



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Evaluación de la producción de ácidos orgánicos en microorganismos rizosféricos y sus efectos en la solubilización de fosfatos

Eduardo José Serna Posso

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de ciencias agropecuarias, Departamento Ciencias Biológicas

Palmira, Colombia

2015

Evaluación de la producción de ácidos orgánicos en microorganismos rizosféricos y sus efectos en la solubilización de fosfatos

Eduardo José Serna Posso

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magíster en Ciencias Biológicas

Director (a):

Ph.D, I.A. Marina Sánchez de Prager

Codirector (a):

Doctor, Químico. Carlos Adolfo Cisneros Rojas,

Línea de Investigación:

Microbiología del suelo

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de ciencias agropecuarias, Departamento Ciencias Biológicas

Palmira, Colombia

2015

A mi hijo, con su llegada cambió mi visión del mundo

Jacobo Serna Hernández

A mi esposa por todo el amor, el apoyo y la confianza puesta en mí

Angélica Hernández

A mi madre y a mi hermano por el apoyo y la motivación

Sofía Poso y Heberto Serna

Les agradezco por creer en mis capacidades y motivarme a llevar a cabo esta investigación, es por esto, que les dedico todos mis triunfos.

Eduardo José Serna Posso

Agradecimientos

A Dios primordialmente doy infinitas gracias por acompañarme y bendecirme cada instante de mí vida.

Quiero agradecerles a todas aquellas personas que me ofrecieran su ayuda, sus conocimientos y su apoyo para que esta investigación saliera adelante de la mejor manera posible.

Quedo especialmente agradecido con mi directora de la investigación, Marina Sánchez de Prager, I.A. Ph.D. y mi codirector Carlos Adolfo Cisneros Rojas, Químico, Doctor.

Agradezco a la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira y a cada uno de los docentes por ofrecerme tan importantes conocimientos que hacen de mi un mejor profesional.

Resumen

Uno de los problemas que presenta los suelos en condiciones extremas de pH es la presencia de algunos metales que perjudican el desarrollo de las plantas; afectándola directamente y/o limitando la disponibilidad de ciertos nutrientes, como es el caso del fósforo que es precipitado. Es por esto, que se hace relevante estudiar mecanismos que permitan contrarrestar los efectos nocivos de los metales disueltos en el suelo, donde los ácidos orgánicos producidos por microorganismos rizosféricos se perfilan como uno de los más adecuados. Para lograr este objetivo, se desarrolló el estudio en dos etapas, la primera etapa, consistió en identificar por medio de una fermentación en estado líquido la capacidad que tienen tanto bacterias como hongos aislados de un *Typic Melanudand* para producir ácidos orgánicos y generar fósforo disponible a partir de fuentes insolubles de fosfato tricálcico (P-Ca), fosfato de aluminio (P-Al) y fosfato de hierro (P-Fe). En la segunda, se determinaron los ácidos orgánicos y los microorganismos más relevantes y se evaluaron bajo invernadero, donde se utilizó como medio un suelo de características ácidas cultivado con plántulas de *Lactuca sativa L.* Los resultados sugirieron que el hongo *Penicillium Ochrochloron*, tuvo la capacidad de solubilizar las tres fuentes de fosfato utilizadas debido a que metabolizó preferiblemente ácido cítrico, el cual, logra solubilizar fosfato de tricálcico por medio de los hidrógenos ácidos de la molécula, y el fosfato de hierro y aluminio por medio de la alta capacidad quelante del ligando citrato. Esta última propiedad del cítrico, le permitió reducir la toxicidad causada por Al^{+3} presente en suelos ácidos, beneficiándose, tanto el microorganismo como las raíces de la planta. Este trabajo permitió comprender algunos eslabones metabólicos ligados a la liberación de P que hacen cierto microorganismos vía producción de ácidos orgánicos.

Palabras claves: ácido cítrico, ciclo biotecnológico del fósforo, microorganismos rizosféricos, *Penicillium ochrochloron*.

Abstract

One of the problems presenting soils in extreme conditions of pH, is the presence of some metals that are impair to the development of the plants; affecting directly and / or by limiting the availability of certain nutrients, as it is the case of phosphorus is precipitated. That is why, that becomes relevant to study mechanisms that allow counteracting the harmful effects of the metals dissolved in the soil, where the organic acids produced by rhizospheric microorganisms are emerging as one of the most suitable. To achieve this goal, the study was conducted in two stages, the first stage, it consisted in identifying through a fermentation liquid the capacity that have both bacteria and fungi isolated from a Typic Melanudand to produce organic acids and generate phosphorus available from insoluble sources of P-Ca, P-Al, P-Fe. In the second, organic acids and the most relevant microorganisms were determined and evaluated under greenhouse, where it was used as half an acidic characteristics soil cultivated with seedlings of *Lactuca sativa* L. The results suggest that the fungus *Penicillium Ochrochloron* SP., Has the ability to solubilize the three sources of phosphate used since it is metabolized preferably citric acid, which achieves to solubilize phosphate of calcium through the acid molecule hydrogen, and phosphate of iron and aluminium by means of high capacity chelator of the ligand citrate. This last property of citric, allows you to reduce the toxicity caused by the Al^{+3} present in acid soils, benefiting, both the microorganism as the roots of the plant. This work allowed to understand some metabolic bond tied to the release of P that makes some micro-organisms via production of organic acids

Keywords: biotechnology phosphorus cycle, citric acid, *Penicillium ochrochloron*, rhizosphere microorganisms,

Contenido

| | |
|---|-------------|
| Resumen | IX |
| Lista de figuras | XIII |
| Lista de tablas | XIV |
| Lista de abreviaturas | XV |
| Introducción | 1 |
| 1. Objetivos | 5 |
| 1.1 Objetivos específicos | 5 |
| 2. Revisión literaria | 7 |
| 2.1 Importancia del fósforo..... | 7 |
| 2.2 El Fósforo en el suelo..... | 9 |
| 2.2.1 Fósforo orgánico e inorgánico en el suelo..... | 10 |
| 2.2.2 Fijación de fósforo en el suelo | 13 |
| 2.2.3 Microorganismos en la disponibilidad del fósforo..... | 14 |
| 2.2.4 Mecanismos utilizados por microorganismos para solubilizar fósforo | 16 |
| 3. Materiales y métodos | 19 |
| 3.1 Origen de la investigación | 19 |
| 3.2 Producción de ácidos orgánicos y fósforo solubilizado por los microorganismos seleccionados..... | 20 |
| 3.2.1 Muestreo durante la fermentación | 20 |
| 3.2.2 Estimación del crecimiento de los hongos y bacterias a través del proceso fermentativo | 21 |
| 3.2.3 Estimación cualitativa y cuantitativa de los ácidos orgánicos producidos en la fermentación | 21 |
| 3.2.4 Estimación de fósforo soluble generado por hongos y bacterias durante la fermentación. | 22 |
| 3.2.5 Diseño experimental y análisis estadístico..... | 22 |
| 3.3 Identificación de los microorganismos y ácidos orgánicos con mayor eficiencia solubilizadora de fósforo | 23 |
| 3.3.1 Identificación de los ácidos orgánicos con mayor eficiencia solubilizadora de fósforo..... | 23 |
| 3.4 Evaluación en invernadero de los efectos del hongo, bacteria y de dos ácidos orgánicos seleccionados en la emergencia de semillas de <i>L sativa</i> y en su crecimiento inicial | 24 |
| 3.4.1 Multiplicación de los microorganismos a evaluar | 24 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.4.2 | Estimación de las concentraciones de los ácidos orgánicos a utilizar en el invernadero..... | 25 |
| 3.4.3 | Prueba de emergencia de las semillas <i>L. sativa</i> | 25 |
| 3.4.4 | Evaluación preliminar del efecto de los ácidos y microorganismos seleccionados sobre semillas y plántulas de <i>L. sativa</i> | 26 |
| 3.4.5 | Ensayo en invernadero..... | 26 |
| 4. | Resultados | 31 |
| 4.1 | Producción de ácidos orgánicos y fósforo solubilizado por los microorganismos seleccionados..... | 31 |
| 4.1.1 | Estimación del crecimiento de los hongos y bacterias a través del proceso fermentativo..... | 31 |
| 4.1.2 | Estimación cualitativa y cuantitativa de los ácidos orgánicos liberados por los microorganismos en la fermentación..... | 33 |
| 4.1.3 | Estimación de fósforo soluble generado por hongos y bacterias durante la fermentación..... | 38 |
| 4.2 | Identificación de los microorganismos y ácidos orgánicos con mayor eficiencia solubilizadora de fósforo..... | 39 |
| 4.2.1 | Identificación de los ácidos orgánicos con mayor eficiencia solubilizadora de fósforo..... | 39 |
| 4.3 | Evaluación en invernadero de los efectos de <i>Penicillium ochrochloron</i> , <i>Kocuria</i> sp y de los ácidos cítrico y glucónico en semillas de <i>L. sativa</i> | 41 |
| 4.3.1 | Evaluación preliminar del efecto de los ácidos y microorganismos seleccionados sobre semillas de <i>L. sativa</i> | 41 |
| 4.3.2 | Ensayo en invernadero..... | 41 |
| 5. | Discusión..... | 49 |
| 5.1 | Crecimiento microbiano en fuentes de fosfatos insoluble de Ca, Al y Fe | 50 |
| 5.1.1 | Efecto de los compuestos generados en el proceso de solubilización sobre el crecimiento y producción de ácidos orgánicos en los microorganismos..... | 50 |
| 5.2 | Mecanismo de solubilización de los ácidos orgánicos producidos por los microorganismos..... | 53 |
| 5.3 | Microorganismos más eficientes en el proceso de solubilización de fosfato..... | 58 |
| 5.4 | Efecto del hongo, bacteria y ácidos orgánicos, en la emergencia de semillas de <i>L. sativa</i> y en su crecimiento inicial..... | 59 |
| 6. | Conclusiones y recomendaciones | 65 |
| 6.1 | Conclusiones | 65 |
| 6.2 | Recomendaciones | 66 |
| | Anexos..... | 67 |
| | Bibliografía | 73 |

Lista de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 3-1. Técnica de dilución y siembra..... | 21 |
| Figura 4-1. Crecimiento de los 10 microorganismos en medios de cultivos con diferentes fuentes de fosfato: P-Ca: fosfato de tricálcico, P-Al: Fosfato de aluminio y P-Fe: Fosfato de hierro..... | 32 |
| Figura 4-2. Valores promedios de ácidos orgánicos (ppm) liberados por los microorganismos estudiados..... | 33 |
| Figura 4-3. Influencia de la fuente de fosfato en la producción de ácidos orgánicos..... | 34 |
| Figura 4-4. Esquema de producción y reacción de los ácidos orgánicos durante el proceso de fermentación..... | 36 |
| Figura 4-5. Ácidos orgánicos expresados como ácidos totales (Ac. Totales), y fósforo soluble (P-Sol) generado por los hongos y bacterias, en cada una de las fuentes de fosfato..... | 37 |
| Figura 4-6. Fósforo solubilizado (P-sol- en ppm) liberado por bacterias y hongos en cada una de las fuentes de fosfato utilizadas..... | 38 |
| Figura 4-7. Capacidad de solubilización de 4 ácidos orgánicos puros, sobre 3 fuentes de fósforo..... | 40 |
| Figura 4-8. Efecto del ácido cítrico y glucónico en tres concentraciones diferentes sobre la emergencia de las semillas de <i>L. sativa</i> | 41 |
| Figura 4-9. Crecimiento en plántulas y raíz de la <i>L. sativa</i> , a los 30 días de siembra ... | 43 |
| Figura 4-10. Efecto de los tratamientos sobre el pH en el suelo..... | 46 |
| Figura 4-11. Círculo de correlaciones de las variables determinadas en el ensayo..... | 48 |
| Figura 4-12. Análisis de nube de individuos..... | 48 |
| Figura 5-1. Dinámica biotecnológica de la solubilización de fosfatos “in vitro”,..... | 49 |
| Figura 5-2. Efecto del pH sobre la solubilidad de los fosfatos..... | 54 |
| Figura 5-3. Mecanismo de solubilización de los ácidos orgánicos en fosfato de calcio. | 55 |
| Figura 5-4. Efecto del pH sobre las formas del aluminio en solución..... | 60 |

Lista de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 3-1. Concentraciones de los ácidos orgánicos puros y los fosfatos, utilizadas en la reacción de solubilización | 24 |
| Tabla 3-2. Dosis de los ácidos (mmol) utilizados en el ensayo de invernadero | 25 |
| Tabla 3-3. Descripción de los tratamientos utilizados en el ensayo de invernadero | 27 |
| Tabla 3-4. Caracterización química del suelo donde se realizó el ensayo de invernadero | 28 |
| Tabla 4-1. Agrupamiento de los hongos y bacterias según la capacidad de producción de ácidos orgánicos (miliequivalente ácidos -meq/L), en las tres fuentes de fosfato utilizadas. Prueba de Duncan ($\alpha=0.05$)..... | 38 |
| Tabla 4-2 . Agrupamiento de los microorganismos según la capacidad de solubilización de fósforo (mg/L) en las tres fuentes de fosfato, utilizando la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$). | 39 |
| Tabla 4-3. Agrupamiento de los ácidos orgánicos en cada fuente de fosfato según el fósforo soluble generado (ppm), utilizando la prueba de Duncan ($P=0,05$). | 40 |
| Tabla 4-4. Agrupamiento de los tratamientos según el fósforo disponible (ppm) presente en el suelo, utilizando la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$)..... | 45 |
| Tabla 4-5. Agrupamiento de los tratamientos según el peso fresco y seco (mg) desarrollado por la plántula, utilizando la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$). | 47 |
| Tabla 5-1. Constante de estabilidad (KE) de los fosfatos..... | 53 |
| Tabla 5-2. Constantes de estabilidad (KE) de los complejos formados por los aniones orgánicos con diferentes metales en condiciones ácidas | 56 |

Lista de abreviaturas

Abreviaturas

| Abreviatura | Término |
|--------------------|--------------------------|
| P-Ca | Fosfato tricálcico |
| P-Al | Fosfato de Aluminio |
| P-Fe | Fosfato de Hierro |
| P-Sol | Fósforo soluble |
| ppm | Partes por millón |
| P | Fósforo |
| Ac | Ácido |
| meq | Miliequivalente |
| CV | Coeficiente de variación |

Introducción

Actualmente la agricultura es afectada por la llamada revolución verde, cuyo objetivo es incrementar la producción a partir del uso intensivo de insumos de síntesis química como los fertilizantes que contienen fósforo, nitrógeno y potasio, en donde su uso indiscriminado ha conducido a un daño severo en el medio ambiente, siendo uno de estos la contaminación del fósforo en los ambientes acuáticos (eutrofización) (Schmid Naset *et al.*, 2008). No obstante, la agricultura moderna es dependiente del fósforo derivado de la roca fosfórica, el cual es un recurso no renovable, conllevando a que el futuro del nutriente sea incierto (Cordell *et al.*, 2009; Ashley *et al.*, 2011).

El fósforo aplicado, como fertilizante soluble en agua (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-}) es reactivo, formando complejos estables con metales como el Ca^{2+} en suelos calcáreos y con Fe^{3+} y Al^{3+} en suelos ácidos, también se puede adsorber en la superficie de las arcillas y óxidos de hierro y aluminio. Estas formas de fosfato, pueden entrar en equilibrio entre ellas, y con el paso del tiempo pueden transformarse a formas más estables. Por consiguiente, el P es precipitado o inmovilizado a los pocos días de ser aplicado, ocasionando que el suelo se torne nuevamente deficiente del nutriente y por ende, afecte negativamente la fisiología de las plantas cultivadas. Ante esto, los agricultores a menudo adicionan grandes cantidades del fertilizantes químicos conllevando a que el fósforo no disponible del suelo se incremente (Shen *et al.*, 2011; García & García, 2013).

En consideración a esta problemática, se ha desarrollado estrategias para fomentar una producción sostenible, implementando conceptos de agricultura ecológica y biología del suelo (CORPOICA, 2007).

Al entrarnos en la biología del suelo encontramos que la rizósfera provee un microambiente complejo y dinámico, donde los organismos forman una comunidad única de considerable potencial para su estudio y aplicación tecnológica. El conocimiento

integral de la misma, es fundamental para la comprensión de distintos aspectos que se consideran pilares de la sustentabilidad agrícola y ambiental (De Salamone et al., n.d.; Buscot & Varma, 2005).

El proceso de solubilización de fósforo por parte de los microorganismos se presenta como uno de esos aspectos relevantes, ya que convierten formas de fósforo insolubles a disponible para las raíces de las plantas y/o cultivos, aumentando la fertilidad del suelo de una forma económica, ecológica y de gran utilidad agronómica (Vessey., 2003; Sindhu *et al.*, 2014).

Diferentes mecanismos son utilizados por los microorganismos solubilizadores de fosfato, entre los que se encuentran la producción de ácidos orgánicos que solubilizan principalmente fosfato mineral. Estos agentes orgánicos, capturan los iones metálicos divalentes o trivalentes que acompañan e insolubilizan el fósforo formando una molécula organometálica llamada quelato. Es decir, que un quelato es el resultado de combinar un ligando (sustancia orgánica) con ciertos cationes metálicos como: Calcio (Ca), Cobre (Cu), Zinc (Zn), Hierro (Fe), Manganeso (Mn), Boro (B), Molibdeno (Mo), Magnesio (Mg) y de esta manera libera el fósforo en su forma soluble (WALCO S.A., n.d; Sindhu *et al.*, 2014).

En otros casos, la solubilización del P ha sido relacionada con la presencia de iones H^+ , los cuales provienen de la asimilación de NH_4^+ por parte de bacterias como las *Pseudomonas*. También, se ha identificado que los ácidos inorgánicos logran solubilizar los fosfatos, como en la bacteria *Thiobacillus* que tiene la capacidad de oxidar sulfuros a ácido sulfúrico, incrementando la acidez del medio y por consiguiente, el fósforo soluble. Los ácidos húmicos y fúlvicos que son generados durante la descomposición de la materia orgánica se les ha identificado características quelante ya que poseen ciertos grupos hidroxilos, fenólicos y carboxílicos, logrando capturar cationes metálicos y en consecuencia, liberar el ion fosfato e incrementar la disponibilidad del fósforo (Sindhu *et al.*, 2014; Xiao & Wu., 2014).

Como hipótesis de trabajo se planteó: Los hongos y bacterias que poseen mayor capacidad de solubilizar fosfatos inorgánicos lo hacen mediante la producción de ácidos

orgánicos, lo cual influye en la disponibilidad del nutriente y por ende, en el crecimiento vegetal.

1. Objetivos

Evaluar la producción de ácidos orgánicos como alternativa utilizada por hongos y bacterias rizosféricas para mejorar la disponibilidad del fósforo en un *Typic Melanudand* y su efecto sobre el crecimiento inicial de lechuga (*L. sativa*)

1.1 Objetivos específicos

- Evaluar cuantitativa y cualitativamente la producción de ácidos orgánicos y fósforo soluble de cinco hongos y cinco bacterias solubilizadores de fosfato aislados de un *Typic Melanudand*
- Identificar la fuente bacteriana, fungosa y los ácidos orgánicos metabolizados por estos microorganismos con mayor eficiencia solubilizadora de P
- Evaluar los efectos de estos tres componentes: hongo, bacteria y ácidos orgánicos, en la emergencia de semillas de *L. sativa* y en su crecimiento inicial

2.Revisión literaria

2.1 Importancia del fósforo

Históricamente, la producción de cultivos se apoyaba sobre los niveles naturales de fósforo en el suelo, con la adición de materia orgánica como abono, este procedimiento en parte de Asia, se utilizó con excrementos humanos. En 1840 Liebig, descubrió que el fósforo es un nutriente limitante para el crecimiento de las plantas (Cordell *et al.*, 2009). Por lo tanto, la deficiencia del elemento en el campo afecta el metabolismo con el consiguiente impacto sobre el rendimiento y la calidad nutricional, así como resistencia de patógenos y plagas (Wiedenhoeft., 2006; Amtmann & Armengaud., 2009; Ashley *et al.*, 2011).

El fósforo disponible, puede alcanzar grandes concentraciones en suelos altamente fertilizados, pero en la mayoría de suelos estas concentraciones son inadecuadas para un óptimo crecimiento (entre 0.1 y 10 uM). Una adecuada fertilización requiere de varios o decenas de micromoles, como por ejemplos los cultivos que más demandan: algodón, papa, alverja, cebolla, frijol, espinaca y tomate. Los suplementos de fósforo se adicionan al suelo debido al efecto que tienen en las etapas de crecimiento y reproducción de la planta, razón por la cual, se le denota como un nutriente primario que no puede ser reemplazado por ningún otro (Hinsinger., 2001; Tran Thi Thu Ha., 2003; Shen *et al.*, 2011).

El fósforo penetra en la planta a través de las capas externas de las células de los pelos radicales y de la cofia de la raíz. El mecanismo de transporte de la membrana depende de la carga eléctrica y la dirección, en consecuencia, se debe superar la barrera de energía de resistencia negativa del potencial de reposo (típicamente entre -0,1 y -0,15 V), lográndose con al menos dos protones que sirven de co-transporte al anión fosfato, y es por esto que la forma en que el fósforo es absorbido desde la solución del suelo por la planta es principalmente como ión ortofosfato primario ($H_2PO_4^-$), pero también como ión

fosfato secundario (HPO_4^-). Las raíces absorben cantidades muy pequeñas de fósforo, por lo que entre más colonizado por el sistema radical esté un suelo, menor será el nivel de fósforo necesario (Miller *et al.*, 2009; Richardson *et al.*, 2009).

Al entrar el fósforo a la planta puede quedar depositado en la raíz o ser transportado a diferentes sitios, siendo este último paso de gran importancia, porque es la forma en que estará disponible para más reacciones. El fósforo disponible se puede encontrar como ión ortofosfato o fósforo incorporado a moléculas orgánicas, entre las que se encuentran: ADN y ARN, fosfolípidos, fosfoproteínas, enzimas y compuestos ricos en energía (ATP y ADP). Las moléculas de ATP y ADP suministran la energía necesaria para que ocurra el proceso llamado fosforilación; que desencadena una multitud de reacciones químicas esenciales (Richardson., 2001; Soetan *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2011).

Dentro de estos procesos esenciales podemos nombrar (European Fertilizer Manufacturers Association., 2000; Cordell *et al.*, 2009; Marschner & Marschner., 2012):

- La fotosíntesis: la energía solar es capturada en el ATP e inmediatamente este compuesto está disponible como fuente de energía para muchas otras reacciones dentro de la planta
- Desarrollo de nuevas células: el fósforo es vital para la formación de genes y cromosomas, y por consiguiente, para la transferencia del código genético de una célula a otra, además, los fosfolípidos son moléculas fundamentales en la estructura celular
- Suministro de energía: los ésteres de fosfato son moléculas ricas en energía, la cual es aportada a la célula para sus funciones metabólicas, de ahí que estas moléculas sean clasificadas como intermediarios de diferentes rutas de biosíntesis y degradación
- Formación y desarrollo de la semilla: abundante cantidad de fósforo se acumula en las semillas y en el fruto en forma de fitina
- Transporte de nutrientes: el movimiento de nutrientes dentro de la planta depende del transporte a través de las membranas de las células, proceso que requiere de energía para contrarrestar las fuerzas de osmosis; de nuevo aquí, el ATP y otros compuestos fosfatados proveen la energía necesaria para el proceso.

- En el crecimiento y desarrollo de flores y frutos

Al interrumpir el desarrollo normal de estos procesos esenciales debido a la deficiencia de fósforo, las plantas presentan ciertos síntomas característicos (European Fertilizer Manufacturers Association., 2000; Wiedenhoeft., 2006; Bunemann *et al.*, 2011):

- Reducción en el crecimiento de la hoja, así como en el número de hojas. El crecimiento de la parte superior es más afectado que el crecimiento de la raíz, sin embargo, el crecimiento de la raíz también se reduce marcadamente en condiciones de deficiencia de fósforo, produciendo menor masa radical para explorar el suelo por agua y nutrientes. En algunos cultivos las hojas deficientes en fósforo desarrollan un color púrpura, ejemplos: el tomate y el maíz
- Translocación de los tejidos viejos a tejidos meristemáticos activos, por esta razón los síntomas aparecen en las hojas viejas (parte baja)
- Pérdida apreciable de rendimiento
- Mala calidad de forrajes, frutos, hortalizas y granos, así como también retraso de la madurez y reducción de la resistencia de las plantas a las enfermedades

2.2 El Fósforo en el suelo

EL fósforo en el suelo se puede dividir en tres fracciones: disponible, lábil y no lábil. El fósforo disponible, se encuentra en concentraciones muy bajas (entre 0.06 y 0.5 ppm) en la solución del suelo y es fácilmente absorbido por las plantas, presentando equilibrio con el fósforo lábil. Puede existir como ortofosfato o polímeros superiores, aunque esta última forma es poco común encontrar; ya que si se adicionan en forma de fertilizantes estos pueden ser fácilmente hidrolizados tanto enzimática como químicamente y convertidos en ortofosfatos (Foth & Ellis, 1997; Shen *et al.*, 2011).

