.
- Rodríguez, H. y R. Fraga.** 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* 17: 319-339.
- Tandon, H.L.S., M. P. Cescas y E. H. Tyner** (1968) An acid-free vanadate-molybdate reagent for the determination of total phosphorus in soils. *Soil Sci Soc Amer Proc* 32:48-51
- Vassilev, N., M. Fenice y F. Federici.** 1996. Rock phosphate solubilization with gluconic acid produced by immobilized *Penicillium variabili* P16. *Biotechnol. Tech.* 10: 585-588.
- Welch, S. A., A. E. Tuanton y J. F. Banfield.** 2002. Effect of microorganisms and microbial metabolites on apatite dissolution. *Geomicrobiol. J.* Vol 19: 343-367.
- Whitelaw, M.A.** 2000. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Adv. Agron.* 69, 99-151.