

**AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN DE MICROORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE
FÓSFORO EN SUELOS DE HAWAII**

NELSON WALTER OSORIO VEGA, I.A., M.Sc.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE MEDELLÍN

FACULTAD DE CIENCIAS

2003

**AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN DE MICROORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE
FÓSFORO EN SUELOS HAWAII**

NELSON WALTER OSORIO VEGA, I.A., M.Sc.

**Trabajo presentado como requisito parcial para promoción
docente a la categoría de Profesor Asociado**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE MEDELLÍN**

FACULTAD DE CIENCIAS

2003



I
631.46
076

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos a:

Mitiku Habte, B.Sc., M.Sc., Ph.D., Profesor de la Universidad de Hawaii, Honolulu, HI, por sus invaluable aportes y orientación del presente trabajo.

Cristopher W. Smith, B.Sc., M.Sc., Ph.D., Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Servicio de Conservación de Recursos Naturales, Hawaii, por la clasificación de los suelos.

Toshiyuki Isoi, B.Sc., M.Sc., Ph.D., Profesor de la Universidad de Meijo, Nagoya, Japón, por la revisión de los manuscritos y criticas del trabajo.

Juan Carlos Pérez, I.A., M.Sc., Profesor de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, por su apoyo, aportes y criticas del trabajo.

Claudia Álvarez, I.A., por su revisión de los manuscritos y criticas del trabajo, además del inmenso apoyo.

Colciencias, por el apoyo económico durante la realización del trabajo.

Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, por el apoyo económico durante la realización del trabajo.

Departamento de Agronomía y Ciencia del Suelo, Universidad de Hawaii, por permitirme usar los recursos disponibles para realizar este trabajo.

Mi familia y mis amigos, por el apoyo recibido.



DEDICATORIA

Deseo dedicar este trabajo a Claudia, Sara y Sofia.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. REVISIÓN DE LITERATURA	3
1.1. FIJACIÓN DE P EN EL SUELO	3
1.2. DIFUSIÓN DE P EN EL SUELO	5
1.3. MANEJO DEL P EN SUELOS ALTAMENTE FIJADORES DE P	6
1.4. ABSORCIÓN MICORRIZAL DE P	7
1.5. ÁCIDOS ORGÁNICOS Y SOLUBILIZACIÓN DE P	9
1.6. MICROORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE P (PSM)	11
1.6.1. Mecanismos de solubilización microbial de P	12
1.6.2. Efectos de los PSM sobre la absorción de P por las plantas	15
1.6.3. Inoculación dual con PSM y AMF	18
1.6.4. Solubilización microbial de P en suelos de regiones templadas vs. tropicales	22
2. MATERIALES Y MÉTODOS	25
2.1. AISLAMIENTO DE PSM	25
2.2. PRUEBA <i>IN VITRO</i>	26
2.3. EXPERIMENTO DE INVERNADERO	27
3. RESULTADOS	31
3.1. AISLAMIENTO DE PSM	31
3.2. PRUEBA <i>IN VITRO</i>	34
3.3. EXPERIMENTO DE INVERNADERO	35
4. DISCUSIÓN	40
5. CONCLUSIONES	44
BIBLIOGRAFÍA	45

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Categorías para medir la fijación de P del suelo y la mineralogía predominante en cada categoría.	5
Tabla 2. Constantes de estabilidad de complejos entre ácidos orgánicos y aluminio (Log K_{Al}) y los efectos de estos ácidos sobre la solubilización de dos fertilizantes fosfóricos.	11
Tabla 3. Efecto de la inoculación con PSM sobre el crecimiento vegetal y la absorción de P por plantas micorrizadas y no-micorrizadas creciendo en suelos de la zona templada.	17
Tabla 4. Incremento del P disponible del suelo por la inoculación con PSM.	18
Tabla 5. Efectos de la inoculación con <i>E. agglomerans</i> (PSM) y <i>G. etunicatum</i> (AMF) sobre el crecimiento y absorción de P por plantas de tomate 75 después de la inoculación.	20
Tabla 6. Efecto de la inoculación con AMF, PSM y la aplicación de roca fosfórica (RP) sobre el rendimiento de maní en dos suelos subtropicales de Taiwan.	24
Tabla 7. Efecto de la inoculación con AMF y PSM sobre el crecimiento de <i>Leucaena leucocephala</i> en tres suelos de Taiwan.	24
Tabla 8. Serie de suelos muestreadas y algunas características químicas.	26
Tabla 9. PSM aislados en los tres diferentes medios de cultivo (10^3 x UFC g^{-1} suelo).	32
Tabla 10. Número de colonias de PSM por gramo de suelo rizosférico (S) o raíces (R) aisladas en el medio de cultivo 1.	32