En cuanto al fósforo lábil, es la porción del fósforo disponible que está unido a la superficie de otros componentes del suelo. Puede estar adsorbido directamente por los bordes de la arcilla (cuando estas tienen cargas positivas como la caolinita a bajos valores de pH), o por uniones que usan el calcio como puente. También, puede unirse a la superficie amorfa de los óxidos hidratados de hierro y aluminio a pH ácidos o neutros, o reaccionar con moléculas de carbonato de calcio en suelos calcáreos o de pH alcalino

formando fosfatos de calcio. Todas estas uniones que sufre el fósforo son fácilmente extractable, por lo que se encuentran en equilibrio directo y rápido con el fósforo en solución (Arai & Sparks., 2007; McLaughlin *et al.*, 2011).

El fósforo no lábil, por su parte, representa la gran reserva del elemento y no se encuentra en equilibrio directo con el fósforo en solución. En este sentido, es formado en el suelo por reacciones de precipitación que se dan a través del tiempo y que dependen principalmente del pH del suelo, generando moléculas sólidas y estables (McLaughlin *et al.*, 2011).

Estas tres formas pueden coexistir en un suelo en particular y cada una es convertida de una forma a otra por los componentes que llegan a la solución. Debido a que los índices de disolución de unos componentes y de precipitación de otros son en la mayoría de los casos cinéticamente lentos, el “pool” de fósforo no lábil tiene una relación de equilibrio con el “pool” de fósforo lábil, pero no directamente con el fósforo de la solución de suelo. Es así, como un aumento en los componentes lábiles del suelo induce un aumento de los componentes no lábiles, mientras que un decrecimiento en la fracción de fósforo lábil, induce un lento decrecimiento en la fracción de fósforo no lábil (Pinochet., 1995; Olibone & Rosolem., 2010).

2.2.1 Fósforo orgánico e inorgánico en el suelo

La formación del fósforo en el suelo tomó alrededor de 10 a 15 millones de años. Este recurso comenzó su generación con restos de vida acuática que fueron eventualmente enterradas en el fondo del océano y transferidas a la litosfera vía mineralización por movimientos tectónicos. Estas secuencias, fueron dadas en el tiempo, y posteriormente arrastradas por cambios meteorológicos como los vientos y las erosiones causadas por las lluvias. La concentración del fósforo es más elevada en las rocas volcánicas, las cuales, constituyen la fuente original y se encuentra principalmente como apatita. Esta concentración disminuye en las rocas primitivas o sedimentarias representando alrededor del 0.1 % de la corteza terrestre (Navarro Blaya & Navarro García., 2003; Ashley *et al.*, 2011).

El fósforo contenido en el suelo puede dividirse en forma amplia en 2 categorías: fósforo orgánico (Po) e inorgánico (Pi), los cuales difieren en su comportamiento y estructura química (Barančíková *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2011).

- **P orgánico**

En condiciones naturales es la forma más abundante, representando entre el 30% y 65%, alcanzando algunas veces valores >90%. Suele ser mayor en las capas superficiales que en el subsuelo, debido a la acumulación de materia orgánica. El fósforo orgánico que ha sido identificado específicamente en el suelo se puede clasificar en tres grupos: inositol fosfato o esteres de fosfatos, ácido nucleico y fosfolípidos. Son caracterizados por su alta acidez y a menudo se encuentran como polímeros o complejos insolubles, estos se obtienen de los restos animales y vegetales, los cuales por procesos de descomposición microbiana empiezan a liberar compuestos fosfatados. Otros compuestos orgánicos que se encuentran en formas menos abundantes son: el fósforo unido a moléculas de azúcares, ácido teicoico y ácidos carboxílicos monofosforilados (Jones & Oburger., 2011).

Los ácidos nucleicos son adsorbidos fuertemente por las arcillas en suelos ácidos y su degradación por los microorganismos queda bloqueada. La fijación es mucho menor en suelos neutros o alcalinos y es aquí, cuando el proceso de degradación toma importancia. Estos procesos de mineralización se dan básicamente en todas las formas del fósforo orgánico, siendo superior en suelos vírgenes que en suelos cultivados, en suelos calizos que en suelos ácidos, y en suelos arenosos no humíferos que en arcillosos (Navarro Blaya & Navarro García., 2003; Arzuaga *et al.*, 2005; Turner., 2008; Bunemann *et al.*, 2011).

- **P inorgánico**

En condiciones naturales se presenta en bajas concentraciones en la solución del suelo, pero la proporción aumenta debido a la presencia de ciertos minerales, donde puede llegar a representar entre el 35% y 70% del fósforo total. El Pi primario representa la forma más estable que incluye la apatita, siendo la más común la fluorapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$), en donde el flúor contribuye a formar una estructura cristalina muy estable que poco

se disuelve y mineraliza en suelo calcáreo o de pH mayor a 7; también se encuentran la hidroxiapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) y francolita (Hinsinger., 2001; Arai & Sparks., 2007; Shen *et al.*, 2011; Jones & Oburger., 2011).

El fósforo mineral secundario, incluye los fosfatos de calcio, hierro y aluminio, los cuales se forman debido a que la estructura del ión fosfato varía con el pH de la disolución, presentando tres formas de ortofosfatos entre pH de 4 y 10 que son los que registran los suelos. Cuando el pH es bajo, la forma monovalente (H_2PO_4^-) tiende a dominar y su concentración es máxima a pH=4 y mínima a pH=9. Lo contrario ocurre con la forma divalente (HPO_4^{2-}) que empieza aparecer a pH=4 y alcanza su máximo a pH=9, los dos iones están en equilibrio a un pH=7. Los iones (PO_4^{3-}) emergen en débil cantidad en el intervalo de pH= 9 - 10. A estos mismos valores de pH se aumenta la solubilidad de ciertos minerales y por tanto, las reacciones se pueden catalogar en dos grupos: suelos ácidos y básicos o alcalinos. En el primero (pH bajos), se liberan los cationes trivalentes de Fe^{3+} y Al^{3+} que provienen del incremento en la solubilidad de los óxidos de estos metales. En estas condiciones de acidez, los iones monovalentes del fosfato (H_2PO_4^-) y los cationes solubles de Fe^{3+} y Al^{3+} reaccionan, para formar las sales insolubles de strengita ($\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y Variscita ($\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Lindsay., 1979; Navarro Blaya & Navarro García., 2003; Shen *et al.*, 2011; Jones & Oburger., 2011; Sindhu *et al.*, 2014).

El H_2PO_4^- en condiciones de menor acidez también puede reaccionar con los óxidos hidratados de estos mismos elementos y arcillas silíceas. Por el contrario, en suelos básicos, los cationes divalentes de Ca^{2+} y en menor intensidad el Mg^{2+} son los predominantes en la solución formando fosfatos de calcio, el cual se precipita debido a su insolubilidad en agua. Los suelos ácidos, fijan el doble de la cantidad adicionada de fósforo por unidad de área de superficie que los suelos calcáreos o neutros. La capacidad de adsorción de fósforo en suelos calcáreos de pH neutro o alto está influenciada por la cantidad de iones de calcio extractable y por el contenido de CaCO_3 (Whitelaw *et al.*, 1999; Navarro Blaya & Navarro García., 2003; Shen *et al.*, 2011).

2.2.2 Fijación de fósforo en el suelo

La fijación de fósforo es un problema en suelos agrícolas, debido a los diferentes procesos de transformación que puede sufrir, evidenciándose principalmente las siguientes formas:

a) Precipitación-Disolución: La precipitación es el proceso en el cual el fósforo se vuelve no disponible para la planta ya que reacciona con ciertos iones presentes en la solución que dependen del pH del medio. A pH alcalino el ión fosfato se precipita como fosfato de calcio, y a pH ácido como fosfato de hierro y aluminio. Por el contrario, el proceso de disolución ocurre a través de largos periodos de tiempos y se dan básicamente en suelos naturales que son ricos en fósforo mineral, los que se transforman lentamente en fósforo disponible (Hinsinger., 2001; Hyland *et al.*, 2005; Jones & Oburger., 2011).

b) Adsorción – Desorción: Es el principal proceso que controla la concentración de fósforo en el suelo. Este se debe a que el fósforo está cargado negativamente y por tanto, los principales agentes adsorbentes son los constituyentes que soportan cargas positivas comprendiendo varios compuestos que contienen cargas variables, como los grupos hidroxil (óxidos de Fe y Al), carboxil (materia orgánica) o silanol (arcillas). Por otra parte, la desorción del fósforo retenido puede ocurrir por medio de una reacción de intercambio de ligando, lo que significa que decrece la concentración del ión fosfato del suelo y se incrementa la concentración del ión competente logrando que el equilibrio adsorción – desorción, se desplace hacia la desorción. Sin embargo, numerosos estudios han demostrado que la superficie de los óxidos de metal u otros adsorbentes del suelo como las arcillas tienen mayor afinidad por el ión fosfato que por otros ligandos inorgánicos como los sulfatos, bicarbonatos y moléculas orgánicas con grupos carboxilos (Hinsinger., 2001; Hyland *et al.*, 2005; Jones & Oburger., 2011).

c) Inmovilización - Mineralización: La inmovilización es debido a que las raíces de las plantas y los microorganismos del suelo toman fósforo disponible de la solución, pero este elemento es retornado en forma orgánica; cuando las especies mueren, y es aquí, donde entra el proceso de mineralización que es efectuado por distintos microorganismos. En este sentido, el principal mecanismo utilizado es la excreción de enzimas fosfatasas,

las cuales liberan el fósforo de las moléculas orgánicas transformándolo en ortofosfato (George *et al.*, 2011).

2.2.3 Microorganismos en la disponibilidad del fósforo.

El suelo es el medio natural en el cual los microorganismos viven, se multiplican y mueren, por lo que su fertilidad no solo depende de su composición química; sino también de la cantidad y calidad de microorganismos que habitan en él. Los microorganismos están estrechamente asociados con las partículas del suelo, principalmente con complejos de materia orgánica, como las arcillas. Su interacción con las partículas de los suelos así como con otros microorganismos y organismos superiores, depende en gran medida de las condiciones en el nivel microhábitat que puede diferir entre microhábitat, incluso a distancias muy pequeñas (Marschner & Marschner., 2012).

Esto se debe a que las transformaciones químicas por parte de los microorganismos tienen una amplia relación con las condiciones ambientales, en donde las condiciones externas no aplican uniformemente a través del suelo; ya que la textura del suelo es un factor trascendental, que influye en el desarrollo de la estructura que depende básicamente de la distribución del tamaño del poro y la retención de la materia orgánica, formando una dinámica compleja de los ecosistemas (Wieland *et al.*, 2001; Buscot & Varma., 2005; Paul., 2014).

La inmensa diversidad de especies microbianas y su habilidad bioquímica para transformar una gran variedad de compuestos químicos, dan a entender que ellos son responsables de muchas funciones cruciales en el suelo. En particular, las que realizan los microorganismos heterotróficos, los cuales controlan la descomposición de la materia orgánica incrementando el ciclo de nutrientes especialmente el nitrógeno, azufre y fósforo. Por consiguiente, la biomasa microbiana tiene un rol central como fuente, reserva y regulador de la transformación de energía y nutrientes en el suelo, jugando un papel crucial la asociación simbiótica entre ciertas plantas y microorganismos, puesto que aumenta su crecimiento y la nutrición mineral (Abbott & Murphy., 2007; Paul., 2014).

El punto donde se llevan a cabo las interacciones más importantes es la rizósfera, que es la porción del suelo adyacente al sistema de la raíz. El tamaño de esta zona depende del tipo de suelo, planta hospedera y condiciones ambientales. El suelo rizosférico, puede ser definido como la parte del suelo en el cual la actividad microbiana es modificada por la presencia de raíces. Un vasto número de especies de microorganismos están presentes en la rizósfera y esa cantidad generalmente disminuye a medida que la distancia de la raíz se incrementa, determinando que la zona adyacente a las raíces, posea características biológicas muy diferentes a las del resto del suelo. (Mukerji *et al.*, 2006; Neumann & Römheld., 2012).

El suelo de la rizósfera, se caracteriza por su gran actividad biológica, ya que la composición cualitativa y cuantitativa de los microorganismos en la zona radical sufre constantes cambios bajo el efecto de los exudados radicales y los compuestos formados por la descomposición celular de las raíces. Por tanto, La dinámica del fósforo en la rizósfera está controlada por el desarrollo de la raíz de la planta, por las propiedades químicas y físicas del suelo y principalmente, por los procesos biológicos, como los que efectúan los microorganismos solubilizadores de fosfato (Marschner & Marschner., 2012).

Algunos microorganismos en el suelo tienen potencial para mejorar el ciclo del fósforo en su forma orgánica e inorgánica y de esta manera aumentar la disponibilidad del elemento. Dentro de estos se encuentran las bacterias, estimándose que entre el 1% y 50 % de la población tienen capacidad de solubilización permitiéndoles una mayor eficiencia, aunque, se ha observado que pierden la capacidad después de subcultivos en serie, mientras que los hongos solo representan el 0.1% al 0.5 % pero, exhiben un mayor poder de solubilización en el tiempo e incluso por años. Hay numerosas especies de bacterias y hongos solubilizadores de fosfatos en el suelo y en la rizósfera. Entre las bacterias se destacan los géneros: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Mesorhizobium*, *Azotobacter* y *Azospirillum*. Los hongos que más predominan son el género, *Aspergillus* y *Penicillium* (Chen *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2009; Behera *et al.*, 2014).

2.2.4 Mecanismos utilizados por microorganismos para solubilizar fósforo

La forma en que los microorganismos solubilizan fosfato depende del estado en que se encuentre el fósforo, ya que en su forma inorgánica su disponibilidad se relaciona con las propiedades de disolución del mineral, que está determinado principalmente por el cambio de pH. Por el contrario, cuando se encuentra en forma orgánica, el principal componente de solubilización es la actividad de los microorganismos, como es el proceso de mineralización e hidrólisis enzimática. Por tanto, los mecanismos de solubilización se puede clasificar en dos grupos: 1) solubilización de fosfato orgánicos durante el proceso de degradación y liberación de enzimas extracelulares y 2) solubilización de fosfato mineral por medio de la producción de compuestos químicos (Jones & Oburger., 2011).

- **Solubilización de fosfato orgánico**

La solubilización del fósforo ligado a moléculas orgánicas se inicia cuando los organismos en el suelo mueren, ya que se incrementa la disponibilidad del fósforo debido a la lisis de las células, aunque, esta disponibilidad depende de las propiedades de adsorción del suelo, el cual puede inmovilizarlo. Por tanto, el principal proceso de mineralización de fosfato está relacionado con la presencia de enzimas fosfatasas. Entre estas, se destacan las fosfohidrolasas abarcando una amplia gama de enzimas que catalizan la hidrólisis de ésteres de fosfatos y son inhibidas cuando se incrementa la concentración de ortofosfatos. También se destacan las fitasas que solubilizan el fósforo que se encuentra como ácido fítico, y finalmente, se nombran las liasas que logran romper los enlaces de fósforo en moléculas orgánicas (Jones & Oburger., 2011; Behera *et al.*, 2014).

Se ha demostrado que algunos cationes divalentes como el Ca, Mg, Zn y Co, sirven de activadores enzimáticos, y que cuando las enzimas son adsorbidas sobre las superficies de los minerales o arcillas se puede alterar la conformación o actividad enzimática, aunque este proceso puede evitar que las enzimas sean consumida por otros microorganismos o inactivadas térmicamente, por consiguiente, la actividad enzimática depende tanto de la capacidad que tienen los microorganismos para generarlas, la

interacción entre los microorganismos, así como la composición mineral del suelo y sus propiedades químicas (Jones & Oburger., 2011; Nannipieri *et al.*, 2011).

Las fosfomonoesterasas son las enzimas más abundantes y las más estudiadas, las cuales, se dividen en enzimas ácidas y alcalinas. Las raíces producen enzimas ácidas, pero rara vez excretan grandes cantidades de alcalinas, sugiriendo que estas últimas son características de los microorganismos (Jones & Oburger., 2011).

- **Solubilización de fosfato inorgánico o mineral**

La disponibilidad de los nutrientes minerales depende de los cambios de pH en el suelo, en donde uno de los mecanismos relacionados con este proceso es la absorción de NH_4^+ por parte de los microorganismos, los cuales expulsan protones para compensar la diferencia de potencial en la membrana ocasionando la disminución del pH. No obstante, cuando los suelos presentan una alta capacidad buffer se ve limitado el efecto de solubilización. Otros de los aspectos nombrados es la presencia de CO_2 en la rizósfera, generado en los procesos de respiración tanto de las raíces como de los microorganismos; conllevando a una reducción del pH debido a que esta molécula propicia la formación del ácido carbónico (Jones & Oburger., 2011; Behera *et al.*, 2014).

El proceso de acidificación por sí sólo no explica completamente la solubilización del fosfato, por lo que el mecanismo que con mayor frecuencia se relaciona es la producción de ácidos orgánicos por parte de los microorganismos, como: el glucónico, cítrico, málico, malónico, oxálico, succínico, láctico y tartárico. Estos ácidos aportan tanto protones que generan acidificación en el suelo, como el anión orgánico que sirve de agente quelante. Los aniones tienen carga negativa, por lo que poseen la capacidad de formar complejos con los metales presentes en el suelo, aunque, la estabilidad o la formación de los complejos dependen de las condiciones del medio (Lucena *et al.*, 2010; Paredes-Mendoza & Espinosa-Victoria., 2010; Mardad *et al.*, 2013).

Cuando los metales mineral que insolubilizan el fósforo son quelatados por los aniones orgánicos se libera el fosfato que se encuentra precipitado u ocluido. Los aniones tricarbónicos, como el cítrico muestran un mayor potencial de solubilización del fósforo que los dicarbónicos como el oxálico. No obstante, el oxálico se manifiesta

particularmente eficiente en suelos calcáreos debido a la alta afinidad que presenta con el calcio. Aunque se ha identificado que el proceso de solubilización de los ácidos orgánicos, es disminuido en suelos ricos en carbonatos y óxidos hidratados de Fe y Al (Jones & Oburger., 2011).

Estos compuestos orgánicos también sirven de fuente de carbono para los microorganismos, por lo que son removidos de la solución y por consiguiente, se reduce el efecto solubilizante, en donde se ha estimado que el rango de vida de los ácidos esta entre 0.5 y 12 h, lo que sugiere que los ácidos deben ser continuamente producidos (Jones & Oburger., 2011; Xiao & Wu., 2014).

Los ácidos orgánicos al ser adicionados a suelos con características ácidas decrecen muy poco el pH y por el contrario, cuando se mezcla con sus sales logran incrementarlo, reduciendo la acidez debido al efecto buffer que estos ácidos logran ejercer con sus bases conjugadas (Zhi-An *et al.*, 2008).

En conclusión, los ácidos orgánicos tienen la capacidad de cambiar las características fisicoquímicas de los microambientes, como es el valor del pH, potencial de reducción, rotación de los nutrientes, inmovilización y reducción de los metales pesados o tóxicos a través de los procesos de quelación y precipitación y en consecuencia, altera la composición y actividad de las comunidades de los microorganismos (Xiao & Wu., 2014).

3. Materiales y métodos

3.1 Origen de la investigación

El desarrollo de la siguiente investigación tiene sus inicios a partir del trabajo titulado “Evaluación de solubilización de fosfatos por microorganismos rizosféricos de un andisol del municipio de cajibío (cauca) y su efecto en plántulas de café” (*Coffea arabica* L. Var. Castillo), efectuado por Carlos Adolfo Cisneros Rojas como tesis de doctorado. Las muestras se obtuvieron en la finca “Santa Rosa”, de la vereda “La Aurelia” del municipio de Cajibío; ubicada a 29 km al norte de Popayán en el departamento del Cauca.

El muestreo se realizó en tres agroecosistemas, que tenían como mínimo dos años de establecidos en la finca. A las muestras tomadas se le realizaron aislamiento de forma independiente, por medio de diluciones seriales desde 10^{-1} hasta 10^{-7} , sobre tres medios de cultivo sólido Pikovskaya modificado (PVK), cada uno con distintas fuentes de fósforo: P-Al, P-Ca y P-Fe, y cada dilución tuvo 5 repeticiones. Para las colonias fúngicas, se utilizó antibiótico con el fin de inhibir el crecimiento bacteriano (Cisneros R, C. A., 2015).

La selección de los microorganismos solubilizadores de fósforo se realizó con base a la eficiencia de solubilización de fosfato (ESF), por cada uno de los aislados. Para poder determinar esta eficiencia, se depositó con un asa de siembra una cantidad suficiente de inóculo en el centro de una placa de Petri con medio PVK modificado, y después de 7 días se observó la formación de un halo claro alrededor de la colonia y se cuantificó por medio de la siguiente relación

$$ESF = \text{área del halo de solubilización} / \text{área de crecimiento de la colonia}$$

Las colonias que presentaron mayor capacidad solubilizadora se purificaron por resiembra sobre el mismo medio, en donde las placas se mantuvieron a temperatura y

humedad relativa ambiente, con luz natural. Después de 5 resiembras, se seleccionaron cinco hongos y cinco bacterias con mejor eficiencia solubilizadora de fósforo, siendo estos microorganismos materiales de partida para la realización de la investigación. Se evaluó por medio de una fermentación en estado líquido la capacidad que tiene cada microorganismo para producir ácidos orgánicos y generar fósforo soluble, lo que permitió identificar la bacteria y el hongo con mayor eficiencia. Posteriormente, estos microorganismos identificados como los más eficientes se evaluaron bajo condiciones de invernadero.

3.2 Producción de ácidos orgánicos y fósforo solubilizado por los microorganismos seleccionados

La producción de ácidos orgánicos y generación de fósforo soluble se realizó en un proceso de fermentación en estado líquido, utilizándose como medio Pikovskaya (PVK), en donde el medio fue modificado al cambiársele la fuente de fósforo por P-Ca, P-Al y P-Fe, correspondiendo a tres medios diferentes (Álvarez Figueroa, 2012). Cada microorganismo se inoculó a una concentración de 5 % v/v en cada uno de los medios de cultivo, por triplicado, y para cada medio se utilizó un testigo, que consistió en no aplicar el inóculo, para un total de 99 muestras (Pradhan & Sukla., 2009). Como fermentadores se utilizaron Erlenmeyer de 250 ml con 150 ml de medio. El proceso se efectuó por 7 días, bajo condiciones ambientales de luz, temperatura y humedad relativa, y se mantuvo la agitación a 120 rpm (Fernández *et al.*, 2005).

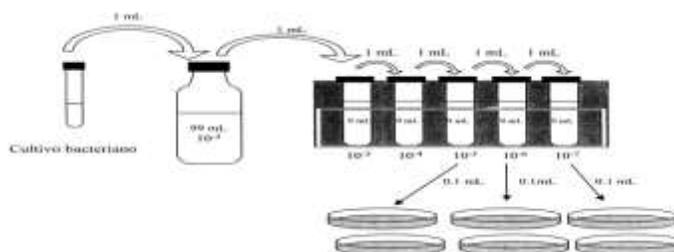
3.2.1 Muestreo durante la fermentación

Durante el proceso de fermentación se tomaron 10 ml de muestra a cada uno de los tratamientos establecidos en el numeral 3.2, en los días 1, 3, 5 y 7. El recipiente utilizado para muestrear y el área donde se efectuó el muestreo fue esterilizado con alcohol y calor (Dutta., 2008). En cada una de las muestras se efectuaron los siguientes análisis:

3.2.2 Estimación del crecimiento de los hongos y bacterias a través del proceso fermentativo

La estimación se realizó por medio de diluciones y siembra en placas (Aquiahuatl & Pérez., 2004), por duplicado. Este procedimiento consistió en tomar 1ml de muestra recolectada en el contenido 3.2.1, y llevarla a diluciones desde 10^{-2} hasta 10^{-7} en condiciones estériles (Figura 3-1), luego se colocaron 0.1 ml de las últimas tres diluciones en cajas Petri y se extendió todo el inóculo en toda la caja. En las bacterias, se utilizó como medio agar nutritivo y se incubaron en forma invertida por 48 horas a 35°C , transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el conteo en aquellas diluciones donde las colonias estaban entre 20 y 200 unidades formadoras de colonia (ufc). Para los hongos, se empleó medio nutritivo y se incubaron por 7 días a 25°C , donde el conteo, se realizó en las diluciones que estaban entre 30 y 300 ufc. Para obtener el número total de la población, se tomó el promedio de las dos cajas y este número se multiplicó por el factor de dilución.

Figura 3-1. Técnica de dilución y siembra



Fuente: Aquiahuatl & Pérez.,(2004).

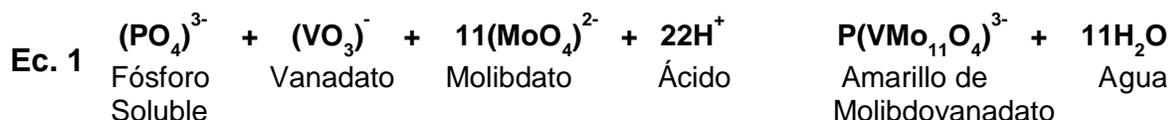
3.2.3 Estimación cualitativa y cuantitativa de los ácidos orgánicos producidos en la fermentación

Del volumen tomado en el numeral 3.2.1, se emplearon 3 ml para estimar los siguientes ácidos orgánicos: acético, cítrico, glucónico, D-málico, L-málico, D-láctico, L-láctico y oxálico. Las muestras se centrifugaron y luego pasaron a través de filtros con tamaño de poro de $0.20\ \mu\text{m}$. Como método analítico se utilizó la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), con una columna de exclusión de ion Aminex HPX-87H (300 mm x 7.8 mm), a una temperatura de 35°C , longitud de onda de detección de 210 nm, volumen de inyección de $20\ \mu\text{L}$ y fase móvil de $\text{H}_2\text{SO}_4\ 0.0025\text{M}$. La identificación cualitativa de las muestras se realizó por comparación de los tiempos de retención de los picos

desconocidos con el de las sustancias patrón de los distintos ácidos. La cuantificación de los ácidos orgánicos se realizó después de construir la curva de calibración mediante áreas. Los patrones primarios fueron marca Sigma grado analítico (Mardad *et al.*, 2013).

