

FACULTAD DE CIENCIAS

Interacción de bacterias solubilizadoras de fosfatos y micorrizas arbusculares en la optimización del uso de rocas fosfóricas y su evaluación mediante la aplicación de técnicas isotópicas.

Marcia Toro García

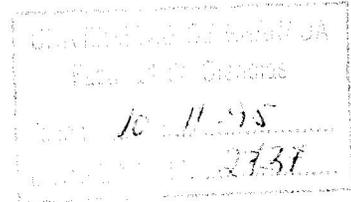
Tesis Doctoral

UNIVERSIDAD DE GRANADA

PROJ. T-151404

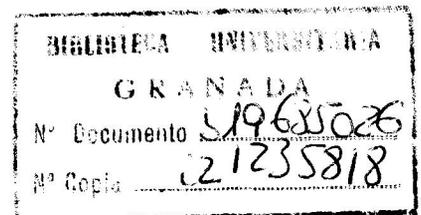
T
15
143

Interacción de bacterias solubilizadoras de fosfatos y micorrizas arbusculares en la optimización del uso de rocas fosfóricas y su evaluación mediante el uso de técnicas isotópicas.



Memoria presentada para optar
al grado de Doctor.
Granada, Noviembre de 1995.

Fdo. Marcia Toro García
Lda. en Ciencias Biológicas



Director de Tesis

Fdo. Dr. José Miguel Barea.



Indice General.

1. Ciclo del Fósforo.

- 1.1. El Fósforo en el suelo
- 1.2. Origen y reservas del Fósforo en el suelo.
- 1.3. Propiedades químicas del Fósforo del suelo.
- 1.4. Formas de P en el suelo. Fósforo disponible.
- 1.5. Compuestos orgánicos del Fósforo.
- 1.6. Pérdidas del Fósforo en el suelo.
- 1.7. Métodos para determinar el Fósforo disponible en el suelo.
- 1.8. Transformaciones microbianas en el ciclo del Fósforo.
- 1.9. Papel de los microorganismos en la solubilización de fosfatos insolubles.
- 1.10. Papel de las micorrizas en la captación del P y el ciclaje de dicho elemento.

2. Micorrizas, descripción y funcionalidad.

- 2.1. Micorrizas, concepto. Tipos de micorrizas. Micorrizas arbusculares.
- 2.2. Taxonomía de los hongos formadores de micorrizas arbusculares.
- 2.3. Descripción y funcionalidad de las micorrizas arbusculares.
- 2.4. Fisiología y captación de nutrientes por las plantas micorrizadas. Énfasis en el P inorgánico y orgánico.

3. Rocas fosfóricas como fertilizantes.

- 3.1. Tipos de rocas fosfóricas. Origen. Ubicación geográfica de su producción.
- 3.2. Aplicación de las rocas fosfóricas. Potencial y eficiencia agronómica. Mejora de su utilización.
- 3.3. Mejora de la reactividad de la roca fosfórica.

4. Interacción de las micorrizas arbusculares con otros microorganismos.

4.1. Concepto de Micorrizósfera.

4.2. Interacción entre las micorrizas arbusculares y *Rhizobium*.

4.3. Interacción con Actinomycetes y Cyanobacterias.

4.4. Interacción con microorganismos fijadores de N₂ de vida libre.

4.5. Interacción con microorganismos solubilizadores de fosfatos.

4.6. Microorganismos con capacidad de colonizar la raíz (Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal-PGPR).

4.7. Interacción con microorganismos fitopatógenos.

5. Detección de los microorganismos en la rizósfera y su capacidad de colonizar la raíz.

5.1. Resistencia espontánea a antibióticos.

5.2. Marcadores genéticos.

5.3. Sondas de ADN.

6. Técnicas isotópicas para la detección de la efectividad del uso de fertilizantes por la planta.

6.1. Método de dilución isotópica.

6.2. Actividad específica, % P proveniente del fertilizante (%Pdff) y % P proveniente del suelo (%Pdds).

6.3. Formas isotópicas del P.

6.4. Medición por Cerenkov.

6.5. Estimación del P radiactivo por el Método del Patrón Interno.

6.6. Hipótesis de funcionamiento para plantas micorrizadas y no micorrizadas.

7. "Peletización" de microorganismos solubilizadores de fosfatos para utilizarlos como inoculantes.

7.1. Formas de "peletización" microbiana.

7.2. "Peletización" de propágulos de hongos formadores de micorrizas arbusculares.

II) Materiales y Métodos.

1) Aspectos generales.

- 1.1. Descripción del suelo utilizado. Eliminación de los propágulos de micorrizas arbusculares.
- 1.2. Aislamiento a partir de suelo rizosférico de bacterias solubilizadoras de fosfatos.
 - 1.2.1. Caracterización de las bacterias.
 - 1.2.2. Cuantificación en medio líquido del fósforo liberado a partir de varias rocas fosfóricas y de la capacidad de disminuir el pH del medio de las bacterias seleccionadas.
 - 1.2.3. Selección de mutantes con resistencia natural a antibióticos. Antibiógramas. Potenciación de la resistencia a Streptomycin y Espectinomycin.
 - 1.2.4. Inmovilización ó pelletización de las bacterias.
 - 1.2.5. Cuantificación de la actividad solubilizadora y capacidad de disminuir el pH de los "pellets".
- 1.3 . Ensayos de invernadero. Tratamientos biológicos.
 - 1.3.1. Inoculación con microorganismos solubilizadores de fosfato.
 - 1.3.2. Inoculación con *Rhizobium*.
 - 1.3.3. Inoculación con hongos formadores de micorrizas arbusculares.
 - 1.3.3. Inoculación con pellets bacterianos.
- 1.4. Plantas utilizadas y condiciones de cultivo.
 - 1.4.1. Soluciones nutritivas aplicadas.
- 1.5. Rocas fosfóricas añadidas. Características.
 - 1.5.1. Aplicación y dosis utilizadas.
- 1.6. Marcaje del suelo con ^{32}P .

- 1.7. Determinaciones.

- 1.7.1. Determinación del P en medios de cultivo líquido.
- 1.7.2. Parámetros de cosecha y nutricionales.
- 1.7.3. Determinación de la composición isotópica del P en los tejidos vegetales.
- 1.7.4. Tinción de las raíces micorrizadas.
- 1.7.5. Cuantificación de las raíces micorrizadas.
- 1.7.6. Cuantificación de la longitud de raíz por sistema de imágenes.
- 1.7.7. Recuperación de las bacterias inoculadas y resistentes a antibióticos de la rizoplasma y de la rizósfera de las plantas.

2) Resultados.

- 2.1. Resultados de la determinación cuantitativa de vitaminas y aminoácidos producidas por las bacterias *Enterobacter* sp. y *B. subtilis*.
- 2.2. Resultados de la determinación de P liberado a partir de rocas fosfóricas naturales y parcialmente aciduladas por las bacterias *Enterobacter* sp. y *B. subtilis* en medio de cultivo líquido.
- 2.3. Resultados del ensayo de *Agrostis tenuis* inoculada con *G. deserticola* y *Enterobacter* sp. para determinar la efectividad agronómica de rocas fosfóricas naturales mediante el uso de técnicas isotópicas.
- 2.4. Resultado del ensayo con *Agrostis tenuis* inoculado con *G. deserticola* y *Enterobacter* sp. para determinar la eficiencia de dos rocas fosfóricas de baja reactividad y sus mezclas con Super Fosfato Triple mediante el uso de técnicas isotópicas.
- 2.5. Resultados del ensayo con plantas de cebolla inoculadas con dos hongos micorrícicos y dos bacterias solubilizadoras de fosfato resistentes a antibióticos en condiciones de microcosmos.
- 2.6. Resultados de los ensayos con alfalfa inoculada con *G. deserticola* y las bacterias solubilizadoras de fosfato *Enterobacter* sp. y *B. subtilis* para comparar su efectividad en presencia de los *R. meliloti*

y su raza GR4 genéticamente manipulada en condiciones de microcosmos y utilizando técnicas nucleares.

2.7. Resultados de los ensayos con alfalfa inoculada con *G. mosseae* y la bacterias solubilizadora de fosfato *Enterobacter* sp. para comparar su efectividad en presencia de los *R. meliloti* y su raza GR4 genéticamente manipulada en condiciones de microcosmos y utilizando técnicas isotópicas.

2.8. Resultado de los ensayos con alfalfa inoculada con dos hongos formadores de micorrizas y dos bacterias solubilizadoras de fosfato para observar el poder captador del micelio en zonas alejadas de la rizósfera y la capacidad de la hifósfera de mantener la población microbiana utilizando técnicas isotópicas.

2.9. Resultados de la aplicación de concentraciones crecientes de calcio en el poder solubilizador de las bacterias sobre la roca fosfórica y su efecto en la nutrición de plantas de cebolla inoculadas con *G. fasciculatum*, evaluada mediante técnicas isotópicas.

2.10. Resultados de la "peletización" de la bacteria *Enterobacter* sp., su capacidad de solubilización de roca fosfórica en medio líquido y su efectividad en ensayos de invernadero.

3) Discusión.

4) Conclusiones.

5) Bibliografía.

Objetivos e interés del trabajo.

1

Las rocas fosfóricas son fertilizantes de lenta liberación recomendados para prácticas agrícolas que no requieran de una alta producción, ya que no son capaces de mantener una concentración de P lo suficientemente alta en la solución del suelo necesaria para cultivos de gran productividad. Para mejorar su utilización se requiere una maximización del área de contacto entre las partículas de la roca y del suelo de manera que se produzca una adecuada solubilización del mismo, por otra parte, incrementar la superficie de contacto entre la superficie de la raíz y de las partículas de roca para promover la adecuada incorporación de P a la planta. Estas dos condiciones se cumplen al adicionar en el sistema planta-suelo un "agente acidificador" como las bacterias productoras de ácidos orgánicos capaces de solubilizar las partículas de roca fosfórica, y al inocular con hongos formadores de micorrizas arbusculares que incrementan la superficie de absorción del sistema radical.

La actividad de las micorrizas arbusculares en la mejora de la nutrición de P de la planta es ampliamente conocida en la literatura. Muchos autores han descrito el efecto benéfico que esta asociación simbiótica tiene sobre las plantas especialmente en suelos con bajo contenido de P. La interacción de las micorrizas con otros microorganismos del suelo también ha sido descrita ampliamente; resalta en particular la interacción con microorganismos solubilizadores de formas insolubles de fosfato. Los hongos y bacterias de vida libre han demostrado buena actividad solubilizadora de roca fosfórica, y cuando interactúan con las micorrizas arbusculares se observa un efecto sinérgico de la actividad de ambos microorganismos sobre el crecimiento y nutrición de la planta. En dichos experimentos, el efecto de los microorganismos solubilizadores podría verse enmascarado en el efecto positivo general sobre el crecimiento de la planta, sin detectarse finalmente la total contribución del microorganismo solubilizador. Por otra parte, si existe algún efecto por acción de sustancias probióticas sobre el crecimiento vegetal, este tampoco podría ser discriminado por las técnicas convencionales.

La posterior aplicación de las bacterias solubilizadoras de fosfato como práctica agronómica no proporcionó buenos resultados, tal como en otras ocasiones. Y, en la bibliografía se observan algunos resultados contradictorios en cuanto al efecto que ejercen estas bacterias. En este trabajo se propone investigar si el efecto de solubilización sobre los fosfatos que poseen las bacterias, una vez inoculadas tanto por separado como junto con las micorrizas arbusculares, es significativo en la incorporación de P de la planta. Se evaluará asimismo la efectividad de varias bacterias y endófitos arbusculares sobre diferentes rocas fosfóricas, naturales y parcialmente aciduladas, así como también sobre la mezcla roca-superfosfato triple para aquellas rocas fosfóricas de menor reactividad. Llevaremos a cabo este objetivo utilizando una planta de bajo contenido de P en sus semillas y medianamente micótrofa como el *Agrostis tenuis* en el microcosmos del suelo, utilizando la técnica de dilución isotópica con el ^{32}P .

Una de las causas que se ha citado como posible fracaso de la acción de estas bacterias es su desaparición por competencia microbiana en la rizósfera. Muchas de estas bacterias son productoras de sustancias de crecimiento y estimuladoras del crecimiento vegetal, razón por la cual se han denominado "Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal" (PGPR, según el acrónimo derivado del inglés). Este concepto ha sido redefinido por Kloepper et al., (1991), adjudicándose esta denominación a aquellas bacterias con capacidad de colonizar la raíz. En este estudio nos proponemos corroborar si el funcionamiento de las bacterias solubilizadoras de fosfato está asociado con su capacidad de colonización de la raíz en plantas con alta micotrofia como *Allium cepa* y *Medicago sativa*. También se cuantificará la presencia de la bacteria en momentos posteriores a la inoculación inicial con la finalidad de observar el efecto de competencia de la microflora nativa sobre las cepas añadidas en el microcosmos del suelo.

Debido al importante papel de captación que ejerce el micelio externo sobre los nutrientes, y con el objetivo de observar cuándo el sistema micelio-bacteria solubilizadora es más eficiente en la captación del P liberado a partir de la roca, se comparará el efecto del momento de inoculación de la bacteria solubilizadora: al inicio del experimento junto con los hongos micorrícicos ó posteriormente, cuando el micelio externo del hongo se encuentra bien desarrollado y sea capaz de alcanzar los micrositos del suelo en el momento en que comienza la solubilización por efecto de la bacteria.

Nos proponemos determinar la eficiencia de la captación del micelio externo de varios endofitos en zonas lejanas a la raíz, en las cuales proliferen las partículas de roca fosfórica y varias bacterias solubilizadoras de fosfato. Igualmente se pretende observar el papel de la hifósfera en mantener la población bacteriana añadida.

En este trabajo también se intentará estudiar cómo se afecta la solubilización de la roca fosfórica, por parte de las bacterias, cuando se incrementa el poder de retención del suelo al adicionar cantidades crecientes de carbonato cálcico. Se observarán los cambios de pH en el suelo y la efectividad de las distintas cepas bacterianas utilizadas tanto por separado como en combinación con un endófito.

Por último y en un intento de aplicación práctica de las bacterias solubilizadoras de fosfato, se prepararán inoculantes con estas bacterias, y se determinará su eficiencia tanto en cultivo líquido como en un microcosmos.

1. Ciclo del Fósforo.

1.1. *El Fósforo en el suelo.*

El ciclo del P es un sistema dinámico en el que intervienen el suelo, las plantas y los microorganismos. La mayoría de los procesos que ocurren en el mismo pueden resumirse en: la incorporación de P por las plantas, su reciclaje a través de la reincorporación de residuos de plantas y animales al suelo, recambio biológico a través de la mineralización e inmovilización, reacciones de fijación en las superficies de arcillas y óxidos y la solubilización de los minerales de fosfato a través de la actividad microbiana (Figura 1).

