



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Efectividad de un hongo inmovilizado en alginato para solubilizar P y promover el crecimiento vegetal en suelos tropicales**

**Laura Osorno Bedoya**

Universidad Nacional de Colombia sede Medellín  
Facultad de Ciencias, Escuela de biociencias  
Medellín, Colombia  
2018



# **Efectividad de un hongo inmovilizado en alginato para solubilizar P y promover el crecimiento vegetal en suelos tropicales**

Effectiveness of an alginate-immobilized fungus in solubilizing P and promoting plant growth in tropical soils

**Laura Osorno Bedoya**

Tesis o trabajo de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Doctorado en Biotecnología**

Comité doctoral:

Ph.D. Nelson Walter Osorio Vega

Ph.D. Raul Darío Zapata

Ph.D. Luz Stella de Bashan

Ph.D. Yoav Bashan

Línea de Investigación: Biofertilizantes

Grupo de Investigación: Microbiología del suelo

Universidad Nacional de Colombia sede Medellín

Facultad de Ciencias, Escuela de biociencias

Medellín, Colombia

2018



*A Manu por la simbiosis que hace conmigo.*



## Agradecimientos

- Al Profesor Walter Osorio y Raúl Zapata, por su apoyo, acompañamiento, enseñanzas durante este tiempo. Mis más sinceros agradecimientos y profunda admiración no solo desde la parte académica sino también desde la humana.
- A los Ph.D Luz estella de Bashan y Yoav Bashan por sus asesorías y aportes.
- A el Ph.D Mitiku Habte quien me recibió en la Universidad de Hawaii, por sus enseñanzas, consejos y disposición.
- A los Ph.D Concepción Azcón, Nuria Ferrol y Jose Miguel Barea quienes me recibieron en mi pasantía en la Estación Experimental del Zaidin.
- A mis padres quienes fueron los que se vieron más afectado por mi falta de tiempo, por su amor, apoyo, comprensión, por la educación y valores recibidos.
- A Manuela Osorno quien se merece completamente este doctorado, por su ayuda desinteresada, su compromiso y cariño.
- A Fer por su amor, ayuda y comprensión incondicional, durante todos estos años. Este esfuerzo también es tuyo.
- A mis compañeros del laboratorio y grupo de Investigación de Microbiología del Suelo.
- Mis compañeros de laboratorio del grupo de Micorrizas de la EEZ en España por recibirme y hacerme parte de la familia (Chon, Jacob, Pedro, Victor, Leyla, Leyren y Gabriela).
- A diferentes profesores y Funcionarios de la Universidad quienes de una u otra forma me apoyaron (Orlando Ruiz, Alvaro Lema, Olga Montoya, Maria del Socorro, Maria Eugenia, Juan Carlos Loaiza, Juan Diego León, Gloria, Vicente, Deyanira Lobo, Mario Arias).
- Gloria Rivas y Neyi Pulgarin de Biotecnología, las personas más queridas dispuestas a ayudar siempre.
- Las instituciones que me permitieron realizar mis estudios, por sus instalaciones y apoyos económicos: Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Al laboratorio de suelos y Laboratorio de Ecología y Conservación ambiental (LECA), Gobernación de Antioquia: generación de nuevo conocimiento, Al Programa Becas Doctorados Nacionales Colciencias 472, Programa Enlazamundos, Agencia de Educación Superior Sapiencia 2016, University of Hawaii y La Estación Experimental del Zaidin, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de España.



## Resumen

La deficiencia de fósforo (P) es un factor limitante para el desarrollo, crecimiento y productividad vegetal, afectando 2016 millones de ha a nivel global. Para corregir este problema se usan altas dosis de fertilizantes fosfóricos solubles, pero su eficiencia usualmente es muy baja. Infortunadamente, estos fertilizantes son costosos, generan riesgos de contaminar el ambiente por eutrofización, en su mayoría son importados y esto genera a su vez riesgos en la soberanía y seguridad alimentaria de los países que lo consumen.

Entre las alternativas biotecnológicas para mejorar la disponibilidad de P en el suelo y la capacidad de absorción de este por las plantas está el uso de hongos solubilizadores de P (HSP) y hongos micorrizo arbusculares (HMA). Los primeros disuelven minerales fosfóricos y además pueden desorber P fijado en los suelos. Por otro lado, los HMA mejoran la eficiencia de las plantas para la absorción de P a través de la producción de hifas extraradicales, que exploran más volumen de suelo y captan más eficientemente el P que las raíces no-micorrizales.

Aunque se ha reportado efectos positivos al inocular individual y combinadamente estos microorganismos, no existe un uso extendido de estos. Varios autores reportan inconsistencias en los resultados al inocular con estos microorganismos; aunque se reconoce que la mineralogía del suelo puede jugar un papel importante en este punto se consideran que hay otros factores involucrados tales como la formulación de los inóculos y la viabilidad y persistencia de los microorganismos. Estas condiciones presumiblemente se podrían mejorar inmovilizando los HSP en alginato para prolongar la viabilidad y efectividad de los hongos, tal como se ha hecho con otros microorganismos.

Por lo anterior se establecieron una serie de experimentos en los que se estudio: Determinar el efecto de factores bioquímicos sobre la bio-solubilización de RP por el hongo *Mortierella* sp. libre; (ii) Formular la inmovilización del hongo solubilizador de P en alginato de calcio; (iii) Determinar la efectividad del hongo inmovilizado en alginato para disolver roca fosfórica; (iv) Estimar la efectividad del hongo inmovilizado en alginato para desorber P adsorbido en un oxisol; (v) Evaluar la efectividad del hongo inmovilizado en alginato para disolver RP en diferentes tipos de suelo bajo condiciones *in vitro*; (vi) Evaluar la efectividad de dosis variables del hongo inmovilizado en alginato para promover el crecimiento de P en plantas leucaena micorrizadas y no micorrizadas en un oxisol bajo condiciones de invernadero; (vii) Evaluar la efectividad del hongo inmovilizado en alginato para promover

el crecimiento de P en plantas leucaena micorrizadas y no micorrizadas en diferentes tipos de suelos bajo condiciones de invernadero.

En general se puede afirmar que la solubilización de P por disolución de RP y desorción de P fijado en el suelo puede ser obtenida a partir del hongo *Mortierella* sp. libre e inmovilizado en alginato de calcio. Su efectividad fue controlada a través de la optimización de varios factores bioquímicos (cantidad de inóculo, fuente y cantidad de carbono y nitrógeno, tiempo de reacción, tipo de RP). La inoculación con el hongo inmovilizado promovió el crecimiento y la nutrición vegetal de plantas de leucaena, pero el efecto fue controlado por el tipo de suelo que controla la capacidad de fijación de P y la interacción con la asociación micorrizal.

**Palabras clave:** Biosolubilización, fósforo, micorriza, inmovilización.

## Abstract

Phosphorus deficiency (P) is a limiting factor for plant development, growth and productivity, affecting 2016 million ha globally. To correct this problem, high doses of soluble phosphate fertilizers are used, but their efficiency is usually low. Unfortunately, these fertilizers are expensive, they generate risks of contaminating the environment by eutrophication, they are mostly imported and this in turn generates risks in the sovereignty and food security of the countries that consume it.

Among the biotechnological alternatives to improve the availability of P in the soil and the capacity of absorption of this by the plants is the use of phosphate solubilizing fungi (PSF) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). The former dissolve phosphoric minerals and can also desorb P fixed in soils. On the other hand, AMF improves the efficiency of the plants for the absorption of P through the production of extra-radical hyphae, which explore more soil volume and capture P more efficiently than non-mycorrhizal roots.

Although positive effects have been reported by inoculating these microorganisms individually and in combination, there is no widespread use of these. Several authors have reported inconsistencies in the results when inoculating with these microorganisms. Although it is recognized that soil mineralogy can play an important role at this point, it is considered that there are other factors involved such as the formulation of the inocula and the viability and persistence of the microorganisms. These conditions could presumably be improved by immobilizing the PSF and AMF in alginate to prolong the viability and effectiveness of the fungi, as has been done with other microorganisms.

Therefore, a series of experiments were established aiming (i) to determine the effect of biochemical factors on the bio-solubilization of RP by the fungus *Mortierella* sp. free; (ii) to formulate the immobilization of the solubilizing fungus of P in calcium alginate; (iii) to determine the effectiveness of the immobilized fungus in alginate to dissolve phosphate rock; (iv) to estimate the effectiveness of the immobilized fungus in alginate to desorb P adsorbed in an oxisol; (v) to evaluate the effectiveness of the immobilized fungus in alginate to dissolve RP in different types of soil under in vitro conditions; (vi) to evaluate the effectiveness of variable doses of the immobilized fungus in alginate to promote the growth of P in mycorrhized and non-mycorrhized leucaena plants in an oxisol under greenhouse conditions; (vii) to evaluate the effectiveness of the immobilized fungus in alginate to promote the growth of P in mycorrhized and non-mycorrhized leucaena plants in different types of soils under greenhouse conditions.

In general, the solubilization of P by dissolution of RP and desorption of P fixed can be obtained from the fungus *Mortierella* sp. free and immobilized in calcium alginate. Its effectiveness was controlled through the optimization of several biochemical factors (amount of inoculum, source and amount of carbon and nitrogen, reaction time, type of

RP). The inoculation with the immobilized fungus promoted the growth and plant nutrition of leucaena plants, but the effect was controlled by the type of soil that controls the ability to fix P and the interaction with the mycorrhizal association.

**Keywords: Biosolubilization, phosphate, mycorrhiza, inmovilization**

# Contenido

Pág.

<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Hipótesis .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Objetivo general.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Objetivos específicos.....</b>	<b>2</b>
<b>1.4 Referencias.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Revisión de literatura .....</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Dinámica del fósforo en suelos tropicales .....</b>	<b>7</b>
<b>2.2 Fertilización fosfórica .....</b>	<b>8</b>
2.2.1 Roca fosfórica.....	9
2.2.2 Roca fosfórica como fertilizante .....	10
2.2.3 Solubilización de roca fosfórica.....	11
<b>2.3 Microorganismos solubilizadores de P .....</b>	<b>12</b>
2.3.1 Mecanismos de biosolubilización de P .....	14
2.3.2 <i>Mortierella</i> sp.....	15
<b>2.4 Microorganismos que mejoran la absorción de P.....</b>	<b>17</b>
2.4.1 Hongos micorrizo arbusculares.....	17
2.4.2 <i>Rhizoglofus fasciculatum</i> .....	19
<b>2.5 Coinoculación de microorganismos solubilizadores de P y hongos formadores de micorrizas .....</b>	<b>20</b>
<b>2.6 Inoculantes microbianos .....</b>	<b>21</b>
<b>2.7 Biofertilizantes .....</b>	<b>22</b>
2.7.1 Formulación de biofertilizantes .....	23
2.7.2 Inmovilización de inoculantes.....	25
<b>2.8 Referencias.....</b>	<b>26</b>
<b>3. Factores nutricionales que controlan la biosolubilización <i>in vitro</i> de roca fosfórica por el hongo <i>Mortierella</i> sp. ....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Introducción.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2 Materiales y métodos.....</b>	<b>28</b>
<b>3.3 Resultados.....</b>	<b>30</b>
<b>3.4 Discusión .....</b>	<b>35</b>
<b>3.5 Referencias.....</b>	<b>40</b>

<b>4. Viabilidad del hongo <i>Mortierella</i> sp. inmovilizado en alginato de calcio .....</b>	<b>45</b>
4.1 Introducción .....	45
4.2 Materiales y métodos .....	46
4.3 Resultados y discusión .....	47
4.4 Conclusiones .....	54
4.5 Referencias .....	55
<b>5. Efectividad del hongo <i>Mortierella</i> sp. inmovilizado en alginato para biosolubilizar roca fosfórica .....</b>	<b>58</b>
5.1 Introducción .....	58
5.2 Materiales y métodos .....	59
5.3 Resultados y discusión .....	61
5.4 Conclusiones .....	68
5.5 Referencias .....	68
<b>6. Desorción de P adsorbido de suelos tropicales por un hongo solubilizador de P libre e inmovilizado .....</b>	<b>73</b>
6.1 Introducción .....	73
6.2 Materiales y métodos .....	74
6.3 Resultados y discusión .....	77
6.4 Conclusión .....	81
6.5 Referencias .....	82
<b>7. Promoción del crecimiento vegetal y absorción de P por un hongo solubilizador inmovilizado en plantas micorrizadas en diferentes suelos tropicales.....</b>	<b>85</b>
7.1 Introducción .....	85
7.2 Materiales y métodos .....	86
7.3 Resultados y discusión .....	89
7.4 Conclusión .....	101
7.5 Referencias .....	102
<b>8. Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>108</b>
8.1 Conclusiones .....	108
8.2 Recomendaciones.....	109