3.2.4 Estimación de fósforo soluble generado por hongos y bacterias durante la fermentación.

De la muestra tomada en el numeral 3.2.1, se utilizaron 5 ml para determinar la presencia de ortofosfatos solubles, empleando la técnica espectrofotométrica de amarillo de molibdovanadato (Panegue-Pérez., 2010), la cual se rige bajo la ecuación de Beer-Lambert, a una longitud de onda de trabajo de 470 nm, y empleando reactivos marca Merck grado analítico para la construcción de los estándares, las muestras fueron centrifugadas y filtradas. La obtención del complejo generado tiene lugar según la ecuación 1 (Daniel., 2001).



Bajo condiciones ácidas se produce el molibdovanadato, que forma un complejo de color amarillo con el fósforo soluble en la solución, donde la intensidad del color es proporcional a la concentración del fósforo.

3.2.5 Diseño experimental y análisis estadístico

Para evaluar el experimento de la fermentación en estado líquido se usó un diseño completamente al azar, correspondiendo los tratamientos a las cinco bacterias, cinco hongos seleccionados y las tres fuentes de fósforo. Las variables de respuesta fueron la concentración de fósforo soluble y los ácidos orgánicos cuantificados, cada tratamiento tuvo 3 repeticiones.

En el análisis estadístico de los resultados se determinó la correlación de Pearson que presentaron los ácidos orgánicos y el fósforo soluble, el coeficiente de variación (CV) presentado por cada ácido, el análisis de varianza correspondiente con una significancia

del 95%, y las medias de los tratamientos se compararon utilizando la prueba de Duncan. Todos los análisis se corrieron utilizando el paquete estadístico SAS versión 9.1.3.

A partir del análisis de varianza y la prueba de Duncan, se determinó la bacteria y el hongo con mayor capacidad de generación de fósforo soluble, y estos microorganismos fueron posteriormente identificados molecularmente. También se seleccionaron aquellos cuatro ácidos con mayor concentración producida, y se sometieron a reacciones independientes con cada una de las fuentes, con el fin de corroborar la eficiencia solubilizadora real de cada uno de los ácidos en cada fosfato

3.3 Identificación de los microorganismos y ácidos orgánicos con mayor eficiencia solubilizadora de fósforo

La identificación de los microorganismos fue realizada por Cisneros R, C. A, (2015), la cual se fundamentó en el análisis molecular de las secuencias de ADNr, utilizando como cebadores, en hongos el ITS1 y ITS4, y en bacterias el fD1 y rD1 (Matias *et al.*, 2010; Pérez *et al.*, 2007)

3.3.1 Identificación de los ácidos orgánicos con mayor eficiencia solubilizadora de fósforo

La reacción consistió en obtener el ácido puro a diferentes concentraciones y luego, cada una de estas concentraciones se mezcló con cada uno de los fosfato a la concentración utilizada en la fermentación (0.5 g/L) (Tabla 3-1). El medio se ajustó a 100 ml y el ensayo se realizó por triplicado, a temperatura ambiente y agitándose por 20 minutos a 100 rpm. Finalmente, se determinó el fósforo soluble en cada reacción utilizando el método mencionado en el numeral 3.2.4. Los reactivos empleados fueron grado analítico marca Merck.

Para determinar si existen diferencias significativas entre los ácidos en cuanto a la capacidad de solubilización en cada fuente de fosfato, se estableció el experimento como un diseño completamente al azar, donde los tratamientos correspondieron a los diferentes ácidos y la variable de respuesta a la máxima cantidad de fósforo soluble que cada ácido generó. Se determinó el análisis de varianza correspondiente con una

significancia del 95%, y las medias de los tratamientos se compararon utilizando la prueba de Duncan. Todos los análisis se corrieron utilizando el paquete estadístico SAS versión 9.1.3.

Tabla 3-1. Concentraciones de los ácidos orgánicos puros y los fosfatos, utilizadas en la reacción de solubilización

| Ácido | Reactivo 1 | Reactivo 2 | |
|-----------|--|------------------------------|---------------|
| | Concentraciones (ppm) | Fosfato | Concentración |
| Glucónico | 200 - 500 - 1000 - 1500 - 1750 - 2000 - 2500 | $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ | 0,5 g/L |
| Cítrico | 30 - 150 - 300 - 450 - 600 - 900 - 1500 | $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ | 0,5 g/L |
| Málico | 30 - 150 - 300 - 450 - 600 - 900 - 1500 | $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ | 0,5 g/L |
| Láctico | 80 - 240 - 880 - 1800 | $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ | 0,5 g/L |
| Glucónico | 200 - 500 - 1000 - 1500 - 1750 - 2000 - 2500 | AlPO_4 | 0,5 g/L |
| Cítrico | 30 - 150 - 300 - 450 - 600 - 900 - 1500 | AlPO_4 | 0,5 g/L |
| Málico | 30 - 150 - 300 - 450 - 600 - 900 - 1500 | AlPO_4 | 0,5 g/L |
| Láctico | 80 - 240 - 880 - 1800 | AlPO_4 | 0,5 g/L |
| Glucónico | 200 - 500 - 1000 - 1500 - 1750 - 2000 - 2500 | FePO_4 | 0,5 g/L |
| Cítrico | 30 - 150 - 300 - 450 - 600 - 900 - 1500 | FePO_4 | 0,5 g/L |
| Málico | 30 - 150 - 300 - 450 - 600 - 900 - 1500 | FePO_4 | 0,5 g/L |
| Láctico | 80 - 240 - 880 - 1800 | FePO_4 | 0,5 g/L |

Fuente: Elaboración propia

3.4 Evaluación en invernadero de los efectos del hongo, bacteria y de dos ácidos orgánicos seleccionados en la emergencia de semillas de *L sativa* y en su crecimiento inicial

3.4.1 Multiplicación de los microorganismos a evaluar

Los aislados escogidos para el ensayo de invernadero (H3 y B5), se multiplicaron depositando sobre 75 ml de medio PDA una cantidad suficiente de inóculo procedente de los microorganismos conservados por Cisneros R, C. A, (2015). Los erlenmeyer se colocaron en un agitador orbital a 160 rpm, temperatura y luz ambiental, por 48 horas

para la bacteria y 120 horas para el hongo. Al finalizar la multiplicación, los medios se ajustaron a una concentración adecuada (10^8 ufc/ml en bacterias y 10^9 ufc/ml en hongos) (Cañedo & Ames., 2004; Mittal *et al.*, 2008; Kaur & Reddy., 2014).

3.4.2 Estimación de las concentraciones de los ácidos orgánicos a utilizar en el invernadero

En el numeral 3.2.3, se determinó que el ácido cítrico lo producen preferiblemente los hongos y el glucónico las bacterias. Las cantidades a utilizar en el invernadero se establecieron en 3 dosis: baja, media y alta. En cítrico, la dosis baja correspondió a la implementada por Mendoza *et al.*, (2003), y la alta por Bolan *et al.*, (1994), en cuanto a la media, se utilizó una cantidad promedio entre la baja y alta. Para el glucónico, se tomó como referencia los resultados observados en el etapa 3.3.1, donde el ácido necesitó una concentración casi tres veces mayor a la del cítrico para solubilizar aproximadamente la misma cantidad de fósforo en fosfato de calcio, y la diferencia se relaciona con los grupos carboxílicos, puesto que el cítrico posee 3 y el glucónico 1 (McMurry., 2004), por tanto, es esta relación (Cítrico 1:3 Glucónico) en cuanto la concentración de los ácidos la que se estableció (Tabla 3-2).

Tabla 3-2. Dosis de los ácidos (mmol) utilizados en el ensayo de invernadero

| Nivel | Cítrico | Glucónico |
|-------|---------|-----------|
| Bajo | 0.26 | 0.75 |
| Medio | 0.75 | 2.22 |
| Alto | 1.56 | 4.59 |

Fuente: Mendoza *et al.*, (2003), Bolan *et al.*, (1994)

3.4.3 Prueba de emergencia de las semillas *L sativa*

Se utilizaron semillas de *L. sativa* variedad BLACK SIMPSON, obtenidas comercialmente de la marca SGA. Se les realizaron pruebas de emergencia siguiendo el método establecido por Rao *et al.*, (2007).

3.4.4 Evaluación preliminar del efecto de los ácidos y microorganismos seleccionados sobre semillas y plántulas de *L. sativa*

Se evaluó la capacidad de germinación de las semillas de *L. sativa* en presencia de diferentes ambientes, como son; ácido cítrico en tres dosis (0.26, 0.75 y 1.56 mmol mmol), glucónico (0.75, 2.22 y 4.59 mmol), hongo a una concentración de 10^9 ufc/ml y bacteria a 10^8 ufc/ml. Para cada ambiente se empleó una caja Petri, la cual se le cubrió el fondo con papel absorbente y se adicionó 4 ml del ácido con la cantidad determinada y 1 ml del microorganismo, en este último tratamiento se añade 3 ml de agua para garantizar el mismo nivel de humedad en todos los ensayos, seguidamente, se introdujeron 30 semillas y se deja en la oscuridad por 5 días a temperatura ambiente. Como blanco se dispone de 4 ml de agua.

3.4.5 Ensayo en invernadero

Se establecieron 28 tratamientos (Tabla 3-4) para evaluar el efecto de la fertilización con roca fosforita Fosforita Huila (RF), y la aplicación de hongo, bacteria y ácidos orgánicos, sobre varios parámetros de crecimiento de plantas *L. sativa* sembradas en un suelo ácido y altamente deficiente en P, con ciertas características químicas (Tabla 3-5).

Se contaron con dos condiciones: con fuente de fósforo y sin fuente de fósforo. Las dosis de RF usadas fue 5.28 mg por 40 g de suelo (equivalente 14 ppm de fósforo adicionado), establecida en función a lo utilizado por Bolan *et al.*, (1994). La RF tuvo las siguientes características: 26% de P_2O_5 , 40% de CaO, solubilidad en citrato de amonio neutro 3.1% (reactividad media). Se sembraron dos semillas por unidad experimental, una de ellas se eliminó a los 15 días de efectuada la siembra. El cultivo se mantuvo en observación constante y con riegos de agua de forma periódica para mantener el suelo a capacidad de campo, durante 30 días.

Tabla 3-3. Descripción de los tratamientos utilizados en el ensayo de invernadero

| Tratamiento | Suelo | Biofertilizante | Dosis |
|-------------|-------|-------------------------|---|
| T1 | Con P | Sin Biofertilizante | |
| T2 | Con P | Ac Cítrico | 0,26 mmol |
| T3 | Con P | Ac Cítrico | 0,75 mmol |
| T4 | Con P | Ac Cítrico | 1,56 mmol |
| T5 | Con P | Ac Glucónico | 0,75 mmol |
| T6 | Con P | Ac Glucónico | 2,22 mmol |
| T7 | Con P | Ac Gluc.ónico | 4,59 mmol |
| T8 | Con P | Hongo | 1X10 ⁻⁸ ufc/ml |
| T9 | Con P | Bacteria | 1X10 ⁻⁹ ufc/ml |
| T10 | Con P | Hongo + Bacteria | 1X10 ⁻⁴ ufc/ml + 1X10 ⁻⁹ ufc/ml |
| T11 | Con P | Hongo + Ac Cítrico | 1X10 ⁻⁸ ufc/ml + 0,026 mmol |
| T12 | Con P | Hongo + Ac Glucónico | 1X10 ⁻⁸ ufc/ml + 0,75 mmol |
| T13 | Con P | Bacteria + Ac Cítrico | 1X10 ⁻⁹ ufc/ml + 0,26 mmol |
| T14 | Con P | Bacteria + Ac Gluónico | 1X10-9 ufc/ml + 0,75 mmol |
| T15 | Sin P | Sin Biofertilizante | |
| T16 | Sin P | Ac Cítrico | 0,26 mmol |
| T17 | Sin P | Ac Cítrico | 0,75 mmol |
| T18 | Sin P | Ac Cítrico | 1,56 mmol |
| T19 | Sin P | Ac Glucónico | 0,75 mmol |
| T20 | Sin P | Ac Glucónico | 2,22 mmol |
| T21 | Sin P | Ac Glucónico | 4,59 mmol |
| T22 | Sin P | Hongo | 1X10 ⁻⁸ ufc/ml |
| T23 | Sin P | Bacteria | 1X10 ⁻⁹ ufc/ml |
| T24 | Sin P | Hongo + Bacteria | 1X10-4 ufc/ml + 1X10 ⁻⁹ ufc/ml |
| T25 | Sin P | Hongo + Ac Cítrico | 1X10 ⁻⁸ ufc/ml + 0,26 mmol |
| T26 | Sin P | Hongo + Ac Glucónico | 1X10 ⁻⁸ ufc/ml + 0,75 mmol |
| T27 | Sin P | Bacteria + Ac Cítrico | 1X10 ⁻⁹ ufc/ml + 0,26 mmol |
| T28 | Sin P | Bacteria + Ac Glucónico | 1X10 ⁻⁹ ufc/ml + 0,75 mmol |

Fuente: Elaboración propia

Tabla 3-4. Caracterización química del suelo donde se realizó el ensayo de invernadero

| Variable química | Cantidad | Unidades | Variable química | Cantidad | Unidades |
|------------------|----------|----------|------------------|----------|----------|
| pH | 4.48 | | Al | 0.64 | cmol/kg |
| MO | 106.48 | g/kg) | S | 39.2 | mg/kg |
| P-Bray-II | 3.05 | mg/kg | B | 0.78 | mg/kg |
| K | 0.45 | cmol/kg | Fe | 36.34 | mg/kg |
| Ca | 2.44 | cmol/kg | Mn | 23.32 | mg/kg |
| Mg | 0.51 | cmol/kg | Cu | 0.81 | mg/kg |
| | | | Zn | 2.12 | mg/kg |

Fuente: Cisneros R, C. A., (2015)

A los 30 días de establecido el ensayo, se evaluaron las siguientes variables en cada uno de los tratamientos:

- **Estimación del fósforo total en el suelo usado para el ensayo**

Se determinó por medio de una digestión ácida (Pierzynski., 2000), donde se mezclaron 2 gramos de suelo con tamaño de partícula menor a 5 mm y 30 ml de ácido perclórico a 60 %, se calentó a 170°C hasta que la solución se volvió transparente y finalmente, se cuantificó el fósforo por medio del método establecido en el numeral 3.2.4.

- **Estimación del fósforo soluble en el suelo**

En cada uno de los suelos donde se implementó cada tratamiento, se determinó el fósforo soluble, utilizando la técnica BrayII (Pierzynski., 2000), que consistió en colocar 2 gramos de suelo fino en un erlenmeyer de 50 ml, luego se adicionó 20 ml de solución extractante (0.025 M HCl en 0.03 M NH₄F). Se agitó a 200 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente, y se añadió 200 mg de carbón activado. Completado el tiempo se pasó a través de filtros Whatman No. 42, y al filtrado se le determinó el fósforo con el procedimiento indicado en el numeral 3.2.4.

- **Estimación del pH en el suelo**

A cada uno de los tratamientos se le realizó una disolución del suelo en agua en una relación 1:1, se agitó por 1 minuto y se midió el pH en un pH-metro marca Mettler Toledo (Zapata Hernández & others., 2004).

- **Estimación del peso fresco**

Se extrajo las plántulas del área donde se cultivó, luego, se lavó la raíz con agua destilada para retirar fragmentos de tierra, se seca con toallas absorbentes y se pesaron en una balanza analítica marca ohaus (Peña & Cely., 2011).

- **Estimación del peso seco**

Después de determinar el peso fresco, se tomó cada plántula y se secó a 70°C por 72 horas. Transcurrido el tiempo, se dejó enfriar el material por 2 horas y se registraron los pesos (Peña & Cely., 2011).

- **Análisis de variables**

Los tratamientos se dispusieron en un diseño de parcelas divididas, donde las parcelas corresponden a las condiciones del ensayo; con fósforo y sin fósforo, y los tratamientos a los establecidos en la Tabla 3-3. A cada una de las variables determinadas se le realizó un análisis de varianza, utilizando el paquete estadístico SAS versión 9.1.3. La diferencia entre medias se evaluó con la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$).

También se realizó un análisis de matriz de correlación para determinar si hay relación entre las variables de respuestas. Al establecer la relación existente, se determinó la correlación entre los tratamientos y las variables por medio de un análisis de matriz factorial. Todos los cálculos se determinaron en el software estadístico R.

4. Resultados

4.1 Producción de ácidos orgánicos y fósforo solubilizado por los microorganismos seleccionados

4.1.1 Estimación del crecimiento de los hongos y bacterias a través del proceso fermentativo

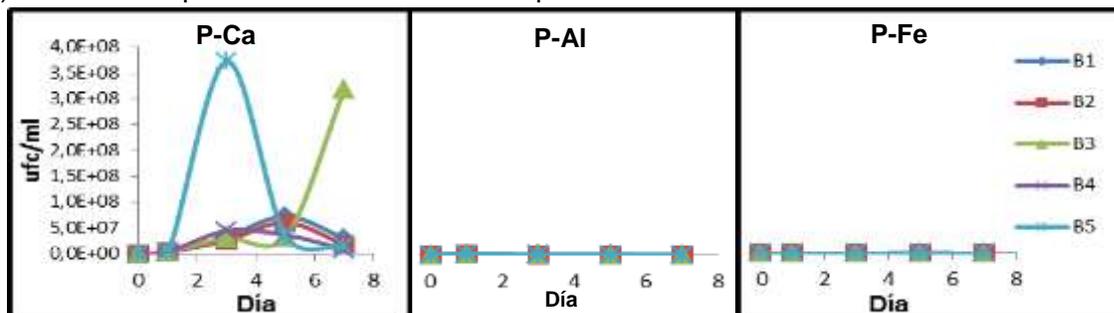
Las poblaciones de bacterias alcanzan el orden de 10^7 a 10^8 ufc/ml en los primeros dos días de crecimiento, pero, entre el quinto y séptimo día las poblaciones decrecen al orden de 10^6 ufc/ml. Son más eficientes creciendo sobre P-Ca que sobre las otras dos fuentes estudiadas (Figura 4-1a), en las cuales los valores poblacionales son mínimos.

Al reducir la escala en la gráfica (Figura 4-1b), para apreciar el crecimiento en fosfato de aluminio, se establece que todas las bacterias analizadas logran multiplicarse en un tiempo relativamente corto por lo que alcanzaron muy rápido la fase declive, conllevando a una población permanentemente baja durante la fermentación. De igual manera, en fosfato de hierro se observó que sólo dos bacterias logran desarrollar una mínima población.

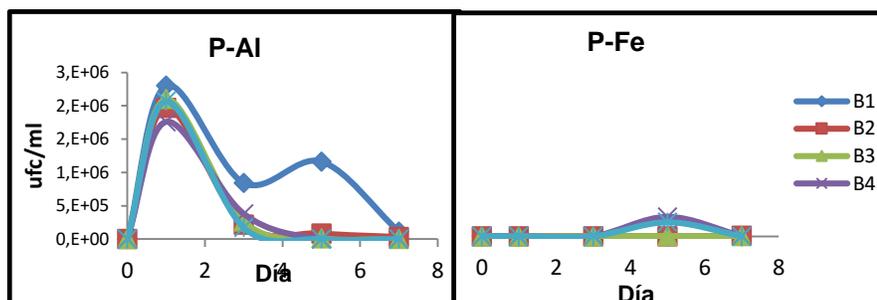
Por el contrario, en P-Ca los hongos alcanzan sólo la mitad de los valores logrados por las bacterias (10^4 ufc/ml). Sin embargo, el crecimiento fungoso aunque con altibajos es continuo a través de los 7 días de evaluación presentando la fase exponencial (Figura 4-1c). En cuanto a P-Al, la mayoría continuaron con el mismo comportamiento que en P-Ca, y sólo en P-Fe se establece que 4 de los 5 hongos disminuyen su población en los últimos días de la fermentación.

Figura 4-1. Crecimiento de los 10 microorganismos en medios de cultivos con diferentes fuentes de fosfato: P-Ca: fosfato de tricálcico, P-Al: Fosfato de aluminio y P-Fe: Fosfato de hierro de hierro

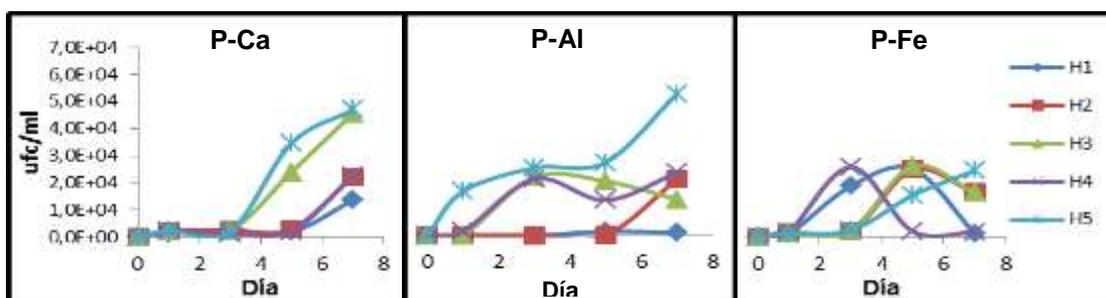
a) Crecimiento poblacional de bacterias expresando la escala al orden de 10^8 ufc/ml



b) Crecimiento de bacterias en P-Al y P-Fe, expresando la escala al orden de 10^6 ufc/ml



c) Crecimiento poblacionales de los hongos expresando la escala al orden de 10^4 ufc/ml



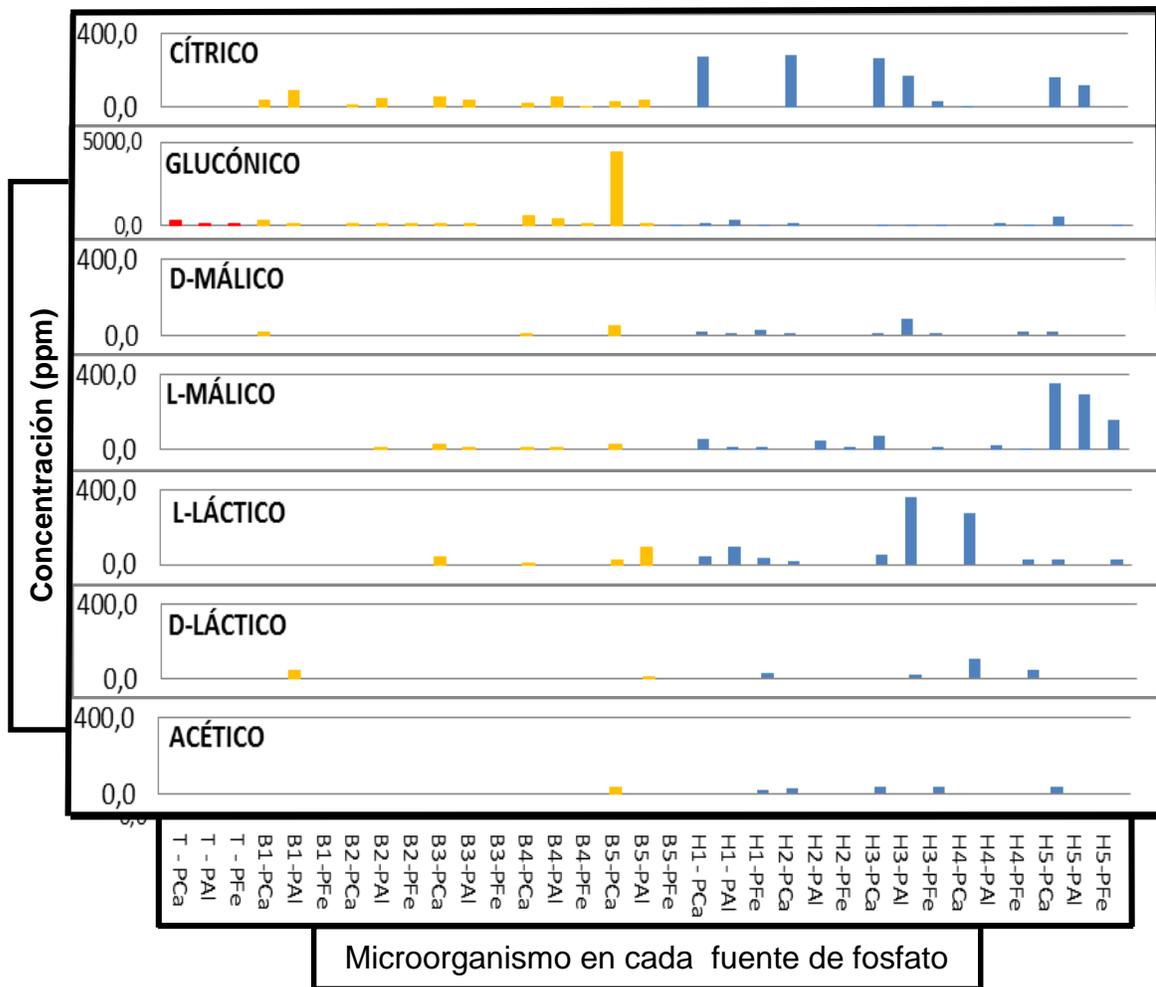
Fuente: Elaboración propia

Como se estableció en la metodología, estas evaluaciones de crecimiento bacteriano y fungoso a través del tiempo se complementaron con estimaciones de ácidos orgánicos y P soluble liberado por los diez microorganismos analizados. El seguimiento a través de los siete días permitió definir el día séptimo como el más adecuado para hacer las valoraciones de estas variables y su análisis estadístico.