1.2. *Origen y Reservas del Fósforo en el suelo.*

El P en los suelos deriva de las rocas de apatito que forman el material parental. Este es un compuesto complejo de fosfato tricálcico con la siguiente forma empírica: $3[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2] \text{Ca X}_2$. De acuerdo al elemento que sustituya a la X se tendrá cloro, fluor, hidroxilo ó carbonato-apatitos.

Durante la solubilización y desarrollo del suelo el P es liberado de las apatitas y: 1) absorbido por las plantas y reciclado; 2) incorporado a la materia orgánica de los suelos y de los sedimentos, y 3) redepositado como insoluble ó como formas minerales lentamente solubles como los fosfatos de Al, Ca y Fe ocluidos en los oxihidróxidos. Es precisamente en éste último compartimiento en donde intervienen los microorganismos que utilizaremos en éste trabajo .

Las principales reservas de P en el planeta son los sedimentos marinos (840.000×10^{12} kg), el suelo ($96-160 \times 10^{12}$ kg), PO_4^{-3} disuelto en los océanos (80×10^{12} kg), rocas de la corteza, como las apatitas (19×10^{12} kg) y la biota ó biomasa ($2,6 \times 10^{12}$ kg).

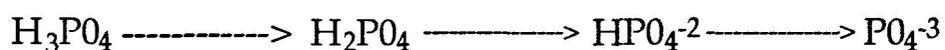
1.3. *Propiedades químicas del Fósforo.*

Este elemento tiene una masa atómica de 30,98. Posee 6 isótopos de los cuales dos: el P^{32} y el P^{33} son radiactivos, que tienen una vida media lo suficientemente larga (14,3 y 25 días respectivamente) para poder ser utilizados en la investigación científica de los procesos del suelo. Ambos son emisores β , con energías de 1,71 MeV y 0,25 MeV respectivamente.

En el suelo, el P se encuentra mayormente en su forma oxidada como ortofosfato asociado a minerales del Al, Fe, Ca y a silicatos. La forma gaseosa, conocida como fosfina (PH_3) existe en muy poca cantidad en los pantanos y/o lagos en los que haya condiciones altamente reductoras.

1.4. *Formas de fósforo en el suelo. P- disponible.*

La forma de los iones fosfato en solución acuosa varía con el pH. En solución el ácido fosfórico se disocia de la siguiente manera:



En los pH normales del suelo (5-8) las formas no disociadas de H_3PO_4 y PO_4^{-3} son insignificantes. Por lo tanto los iones incorporados por las plantas son principalmente: $H_2PO_4^{-1}$ y $HP0_4^{-2}$. A pH 6 alrededor de un 94% del fosfato está presente como $H_2PO_4^{-1}$, pero el porcentaje del mismo disminuye a un 60 % a pH 7.

Los valores típicos de P en la solución del suelo de un suelo agrícola fértil se encuentran entre 100 a 400 kg P ha⁻¹. Un cultivo normal requiere entre 10 y 40 g P ha⁻¹ (Wild, 1988). La utilización de P por la raíz reduce localmente la concentración de P en la solución del suelo. Esto conlleva a un movimiento de P hacia la raíz para reemplazar el P absorbido por la planta e influye en el equilibrio químico para que haya liberación de P a la solución del suelo. El primer proceso mencionado está mediado, principalmente, por un proceso de difusión y su velocidad está determinada por el gradiente de concentración de P, el coeficiente de difusión del P en agua y por

parámetros del suelo como son su capacidad de tamponamiento, espacio poroso, el contenido de agua y la tortuosidad. El movimiento del P y su liberación a la solución del suelo son procesos lentos, mientras que el de la planta es rápido, por lo cual el resultado final es la formación de zonas de deficiencia de P alrededor de la raíz (Nye, 1977).

1.5. *Compuestos orgánicos de Fósforo.*

Gran parte del P en el suelo se encuentra en forma orgánica (Dalal, 1977) formando parte de residuos mas o menos transformados de plantas y de la biota del suelo. Este puede constituir entre un 30-50% del P total de la mayoría de los suelos, aunque esta cantidad puede variar entre 5 y 95%, dependiendo del tipo de suelo (Paul y Clark, 1989). Se conoce relativamente poco de la química y de los compuestos de P orgánico en el suelo. Las principales formas son: los inositol-fosfatos (10-50%), los ácidos nucleicos (0,2-2,5%) y los productos de la degradación de estos (trazas), y los fosfolípidos (1-5%). Otros compuestos presentes en pequeñas cantidades son los azúcares-fosfatos y las fosfoproteínas (trazas).

1.6. *Pérdidas de Fósforo del suelo.*

Las superficies coloidales ejercen una fuerte adsorción sobre los iones del P lo que ocasiona la formación de compuestos insolubles con cationes di y trivalentes. Debido a ello, las pérdidas de P desde la superficie y por el agua de escorrentía en los suelos agrícolas es muy pequeña (aproximadamente 0,1-1,2 kg P/ha.año). Sin embargo, a gran escala de tiempo y/o de area (por ejemplo, en los bosques) las pérdidas por lavado de nutrientes son considerables.

Se considera que la principal causa de pérdida de P de los suelos agrícolas es la erosión. Se ha observado que cada tonelada métrica de suelo que se pierde por erosión puede transportar entre 0,2 a 0,8 kg de P.

Las pérdidas de P del suelo a corto plazo pueden ser importantes cuando hay enriquecimiento de las aguas naturales, lo cual puede contribuir a la eutrofización de las mismas.

1.7. Métodos para determinar el P disponible en el suelo.

Existen varios métodos para determinar el P disponible en las plantas, algunos de ellos bastante similares. Al analizar un suelo no se suele aplicar un solo método, ya que todos poseen limitaciones que se deben tomar en cuenta cuando se hagan recomendaciones para el uso de fertilizantes. En general, los principales métodos utilizados son: 1) P soluble en H₂O; 2) P extraíble con fluoruro ácido diluído; 3) P soluble en NaHCO₃; 4) P soluble en NH₄HCO₃-DTPA; 5) P extraíble con resina aniónica; 6) P soluble en HCl-H₂SO₄; 7) P marcable con ³²P.

1.8. Transformaciones microbianas en el ciclo del P.

Los microorganismos pueden afectar el suministro de P a las plantas de tres maneras distintas: 1) por descomposición de los compuestos orgánicos del P, con liberación de P inorgánico disponible (mineralización); 2) immobilizando fosfatos disponibles en el material celular, y 3) promoviendo la solubilización de formas minerales insolubles o fijadas del P, a través de la producción de agentes quelantes. Por nuestro interés particular se detalla este último proceso.

1.9. Papel de los microorganismos en la solubilización de fosfatos insolubles.

La disponibilidad del fosfato en la solución del suelo depende de las reacciones de fijación, que convierten al H₂PO₃⁻¹ en varias formas insolubles. En los suelos calcáreos predominan los fosfatos de Ca insolubles; los fosfatos de Fe y Al se forman en los suelos ácidos. La absorción por las arcillas también puede afectar la disponibilidad

de los fosfatos en condiciones ácidas o neutras. La Figura 2 refleja cómo puede liberarse P inorgánico a partir de los fosfatos insolubles.

La lenta y continúa solubilización de los fosfatos inorgánicos a través de la quelación por ácidos orgánicos puede llevar a la liberación de P mineral a formas de P orgánico e inorgánico más disponibles, lo que incrementa la fertilidad del suelo. Varios autores han demostrado que tanto hongos como bacterias del suelo son capaces de producir este tipo de ácidos, solubilizando distintos fosfatos insolubles. Sin embargo, Tinker y Sanders (1975) sugieren que el incremento del P en la solución del suelo por efecto de la solubilización microbiana es difícil que ocurra en la naturaleza debido a que: 1) las cantidades de ácidos orgánicos ó quelatos producidos por los microorganismos o las plantas son pequeños como para afectar la solubilización de los fosfatos, y 2) cualquier fosfato liberado por los microorganismos entrará en el equilibrio de absorción en el suelo y sufrirá los mismos procesos de fijación que los iones ya existentes en el suelo. Sin embargo, debido a la gran riqueza microbiana en la rizósfera de las plantas se sugiere no obviar estos procesos en el estudio de la nutrición de las plantas.

1.10. Papel de las micorrizas en la captación del P y el ciclado de dicho elemento.

Como se mencionó anteriormente, las micorrizas contribuyen notablemente en la nutrición de las plantas, especialmente en suelos con bajo contenido de P. En sistemas con estas características los hongos juegan un papel importante en la captación del P, especialmente en los estadios primarios de la colonización.

Bolan et al., (1984) revisaron los siguientes mecanismos sugeridos para explicar el incremento de P por efecto de las micorrizas y los resumieron así: 1) Una mayor exploración del suelo debido a la extensión de las hifas dentro del mismo; 2) Los exudados producidos por los hongos (ácidos orgánicos en el caso de las ectomicorrizas) que incrementan la cantidad de P disponible para las plantas; 3) Las raíces micorrizadas y no micorrizadas difieren en su habilidad para absorber los iones fosfato de la solución del suelo; 4)

La absorción diferencial de cationes y aniones en presencia de los hongos micorrícicos lleva a cambios de pH, que alterarán la cantidad de fosfatos tomada por la planta. Para poder interpretar el papel de las micorrizas en este sentido, se resumen a continuación, los conceptos generales sobre esta simbiosis.

2. Micorrizas, descripción y funcionalidad.

2.1. *Micorrizas, concepto. Tipos de micorrizas. Micorrizas arbusculares.*

El término micorriza es el nombre común de un grupo de simbiosis de amplia distribución que se establece entre hongos del suelo y las raíces de las plantas. El beneficio mutuo en esta simbiosis consiste en el intercambio de nutrientes: la planta suministra compuestos hidrocarbonados al hongo y este proporciona nutrientes inorgánicos a las plantas.

Una división amplia del tipo de micorrizas existentes puede establecerse en base a si el hongo simbiote penetra las células de la raíz (Endomicorrizas) ó si este sólo se establece y funciona a nivel intercelular (Ectomicorrizas). Las Ectomicorrizas predominan entre las plantas leñosas de las zonas templadas y boreales, y en los bosques de coníferas; también se han observado en algunas monocotiledoneas y en helechos. Las Endomicorrizas están subdivididas en varios grupos entre los que sobresalen las *Ericoides* y las Arbusculares. Las primeras se encuentran sólo entre las plantas *Ericales* (que dominan en las comunidades vegetales alpinas); las Arbusculares son el tipo mas ampliamente distribuído, se encuentran en un amplio rango de plantas. Se han observado en casi todas las plantas anuales y perennes, en muchas plantas de uso agrícola y hortícola, en árboles frutales y en aquellos árboles decíduos que no forman ectomicorrizas.

2.2. Taxonomía de los hongos formadores de micorrizas arbusculares.

Los hongos formadores de las micorrizas arbusculares (MA) pertenecen al grupo de los Zygomycetes, orden Glomales (Morton y Benny, 1990; Morton et al., 1995). Este consta de los siguientes géneros: *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Glomus*, *Gigaspora*, *Sclerocystis* y *Scutellospora*. La taxonomía se basa en la morfología de la espora: tamaño, color, estructura de las paredes y de su hifa de sustentación, y en algunos géneros la presencia del escudo de germinación en la pared de la espora y el sáculo esporífero en la hifa de sustentación. El diámetro de las esporas suele variar entre 80 y 200 μm . Las hifas son aseptadas con paredes de quitina. La taxonomía basada en el estudio de perfiles isoenzimáticos y técnicas de biología molecular está en sus albores, pero ya iniciada (Rosendahl et al., 1994).

Estos hongos son simbioses obligados: no son capaces de asimilar carbono orgánico de otras fuentes más que de su planta hospedera (Lewis, 1975). Luego de que el carbono es transferido desde el hospedador al endófito sufre una serie de transformaciones rápidas hasta convertirse en metabolitos del hongo (Gianinazzi-Pearson and Gianinazzi, 1983). La cantidad de C transferido puede ser importante, y se ha estimado que puede constituir entre un 4 a 20 % del C fotoasimilado (Kucey y Paul, 1982).

2.3. Estructura y función en las micorrizas arbusculares.

La estructura característica de las MA son los arbusculos, órganos en donde se lleva a cabo el intercambio de nutrientes entre los simbioses. Se localizan en las células corticales de la raíz, son muy ramificados y están imbibidos en una matriz interfacial entre la pared de la célula hospedera y su plasmalema, por lo cual, el hongo no se encuentra en contacto directo con el citoplasma de la célula (Bonfante-Fasolo, 1984; Peterson y Bonfante-Fasolo, 1994). Sin embargo, gracias a la gran área superficial del arbusculo se facilita el

intercambio de nutrientes entre los dos simbioses. Los arbusculos tienen una vida media de 4 a 10 días, por lo cual, se están formando continuamente dentro de la célula para garantizar el constante intercambio de nutrientes (Cox y Tinker, 1976).

Otra de las estructuras características son las vesículas. Estas son abultamientos intra o intercelulares de las hifas, llenas de lípidos, que parecen tener función de órganos de almacenamiento para el hongo (Bonfante-Fasolo, 1984). Los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora* no forman vesículas.

La fase extraradical del hongo incluye hifas externas y esporas. Las hifas externas son el órgano funcional para la captación de nutrientes y el punto de unión entre la fase interna y las esporas.

2.4. Fisiología y captación de nutrientes por las plantas micorrizadas. Énfasis en el P inorgánico y orgánico.

Los hongos formadores de MA suministran a la planta nutrientes inorgánicos, fundamentalmente aquellos cuya forma iónica es de lenta difusión en el suelo, como son el P (Mosse, 1973), NH_4^+ , Cu y Zn. El suministro extra de nutrientes lleva a un incremento sustancial del crecimiento vegetal en comparación con plantas que crecen en el mismo suelo en que se han eliminado los propágulos micorrícicos.

Los beneficios nutricionales están inversamente relacionados con el contenido nutricional del suelo, particularmente el contenido de P disponible. En suelos con alto contenido de P la formación de micorrizas no se favorece (Sanders y Tinker, 1973). El desarrollo de la simbiosis parece estar regulado por los niveles de P en la raíz (Menge et al., 1978) con lo cual, a mayores niveles de P se observa menor cantidad de carbohidratos en raíces y exudados (Thomson et al., 1986). Una explicación a este hecho es que hay menor permeabilidad en las membranas (a altas concentraciones de P) y por lo tanto una reducción en la exudación de compuestos carbonados (Ratnayake et al., 1978). La alta concentración de P en el suelo reduce la actividad de las enzimas implicadas en la transferencia de nutrientes (Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi, 1983).