## Lista de figuras

Figura 2-1. Micelio blanco de <i>Mortierella</i> sp. en medio de cultivo PDA (izquierada), Producción de ácidos orgánicos (halos amarillos) por <i>Mortierella</i> sp. creciendo en medio con roca fosfórica como única fuente de P (derecha).....	16
Figura 2-2. Imágenes de microscopía electrónica de barrido donde se puede ver el hongo <i>Mortierella</i> sp. creciendo alrededor de partículas de RP (Osorio et al., 2017). .....	17
Figura 2-3. Transportadores usados para las formulaciones de los inoculantes microbianos. Elaboración propia. ....	24
Figura 3-1. pH de la solución y Concentración de P en solución ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en función de la inoculación con cantidades crecientes de unidades formadoras de colonias (UFC) de <i>Mortierella</i> sp. Cada columna representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ). .....	31
Figura 3-2. pH de la solución y Concentración de P en solución ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en función de la cantidad de glucosa aplicada y la inoculación con <i>Mortierella</i> sp. Cada valor representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ). .....	32
Figura 3-3. pH del medio en función del tipo de fuente de carbono y la inoculación con <i>Mortierella</i> sp. Cada valor representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ). CMC: carboximetilcelulosa. ....	32
Figura 3-4. Concentración de P en solución ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en función de la fuente de C y la inoculación con <i>Mortierella</i> sp. Cada valor representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ). .....	33
Figura 3-5. pH de la solución y Concentración de P en solución ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en función de la dosis de $\text{NH}_4\text{Cl}$ ( $\text{g L}^{-1}$ ) y la inoculación con <i>Mortierella</i> sp. Cada valor representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ). .....	34
Figura 3-6. pH de la solución y Concentración de P en solución ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en función de la fuente de N y la inoculación con <i>Mortierella</i> sp. Cada valor representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ). .....	34
Figura 3-7. pH de la solución en función del tipo de RP inoculados con <i>Mortierella</i> sp. Cada columna representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas	

con las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ). CN: Carolina del Norte, H: Huila, S: Santander..... 35

Figura 4-1. Perlas de *Mortierella* sp. inmovilizadas en alginato de calcio. A la derecha: perlas frescas o húmedas, a la izquierda: perlas secas después de 40 horas a 40 °C..... 48

Figura 4-2. Peso (g) de perlas de alginato de calcio con *Mortierella* sp. en función del tiempo (horas) de secado a tres temperaturas (30, 35 y 40 °C). Las barras indican la desviación estándar, cada punto es el promedio de tres repeticiones. .... 49

Figura 4-3 Contenido de esporas de *Mortierella* sp. por perla de alginato de Ca húmedas y secas. Cada columna representa el promedio de 10 repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. NS: no hay diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ )..... 49

Figura 4-4. Crecimiento de *Mortierella* sp. inmovilizada en Perlas de alginato de calcio en medio PDA al tercer día de incubación a 28°C..... 50

Figura 4-5. Índice de germinación es esporas (%) de *Mortierella* sp. por perla seca en medio cultivo PDA en función del tiempo. Cada columna representa el promedio de 5 repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. NS: no hay diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ). Las perlas fueron conservadas a temperatura ambiente en un ambiente estéril..... 50

Figura 4-6 Contenido de esporas de *Mortierella* sp. por perla seca en función del tiempo (12 meses). Cada columna representa el promedio de 10 repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. NS: no hay diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ). Las perlas fueron conservadas a temperatura ambiente en un ambiente estéril. .... 51

Figura 4-7. Producción de CO<sub>2</sub> (mg g<sup>-1</sup>) a partir de la inoculación o no (control) con perlas de alginato (dos meses de almacenamiento) con *Mortierella* sp. en un oxisol. Las barras indican la desviación estándar. NS: no hay diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ). Las perlas fueron previamente conservadas a temperatura ambiente en un ambiente estéril sellado..... 52

Figura 4-8 Producción de CO<sub>2</sub> (mg g<sup>-1</sup>) a partir de la inoculación o no con perlas de alginato (dos meses de almacenamiento) con *Mortierella* sp. en diferentes suelos: Oxisol, Andisol y Mollisol. Las barras indican la desviación estándar. Cuadros negros: HSP inmovilizado, cuadros grises: HSP sin inmovilizar, cuadros blancos: no inoculados. Las perlas fueron previamente conservadas a temperatura ambiente en un ambiente estéril y sellado. .... 53

Figura 4-9. Diagrama de disolución de la perla de alginato de calcio y liberación de esporas del hongo *Mortierella* sp. en el tiempo en presencia de suelo..... 54

Figura 5-1. pH y conductividad eléctrica de la solución (mS cm<sup>-1</sup>) en función de la dosis de perlas de *Mortierella* sp. inoculadas (0, 150, 300, 450 y 600 mg) en la biosolubilización de roca fosfórica. Cada columna representa el promedio de cinco repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ )..... 61

Figura 5-2. Concentración de P y Ca en la solución (mg L<sup>-1</sup>) en función de la dosis de perlas de *Mortierella* sp. inoculadas (0, 150, 300, 450 y 600 mg) en la biosolubilización de roca fosfórica. Cada columna representa el promedio de cinco repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ )..... 62

Figura 5-3. Biomasa seca (mg) y número de esporas del hongo (esporas mL<sup>-1</sup>) en función de la dosis de perlas de *Mortierella* sp. inoculadas (0, 150, 300, 450 y 600 mg) en la biosolubilización de roca fosfórica. Cada columna representa el promedio de cinco repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan (P≤0.05). ..... 63

Figura 5-4. pH, número de esporas (1 mL<sup>-1</sup>), concentración de P y Ca en la solución (mg L<sup>-1</sup>) en el tiempo (días) en función de la inoculación (perlas de *Mortierella* sp.) o no (Control). Cada punto representa el promedio de cuatro repeticiones. La barra indica la mínima diferencia significativa (LSD). Los valores del LSD para pH, esporas, P y Ca soluble fueron 0.5, 10, 10 y 51, respectivamente. .... 64

Figura 5-5. Diagrama de disolución de la perla de alginato para la liberación de esporas de *Mortierella* sp., ciclo de crecimiento y reproducción del hongo y la solubilización de la RP (roca fosfórica) por los ácidos orgánicos producidos por el hongo y los protones generados por el consumo de fuentes amoniacales. Elaboración propia. .... 67

Figura 6-1. Concentración de P (mg L<sup>-1</sup>) (izquierda) y pH de la solución (derecha) para el suelo Lualualei en cuatro concentraciones iniciales de P (original, 0.05, 0.1, and 0.2 mg L<sup>-1</sup>). No inoculado (columnas blancas) e inoculado (columnas grises) con *Mortierella* sp. Cada columna representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan (P≤0.05). .... 78

Figura 6-2. Concentración de P (mg L<sup>-1</sup>) (izquierda) y pH de la solución (derecha) para el suelo Wahiawa en cuatro concentraciones iniciales de P (original, 0.05, 0.1, and 0.2 mg L<sup>-1</sup>). No inoculado (columnas blancas) e inoculado (columnas grises) con *Mortierella* sp. Cada columna representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan (P≤0.05). .... 78

Figura 6-3. Concentración de P (mg L<sup>-1</sup>) (izquierda) y pH de la solución (derecha) para el suelo Makapilli en cuatro concentraciones iniciales de P (original, 0.05, 0.1, and 0.2 mg L<sup>-1</sup>). No inoculado (columnas blancas) e inoculado (columnas grises) con *Mortierella* sp. Cada columna representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan (P≤0.05). .... 79

Figura 6-4. Concentración de P (mg L<sup>-1</sup>) (izquierda) y pH de la solución (derecha) para el suelo Makapilli en cuatro concentraciones iniciales de P (original, 0.05, 0.1, and 0.2 mg L<sup>-1</sup>). No inoculado (columnas blancas) e inoculado (columnas grises) con *Mortierella* sp. Cada columna representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan (P≤0.05). .... 80

Figura 6-5. Número de esporas para el suelo de Carimagua en cuatro concentraciones iniciales de P (original, 0.05, 0.1, and 0.2 mg L<sup>-1</sup>). No inoculado (columnas blancas) e inoculado (columnas grises) con *Mortierella* sp. Cada columna representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan (P≤0.05). .... 80

Figura 7-1. Altura de planta (cm), masa seca aérea (g) y contenido de P foliar (µg) en función de las dosis de perlas de alginato conteniendo *Mortierella* sp. inmovilizado (0, 150, 300 y 600 mg por

planta) y la inoculación micorrizal con *R. fasciculatum* en el suelo de Carimagua. No micorrizado (columnas blancas) e inoculado con *Mortierella* sp. (columnas negras). Cada columna representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ )..... 91

Figura 7-2. Colonización (%) micorrizal (izquierda), del solubilizador (derecha), en función de la inculcación micorrizal (*R. fasciculatum*) y la inoculación con *Mortierella* sp. inmovilizado alginato de calcio en diferentes concentraciones (0, 150, 300 y 600 mg por planta) en el oxisol. No micorrizado (columnas blancas) e inoculado (columnas grises) con *Mortierella* sp. Cada columna representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ )..... 93

Figura 7-3. Altura de planta (cm) en función de la inoculación individual y combinada con el HSP (*Mortierella* sp., inmovilizado) y HMA (*R. fasciculatum*) en tres suelos (Mollisol, Oxisol, Andisol). Cada columna representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ). Cada suelo es un experimento separado y por ello no comparten letras para comparación..... 94

Figura 7-4. Masa seca aérea (g) en función de la inoculación individual y combinada con el HSPi (*Mortierella* sp., inmovilizado) y HMA (*R. fasciculatum*) en tres suelos (Mollisol, Oxisol, Andisol). Cada columna representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ). Cada suelo es un experimento separado y por ello no comparten letras para comparación..... 95

Figura 7-5. Contenido de P foliar ( $\mu\text{g}$ ) en función de la inoculación individual y combinada con el HSPi (*Mortierella* sp., inmovilizado) y HMA (*R. fasciculatum*) en tres suelos (Mollisol, Oxisol, Andisol). Cada columna representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ). Cada suelo es un experimento separado y por ello no comparten letras para comparación..... 95

Figura 7-6. Colonización del solubilizador (%) en función de la inoculación individual y combinada con el HSPi (*Mortierella* sp., inmovilizado) y HMA (*R. fasciculatum*) en tres suelos (Mollisol, Oxisol, Andisol). Cada columna representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ). Cada suelo es un experimento separado y por ello no comparten letras para comparación..... 96

Figura 7-7. Colonización micorrizal (%) en función de la inoculación individual y combinada con el HSPi (*Mortierella* sp., inmovilizado) y HMA (*R. fasciculatum*) en tres suelos (Mollisol, Oxisol, Andisol). Cada columna representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ). Cada suelo es un experimento separado y por ello no comparten letras para comparación..... 97

Figura 7-8. Concentración de P, Ca, Mg, Fe y Mn ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en solución para los suelos: Carimagua, Guarne y Neira, inoculado o no con *Mortierella* sp. inmovilizado en alginato. No inoculado (columnas blancas) e inoculado (columnas grises) con *Mortierella* sp. Cada columna representa el promedio

de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ) ..... 100

Figura 7-9. pH de la solución y número de esporas de *Mortierella* sp. para los suelos de Carimagua, Guarne y Neira No inoculado (columnas blancas) e inoculado (columnas grises) con *Mortierella* sp. Cada columna representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ). ..... 101

## Lista de tablas

### Pág.

Tabla 2-1. Efectos benéficos de la coinoculación de HMA y MSP en diferentes especies vegetales. ....	21
Tabla 4-1. Clasificación taxonómica de los suelos de Colombia, ubicación, pH y materia orgánica (MO).....	47
Tabla 4-2. Características físicas de las perlas de <i>Mortierella</i> sp. en alginato de calcio antes (húmedas) y después del proceso de secado (40°C por 40 horas). Los datos son el promedio de 10 perlas. ....	48
Tabla 5-1. Parámetros de la biosolubilización de roca fosfórica por el hongo <i>Mortierella</i> sp. inmovilizado en alginato de calcio en el tiempo. ....	65
Tabla 6-1. Clasificación de suelos, ubicación, pH, valor $P_{0.2}$ y categoría de adsorción de P de acuerdo a (Juo and Fox, 1977) .....	75
Tabla 6-2. Cantidad de P adicionado ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) al suelo para alcanzar cuatro concentraciones de P en solución.....	76
Tabla 7-1. Clasificación de los suelos usados, y análisis físico químicos de estos. ....	86
Tabla 7-2. Incrementos relativos al inocular HSP ( <i>Mortierella</i> sp.), HMA ( <i>R. fasciculatum</i> ) y HSP+HMA en plantas de leucaenas con respecto al control no inoculado, en tres suelos con diferentes capacidades de fijación de P, baja (Mollisol), media (Oxisol) y alta (Andisol). Cada valor corresponde al valor del tratamiento dividido el valor de los controles.....	96