4.1.2 Estimación cualitativa y cuantitativa de los ácidos orgánicos liberados por los microorganismos en la fermentación

En general, tanto bacterias como hongos presentaron la capacidad de generar ácidos orgánicos entre los que se estimaron: ácido cítrico, glucónico, D-málico, D-láctico, L-málico, L-láctico y acético. Ninguno de los microorganismos produjo oxálico (Figura 4-2).

Figura 4-2. Valores promedios de ácidos orgánicos (ppm) liberados por los microorganismos estudiados

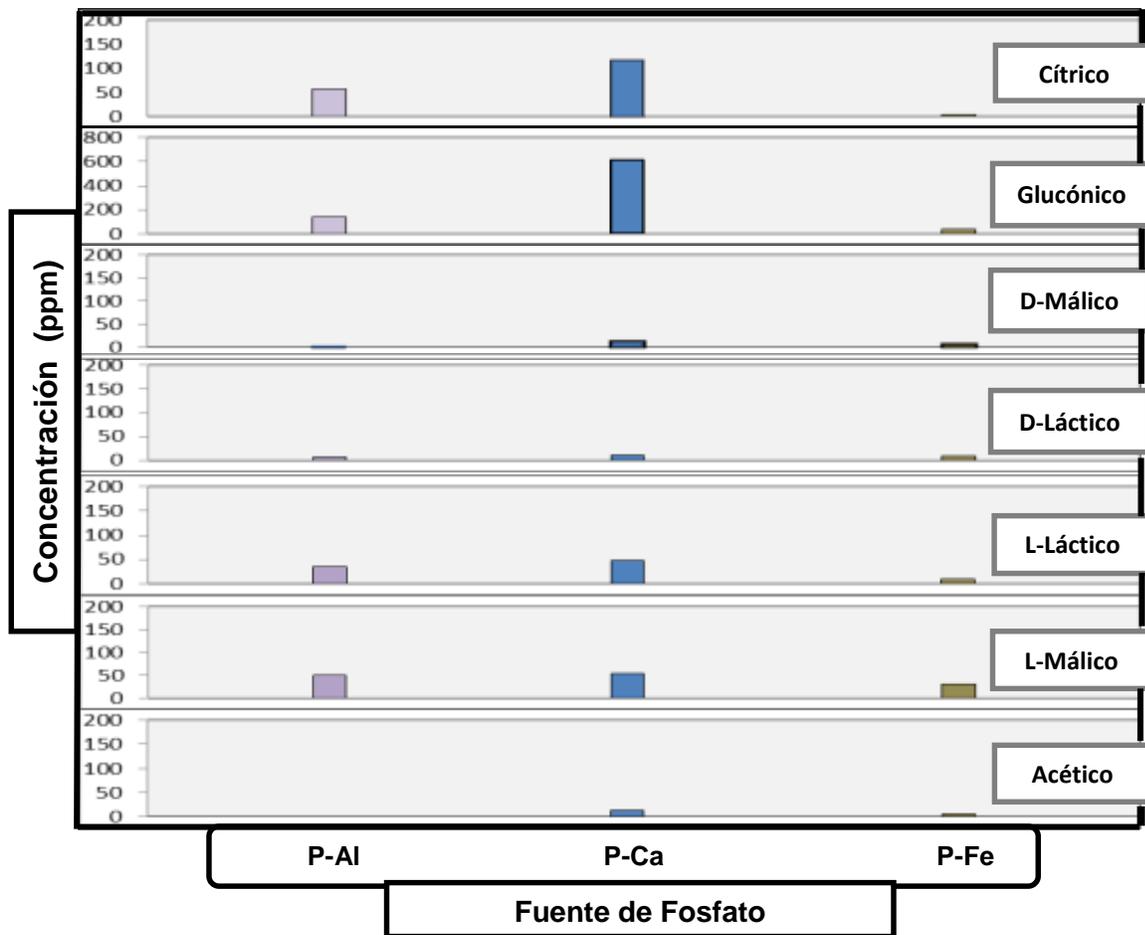


Convenciones: T=Testigo, B= bacterias y H=hongos. P-Ca: Fosfato de tricálcico, P-Al: Fosfato de aluminio, y P-Fe: Fosfato de hierro

Fuente: Elaboración propia

Los dos grupos microbianos variaron en los ácidos orgánicos y cantidades que produjeron. Las cinco bacterias liberaron ácido glucónico, mientras que los hongos generaron cítrico, málico y láctico. La fuente de fosfato que se utilizó durante la fermentación determinó la producción de ácidos orgánicos. En promedio, en presencia de fosfato tricálcico se registraron los mayores valores, en fosfato de aluminio ocurrió un descenso en la concentración de aproximadamente la mitad y por último, en fosfato de hierro se observó una significativa reducción en la fermentación (Figura 4-3).

Figura 4-3. Influencia de la fuente de fosfato en la producción de ácidos orgánicos



Convenciones: Cada cantidad de ácido presentado en cada fuente de fosfato corresponde al promedio entre todos los microorganismos

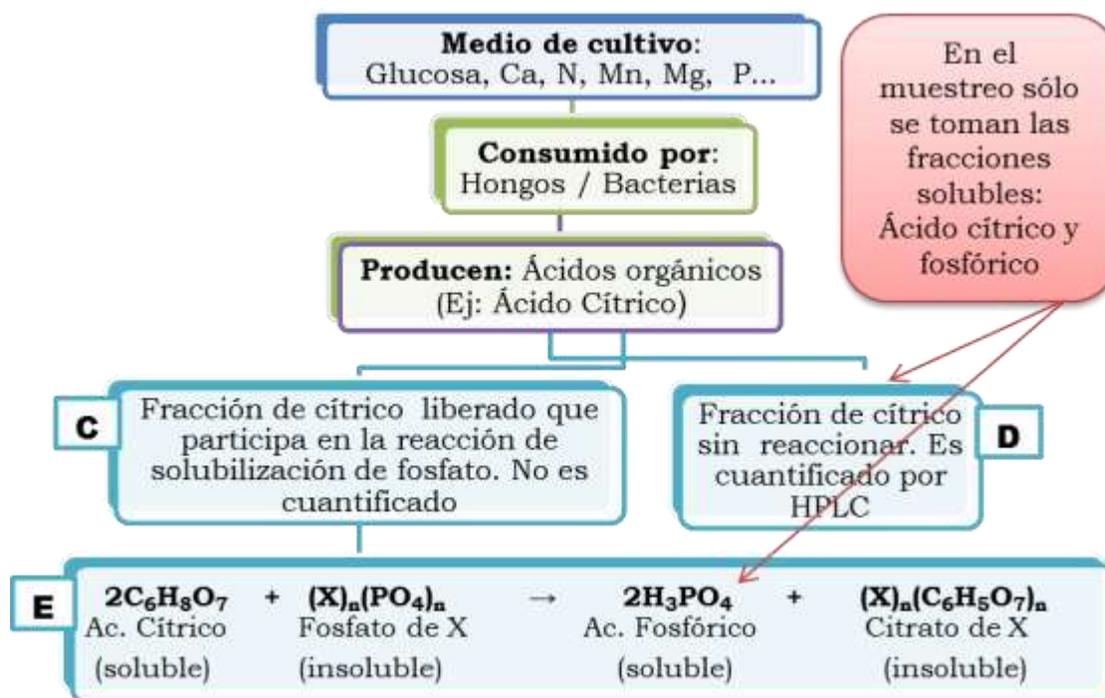
Fuente: Elaboración propia

Al realizar el análisis estadístico convencional se encontró que el CV en los ácidos orgánicos estimados fluctuaba considerablemente, presentando cifras iguales o mayores a 80% en cada una de las fuentes de fósforo (A. Anexo), valores muy diferentes a los encontrados por Romano *et al.*, (2005), donde estimaron que el CV para ensayos in vitro es máximo 9.8%. De igual manera, Ghaly & Kamal., (2004) establecieron que en un sistema de fermentación sumergido utilizando levadura las variables determinadas presentaron CV entre 3.9 % y 8.8%. Por otra parte Prakash & Srivastava., (2005) que experimentaron con crecimiento celular y producción de metabolitos secundarios estipularon un CV de 14.76%, mientras que Molloy *et al.*, (2003) que trabajaron con cultivos bacterianos su CV fue de 31%, además, en ensayos de campo en agricultura se establece como un máximo permisible en CV de 33% (Patel *et al.*, 2001) y finalmente, Rathi *et al.*, (2002) determinaron un CV de 39.05% para la producción de lipasas en la bacteria *Burkholderia sp.*

También se evidenció una correlación baja o negativa entre los ácidos identificados y el fósforo soluble (B. Anexo). A pesar de ello, el ácido cítrico presentó la correlación más alta en las tres fuentes. Aparentemente, estos resultados arrojan dudas sobre la distribución normal entre los tratamientos y la confiabilidad del ensayo.

La búsqueda de explicación a estos resultados llevó a establecer que la concentración de los ácidos determinados no correspondía al total de los producidos por el microorganismo, ya que una parte de éstos se consumían en la reacción de solubilización, como se puede corroborar en la Figura 4-4 – indicado con la letra **C**.

Figura 4-4. Esquema de producción y reacción de los ácidos orgánicos durante el proceso de fermentación



Convenciones: **Ac**=Ácido, **X** puede ser Ca, Al o Fe, **n**= 1, 2,3, que corresponde a la cantidad de iones presente en la molécula

Fuente: Elaboración propia

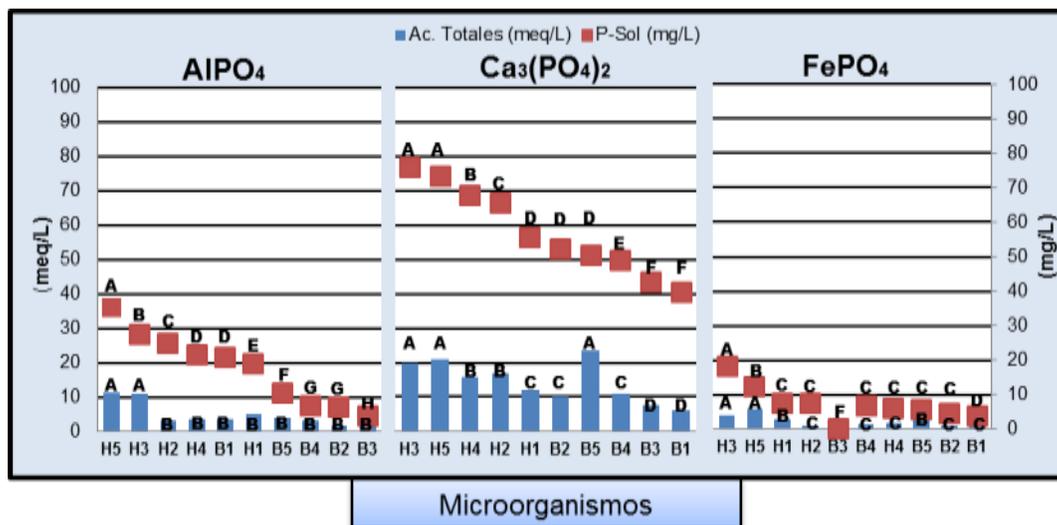
Como se desprende del análisis de la Figura 4-4, el total de ácidos producidos por cada microorganismo corresponden: 1. Ácidos que participan en la solubilización del fosfato (**C**), 2. Ácidos determinados por HPLC (Ácidos sin reaccionar - **D**). Teniendo en cuenta la reacción (**E**), se procedió a calcular estequiométricamente los ácidos no cuantificados en cada fuente de fosfato a partir del fósforo soluble, con el fin de conocer la cantidad producida. Como cada microorganismo generó varios ácidos se dirigió el cálculo a una unidad que equivalga a todos los ácidos producidos, y esta es la equivalencia ácida o cantidad de hidrógenos ácidos en un molécula, expresada como acidez total (C. Anexo).

Los hidrógenos ácidos, son aquellos hidrógenos que pertenecen al grupo carboxilo del ácido orgánico, y debido a fuerzas de atracción, estos hidrógenos fácilmente se liberan dejando en la molécula orgánica sitios ricos en electrones y aptos para formar enlaces

con cationes como el calcio, hierro, aluminio y potasio. Los hidrógenos al quedar libres disminuyen el pH del medio (McMurry., 2004).

Con este cambio metodológico los resultados estadísticos cambiaron considerablemente, ya que la correlación entre acidez total (expresada como equivalentes ácidos en cada una de las fuentes de fosfato) y fósforo soluble (B. Anexo) fue positiva y altamente significativa, y el coeficiente de variación menor (P-Al: 39.53%, P-Ca:18.53%, P-Fe:38.76%). Con base en estos cálculos, se logró comprobar que los ácidos orgánicos estaban relacionados con el proceso de solubilización del fósforo y que el diseño experimental implementado para estimar esta relación, fue confiable (Figura 4-5).

Figura 4-5. Ácidos orgánicos expresados como ácidos totales (Ac. Totales), y fósforo soluble (P-Sol) generado por los hongos y bacterias, en cada una de las fuentes de fosfato



Convenciones: meq = miliequivalente, H=hongo y B=Bacteria, Las letras en las barras representan el agrupamiento de Duncan ($\alpha=0.05$)

Fuente: Elaboración propia

El análisis de varianza (D. Anexo) para esta variable generada, indicó que existen diferencias significativas entre los tratamientos en cada una de las fuentes de fósforo. Los hongos H3 y H5 obtuvieron los mejores rendimientos en las 3 fuentes de P. Por el contrario, las bacterias presentaron los rendimientos más bajos y solo la B5 alcanzó la mayor producción de ácidos orgánicos en el medio con P-Ca (Tabla 4-1).

Tabla 4-1. Agrupamiento de los hongos y bacterias según la capacidad de producción de ácidos orgánicos (miliequivalente ácidos -meq/L), en las tres fuentes de fosfato utilizadas. Prueba de Duncan ($\alpha=0.05$).

| Fosfato de aluminio | | Fosfato tricálcico | | Fosfato de hierro | |
|---------------------|--------|--------------------|----------|-------------------|----------|
| Micro | Grupos | Micro | Grupos | Micro | Grupos |
| H5 | 11,2 A | B5 | 23,6 A | H5 | 5,80 A |
| H3 | 11,1 A | H5 | 20,9 AB | H3 | 4,01 AB |
| H1 | 5,15 B | H3 | 19,7 AB | H1 | 2,98 BC |
| B5 | 3,82 B | H2 | 17,0 BC | B5 | 2,48 BCD |
| B1 | 3,54 B | H4 | 15,9 BCD | H4 | 1,90 BCD |
| H4 | 3,37 B | H1 | 12,2 DEF | B4 | 1,36 BCD |
| H2 | 3,17 B | B4 | 10,9 DFG | H2 | 1,00 CD |
| B4 | 3,03 B | B2 | 10,3 DFG | B2 | 0,88 CD |
| B3 | 1,80 B | B3 | 7,69 FG | B3 | 0,79 CD |
| B2 | 1,69 B | B1 | 6,19 G | B1 | 0,62 D |

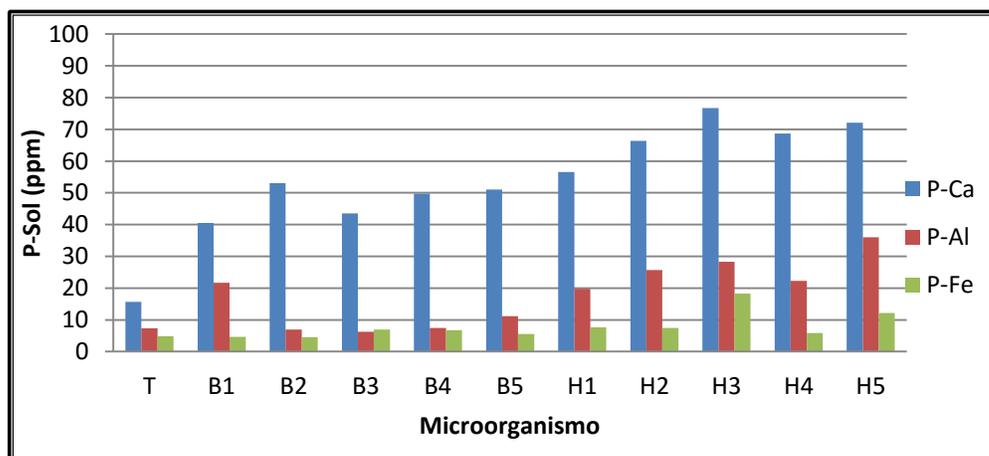
Convenciones: Micro= Microorganismos, meq =miliequivalente ácidos

Fuente: Elaboración propia

4.1.3 Estimación de fósforo soluble generado por hongos y bacterias durante la fermentación

La fuente de P que más fue solubilizada por los microorganismos es P-Ca (Figura 4-6), seguido por P-Al y por último P-Fe, siendo más eficientes los hongos.

Figura 4-6. Fósforo solubilizado (P-sol- en ppm) liberado por bacterias y hongos en cada una de las fuentes de fosfato utilizadas



Fuente: Elaboración propia

Los hongos H5 y H3 son los que presentan mayor eficiencia solubilizadora de fosfato en las tres fuentes, donde en P-Al y P-Fe alcanzan un rendimiento casi 3 veces mayor al presentado por las bacterias que fueron las menos eficientes, por el contrario, en P-Ca las diferencias son menores (Tabla 4-2).

Tabla 4-2 . Agrupamiento de los microorganismos según la capacidad de solubilización de fósforo (mg/L) en las tres fuentes de fosfato, utilizando la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$).

| Fosfato de Aluminio | | Fosfato Tricálcico | | Fosfato de Hierro | |
|---------------------|--------|--------------------|---------|-------------------|--------|
| Micro | Grupo | Micro | Grupos | Micro | Grupos |
| H5 | 36,1 A | H3 | 76,7 A | H3 | 18,2A |
| H3 | 28,3 B | H5 | 72,1 AB | H5 | 12,2B |
| H2 | 25,7 C | H4 | 68,7 BC | H1 | 7,6 C |
| H4 | 22,3 D | H2 | 66,4 C | H2 | 7,5 CD |
| B1 | 21,7 D | H1 | 56,5 D | B3 | 7.0 CD |
| H1 | 19,8 E | B2 | 53,1 DE | B4 | 6,8 D |
| B5 | 11,2 F | B5 | 51,1 DE | H4 | 5,9 E |
| B4 | 7,40 G | B4 | 49,7 E | B5 | 5,6 E |
| B2 | 7,00 G | B3 | 43,5 F | B2 | 4,6 F |
| B3 | 4,30 H | B1 | 40,5 F | B1 | 3,6 G |

Fuente: Elaboración propia

4.2 Identificación de los microorganismos y ácidos orgánicos con mayor eficiencia solubilizadora de fósforo.

Dentro de los hongos y bacterias estudiados, con base en la habilidad demostrada para solubilizar las tres fuentes de P, se hizo identificación molecular de las especies H3 y B5, correspondiendo a *Penicillium ochrochloron* Y *Kocuria sp.*, respectivamente. Las características de ambos fueron descritas por Cisneros R, C. A, (2015).

4.2.1 Identificación de los ácidos orgánicos con mayor eficiencia solubilizadora de fósforo

La prueba in vitro de la capacidad solubilizadora de P de los ácidos puros cítrico, glucónico, málico y láctico, mostró que todos son buenos solubilizadores de P-Ca; Málico y láctico ocasionaron la mayor disponibilidad de P soluble. Cuando se cambia a P-Al, el P

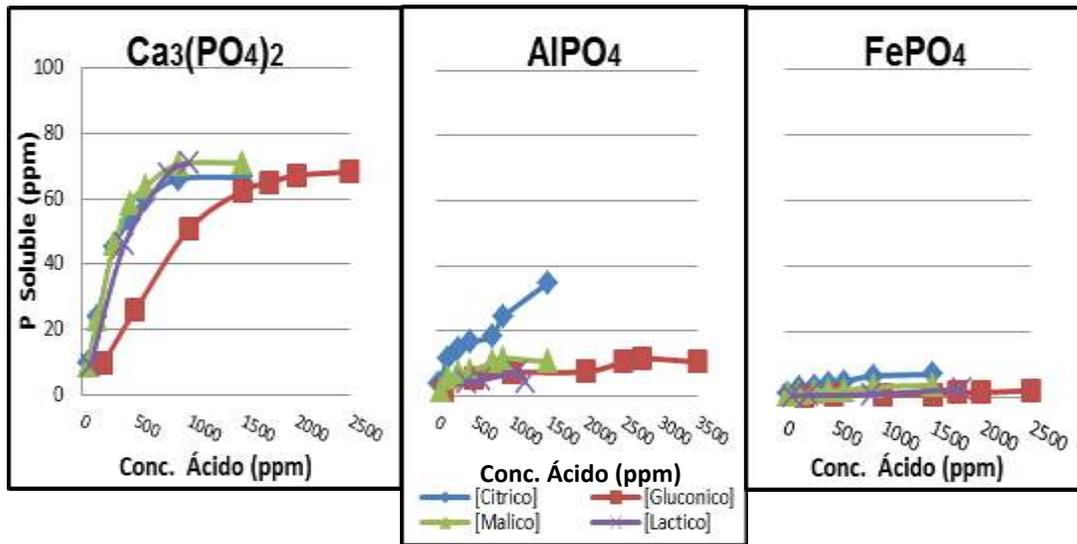
disponible disminuye drásticamente, aún en presencia de cítrico (el más eficiente), y la situación de disponibilidad del P aún es más crítica cuando se usa P-Fe (Tabla 4-3, Figura 4-7)

Tabla 4-3. Agrupamiento de los ácidos orgánicos en cada fuente de fosfato según el fósforo soluble generado (ppm), utilizando la prueba de Duncan (P=0,05).

| Fosfato de Aluminio | | Fosfato Tricálcico | | Fosfato de Hierro | |
|---------------------|-------|--------------------|-------|-------------------|-------|
| Ácido | Grupo | Ácido | Grupo | Ácido | Grupo |
| Málico | 71,1A | Cítrico | 34.7A | Cítrico | 7.1A |
| Láctico | 70,1A | Glucónico | 11.9B | Málico | 3,1B |
| Glucónico | 68,3B | Málico | 11.5B | Láctico | 2,6C |
| Cítrico | 66,6C | Láctico | 8.1C | Glucónico | 2,2C |

Fuente: Elaboración propia

Figura 4-7. Capacidad de solubilización de 4 ácidos orgánicos puros, sobre 3 fuentes de fósforo



Convenciones: conc = concentración

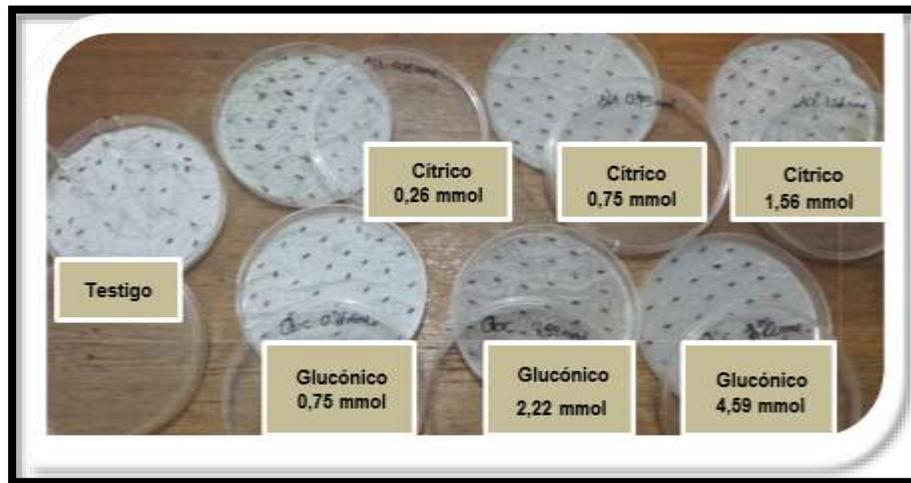
Fuente: Elaboración propia

4.3 Evaluación en invernadero de los efectos de *Penicillium ochrochloron*, *Kocuria* sp y de los ácidos cítrico y glucónico en semillas de *L. sativa*

4.3.1 Evaluación preliminar del efecto de los ácidos y microorganismos seleccionados sobre semillas de *L. sativa*

De acuerdo con los resultados indicados en la Figura 4-2, los microorganismos evaluados produjeron mayores cantidades de glucónico en bacterias y cítrico en hongos. Por tanto, fueron estos ácidos los seleccionados, con el fin de evaluar el efecto de tres concentraciones sobre las semillas. En las semillas de *L. sativa* todos los ácidos orgánicos evaluados en sus diferentes concentraciones inhibieron el proceso de germinación (Figura 4-8). En los testigos microbianos, las semillas germinaron sin problema.