Por lo general se acepta que el incremento en la incorporación de P a las plantas micorrizadas se debe a que las hifas externas funcionan como una extensión del sistema radical, incrementando su superficie de absorción. La lenta difusión del P en el suelo hace que se formen zonas de deficiencia de este elemento alrededor de la raíz. Bajo esta circunstancia, la planta podría operar los siguientes mecanismos: 1) solubilizar el P en lugares que sobrepasen la zona de deficiencia mediante la producción de ácidos orgánicos, agentes quelantes ó enzimas que mineralicen el P orgánico; 2) un continuo crecimiento de la raíz para explorar el suelo no agotado; 3) utilizar la simbiosis micorrícica para tomar P en sitios que se extiendan mas allá de la zona de deficiencia. De estos tres mecanismos los dos últimos son los más factibles y permiten incorporar el P de las fracciones de P del suelo mas importantes (Harley, 1975).

Las plantas micorrizadas pueden adquirir mayor cantidad de P de fuentes del suelo de poca solubilidad en relación a las no micorrizadas. Inicialmente este hecho se atribuyó a una mayor afinidad de las raíces micorrizadas por el P (Mosse et al., 1973), pero puede explicarse por el incremento del area de absorción que proporcionan las hifas externas, lo cual resulta en una mayor incorporación de P desde las zonas con baja concentración de P disuelto (Bolan et al., 1987). La extensa red de micelio reduce la distancia de difusión de P en el suelo, que es el proceso limitante en el movimiento del P en el suelo. Dicha red también confiere una ventaja física en comparación con la raíz, al estar más próxima a la solución del suelo y a las películas líquidas que se encuentran en los microporos y partículas del suelo (O'Keefe y Sylvia, 1992). Este hecho cobra mayor importancia a medida que el suelo pierde humedad. Sin embargo, no hay evidencias de que las MA solubilizan P a partir de formas no disponibles para las plantas no micorrizadas (Bolan, 1991), incluyendo el P orgánico (Powell, 1975).

La mineralización del P orgánico por las enzimas fosfatásicas fúngicas es bien conocida en las micorrizas de las *Ericales* (Mitchell y Read, 1981) y en las ectomicorrizas (Dighton, 1991). Para las MA los resultados son escasos y contradictorios. Se ha encontrado actividad fosfatásica en extractos de hifas externas maceradas de *G. mosseae*

(Capaccio y Callow, 1982), pero se tienen pocos datos de actividad fosfatásica extracelular y contradictorios (Azcón et al., 1982, Dodd, et al., 1987; Tarafdar y Marschner, 1994). Por lo general los hongos filamentosos y las levaduras contienen un 75% de la actividad fosfatásica ácida en el espacio periplásmico entre el plasmalema y la pared celular. El resto parece estar asociado al plasmalema (Beever y Burns, 1980). Algunos hongos retienen las fosfatasas ácidas dentro del espacio periplásmico, mientras que otras especies exudan una proporción importante de estas enzimas (Beever y Burns, 1980). El comportamiento de los hongos MA a este respecto no se conoce. En el suelo rizosférico se ha observado tanto el incremento (Dodd et al., 1987) como la disminución de los niveles de fosfatasa en presencia de MA (Sainz et al., 1987).

3. Rocas fosfóricas como fertilizantes.

3.1. Rocas fosfóricas. Origen. Ubicación geográfica de su producción.

Las rocas fosfóricas son fertilizantes de baja reactividad formados principalmente por apatitas. Estas pueden variar en sus propiedades químicas, físicas y cristalográficas, y en general se encuentran en formas carbonatadas que varían en el grado de sustitución isomórfica del carbonato por el fosfato. Mientras mayor sustitución exista del carbonato por el fosfato, mayor será la reactividad de la roca fosfórica (Khasawneh y Doll, 1978).

Este fertilizante existe como yacimiento natural en muchos países, sin embargo, los mayores productores a nivel comercial son Marruecos y los Estados Unidos (Hammond et al., 1986). Varios países de América Latina poseen sus propios yacimientos, y la tendencia general es a explotarlos para uso local tanto para su aplicación directa en el uso agrícola como para mejorar su reactividad con diferentes técnicas y producir otros fertilizantes. Las rocas fosfóricas en combinación con las MA constituyen una combinación importante como práctica agrícola en suelos ácidos con bajo contenido de P (Sanchez et al., 1988; Jeffries y Barea, 1994).

3.2. Aplicación de las rocas fosfóricas (potencial y eficiencia agronómica). Mejora de su captación.

Se recomienda que las rocas fosfóricas sean aplicadas directamente en aquellos sistemas agrícolas que no requieran de una producción agrícola intensa, ya que no pueden mantener una alta concentración de P en la solución del suelo para suplir los requerimientos de un cultivo de altos insumos. Por otra parte, debido a que se requieren muy pocos gastos económicos y energéticos en su preparación es uno de los fertilizantes fosforados minerales cuya utilización se sugiere en países no desarrollados.

Para la evaluación de las rocas fosfóricas es necesario conocer el **Potencial Agronómico**, el cual define a la capacidad intrínseca del P contenido en una roca fosfórica de suplir la el P disponible necesario para la nutrición de la planta. El término **Efectividad Agronómica** se refiere al comportamiento de una roca fosfórica en particular influenciada tanto por su potencial agronómico como por las condiciones externas en que se ha utilizado. El conocer la efectividad agronómica de una roca fosfórica nos permitirá comparar distintas fuentes y predecir en relación a otras rocas de reactividad similar lo adecuada que puedan ser para aplicar en condiciones determinadas. La efectividad agronómica de una roca fosfórica depende básicamente de tres factores: el pH del suelo y las concentraciones de Ca y P en el mismo (Khasawneh y Doll, 1978). No debemos descartar que la mineralogía y la química de cada roca, la influencia del suelo, del cultivo, del ambiente y del manejo al aplicarla influyen de forma importante en la misma.

El tamaño de la partícula de roca es determinante en la eficiente utilización del P por la planta. Debido a que la concentración de P alrededor de la partícula de roca es muy pequeña y su difusión poca, su disponibilidad a partir de la roca fosfórica está dada en función de la probabilidad en que las raíces puedan alcanzar las zonas en que la solubilización ocurre. Este alcance se ve incrementado por la presencia de las micorrizas en la raíz, ya que las redes de micelio externo puede explorar mejor los micrositos en que las partículas se encuentran. Se ha observado que a menor tamaño de la

partícula (hasta un tamaño de 150 μm) la disponibilidad de P incrementa. Suponemos que la aplicación de un agente biológico eficientizador de la captación de P como las micorrizas, un agente solubilizante como las bacterias productoras de ácidos orgánicos y la fina particulación de la roca fosfórica constituirán un sistema óptimo para el aprovechamiento de la roca fosfórica por la planta.

En general los resultados experimentales muestran que las rocas fosfóricas son mas eficientes en suelos ácidos deficientes de P. Suelen ser practicamente inertes en suelos neutros y alcalinos (Khasawneh y Doll, 1978). En el presente estudio, la evaluación de las rocas fosfóricas se va a realizar en suelo de tipo neutro, condiciones en las que no se observaría, efecto de la solubilización natural de la roca por acción del pH, y se trataba de evidenciar el efecto que el P liberado por la actividad bacteriana y su repercusión tendría sobre la nutrición de las plantas.

El efecto de la interacción micorrizas-microorganismos solubilizadores de fosfatos se desarrolla en el apartado 4.5.

3.3. Mejoramiento de la reactividad de la roca fosfórica.

Muchos de las rocas fosfóricas existentes poseen características químicas inadecuadas, y, para mejorarlas se han sugerido las siguientes alternativas: 1) granular finamente las rocas fosfóricas naturales al aplicarlas directamente al suelo, 2) desarrollar técnicas de granulación para mejorar las propiedades físicas de las rocas nativas, 3) mezclar la roca finamente pulverizada con materiales orgánicos, azufre, fertilizantes solubles u otros productos capaces de incrementar la disponibilidad del P presente en la roca, 4) acidular parcialmente la roca fosfórica con ácidos para incrementar la solubilidad en agua y citrato del P contenido, a la vez que se obtiene un producto relativamente mas barato que los fertilizantes totalmente solubles. La acidulación se lleva a cabo con ácido sulfúrico obteniéndose Super Fosfato Simple (SFS), ó con ácido fosfórico para obtener Super Fosfato Triple (SFT); y, 5) cogranular la roca fosfórica

con fertilizantes solubles de P para obtener productos similares a la roca parcialmente acidulada.

4. Interacción de las micorrizas arbusculares con otros microorganismos.

4.1. Concepto de Micorrizósfera.

La formación de la micorriza induce a cambios en la fisiología, composición mineral de los tejidos de la raíz, y de sus exudados. La formación del micelio externo también conlleva a cambios físicos y químicos en la zona alrededor de la micorriza, cambios que afectan las poblaciones microbianas. Estas condiciones han llevado a describir a la zona alrededor de la micorriza como "micorrizósfera" y a su influencia como "Efecto micorrizosférico" (Linderman, 1988). De allí a que las interacciones microbianas en esta zona sean de especial interés (Azcón-Aguilar y Barea, 1992).

Los efectos más importantes de las poblaciones microbianas en la rizósfera son 1) la producción de compuestos biológicamente activos como hormonas, quelatos, enzimas, sideróforos y otros; 2) las actividades implicadas en el ciclaje de nutrientes y descomposición de la materia orgánica; 3) aquellas actividades capaces de modificar la estructura del suelo.

4.2. Interacción entre las micorrizas arbusculares y *Rhizobium*.

La presencia de hongos y bacterias coexistiendo en las raíces de las plantas leguminosas fue descrita el siglo pasado. Se identificó posteriormente a ambos microorganismos como hongos formadores de micorrizas arbusculares y *Rhizobium*. Actualmente, se reconoce ampliamente la presencia de las micorrizas arbusculares en las leguminosas y la influencia que éstas tienen mejorando la nodulación y la actividad de *Rhizobium* en la nodulación y fijación de N₂.

La fijación de N_2 es un proceso que posee una alta demanda de P, por lo cual, el principal beneficio de la asociación con micorrizas arbusculares en las leguminosas es el P que el hongo suministra a la planta. Por otra parte, el hongo requiere de una alta cantidad de nitrógeno para la síntesis de quitina, que es el principal constituyente de sus paredes.

Se ha observado que existe estimulación del crecimiento del micelio del hongo micorrícico por parte del *Rhizobium* en condiciones axénicas. También una estimulación de la micorrización en alfalfa por efecto de los polisacáridos extracelulares producidos por *R. meliloti*. Sin embargo, ambos simbiosntes pueden competir por la colonización de la raíz, en situaciones en que los fotosintatos sean escasos, mostrando el hongo cierta ventaja en la colonización sobre el *Rhizobium*.

Además del beneficio que ejercen las micorrizas sobre la fijación de N_2 también se ha observado un incremento en la cantidad de leg-hemoglobina, en la biomasa nodular y en la actividad nitrogenasa. Otros efectos benéficos de esta doble interacción han sido descritos, como por ejemplo la mejora del desarrollo y la actividad de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa en condiciones de escasa humedad del suelo, ya que es bien conocido el papel que las micorrizas cumplen en la resistencia de las plantas al estrés hídrico. Bajo condiciones de salinidad también se ha observado la mejora de la fijación de N_2 y nodulación en plantas micorrizadas (El-Atrach et al., 1989).

4.3. Interacción con Actinomycetes y Cyanobacterias.

El actinomiceto *Frankia* spp. es capaz de formar nódulos fijadores de N_2 en plantas no leguminosas de interés ecológico. Esta asociación recibe el nombre de Actinorriza. Se ha observado que las plantas actinorrícicas presentan endo y ectomicorrizas; sin embargo, las endomicorrizas aparecen mas frecuentemente implicadas en esta asociación. Sus características son similares a la asociación con *Rhizobium*, pero las hifas del hongo endomicorrícico pueden

colonizar los tejidos del nódulo lo que permite una comunicación más íntima. La colonización de la raíz ocurre simultáneamente por el actinomiceto y el hongo endomicorrífcico; la colonización por ectomicorrizas ocurre posteriormente. Se ha observado que las plantas inoculadas con *Frankia* y ambos tipos de micorriza presentan un mejor desarrollo que cuando los simbiosntes están por separado (Azcón-Aguilar y Barea, 1992).

Las gimnospermas pertenecientes al orden Cycadales poseen en sus raíces nódulos de *Nostoc* y *Anabaena* los cuales coexisten con micorrizas arbusculares (Trappe, 1986). Poco más se sabe de estas asociaciones.

4.4. Interacción con microorganismos fijadores de N₂ de vida libre.

Los fijadores de N₂ de vida libre más estudiados son *Azospirillum* y *Azotobacter*, ambos conocidos porque estimulan la micorrización y el crecimiento vegetal (Azcón, et al., 1978; Barea et al., 1983).

Para ambas bacterias se ha postulado que el efecto sinérgico observado en el crecimiento y nutrición vegetal se debe a la producción bacteriana de hormonas, mas que al efecto derivado de la fijación de N₂ (Bagyaraj, 1984; Mosse et al., 1981).

Estas bacterias ejercen un efecto importante sobre la morfología, geometría y fisiología de la raíz. Es recomendable determinar el efecto de la inoculación con micorrizas sobre la fijación de N₂, mediante técnicas isotópicas con ¹⁵N.

4.5. Interacción con microorganismos solubilizadores de fosfatos.

Ciertas bacterias y hongos de vida libre han mostrado in vitro una buena actividad solubilizadora de fosfatos poco solubles, tanto orgánicos como inorgánicos in vitro (Puppi et al., 1994). Sin embargo, su efectividad al ser inoculadas en el suelo puede verse disminuída debido a lo escasas de las fuentes de energía en micrositos del suelo y zonas alejadas de la rizósfera, al amensalismo entre los microorganismos del suelo y los problemas derivados de la

lenta difusión de los iones desde el punto en que son liberados hasta la raíz, ya que pueden sufrir re-fijación por las partículas del suelo.

Hasta el momento, se ha sugerido que la interacción entre dichos microorganismos solubilizadores y las micorrizas arbusculares constituirían un sistema eficiente en el transporte de P desde la fuente de fosfato insoluble a la planta al haber sinergismo entre ambos microorganismos. Varios autores han encontrado efectos que pudieran explicarse con la anterior hipótesis (Barea, 1975; Azcón, 1976). Otros, mediante el uso del isótopo ^{32}P han observado resultados positivos de dicha interacción pero no son concluyentes en cuanto a que el efecto observado sea debido a la actividad bacteriana (Raj et al., 1981; Azcón-Aguilar et al., 1986).