# Lista de Símbolos y abreviaturas

## Abreviaturas

### Abreviatura Término

---

MSP	Microorganismo solubilizador de fósforo
HSP	Hongo solubilizador de fósforo
P	Fósforo
IG	Índice de germinación
RP	Roca fosfórica
HMA	Hongo micorrizo arbuscular
Rf	<i>Rhizoglonus fasciculatum</i>
EDRP	Eficiencias de disolución de RP
C	Carbono
N	Nitrógeno
K	Potasio
MPCV	Microorganismos promotores del crecimiento vegetal
PGPR	Plant growth-promoting rhizobacteria
PGPB	Plant growth promoting bacteria
UFC	Unidades formadoras de colonia
PDA	Papa dextrosa agar
RPM	Revoluciones por minuto
H	Roca fosfórica de Huila
CN	Roca fosfórica de Carolina del Norte
S	Roca fosfórica de Santander
CMC	Carboximetilcelulosa
MO	Materia orgánica



# 1. Introducción

La deficiencia de fósforo (P) es un factor limitante para el desarrollo, crecimiento y productividad vegetal (Scholz et al., 2013; Ulrich y Frossard, 2014) que afecta 2016 millones de ha a nivel global (Fairhurst et al., 1999). Esta deficiencia es causada por reacciones de fijación de P que adsorben y precipitan fosfato en el suelo (Meason et al., 2009; Oberson et al., 2011). La deficiencia es particularmente severa en suelos altamente meteorizados y en suelos derivados de cenizas volcánicas (Liu et al., 2012).

Para corregir este problema se usan altas dosis de fertilizantes fosfóricos solubles (Asci et al., 2015; Heisey and Norton, 2007; Hue and Fox, 2010), pero su eficiencia usualmente es muy baja, esta entre un 5-10% (Bhatti and Yawar, 2010). Infortunadamente, estos fertilizantes son costosos (Cordell et al., 2009; Zhang et al., 2011; Walan et al., 2014), generan riesgos de contaminar el ambiente por eutrofización (Abouzeid, 2008; Aydin et al., 2010), y en su mayoría son importados, lo cual genera a su vez riesgos en la soberanía y seguridad alimentaria de los países que lo consumen (Cordell et al., 2009; Kaur et al., 2013; de Oliveira Souza et al., 2014; Pérez, 2014).

Hay un creciente interés en mejorar la eficiencia de la roca fosfórica como fertilizante y su uso en la síntesis de otros fertilizantes (Lassis et al., 2015; Siminovich and Joao, 2014) ya que este mineral es escaso y se estima que se agotaran las reservas en menos de 100 años (Cordell et al., 2009; Gilbert, 2009; Ulrich and Frossard, 2014). Entre las alternativas biotecnológicas para mejorar la disponibilidad de P en el suelo y la capacidad de absorción de este por las plantas está el uso de hongos solubilizadores de P (HSP) y hongos micorrizo arbusculares (HMA). Los primeros disuelven minerales fosfóricos (Khan et al., 2007; Osorno and Osorio, 2014; Singh and Reddy, 2011) y además pueden desorber P fijado en los suelos (Chen et al., 2006; Osorio and Habte, 2014; Pandey et al., 2006). Por otro lado, los HMA mejoran la eficiencia de las plantas para la absorción de P a través de la producción de hifas extraradicales, que exploran más volumen de suelo y captan más eficientemente el P que las raíces no-micorrizales (Habte, 2006). El uso de estos microorganismos es muy atractivo en el contexto de la agricultura más limpia (Khan et al., 2007; Cai et al., 2013; Kaur et al., 2013) donde se pretende evitar o reducir el consumo de agroquímicos y mantener rendimientos satisfactorios en los cultivos (Aydin et al., 2010; Vassilev et al., 2001).

Aunque se ha reportado efectos positivos al inocular individual y combinadamente estos microorganismos (Osorio and Habte, 2013; Zhang et al., 2011), no existe un uso extendido de estos. Varios autores reportan inconsistencias en los resultados al inocular con estos microorganismos (Jain et al., 2010; Khan et al., 2007; Whitelaw, 1999). Aunque se reconoce que la mineralogía del suelo puede jugar un papel importante en este punto (Osorio and Habte, 2014) se consideran que hay otros factores involucrados tales como la formulación de los inóculos y la viabilidad y persistencia de los microorganismos (Bashan et al., 2002; Jain et al., 2010; Leung et al., 2000). Estas condiciones presumiblemente se podrían mejorar inmovilizando estos microorganismos (HSP) en alginato para prolongar la viabilidad y efectividad de los hongos, tal como se ha hecho con otros microorganismos (de-Bashan and Bashan, 2010; Covarrubias et al., 2011; Martínez-Trujillo and García-Rivero, 2012; Vassileva et al., 2000).

## 1.1 Hipótesis

La solubilización de P por disolución de roca fosfórica y desorción de P fijado puede ser obtenida a partir del hongo *Mortierella* sp. libre e inmovilizado en alginato de calcio. Su efectividad puede ser controlada a través de la optimización de varios factores bioquímicos (cantidad de inóculo, fuente y cantidad de carbono y nitrógeno, tiempo de reacción, tipo de RP).

El efecto de este hongo inmovilizado sobre el crecimiento de plantas puede ser afectado por el tipo de suelo que controla la capacidad de fijación de P y la interacción con la asociación micorrizal.

## 1.2 Objetivo general

Evaluar el efecto de la aplicación de *Mortierella* sp. libre e inmovilizado con alginato sobre la solubilización de P y crecimiento de plantas de leucaena (*Leucaena leucocephala*) micorrizadas en diferentes tipos de suelos.

## 1.3 Objetivos específicos

- Determinar el efecto de factores bioquímicos sobre la bio-solubilización de roca fosfórica por el hongo *Mortierella* sp. libre.
- Formular la inmovilización del hongo solubilizador de P *Mortierella* sp. en alginato de calcio.
- Determinar la efectividad del hongo *Mortierella* sp. inmovilizado en alginato para disolver roca fosfórica.

- Estimar la efectividad del hongo *Mortierella* sp. inmovilizado en alginato para desorber P adsorbido en un oxisol.
- Evaluar la efectividad del hongo *Mortierella* sp. inmovilizado en alginato para disolver roca fosfórica en diferentes tipos de suelo bajo condiciones *in vitro*.
- Evaluar la efectividad de dosis variables del hongo *Mortierella* sp. inmovilizado en alginato para promover el crecimiento de P en plantas leucaena micorrizadas y no micorrizadas en un oxisol bajo condiciones de invernadero.
- Evaluar la efectividad del hongo *Mortierella* sp. inmovilizado en alginato para promover el crecimiento de P en plantas leucaena micorrizadas y no micorrizadas en diferentes tipos de suelos bajo condiciones de invernadero.

## 1.4 Referencias

- Abouzeid, A.-Z.M. (2008). Physical and thermal treatment of phosphate ores — An overview. *Int. J. Miner. Process.* 85, 59–84.
- Asci, S., Borisova, T., and VanSickle, J.J. (2015). Role of economics in developing fertilizer best management practices. *Agric. Water Manag.* 152, 251–261.
- Aydin, I., Aydin, F., Saydut, A., Bakirdere, E.G., and Hamamci, C. (2010). Hazardous metal geochemistry of sedimentary phosphate rock used for fertilizer (Mazıdag, SE Anatolia, Turkey). *Microchem. J.* 96, 247–251.
- Bashan, Y., Hernandez, J.-P., Leyva, L.A., and Bacilio, M. (2002). Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biol. Fertil. Soils* 35, 359–368.
- de-Bashan, L.E., and Bashan, Y. (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresour. Technol.* 101, 1611–1627.
- Bhatti, T.M., and Yawar, W. (2010). Bacterial solubilization of phosphorus from phosphate rock containing sulfur-mud. *Hydrometallurgy* 103, 54–59.
- Cai, L., Xiao, H.-R., Huang, S.-M., Li, H., and Zhou, G.-T. (2013). Solubilization of Magnesium-Bearing Silicate Minerals and the Subsequent Formation of Glushinskite by *Aspergillus niger*. *Geomicrobiol. J.* 30, 302–312.
- Chen, Y.P., Rekha, P.D., Arun, A.B., Shen, F.T., Lai, W.-A., and Young, C.C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl. Soil Ecol.* 34, 33–41.
- Cordell, D., Drangert, J.-O., and White, S. (2009). The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Glob. Environ. Change* 19, 292–305.
- Covarrubias, S.A., de-Bashan, L.E., Moreno, M., and Bashan, Y. (2011). Alginate beads provide a beneficial physical barrier against native microorganisms in wastewater treated with immobilized bacteria and microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 2669–2680.
- Fairhurst, T., Lefroy, R., Metert, E., and Batjes, N. (1999). The importance, distribution and causes of phosphorus deficiency as constraint to crop production in the tropics. *Agrofrestry Forum* 9, 2–8.
- Gilbert, N. (2009). Environment: The disappearing nutrient. *Nat. News* 461, 716–718.

- Habte, M. (2006). The roles of arbuscular mycorrhizas in plant and soil health. In *Biological Approaches to Sustainable Soil Systems*, (CRC Press), pp. 129–147.
- Heisey, P.W., and Norton, G.W. (2007). Chapter 53 Fertilizers and other farm chemicals. In *Handbook of Agricultural Economics*, R.E. and P. Pingali, ed. (Elsevier), pp. 2741–2777.
- Hue, N.V., and Fox, R.L. (2010). Predicting Plant Phosphorus Requirements for Hawaii Soils using a Combination of Phosphorus Sorption Isotherms and Chemical Extraction Methods. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 41, 133–143.
- Jain, R., Saxena, J., and Sharma, V. (2010). The evaluation of free and encapsulated *Aspergillus awamori* for phosphate solubilization in fermentation and soil–plant system. *Appl. Soil Ecol.* 46, 90–94.
- Kaur, S., Dhillon, G.S., Brar, S.K., Chauhan, V.B., Chand, R., and Verma, M. (2013). Potential Eco-friendly Soil Microorganisms: Road Towards Green and Sustainable Agriculture. In *Management of Microbial Resources in the Environment*, A. Malik, E. Grohmann, and M. Alves, eds. (Springer Netherlands), pp. 249–287.
- Khan, M.S., Zaidi, A., and Wani, P.A. (2007). Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture — A review. *Agron. Sustain. Dev.* 27, 29–43.
- Lassis, M., Mizane, A., Dadda, N., and Rehamnia, R. (2015). Dissolution of Djebel Onk phosphate ore using sulfuric acid. *Environ. Nanotechnol. Monit. Manag.*
- Leung, K.T., So, J.-S., Kostrzynska, M., Lee, H., and Trevors, J.T. (2000). Using a green fluorescent protein gene-labeled p-nitrophenol-degrading *Moraxella* strain to examine the protective effect of alginate encapsulation against protozoan grazing. *J. Microbiol. Methods* 39, 205–211.
- Liu, L., Gundersen, P., Zhang, T., and Mo, J. (2012). Effects of phosphorus addition on soil microbial biomass and community composition in three forest types in tropical China. *Soil Biol. Biochem.* 44, 31–38.
- Martínez-Trujillo, M.A., and García-Rivero, M. (2012). Revisión: Aplicaciones ambientales de microorganismos inmovilizados. *Rev. Mex. Ing. Quím.* 11, 55–73.
- Meason, D.F., Idol, T.W., Friday, J.B., and Scowcroft, P.G. (2009). Effects of fertilisation on phosphorus pools in the volcanic soil of a managed tropical forest. *For. Ecol. Manag.* 258, 2199–2206.
- Oberson, A., Pypers, P., Bünemann, E.K., and Frossard, E. (2011). Management Impacts on Biological Phosphorus Cycling in Cropped Soils. In *Phosphorus in Action*, E. Bünemann, A. Oberson, and E. Frossard, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 431–458.
- de Oliveira Souza, S., da Costa, S.S.L., Santos, D.M., dos Santos Pinto, J., Garcia, C.A.B., Alves, J. do P.H., and Araujo, R.G.O. (2014). Simultaneous determination of macronutrients, micronutrients and trace elements in mineral fertilizers by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 96, 1–7.
- Osorio, N.W., and Habte, M. (2013). Synergistic effect of a phosphate-solubilizing fungus and an arbuscular mycorrhizal fungus on leucaena seedlings in an Oxisol fertilized with rock phosphate. *Botany* 91, 274–281.