Tabla 11. Cambios en el pH y la concentración de P en el medio líquido inoculado con selectos PSM.	35
Tabla 12. Nivel de significancia (<i>P</i>) asociado con la masa seca aérea, el contenido de P en la parte aérea, la concentración de P en la solución del suelo y la colonización micorrizal al tiempo de la cosecha (NS: no significativo).	36
Tabla 13. Efectos de roca fosfórica (RP), KH_2PO_4 (KP) y la inoculación con <i>G. aggregatum</i> (AMF) y <i>Mortierella</i> sp. (PSM) sobre el contenido de P en la parte aérea y la colonización micorrizal de raíces de <i>L. leucocephala</i> .	36
Tabla 14. Niveles de significancia (<i>P</i>) de las diferentes fuentes de variación con respecto al contenido de P de los pinnulos de <i>L. leucocephala</i> a diferentes días después de la siembra (NS: no significativo).	38

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Gradientes de concentración de P en la solución del suelo alrededor de una hifa micorrizal y una raíz.	9
Figura 2. Probable desplazamiento de fosfatos adsorbidos en la superficie de óxidos e hidróxidos de Fe por aniones orgánicos (A^-) producidos por PSM.	15
Figura 3. Diagrama mostrando la solubilización microbial de fosfato hacia la solución del suelo y su posterior absorción por las hifas micorrizales.	19
Figura 4. Isoterma de adsorción de P del suelo Wahiawa.	28
Figura 5. Hoja de <i>Leucaena leucocephala</i> mostrando la pinna y los pinnulos.	30
Figura 6. Plato de Petri conteniendo el medio de cultivo 1 inoculado con una dilución (10^{-3}) de suelo rizosférico de la serie Tantalus.	33
Figura 7. Platos de Petri conteniendo el medio de cultivo 1 inoculado con raíces finas de <i>Leucaena leucocephala</i> tomadas de los suelos kaena (a) y Tantalus (b).	33
Figura 8. Relación entre pH y concentración de P en el medio líquido inoculado o no con microorganismos solubilizadores de P.	34
Figura 9. Contenido de P en pinnulos de <i>L. leucocephala</i> en función del tiempo y la inoculación (+) o no (-) con <i>G. aggregatum</i> (AMF) y <i>Mortierella</i> sp. (PSM).	38
Figura 10. Efectos de la inoculación con <i>G. aggregatum</i> (AMF) y <i>Mortierella</i> sp. (PSM) sobre la masa seca aérea (MSA) de <i>Leucaena leucocephala</i> .	39

RESUMEN

Se realizó un trabajo de investigación que tuvo como objetivos: (i) aislar microorganismos solubilizadores de P de suelos tropicales, (ii) estandarizar un método que permita medir cuantitativamente la capacidad de microorganismos del suelo para solubilizar P, y (iii) evaluar el efecto de la inoculación con un microorganismo solubilizador de P sobre la absorción de P por plantas de *Leucaena leucocephala* (Lam.) micorrizadas y no micorrizadas cultivadas en un Oxisol

Microorganismos del suelo capaces de solubilizar roca fosfórica se aislaron de la rizosfera de *L. Leucocephala* que crecía naturalmente en tres diferentes suelos de Hawaii. Se estandarizó un método *in vitro* para cuantificar la actividad solubilizadora de P. La más alta solubilización se observó con uno de los aislados fungales, el cual se identificó como *Mortierella* sp. Este se multiplicó y posteriormente se evaluó en presencia o ausencia del hongo micorrizal *Glomus aggregatum* en su efectividad para incrementar la absorción de P por *L. Leucocephala* cultivado en un Oxisol fertilizado o no con roca fósforica.