Los estudios realizados con estas bacterias han mostrado, otros efectos benéficos sobre el crecimiento de la planta, tal como un incremento en el contenido de N de la planta, en el nivel de colonización por la micorriza y en la relación vástago/raíz. Todo ello hace pensar que estas bacterias son promotoras del crecimiento vegetal, conocidas como PGPR en la literatura científica (descritas seguidamente). Los estudios relativos al mecanismo de acción y transporte de nutrientes que estas bacterias realizan deben continuarse con el uso de técnicas adecuadas como las isotópicas con P^{32} y N^{15} .

4.6. Microorganismos con capacidad de colonizar la raíz (Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal-PGPR).

Las Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (del inglés, Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR) son aquellas capaces de colonizar la raíz, manteniendo una población de al menos 10^3 ufc/mm raíz (Kloepper & Beuchamp, 1992) e incrementar el crecimiento vegetal.

Las bacterias PGPR mas conocidas pertenecen al género *Pseudomonas*. Estas bacterias inoculadas junto con *G. mosseae*, producen un incremento en el crecimiento vegetal, a la vez que se observa que cada microorganismo favorecía mutuamente el establecimiento del otro en la raíz (Meyer y Linderman, 1986). Por

otra parte, Azcón (1989) observa que el efecto promotor de crecimiento producido por varias PGPR y hongos micorrícicos era selectivo, dependiendo de la bacteria utilizada. Estos efectos observados por efecto bacteriano son normalmente atribuidos a la producción de hormonas (Linderman, 1988).

Los compuestos metabólicos como los sideróforos, antibióticos y el ácido cianhídrico son reconocidos como los responsables del efecto descrito para ejercer control biológico para por las bacterias de tipo PGPR, de patógenos de la raíz .

Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular, que se producen extracelularmente y que tienen efecto quelante sobre los iones de Fe^{+3} . Al retirar el Fe del medio, se suprimen aquellos microorganismos sensibles a la falta de Fe, por lo cual se reconoce que es un mecanismo de control biológico (Kloepper et al., 1980). Varios microorganismos, entre los que podemos citar las *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Azotobacter* y los hongos ectomicorrícicos son productores de sideróforos. Los sideróforos pueden afectar el transporte de Fe a la planta ya que lo solubilizan y ayudan a su transporte hasta la superficie de la raíz y/o micorrizas. Su producción por hongos endomicorrícicos no se ha observado, sin embargo, no se descarta que ésta pueda existir dado que se ha visto que los hongos pueden influir en el transporte de Fe a la planta.

Actualmente el interés se ha concentrado sobre otros compuestos, que, derivados del metabolismo secundario de los microorganismos, también tienen efecto de control biológico. Estos compuestos son: ácido fenacín-carboxílico (PCA), 2,4-diacetilfluoroglucinol (Phl), pioluteorina (Plt), pirrolnitrina, oomicina A y ácido cianhídrico (Weller y Thomashow, 1994).

4.7. Interacción con microorganismos fitopatógenos.

Tanto el hongo micorrícico como el organismo patógeno tienen en común el sustrato a colonizar: la raíz. Por lo tanto se ha postulado que ambos microorganismos, el eusimbionte (hongo micorrícico) y el disimbionte (parásito), interactúan como componentes de la rizósfera o al colonizar la raíz.

En el caso de las ectomicorrizas, se han postulado algunos mecanismos para explicar el efecto protector que los hongos simbiotes ejercen sobre los patógenos: 1) competencia por nutrientes; 2) el efecto de barrera mecánica que ejerce el manto externo del hongo sobre la penetración del patógeno; 3) estimulación de la microflora antagonista al patógeno en la micorrizósfera; 4) síntesis de compuestos antimicrobianos por el hongo simbiote.

Se reconoce que el previo establecimiento de la ectomicorriza en la raíz disminuye la invasión del patógeno (Duchesne et al., 1989). Así como también la protección contra los patógenos está también influenciada por la propia resistencia de la planta y por el eusimbiote implicado.

En el caso de las endomicorrizas, el efecto de protección a la infección por patógenos también ha sido descrito. Algunos autores postulan que dicho efecto de protección puede deberse a la mejora nutricional de la planta, lo cual permite que ésta tolere mejor al ataque por patógenos. Seguidamente, discutiremos sobre los efectos descritos con distintos grupos de patógenos en particular.

* **Interacción con hongos patógenos:** La infección por hongos patógenos productores de marchitez de la planta y pudrición de la raíz, tales como *Phytophthora*, *Gaeumannomyces*, *Fusarium*, *Thielaviopsis*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium* y *Verticillum*, se ve disminuída por la presencia de las micorrizas. Sin embargo, se han citado casos en que la severidad de la enfermedad no es mermada, probablemente a una tardía infección por micorrizas en relación a la del patógeno (Bagyaraj, 1984; Graham, 1986).

* **Interacción con bacterias patógenas:** Son pocos los estudios realizados en relación a la interacción bacteria-micorriza (Bagyaraj, 1984), sin embargo, García-Garrido y Ocampo (1988) encuentran que la micorrización protege a las plantas tomate de la infección por *Erwinia caratovora* y que hay una disminución de dichas bacterias en la rizósfera de las plantas micorrizadas.

* **Interacción con nemátodos:** La precolonización de la raíz por la micorriza también disminuye el ataque por el nemátodo

Meloidogyne (Bagyaraj, 1984; Graham, 1986; Zambolin, 1987) en la raíz. Se ha observado que en los sitios donde hay colonización previa de la micorriza no hay ataque de los nemátodos, y lo contrario también; por lo cual se cree que ambos microorganismos son mutuamente inhibitorios.

5. Detección de los microorganismos en la rizósfera y su capacidad de colonizar la raíz.

La práctica de inocular los microorganismos en la rizósfera de las plantas de interés es cada vez más común. Se inoculan fijadores de N₂ de vida libre, *Rhizobium*, hongos de la micorriza y bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Pero, la necesidad de observar la evolución del microorganismo en el suelo una vez inoculado es importante, a fin de observar cuán exitoso resulta el microorganismo en sí en base a la efectividad de la actividad por la cual ha sido elegido.

Varias técnicas se utilizan hasta el momento para detectar la presencia de los microorganismos en el microcosmos del suelo, las cuales se detallan seguidamente.

5.1. Resistencia espontánea a antibióticos.

Una de las formas más comunes de detectar las bacterias es la utilización de un medio selectivo para recuperar a aquellas bacterias que, derivadas de una cepa parental, muestren resistencia a antibióticos (Ryder et al., 1994). Para ello se seleccionan cepas derivadas de una parental que sean resistentes a un antibiótico, y luego dicha bacteria es detectada con medios de agar (placas de Petri) que contengan dicho antibiótico. Como requisitos para detectar las bacterias mediante esta técnica se requiere que las cepas sean fácilmente cultivables, que exista un bajo ó muy poca presencia de población microbiana que tenga resistencia natural al antibiótico presente en el medio de recuperación y que la mutación a la resistencia del antibiótico no disminuya el funcionamiento de la cepa en cuestión.

Esta técnica se ha aplicado ampliamente para distintas bacterias, mayormente para gram negativas (*Rhizobium*), pero también para algunas gram positivas (*Bacillus* y *Clavibacter*, entre otras).

Las ventajas de este método son lo relativamente sensible, rápida y sencilla que resulta su aplicación. Los materiales a utilizar no son caros y los datos son analizables estadísticamente. La principal desventaja es la riqueza de suelo en cuanto a bacterias con resistencia natural que puedan afectar la muestra. La utilización de bacterias con doble marcaje permite superar este problema, sin embargo puede ocurrir que ésta no se comporte de forma similar a la cepa parental.

5.2. Marcadores genéticos.

Esta técnica implica la adición de nuevo ADN a un organismo de manera que este pueda ser distinguido de forma única de otros microorganismos presentes en el ambiente en ha sido introducido (Ryder et al., 1994). Los genes son introducidos al organismo, como plásmido o inserción en el cromosoma, lo cual permite que dicho microorganismo sea detectado como consecuencia de la expresión de sus genes.

Estos marcadores genéticos permiten la detección del microorganismo porque añaden una nueva capacidad metabólica, resistencia a metales pesados, bioluminiscencia, resistencia a los herbicidas ó transposones que contengan resistencia a antibióticos.

5.3. Sondas de ADN.

Las bacterias pueden detectarse en la rizósfera mediante el uso de sondas específicas a secuencias del ADN o del ARN. Las sondas de ADN son secuencias cortas de ADN que encajan ó se unirán solamente con el ADN de un organismo ó grupo de organismos en general, dependiendo del nivel del nivel de especificidad requerido. Las secuencias a las que una sonda se une en el genoma del microorganismo pueden ocurrir de forma natural

y única en el ambiente que se esté trabajando (Cooper & Bjourson, 1994; Ryder et al., 1994).

Las sondas de ADN se utilizan para detectar los organismos tanto por: 1) hibridación de colonias (por hibridación de la sonda de ADN a partir de colonias que han crecido en el medio de cultivo); 2) detección directa (por hibridación con ADN directamente extraído de muestras del suelo ó la planta).

Como ventajas de esta metodología podemos citar la alta sensibilidad y especificidad de la sonda una vez que se haya detectado una secuencia adecuada. Como desventajas citamos que solo puede ser aplicada a células que sólo puedan ser cultivadas. Si el medio utilizado es poco selectivo su efectividad puede disminuir debido a la baja frecuencia de las colonias positivas.

También han mostrado ser bastante efectivos la combinación de dos de estos métodos, como por ejemplo, los marcadores genéticos con otros métodos de detección: un trasposón con resistencia a antibióticos + bioluminiscencia, un marcador genético + resistencia espontánea a antibióticos u otros. El uso de dos de estas técnicas conjuntas trae como beneficio: una mayor certidumbre en cuanto a la detección de la cepa a detectar, mayor facilidad de detección y mayor sensibilidad (un menor límite de detección).

La aplicación de cualquiera de estas técnicas permite la detección del microorganismo en cuestión tanto en la zona rizósferica del microcosmos del suelo, como en la rizoplana o superficie de la raíz. En el presente estudio, se utiliza la técnica de selección de mutantes con resistencia espontánea a los antibióticos para detectar la presencia de nuestras cepas en la rizósfera y su capacidad colonizadora de la raíz (PGPR).

6. Técnicas isotópicas para la detección de la efectividad del uso de fertilizantes por la planta.

Los fertilizantes son necesarios para mantener ó incrementar el nivel de fertilidad de los suelos en sistemas agrícolas. El principal objetivo al aplicar fertilizantes es suministrarle a los cultivos los nutrientes esenciales (N,P,K) por lo cual estos se suministran de

forma regular para compensar las cantidades exportadas en el momento de la cosecha. El interés principal en este trabajo es evaluar la eficiencia del uso de un fertilizante fosforado, la roca fosfórica. Para ello, necesitamos saber cuánto P presente en la planta proviene del fertilizante, y cuán efectivas son las micorrizas y los microorganismos solubilizadores de fosfatos en el aprovechamiento por la planta de dicho fertilizante. Así como también la eficiencia del sistema planta-suelo en el aprovechamiento del fertilizante en condiciones de pH neutro. Para ello, sería apropiado añadir un fertilizante marcado y determinar la presencia del isótopo en la planta. Pero, estos fertilizantes no pueden marcarse, ya que son productos naturales y de composición heterogénea. En este caso se requiere de una técnica adecuada para determinar dicha eficiencia, por lo cual debe utilizarse la técnica de dilución isotópica.

6.1. Método de dilución isotópica.

Esta técnica consiste esencialmente en marcar el suelo con una solución que contenga el isótopo con el que se requiera trabajar (P^{32} ó N^{15}) en presencia ó no de un fertilizante. La relación isotópica (actividad específica) en los tratamientos con fertilizante disminuirá como resultado del suministro de N ó P a partir de fuentes no marcadas. Se requiere un tratamiento estándar sin aplicar la fuente no marcada, a fines comparativos (Hardarson, 1990). El parámetro fundamental para comparar los diferentes tratamientos es la Actividad Específica.

6.2. Actividad Específica.

Los radioisótopos están generalmente acompañados por los isótopos estables del mismo elemento. La Actividad Específica se define como la cantidad de radiactividad por unidad de peso (ó volumen) del elemento Total presente en la muestra (esto es válido para isótopos estables y radiactivos). Puede expresarse en Bq/g, μ Ci/g, dpm/mg, dps/mg ú otros.

6.3. Formas isotópicas del P.

Como mencionamos anteriormente, el P tiene dos radioisótopos que pueden utilizarse en estudios de agricultura. El más frecuentemente utilizado es el P^{32} , con una vida media de 14,3 días y puede medirse tanto por un sistema Geiger-Muller ó por el método Cerenkov en un contador de centelleo; en tanto que el ^{33}P requiere de un contador de centelleo para obtener una eficiencia satisfactoria en la medición. El factor costo es también importante, ya que es mucho mayor para el P^{33} que para el P^{32} (Hardarson,1990).

6.4. Medidas por Cerenkov.

Cuando las partículas β que poseen una alta energía (como las del P^{32}), están en alta concentración en una solución, emiten una luz azul clara conocida como radiación Cerenkov. Esta emisión se genera cuando una partícula cargada viaja en un medio a una velocidad más rápida que la velocidad de la luz en el mismo medio (Kobayashi y Maudsley, 1974). Gracias a esta propiedad los radioisótopos pueden ser determinados en líquidos transparentes adecuados, sin necesidad de cócteles de centelleo. La fácil preparación de las muestras, el bajo costo y la disponibilidad de técnicas de conteo automático son las principales razones por las que la medición por Cerenkov es el método de conteo más ampliamente utilizado.

El análisis de los radioisótopos requiere la determinación de la eficiencia del conteo de las muestras. Siendo esta la relación entre el conteo de la muestra y la desintegración del isótopo que ocurre durante el proceso de medición; se expresa como %. Los métodos más comunes para determinar la eficiencia son: 1) el método del patrón interno; 2) el método de la relación de canales y 3) el método del patrón externo. Por ser el más utilizado y por ser el caso que nos ocupa detallaremos sólo el método del patrón interno.