- Osorio, N.W., and Habte, M. (2014). Soil Phosphate Desorption Induced by a Phosphate-Solubilizing Fungus. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 45, 451–460.
- Osorno, L., and Osorio, N.W. (2014). Effect of Carbon and Nitrogen Source and Concentration on Rock Phosphate Dissolution Induced by Fungi. *J. Appl. Biotechnol.* 2, 1–11.
- Pandey, A., Trivedi, P., Kumar, B., and Palni, L.M.S. (2006). Characterization of a Phosphate Solubilizing and Antagonistic Strain of *Pseudomonas putida* (B0) Isolated from a Sub-Alpine Location in the Indian Central Himalaya. *Curr. Microbiol.* 53, 102–107.
- Pérez, J.P. (2014). Uso de los fertilizantes y su impacto en la producción agrícola. masters. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.
- Scholz, R.W., Ulrich, A.E., Eilittä, M., and Roy, A. (2013). Sustainable use of phosphorus: A finite resource. *Sci. Total Environ.* 461–462, 799–803.
- Siminovich, C., and Joao, S. (2014). Dynamic Operator Training Simulators for Sulphuric Acid, Phosphoric Acid, and DAP Production Units. *Procedia Eng.* 83, 215–224.
- Singh, H., and Reddy, M.S. (2011). Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. *Eur. J. Soil Biol.* 47, 30–34.
- Ulrich, A.E., and Frossard, E. (2014). On the history of a reoccurring concept: Phosphorus scarcity. *Sci. Total Environ.* 490, 694–707.
- Vassilev, N., Vassileva, M., Azcon, R., and Medina, A. (2001). Application of free and Calcium alginate-entrapped *Glomus deserticola* and *Yarrowia lipolytica* in a soil–plant system. *J. Biotechnol.* 91, 237–242.
- Vassileva, M., Azcon, R., Barea, J.-M., and Vassilev, N. (2000). Rock phosphate solubilization by free and encapsulated cells of *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochem.* 35, 693–697.
- Walan, P., Davidsson, S., Johansson, S., and Höök, M. (2014). Phosphate rock production and depletion: Regional disaggregated modeling and global implications. *Resour. Conserv. Recycl.* 93, 178–187.
- Whitelaw, M.A. (1999). Growth Promotion of Plants Inoculated with Phosphate-Solubilizing Fungi. In *Advances in Agronomy*, D.L. Sparks, ed. (Academic Press), pp. 99–151.
- Zhang, H., Wu, X., Li, G., and Qin, P. (2011). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing fungus (*Mortierella* sp.) and their effects on *Kosteletzkya virginica* growth and enzyme activities of rhizosphere and bulk soils at different salinities. *Biol. Fertil. Soils* 47, 543–554.



## 2.Revisión de literatura<sup>1</sup>

### 2.1 Dinámica del fósforo en suelos tropicales

El fósforo (P) es un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Estas lo adquieren de la solución del suelo en forma de aniones fosfatos:  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$ . Sin embargo, la disponibilidad del P en el suelo es uno de las mayores limitantes para alcanzar altos rendimientos de los cultivos de muchas especies vegetales en el trópico (Wakelin et al., 2004). Lamentablemente, muchos de los suelos son deficientes en formas disponibles de P para las plantas. Esto es debido a que los suelos tropicales y subtropicales son altamente meteorizados, extremadamente ácidos, dominados por óxidos e hidróxidos de hierro y aluminio (Shen et al., 2011; Martins da Costa et al., 2015; Liu et al., 2012; de Campos et al., 2016), y además tiene una alta capacidad de fijación de este elemento (Khan et al., 2007). Una gran porción (95-99%) del P soluble inorgánico aplicado en los fertilizantes es rápidamente fijado o inmovilizado a formas no disponibles para las plantas (Gyaneshwar et al., 2002; Bhatti and Yawar, 2010). El término fijación describe las reacciones que remueven el P disponible de la solución del suelo (Barber, 1995). Hay dos tipos de reacciones de fijación de P (Collavino et al., 2010):

- La adsorción de P en la superficie de los minerales del suelo (arcillas y óxidos).
- La precipitación con  $\text{Al}^{3+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  libres en la solución de suelos ácidos, y con  $\text{Ca}^{2+}$  en suelos neutros o alcalinos.

Con la formación de estos compuestos tan insolubles se disminuye la disponibilidad de P para las plantas (Collavino et al., 2010; Wakelin et al., 2004). Por lo anterior, el P es un nutriente de poca movilidad en el suelo debido a su gran reactividad con los constituyentes

---

<sup>1</sup> Apartes de este capítulo fueron publicados:

- Osorio, N. W., Osorno, L., León, J. D., & Álvarez, C. (2017). Plant-Microbe Interactions for Phosphate Management in Tropical Soils. In *Essential Plant Nutrients* (pp. 491-512). Springer, Berlin.
- Osorio W, Osorno L (2014) Biofertilization with mycorrhizal fungi and phosphate solubilizing microorganisms enhance effectiveness of phosphate fertilizers in tropical soils (Chapter book 9). In: Fertilizer Technology Vol. II: Biofertilizer. pp. 298-326. ISBN: 9781626990456. Editorial Studium Press LLC, Ed Shishir Sihan, K.K. Pant, S. Bajpai, J.N. Govil.

que lo retienen fuertemente (Hinsinger, 2001). Por otro lado, el P es uno de los elementos más afectados por el proceso de degradación de los suelos, particularmente cuando hay pérdida de materia orgánica por procesos erosivos (Rosas et al., 2006). Adicionalmente, la disponibilidad del P en la solución del suelo también puede ser afectada por la inmovilización microbial (Bojinova et al., 2008; Oliveira et al., 2009; Bünemann et al., 2011).

En el suelo el P puede estar en formas orgánicas e inorgánicas (Alam et al., 2002). Las formas orgánicas se encuentran en la materia orgánica humificada (humus) y material orgánico fresco (hojarasca representada por tejidos de plantas, estiércol de animales y las células muertas de microorganismos), principalmente como: fosfolípidos, ácidos nucleicos y fosfatos de inositol, estas pueden constituir entre el 4-90% del P total del suelo (Tisdale and Nelson, 1982; Condrón et al., 2005; Mohammadi, 2012). Los componentes orgánicos de P pueden ser lentamente convertidos a P inorgánico en un proceso llamado mineralización, el cual está mediado por la actividad de enzimas fosfatasas (P-asa) que liberan los microorganismos del suelo (Khan et al., 2007). Igualmente, el P puede estar temporalmente inmovilizado en la células vivas de microorganismos, este es más significativo cuando el P soluble es escaso en el suelo (Zaidi et al., 2009). El P inorgánico está representado por los fertilizantes fosfóricos aplicados, el P precipitado con Fe, Al o Ca y el fijado con las arcillas del suelo.

El P libre inorgánico en la solución del suelo juega un papel fundamental en el ciclo biogeoquímico de este elemento (Scervino et al., 2010). Los microorganismos modifican la disponibilidad de P para las plantas, (Bojinova et al., 2008; Oliveira et al., 2009), y hacen partes de los siguientes procesos:

- Solubilización de P-inorgánico.
- Mineralización del P-orgánico.
- Disolución de los precipitados de P.
- Desorción del P adsorbido.
- Reversar la inmovilización del P en las células.

Así mismo, la absorción del P por las plantas puede ser mediada por hongos formadores de micorrizas (Osorio and Habte, 2001). De esta manera, la dinámica del P disponible en el suelo está determinada, al menos en parte, por la actividad microbial del suelo.

## 2.2 Fertilización fosfórica

Una de las estrategias para aumentar la disponibilidad de P en suelos tropicales con alta capacidad de fijación de P, consiste en aplicar altas cantidades de fertilizantes fosfóricos solubles (500-1000 mg de P kg<sup>-1</sup>), seguido por pequeñas cantidades aplicadas anualmente. Sin embargo, este proceso es ineficiente y costoso, ya que entre 90 y 95%

del P aplicado es fijado en el suelo en formas que no son disponibles para las plantas (Khasawneh et al., 1980).

Por otro lado, las rocas fosfóricas (RP) son altamente recomendadas para la fertilización de suelos ácidos con alta capacidad de fijación. Estas son más económicas, pero desafortunadamente son muy insolubles. En este contexto se han desarrollado varias investigaciones para mejorar la efectividad agronómica de la RP en los suelos cultivados. Una alternativa es inocular la RP con microorganismos solubilizadores de P, los cuales pueden mejorar su disolución, incrementando así la cantidad de P para las plantas (Kucey et al., 1989; Whitelaw, 1999; Khan et al., 2007).

### 2.2.1 Roca fosfórica

En la naturaleza la principal fuente de P inorgánico es la RP. Estas son minerales derivados del ácido ortofosfórico, conocidas con el nombre de apatitos o apatitas. Una vez que la roca se extrae de la mina, se muele y se empaca para ser aplicada directamente a los suelos cultivados. El nombre comercial “roca fosfórica” es usado por al menos 300 fosfatos de diferentes calidades en el mundo (Hammond and Day, 1992). Su composición química general es  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH}, \text{F}, \text{Cl})$ , cuando el  $\text{F}^-$  es predominante recibe el nombre de fluorapatito o fluorfosfato cálcico [ $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ ]; si el  $\text{OH}^-$  es predominante se llama hidroxilapatito [ $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ]. La predominancia de  $\text{Cl}^-$  es menos frecuente y se llama cloroapatito [ $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$ ]. Los aniones  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{OH}^-$  puede substituirse entre sí, dando origen a una formula isomorfa completa. En Colombia, los fosfatos minerales son en su mayoría carbonato apatitas, en los cuales el fosfato ha sido parcialmente sustituido por carbonato y flúor, mientras que el Ca ha sido parcialmente sustituido por sodio y magnesio. Los apatitos son minerales frecuentes que aparecen como accesorios de todas las clases de rocas ígneas, sedimentarias y metamórficas. Se halla también en pegmatitas y filones, probablemente de origen hidrotermal. También en las masas magnéticas titaníferas. Ocasionalmente se concentran en depósitos grandes o en filones asociados a las rocas alcalinas (Klein and Hurlbut, 1960).

Cerca del 80% de la producción mundial de RP proviene de depósitos de origen sedimentario marino (p.e., Colombia), 17% es de origen ígneo y de productos derivados de su meteorización, el resto proviene de los depósitos sedimentarios residuales y de tipo guano (Zapata and Roy, 2004).

Los depósitos de RP están ampliamente distribuidos en todo el mundo tanto geográficamente como geológicamente. Los depósitos que cuentan con la mayor producción mundial de RP se hallan en Marruecos y otros países de África, Estados Unidos, Medio Oriente y en la China. La mayor parte son depósitos sedimentarios que contienen fluorapatita carbonatada (Zapata and Roy, 2004). Además, existen grandes yacimientos de apatito en Noruega, Suecia, Canadá, Rusia, Suiza, España, Uganda, Zimbabwe, Finlandia y Brasil (Gilbert, 2009; Klein and Hurlbut, 1960).

En Colombia las minas de apatito se encuentran a lo largo de la Cordillera Oriental, desde Sardinata en Norte de Santander hasta el sur del Huila, aflorando en numerosos sitios a lado y lado de sus vertientes. En el Departamento del Norte de Santander se encuentra en los municipios de Sardinata, Lourdes y Gramalote, en Santander en el municipio de San Vicente de Chucurrí. En Boyacá se puede encontrar en Sogamoso, Monguí, Tota, Tunja, Samaná, Turmequé, Toca, Pesca, y Jenesano. En el Huila se encuentra en los municipios de Palermo, Aipe, Teurel, Yaguará y Tesalia y en el Departamento del Tolima en Coyaima, Ortega, Iconozco y Pandi. Estas rocas fosfóricas se presentan en facies geológicas de tipo areniscas, de lutitas y de calizas (Suescun, 1899).

Las minas más conocidas son las de Huila, Sardinata y Pesca. El yacimiento de Sardinata tiene un contenido de P, expresado como  $P_2O_5$ , de 34%, y sus reservas llegan casi a 10 millones de toneladas.

### 2.2.2 Roca fosfórica como fertilizante

La industrial mundial de los fertilizantes fosfóricos está basada en la explotación de los depósitos de RP. A diferencia de otros productos como el hierro, cobre y azufre, las RP tienen escasa oportunidad de sustitución o reciclado. Ocupa el segundo puesto de minerales (excluido el carbón y los hidrocarburos) en peso y volumen brutos en el comercio internacional (Zapata and Roy, 2004). La industria de los fertilizantes consume cerca del 90% de la producción mundial de RP, el 10% restante se usa en la industria de suplementos para alimentación animal y detergentes (Hammond and Day, 1992).