Figura 4-8. Efecto del ácido cítrico y glucónico en tres concentraciones diferentes sobre la emergencia de las semillas de *L. sativa*



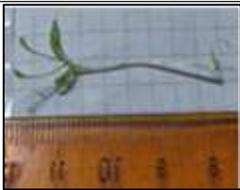
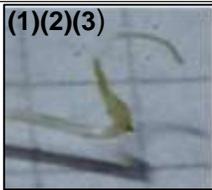
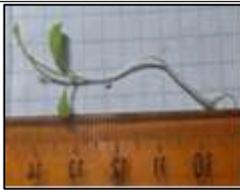
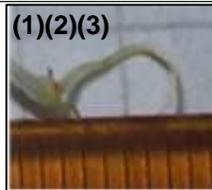
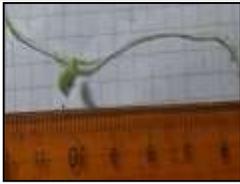
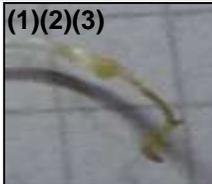
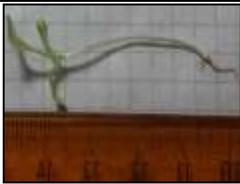
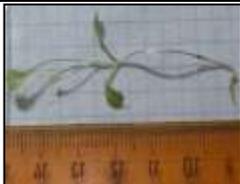
Fuente: Elaboración propia

4.3.2 Ensayo en invernadero

En la Figura 4-9 se observó que la altura de las plántulas varió muy poco entre los tratamientos, sus longitudes oscilaron entre 4 y 5 cm a los 30 días de siembra. Sin embargo, en el desarrollo de la raíz se observaron diferencias notorias en las longitudes

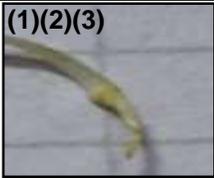
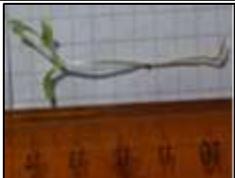
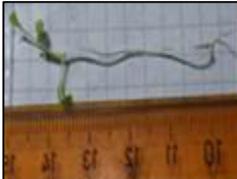
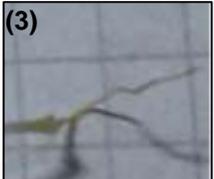
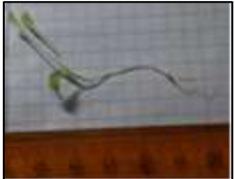
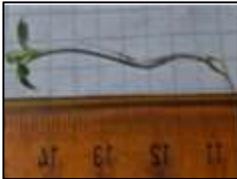
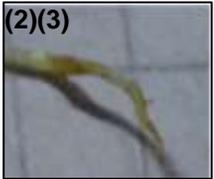
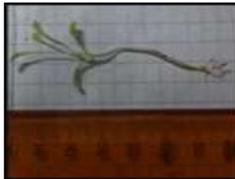
y morfología radical, en donde estas observaciones se describen en detalle en la discusión. En los tratamientos donde interactuaron los microorganismos y especialmente, el ácido cítrico, se hace evidente una ramificación más temprana de la raíz, en comparación con el testigo. Estos mismos tratamientos presentaron los mejores resultados en las estimaciones cuantitativas.

Figura 4-9. Crecimiento en plántulas y raíz de la *L. sativa*, a los 30 días de siembra

| Tratamiento | Plántula | Raíz | Tratamiento | Plántula | Raíz |
|--------------------------|---|---|------------------------|---|--|
| Testigo |  | (1)(2)(3)  | Hongo + Bacteria |  | (1)(2)(3)  |
| Ac Glucónico (0,75 mmol) |  | (1)(2)(3)  | Ac Cítrico (0,26 mmol) |  | (1)(2)(3)  |
| Ac Glucónico (2,22 mmol) |  | (1)(2)(3)  | Ac Cítrico (0,75 mmol) |  | (2)(3)  |
| Ac Glucónico (4,59 mmol) |  | (1)(2)(3)  | Ac Cítrico (1,56 mmol) |  | (2)(3)  |

Fuente: Elaboración propia

Figura 4 9. Crecimiento en plántulas y raíz de la *L. sativa*, a los 30 días de siembra

| Tratamiento | Plántula | Raíz | Tratamiento | Plántula | Raíz |
|-------------------------------|--|---|----------------------------|--|---|
| Bacteria |  | (1)(2)(3)  | Hongo |  | (2)(3)  |
| Bacteria + Ac Glucónico |  | (3)  | Hongo + Ac Glucónico |  |  |
| Bacteria + Ac Cítrico |  | (2)(3)  | Hongo + Ac Cítrico |  |  |

Convenciones: los números representan las siguientes observaciones en la raíz, **(1)** formación de encallados, **(2)** disminución en la longitud de la raíz, **(3)** ausencia de pelos radicales

Fuente: Elaboración propia

- **Estimación del fósforo total en el suelo usado para el ensayo**

El suelo utilizado en el ensayo presentó 1394 ppm de fósforo total, resultado similares fueron reportados por Bravo *et al.*, (2007) que trabajaron con suelos del mismo sitio

- **Estimación del fósforo soluble en el suelo**

En las variables de respuesta, la ANDEVA (G. Anexo) indicó que existen diferencias significativas entre los tratamientos, más no entre parcelas o fuentes (Con y sin adición de fosfato), tal vez debido a la cantidad de fosforita Huila adicionada (equivalente a 14 ppm de P), la cual es insignificante ante el fósforo total o fósforo no disponible (1394 ppm). De esto se infiere que es innecesaria una fertilización que implique adición de fosfatos, sino más bien estimular los mecanismos que permitan hacer disponible el P presente en el suelo, como se puede observar en los tratamientos más eficientes de este ensayo (Tabla 4-4).

Tabla 4-4. Agrupamiento de los tratamientos según el fósforo disponible (ppm) presente en el suelo, utilizando la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$).

| Tratamiento | Grupo | | | | | |
|--------------------------|-------|------|-----|-----|-----|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Hongo | 13,8 | A | | | | |
| Hongo + Ac Cítrico | 13,6 | A | | | | |
| Hongo + Ac Glucónico | | 11,3 | B | | | |
| Ac Cítrico (1,56 mmol) | | 10,5 | BC | | | |
| Ac Glucónico (4,59 mmol) | | 10,1 | BC | | | |
| Hongo + Bacteria | | | 8,9 | CD | | |
| Bacteria | | | 8,6 | CD | | |
| Bacteria + Ac Cítrico | | | | 7,5 | DE | |
| Ac Cítrico (0,75 mmol) | | | | 7,5 | DE | |
| Ac Glucónico (2,22 mmol) | | | | | 7 | E |
| Ac Glucónico (0,75 mmol) | | | | | 6,5 | E |
| Ac Cítrico (0,26 mmol) | | | | | 5,9 | E |
| Testigo | | | | | | 3,1 |
| | | | | | | F |

Convenciones: Ac = ácido

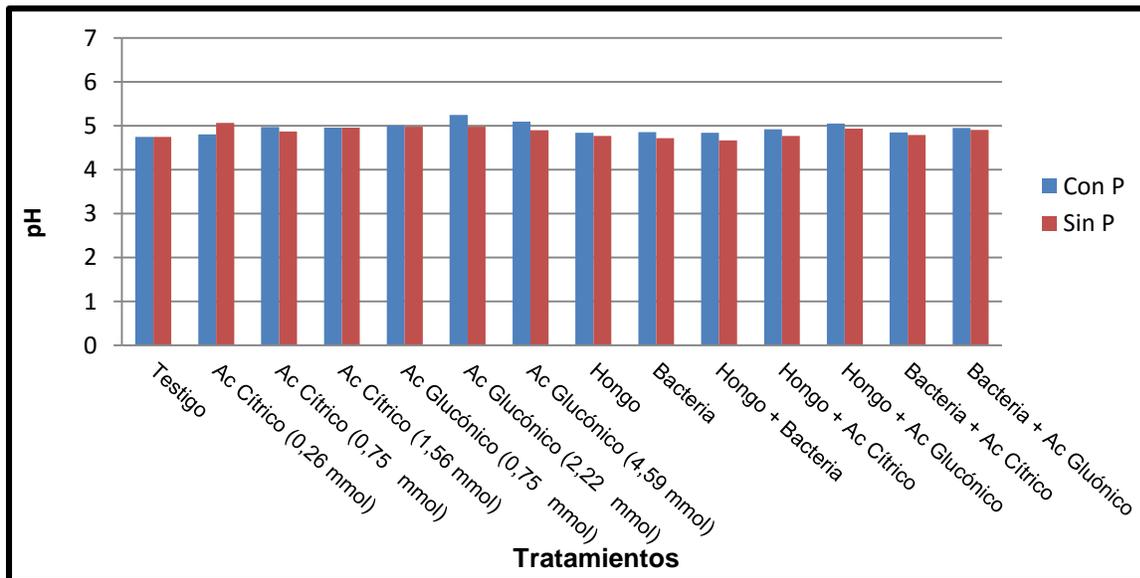
Fuente: Elaboración propia

En general, todos los tratamientos incrementaron la disponibilidad del fósforo en el suelo. *P. ochrochloron* y su interacción con los ácidos orgánicos a bajas concentraciones lograron aumentar 4 veces dicha variable. De tendencia similar a la anterior, se encuentra el cítrico y glucónico en sus concentraciones más altas.

• Estimación del pH en el suelo

Ninguno de los tratamientos modificó significativamente el pH original del suelo, evidenciándose al compararlo con el testigo (Figura 4-10)

Figura 4-10. Efecto de los tratamientos sobre el pH en el suelo



Fuente: Elaboración propia

• Estimación del peso fresco y seco

El efecto más notorio ocurrió en la interacción de los microorganismos con los dos ácidos a bajas concentraciones, en comparación con el testigo y el ácido glucónico aplicado individualmente en las tres concentraciones (Tabla 4-5).

Tabla 4-5. Agrupamiento de los tratamientos según el peso fresco y seco (mg) desarrollado por la plántula, utilizando la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$).

| Peso Fresco | | Peso Seco | |
|--------------------------|----------|--------------------------|----------|
| Tratamiento | Grupo | Tratamiento | Grupo |
| Hongo + Ac Glucónico | 22,6 A | Bacteria + Ac Glucónico | 1,3 A |
| Hongo + Ac Cítrico | 20,5 AB | Hongo + Ac Cítrico | 1,2 AB |
| Bacteria + Ac Glucónico | 18,7 ABC | Hongo + Ac Glucónico | 1,1 ABC |
| Ac Cítrico (1,56 mmol) | 17,8 ABC | Bacteria + Ac Cítrico | 1,0 ABCD |
| Hongo + Bacteria | 17,2 ABC | Ac Cítrico (1,56 mmol) | 1,0 ABCD |
| Hongo | 16,9 ABC | Ac Glucónico (4,59 mmol) | 1,0 ABCD |
| Bacteria + Ac Cítrico | 16,1 ABC | Hongo | 1,0 BCD |
| Ac Cítrico (0,75 mmol) | 13,9 BCD | Ac Glucónico (2,22 mmol) | 0,9 CDE |
| Bacteria | 13,9 BCD | Bacteria | 0,8 CDE |
| Ac Glucónico (0,75 mmol) | 12,4 CD | Hongo + Bacteria | 0,8 CDE |
| Ac Glucónico (4,59 mmol) | 12,3 CD | Ac Glucónico (0,75 mmol) | 0,8 CDE |
| Ac Cítrico (0,26 mmol) | 12,0 CD | Ac Cítrico (0,75 mmol) | 0,8 DE |
| Ac Glucónico (2,22 mmol) | 11,8 CD | Ac Cítrico (0,26 mmol) | 0,6 E |
| Testigo | 8,40 D | Testigo | 0,6 E |

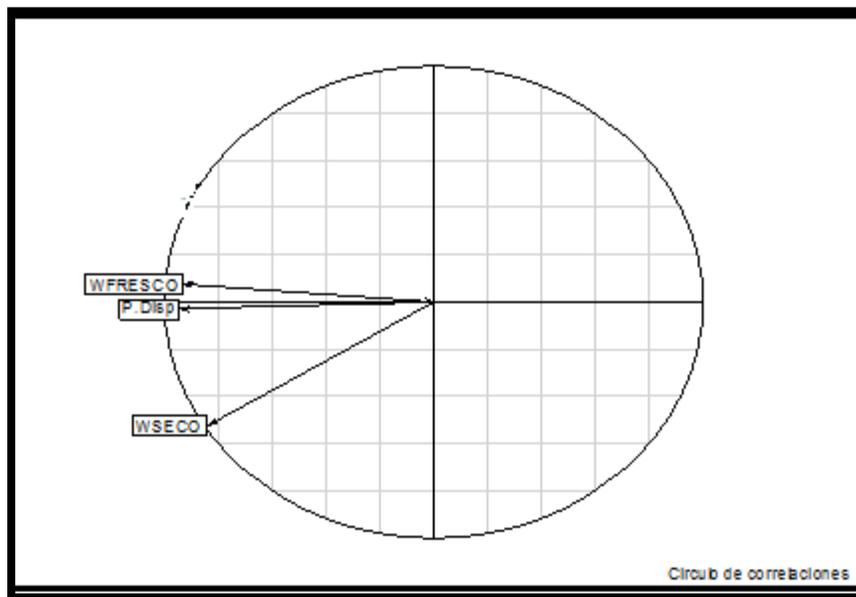
Fuente: Elaboración propia

• Análisis de variables

La gráfica de las variables (Figura 4-11) sobre el círculo de centro 0 y radio 1 formó un sólo grupo: peso seco (W Seco), peso fresco (W Fresco) y fósforo disponible (P disponible), indicando que todas las variables están relacionadas y por tanto, algunos tratamientos pueden explicar la variabilidad.

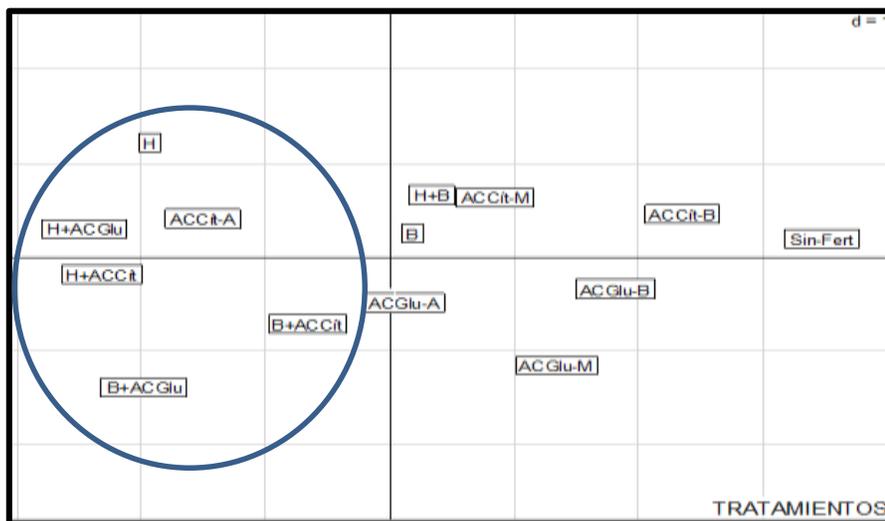
El hecho de que las variables estén muy cerca al borde del círculo muestran que están bien representadas por el plano formado sobre el eje X, lo que ayudó a identificar aquellos tratamientos que influyeron positivamente, evidenciándose en el análisis de nube de individuos (Figura 4-12) donde los tratamientos que mejor efecto presentaron sobre las variables determinadas son la interacción del hongo con los ácidos a bajas concentraciones, seguido por el hongo y ácido cítrico (concentración alta), luego, la bacteria + ácido glucónico (concentración baja) influyó mejor en el peso seco. Finalmente se estableció la bacteria + ácido cítrico (concentración baja)

Figura 4-11. Círculo de correlaciones de las variables determinadas en el ensayo



Fuente: Elaboración propia

Figura 4-12. Análisis de nube de individuos

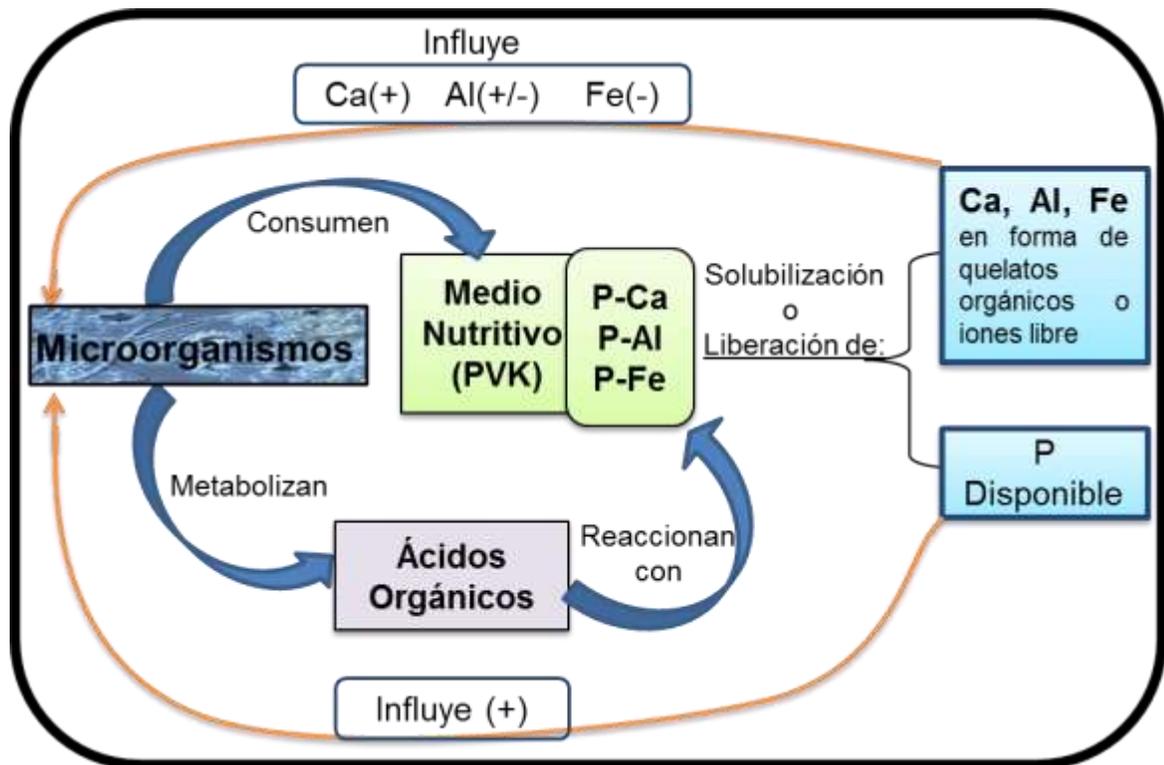


Fuente: Elaboración propia

5. Discusión

En esta investigación la correlación encontrada entre los ácidos totales y fósforo soluble (B. Anexo) se puede visualizar como una dinámica biotecnológica inducida por los tratamientos aplicados (Figura 5-1), que reproducen artificialmente “in vivo” algunos componentes de los ciclos biogeoquímicos que suceden cotidianamente en la naturaleza (Filippelli, 2002).

Figura 5-1. Dinámica biotecnológica de la solubilización de fosfatos “in vitro”,



Convenciones: El signo representa el efecto del ión solubilizado o disponible sobre el crecimiento microbiano: (+) efecto positivo, (+/-) que el efecto no es tan positivo o en algunos casos es negativo, y (-) efecto negativo

Fuente: Elaboración propia

La Figura 5-1 representa lo sucedido en el birreactor utilizado, donde la fuente de fosfato al solubilizarse puede estimular o inhibir la producción de ácidos orgánicos en los microorganismos, y estos ácidos influyen en la generación de fósforo disponible. Las Figuras 4-2, 4-3 y 4-5, fundamenta las anteriores afirmaciones. La fuente de fosfato que presentó mayor producción de ácidos orgánicos (P-Ca > P-Al > P-Fe) en presencia de actividad de los microorganismos estudiados, coincide con la producción de la mayor cantidad de fósforo soluble (Figura 4-6). Con respecto a lo anterior, se logró estructurar el proceso de solubilización en dos etapas que ocurren así:

- Crecimiento microbiano en fuentes de fosfatos insoluble de Ca, Al y Fe
- Mecanismo de solubilización de los ácidos orgánicos producidos por los microorganismos

5.1 Crecimiento microbiano en fuentes de fosfatos insoluble de Ca, Al y Fe

Para comprender el proceso de fermentación se partió del efecto que ejerció cada fuente de fosfato en el microorganismo. La primera fuente a analizar fue el fosfato tricálcico, donde los hongos como las bacterias lograron su mayor rendimiento en cuanto a la producción de ácidos (Figura 4-5) y crecimiento de la población (Figura 4-1). Este comportamiento está relacionado con lo señalado por Dominguez, (2004); Papagianni, (2004), He, Yang, & Stoffella., 2005, estableciendo que uno de los factores determinantes en la generación de metabolitos secundarios es el desarrollo de los microorganismos, el cual es influenciado por la presencia de ciertos elementos y/o compuestos.

5.1.1 Efecto de los compuestos generados en el proceso de solubilización sobre el crecimiento y producción de ácidos orgánicos en los microorganismos

En cuanto al crecimiento, los hongos desarrollaron la fase exponencial y no llegan a la fase de declive durante el periodo de fermentación en P-Ca, por el contrario, las bacterias lograron el doble de la población obtenida por los hongos entre los días 3 y 5, pero 4 de las 5 bacterias presentaron una disminución poblacional en el día 7, con excepción de la B3 que tardó casi 5 días en iniciar su germinación y sólo alcanzó la fase exponencial (Figura 4-1 a y c). Tendencias similares fueron encontraron Chen *et al.*, (2006); Khan *et*

al., (2009), quienes relacionan la efectividad de las bacterias en la producción de ácidos con el incremento poblacional en cortos periodos de vida. Por el contrario, los hongos presentan menores poblaciones pero perduran más en el tiempo, lo cual se refleja en su capacidad de producir más ácidos orgánicos y por lo tanto, de solubilizar más fósforo.

El estímulo en el crecimiento poblacional va acompañado con la liberación de las primeras trazas de ácidos que al reaccionar con la fuente de fosfato inician su solubilización. Según Papagianni, (2004) este fósforo soluble y otros nutrientes que quedan disponibles (como se verá más adelante), se convierten en fuente alimenticia para el microorganismo involucrado.

Madi *et al.*, (1997); Naveena *et al.*, (2011); Omoifo, (2013) mencionan que el calcio disponible induce desarrollo hifal, con un mejor desarrollo fungoso. En cuanto a las bacterias, Onoda *et al.*, (2000); Cooper, (2012) registraron que el contenido de calcio en las células bacterianas juega un rol importante en los ciclos de división celular, conllevando a un incremento poblacional, como es el caso *Escherichia coli* L-Form NC-7.

En presencia de P-Al la producción de ácidos orgánicos disminuyó en hongos y principalmente en bacterias (Figura 4-5). El efecto tóxico del Al solubilizado es invisible inicialmente y se apreció sólo a través del tiempo de incubación bacteriana, en la medida que se concentra en el medio de cultivo. Fransson *et al.*, (2004) sugirieron que las bacterias y las levaduras tienen la capacidad de tomar sales orgánicas de aluminio en unas cantidades muy pequeñas sin causar un efecto negativo. Mientras que Illmer & Erlebach, (2003) encontraron que cuando la concentración de aluminio superaba los 30 μM se apreciaba un efecto perjudicial sobre las bacterias del género *Arthrobacter sp.*

En el caso de los hongos, en P-Al, éstos crecieron en forma similar a como lo hicieron en P-Ca (Figura 4-1a). Diferentes autores han explicado este comportamiento por medio de un mecanismo interno de tolerancia en la pared celular, ya que ésta tiene la capacidad de adsorber el Al^{3+} mediante grupos funcionales como los hidroxilos, aminas y carboxilos, presentes en los polisacáridos (Chao *et al.*, 2013). También Piña & Cervantes, (1996); Baudoin *et al.*, (2008) mencionan que el almacenamiento se da en las vacuolas de la pared celular, con lo cual contrarrestan la toxicidad de este elemento.

A pesar de mantenerse la población, los ácidos disminuyeron en comparación con P-Ca. Madi *et al.*, (1997), Illmer & Buttner, (2006) han encontrado que en los hongos la poca disponibilidad del calcio en una fuente aluminica, estimula la producción de biomasa e inhibe la secreción de ácidos.

En fosfato de hierro la disminución de ácidos orgánicos afecta a los dos grupos microbianos (Figura 4-5). Este fenómeno en el caso de las bacterias, las cuales en general redujeron su tasa poblacional, ha sido atribuido a la presencia del Fe^{3+} como parte del FePO_4 . Chamnongpol *et al.*, (2002), sostiene que el hierro en este estado logra permeabilizar la membrana de la bacteria por la parte externa lo que conlleva a la lisis y muerte.