6.5. Estimación del P radiactivo por el Método del Patrón Interno.

Según este método se realizan conteos de la muestra antes y después de la adición de un estándar marcado. A partir de estos datos la eficiencia del conteo de la muestra es calculada de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$E = \frac{C_{s+i} - C_s}{D_i}$$

en donde C_{s+i} es el conteo de la muestra después de añadir el patrón interno, C_s es el conteo de la muestra antes de la adición del patrón interno y D_i es la tasa de desintegración de la alícuota añadida de dicho patrón. La tasa de desintegración de la muestra D_s , se calcula de la siguiente manera:

$$D_s = C_s / E$$

El patrón interno añadido debe contener el mismo radioisótopo que posean las muestras (L'Annunziata, 1987).

6.6. Hipótesis de funcionamiento para plantas micorrizadas y no micorrizadas.

El P radiactivo (P^{32}) se ha utilizado para diferenciar si las plantas micorrizadas y no micorrizadas utilizan las mismas fuentes de P del suelo. Para ello se marca el suelo con P^{32} y luego se compara la actividad específica de ambos tipos de plantas. Un menor valor de la actividad específica en las plantas micorrizadas indicaría que el hongo estaría suministrándole a las plantas formas del P que no estuvieran marcadas por el isótopo añadido (se asume que en una incubación durante poco tiempo el P^{32} se intercambia solo con la fracción lábil del suelo). La mayoría de estos estudios muestran actividades específicas similares para plantas micorrizadas y no micorrizadas (Bolan, 1991). En otra serie de experimentos, Bolan et al., (1984) al añadir hidróxido de hierro al suelo observaron que se reducía la disponibilidad del P^{32} que se añadía posteriormente. Al

medir la actividad específica de plantas micorrizadas y no micorrizadas y en tres extractos de suelo con diferente capacidad de intercambio aniónico, observaron que había diferencias en el P tomado por las plantas micorrizadas y no micorrizadas pero los valores de actividad específica en plantas y en suelo eran similares. En este experimento parece concluyente que las técnicas isotópicas no permiten observar diferencias en la incorporación de P por la planta cuando éste proviene de fracciones del suelo con diferente solubilidad.

7. "Peletización" de microorganismos.

Debido al efecto benéfico que tienen ciertos microorganismos sobre el crecimiento, nutrición de las plantas y algunos otros efectos ya nombrados, la necesidad de adicionar microorganismos al suelo, específicamente a la rizósfera de las plantas es evidente. Son claros los ejemplos de los simbioses como *Rhizobium* y los hongos formadores de micorrizas, entre otros. Por otra parte, no es sólo importante introducir los microorganismos, sino también promover en cierta medida su permanencia en la rizósfera. Una manera de facilitarla es agregándolos en forma de inoculantes preparados con distintos tipos de "soporte", que se elegirán de acuerdo a la supervivencia de los microorganismos en el mismo, a lo adecuado que pueda ser el soporte como agente aglutinador, que éste posea baja toxicidad y tenga facilidad de preparación, entre otras características (Vassilev et al., 1995).

7.1. Formas de "peletización" microbiana.

La "inmovilización ó peletización" de microorganismos puede lograrse por distintos métodos: adsorción, "entrapamiento", y enlaces covalentes. En general, la peletización de microorganismos beneficiosos para las plantas es realizada por adsorción y "entrapamiento".

Se han utilizado diversos sustratos inertes para la preparación de inoculantes bacterianos por adsorción tales como la

turba, talco, yeso, arcillas, carbón, celulosa en polvo y mezclas de compost del suelo. De todos estos sustratos, la turba fragmentada es una de las que mejor resultado ha mostrado en comparación con otros soportes sugeridos (Date & Roughley, 1977).

Sin embargo, células de *Rhizobium*, particularmente *R. japonicum* han sido exitosamente adsorbidas en suelo mineral, suero de leche, carbón, alginatos de calcio, "atrapados" en una mezcla de geles de poliacrilamida, alginatos y gelatina manteniéndose la capacidad de reproducirse, de nodulación y la viabilidad de las células hasta 314 días después de ser "peletizados" (Jha et al., 1993).

La bacteria *Pseudomonas fluorescens* ha sido inmovilizada en "pelets" de alginatos, observándose que las células mantenían la viabilidad y sus propiedades de colonización de la raíz, especialmente en "pelets" con alta densidad de células. Las propiedades de colonización mejoraban al adicionar bentonita y leche desnatada.

Algunos microorganismos del suelo con capacidad de biocontrol, como *Pseudomonas cepacia*, *Penicillium oxalicum* y *Trichoderma viride*, también han sido inmovilizados utilizando distintos soportes, entre estos la vermiculita (Fravel et al., 1983) y el alginato de sodio (Fravel et al., 1985). La bacteria *Erwinia caratovora* fue exitosamente inmovilizada en arena (Takahara & Shioda, 1991).

7.2. "Peletización" de propágulos de hongos formadores de micorrizas arbusculares.

Debido a que los hongos pertenecientes al orden *Glomales* son simbioses obligados, su reproducción en medios artificiales en ausencia de la planta hospedadora es complicada (Sieverding, 1991). Por esta razón, la tecnología relacionada con la obtención de inóculos se ha limitado a la producción de raíces infectadas y esporas en algunos sustratos. Es posible inocular plantas con esporas de estos hongos, pero debido a que necesitan varios días para germinar y para extenderse en el sistema radical, su aplicación es cuestionable.

Para la producción de inóculo de *G. fasciculatum* se han probado combinaciones de vermiculita, perlita, sustratos inertes y suelo. La mejor combinación resultó la mezcla de perlita con sustratos inertes ya que en esta crecía satisfactoriamente la planta *Chloris gayana*. (Sreenivasa & Bagyaraj, 1988). Estas respuestas parecían estar afectadas por las cantidades de N, P, Zn, Cu y otros microelementos presentes en el soporte. Sin embargo, de acuerdo a Sylvia (1984) el soporte ideal debe tener bajas concentraciones de materia orgánica y nutrientes.

En esta memoria pretendemos "peletizar" las células de las bacterias solubilizadoras de fosfato, con la finalidad de observar si este procedimiento afecta la propiedad de solubilización de roca fosfórica y la permanencia de la bacteria en la rizósfera.

II. MATERIALES Y METODOS.

1. Aspectos generales.

1.1. *Descripción del suelo utilizado.*

El suelo utilizado procede de la localidad de Güejar Sierra, provincia de Granada. Sus características químicas son las siguientes: P disponible (Olsen)=15 ppm; % NTotal (Kjeldhal) = 0,26; N-N₀₃ = 0,22 mg/100 g suelo; % M.O (Walkley & Black, 1934) = 0,8; pH (H₂O) = 6,8. El suelo se utilizó en la mayoría de los ensayos en condiciones naturales, tamizado a través de una malla de 2 mm de abertura. En algunos de los ensayos se mezcló con arena gruesa, para mejorar la aireación y evitar compacticidad en las macetas, en la proporción 5 partes de suelo: 2 de arena. En aquellos ensayos que se requirió de condiciones de esterilidad, debido a que se necesitaba eliminar los propágulos micorrícicos naturales, el suelo, ó su mezcla con arena, se esterilizó a vapor fluente (120 °C) durante una hora cada día durante tres días seguidos.

1.2. *Aislamiento a partir de suelo rizosférico de bacterias solubilizadoras de fosfatos.*

Se toma una muestra de 1 g de suelo rizosférico de plantas crecidas en condiciones naturales y se realizan diluciones seriadas en condiciones de esterilidad. Se toman las diluciones -5 y -7 y se siembran en placas que contenían el medio de Ramos y Callao (1967), o medio RC, cuya composición por L es la siguiente: Caldo nutritivo, 8 g; glucosa, 20 g; extracto de levadura, 2 g; agar, 22 g; roca fosfórica, 2 g; pH=7,0. El medio se prepara con extracto de suelo (en proporción 1 parte de suelo:10 de agua), previamente filtrado. Una vez sembradas las placas, se incuban a 28 °C durante 2 días. Los microorganismos con capacidad solubilizadora de roca fosfórica son elegidos en base a la producción de un halo de

aclareamiento alrededor de la colonia bacteriana, indicativo de que la roca fosfórica se ha solubilizado en el medio.

1.2.1. Determinación de la capacidad de producción de sustancias promotoras de crecimiento.

Esta capacidad se determina de forma cualitativa utilizando la propiedad que tienen las bacterias auxotrofas de crecer solo en presencia de algunas sustancias (para las que son auxotrofas indicadoras). Ello permite que su crecimiento sea utilizado como indicador de la presencia de una sustancia dada, si es que ésta es producida, por parte de los microorganismos que se tratan de investigar en base a dicha capacidad. Las cepas auxotrofas utilizadas fueron *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 y *Pediococcus acidilacti* ATCC 8042, provenientes de la colección española de cultivos tipo. Estas cepas se cultivan en el medio Bacto *Lactobacilli* MRS broth (DIFCO) líquido, para microorganismos auxotrofos, a una densidad óptica de 0,4. Se añade una alícuota de 0,1 mL de este cultivo a una porción de agar-solución de Ringer, y esta se vierte sobre la placa de Petri que contiene las bacterias a investigar, cultivadas en los medios específicos para las sustancias de crecimiento que se desea probar. Se utilizaron los siguientes medios: Bacto niacin, Bacto vitamin B₁₂, Bacto Biotin, Bacto pantotenate, Bacto riboflavin, Bacto thiamine, Bacto arginine, Bacto glutamic acid, Bacto lysine, Bacto methionine, Bacto phenilalanine y Bacto tryptophan.

La prueba se consideraba como positiva si se observaba crecimiento de la cepa auxotrofa sobre la cepa problema.

1.2.2. Caracterización de las bacterias.

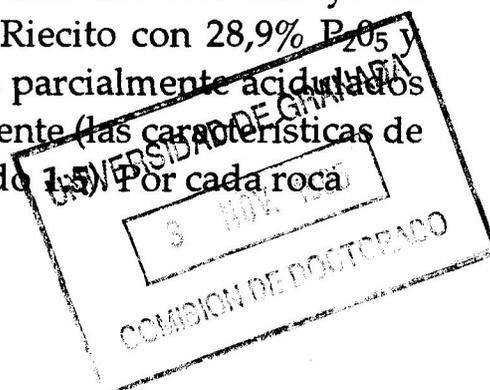
Las bacterias utilizadas en el presente estudio han sido identificadas en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia, Universidad de Granada.

Se realizaron las siguientes pruebas morfológicas de identificación: tinción de gram, tinción y presencia de esporas, movilidad y morfología. También se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: producción de catalasa, oxidasa, capacidad oxido-fermentativa (OF), fermentación de azúcares, Test del IMViC (Indol, Rojo de metilo, Voges-Proskauer, Citratos), Reducción de nitratos, prueba de Kligler, hidrólisis de almidón e hidrólisis de gelatina.

En el caso de la bacteria identificada como *Bacillus subtilis* se aplicó, además de las pruebas antes mencionadas, el "Test de API 50 CHB", específico para bacterias del género *Bacillus*. (Logan y Berkeley, 1984). Esta prueba consiste en la incubación de la bacteria con 40 azúcares distintos, a 28 °C durante dos días, obteniéndose un perfil metabólico detallado que permite su identificación hasta especie.

1.2.3. Cuantificación, en medio líquido, del fósforo liberado a partir de varias rocas fosfóricas y de la capacidad de disminuir el pH del medio de las bacterias seleccionadas.

Las bacterias se cultivan en el medio líquido de RC en un agitador a 200 rpm y 28 °C, hasta obtener crecimiento en fase exponencial. Se toman 0,1 mL de este cultivo madre y se inoculan matraces con 100 mL del siguiente medio de cultivo: glucosa, 2 g; NH₄Cl, 3,5g; MgSO₄ 7H₂O, 0,25; CaCl₂ · H₂O; 0,05g; extracto de levadura, 0,01; 0,2 g de roca fosfórica y pH = 7,5. A los 5, 9, 13 y 16 días se toma una alícuota de cada matraz, se centrifuga a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. En el sobrenadante se determina el pH del medio y del mismo se toma una alícuota de 2 mL para determinar colorimetricamente el P total presente en la muestra, mediante el método que utiliza metavanadato de amonio ó Reactivo de Barton (1981) a una longitud de onda de 440 nm. En este ensayo se probaron dos rocas fosfóricas naturales: Riecito con 28,9% P₂O₅ y PN-brut, con 22,46 % P₂O₅ y sus derivados parcialmente acidulados con 30,6 % P₂O₅ y 16,59 % P₂O₅ respectivamente. Las características de las rocas fosfóricas se detallan en el apartado 1.5. Por cada roca



probada se aplicaron los siguientes tratamientos, cada uno con cuatro repeticiones: Control (medio de cultivo solo), bacteria, sin roca fosfórica y bacteria con la roca fosfórica en cuestión. Las bacterias utilizadas son las mencionadas en el apartado anterior.

Cada 4 días se realizaron pruebas para verificar si había contaminación y para comprobar si en el cultivo había suficiente número de bacterias viables que llevaran a cabo la solubilización.

1.2.4. Selección de mutantes con resistencia natural a antibióticos. Antibiogramas. Potenciación de la resistencia a estreptomomicina y espectinomomicina.

Las bacterias seleccionadas *Enterobacter* sp. y *B. subtilis* se cultivaron en el medio RC, sembrando en cada placa 0,1 mL del cultivo bacteriano bien crecido. Se coloca sobre la bacteria ya distribuída en la placa un disco de cada uno de los siguientes antibióticos (de la marca bioMérieux) con las siguientes dosis entre paréntesis: kanamicina (30 μ), neomicina (30 μ g), oxacilina (1 μ g), cloranfenicol (30 μ g), tobramicina (10 μ g), xefoquicitina, penicilina G (10 μ g), rifampicina (30 μ g), amicacina (30 μ g), tetraciclina (30 μ g), vancomicina (30 μ g), cefalotina (30 μ g), eritromicina (15 μ g), lincomicina (2 μ g), teicoplanina, ampicilina (10 μ g), gentamicina (10 μ g), estreptomomicina (10 μ g), y espectinomomicina. Las bacterias fueron consideradas como sensibles si no crecían alrededor del disco del antibiótico en cuestión, y como resistentes, si crecían abundantemente alrededor del mismo. En el caso de la Espectinomomicina, al no disponer de disco preparado, como para los demás antibióticos, se realizó una curva con las siguientes concentraciones crecientes: 25, 50, 75, 100, 125 y 150 μ g/mL.