La RP como fertilizante fosfórico es poco soluble (Pramanik et al., 2009; Reddy et al., 2002) y de baja efectividad agronómica (Vassileva et al., 2000); se usa como materia prima para la síntesis de fertilizantes más solubles (Bhatti and Yawar, 2010; Reyes et al., 2001). Algunos autores han reportado que el uso de fertilizantes fosfóricos solubles es una práctica costosa y afecta la diversidad microbial del suelo (Gyaneshwar et al., 2002; Zhang et al., 2011).

El principal problema con la aplicación directa de RP al suelo es su insolubilidad (Sahu and Jana, 2000), además el bajo porcentaje soluble es fijado en el suelo. Se considera que el uso de RP es más económico que la aplicación de fertilizantes fosfóricos solubles (Sahu and Jana, 2000). Una ventaja de la aplicación de RP es que ésta es considerada como un abono “verde” o natural, aceptado en la agricultura orgánica (Zapata and Roy, 2004).

La RP es usada a gran escala, pero este recurso es finito y no-renovable (Vassileva et al., 2009). El crecimiento de la explotación minera de RP y la demanda de esta en el mundo han estado creciendo alrededor de 3% por año desde el año 2008, al igual que su precio.

De acuerdo a la U.S. Geological Survey se estima que las reservas de RP de fácil acceso duraran solo por 125 años más, otros autores estiman que a nivel mundial las minas de RP de fácil acceso se agotarán en menos de 100 años (Gilbert, 2009). Esto pone en riesgo la seguridad alimentaria a nivel global. Por lo anterior, el uso adecuado de las RP como

fertilizante es estratégico en Colombia. Esto no significa que se agotarán las fuentes de P, sino los depósitos fácilmente minables y así pueden cambiar las formas o la localización del P, o el costo para extraerlo (Dibb, 2004).

### 2.2.3 Solubilización de roca fosfórica

Con el fin de aumentar la solubilidad del fósforo y mejorar la efectividad de la RP, en la investigación se han considerado varios métodos como:

- Acidulación química con ácido sulfúrico y fosfórico (Gyaneshwar et al., 2002; Reddy et al., 2002; Whitelaw, 1999; Xiao et al., 2008).
- Acidulación (Bioacidulación o biosolubilización) con microorganismos solubilizadores de fósforo (MSP) (Jayasinghearachchi and Senevirate, 2006; Osorio, 2008; Singh and Reddy, 2011; Vassilev et al., 2006; Whitelaw, 1999) capaces de producir ácidos orgánicos.
- Mezcla de RP con residuos agroindustriales como sustrato carbonáceo para los MSP (Vassileva et al., 2009).
- Disminución del tamaño de partícula, mediante molido fino del material (micronización).
- Mezclas de RP con azufre elemental.
- Alteraciones de las rocas mediante tratamientos térmicos.
- Métodos de aplicación al suelo (localizado en bandas cercanas a las raíces).
- Mezcla de RP con enmiendas orgánicas: estiércol, residuos de cosecha, abonos verdes, compost (Msolla et al., 2005; Shrivastava et al., 2007; Yusdar et al., 2007).

El uso de MSP (microorganismos solubilizadores de P) para disolver RP y volverla más soluble está enfocado en una agricultura sostenible, una agricultura verde, con prácticas más amigables con el medio ambiente que mantiene un balance ecológico en el suelo. El uso de inoculantes microbiales o biofertilizantes es considerado como una alternativa al uso de los fertilizantes químicos (Khan et al., 2007). Adicionalmente con el uso de MSP se disminuyen los costos de operación y se puede usar de una manera más efectiva la RP, evitando el consumo excesivo de ésta (Vassilev et al., 2009; Vassileva et al., 2009).

Sin embargo, es importante conocer los factores que afectan la efectividad de los MSP para disolver RP, tales como: el tipo de microorganismo (Narsian and Patel, 2000), factores nutricionales, fisiológicos y de las condiciones de crecimiento en el medio de cultivo (Adham, 2002; Ates et al., 2002; Cunningham and Kuiack, 1992; Haq et al., 2003; Nahas, 2007), y del tipo de RP empleada (Schneider et al., 2010).

## 2.3 Microorganismos solubilizadores de P

Muchos microorganismos del suelo participan en la transformación de P en el suelo, haciendo así parte integral del ciclo biogeoquímico del P (Chen et al., 2003). Algunos de estos pueden disolver compuestos de P orgánicos (Alikhani et al., 2007; Tallapragada and Seshachala, 2012) e inorgánicos (Gyaneshwar et al., 2002; Oliveira et al., 2009; Rao, 1982). La diferencia entre estos dos tipos de microorganismos no sólo está en la fuente de P que usan sino en los mecanismos que desarrollan para solubilizarla. Así la disolución del P-mineral se hace por medio de ácidos orgánicos, mientras que la disolución de P-orgánico es mediante enzimas fosfatasas. La solubilización de P hace biodisponible este elemento (como fosfato) en la solución del suelo para las plantas (Oberson et al., 2011; Selvakumar et al., 2013). Las plantas al crecer mejor pueden excretar compuestos carbonáceos, los cuales son utilizados metabólicamente por los microorganismos para producir eficientemente más ácidos orgánicos o enzimas, según sea el caso (Deubel et al., 2000).

Los MSP pueden encontrarse en el suelo, en la rizosfera, en el suelo no-rizosférico, en el rizoplano, y aún en los depósitos de RP (Bowen and Rovira, 1999; Kucey, 1987; Zaidi et al., 2009). El número de MSP varía de acuerdo al tipo de suelo (Khan et al., 2007). Sin embargo, la densidad de estos puede ser muy baja en el suelo; alrededor de  $10^2$ - $10^3$  UFC  $g^{-1}$  han sido reportados (Osorio and Habte, 2001; Peix et al., 2001). En el suelo las bacterias y los hongos solubilizadores de P constituyen un 1% del total de la población del suelo (Kucey, 1983).

Se han reportado diferentes funciones de los MSP que favorece el crecimiento de las plantas (Vassilev et al., 2006; Vassileva et al., 2009; Zaidi et al., 2009): (i) proveen P a las plantas, (ii) promueven el crecimiento de las plantas, (iii) sintetizan sustancias promotoras del crecimiento tales como sideróforos y antibióticos, (iv) estimulan la eficiencia de fijación de  $N_2$ , (v) mejoran la accesibilidad a otros elementos trazas, (vi) proveen protección a la planta en contra de patógenos y (vii) mejoran la fertilidad de los suelos. También se conoce la capacidad de los MSP para desorber P de suelos (Bashan et al., 2012; Chen et al., 2003; Osorio and Habte, 2014; Pandey et al., 2006) y el uso de los MSP para remover P de sedimentos para prevenir eutroficación en lagos y estanques (Kim et al., 2005).

Entre los MSP efectivos hay bacterias de los géneros *Pseudomonas* (Bar-Yosef et al., 1999; Kim et al., 1998; Rosas et al., 2006), *Enterobacter* (Kim et al., 1998), *Bacillus* (Chen et al., 2006; Kim et al., 1998), *Burkholderia* (Song et al., 2008), *Serratia* (Chen et al., 2006; Hameeda et al., 2006), *Citrobacter* (Patel et al., 2008), *Xanthomonas* (Sharan et al., 2008), *Rhizobium* (Alikhani et al., 2007), *Azospirillum* (Rodriguez et al., 2004), *Lebsiella* (Chung et al., 2005).

En cuanto los hongos hay de los géneros *Penicillium* (Morales et al., 2007; Reyes et al., 2001; Wakelin et al., 2004), *Aspergillus* (Bojinova et al., 2008; Vassilev et al., 1997; Vassileva et al., 1998; Whitelaw, 1999) y *Mortierella* (Osorio and Osorno, 2014; Osorno and Osorio, 2014, 2017; Zhang et al., 2011). También levaduras y especies de actinomicetos se han reportado como MSP (Hamdali et al., 2008, 2010).

Aunque las bacterias han recibido mayor atención, varios autores han indicado que los hongos pueden ser más efectivos solubilizando P (Arora et al., 2010; Kucey, 1983; Osorio and Habte, 2009). Además, después de varios subcultivos las bacterias solubilizadoras de P pueden perder su capacidad solubilizante, mientras que los subcultivos de hongos solubilizadores de P pueden mantener tal capacidad (Whitelaw, 1999). Además, las hifas de los hongos pueden crecer en contacto con la superficie de la RP, solubilizándola como resultado de sus actividades metabólicas, formando biotúneles en el mineral lo que fracciona la RP y facilita la biosolubilización (Bermanec et al., 2012; Osorio et al., 2017). Sin embargo, otros autores indican que los hongos pueden inmobilizar más P que las bacterias (Alam et al., 2002).

Osorio (2008) aisló varios MSP de la rizósfera de *Leucaena leucocephala* que se encontraban creciendo naturalmente en tres suelos de Hawaii (Andisol, Oxisol y Vertisol) y encontró que el más efectivo fue un hongo identificado como *Mortierella* sp., el cual incrementó la absorción de P en leucaena. Por su parte, Chen et al. (2006) aislaron y caracterizaron 35 cepas bacterianas con capacidad solubilizadora en un suelo tropical de Taiwan, los géneros que encontraron fueron: *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Serratia*, *Chryseobacterium*, *Delftia*, *Gordonia* y *Phyllobacterium*. La capacidad solubilizadora de estas cepas fue asociada con la producción de ácidos orgánicos que al disminuir el pH de medio disuelve la RP e incrementa el P soluble.

Debido al fácil aislamiento de los MSP muchos estudios han investigado el efecto de la inoculación con estos microorganismos en el suelo sobre el crecimiento de plantas y absorción de P (Gyaneshwar et al., 2002; Marschner, 2008). La respuesta a la inoculación con MSP depende de varios factores, tales como: la composición y propiedades del suelo, la capacidad buffer del suelo, el tipo de cultivo y la microflora acompañante (Kucey et al., 1989). En algunos casos, respuestas negativas a las inoculaciones se pueden deber al pobre crecimiento y sobrevivencia de los MSP, que puede ser causada por la falta de nutrientes y/o la competencia con la microflora nativa (Marschner, 2008). La fuente de nitrógeno y carbono son muy limitantes en la efectividad de los MSP (Gyaneshwar et al., 2002). Así mismo, la capacidad de fijación de P del suelo puede determinar la efectividad de los MSP para promover el crecimiento vegetal (Osorio, 2008).

Varios autores han reportado efectos benéficos al inocular con MSP de manera individual en diferentes cultivos, como *Aspergillus* (Babana and Antoun, 2006; Mittal et al., 2008; Jain et al., 2010, 2012), *Pseudomonas* (Selvakumar et al., 2013), *Enterobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, (Collavino et al., 2010), *Mortierella* (Osorio and Habte, 2013), *Acinetobacter* (Ogut et al., 2010), *Penicillium* (Morales et al., 2007) y *Bacillus* (Mohammadi, 2012). También se han reportado efectos sinérgicos en el crecimiento de las plantas al inocular MSP con otras bacterias, ya que la co-inoculación puede proveer mayor balance nutricional para la planta (Belimov et al., 1995; Rosas et al., 2006). Así, se han encontrado efectos favorables con *Rhizobium* (Rosas et al., 2006) y especialmente hongos micorrizo arbusculares, los cuales han mostrado estimulación en el

crecimiento en plantas en suelos deficientes de P (Kim et al., 1998; Londoño Usuga, 2010; Osorio and Habte, 2001, 2009; Piccini and Azcon, 1987). Shankaraiah et al., (2000) encontraron que la adición de los MSP *Bacillus megaterium*, *Aspergillus awamori* y *Agrobacterium radiobacter* mejoraron el rendimiento del cultivo de caña de azúcar en un 10% y disminuyeron el costo de fertilización en un 25%.

Por otro lado, se ha evaluado la aplicación directa de MSP en suelos alcalinos, neutros y ácidos y sin plantas. En suelos neutros o alcalinos, la producción de ácidos por los MSP ha disminuido el pH de la rizosfera, favoreciendo la disolución de fosfatos de calcio nativos del suelo y de RP aplicada (Kim et al., 1998). En los suelos ácidos altamente meteorizados del trópico hay pocas cantidades de fosfato de calcio. En este tipo de suelos los MSP pueden solubilizar compuestos de fosfatos de aluminio y hierro (Bashan et al., 2013; Bolan et al., 1994). Sin embargo, Osorio (2008) encontró que la solubilización microbiana de P en un Oxisol (rico en fosfato de hierro y aluminio) sólo ocurrió con la presencia de fosfatos de calcio en el suelo, producto de la adición de RP. No obstante, Bolan et al. (1994) afirma que los iones de Al y de Fe en solución pueden ser complejados por aniones orgánicos (oxalato y citrato), lo cual favorece la disolución *in vitro* de fosfatos de Al y Fe.