Al momento de las cosecha, las plantas inoculadas con *Mortierella* sp. presentaron un incremento en la concentración de P de 13 % en el suelo no fertilizado y de 73 % en el suelo fertilizado con roca fósforica. La masa seca aérea indicó que la inoculación con *Mortierella* sp. estimuló el crecimiento de la plantas no-micorrizadas en un 22 %, mientras que con plantas micorrizadas este incremento de la masa seca fue de 29 %. Así mismo, el contenido de P en pinnulos de *L. leucocephala*, monitoreada en función del tiempo, reveló que plantas inoculadas con ambos microorganismos tuvieron una mayor concentración de P, seguidas por plantas inoculadas con el hongo micorrizal y luego por plantas inoculadas con *Mortierella* sp. Los resultados sugieren la existencia de una interacción sinérgica entre microorganismos solubilizadores de P y hongos micorrizales.

Palabras claves: *Glomus aggregatum*, *Mortierella* sp., inoculación dual, micorriza, roca fosfórica.

ABSTRACT

An investigation was carried out to: (i) isolate phosphorus solubilizing microorganisms (PSM) from tropical soils, (ii) develop an *in vitro* test to quantify the activity of PSM, and (iii) assess the role that P solubilizing microorganisms play in the P nutrition of mycorrhizal and mycorrhiza-free *Leucaena leucocephala* (Lam.).

Soil microorganisms able to solubilize rock phosphate were isolated from the rhizosphere of *L. leucocephala* naturally growing on three different soils of Hawaii. An *in vitro* test was effective to screen soil microorganisms for their ability to solubilize rock phosphate in culture medium. The highest activity was observed with one of the fungal isolates, which was identified as *Mortierella* sp. It was multiplied and further evaluated with or without the mycorrhizal fungus *Glomus aggregatum* in a highly weathered soil for its effectiveness to enhance P uptake and growth of *L. leucocephala*.

At harvest, plant inoculated with *Mortierella* sp. increased the P content of mycorrhizal plants by 13 % in the unfertilized soil and by 73 % in the soil fertilized with rock phosphate. Shoot dry weight measurements showed that *Mortierella* sp. stimulated growth of non mycorrhizal by 22 %, while it stimulated the growth of mycorrhizal plants by 29%, regardless of P fertilization. Phosphorus status of *L. leucocephala* pinnules monitored as a function of time revealed that plants inoculated by both microorganisms had the highest P content followed by plants inoculated with the mycorrhizal fungus and then by plants inoculated with the PSM. These results suggest the existence of synergistic interaction between P solubilizing microorganisms and mycorrhizal fungi.

Keywords: *Glomus aggregatum*, *Mortierella* sp., dual inoculation, mycorrhiza, rock phosphate.

INTRODUCCIÓN

La baja disponibilidad de fósforo (P) en el suelo es uno de los más serios limitantes de la agricultura. Este problema es de particular importancia en los suelos altamente meteorizados de los trópicos y en los suelos derivados de ceniza volcánica. La baja disponibilidad de este elemento se debe al paso de los iones fosfato de la solución del suelo (donde son biodisponibles) a la fase sólida donde son retenidos. Los iones fosfato son adsorbidos a las superficies de algunos minerales del suelo o precipitados con iones de hierro (Fe) y aluminio (Al). El fenómeno es ampliamente conocido como fijación de P.

Una de las alternativas más recomendadas para incrementar la disponibilidad de P en los suelos consiste en aplicar altas cantidades de fertilizantes fosfóricos. Desafortunadamente, cuando los fertilizantes se diluyen en la solución del suelo, los iones fosfato son fijados en la fase sólida. Consecuentemente, los fertilizantes fosfóricos solubles tienen una baja eficiencia para incrementar la disponibilidad de P, además el alto costo de estos fertilizantes desestimula su uso extensivo. La opción frente a esta serie de problemas está en usar fuentes fosfóricas de baja solubilidad, como por ejemplo las rocas fosforicas. Sin embargo, éstas son demasiado insolubles y un poco más de reactividad ha sido siempre deseada.