1.2.5. Obtención de bacterias con doble resistencia a estreptomomicina y espectinomomicina.

Las bacterias mostraron resistencia natural a la estreptomomicina, la cual se potenció incrementando la concentración del antibiótico en el medio de cultivo de forma gradual desde 25

$\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta $150 \mu\text{g}/\text{mL}$. Una vez obtenida la bacteria resistente a $150 \mu\text{g}$ estreptomicina/ mL se comenzó a potenciar la resistencia a la espectinomicina añadiendo al medio, que contenía $150 \mu\text{gStp}/\text{mL}$, concentraciones crecientes de espectinomicina (tal como se indicó en la curva mencionada en el apartado anterior para obtener la resistencia a este antibiótico) hasta conseguir que la bacteria fuera resistente a ambos antibióticos a la concentración de $150 \mu\text{g}/\text{mL}$.

1.2.6. Inmovilización ó "peletización" de las bacterias.

Se preparan cuatro matraces por bacteria con 70 mL del medio de cultivo líquido RC hasta obtener un crecimiento en fase exponencial (aproximadamente a 36 horas de cultivo). Se toma el contenido total de los matraces y se centrifuga a 10.000 rpm durante 10 minutos a una temperatura de $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Se elimina el sobrenadante, dejando apenas unos mL del mismo para resuspender las células precipitadas.

Se prepara una mezcla de 50 mL de agar-agua al 3 % a $35 \text{ }^\circ\text{C}$, a la cual se añaden las células resuspendidas. Se agita la mezcla hasta homogeneizar bien y con una jeringa se toma todo el contenido de la mezcla y se deja caer gota a gota en un recipiente que contenía aceite estéril. Se irán formando pequeñas esferas sobre la superficie con aceite, que constituyen los "pelets". Se retira el aceite y se lavan los "pelets" con abundante agua estéril, tres veces. Se produjeron "pelets" para las dos bacterias utilizadas.

1.2.7. Cuantificación de la actividad solubilizadora y capacidad de disminuir el pH de los "pelets".

Se utilizan matraces que contenían 100 mL. del medio con roca fosfórica, descrito en el apartado 1.5. Para la determinación de la capacidad solubilizadora se utilizaron 20 "pelets". Se colocaban los matraces en un agitador rotatorio a 200 rpm y $28 \text{ }^\circ\text{C}$ durante dos días, luego de los que se extraía el medio de cultivo para determinar en este el pH y el contenido total de P por la metodología descrita

anteriormente. Se realizaron medidas cada dos días; seis medidas en total.

1.3 . Ensayos de invernadero. Tratamientos biológicos.

Los ensayos se realizaron en los sistemas tipo microcosmos adecuados en cada caso. En el invernadero se mantuvieron a las siguientes condiciones de temperatura: 25 °C por el día y 19 °C en la noche; 70 % de humedad relativa y un fotoperíodo de 14 horas. Los ensayos que utilizaban isótopos radiactivos se realizaron en un invernadero especial para este tipo de experimentos, con las mismas condiciones ambientales.

1.3.1. Inoculación con microorganismos solubilizadores de fosfato.

Las bacterias se cultivaban en el medio de cultivo líquido RC, en agitación durante 36 horas, tiempo en que se alcanzaba la fase exponencial del cultivo (aproximadamente 10^{12} ufc/mL). Se diluye el cultivo en solución salina (NaCl al 0,85 %) hasta una densidad de 10^8 ufc/mL, y con esta riqueza de células se añaden 2 mL del cultivo por maceta.

En el caso de las bacterias resistentes a antibióticos, se procedía a cultivarlas de la misma manera en el medio que contenía 150 μ g estreptomina/mL y 150 μ g espectinomicina/mL. La dilución del cultivo es realizada de la misma manera.

1.3.2. Inoculación con *Rhizobium meliloti*.

Rhizobium meliloti GR4, procedente de la colección del departamento de microbiología de la EEZ se cultiva en el medio Ty, cuya composición por L es la siguiente: triptona, 5 g; extracto de levadura, 3g; CaCl₂, 0,5 g; pH, 7. Se cultiva en medio líquido en agitación a 200 rpm durante 48 horas, luego de lo cual se inocula 1 mL por maceta.

En aquellos ensayos en que se aplicó *Rhizobium meliloti* GR4 pCK3 (genéticamente manipulado), resistente a Tetraciclina y

Kanamicina, se utilizó de la misma manera el medio Ty adicionado de 0,7 mL de Tetraciclina y 0,7 mL de Kanamicina.

1.3.3. Inoculación con hongos formadores de micorrizas arbusculares.

Los hongos utilizados en esta investigación han sido *Glomus mosseae* y *Glomus deserticola* reproducidos ambos en una mezcla de suelo:arena en proporción 5 a 2, utilizando como planta hospedera lechuga. La riqueza de los inóculos utilizados en cada ensayo se mantuvo constante, y consistía en fragmentos de raíz con un 70 % de colonización, 20 esporas por cada 10 g de inóculo y una cantidad considerable de micelio, como propágulos infectivos. Los inóculos han sido reproducidos en la Estación Experimental del Zaidín.

1.3.4 Inoculación con "pelets " bacterianos.

Se añadieron 5 pelets por maceta de 300 g de mezcla suelo:arena. Se colocaban en el suelo de la maceta justamente en la zona debajo de cada semilla pregerminada. Cada "pelet" contenía una riqueza bacteriana de 10^8 ufc/mL.

1.4. Ensayos de invernadero: plantas utilizadas y condiciones de cultivo.

La planta utilizada para los bioensayos de eficiencia agronómica de distintas rocas fosfóricas ha sido *Agrostis tenuis*, en dosis de 10 mg semillas/100 g de suelo. En los demás ensayos se han utilizado plantas de *Allium cepa* (cebolla), una planta por maceta y *Medicago sativa* (alfalfa), 2 plantas por maceta. Las semillas de estas dos últimas plantas se esterilizan durante 25 minutos con una solución de lejía al 10 %; se lavan durante cinco minutos con agua estéril, tres veces seguidas y se incuban imbibidas en agua estéril en placas de Petri, a 28 °C y en oscuridad hasta la germinación.

1.4.1. Soluciones nutritivas aplicadas.

En los ensayos realizados con plantas no leguminosas, se añadía la solución nutritiva descrita por Hepper y O'Shea (1984), carente de P. En el caso de los ensayos con alfalfa se añadía la misma solución nutritiva sin P ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ni N ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

La composición de dicha solución nutritiva, por L es la siguiente: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 18,4 g; K_2SO_4 , 62,15 g; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 350 g; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,6 g; FeEDTA-Na, 2,3 g; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 23,3 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,9 g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2,4 g; H_3BO_3 , 16,6 g; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,35 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 189 g.

Esta solución se utilizó modificada para el N en relación a la receta original que contenía como fuente nitrogenada, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

1.5. Ensayos de invernadero: rocas fosfóricas utilizadas. Características.

Se utilizaron las siguientes rocas fosfóricas naturales: Riecito, con 28,9% de P_2O_5 ; PN-brut, con 22,46% de P_2O_5 y Carolina del Norte, con 30% de P_2O_5 . También, sus derivados parcialmente acidulados: Riecito acidulado a 60 %, con 30,6 % de P_2O_5 ; PS-75, con 16,59% de P_2O_5 y Carolina del Norte acidulado a 50 % con H_2SO_4 , con 19,5 % de P_2O_5 .

La roca fosfórica de Carolina del Norte es la más reactiva que se conoce mundialmente (Kasawneh y Doll, 1978) y es autóctona de los Estados Unidos de América. Las rocas fosfóricas Riecito y PN-brut tienen menor reactividad que la anterior y proceden de Venezuela y España respectivamente.

Para comparar la efectividad de las formas de lenta liberación (rocas fosfóricas) con una fuente de P totalmente soluble se utilizó el Super Fosfato Triple.

1.5.1. *Aplicación y dosis utilizadas.*

Las rocas fosfóricas tanto naturales como parcialmente aciduladas fueron molidas y tamizadas a través de una malla de 0,1 mm de luz. En todos los ensayos se utilizó una dosis de 100 ppm P de la roca en cuestión. El Super Fosfato Triple también era aplicado en dosis de 100 ppm P.

1.6. *Ensayos de invernadero: marcado del suelo con P^{32} y N^{15} .*

Para el marcado del suelo con el P^{32} , se utilizó una dosis general de 25 $\mu\text{Ci}/500$ g de suelo (o su equivalente a 925 kBq/500 g suelo). En general se hace una dilución en agua del isótopo calculando que una alícuota añadida a cada porción de 500 g de suelo esté contenida en 10 mL de la dilución y contenga los 25 μCi requeridos.

1.6.1. *Preparación del isótopo de H_3P_0_4 , "carrier free." Aplicación del "carrier" KH_2P_0_4 .*

El isótopo requerido para el marcado del suelo se utiliza en la forma de H_3P_0_4 diluido en agua, libre de ácidos y de otros solutos o "carriers" en la dilución. Por lo general el contenido total del vial original que contiene el isótopo se diluye en agua de acuerdo a la actividad requerida en el experimento que se va a desarrollar. La dilución debe complementarse con 50 ppm de KH_2P_0_4 con la finalidad de evitar que el P radiactivo se adhiera a las paredes del recipiente; la sal de P no marcado añadida contribuirá por intercambio con el P marcado a evitar la adherencia del isótopo a las paredes del recipiente.

1.6.2. *Marcado con N^{15}*

Cuando se pretendía medir fijación de N_2 (alfalfa) se utilizó un fertilizante nitrogenado marcado isotópicamente (N^{15}) que fue aplicado concretamente como $\text{N}^{15}\text{O}_3(\text{Ca})_2$, cuando las semillas ya

habían germinado. La riqueza del producto utilizado era de 2 % átomos de N^{15} en exceso y la dosis osciló entre 5 y 20 kg N.ha⁻¹ (equivalente).

1.7. *Determinaciones.*

1.7.1. *Determinación del P en medios de cultivo líquido.*

Se toma una alícuota (2 mL) del sobrenadante proveniente de la centrifugación del medio de cultivo crecido y se coloca en matraces aforados de 25 mL. Se añaden 5 mL del Reactivo de Barton, cuya composición se detalla posteriormente, y se enrasa hasta 25 mL con agua destilada. Luego de media hora, cuando se haya estabilizado el color amarillo, se mide en el espectrofotómetro a 440 nm. Para la curva de calibración se utilizan patrones preparados con KH_2PO_4 , y se utilizan las siguientes concentraciones: 1, 2, 5, 8, 10, 15 y 20 ppm.

La fórmula del reactivo de Barton es la que sigue. **Solución A:** $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, 100 g disueltos en 1600 mL de agua destilada. **Solución B:** separadamente se disuelven 5 g de NH_4VO_3 en 1200 mL de agua destilada y 1000 mL de HNO_3 concentrado. Se añade la solución A a la B y se diluye con agua destilada hasta 4000 mL.

1.7.2. *Parámetros de cosecha y nutricionales.*

Al cosechar los ensayos se determinaron los siguientes parámetros: peso fresco y seco de la parte aérea, peso fresco y seco de raíz, longitud de raíz, número de nódulos, % de colonización MA, el contenido nutricional de la parte aérea (P total en los ensayos con plantas no leguminosas, P total y N total en aquellos ensayos realizados con leguminosas).

Para la determinación del P total se coloca todo el contenido de la parte aérea en crisoles de porcelana y se calcina en una mufla a 450 °C durante 3 horas, hasta obtener cenizas blancas. Se deja enfriar a temperatura ambiente y se añaden 20 mL de HCl 2N al crisol de

porcelana. Se agita, se deja reposar por 10 minutos y se agita nuevamente antes de filtrar a través de papel de filtro seco. De esta digestión se toma una alícuota (entre 0,5 a 4 mL) y se añade a un matraz aforado de 50 mL, luego se añaden 5 mL del reactivo de Barton y se enrasa hasta 50 mL con agua destilada. Se utilizan patrones con las siguientes concentraciones: 1/2/5/8/10/15 y 20 ppm P, y se realiza la lectura según señalado en el apartado 1.7.1.

La determinación del N total se realiza mediante el método de Kjeldhal (Lachica, 1973).

1.7.3. Determinación de la composición isotópica del P y el N en los tejidos vegetales.

Para la determinación del P^{32} presente en el material vegetal se toman 10 mL de la digestión obtenida en el apartado anterior, se colocan en viales de plástico y se introducen en el contador de centelleo (modelo TRICARB 300, programado para la detección de dicho isótopo). El conteo se realiza durante 10 minutos /vial. Debido al bajo rendimiento del conteo del P^{32} y a la desintegración del isótopo durante la determinación es necesario hacer una corrección de las mediciones ya realizadas, por lo cual, se añade una alícuota fija de un patrón de P^{32} de actividad conocida a las muestras ya determinadas. De esta manera se obtiene una segunda medición y se realiza la corrección para obtener el valor definitivo. Los valores de actividad específica se obtienen al dividir el valor de P^{32} sobre el de P^{31} , P^{32}/P^{31} total y puede expresarse según las siguientes unidades: dpm/mg P, kBq/mg P ó dps/mg P. Esta metodología corresponde al Método del Patrón Interno, que se ha detallado en la introducción.

La determinación del N^{15} se realiza por espectrometría de emisión, utilizando la digestión del material para la determinación por Kjeldahl (Hardarson, 1990). Se analizan los datos como abundancia de átomos de N^{15} ó exceso de átomos de N^{15} , según se corrija o no al inicio del experimento con la abundancia natural del isótopo (0,3366).

1.7.4. *Tinción de las raíces micorrizadas.*

La tinción de las raíces se realiza según la metodología de Phillips y Hayman (1970). Se toma una porción de raíces, se añade KOH al 10 % y se hierve la preparación en baño de María durante 30 minutos; se retira el KOH y se lavan las raíces con agua corriente. Se añade HCL 0,1N por 5 a 10 minutos. Se retira el ácido y se añade el colorante azul de tripán (0,05 % diluído en ácido láctico), hirviéndose nuevamente la preparación durante 30 minutos más. Se retira el exceso de colorante y realiza la lectura de inmediato en el microscopio estereoscópico ó se dejan las raíces inmersas en ácido láctico diluído (20%) hasta el momento de la lectura.

1.7.5. *Cuantificación de las raíces micorrizadas.*

Se realiza la cuantificación mediante la metodología de Giovannetti y Mosse (1980). Según ésta, se toma una porción de raíces teñidas y se distribuyen al azar sobre una cuadrícula de 1 cm de lado. Deben contarse todas las intersecciones de las raíces con las líneas de la cuadrícula, y anotarse si en el punto de la intersección hay colonización o no. Se obtienen dos valores: número total de raíces (micorrizadas + no micorrizadas) y número de raíces micorrizadas que intersectan la cuadrícula. Se calcula así el % de raíces infectadas en la muestra.