### 2.3.1 Mecanismos de biosolubilización de P

Diferentes mecanismos se han propuesto para explicar la solubilización microbiana de compuestos inorgánicos de P:

- Producción de ácidos orgánicos o sus bases conjugadas (Bar-Yosef et al., 1999; Marschner, 2008; Hameeda et al., 2006).
- Excreción de protones debido a la asimilación de  $\text{NH}_4^+$  por los microorganismos (Kucey, 1983; Roos and Luckner, 1984; Whitelaw, 1999).
- Desorción de iones P de los sitios de adsorción (He and Zhu, 1998; Osorio, 2008; Osorio and Habte, 2012; Osorio et al., 2018).
- Quelatación de Ca, Al y Fe (Bar-Yosef et al., 1999; Iyamuremye et al., 1996; Marschner, 2008; Richardson et al., 2001; Ryan et al., 2001).
- Competencia de los aniones orgánicos producidos por los MSP con los iones fosfato por los sitios de adsorción en las superficies de los minerales arcillosos del suelo (Bolan et al., 1994; Nahas, 1996; Osorio, 2008).

La capacidad para disolver P mineral de los MSP está relacionada con la producción de ácido orgánico que reducen el pH del medio como resultado de su actividad metabólica (Wakelin et al., 2004) y permiten la formación de complejos orgánico-minerales, jugando un papel importante en la economía del P (Richardson et al., 2001; Ryan et al., 2001; Scervino et al., 2010). Algunos de los ácidos orgánicos o sus respectivos aniones, comúnmente asociados con la solubilización microbiana de P, son el ácido glucónico (Bar-Yosef et al., 1999; Chen et al., 2003; Ogut et al., 2010; Rodríguez et al., 2004); ácido oxálico (Alam et al., 2002; Osorio, 2008), ácido cítrico (Chen et al., 2006; Kim et al., 1997; Kucey

et al., 1989), ácido tartárico (Fankem et al., 2006), ácido aspártico (Fankem et al., 2006), ácido nítrico (Azam y Memon, 1996), ácido sulfúrico (Bhatti and Yawar, 2010; Chi et al., 2006), ácido láctico, ácido succínico (Chen et al., 2006; Nisha and Venkateswaran, 2011; Vazquez et al., 2000) ácido propiónico (Chen et al., 2006), isovalérico, isobutírico, acético (Vazquez et al., 2000) y ácido málico (Fankem et al., 2006).

Estos ácidos son productos del metabolismo microbial, en algunos casos por respiración oxidativa o por fermentación de sustratos carbonáceos (glucosa) (Bhatti and Yawar, 2010; Chi et al., 2006).

### **2.3.2 *Mortierella* sp.**

Este hongo pertenece al género *Mortierella*, está en el Phylum: Glomeromycota, Clase: Glomeromycetes, Subphylum: Mucoromycotina y Orden: Mortierellales (James et al., 2006; Hibbett et al., 2007).

Es un hongo filamentoso del suelo que actúa tanto como saprofito y como endofito. Este género prefiere fuentes de carbono simples para su crecimiento y reproducción, tiene rápido crecimiento y proliferación, su micelio es blanco (Figura 2-1, izquierda) y dentro de su micelio tiene las esporangiosporas (Dyal and Narine, 2005).

Es reconocido como un hongo solubilizador de P inorgánico por la producción de ácidos orgánicos como ácido oxálico y cítrico (Osorio, 2008; Zhang et al., 2011), tolerante a la acidez y el aluminio, a la sequía y al fungicida benomyl (Osorio, 2008). En la Figura 2-1 (derecha) se puede ver el hongo creciendo en medio de cultivo con azul de bromotimol como indicador de pH y RP como única fuente de P, alrededor del hongo se puede ver un halo amarillo por la producción de ácidos por el hongo con el fin de solubilizar la RP y obtener el P.

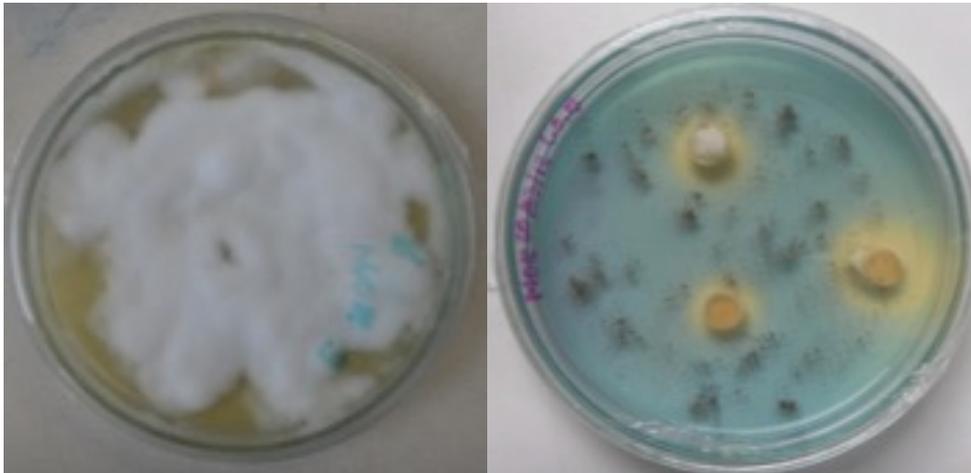


Figura 2-1. Micelio blanco de *Mortierella* sp. en medio de cultivo PDA (izquierada), Producción de ácidos orgánicos (halos amarillos) por *Mortierella* sp. creciendo en medio con roca fosfórica como única fuente de P (derecha).

*Mortierella* sp. además de la producción de ácidos orgánicos tiene la capacidad de crecer fácilmente sobre superficies, como la de la RP, las hifas del hongo crecen alrededor y dentro del mineral, formando bio-túneles que favorece la solubilización de la roca como se puede ver en la Figura 2-2, tomado de Osorio et al., 2017.

Se reconocen varios beneficios de *Mortierella* sp. en la agricultura:

- Solubilizar o disolver minerales y compuestos fosfóricos (Osorio, 2011; Osorno and Osorio, 2014, 2017; Xiao et al., 2008).
- Desorber P fijado en el suelo (Osorio and Habte, 2014).
- Producir enzimas para solubilizar P orgánico (fitato) (Alvarez, 2012).
- Mejorar la eficiencia de los fertilizantes P en el suelo (Osorio and Osorno, 2014).
- Presenta sinergismo con microorganismos que ayudan a absorber P para la planta (hongo micorrizico arbusculares) (Osorio, 2011; Osorio and Habte, 2001, 2015; Osorio et al., 2017; Ramirez et al., 2013; Tamayo-Velez and Osorio, 2016).
- Disolver otros minerales de K, Si, Mg y Ca como feldespatos de potasio y silicatos de magnesio (Salazar, 2017).
- Promover el crecimiento vegetal (Londoño, 2017; Londoño Usuga, 2010; Moreno et al., 2016; Tamayo-Velez and Osorio, 2016).
- Mejorar el tiempo de vida en florero en crisantemo y la biodisponibilidad de elementos menores en el suelo para este cultivo (Londoño, 2017).
- Ayudar a la descomposición de hojarasca o materia orgánica y liberación de nutrientes (Tamayo-Velez, 2016).

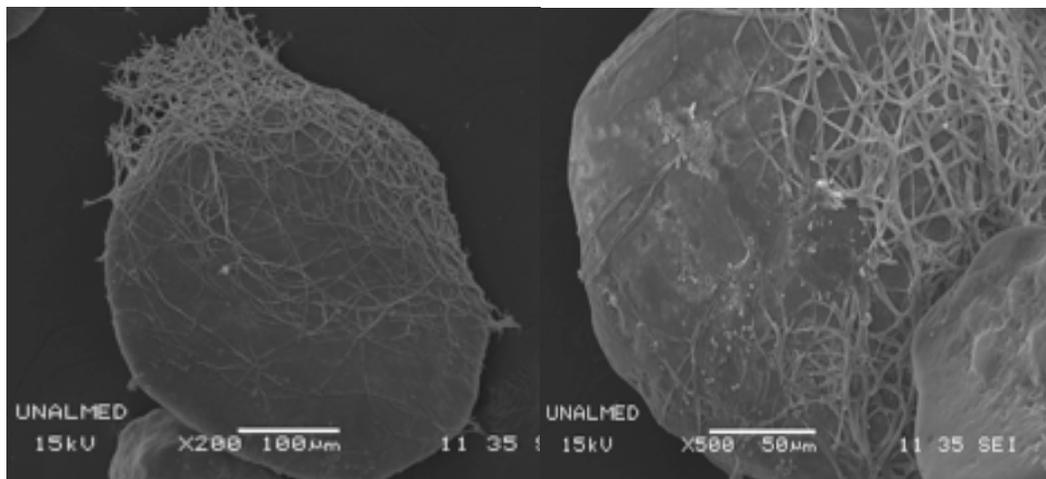


Figura 2-2. Imágenes de microscopia electronica de barrido donde se puede ver el hongo *Mortierella* sp. creciendo alrededor de partículas de RP (Osorio et al., 2017).

Otras especies de *Mortierella* sp. son reconocidas por su producción de ácidos grasos esenciales (Dyal and Narine, 2005), como araquidónico (Lu et al., 2011; Nisha and Venkateswaran, 2011; Park et al., 2015; Sakuradani and Shimizu, 2009; Totani and Oba, 1987), ácido eicosapentaenoico (Shimiziu et al., 1988) y ácido linoleico (Hansson and Dostálek, 1988), usados en la industria de alimentos (Streekstra, 1997). Además, las investigaciones han mostrado que las condiciones de crecimiento de este hongo pueden ser manipuladas para aumentar la producción de ácidos grasos (Dyal and Narine, 2005) o ácidos orgánicos (Osorio et al., 2017).

## 2.4 Microorganismos que mejoran la absorción de P

### 2.4.1 Hongos micorrizo arbusculares

Las micorrizas son asociaciones simbióticas mutualistas entre plantas y hongos del suelo (Kuo et al., 2014), son probablemente la asociación terrestre más extendida en la naturaleza cuyo origen se remonta hace unos 460 millones de años (Redecker et al., 2000). Los hongos se benefician de los compuestos carbonados fotosintetizados por las plantas, a cambio de ceder nutrientes minerales a las raíces, especialmente P (Martin and Nehls, 2009). Estos hongos son además indicadores de calidad de suelo (González-Chávez et al., 2004; Fokom et al., 2012; Vasconcellos et al., 2013). No obstante, esta no es la única función de las micorrizas entre los beneficios de la asociación con la planta esta:

- La formación de micorrizas arbusculares aumenta la producción de biomasa y mejora la nutrición mineral de la planta.
- Aumenta el área de la raíz (Marschener, 1998; Smith et al., 2011).

- Mayor eficiencia o afinidad en captar P en menores concentraciones (Harrison et al., 2002; Smith et al., 2011).
- Absorción de nitrógeno (N) por las plantas (Jin et al., 2012; Pérez-Tienda et al., 2012), potasio (K) (García and Zimmermann, 2014) y nutrición en general (Smith et al., 2011).
- Absorción de nutrientes de baja movilidad en el suelo como son: el hierro (Fe), manganeso (Mn), el cobre (Cu) o el zinc (Zn) (Chen et al., 2003; Lehmann and Rillig, 2015).
- Translocación de nutrientes y minerales del suelo a la planta (Gianinazzi et al., 2010; Johnson and Graham, 2013).
- Mejora la estructuración física del suelo y la generación de agregados estables (Miller and Jastrow, 2000; Jeffries and Barea, 2001; Vasconcellos et al., 2013).
- Inducción de resistencia de la planta a patógenos del suelo (Vigo et al., 2000; Pozo et al., 2002; Pozo and Azcón-Aguilar, 2007).
- Disminuye los efectos de toxicidad en la planta por metales pesados como Cu, Zn y Mn (Nogueira and Cardoso, 2003; González-Chávez et al., 2004; Ferrol et al., 2009; Cornejo et al., 2013).
- Disminuye el estrés de plantas por sequía (Al-Karaki et al., 2004), en suelos salinos (Bharti et al., 2016), de aluminio (Al) en suelos ácidos (Seguel et al., 2013).
- Biorremediación y fitorremediación de plomo (Pb), uranio (U), cadmio (Cd) (Aloui et al., 2009; Gervais Rufyikiri et al., 2002; Schneider et al., 2016).