Por el contrario, en los hongos aunque fue mínima la formación de ácidos, las poblaciones crecieron, no obstante en menor proporción a P-Ca. El hierro en esta condición se encuentra en forma férrica, y de acuerdo a lo registrado por Philpott, (2006), en este estado de oxidación el elemento no es tomado, pues la pared celular de los hongos utiliza un sistema reductor que implica dos etapas. Primero, ocurre la reducción del hierro férrico (Fe^{3+}) a ferroso (Fe^{2+}) en la membrana plasmática por proteínas designadas FRE reductasas, y luego, es transportado al interior de la célula por la función de proteínas especializadas denominadas FIT. Al encontrarse hierro disponible dentro de la célula se incrementa la actividad metabólica aumentando la concentración de moléculas de ATP (Oexle *et al.*, 1999), y según Kristiansen *et al.*, (2002) el aumento de energía activa el crecimiento de la población que se torna filamentosa y afecta la producción de ácidos orgánicos.

Cuando la concentración intracelular del Fe^{2+} incrementa su efecto se vuelve tóxico, ya que reacciona con el oxígeno y genera radicales libre que llegan a atacar macromoléculas como el ADN conduciendo a la muerte celular (De Freitas & Meneghini., 2001), Apparently esto explica que los hongos H1, H2, H3 y H4 disminuyeran su población entre el quinto y séptimo día de la fermentación. El único hongo que no presenta este descenso es el H5, considerando que posiblemente posee un mayor número de proteínas hemo que almacenan el hierro intracelular (Philpott., 2006),

contrarrestando el efecto tóxico y presentando mayor tolerancia a altas concentraciones de hierro.

Los microorganismos se estimularon de manera diferente en presencia de P-Ca, P-Al y P-Fe, en donde los hongos H5 y en especial el H3 lograron solubilizar en diferente magnitud, las tres fuentes. Por el contrario, las bacterias sólo alcanzan un buen desempeño en P-Ca, en el que la B5 y B2 consiguieron los mejores resultados.

La capacidad solubilizadora de los microorganismos puede estar relacionada con el tipo de ácido que metabolizan, ya que la B5 produjo concentraciones significativas de glucónico en P-Ca, y el H3 cítrico en todos los medios (Figura 4-2), y es aquí, donde se hace importante dilucidar los mecanismos de solubilización de cada ácido orgánico, indicándose en la dinámica biotecnológica (Figura 5-1).

5.2 Mecanismo de solubilización de los ácidos orgánicos producidos por los microorganismos

Para entender la reacción que se presenta entre los ácidos orgánicos y las diferentes fuentes de fósforo evaluadas, se parte de las propiedades químicas que tiene cada uno de ellas. Una de estas propiedades es la estabilidad que presenta la molécula (Martí, 2002), la cual se define por la constante de formación (K_F) o constante de estabilidad (K_E). Entre mayor sea el valor de la constante más estable es la molécula (Tabla 5-1).

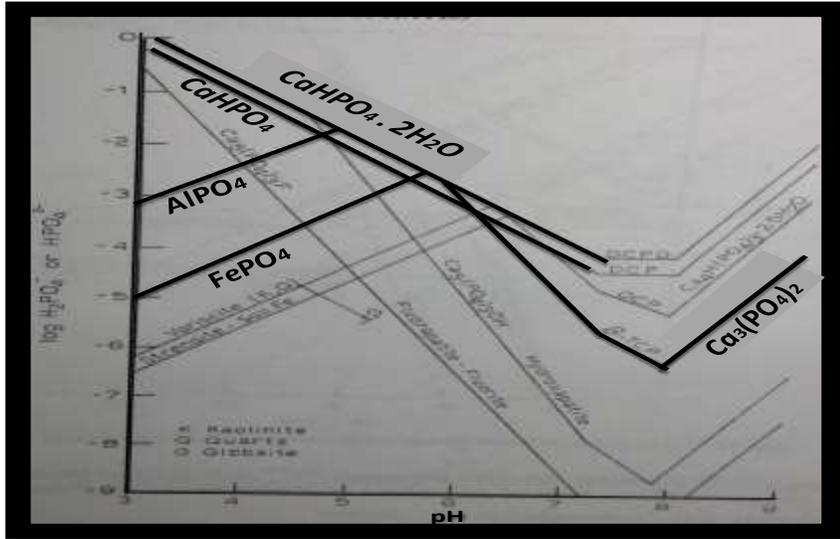
Tabla 5-1. Constante de estabilidad (K_E) de los fosfatos

| Fosfatos | K_E |
|---|-------|
| FePO ₄ | 26,4 |
| Ca ₃ (PO ₄) ₂ | 26.0 |
| AlPO ₄ | 18.0 |
| CaHPO ₄ | 15.1 |

Fuente: M. Aguilar *et al.*, (2014)

La estabilidad de los fosfatos depende del pH del medio (Figura 5-2), así, la alta estabilidad de los fosfatos de hierro y aluminio es a pH ácido y del fosfato de calcio a pH alcalino.

Figura 5-2. Efecto del pH sobre la solubilidad de los fosfatos



Fuente: Lindsay., (1979); Hinsinger., (2001)

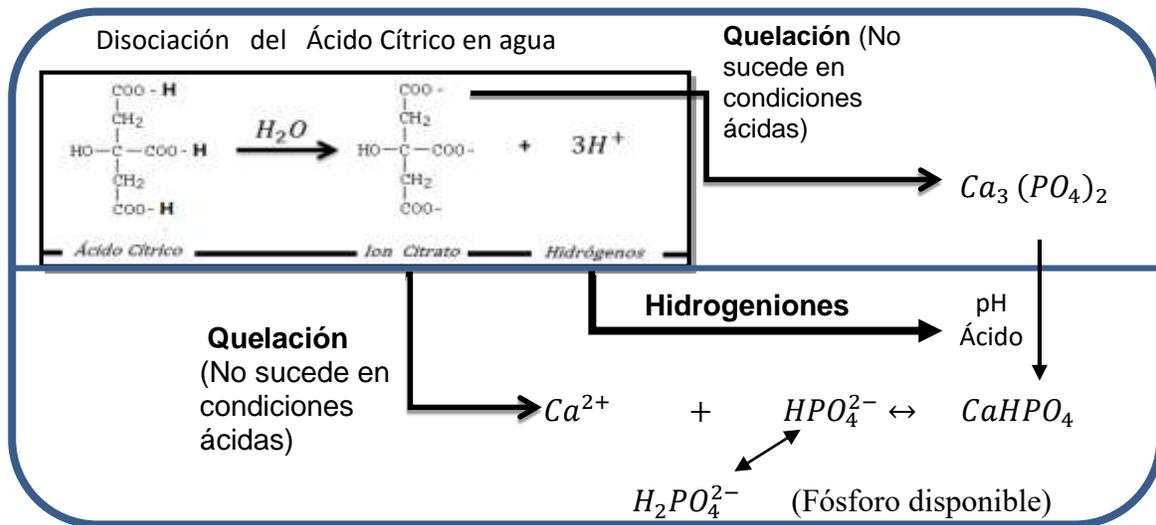
El fosfato de calcio a un pH de 8 presenta la más baja solubilidad pero a medida que el pH desciende, su solubilidad se incrementa (Johnsson & Nancollas., 1992; Tung., 2004). Este comportamiento se explica porque todos los fosfatos de calcio sufren cambios microestructurales en medio ácido (Greenfield and Eanes., 1972; Harries *et al.* 1987; Tamai and Nakahira, 2004; Combes and Rey, 2010; Salma *et al.*, 2010) y, con excepción de la apatita, todos convergen en una misma molécula de CaHPO_4 o $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, comportándose como un complejo de ortofosfatos con una constante de estabilidad de menor magnitud (Tabla 5-1) y por tanto, gran parte del compuesto se separa en sus iones en presencia de agua, de ahí, que la solubilidad aumenta casi 10000 veces en comparación con la de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Figura 5.2).

Teniendo en cuenta lo anterior, se comienza a dilucidar la reacción que ocurre entre los fosfatos y los ácidos, evidenciándose dos mecanismos de solubilización que han sido

nombrados ampliamente en la literatura como son: los hidrogeniones y la quelación (Mardad *et al.*, 2013).

Para el fosfato de calcio, el proceso de solubilización se desarrolla por el efecto de hidrogeniones (Figura 5-3), ya que cuando se disuelven los ácidos en agua se separa el anión de sus hidrógenos, como por ejemplo: una molécula de cítrico genera aproximadamente un ión citrato y 3 hidrógenos.

Figura 5-3. Mecanismo de solubilización de los ácidos orgánicos en fosfato de calcio



Fuente: Elaboración propia

Los hidrógenos al encontrarse libres en la solución disminuyen el pH y generan condiciones ácidas ($\text{pH} = -\text{Log} [\text{H}^+]$) (Chang., 2002). Luego, al adicionar el fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) bajo estas condiciones se transforma en fosfato monocálcico (CaHPO_4), y como esta molécula presenta una mayor solubilidad se disocia en el ión HPO_4^{2-} , que puede reaccionar con más hidrógenos del medio y formar H_2PO_4^- , siendo estas estructuras las formas de fósforo disponible en medio ácido.

Otro posible mecanismo que se puede presentar es el efecto de quelación del anión del ácido hacia el calcio (Bazin *et al.*, 1995), pero esta reacción es poco probable que suceda puesto que los ácidos orgánicos sólo forman complejos estables con el calcio en medios básicos (Tabla 5-2)

Por consiguiente, los altos rendimientos en solubilización logrados por los ácidos orgánicos en P-Ca, se deben a que todos proporcionaron hidrógenos al medio que le confirieron características ácidas (Tabla 4-3 y Figura 4-7).

Tabla 5-2. Constantes de estabilidad (K_E) de los complejos formados por los aniones orgánicos con diferentes metales en condiciones ácidas

| Complejos Orgánicos | | | |
|----------------------------|-------------------|--------|-------------------------|
| Anión | Al(III) | Ca(II) | Fe(III) |
| Citrato | 23,0 ⁱ | - a,h | 23.0 ^{i,e,f,b} |
| Gluconato | - d,f | - a,h | - c |
| Lactato | - h,g | - a,h | - h,g |
| Malato | - h,g | - a,h | - h,g |

Convenciones: - significa que no se forma el complejo o presentan constantes de estabilidad con valores muy bajos en condiciones ácidas

Fuente: Bazin et al., (1995^a); Pierre & Gautier-Luneau., (2000^b); Warwick et al., (2006^c); Lakatos et al., (2008^d); Silva et al., (2009^e); Pallagi et al., (2013^f); Crisponi et al., (2013^g); WALCO S.A., (n.d^h); M. Aguilar et al., (2014ⁱ)

En contraste, en los fosfatos de hierro y aluminio, en los cuales el principal mecanismo de solubilización es la quelación, ya que estos compuestos no sufren cambios microestructurales en medio ácido, puesto que su alta estabilidad sucede en estas condiciones. El $AlPO_4$ presenta la constante más baja (Tabla 5-1), que se refleja en mayor solubilidad (Figura 5-2), por lo que algunas moléculas alcanzan el equilibrio con su forma iónica (Ec 2).

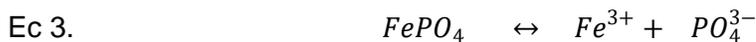


De acuerdo con el principio de Le Chatelier (Chang, 2002), para lograr que el equilibrio se desplace hacia la derecha y aumente la cantidad de iones de fosfato disponibles $PO_4^{3-} \leftrightarrow HPO_4^{2-} \leftrightarrow H_2PO_4^-$, el Al^{3+} debe ser secuestrado o retirado del medio, pero este metal al ser trivalente sólo forma compuestos estables con ligandos con mayor capacidad quelante (Crisponi et al., 2013).

Por ejemplo, los ácidos málico y láctico no cumplen estas especificaciones y son clasificados como débiles (WALCO S.A., n.d), el glucónico puede quelatar el aluminio (Lakatos *et al.*, 2008), pero sólo forma complejos estables a pH alcalinos debido a que en estas condiciones los grupos hidroxilos del ácido se protonan y aumentan la capacidad de capturar este tipo de cationes (Lucena *et al.*, 2010).

En el ácido cítrico la presencia de mayor número de grupo donadores de electrones o grupos carboxílicos le confieren mayor capacidad quelante (Kuan *et al.*, 2005), formando con el aluminio en medio ácido, una sal más estable que la del fosfato (Tabla 5-1 y 5-2), conllevando a que el equilibrio en la ecuación 2 se desplace hacia la derecha y genere mayor fósforo disponible, como se observa en la Figura 4-7.

Finalmente, el $FePO_4$ presenta la K_E más alta, por consiguiente, son muy pocas las moléculas que en un momento dado del equilibrio pueden encontrarse como iones (Ec 3), y por las misma características que en el aluminio sólo el cítrico puede quelatar el catión, generando una sal con una constante de estabilidad similar a la del fosfato de hierro (Tabla 5-1 y 5-2).



En consecuencia, el equilibrio de la reacción depende de la fuerza iónica del quelato o su concentración (Silva *et al.*, 2009). Por ello, un pequeño aumento en la concentración del ión fosfato favorecerá la formación de $FePO_4$. Por lo anterior, el ácido cítrico en presencia de esta fuente generó poco fósforo disponible (Figura 4-7).

Sin embargo, el único ácido de los evaluados que logró solubilizar las tres fuentes de fosfato fue el cítrico, con una correlación significativa con el fósforo disponible (B. Anexo). El hongo H3: *Penicillium ochrochloron*, produjo ácido cítrico en estas fuentes (Figura 4-2), y, también, la mayor solubilización del fósforo.

Por el contrario, las bacterias solubilizaron especialmente fosfato de calcio (Figura 4-6, Tabla 4-2) y el ácido glucónico fue el encargado de este proceso, como en el caso de B5 *Kocuria sp* (Figura 4-2).

5.3 Microorganismos más eficientes en el proceso de solubilización de fosfato

El género *Penicillium* ha sido catalogado ampliamente como solubilizador de fosfato (Whitelaw, 2000), encontrándose registros desde 1965 (Picci, 1965). Resultados similares a los establecidos en esta investigación los han registrado Pradhan & Sukla, (2009); Coutinho *et al.*, (2012) quienes han encontrado que *P. ochrochloron*, produce preferiblemente ácido cítrico y málico, aunque mencionan que la producción se incrementa cuando la cepa se encuentra en ausencia de fosfato y en pH cercano a 7.

Por otra parte Sharma, (2011), determinó que diferentes cepas de *Penicillium*, aisladas de los terrenos montañosos de Pachmarhi (India) tienen la capacidad de generar fósforo disponible y a su vez, aprovechar parte del fósforo para su crecimiento.

Whitelaw *et al.*, (1999) registraron que *P. radicum.*, metabolizaba solamente ácido glucónico y fue muy eficiente cuando el medio contenía fosfato de calcio, decaía su actividad en fosfato de aluminio, y, en fosfato de hierro, no tenía ningún efecto.

En cuanto a *Kocuria sp.*, está registrada como productora del ácido indolacético a partir del nitrógeno de la materia orgánica, y por tanto, dentro de las bacterias promotoras de crecimiento, al sumar a este efecto estimulante, la solubilización de fosfato (Godinho *et al.*, 2010; Goswami *et al.*, 2014).

Kocuria spp toleran altas concentraciones salinas, pertenece al phylum de Actinobacterias, y han sido aisladas de diferentes sitios como el aire, mamíferos muertos, mariscos fermentados, suelo, agua dulce y del mar, sedimentos marinos y de suelos del desierto (Bala *et al.*, 2012).

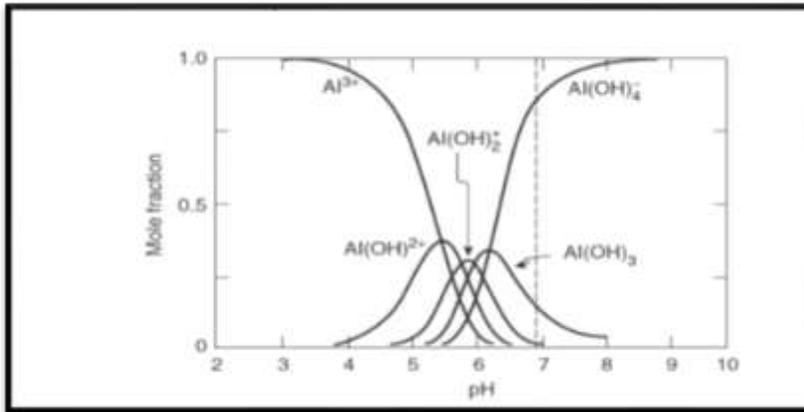
Dastager & Damare, (2013) aislaron un grupo de actinobacterias de la zona costera de la isla de Chora en India: *Streptomyces*, *Microbacterium*, *Angustibacter*, *Isoptericola* y

Agromyces, y *Kocuria*, todas con capacidad de solubilizar fosfato y la más alta eficiencia la presentó *Kocuria spp.* Estos mismos autores mencionan que el mecanismo de solubilización fue mediante producción de ácidos orgánicos aunque no especifican cuáles.

5.4 Efecto del hongo, bacteria y ácidos orgánicos, en la emergencia de semillas de *L. sativa* y en su crecimiento inicial

La característica ácida del suelo proporcionó condiciones desfavorables para el crecimiento de *L. sativa*, la cual es altamente sensible a $\text{pH} < 6.8$ (Rincón, 2005). Se ha establecido que la lechuga en condiciones de pH entre 5.5 y 4.25 decrece el tamaño de la raíz pero incrementa los pelos radicales laterales favoreciendo la emergencia del Hipocótilo, beneficiando la absorción de agua y nutrientes (Inoue *et al.*, 2000; Takahashi, 2012). A pesar de estas estrategias, las plántulas se ven afectadas en su desarrollo.

Los factores negativos asociados a esta acidez se reflejan en disminución de la disponibilidad de nutrientes primarios como el calcio, magnesio, potasio y fósforo, y a su vez, la proliferación de elementos tóxicos para la planta como el aluminio y manganeso (Konno *et al.*, 2003). El análisis químico del suelo bajo estudio (Tabla 3-5), mostró un $\text{pH} < 5$, aluminio intercambiable $> 0.5 \text{ cmol/Kg}$ y la suma de bases (Ca, Mg y K) $< 5 \text{ cmol/Kg}$. De acuerdo con lo establecido por Kamprath *et al.*, (1973) y Barker & Pilbeam, (2014), confluyen en este suelo condiciones para causar efectos nocivos para el desarrollo de las plantas, especialmente el Al, ya que a un pH por debajo de 6 presenta la forma química: Al^{3+} (Figura 5-4), la más tóxica, ya que puede ser absorbido a través de los canales del calcio, también se encuentra la presencia de los iones de hidroxil aluminio (AlOH^{2+} y Al(OH)_2^+) presentando un efecto menos perjudicial, pero estos cationes pueden estar interrelacionados a través de los rangos de pH (Takahashi, 2012; Barker & Pilbeam, 2014)

Figura 5-4. Efecto del pH sobre las formas del aluminio en solución

Fuente: Barker & Pilbeam, (2014)

Ortiz *et al.*, 2004, encontró que en andisoles de la zona cafetera donde el aluminio intercambiable es mayor a 1,5 cmol/kg y el pH oscila entre 4.9 y 5.6, la cantidad de aluminio en la solución del suelo era muy baja, por lo que no representa niveles tóxicos para el desarrollo del cultivo del café. Por el contrario, el suelo donde se llevó a cabo esta investigación presenta una concentración de aluminio intercambiable casi tres veces menor (0.64 cmol/kg), clasificado por Bravo *et al.*, (2007) como de saturación medía, y un pH de características más ácidas (4.48), indicando que la concentración del aluminio en la solución del suelo puede presentarse en niveles tóxicos, y como sugiere Du *et al.*, (2009) los efectos nocivos se evidencian en concentraciones del orden de micromolares, donde Takahashi (2012) estableció que una concentración de 100 μM de Al^{3+} tiene impacto negativo sobre el rendimiento de la cosecha.

Los efectos negativos causados por el Al^{3+} se evidenciaron (Figura 4-9) en inhibición de la elongación de la raíz, inhibición en la formación de las raíces laterales, aumento en el diámetro de la raíz primaria, interrupción del proceso de la cofia, formación de encallado y disminución de la división celular (Čiamporová, 2002)

Estos disturbios, según Barker & Pilbeam, (2014) ocasionan disfunciones en la toma de nutrientes y agua, con la consecuente reducción de la biomasa de la raíz y la longitud de todo el brote, que se manifiestan en bajos peso fresco y seco (Tabla 4-5).

El tratamiento con ácido cítrico en su concentración mayor, favoreció la elongación de la raíz, disminuyendo la formación de encallados y por tanto, beneficiando la toma de agua y minerales por parte de la plántula. El efecto positivo está relacionado con la capacidad que tiene el ácido de formar complejos estables con el aluminio (Tabla 5-2) en condiciones acidas (Furukawa *et al.*, 2007), reduciendo la toxicidad del suelo, debido a que el aluminio en este estado no logra pasar a través de la membrana plasmática o no es absorbido por la raíz (Kochian *et al.*, 2004; Takahashi, 2012).

Kochian *et al.*, 2005 lograron determinar el aumento en la concentración del ion citrato en células de la raíz expuestas a altas concentraciones de aluminio, aunque son muy pocas las que logran desarrollar esta estrategia como es el maíz y el trigo, y en otras como el tabaco se ha recurrido a la transgénesis (Ma, Ryan, & Delhaize, 2001). Otro de los efectos positivos del ácido cítrico es el aumento en el fósforo disponible (Tabla 4-4) y según Furukawa *et al.*, (2007) el incremento beneficia el desarrollo de la plántula.

Penicillium ochrochloron al producir ácido cítrico favorece el desarrollo de la raíz y el crecimiento de las plántulas de lechuga. Zhang *et al.*,(2002); Deng *et al.*,(2014) han registrado este género como tolerantes al aluminio y además, bajo estas circunstancias con capacidad de producir ácido cítrico (Ghorbani, Oliazadeh, & Shahverdi, 2009), como se encontró en esta investigación.

Kocuria sp., cuando se inoculó sola no incrementó el desarrollo de la *L. sativa*, pero al combinarse con los ácidos su efecto se vuelve positivo, lo cual se podría explicar con base en:

- a) los ácidos al quelatar los cationes lograron reducir la concentración de Al^{3+} y el estrés osmótico, beneficiando el crecimiento bacteriano, pero, la hipótesis no es muy viable en este caso, ya que el ácido cítrico tiene mayor capacidad de quelatar el aluminio (Furukawa *et al.*, 2007) y por tanto, el efecto debe ser mayor lo cual no concuerda con los resultados, en donde los dos tratamientos no tuvo diferencias significativas en el análisis de varianza
- b) Los ácidos al ser aplicados en el suelo afectaron el pH, pero, los resultados expuestos en Figura 4-10 sugieren que la capacidad buffer del suelo permitió que el pH no fuera alterado por ningún tratamiento.

- c) El efecto más probable es que los ácidos sirven de fuente de carbono a la bacteria, porque que según Baetz & Martinoia, (2014); de Werra *et al.*, (2009) estos microorganismos tienen la capacidad de consumirlos e incrementa el crecimiento de la población y su desempeño metabólico.

Kamilova *et al.*,(2006) estableció que los cationes de aluminio estimulan la raíz del pepino, tomate y pimienta, a producir fuentes de carbono que contiene más ácidos orgánicos que azúcares, y que el principal ácido es el cítrico, además, relacionó el efecto ejercido por la fuente de carbono con el crecimiento de las bacterias rizosféricas del género *Pseudomonas*, incrementándose en 10 veces la población, y resaltando la importancia de los ácidos orgánicos como fuentes de carbono.

El Análisis de componentes principales (Figura 4-12) indicó que la bacteria en combinación con el ácido glucónico presentó un mejor desempeño que con el cítrico, y esta tendencia puede deberse a dos factores:

Primero, que la concentración del glucónico es dos veces mayor a la del cítrico por lo que la cantidad de carbono disponible es de igual magnitud, teniendo en cuenta que las dos moléculas tienen pesos moleculares similares (Cítrico: 192.12 g/mol, glucónico: 196.16 g/mol).

Segundo, los ácidos al entrar en contacto con el suelo reaccionan con los cationes, formando principalmente sales con el aluminio. Sin embargo, el gluconato de aluminio al presentar baja estabilidad en pH ácidos puede desplazarse en el equilibrio hacia el ácido glucónico, mientras que el citrato de aluminio que tiene la constantes de estabilidad de mayor magnitud (Tabla 5-2) prevalece como sal, y de acuerdo con lo relacionado por Fransson *et al.*, (2004) las bacterias consumen preferiblemente el ácido que su sal.

Por consiguiente, la bacteria en combinación con el glucónico estimuló una mayor longitud en la raíz de la *L. sativa* que con el cítrico (Figura 4-9), permitiéndole acceder a una mayor superficie en el suelo para adquirir minerales y agua.

Algo similar puede pasar con los tratamientos que implicaron la interacción entre el hongo y los ácidos orgánicos, que exhibieron un efecto positivo, en donde una de las posibles causas es la disposición de los ácidos como nutriente, ya que según lo mencionado por Gallmetzer *et al.*, (1998) el *Penicillium simplicissimum.*, al no tener fuente de carbono puede consumir el cítrico y glucónico, pero esta causa carece de soporte, debido a que el hongo cuando interactuó solo logró incrementar significativamente las variables de crecimiento en la plántula (Tabla 4-5), sugiriendo que el *Penicillium* adquirió los nutrientes necesarios para su desarrollo, sin acudir a estos ácidos.