1.7.6. *Cuantificación de los puntos de entrada ó puntos de infección.*

Se toma el sistema radical de la planta por completo. Se determina la longitud total del mismo. Se tiñe según la metodología de Phillips y Hayman (1970) y se observa en el microscopio la presencia de puntos de entrada en la muestra completa. El resultado se expresa como número de puntos de entrada por longitud total de raíz.

1.7.6 Cuantificación de la longitud de raíz por análisis de imagen **Determinación de la longitud específica.**

La longitud de la raíz se determina extrayendo completamente el sistema radical de la planta y colocándolo bajo la cámara que recoge la imagen a ser determinada por un sistema analizador de imagen, cuyas características son: Digital Image Analysis System. Version 1.10A. (c) 1990 Copyright- Delta T Devices, Ltd. Decagon Devices, Inc. El parámetro longitud específica se obtiene al dividir el valor de longitud de raíz entre el valor de peso fresco de la raíz.

1.7.7. Recuperación de las bacterias inoculadas y resistentes a antibióticos de la rizoplana y de la rizósfera de las plantas.

Las bacterias inoculadas en los microcosmos eran recuperadas de la rizósfera y de la rizoplana para comprobar su persistencia en ambas zonas a lo largo del experimento. Para recuperarlas de la rizósfera, se tomaban 5 g de suelo rizosférico y se colocaban en 50 mL de agua estéril. Se agita la preparación por 3 minutos y se toma una alícuota de la fase líquida para realizar diluciones seriadas y sembrar 0,1 mL en placas de Petri que contienen el medio RC sólido con 150 μ g Estreptomina/mL, 150 μ g Espectinomicina/mL y 150 μ g cicloheximida /mL.

Las bacterias de la rizoplana se recuperaban tomando el sistema radical completo de la planta e introduciéndolo en un matraz con 50 mL de agua estéril. Se agita la preparación durante tres minutos y se toma una alícuota de la fase líquida para realizar diluciones seriadas. Se continúa de forma similar a lo descrito anteriormente (Lalande et al., 1991).

2. Descripción de los ensayos concretos.

2.1. *Aislamiento y caracterización de las bacterias solubilizadoras de fosfato. Determinación de la capacidad de producción de sustancias promotoras de crecimiento.*

2.2. *Cuantificación en medio de cultivo líquido de la actividad solubilizadora de las bacterias *Enterobacter sp.* y *B. subtilis* sobre rocas fosfóricas de distinta reactividad y de su capacidad de disminuir el pH del medio.*

2.3. *Ensayo con *Agrostis tenuis* y tres rocas fosfóricas naturales inoculada con *G. deserticola* y *Enterobacter sp.*. Determinaciones con el método de dilución isotópica con aplicación de P^{32} .*

En este ensayo se pretendía determinar, mediante el uso de técnicas isotópicas la efectividad de los microorganismos que mostraron mejor actividad en crecimiento y nutrición de la planta. Del ensayo anterior se seleccionó la mejor combinación hongo-bacteria solubilizadora, (*G. deserticola* y *Enterobacter sp.*), las rocas fosfóricas naturales Riecito, PN-brut y Carolina del Norte (como roca de alta reactividad) con 30% de P_{205} y los tratamientos con SFT y control sin fosfatos. Se utilizaron microcosmos de 100 g de suelo no estéril y una dosis de 25 $\mu\text{Ci } P^{32}$ /maceta. El experimento tuvo una duración de 9 semanas y se realizaron dos cortes: a la semana 5 y a la semana 9. En cada corte se analizaron los siguientes parámetros: peso fresco y peso seco de la parte aérea y contenido de P^{32} y P_{total} (actividad específica). En el segundo corte también se determinó peso fresco y seco de raíz y % de colonización por MA.

2.4. Ensayo con *Agrostis tenuis* con rocas fosfóricas de menor reactividad naturales y mezcladas con Super Fosfato Triple inoculada con *G. deserticola* y *Enterobacter sp.* para mejorar la disponibilidad de P a partir de las rocas. Determinación con la técnica de dilución isotópica con P^{32} .

Este ensayo fue diseñado para determinar si la efectividad del uso de las rocas fosfóricas de menos reactividad, Riecito y PN-brut mejoraba al mezclarlas con SFT. Para ello se mantuvo la dosis de 100 ppm P en todos los casos. Para las mezclas de SFT y roca fosfórica, 50 ppm P eran aportados por la roca fosfórica y 50 ppm P por el SFT. Se utilizaron macetas de 500 g de suelo estéril y una dosis de 25 $\mu\text{Ci } P^{32}$ /maceta. El experimento tuvo una duración de 9 semanas y se realizaron dos cortes: a la semana 5 y a la semana 9. En cada corte se analizaron los siguientes parámetros: peso fresco y peso seco de la parte aérea y contenido de P^{32} y P_{total} (actividad específica). En el segundo corte también se determinó peso fresco y seco de raíz y % de colonización por MA.

2.5. Observación del efecto sobre la morfología de raíz y de la capacidad colonizadora de la rizoplasma y permanencia en la rizósfera de cebolla de *Enterobacter sp.* y *B. subtilis* resistentes a antibióticos micorrizada con *G. mosseae* y *G. deserticola*.

Este ensayo se realizó con la finalidad de determinar, en microcosmos, el efecto de la doble inoculación: bacteriana y hongo micorrízico en el crecimiento y nutrición de las plantas. También se observó la capacidad de la bacteria para colonizar la raíz y su permanencia en la rizósfera. Se determinó la longitud de raíz y posteriormente se calculó el valor de longitud específica. Se utilizaron macetas con 300 g de suelo tamizado a 2 mm, sin esterilizar y una planta por maceta. Se utilizaron 10 g de inóculo de los hongos *G. mosseae* y *G. deserticola*, y 2 mL con 10^8 ufc/mL de las bacterias *Enterobacter sp.* y *B. subtilis* resistentes a 150 μg Estreptomomicina/mL y a 150 μg Espectinomomicina /mL.

En este experimento se realizaron todas las determinaciones a los quince, treinta y sesenta días. En cada muestreo se analizaban 3 plantas por tratamiento y se determinaba, aparte de los parámetros antes mencionados, el peso fresco y seco tanto de la parte aérea como de la raíz, el contenido de P de la parte aérea y el % de colonización por MA.

2.6. Observación del efecto sobre la morfología de la raíz, de la capacidad colonizadora de la rizoplasma y permanencia en la rizósfera de alfalfa de *Enterobacter* sp. resistente a antibióticos.

Este ensayo tiene por finalidad comparar el comportamiento de una bacteria solubilizadora de fosfato sobre los parámetros ya medidos en cebolla en el ensayo anterior; es decir, se trataba de comparar en la rizósfera de otra planta el comportamiento de esta bacteria. Por otra parte, también se desea observar el efecto que pueda tener la presencia de la bacteria en el desarrollo y evolución de la micorrización desde su inicio. Para ello se utilizaron macetas de 100 g de mezcla suelo:arena en proporción 5 a 2, esterilizada como se detalló anteriormente. Se utilizaron 20 g de inóculo del hongo *G. deserticola* (de riqueza conocida), 2 mL con 10^8 ufc/mL de la bacteria *Enterobacter* sp. resistente a estreptomina y espectinomina y 1 mL de *R. meliloti*. Los tratamientos consistían en el tratamiento control, y los microorganismos (hongo y bacteria solubilizadora) en conjunto y por separado. Se observa el inicio de la colonización por micorrizas a los diez días después de la germinación, y así cada 5 días. Se realizarán en total siete medidas, determinando en cada una todos los parámetros antes mencionados. El experimento tuvo una duración de 40 días.

2.7. Comparación de la presencia de *Enterobacter* sp. en la rizosfera de alfalfa inoculada con *R. meliloti* genéticamente manipulado y no, y micorrizada con *G. mosseae* y *G. deserticola* con técnicas isotópicas.

La finalidad de este ensayo es comparar, utilizando técnicas isotópicas, la efectividad de la actividad solubilizadora de la bacteria *Enterobacter* sp. en presencia de dos estirpes de *R. meliloti*, el salvaje y el genéticamente manipulado para mejorar su competitividad. También, observar la persistencia de la bacteria en la rizósfera después de ocho semanas. Se utilizaron macetas de 500 g de suelo estéril, con dos plantas por maceta. Se añadieron 5 mL/maceta de la solución nutritiva de Hepper modificada para leguminosas. Como tratamientos biológicos se utilizaron *G. mosseae* y *Enterobacter* sp. en conjunto y por separado. Se añadieron 25 μ Ci P^{32} /maceta, y 100 ppm P de roca fosfórica y SFT, en cada caso. Los tratamientos microbianos y sus efectos sobre las rocas el SFT se probaron tanto para el *R. meliloti* salvaje como para el manipulado. El experimento duró ocho semanas luego de lo cual se determinó el peso fresco y seco de la parte aérea y de raíz, contenido de P_{total} y N_{total} , contenido de P^{32} y actividad específica, número de nódulos y % de colonización por MA.

2.8. Valoración de la captación de la roca fosfórica en zonas lejanas de la rizósfera de alfalfa por el micelio de *G. mosseae* y *G. deserticola* y permanencia de las bacterias *Enterobacter* sp. y *B. subtilis* en la hifósfera de dichos hongos. Ensayo realizado con técnicas isotópicas.

La finalidad de este ensayo era determinar la efectividad de dos hongos micorrícicos *G. mosseae* y *G. deserticola* en la captación de la roca fosfórica cuando ésta y las bacterias solubilizadoras son aplicadas en zonas lejanas de la raíz. En este ensayo se colocó una planta de alfalfa dentro de una bolsa de malla de 50 μ m de abertura,

y una capacidad de 300 g de suelo. El sistema planta-bolsa se colocó en el centro de un recipiente con 700 g de suelo a cada lado. En los extremos laterales se coloca la roca fosfórica, 2 mL de la bacteria solubilizadora y el P^{32} con una actividad de $16 \mu\text{Ci } P^{32}/300\text{g}$ suelo. Se efectuaba el riego a 80% de capacidad de campo por peso, regando directamente sobre la planta. Se realizaron dos cortes de la parte aérea, a la semana 6 y a la semana 8, en los que se determinó el peso fresco y seco de la parte aérea, P_{total} y P^{32} (actividad específica), Nitrógeno total y N^{15} , % de colonización por MA y número de nódulos. Se cuantificó la población bacteriana en el compartimiento de hifas (hifósfera) a las 8 semanas y se sembró una planta en cada compartimiento de hifósfera para comprobar por colonización de la raíz la presencia del micelio en la zona.

2.9. Evaluación del incremento del poder fijador del suelo con concentraciones crecientes de CaCO_3 sobre la captación de roca fosfórica en plantas de cebolla inoculadas con *G. fasciculatum* y las bacterias *Enterobacter sp.* y *B. subtilis*. mediante el uso de técnicas isotópicas.

Este ensayo tiene por finalidad observar el efecto que tiene el incremento del poder fijador de P del suelo cuando se adicionan cantidades crecientes de CaCO_3 , en la actividad solubilizadora de las bacterias sobre la roca fosfórica y en el poder de captación de la micorriza. Se utilizaron macetas de 300 g de suelo y las siguientes dosis de CaCO_3 : 9 g/maceta y 18 g/maceta. Se utilizó una planta de cebolla por maceta, el hongo *G. fasciculatum* y las dos bacterias utilizadas en los ensayos. Se utilizaron 100 ppm P de la roca fosfórica Riecito y $16 \text{ mCi } P^{32}/\text{maceta}$. El ensayo tuvo una duración de ocho semanas luego de las que se determinó: pH del suelo en todos los tratamientos, peso fresco y seco de la parte aérea, peso fresco y seco de la raíz, P_{total} y P^{32} (actividad específica), % de colonización por MA.

2.10. Peletización en agar de la bacteria *Enterobacter sp.*, comprobación de su actividad solubilizadora de roca fosfórica en medio de cultivo líquido y comprobación de su actividad en un ensayo de invernadero con plantas de cebolla.

Este ensayo se realizó con la finalidad de probar la factibilidad de la preparación de inoculantes de las bacterias solubilizadoras de fosfato. Para ello se prepararon "pelets" de agar de la bacteria *Enterobacter sp.*. Se cuantificó su capacidad solubilizadora de fosfato en medio líquido, y luego, con la bacteria marcada con antibióticos, se prepararon "pellets" para determinar su funcionamiento como inoculantes en un ensayo de microcosmos. Se utilizaron macetas de 300 g de mezcla suelo:arena estéril y se colocó una planta de cebolla por maceta. Cada maceta contenía 100 ppm P de roca fosfórica Riecito. Se realizó una comparación entre tres tipos de inoculantes: "pelets", "pelets" semi desechos y células libres. Por lo tanto, el experimento constaba de tres tratamientos con cinco repeticiones cada uno. El número de células por "pellet" era similar al número de células por mL de cultivo: 10^8 ufc/mL. El experimento tuvo una duración de ocho semanas luego de las que se determinó el peso seco de la parte aérea y de la raíz, y el contenido de P total. Se verificó también, en cada tratamiento la abundancia de la bacteria en la rizósfera de la planta al finalizar el experimento.

1) Resultados de la determinación cuantitativa de vitaminas y aminoácidos producidas por las bacterias *Enterobacter* sp. y *B. subtilis*.

La bacteria *Enterobacter* sp. mostró mayor producción de vitaminas y aminoácidos que la bacteria *B. subtilis*. La metodología empleada ha demostrado ser adecuada para la determinación cualitativa de la producción de vitaminas y aminoácidos por microorganismos.

**Tabla I. Producción de vitaminas por las bacterias
Enterobacter sp. y *B. subtilis* en placas de Petri.**

	A. Pantoténico	Biotina	Tiamina	Niacina	Riboflavina	B ₁₂
<i>Enterobacter</i>	-	-	+	+	+	-
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	+	+	-

**Tabla II. Producción de aminoácidos por las bacterias
Enterobacter sp. y *B. subtilis* en placas de Petri.**

	Arginina	Lisina	Metionina	Fenilalanina	A. Glutámico
<i>Enterobacter</i>	+	+	-	-	+
<i>B. subtilis</i>	+	+	-	-	-

2) Resultados de la determinación de P liberado a partir de rocas fosfóricas naturales y parcialmente aciduladas por las bacterias *Enterobacter* sp. y *B. subtilis* en medio de cultivo líquido.