Las causas de la mejora de la nutrición mineral de la planta hospedadora pueden ser múltiples:

- El micelio extrarradical, como consecuencia de su tamaño y distribución, es capaz de explorar un volumen de suelo mayor que las propias raíces, por lo que aumenta la capacidad de absorción de nutrientes, especialmente la de aquellos que difunden lentamente en la solución del suelo y que, por tanto, dan lugar a la formación de zonas de deficiencia alrededor de la raíz.
- Las hifas del hongo pueden absorber fuentes de nutrientes no disponibles para la planta.
- Las hifas son capaces de competir más eficientemente que las raíces con otros microorganismos del suelo por los nutrientes.
- Los transportadores de los hongos micorrízicos pueden presentar una mayor afinidad por el nutriente que los de la planta.
- La promoción de un sistema de raíces más ramificado y elongado.

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son organismos biotrofos obligados que dependen de raíces metabólicamente activas (Novais et al., 2013), siendo incapaces de completar su ciclo de vida en ausencia de una planta hospedadora. Esta asociación se establece con más del 80% de las plantas terrestres. Se les denomina arbusculares porque sus hifas forman estructuras en las células corticales de la raíces que parecen árboles

microscópicos (Krüger et al., 2012). Es en esta estructura, donde ocurre el intercambio bidireccional de nutrientes entre hongo y planta (Bonfante and Genre, 2010).

Se han descrito 200 especies de HMAs (Salmerón-Santiago et al., 2015), clasificados en cuatro órdenes: Glomerales, Diversisporales, Paraglomerales y Archaeosporales; 11 familias y 17 géneros (Hibbett et al., 2007; Schüßler and Walker, 2010; Krüger et al., 2012).

El ciclo de vida de los HMAs está dividido en dos fases: una fase presimbiótica y fase simbiótica. La fase presimbiótica se da después de la colonización de la planta hospedadora por el hongo e incluye varias etapas: germinación de esporas, crecimiento y desarrollo de las hifas en busca de una raíz huésped y, formación de un apresorio para la posterior penetración en la raíz de la planta.

La fase simbiótica o colonización de la raíz transcurre tras la penetración de la hifa en la raíz de la planta huésped, se pueden diferenciar varias etapas: crecimiento intracelular de las hifas, formación de arbusculos y vesículas, desarrollo de micelio extraradical y, finalmente, esporulación.

Las raíces colonizadas por los HMA no presentan signos de daños, al contrario de lo que ocurre cuando las raíces son infectadas por hongos patógenos. La colonización de la raíz por los HMA provoca tan solo una activación débil, transitoria y local de la respuesta de defensa de la planta (Smith and Read, 2010).

Las raíces colonizadas por los HMA disponen de dos vías para la absorción de nutrientes. La *vía directa* en la que las células epidérmicas de la raíz de la planta son las responsables de la absorción de nutrientes y, por el otro, la *vía indirecta* o micorrícica mediante la cual, las hifas del hongo son las que realizan la absorción (Smith and Smith, 2012). En ésta última vía, las hifas de la red del micelio extraradical captan los nutrientes más alejados de la rizosfera conduciéndolos, a través de las hifas, hasta los arbusculos. En la vía micorrícica están implicados los transportadores fúngicos expresados en el micelio externo y los transportadores de nutrientes de la planta expresados en la interfase simbiótica establecida entre el hongo y la planta.

#### **2.4.2 *Rhizogloium fasciculatum***

Este HMA pertenece al Phylum: Glomeromycota (Redecker et al., 2000), Clase: Glomeromycetes y Orden: glomerales (James et al., 2006; Hibbett et al., 2007). El nombre del genero ha cambiado y se puede encontrar con los siguientes nombres *Rhizogloium* (Sieverding et al., 2015), *Rhizophagus* (Schüßler and Walker, 2010); conocido como *Glomus* hasta el 2010 (Tulasne and Tulasne, 1845). Especie: *fasciculatum*.

Esta cepa se ha usado en ensayos en los que se ha mostrado beneficios en crecimiento y absorción de P en plantas de:

- Leucena leucocephala (Londoño Usuga, 2010; Osorio and Habte, 2001, 2013, 2015).
- Aguacate var Hass (Montoya and Osorio, 2009; Osorio et al., 2012; Ramirez et al., 2014; Serna, 2014; Tamayo-Velez and Osorio, 2016).
- Café (Jaramillo, 2006; Cuervo, 2017).
- Frijol caupi (Ramirez et al., 2013).
- Gulupa (Ramirez et al., 2015).
- Pino Romeron, *Nageia rospigliosii Pilger* (Diez et al., 2008).
- Especies forestales: *Tecoma stans*, *Dodonaea viscosa*, *Fraxinus chinensis* y *Lafoensia speciosa* (Moreno et al., 2016).
- Curuba y granadilla (Corredor, 2007).
- Frutales de clima frio (Gonzalez, 2006).
- Tomate (Manila and Nelson, 2017).

## 2.5 Coinoculación de microorganismos solubilizadores de P y hongos formadores de micorrizas

La co-inoculación puede proveer mayor balance nutricional para las plantas (Belimov et al., 2009; Rosas et al., 2006), esta puede resultar más efectiva que la inoculación individual, presentando efectos sinérgicos o aditivos entre los MSP y HMA como se puede ver en la Tabla 2-1. Sin embargo, la magnitud de este efecto puede depender de la capacidad del suelo para fijar P (Osorio and Habte, 2015). Esta coinoculación presenta las siguientes ventajas (Osorio and Habte, 2013; Osorio et al., 2017):

- Una mayor capacidad para solubilizar P (de fertilizantes, del suelo, de minerales como la RP) en el suelo puede estimular mayor absorción, crecimiento vegetal y favorecer la actividad micorrizal.
- Las plantas micorrizadas pueden liberar mayor cantidad de sustancias carbonáceas hacia la rizosfera que las plantas no micorrizadas y así los PSM pueden usar estos sustratos para la producción de ácidos orgánicos en la rizosfera.
- La extensiva red de hifas micorrizales formadas alrededor de las raíces pueden absorber el P liberado por los MSP evitando así que se vuelva a fijar.
- Incrementa la efectividad agronómica de la RP como fertilizante, el PSM va disolviendo la roca mientras el HMA absorbe el P.

Tabla 2-1. Efectos benéficos de la coinoculación de HMA y MSP en diferentes especies vegetales.

Planta	HMA	MSP	Efecto	Referencia
Leucaena leucocephala	<i>G. fasciculatum</i>	<i>Mortierella</i> sp.	Mayor biomasa, absorción de P	(Habte and Osorio, 2001; Osorio and Habte, 2013)
Leucaena leucocephala	<i>G. aggregatum</i>	<i>Mortierella</i> sp.	Mayor biomasa y efectividad de RP	(Londoño Usuga, 2010)
<i>Anacardium othonianum</i>	<i>G. etunicatum</i>	Nativos aislados	Mayor biomasa	(Cabral et al., 2012)
Trigo	<i>Cladosporium herbarum</i>	<i>Bacillus circulans</i>	Mejor absorción de nutrientes	(Singh and Kapoor, 1999)
Medicago sativa	<i>Rhizophagus intraradices</i>	<i>Rahnella aquatilis</i>	Mayor absorción de P	(Zhang Lin et al., 2016)
Kosteletzkya virginica	<i>G. aggregatum</i> <i>G. mosseae</i>	<i>Mortierella</i> sp.	Promoción del crecimiento y tolerancia a sales	(Zhang et al., 2011)
Trigo	<i>G. mossea</i> <i>G. intraradices</i>	<i>Azotobacter chroococcum</i> <i>P. fluorescens</i>	Promoción del crecimiento y rendimiento	(Yousefi et al., 2011)
Menta	<i>G. mossea</i>	<i>Penicillium thomii</i>	Promoción del crecimiento	(Cabello et al., 2005)
Frijo Caupi	<i>G. fasciculatum</i>	<i>Mortierella</i> sp.	Mayor biomasa, absorción de P	(Ramirez et al., 2013)
<i>Dorycnium pentaphyllum</i> L	<i>G. intraradices</i> <i>G. deserticola</i>	<i>Aspergillus niger</i>	Promoción de crecimiento y mejora las propiedades del suelo	(Caravaca et al., 2004)
<i>Dorycnium pentaphyllum</i> L <i>Trifolium repens</i>	Micorrizas nativas	<i>Aspergillus niger</i> <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Promoción del crecimiento, absorción de P	(Medina et al., 2010)
<i>Trifolium pratense</i>	<i>G. clarum</i> <i>G. geosporum</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	Promoción del crecimiento	(Souchie et al., 2006)
Leucaena leucocephala	<i>C. claroideum</i>	<i>Mortierella</i> sp.	Mayor biomasa, absorción de P	(Osorio and Habte, 2015)

## 2.6 Inoculantes microbianos

Los inoculantes hacen parte de una categoría denominada bioestimulantes de plantas, estos cumplen importantes funciones para el crecimiento, salud de las plantas y además pueden actuar como enmiendas del suelo mejorando sus propiedades físicas, químicas y biológicas (du Jardin, 2012, 2015; Yakhin et al., 2017).

Los inoculantes microbianos también se pueden llamar microorganismos asociados a las plantas o microorganismo promotores del crecimiento vegetal (MPCV). El término PGPR (Plant growth-promoting rhizobacteria) (Kloepper et al., 1989) es el más usado, pero no incluye bacterias de vida libre. PGPB (Plant growth promoting bacteria) (Bashan et al., 2014) se usa de manera más general. Sin embargo, estos términos no tienen en cuenta los hongos que promueven el crecimiento de plantas, como las micorrizas.

La promoción del crecimiento de las plantas se basa en diferentes mecanismos (Berg, 2009; Trabelsi and Mhamdi, 2013):

- Biofertilizantes: una mejor adquisición de nutrientes (solubilización (P), fijación (N) y/o absorción de agua y nutrientes).
- Fitoestimuladores: estimulación hormonal (incrementan la superficie de la raíz).
- Agentes de control biológico: supresión de patógenos de plantas (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* y *Streptomyces* y los géneros de hongos *Ampelomyces*, *Coniothyrium* y *Trichoderma*).

Con base en estas interacciones beneficiosas planta-microbio es posible desarrollar inoculantes microbianos para su uso en la biotecnología agrícola o agricultura sostenible. Dependiendo de su modo de acción y efectos, estos productos pueden usarse como biofertilizantes, fortalecedores de plantas, fito-estimuladores y bioplaguicidas. Existe un fuerte mercado en crecimiento para inoculantes microbianos en todo el mundo con una tasa de crecimiento anual de aproximadamente 10% (Berg, 2009; Herrmann and Lesueur, 2013; Trabelsi and Mhamdi, 2013) debido a su atractivo uso en la agricultura sostenible.

La aplicación de inoculantes microbianos es una estrategia que reduce sustancialmente el uso de fertilizantes de síntesis y pesticidas químicos y hace más eficiente la toma de nutrientes por la planta. En la actualidad, hay un creciente número de empresas que comercializan inoculantes para diferentes tipos de cultivos (Berg, 2009).

Tanto en las investigaciones como a nivel comercial se usa un solo tipo de microorganismo con buenos resultados, pero también se busca hacer mezclas de dos o más microorganismos para potencializar los beneficios en la planta abarcando diferentes nutrientes y estrategias de promoción de crecimiento (Herrmann and Lesueur, 2013). Varios autores, reportan efectos positivos al hacer co-inoculaciones (Biró et al., 2000; Osorio and Habte, 2015; Remans et al., 2008; Ruíz-Sánchez et al., 2011; Tamayo-Velez and Osorio, 2016) Aunque la combinación de inoculantes es de interés, se debe tener en cuenta que se pueden dar efectos aditivos o sinérgicos entre los microorganismos involucrados, pero en algunos casos se ha reportado efectos competitivos entre ellos (Trabelsi and Mhamdi, 2013).

## 2.7 Biofertilizantes

Un biofertilizante es una sustancia o producto que contiene microorganismos vivos, los cuales se aplican al suelo, semillas o plantas y colonizan la rizosfera o el interior de la planta, con el objetivo de aumentar la disponibilidad de nutrientes y su utilización por las plantas (Vessey, 2013). Los biofertilizantes son bioestimulantes microbianos que mejoran la eficiencia nutricional de las plantas (du Jardin, 2015). De manera errónea, en ocasiones se llama biofertilizantes a enmiendas animales o vegetales, suplementos orgánicos o desechos de cosecha (Bhattacharyya and Jha, 2012; Herrmann and Lesueur, 2013).