Una forma de mejorar la absorción de P en estos suelos es mediante el uso de hongos formadores de micorrizas. Las hifas de estos hongos son prácticamente una extensión del sistema radical y mejoran la eficiencia para absorber fosfatos de la solución del suelo. Sin embargo, esta mayor eficiencia de la asociación micorrizal se limita a incrementar la superficie de absorción y poco o ningún efecto tiene en la solubilidad del P nativo del suelo o del aplicado (p.e., roca fósforica).

Recientemente, hay un gran interés por la capacidad de algunos microorganismos para solubilizar P del suelo. Estos microorganismos han recibido una gran atención por científicos de suelos en la región templada (p.e., Canada, Estados Unidos, España). Paradojicamente, en la región tropical, donde la fijación de P es más intensa, son pocos los trabajos de investigación que se han hecho para aislar y evaluar microorganismos solubilizadores de P.

Es deseable hallar prácticas que permitan incrementar la eficiencia de las plantas para absorber P de los suelos altamente fijadores de este elemento. Esto podría incrementar la eficiencia de la fertilización fosfórica y, consecuentemente, reducir la cantidad de fertilizante fosfórico requerida para alcanzar ciertos niveles de producción deseados por los agricultores. Tal disminución de los costos en materia de fertilizantes apunta a tener procesos más eficientes y usar más adecuadamente recursos tan valiosos como la roca fosfórica.

Los objetivos del presente trabajo son:

- (i) Aislar microorganismos solubilizadores de P de suelos tropicales.
- (ii) Estandarizar un método que permita medir cuantitativamente la capacidad de microorganismos del suelo para solubilizar P.
- (iii) Evaluar el efecto de la inoculación con un microorganismo solubilizador de P sobre la absorción de P por plantas de *Leucaena leucocephala*, micorrizadas y no-micorrizadas en un Oxisol.

1. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. FIJACIÓN DE P EN EL SUELO

La fijación de fósforo (P) es un problema serio en los suelos agrícolas, particularmente en los suelos altamente meteorizados y en los derivados de cenizas volcánicas (Sánchez, 1976; Sánchez y Uehara, 1980). Sanchez y Logan (1992) estimaron que 1018 millones de hectáreas (ha) en los trópicos tienen una alta capacidad de fijación de P. En América tropical hay 659 millones de ha afectadas, 210 en África y 199 en Asia. La fijación de P describe las reacciones que remueven iones fosfato biodisponibles desde la solución del suelo hasta la fase sólida del mismo (Barber, 1995). Hay dos tipos de reacciones: (i) adsorción de iones fosfato sobre la superficie de los minerales arcillosos del suelo y (ii) precipitación de fosfato con cationes de la solución del suelo (Havlin et al., 1999).

La adsorción de fosfato es particularmente fuerte sobre hidróxidos de hierro y aluminio que predominan en suelos altamente meteorizados de regiones húmedas y sabanas ácidas tropicales (Mattlingly, 1975). Los mecanismos de adsorción de P son descritos por Bohn et al. (1985): (i) *adsorción no específica* que consiste en la atracción electrostática que ejercen las cargas positivas de la superficie de algunos coloides minerales (p.e., óxidos e hidróxidos de hierro); (ii) *adsorción específica* que consiste en la sustitución de grupos OH^- por grupos H_2PO_4^- en la estructura superficial de algunos coloides minerales.

Jones (1981) estudió la adsorción de P en 11 suelos de Puerto Rico y encontró que el área superficial de la goetita fue un factor primario para predecir la fijación. El área superficial de la gibsitita fue menor y, por ende, contribuyó poco a la fijación de P; mientras que la hematita prácticamente no contribuyó. Jackman (1994) y Jackman et al. (1997) encontraron resultados similares en suelos de Hawaii, donde la adsorción de P fue significativamente correlacionada con el área superficial de la fracción mineral del suelo y con los sitios potenciales de adsorción de P.