Las dos bacterias utilizadas mostraron buena capacidad de disminuir el pH del medio, indicando que son capaces de producir ácidos orgánicos que pueden solubilizar las rocas fosfóricas. La cepa más activa solubilizando las rocas fosfóricas fue *B. subtilis*, la cual liberó al medio un 41% del P contenido en la roca fosfórica Riecito (100 μ g P/mL) y un 40 % de la roca PN-brut parcialmente acidulada (78 μ g/mL). Esta misma bacteria liberó un 47 % del P contenido en la roca Riecito parcialmente acidulada tal como se indica en las Tablas III y IV. La bacteria *Enterobacter* sp. liberó un 49 % de P de la roca PN-brut parcialmente acidulada.

La disminución del pH del medio fue ligeramente mayor en el caso de la bacteria *B. subtilis* al incubarse con todas las rocas fosfóricas respecto a *Enterobacter* sp.

La contaminación y número de células viables en los cultivos fueron verificados cada nueve días. En cada determinación se observó un número de 10⁴ ufc/mL, indicando que había suficiente número de células que mantenían su actividad a lo largo del experimento.

Tabla . Cantidad de P liberado por las bacterias *Enterobacter* sp. y *B. subtilis* en cultivo líquido a partir de la roca fosfórica Riecito y su derivado parcialmente acidulado.

Roca fosfórica	Bacteria	P liberado a partir de las rocas fosfóricas ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
		5 días	10 días	15 días	21 días
Riecito natural	<i>Enterobacter</i>	50	0	0	0
	<i>B. subtilis</i>	100*	4	0	0
	Control	3	40	20	15
Parcialmente acidulada	<i>Enterobacter</i>	110*	40*	50*	40
	<i>B. subtilis</i>	130*	70*	110*	50*
	Control	40	40	30	30

* datos significativamente diferentes a $P=0,05$

Tabla . Cantidad de P liberado por las bacterias *Enterobacter* sp. y *B. subtilis* en cultivo líquido a partir de la roca fosfórica PN-brut y su derivado parcialmente acidulado.

Roca fosfórica	Bacteria	P liberado a partir de las rocas fosfóricas (ug/mL)			
		5 días	10 días	15 días	21 días
PN-brut Natural	<i>Enterobacter</i>	20	0	20	1
	<i>B. subtilis</i>	80*	20	10	20
	Control	3	5	5	0
Parcialmente acidulada	<i>Enterobacter</i>	70*	0	60*	10
	<i>B. subtilis</i>	30	40*	50*	10
	Control	0	3	30	0

* datos significativamente diferentes a P=0,05

3) Resultados del ensayo de *Agrostis tenuis* inoculada con *G. deserticola* y *Enterobacter* sp. para determinar la efectividad agronómica de rocas fosfóricas naturales mediante el uso de técnicas isotópicas.

El efecto de la inoculación microbiana fue significativo en relación a los controles y a los tratamientos con Super Fosfato Triple, particularmente en los tratamientos con las rocas Carolina del Norte y Riecito, y en menor grado con PN-brut.

El contenido de P (mg P/g p seco) incrementó respecto a los controles de forma significativa por efecto de los tratamientos microbianos, particularmente en aquellos con la roca fosfórica PN-brut y Riecito.

La micorrización fue prácticamente igual de efectiva en presencia o no de la bacteria solubilizadora de fosfato para todos los tratamientos, a excepción del tratamiento con la roca Riecito, donde la inoculación bacteriana incrementó hasta más de diez unidades la micorrización.

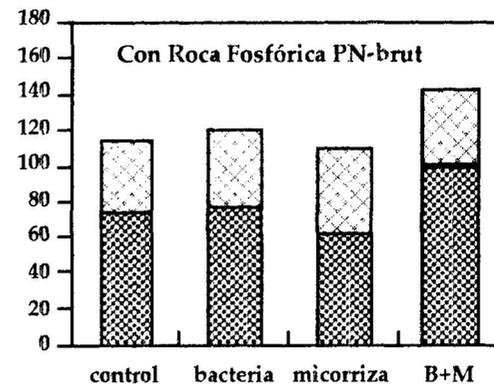
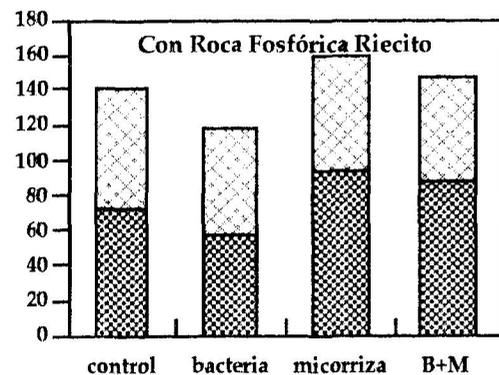
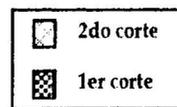
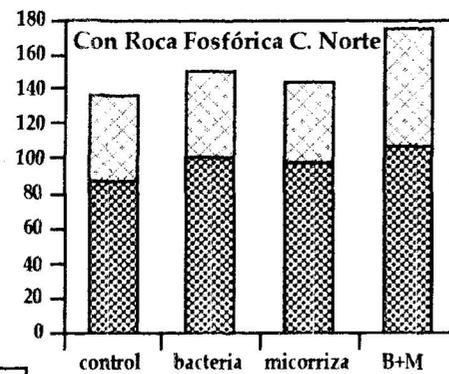
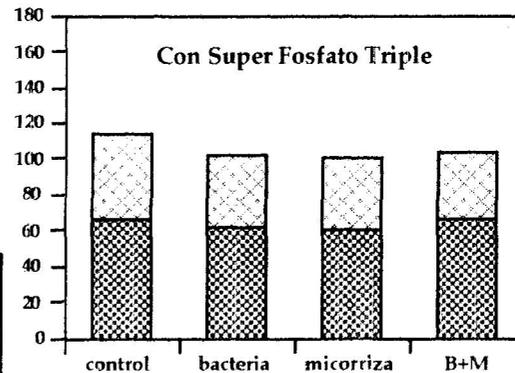
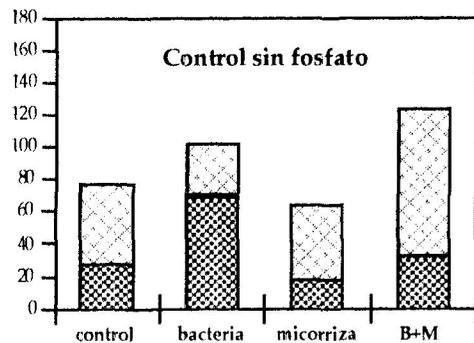
Los valores de actividad específica corroboran la efectividad del método para determinar la incorporación de P a partir de fuentes de mayor o menor solubilidad, indicando que la micorrización fue efectiva en la incorporación del P a partir de las tres rocas fosfóricas naturales y en el tratamiento control a cinco semanas de crecimiento. La interacción micorriza-bacteria fue efectiva con la roca PN-brut. En el segundo corte (9 semanas) la micorrización fue efectiva en incorporar P a partir de todas las fuentes insolubles y en el tratamiento control.

Peso seco (mg) de *Agrostis tenuis* inoculado con *G. deserticola* y *Enterobacter* sp. con 100 ppm P de varias rocas fosfóricas y SFT a cinco semanas de crecimiento.

	control	SFT	Riecito	PN-brut	N.Carolina
control	27	67	73	73	87
Bacteria	70	63	57	77	100
Micorriza	17	60	93	63	97
B+M	33	67	87	100	107

Peso seco (mg) de *Agrostis tenuis* inoculado con *G. deserticola* y *Enterobacter* sp. con 100 ppm P de varias rocas fosfóricas y SFT a nueve semanas de crecimiento.

	control	SFT	Riecito	PN-brut	N.Carolina
control	43	50	66	44	40
Bacteria	33	40	66	42	50
Micorriza	50	40	76	52	48
B+M	83	40	62	33	70



Efecto de inoculación (Peso seco, mg) de *Enterobacter* sp. y *G. deserticola* sobre *Agrostis tenuis* en presencia de 100 ppm P de SFT y tres rocas fosfóricas a cinco y nueve semanas de crecimiento.

**Actividad Específica (dpm.10⁵/mgP) de *Agrostis tenuis*
inoculado con *G. deserticola* y *Enterobacter* sp. con 100 ppm
P de varias rocas fosfóricas y SFT a cinco semanas de
crecimiento.**

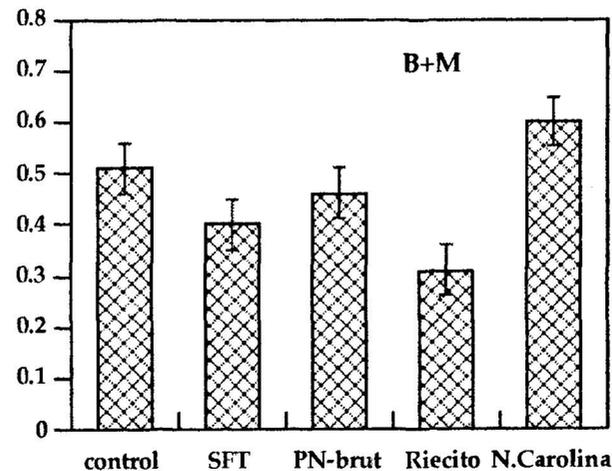
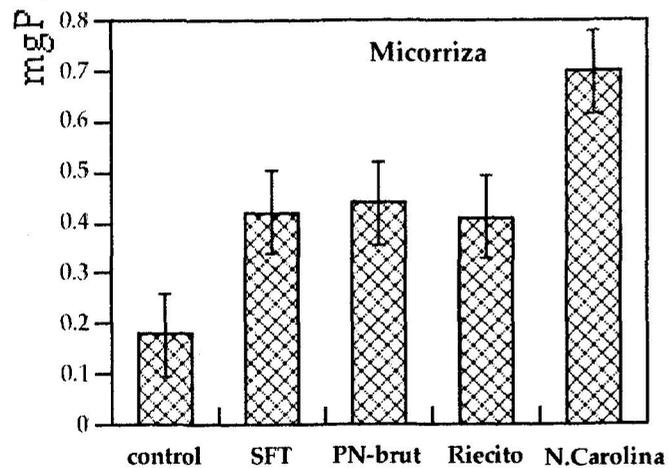
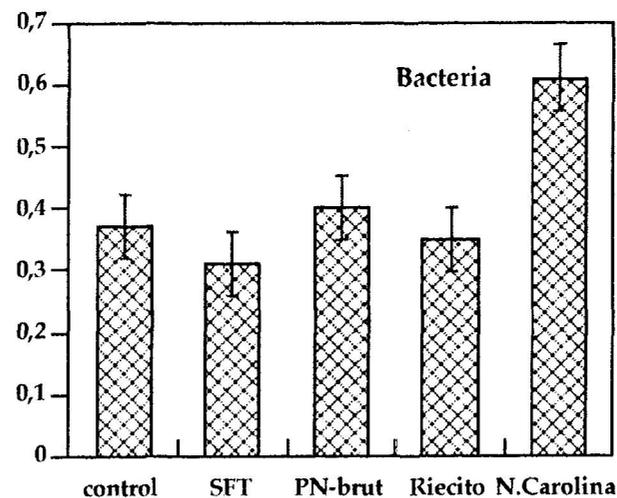
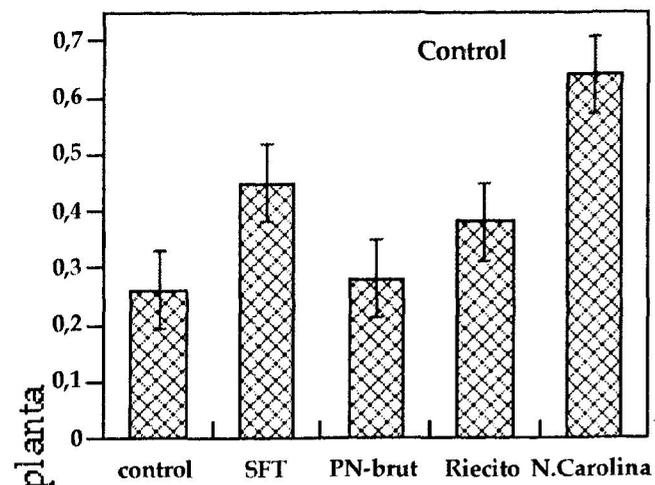
	control	SFT	PN-brut	Riecito	N.Carolina
control	1,86 _a	0,86 _a	1,32 _a	1,02 _a	1,44 _a
Bacteria	1,03 _a	0,64 _a	1,33 _a	0,97 _a	1,13 _a
Micorriza	1,01 _a	0,28 _a	1,24 _a	0,96 _a	1,04 _a
B+M	1,12 _a	1,19 _a	1,09 _a	1,13 _a	1,20 _a

Valores seguidos por la misma letra, en cada columna, no difieren significativamente (P=0.05).

**Actividad Específica (dpm.10⁴/mgP) de *Agrostis tenuis*
inoculado con *G. deserticola* y *Enterobacter* sp. con 100 ppm
P de varias rocas fosfóricas y SFT a nueve semanas de
crecimiento.**

	control	SFT	PN-brut	Riecito	N.Carolina
control	9,18 _a	3,21 _b	7,44 _a	7,14 _a	4,94 _a
Bacteria	8,87 _a	3,86 _{ab}	7,92 _a	6,86 _a	4,14 _a
Micorriza	3,33 _a	4,98 _{ab}	6,28 _a	4,89 _a	3,65 _a
B+M	4,99 _a	5,52 _a	9,01 _a	5,42 _a	5,39 _a

Valores seguidos por la misma letra, en cada columna, no difieren significativamente (P=0.05).



mgP/
plan
ta

Contenido de P (mgP/planta) de *Agrostis tenuis* inoculado con *Enterobacter* sp. y *G. deserticola* en presencia de 100 ppm P SFT y roca fosfórica a nueve semanas de crecimiento.

Peso seco de raíz (mg) de *Agrostis tenuis* inoculado con *G. deserticola* y *Enterobacter* sp. con 100 ppm P de varias rocas fosfóricas y SFT a nueve semanas de crecimiento.

	control	SFT	Riecito	PN-brut	N.Carolina
control	140	50	130	100	230
Bacteria	60	100	170	110	510
Micorriza	110	60	240	220	200
B+M	50	140	150	230	400

Debido a que son promedio de las dos muestras no radiactivas, estos valores no tienen análisis estadístico.

% de colonización por MA de *Agrostis tenuis* inoculado con *G. deserticola* y *Enterobacter* sp. con 100 ppm P de varias rocas fosfóricas y SFT a nueve semanas de crecimiento.

	control	SFT	Riecito	PN-brut	N.Carolina
control	*	*	*	*	*
Bacteria	*	*	*	*	*
Micorriza	12	27	28	30	37
B+M	13	23	38	30	36

* indica una colonización por micorrizas menor de 10% en condiciones naturales.