A pesar de que el análisis de componente principal y la prueba de Duncan no exhibe diferencias significativas entre los tratamientos que involucran el hongo, el desarrollo morfológico de la raíz en las plántulas establece variaciones notables (Figura 4-9), puesto que cuando el hongo actúo sólo, incrementó la longitud de la raíz, pero cuando se combinó con los ácidos orgánicos incrementó la longitud y además, generó el desarrollo de las pelos radicales, donde el tratamiento que implicó el ácido cítrico presentó un mayor estímulo.

La hipótesis que más se relaciona con estos tratamientos es la mencionada por Wang *et al.* (2013), quienes investigaron los efectos que puede generar el aluminio en la levadura *Rhodotorula taiwanensis.*, a pesar de presentar al igual que el *Penicillium ochrochloron.*, tolerancia al catión, estableciendo que cuando la concentración del aluminio comienza a incrementar dentro del microorganismo se evidencia la disminución de ciertas proteínas o enzimas vitales en el metabolismo, afectando su crecimiento.

Lo anterior permite entender el posible efecto ejercido por la interacción entre el hongo y los ácidos, ya que al aplicar los ácidos se reduce la concentración del aluminio por la quelación, desplegando un mayor alcance el cítrico, luego, el *Penicillium ochrochloron.*, al encontrarse expuesto a menos concentración del catión desarrolla un mejor desempeño metabólico, y según Gallmetzer & Burgstaller, (2001); Pines *et al.*, (1997) cuando el microorganismo presenta un mejor aprovechamiento de los nutrientes debido al incremento de su actividad metabólica, éste consigue aumentar la producción de metabolitos secundarios como el citrato y a su vez, la energía generada en este proceso sirve para promover el paso de las moléculas a través de la membrana.

Ocasiona finalmente, un mayor flujo de ácidos orgánicos hacia el exterior los cuales reducen la toxicidad causada por el aluminio presente en el suelo, e incrementan el fósforo disponible (Tabla 4-4), conllevando a un mejor desarrollo de las raíces como el evidenciado en el tratamiento hongo + cítrico.

En la prueba de invernadero, entre los tratamientos que presentaron un efecto significativo se observó que algunos estimularon el desarrollo en la raíz de *L. sativa*, y aún así, no se logran diferencias estadísticas en cuanto al peso fresco y seco. Lo anterior, se debe a que la prueba se desarrolló por 30 días que corresponde a la fase inicial del cultivo (germinación y la primera etapa vegetativa), pero *L. sativa* absorbe la mayor cantidad de minerales del suelo después de este periodo, según lo establecido por Rincón, (2005). Por tanto, es posible, que, si el ensayo se hubiera prolongado por un mayor espacio de tiempo posiblemente, los tratamientos hongo + glucónico y en especial hongo + cítrico hubieran logrado una mayor diferencia en cuanto al crecimiento.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

- Esta investigación permitió comprender que el crecimiento poblacional de las bacterias y hongos estudiados está altamente relacionado con la producción de ácidos orgánicos y la actividad solubilizadora que realizan. Los ácidos secretados al dejar el P disponible en el medio, permiten que estos microorganismos lo aprovechen para su metabolismo, al igual que los cationes liberados y las condiciones ambientales que se propician.
- Los microorganismos evaluados variaron en su capacidad para producir diferentes ácidos orgánicos, entre ellos, ácido cítrico, glucónico e isómeros de málico y láctico. Aquellos encontradas con más frecuencia fueron: cítrico y glucónico
- El ácido cítrico fue el de mayor rendimiento solubilizador en las tres fuentes de fosfato analizadas: fosfato de Ca, Al y Fe. Además reúne otras cualidades que favorecen la nutrición vegetal, como su poder quelante.
- *Penicillium ochrochloron.*, presentó la mayor eficiencia solubilizadora en las tres fuentes de P evaluadas. Esta especie fúngica al ser aplicada a semillas de *L. sativa* sembradas en un *Typic Melanudand*, en mezcla con ácido cítrico en baja concentración, estimuló el crecimiento de la raíz y de pelos radicales.

6.2 Recomendaciones

- Cuando se implementa como metodología la técnica de HPLC para evaluar los ácidos orgánicos en la fermentación, se debe, tener en cuenta diluir la muestra con fase móvil o H₂SO₄ 0.0025M antes de centrifugar y filtrar, con el fin de disolver los quelatos o sales formados, para así poder realizar una estimación más precisa de los ácidos producidos por los microorganismos.
- Los suelos con características ácidas y que poseen aluminio disponible en concentraciones perjudiciales para las plantas, suelen presentar complicaciones agronómicas. Por tal motivo, es recomendable evaluar la implementación en campo del *Penicillium ochrochloron.*, como alternativa biológica para corregir dichas condiciones adversas, teniendo en cuenta el efecto positivo que puede presentar la interacción del hongo con el ácido cítrico a bajas concentraciones.

Anexos

A. Anexo: Coeficiente de variación (CV) de cada uno de los ácidos orgánicos metabolizados por los microorganismos en cada una de las fuentes de fosfato

| Fuente | Ácidos | | | | | |
|---|---------|-----------|----------|-----------|-----------|----------|
| | Cítrico | Glucónico | D-Málico | D-Láctico | L-Láctico | L-Málico |
| AlPO ₄ | 107,73 | 121,5 | 361,21 | 229,98 | 226,3 | 108,21 |
| Ca ₃ (PO ₄) ₂ | 80,18 | 175,65 | 80,66 | 321,48 | 314,2 | 129,37 |
| FePO ₄ | 387,5 | 113,81 | 248,03 | 346,27 | 142,58 | 150,82 |

B. Anexo: Coeficientes de correlación de Pearson entre los ácidos orgánicos y el fósforo soluble generados durante la fermentación en cada una de las fuentes de fosfato

| Ácidos orgánicos | Fuente | | |
|------------------|-------------------|---|-------------------|
| | AlPO ₄ | Ca ₃ (PO ₄) ₂ | FePO ₄ |
| Cítrico | 0,58 | 0,53 | 0,5 |
| | 0,15 | 0,003 | 0,11 |
| Glucónico | -0,39 | -0,18 | 0,32 |
| | 0,03 | 0,34 | 0,009 |
| D-Málico | 0,22 | -0,68 | 0,18 |
| | 0,24 | 0,72 | 0,35 |
| D-Láctico | 0,17 | 0,21 | -0,083 |
| | 0,37 | 0,25 | 0,66 |
| L-Láctico | 0,2 | 0,22 | 0,048 |
| | 0,28 | 0,25 | 0,8 |
| L-Málico | 0,29 | 0,44 | 0,28 |
| | 0,16 | 0,015 | 0,04 |
| Ac. Total | 0,67 | 0,63 | 0,63 |
| | <.0001 | 0,03 | 0,0008 |

C. Anexo: Mecanismo utilizado para determinar la acidez total producida por los hongos en fosfato de aluminio

| P-AI | | | | | | | | | |
|----------|------------------|---------|-----------|----------|-----------|-----------|----------|---------|-----------------|
| H1 (ppm) | | | | | | | | | |
| Unidades | ácidos Orgánicos | | | | | | | | Fósforo soluble |
| | OXALICO | CITRICO | GLUCONICO | D-MALICO | D-LACTICO | L-LACTICO | L-MALICO | ACETICO | |
| ppm | 0,00 | 0,00 | 353,03 | 10,72 | 0,00 | 95,95 | 14,55 | 0,00 | 15,59 |
| meq/L | 0,00 | 0,00 | 1,80 | 0,16 | 0,00 | 1,07 | 0,22 | 0,00 | 1,92 |
| Total p | 3,24 | | | | | | | | 1,92 |
| Total | 5,16 | | | | | | | | |

| H2 (ppm) | | | | | | | | | |
|----------|------------------|---------|-----------|----------|-----------|-----------|----------|---------|-----------------|
| Unidades | ácidos Orgánicos | | | | | | | | Fósforo soluble |
| | OXALICO | CITRICO | GLUCONICO | D-MALICO | D-LACTICO | L-LACTICO | L-MALICO | ACETICO | |
| ppm | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 45,55 | 0,00 | 20,27 |
| meq/L | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,68 | 0,00 | 2,49 |
| Total p | 0,68 | | | | | | | | 2,49 |
| Total | 3,17 | | | | | | | | |

| H3 (ppm) | | | | | | | | | |
|----------|------------------|---------|-----------|----------|-----------|-----------|----------|---------|-----------------|
| Unidades | ácidos Orgánicos | | | | | | | | Fósforo soluble |
| | OXALICO | CITRICO | GLUCONICO | D-MALICO | D-LACTICO | L-LACTICO | L-MALICO | ACETICO | |
| ppm | 0,00 | 172,71 | 24,05 | 91,03 | 20,39 | 360,55 | 0,00 | 0,00 | 22,28 |
| meq/L | 0,00 | 2,70 | 0,12 | 1,36 | 0,23 | 4,00 | 0,00 | 0,00 | 2,74 |
| Total p | 8,41 | | | | | | | | 2,74 |
| Total | 11,15 | | | | | | | | |

| H4 (ppm) | | | | | | | | | |
|----------|------------------|---------|-----------|----------|-----------|-----------|----------|---------|-----------------|
| Unidades | ácidos Orgánicos | | | | | | | | Fósforo soluble |
| | OXALICO | CITRICO | GLUCONICO | D-MALICO | D-LACTICO | L-LACTICO | L-MALICO | ACETICO | |
| ppm | 0,00 | 0,00 | 173,29 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 22,07 | 0,00 | 17,57 |
| meq/L | 0,00 | 0,00 | 0,88 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,33 | 0,00 | 2,16 |
| Total p | 1,21 | | | | | | | | 2,16 |
| Total | 3,37 | | | | | | | | |

| H5 (ppm) | | | | | | | | | |
|----------|------------------|---------|-----------|----------|-----------|-----------|----------|---------|-----------------|
| Unidades | ácidos Orgánicos | | | | | | | | Fósforo soluble |
| | OXALICO | CITRICO | GLUCONICO | D-MALICO | D-LACTICO | L-LACTICO | L-MALICO | ACETICO | |
| ppm | 0,00 | 116,42 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 397,29 | 0,00 | 28,38 |
| meq/L | 0,00 | 1,82 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 5,93 | 0,00 | 3,49 |
| Total p | 7,74 | | | | | | | | 3,49 |
| Total | 11,24 | | | | | | | | |

Convención: Los ácidos cuantificados por HPLC y el fósforo soluble se encuentran en mg/L, luego de convertirlos a meq/L siendo igual a hidrógenos/L

D. Anexo: ANDEVA realizado a los ácidos totales generado por los microorganismos durante la fermentación en cada una de las fuentes de fosfato

| Fosfato de Aluminio | | | | | | |
|---------------------|----|-------------------|----------------------|---------|--------|----------------|
| Fuente de variación | GL | Suma de cuadrados | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F | R ² |
| Modelo | 9 | 332,12 | 36,9 | 5,81 | 0,0005 | 0,72 |
| Error | 20 | 126,95 | 6,35 | | | |
| Total corregido | 29 | 459,07 | | | | |

| Fosfato de Calcio | | | | | | |
|---------------------|----|-------------------|----------------------|---------|---------|----------------|
| Fuente de variación | GL | Suma de cuadrados | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F | R ² |
| Modelo | 9 | 2959,57 | 328,84 | 43,79 | <0,0001 | 0,95 |
| Error | 20 | 150,18 | 7,51 | | | |
| Total corregido | 29 | 3109,75 | | | | |

| Fosfato de Hierro | | | | | | |
|---------------------|----|-------------------|----------------------|---------|--------|----------------|
| Fuente de variación | GL | Suma de cuadrados | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F | R ² |
| Modelo | 9 | 71,39 | 7,93 | 5,6 | 0,0007 | 0,72 |
| Error | 20 | 28,31 | 1,42 | | | |
| Total corregido | 29 | 99,7 | | | | |

E. Anexo: ANDEVA realizado al fósforo soluble generado por los microorganismos durante la fermentación

| Fósforo soluble | | | | | | | |
|---------------------|----|-------------------|----------------------|---------|---------|----------------|---------------------------|
| Fuente de variación | GL | Suma de cuadrados | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F | R ² | Coefficiente de variación |
| Modelo | 29 | 49247,70 | 1698,20 | 486,10 | <0,0001 | 0,996 | 6,67 |
| Error | 60 | 209,61 | 3,49 | | | | |
| Total corregido | 89 | 49457,31 | | | | | |
| Microorg | 9 | 5482,65 | 609,18 | 174,38 | <0,0001 | | |
| FUENTE | 2 | 41607,66 | 20803,83 | 5955,01 | <0,0001 | | |
| Microorg*FUENTE | 18 | 2157,39 | 119,86 | 34,31 | <0,0001 | | |

F. Anexo: ANDEVA realizado al fósforo soluble generado en la reacción de los fosfatos con los ácidos puros

Fosfato de Calcio

| Fuente de variación | GL | Suma de cuadrados | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F | R ² | Coefficiente de variación |
|---------------------|----|-------------------|----------------------|---------|---------|----------------|---------------------------|
| Modelo | 3 | 45,61 | 15,20 | 608,12 | <0,0001 | 0,996 | 0,23 |
| Error | 8 | 0,20 | 0,03 | | | | |
| Total corregido | 11 | 45,81 | | | | | |
| Tratamiento | 3 | 45,61 | 15,20 | 608,12 | <0,0001 | | |

Fosfato de Aluminio

| Fuente de variación | GL | Suma de cuadrados | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F | R ² | Coefficiente de variación |
|---------------------|----|-------------------|----------------------|---------|---------|----------------|---------------------------|
| Modelo | 3 | 1398,49 | 466,16 | 4906,97 | <0,0001 | 0,999 | 1,90 |
| Error | 8 | 0,76 | 0,10 | | | | |
| Total corregido | 11 | 1399,25 | | | | | |
| Tratamiento | 3 | 1398,49 | 466,16 | 4906,97 | <0,0001 | | |

Fosfato de Hierro

| Fuente de variación | GL | Suma de cuadrados | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F | R ² | Coefficiente de variación |
|---------------------|----|-------------------|----------------------|---------|---------|----------------|---------------------------|
| Modelo | 3 | 43,74 | 14,58 | 648,04 | <0,0001 | 0,996 | 3,82 |
| Error | 8 | 0,18 | 0,02 | | | | |
| Total corregido | 11 | 43,92 | | | | | |
| Tratamiento | 3 | 43,74 | 14,58 | 648,04 | <0,0001 | | |

Convención: Los tratamientos corresponden a el ácido cítrico, glucónico, málico y láctico

G. Anexo: ANDEVA para el efecto de los tratamientos sobre el fósforo disponible en el suelo y las variables de crecimiento de la *L sativa*

Fósforo Disponible

| Fuente de variación | GL | Suma de cuadrados | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F | R ² | Coefficiente de variación |
|---------------------|----|-------------------|----------------------|---------|---------|----------------|---------------------------|
| Modelo | 29 | 718,12 | 24,76 | 17,73 | <0,0001 | | |
| Error | 26 | 36,30 | 1,40 | | | | |
| Total corregido | 55 | 754,43 | | | | | |
| Fuente | 1 | 0,30 | 0,30 | 0,21 | 0,6477 | 0,952 | 11,28 |
| Tratamiento | 13 | 573,93 | 44,15 | 31,62 | <0,0001 | | |
| Fuente * | 13 | 137,06 | 10,54 | 7,55 | <0,0001 | | |
| Tratamiento | | | | | | | |

Área Foliar

| Fuente de variación | GL | Suma de cuadrados | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F | R ² | Coefficiente de variación |
|---------------------|----|-------------------|----------------------|---------|--------|----------------|---------------------------|
| Modelo | 33 | 1,7108 | 0,0518 | 1,1300 | 0,3615 | | |
| Error | 33 | 1,5107 | 0,0458 | | | | |
| Total corregido | 66 | 3,2215 | | | | | |
| Fuente | 1 | 0,0123 | 0,0123 | 0,2700 | 0,6074 | 0,531 | 32,95 |
| Tratamiento | 13 | 1,1193 | 0,0861 | 1,8800 | 0,0709 | | |
| Fuente * | 13 | 0,5050 | 0,0388 | 0,8500 | 0,6096 | | |
| Tratamiento | | | | | | | |

Peso Fresco

| Fuente de variación | GL | Suma de cuadrados | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F | R ² | Coefficiente de variación |
|---------------------|----|-------------------|----------------------|---------|--------|----------------|---------------------------|
| Modelo | 33 | 0,001457 | 0,000044 | 2,0200 | 0,0237 | | |
| Error | 33 | 0,000722 | 0,000022 | | | | |
| Total corregido | 66 | 0,002179 | | | | | |
| Fuente | 1 | 0,000015 | 0,000015 | 0,6900 | 0,4127 | 0,669 | 29,27 |
| Tratamiento | 13 | 0,000914 | 0,000070 | 3,2200 | 0,0033 | | |
| Fuente * | 13 | 0,000499 | 0,000038 | 1,7600 | 0,0947 | | |
| Tratamiento | | | | | | | |

Peso Seco

| Fuente de variación | GL | Suma de cuadrados | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F | R² | Coefficiente de variación |
|----------------------------|-----------|--------------------------|-----------------------------|----------------|------------------|----------------------|----------------------------------|
| Modelo | 33 | 3,131 x E-6 | 9,489 x E-8 | 2,57 | 0,0041 | | |
| Error | 33 | 1,218 x E-6 | 3,692 x E-8 | | | | |
| Total corregido | 66 | 4,349 x E-6 | | | | 0,720 | 19,24 |
| Fuente | 1 | 5,773 x E-9 | 5,773 x E-9 | 0,16 | 0,6951 | | |
| Tratamiento | 13 | 2,319 x E-6 | 1,784 x E-7 | 4,83 | 0,0001 | | |
| Fuente Tratamiento * | 13 | 3,184 x E-7 | 2,449 x E-8 | 0,66 | 0,7825 | | |

Bibliografía

Abbott, L. K., & Murphy, D. V. (2007). What is soil biological fertility? In *Soil Biological Fertility* (pp. 1–15). Springer. Retrieved from http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-6619-1_1

Acuña, J. J., Jorquera, M. A., Martínez, O. A., Menezes-Blackburn, D., Fernández, M. T., Marschner, P., ... Mora, M. L. (2011). Indole acetic acid and phytase activity produced by rhizosphere bacilli as affected by pH and metals. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 11(3), 1–12.

Álvarez Figueroa, P. A. (2012). Selección y evaluación de microorganismos solubilizadores de fosfatos en suelos calcáreos del valle del Mantaro. Retrieved from <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/handle/28000/260>

Amtmann, A., & Armengaud, P. (2009). Effects of N, P, K and S on metabolism: new knowledge gained from multi-level analysis. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(3), 275–283. <http://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.04.014>

Aquihuatl, R. M., & Pérez, C. M. (2004). Manual de prácticas de laboratorio de microbiología general. *Manual de Prácticas de Laboratorio Microbiología General*.

Arai, Y., & Sparks, D. L. (2007). Phosphate Reaction Dynamics in Soils and Soil Components: A Multiscale Approach. In D. L. Sparks (Ed.), *Advances in Agronomy* (Vol. 94, pp. 135–179). Academic Press. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065211306940036>

- Arzuaga, S. A., López, C. F., Dalurzo, H. C., & Vazquez, S. (2005). Fósforo total, fósforo orgánico y fosfatasa acida, en entisoles, alfisoles y vertisoles de Corrientes con diferentes usos agrícolas. *Comunicaciones Científicas Y Tecnológicas Resumen A-066*. Pp, 1–4.
- Ashley, K., Cordell, D., & Mavinic, D. (2011). A brief history of phosphorus: From the philosopher's stone to nutrient recovery and reuse. *Chemosphere*, 84(6), 737–746.
- Baetz, U., & Martinoia, E. (2014). Root exudates: the hidden part of plant defense. *Trends in Plant Science*, 19(2), 90–98.
- Bala, M., Kaur, C., Kaur, I., Khan, F., & Mayilraj, S. (2012). *Kocuria sediminis* sp. nov., isolated from a marine sediment sample. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 101(3), 469–478.
- Barančíková, G., Liptaj, T., & Prónayová, N. (2007). Phosphorus fractions in arable and mountain soils and their humic acids. *Soil and Water Research*, 2(4), 141–148.
- Barker, A. V., & Pilbeam, D. J. (2014). *Handbook of plant nutrition* (Vol. 117). CRC press. Retrieved from <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=5k0afN5UZ4IC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Handbook+of+Plant+Nutrition&ots=3LjFISfa55&sig=f1MC14v1ThZL0amuJpTA-kGGB3g>
- Baudoin, J.-M., Guérold, F., Felten, V., Chauvet, E., Wagner, P., & Rousselle, P. (2008). Elevated aluminium concentration in acidified headwater streams lowers aquatic hyphomycete diversity and impairs leaf-litter breakdown. *Microbial Ecology*, 56(2), 260–269.
- Bazin, H., Descotes, G., Bouchu, A., & Petit-Ramel, M. (1995). Comparison of calcium complexation of some carboxylic acids derived from dglucose and d-fructose. *Canadian Journal of Chemistry*, 73(8), 1338–1347.

- Behera, B. C., Singdevsachan, S. K., Mishra, R. R., Dutta, S. K., & Thatoi, H. N. (2014). Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove—a review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(2), 97–110.
- Bolan, N. S., Naidu, R., Mahimairaja, S., & Baskaran, S. (1994). Influence of low-molecular-weight organic acids on the solubilization of phosphates. *Biology and Fertility of Soils*, 18(4), 311–319.
- Bravo, I., Marquinez, L., & Potosí, S. (2007). Fraccionamiento del Fósforo y correlación con la materia orgánica en dos suelos del departamento del Cauca. *Revista de La Sociedad Colombiana de La Ciencia Del Suelo*. Bogotá-Colombia. *Suelos Ecuatoriales*, 37(2), 147–154.
- Bunemann, E. K., Oberson, A., & Frossard, E. (2011). Phosphorus in Action. *Soil Biology*, 26, 37–57.
- Buscot, F., & Varma, A. (2005). *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*. Springer. Retrieved from <http://link.springer.com/content/pdf/10.1007/b137872.pdf>
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos*. Centro Internacional de La Papa. Retrieved from www.cipotato.org
- Chamnongpol, S., Dodson, W., Cromie, M. J., Harris, Z. L., & Groisman, E. A. (2002). Fe (III)-mediated cellular toxicity. *Molecular Microbiology*, 45(3), 711–719.
- Chang, R. (2002). *Química general (Sexta)*. México: McGraw-Hill.
- Chen, Y. P., Rekha, P. D., Arun, A. B., Shen, F. T., Lai, W.-A., & Young, C. C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*, 34(1), 33–41.
- Chao, W., Xue-Qiang, Z., Aizawa, T., Sunairi, M., & Ren-Fang, S. (2013). High aluminum tolerance of *Rhodotorula* sp. RS1 is associated with thickening of the cell wall rather than chelation of aluminum ions. *Pedosphere*, 23(1), 29–38.

- Čiamporová, M. (2002). Morphological and structural responses of plant roots to aluminium at organ, tissue, and cellular levels. *Biologia Plantarum*, 45(2), 161–171.
- Cisneros R, C. A. (2015). Evaluación de solubilización de fosfatos por microorganismos rizosféricos de un Andisol del municipio de Cajibío (Cauca) y su efecto en plántulas de café (*Coffea arabica* Var. Castillo). UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA – SEDE PALMIRA, Palmira colombia.
- Combes, C., & Rey, C. (2010). Amorphous calcium phosphates: Synthesis, properties and uses in biomaterials. *Acta Biomaterialia*, 6(9), 3362–3378. <http://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.02.017>
- Cordell, D., Drangert, J.-O., & White, S. (2009). The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change*, 19(2), 292–305. <http://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2008.10.009>
- CORPOICA. (2007, July). Para la preparación, uso, manejo y certificación de productos para una agricultura ecológica en Colombia.
- Coutinho, F. P., Felix, W. P., & Yano-Melo, A. M. (2012). Solubilization of phosphates in vitro by *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. *Ecological Engineering*, 42, 85–89.
- Crisponi, G., Dean, A., Di Marco, V., Lachowicz, J. I., Nurchi, V. M., Remelli, M., & Tapparo, A. (2013). Different approaches to the study of chelating agents for iron and aluminium overload pathologies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(2-3), 585–601.
- Daniel, H. (2001). *Análisis químico cuantitativo* (2a ed.). Barcelona ; España: Reverté. Retrieved from <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=AGRIUAN.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=024477>

- Dastager, S. G., & Damare, S. (2013). Marine actinobacteria showing phosphate-solubilizing efficiency in Chorao Island, Goa, India. *Current Microbiology*, 66(5), 421–427.
- De Freitas, J. M., & Meneghini, R. (2001). Iron and its sensitive balance in the cell. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 475(1–2), 153–159. [http://doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00066-5](http://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00066-5)
- Deng, X., Chai, L., Yang, Z., & Wang, Y. (2014). Influence of heavy metal stress on morphology and physiology of *Penicillium chrysogenum* during bioleaching process. *Journal of Central South University*, 21, 3254–3262.
- de Salamone, I. E. G., Vázquez, S., Penna, C., & Cassán, F. (n.d.). RIZOSFERA, BIODIVERSIDAD Y AGRICULTURA SUSTENTABLE. Retrieved from <http://bashanfoundation.org/gmaweb/pdfs/tribas.pdf>
- de Werra, P., Péchy-Tarr, M., Keel, C., & Maurhofer, M. (2009). Role of gluconic acid production in the regulation of biocontrol traits of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(12), 4162–4174.
- Dominguez, D. C. (2004). Calcium signalling in bacteria. *Molecular Microbiology*, 54(2), 291–297.
- Dutta, R. (2008). *Fundamentals of biochemical engineering*. *Fundamentals of Biochemical Engineering*; ISBN 978-3-540-77900-1. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008, 1. Retrieved from <http://adsabs.harvard.edu/abs/2008fobe.book....D>
- Du, Y.-M., Tian, J., Liao, H., Bai, C.-J., Yan, X.-L., & Liu, G.-D. (2009). Aluminium tolerance and high phosphorus efficiency helps *Stylosanthes* better adapt to low-P acid soils. *Annals of Botany*, mcp074.

- European Fertilizer Manufacturers Association. (2000). UNDERSTANDING PHOSPHORUS AND ITS USE IN AGRICULTURE. Retrieved from www.efma.org
- Fernández, L. A., Zalba, P., Gómez, M. A., & Sagardoy, M. A. (2005). Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Ciencia Del Suelo*, 23(1), 31–37.
- Filippelli, G. M. (2002). The global phosphorus cycle. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 48(1), 391–425.
- Foth, H. D., & Ellis, B. G. (1997). Soil fertility. *Soil Fertility*, (Ed. 2). Retrieved from <http://www.cabdirect.org/abstracts/19981909558.html>
- Fransson, A. M., Vinogradoff, S., Godbold, D. L., van Hees, P. A. W., & Jones, D. L. (2004). Aluminum complexation suppresses citrate uptake by acid forest soil microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(2), 353–357. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2003.09.015>
- Furukawa, J., Yamaji, N., Wang, H., Mitani, N., Murata, Y., Sato, K., ... Ma, J. F. (2007). An aluminum-activated citrate transporter in barley. *Plant and Cell Physiology*, 48(8), 1081–1091.
- Gallmetzer, M., & Burgstaller, W. (2001). Citrate efflux in glucose-limited and glucose-sufficient chemostat culture of *Penicillium simplicissimum*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 79(1), 81–87.
- Gallmetzer, M., Müller, B., & Burgstaller, W. (1998). Net efflux of citrate in *Penicillium simplicissimum* is mediated by a transport protein. *Archives of Microbiology*, 169(4), 353–359.
- García, G. N., & García, S. N. (2013). QUIMICA AGRICOLA QUIMICA DEL SUELO Y DE NUTRIENTES ESENCIAL. Mundi-Prensa Libros.

- George, T. S., Fransson, A.-M., Hammond, J. P., & White, P. J. (2011). Phosphorus nutrition: rhizosphere processes, plant response and adaptations. In Phosphorus in Action (pp. 245–271). Springer. Retrieved from http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-15271-9_10
- Ghaly, A. E., & Kamal, M. A. (2004). Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction. *Water Research*, 38(3), 631–644.
- Ghorbani, Y., Oliazadeh, M., & Shahverdi, A. R. (2009). Microbiological leaching of Al from the waste of bayer process by some selective fungi. *Iran. J. Chem. Chem. Eng. Research Note* Vol, 28(1). Retrieved from http://ijcce.ac.ir/pdf_6922_a8915f70b69923a3b8b8bbe3dc4b0d2f.html
- Godinho, A., Ramesh, R., & Bhosle, S. (2010). Bacteria from sand dunes of Goa promoting growth in Eggplant. *World Journal of Agricultural Sciences*, 6(5), 555–564.
- Goswami, D., Pithwa, S., Dhandhukia, P., & Thakker, J. N. (2014). Delineating *Kocuria turfanensis* 2M4 as a credible PGPR: a novel IAA-producing bacteria isolated from saline desert. *Journal of Plant Interactions*, 9(1), 566–576.
- Greenfield, D. J., & Eanes, E. D. (1972). Formation chemistry of amorphous calcium phosphates prepared from carbonate containing solutions. *Calcified Tissue Research*, 9(1), 152–162.
- Guerrero, N. R., Quintero, M. A. O., & Naranjo, J. C. P. (2012). Determinación del Área Foliar en Fotografías Tomadas con una Cámara Web, un Teléfono Celular o una Cámara Semiprofesional. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*, 65(1), 6399–6405.
- Harries, J. E., Hukins, D. W. L., Holt, C., & Hasnain, S. S. (1987). Conversion of amorphous calcium phosphate into hydroxyapatite investigated by EXAFS

- spectroscopy. *Journal of Crystal Growth*, 84(4), 563–570.
[http://doi.org/10.1016/0022-0248\(87\)90046-7](http://doi.org/10.1016/0022-0248(87)90046-7)
- He, Z. L., Yang, X. E., & Stoffella, P. J. (2005). Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 19(2), 125–140.
- Hinsinger, P. (2001). Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil*, 237(2), 173–195.
<http://doi.org/10.1023/A:1013351617532>
- Hyland, C. F., Ketterings, Q. M., Dewing, D. R., Stockin, K., Czymmek, K. J., Albrecht, G. L., & Geohring, L. D. (2005). Phosphorus basics—The phosphorus cycle. Cornell University, Cornell (Agronomy Fact Sheet, 12), (12). Retrieved from <http://nmsp.cals.cornell.edu/publications/factsheets/factsheet12.pdf>
- Illmer, P., & Buttinger, R. (2006). Interactions between iron availability, aluminium toxicity and fungal siderophores. *Biometals*, 19(4), 367–377.
- Illmer, P., & Erlebach, C. (2003). Influence of Al on growth, cell size and content of intracellular water of *Arthrobacter* sp. PI/1-95. *Antonie van Leeuwenhoek*, 84(3), 239–246.
- Inoue, Y., Yamaoka, K., Kimura, K., Sawai, K., & Arai, T. (2000). Effects of Low pH on the Induction of Root Hair Formation in Young Lettuce (*Lactuca sativa* L. cv. Grand Rapids) Seedlings. *Journal of Plant Research*, 113(1), 39–44.
<http://doi.org/10.1007/PL00013909>
- Jaramillo Jaramillo, D. F., & others. (2002). Introducción a la ciencia del suelo. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/2242/>

- Johnsson, M. S.-A., & Nancollas, G. H. (1992). The role of brushite and octacalcium phosphate in apatite formation. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 3(1), 61–82.
- Jones, D. L., & Oburger, E. (2011). Solubilization of phosphorus by soil microorganisms. In *Phosphorus in Action* (pp. 169–198). Springer. Retrieved from http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-15271-9_7
- Kamilova, F., Kravchenko, L. V., Shaposhnikov, A. I., Azarova, T., Makarova, N., & Lugtenberg, B. (2006). Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(3), 250–256.
- Kamprath, E. J., Sánchez, P. A., Bartholomew, W. V., Buol, S. W., Cox, F. R., Kamprath, J. F., & Sánchez, P. A. (1973). Acidez del suelo y encalado. *Boletín Técnico*, (4). Retrieved from <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IisScript=CDIICA.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expression=mfn=000967>
- Kaur, G., & Reddy, M. S. (2014). Influence of P-solubilizing bacteria on crop yield and soil fertility at multilocal sites. *European Journal of Soil Biology*, 61, 35–40.
- Khan, M. S., Zaidi, A., & Wani, P. A. (2009). Role of Phosphate Solubilizing Microorganisms in Sustainable Agriculture - A Review. In E. Lichtfouse, M. Navarrete, P. Debaeke, S. Véronique, & C. Alberola (Eds.), *Sustainable Agriculture* (pp. 551–570). Springer Netherlands. Retrieved from http://link.springer.com.ezproxy.unal.edu.co/chapter/10.1007/978-90-481-2666-8_34
- Kinraide, T. B., & Sweeney, B. K. (2001). Buffered, phosphate-containing media suitable for aluminum toxicity studies. *Plant and Soil*, 235(1), 75–83.

- Kinraide, T. B., & Sweeney, B. K. (2003). Proton alleviation of growth inhibition by toxic metals (Al, La, Cu) in rhizobia. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(2), 199–205. [http://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00246-8](http://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00246-8)
- Kochian, L. V., Hoekenga, O. A., & Piñeros, M. A. (2004). How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 459–493.
- Kochian, L. V., Piñeros, M. A., & Hoekenga, O. A. (2005). The Physiology, Genetics and Molecular Biology of Plant Aluminum Resistance and Toxicity. *Plant and Soil*, 274(1-2), 175–195. <http://doi.org/10.1007/s11104-004-1158-7>
- Konno, M., Ooishi, M., & Inoue, Y. (2003). Role of manganese in low-pH-induced root hair formation in *Lactuca sativa* cv. Grand Rapids seedlings. *Journal of Plant Research*, 116(4), 301–307. <http://doi.org/10.1007/s10265-003-0100-z>
- Kristiansen, B., Linden, J., & Matthey, M. (2002). *Citric acid biotechnology*. CRC Press. Retrieved from <http://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=v5f0FapfLfYC&oi=fnd&pg=PP1&dq=Citric+Acid+Biotechnology+&ots=JPBf5xINtA&sig=UUN-jpbpbpub6uwls37d9RC9n3o>
- Kuan, W. H., Wang, M. K., Huang, P. M., Wu, C. W., Chang, C. M., & Wang, S. L. (2005). Effect of citric acid on aluminum hydrolytic speciation. *Water Research*, 39(15), 3457–3466.
- Lakatos, A., Kiss, T., Bertani, R., Venzo, A., & Di Marco, V. B. (2008). Complexes of Al (III) with d-gluconic acid. *Polyhedron*, 27(1), 118–124.
- Lindsay, W. L. (1979). *Chemical equilibria in soils*. John Wiley and Sons Ltd. Retrieved from <http://www.cabdirect.org/abstracts/19811961894.html>

- Lucena, J. J., Gárate, A., & Villén, M. (2010). Stability in solution and reactivity with soils and soil components of iron and zinc complexes. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 173(6), 900–906.
- Madi, N., McNeil, B., & Harvey, L. M. (1997). Effect of exogenous calcium on morphological development and biopolymer synthesis in the fungus *Aureobasidium pullulans*. *Enzyme and Microbial Technology*, 21(2), 102–107. [http://doi.org/10.1016/S0141-0229\(96\)00232-3](http://doi.org/10.1016/S0141-0229(96)00232-3)
- M. Aguilar, J.L. Cortina, M. Martínez, & N. Miralles. (2014). Base de datos Hidroquimicos. Retrieved from <http://ocw.upc.edu/sites/default/files/materials/15012031/40831-2903.pdf>
- Ma, J. F., Ryan, P. R., & Delhaize, E. (2001). Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science*, 6(6), 273–278.
- Mardad, I., Serrano, A., & Soukri, A. (2013). Solubilization of inorganic phosphate and production of organic acids by bacteria isolated from a Moroccan mineral phosphate deposit. *Afri J Microbiol Res*, 7(8), 626–635.
- Marschner, H., & Marschner, P. (2012). Marschner's mineral nutrition of higher plants (Vol. 89). Academic press. Retrieved from <http://books.google.es/books?hl=es&lr=&id= a-hKcXXQuAC&oi=fnd&pg=PP1&dq=Mineral+nutrition+of+higher+plants&ots=QhozEqcfaT&sig=iggepZuxUOsL9uvn23ewUWuXiJg>
- Martí, F. B. (2002). Química analítica cualitativa. Editorial Paraninfo. Retrieved from <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=QChYqMIUJL8C&oi=fnd&pg=PR1&dq=Constantes+de++formacion+quimica&ots=1d60p2nfi-&sig=2GzAKULbSX3PNzl-DPraiersJM>
- Matias, B. G., Pinto, P. S. A., Cossi, M. V. C., Silva, A., Vanetti, M. C. D., & Nero, L. A. (2010). Evaluation of a polymerase chain reaction protocol for the detection of

- Salmonella species directly from superficial samples of chicken carcasses and preenrichment broth. *Poultry Science*, 89(7), 1524–1529.
- McLaughlin, M. J., McBeath, T. M., Smernik, R., Stacey, S. P., Ajiboye, B., & Guppy, C. (2011). The chemical nature of P accumulation in agricultural soils—implications for fertiliser management and design: an Australian perspective. *Plant and Soil*, 349(1-2), 69–87.
- McMurry, J. (2004). *Química orgánica*. International Thomson Editores. Retrieved from <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=orton.xis&B1=Buscar&formato=1&cantidad=50&expresion=ACIDS>
- Mendoza, A. B., Pacheco, C. G., Lara, L. O. F., Francisco, A., Carbó, A., Ramírez, H., ... Torres, V. R. (2003). Efecto del ácido cítrico aplicado en soluciones fertilizantes de diferente conductividad eléctrica en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). VOLUMEN 3 NÚMERO2, 321.
- Miller, A. J., Shen, Q., & Xu, G. (2009). Freeways in the plant: transporters for N, P and S and their regulation. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(3), 284–290. <http://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.04.010>
- Mittal, V., Singh, O., Nayyar, H., Kaur, J., & Tewari, R. (2008). Stimulatory effect of phosphate-solubilizing fungal strains (*Aspergillus awamori* and *Penicillium citrinum*) on the yield of chickpea (*Cicer arietinum* L. cv. GPF2). *Soil Biology and Biochemistry*, 40(3), 718–727.
- Molloy, M. P., Brzezinski, E. E., Hang, J., McDowell, M. T., & VanBogelen, R. A. (2003). Overcoming technical variation and biological variation in quantitative proteomics. *Proteomics*, 3(10), 1912–1919.
- Mukerji, K. G., Manoharachary, C., & Singh, J. (2006). *Microbial activity in the rhizosphere* (Vol. 7). Springer Science & Business Media. Retrieved from

https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=vrJRJO_KfxEC&oi=fnd&pg=PA1&dq=%3B+K.+G.+Mukerji,+2006&ots=NJ79Td8LfE&sig=ifQfrjqI9xpKVI-4ktDqwjpZ49E

Nannipieri, P., Giagnoni, L., Landi, L., & Renella, G. (2011). Role of phosphatase enzymes in soil. In *Phosphorus in action* (pp. 215–243). Springer. Retrieved from http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-15271-9_9

Navarro Blaya, S., & Navarro García, G. (2003). *Química agrícola: el suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal*. Mundi-Prensa, España. Retrieved from <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=UCC.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=001221>

Naveena Lavanya Latha, J., & Maruthi Mohan, P. (2011). Role of cell wall bound calcium in *Neurospora crassa*. *Microbiological Research*, 166(5), 419–429. <http://doi.org/10.1016/j.micres.2010.10.001>

Neumann, G., & Römheld, V. (2012). Rhizosphere chemistry in relation to plant nutrition. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*, 347–368.

Oexle, H., Gnaiger, E., & Weiss, G. (1999). Iron-dependent changes in cellular energy metabolism: influence on citric acid cycle and oxidative phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1413(3), 99–107.

Olibone, D., & Rosolem, C. A. (2010). Phosphate fertilization and phosphorus forms in an Oxisol under no-till. *Scientia Agricola*, 67(4), 465–471.

Omoifo, C. O. (2013). Effect of extracellular calcium chloride on sporangiospore-yeast transformation of *Rhizopus stolonifer*. *African Journal of Biotechnology*, 10(20), 4276–4288.

- Onoda, T., Enokizono, J., Kaya, H., Oshima, A., Freestone, P., & Norris, V. (2000). Effects of calcium and calcium chelators on growth and morphology of *Escherichia coli* L-form NC-7. *Journal of Bacteriology*, 182(5), 1419–1422.
- Ortiz, M., Zapata, R., Sadeghian, S., & Franco, H. (2004). Aluminio intercambiable en suelos con propiedades ácidas y su relación con la toxicidad. Retrieved from <http://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/165>
- Pallagi, A., Tasi, Á. G., Peintler, G., Forgo, P., Pálinkó, I., & Sipos, P. (2013). Complexation of Al (III) with gluconate in alkaline to hyperalkaline solutions: formation, stability and structure. *Dalton Transactions*, 42(37), 13470–13476.
- Paneque-Pérez, V. M. (2010). Manual de técnicas analíticas para análisis de suelo, foliar, abonos orgánicos y fertilizantes químicos. Retrieved from <http://mst.ama.cu/578/>
- Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, 22(3), 189–259. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2003.09.005>
- Paredes-Mendoza, M., & Espinosa-Victoria, D. (2010). Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana*, 28(1), 61–70.
- Patel, J. K., Patel, N. M., & Shiyani, R. L. (2001). Coefficient of variation in field experiments, and yardstick thereof-An empirical study. *Current Science*, 81(9), 1163–1164.
- Paul, E. A. (2014). *Soil microbiology, ecology and biochemistry*. Academic press. Retrieved from <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=gDnLAWAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Microorganisms+in+Soils:+Roles+in+Genesis+and+Functions&ots=rerlQXpVhI&sig=15vFSreNcqVrV26YVVrSM5y-CWA>

- Peña, N. Q., & Cely, C. R. C. (2011). Comparación de técnicas experimentales para la medición del crecimiento vegetal. *Revista Memorias*, 9(15), 81–94.
- Pérez, E., Sulbaran, M., Ball, M. M., & Yarzabal, L. A. (2007). Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(11), 2905–2914.
- Philpott, C. C. (2006). Iron uptake in fungi: A system for every source. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1763(7), 636–645. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.05.008>
- Picci, G. (1965). Intorno alla microflora presente sulle olive sane e colpite da cicloconio. *Agric. Italia Pisa*, 65, 1–11.
- Pierre, J. L., & Gautier-Luneau, I. (2000). Iron and citric acid: a fuzzy chemistry of ubiquitous biological relevance. *Biometals*, 13(1), 91–96.
- Pierzynski, G. M. (2000). Methods of phosphorus analysis for soils, sediments, residuals, and waters. North Carolina State University Raleigh. Retrieved from https://secure.hosting.vt.edu/www.sera17.ext.vt.edu/Documents/Methods_of_P_A_nalysis_2000.pdf
- Piña, R. G., & Cervantes, C. (1996). Microbial interactions with aluminium. *Biometals*, 9(3), 311–316.
- Pines, O., Shemesh, S., Battat, E., & Goldberg, I. (1997). Overexpression of cytosolic malate dehydrogenase (MDH2) causes overproduction of specific organic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48(2), 248–255.
- Pinochet, D. (1995). The Residual Effect of Applications of Phosphate Fertilizer Measured by the Olsen Method. University of Reading.

- Pradhan, N., & Sukla, L. B. (2009). Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. *African Journal of Biotechnology*, 5(10). Retrieved from <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/42884>
- Prakash, G., & Srivastava, A. K. (2005). Statistical media optimization for cell growth and azadirachtin production in *Azadirachta indica* (A. Juss) suspension cultures. *Process Biochemistry*, 40(12), 3795–3800.
- Rao, N. K., Hanson, J., Dulloo, M. E., Ghosh, K., & others. (2007). Manual para el Manejo de Semillas en Bancos de Germoplasma (Manuales para Bancos de Germoplasma No. 8). Bioversity International. Retrieved from http://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=sv_FnxOQiCcC&oi=fnd&pg=PR6&dq=Manuales+para+Bancos+de+Germoplasma+No.+8&ots=JQENWFcgMM&sig=4NMJsRWIkAkOeu9uTuc9Cvd5Ya8
- Rathi, P., Goswami, V. K., Sahai, V., & Gupta, R. (2002). Statistical medium optimization and production of a hyperthermostable lipase from *Burkholderia cepacia* in a bioreactor. *Journal of Applied Microbiology*, 93(6), 930–936.
- Richardson, A. E. (2001). Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Functional Plant Biology*, 28(9), 897–906.
- Richardson, A. E., Barea, J.-M., McNeill, A. M., & Prigent-Combaret, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil*, 321(1-2), 305–339. <http://doi.org/10.1007/s11104-009-9895-2>
- Rincón, L. (2005). La Fertirrigación de la lechuga Iceberg. IMIDA. Región de Murcia.
- Romano, F. L., Ambrosano, G. M. B., Magnani, M. B. B. de A., & Nouer, D. F. (2005). Analysis of the coefficient of variation in shear and tensile bond strength tests. *Journal of Applied Oral Science*, 13(3), 243–246.

- Salma, K., Berzina-Cimdina, L., & Borodajenko, N. (2010). Calcium phosphate bioceramics prepared from wet chemically precipitated powders. *Processing and Application of Ceramics*, 4(1), 45–51.
- Schmid Naset, T.-S., Bader, H.-P., Scheidegger, R., & Lohm, U. (2008). The flow of phosphorus in food production and consumption — Linköping, Sweden, 1870–2000. *Science of The Total Environment*, 396(2–3), 111–120. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.02.010>
- Sharma, K. (2011). Phosphate Solubilization Potential of *Penicillium* species Inhabiting the Hilly Terrains of Pachmarhi (India). *Oriental Journal of Chemistry*, 27(1), 101.
- Shen, J., Yuan, L., Zhang, J., Li, H., Bai, Z., Chen, X., ... Zhang, F. (2011). Phosphorus dynamics: from soil to plant. *Plant Physiology*, 156(3), 997–1005.
- Silva, A. M., Kong, X., Parkin, M. C., Cammack, R., & Hider, R. C. (2009). Iron (III) citrate speciation in aqueous solution. *Dalton Transactions*, (40), 8616–8625.
- Sindhu, S. S., Phour, M., Choudhary, S. R., & Chaudhary, D. (2014). Phosphorus Cycling: Prospects of Using Rhizosphere Microorganisms for Improving Phosphorus Nutrition of Plants. In N. Parmar & A. Singh (Eds.), *Geomicrobiology and Biogeochemistry* (pp. 199–237). Springer Berlin Heidelberg. Retrieved from http://link.springer.com.ezproxy.unal.edu.co/chapter/10.1007/978-3-642-41837-2_11
- Soetan, K. O., Olaiya, C. O., & Oyewole, O. E. (2010). The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants: A review. *African Journal of Food Science*, 4(5), 200–222.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), 425–448.

- Takahashi, H. (2012). How do lettuce seedlings adapt to low-pH stress conditions? A mechanism for low-pH-induced root hair formation in lettuce seedlings. In *Phytohormones and Abiotic Stress Tolerance in Plants* (pp. 125–155). Springer. Retrieved from http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-25829-9_6
- Tamai, M., & Nakahira, A. (2004). EXAFS STUDIES ON STRUCTURAL DISORDER IN CALCIUM DEFICIENT HYDROXYAPATITE. *Phosphorus Research Bulletin*, 17(0), 69–74.
- Tran Thi Thu Ha. (2003). Effect of Phosphorus Fertilizer on Groundnut Yield in Poor Alluvial and Sandy Soils of Thua Thien Hue. *BETTER CROPS INTERNATIONAL (BCI)*, 17(2), 16–17.
- Tung, M. S. (2004). Amorphous Calcium Phosphates for Tooth Mineralization. *American Dental Association Foundation*, 25(1), 9 – 13.
- Turner, B. L. (2008). Resource partitioning for soil phosphorus: a hypothesis. *Journal of Ecology*, 96(4), 698–702.
- Verkhatsky, A., & Parpura, V. (2014). Calcium signalling and calcium channels: Evolution and general principles. *European Journal of Pharmacology*, 739, 1–3. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.11.013>
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255(2), 571–586. <http://doi.org/10.1023/A:1026037216893>
- WALCO S.A. (n.d). TODO SOBRE QUELATOS. Retrieved from <http://documents.mx/documents/todo-sobre-quelatos.html>
- Wang, C., Wang, C. Y., Zhao, X. Q., Chen, R. F., Lan, P., & Shen, R. F. (2013). Proteomic analysis of a high aluminum tolerant yeast *Rhodotorula taiwanensis* RS1 in response to aluminum stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Proteins and Proteomics*, 1834(10), 1969–1975.

- Warwick, P., Evans, N., & Vines, S. (2006). Studies on metal gluconic acid complexes. In MRS Proceedings (Vol. 932, pp. 14–1). Cambridge Univ Press.
- Whitelaw, M. A. (2000). Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Advances in Agronomy*, 69, 99–151.
- Whitelaw, M. A., Harden, T. J., & Helyar, K. R. (1999). Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(5), 655–665.
- Wiedenhoeft, A. C. (2006). Plant Nutrition. Infobase Publishing. Retrieved from http://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=p6Y2Z8vnj04C&oi=fnd&pg=PR5&dq=plant+nutrition+%2B+Alex+C.+Wiedenhoeft&ots=FOxruA_bmC&sig=cbLEd1EprVuUwzAugFvrdDnkfk0
- Wieland, G., Neumann, R., & Backhaus, H. (2001). Variation of microbial communities in soil, rhizosphere, and rhizoplane in response to crop species, soil type, and crop development. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12), 5849–5854.
- Xiao, M., & Wu, F. (2014). A review of environmental characteristics and effects of low-molecular weight organic acids in the surface ecosystem. *Journal of Environmental Sciences*, 26(5), 935–954.
- Zapata Hernández, R. D., & others. (2004). Química de la acidez del suelo. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/1735/>
- Zhang, D., Duine, J. A., & Kawai, F. (2002). The extremely high Al resistance of *Penicillium janthineleum* F-13 is not caused by internal or external sequestration of Al. *Biometals*, 15(2), 167–174.
- Zhi-An, L. I., Bi, Z. O. U., Han-Ping, X. I. A., Yong-Zhen, D., Wan-Neng, T. A. N., & Sheng-Lei, F. U. (2008). Role of low-molecule-weight organic acids and their salts in regulating soil pH. *Pedosphere*, 18(2), 137–148.