Los biofertilizantes deben consistir en altas densidades de microorganismos viables y eficientes para una rápida colonización de la rizosfera huésped, ya que esta es una zona

dinámica que permite una interacción diversa de señales de plantas y microorganismos asociadas a plantas (Mendes et al., 2013).

Aunque se han obtenido efectos positivos de los biofertilizantes en las investigaciones de laboratorio o invernadero, al llevar los microorganismos al campo, los efectos benéficos se pueden disminuir o no presentar los efectos encontrados (Okon and Itzigsohn, 1995; Bashan, 1998), esto se puede deber a: cambio de ambiente del microorganismo, formulación, comercialización y aplicación de este. Dentro de los aspectos claves para tener un buen biofertilizante está:

- **Microorganismo:** escoger el microorganismo de acuerdo a la función que se espere. Este microorganismo (hongos o bacterias), no debe ser patógeno ni para humanos, animales o plantas, debe ser cultivable, ser genéticamente estable, presentar habilidad para producir efectos en cultivos trampa, colonizar rápidamente la rizosfera o la planta hospedera y sobrevivir en el ambiente del suelo (Herrmann and Lesueur, 2013).
- **Producción del microorganismo:** de este proceso depende la calidad del producto. Esta se debe hacer de manera aséptica y dependerá de las condiciones ambientales, nutricionales y de crecimiento del microorganismo. La producción podrá ser líquida o sólida y se busca usar materia prima económica para las etapas de escalamiento, en producción a escala industrial y piloto. La producción busca tener un buen número de biomasa de la cepa (UFC, células o esporas por g o mL).
- **Formulación:** de este proceso depende la supervivencia del microorganismo en el almacenamiento, transporte, aplicación y establecimiento en la rizosfera o dentro de la planta. La formulación se hace líquida o sólida con el microorganismo vivo y debe permitir la supervivencia de éste sin afectar su efectividad. Se pueden adicionar sustancias o aditivos que aumenten la vida del microorganismo (durante el almacenamiento), o fuentes extras de nutrientes para él o para la planta, sustancias que mejoren la mezcla o aplicación en campo del producto, sustancias que mejoran la acción del microorganismo o complementan su acción. Una buena formulación provee unas condiciones para que el microorganismo persista en el suelo, maximice su actividad y así las plantas obtengan beneficios.
- **Aplicación:** esta es una práctica agronómica importante para determinar la efectividad del microorganismo. La aplicación se puede hacer en la rizosfera, en la filosfera, en la semilla, en el sustrato, en el sistema de riego o mezclado con otras enmiendas. Sin embargo, es importante determinar si el microorganismo se debe aplicar al inicio del crecimiento de la plántula, en el establecimiento, en producción o en cualquier etapa. La aplicación se puede ver afectada por condiciones ambientales como humedad, sequía y por el tipo de suelo, disponibilidad de nutrientes, interacciones biológicas con planta y otros microorganismos y productos agroquímicos o microbicidas.

### **2.7.1 Formulación de biofertilizantes**

La formulación busca mantener un ambiente estable para el inoculante microbiano y dar algunos beneficios extras al producto final. La composición debe permanecer química y

físicamente estables, no permitir que disminuya la población del microorganismo, ser ambientalmente amigable y fácil de usar (Bashan, 1998). Hay diferentes formulaciones, estas dependen del tipo de transportador a usar. Estos últimos pueden proveer una protección física o nutricional para el inoculante (Arora et al., 2010). Una clasificación de transportadores se puede ver en la Figura 2-3.

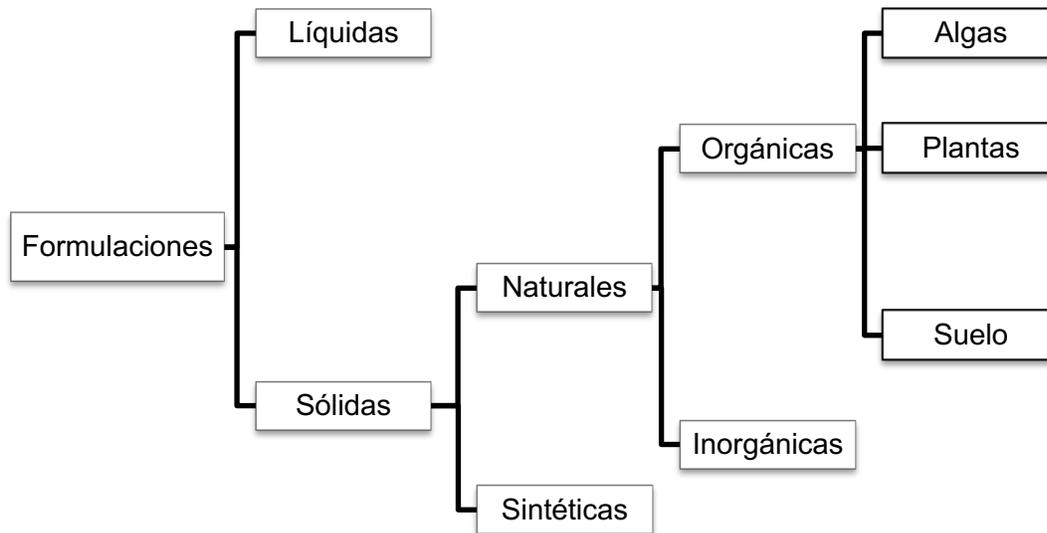


Figura 2-3. Transportadores usados para las formulaciones de los inoculantes microbianos. Elaboración propia.

Las formulaciones pueden ser líquidas o sólidas (Date, 2000; Herrmann and Lesueur, 2013; Bashan et al., 2014). Formulaciones líquidas: son de fácil manejo y aplicación, pero requieren condiciones de almacenamiento y transporte a bajas temperaturas (Stephens and Rask, 2000; Herrmann and Lesueur, 2013). Usualmente, son soluciones acuosas, medios de cultivo o emulsiones, pero también se usa glicerol, ácidos orgánicos, aceites vegetales (soya, mani), aceites minerales entre otros.

Formulaciones sólidas: son más estables que las líquidas, el microorganismo tiene mayor tiempo de vida, tiene contenidos de humedad menores al 20%. Estas pueden ser en polvo, granuladas, en suelos o inmovilizados (capsulas, perlas, atrapamiento). Los compuestos más usadas son de origen natural o sintético:

- Natural orgánico:
  - Algas: alginato, agar-agar, carragina.
  - Plantas: miel, gomas, residuos de cosecha, celulosa, carboximetilcelulosa, goma xantana, almidón, harina de soya, maltodextrinas y quitosan.
  - Suelo: suelos orgánicos, turba, compost de varios orígenes.
- Natural inorgánico:
  - Vermiculita, arena, perlita, carbón, arcillas, tierra de diatomeas, rocas volcánicas, silicato de magnesio, bentonita, arcillas, enmiendas, micas expandidas, talco, roca fosfórica.
- Sintéticas:

- Poliacrilamidas, poliuretanos, poliestireno.

Para el uso de inoculantes en la agricultura, el transportador debe ser un material convencional, que no sea tóxico, biodegradable, compatible con el microorganismo y económico. Uniforme física y químicamente y que no cambie al esterilizar.

La mayoría de los desarrollos en formulación de inoculantes han estado asociadas a bacterias y en menor cantidad a hongos. Uno de los transportadores más usados en el mercado ha sido la turba, sin embargo, este material no está disponible en todos los países (Bashan et al., 2002), presenta una alta variabilidad en calidad y composición, y puede generar elementos tóxicos durante su esterilización (Herrmann and Lesueur, 2013). Por otro lado, varios experimentos de formulaciones se han hecho con polímeros (Bashan, 1998; Jung et al., 2006) El polímero más usado en las investigaciones en el alginato de sodio (Schoebitz et al., 2013).

Las formulaciones pueden incluir aditivos o adherentes como: sacarosa, almidón, glicerol, goma arábica, goma xantana, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, derivados de polialcohol, sales de caseinato, polivinilpirrolidona, trehalosa que pueden mejorar la supervivencia de los microorganismos (Tittabutr et al., 2007; Manikandan et al., 2010; Herrmann and Lesueur, 2013; Schoebitz et al., 2013). Micro o macronutrientes, fuentes de carbono, minerales o incluso fungicidas (Arora et al., 2010).

### 2.7.2 Inmovilización de inoculantes

La inmovilización es una forma de atrapar el microorganismo en una matriz que mantiene su viabilidad (Bashan et al., 2014). Incluye tanto procesos físicos, químicos y fisicoquímicos. Los físicos son: secado en *spray*, lecho fluidizado, floculación, extrusión. Los procesos químicos incluyen: adsorción en superficies, enlaces covalente, enlace entre células (*cross-linking*), gelación iónica, inclusión molecular, emulsión atrapada en aceite, encapsulación en polímeros o polimerización. Por último, los fisicoquímicos: liposomas, coacervación (Cassidy et al., 1996; Schoebitz et al., 2013).

La encapsulación o bioencapsulación es la técnica más promisoría para transportar, almacenar y aplicar el microorganismo concentrado en pequeños volúmenes. Esta técnica presenta diferentes ventajas: el microorganismo estará protegido físicamente en un microambiente (celda o capsula o perla) contra daños mecánicos, estrés por cambio de ambiente (temperatura, suelo, humedad, plantas, presencia de agroquímicos) y antagonistas o depredadores. Previniendo una disminución en la población microbiana y contaminaciones (Sanjay and Sugunan, 2008; de-Bashan and Bashan, 2010; Herrmann and Lesueur, 2013; Schoebitz et al., 2013; Bashan et al., 2014).

El alginato es un polímero natural, es una macromolécula lineal que comprenden dos monómeros: ácido D-manurónico y ácido  $\alpha$ -L-gulurónico, unidos por el enlace alfa 1-4: ácido  $\beta$ , tiene un peso molecular entre 20,000 y 200,000 Da (Schoebitz et al., 2013). Es un recurso marino renovable de gran abundancia en el Océano Pacífico (Ladah et al., 1999).

El alginato se extrae de algas pardas como *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborean* y *Eklonia cava*. Algunas bacterias también pueden producir extracelularmente alginato como *Azotobacter vinelandii* y algunas cepas de *Pseudomonas*, entre otras (Ahumada-Manuel et al., 2017; Maleki et al., 2017).

El alginato es uno de los polímeros más usados para la encapsulación de microorganismos, formando perlas de alginato que contienen la cepa encapsulada (Bashan et al., 2014). Estas perlas pueden ser de diferentes tamaños, de acuerdo al tipo de microorganismo que se use y el proceso. Las formulaciones son en macroperlas con un diámetro de 1-4 mm, o microperlas 10-100 µm ya sea para uso agrícola o uso ambiental (Bashan, 1998; Gonzalez and Bashan, 2000).

Para la formación de las perlas, el microorganismo se mezcla con el polímero y se dispone por goteo sobre una solución catiónica para que se dé la polimerización (Herrmann and Lesueur, 2013). Posteriormente, las perlas se secan para su almacenamiento y manejo (Date, 2000). La encapsulación con alginato no afecta la viabilidad del microorganismo y minimiza las probabilidades de contaminación. En resumen, las ventajas de las perlas de alginato:

- Es natural, es un recurso renovable.
- No es tóxico, no contamina y es biodegradable.
- No es soluble en agua, pero tiene buena solubilidad en el suelo y medios de cultivo, es de baja viscosidad (Schoebitz et al., 2013).
- Libera lentamente el microorganismo en el suelo (Bashan, 1998).
- Mayor tiempo de vida útil. Las perlas secas pueden ser almacenadas a temperatura ambiente por largos periodos de tiempo sin perder la calidad (Elsas et al., 1992).
- Poco volumen, disminuye el espacio de almacenamiento, los costos de transporte y aplicación (Bashan and Gonzalez, 1999). Cada perla cuenta con alta concentración de microorganismos.

En alginato se han inmovilizados bacterias, hongos, algas y protozoos como: *Azospirillum brasilense* (John et al., 2011), *Pseudomonas* sp. (Bashan, 1986; Bashan et al., 2002), *Chlorella sorokiniana* (Bashan, 1986), *Phanerochaete chrysosporium* (de-Bashan et al., 2004; Covarrubias et al., 2011), *Bacillus subtilis* (Loomis et al., 1997), *Glomus deserticola* y *Yarrowia lipolytica* (Tong, 2017), Entre ellos HMA *Glomus versiforme* (Declerck et al., 1996), y microorganismos solubilizadores como *Aspergillus awamori* (Jain et al., 2010).

## 2.8 Referencias

Las actualizaciones automáticas de citas están deshabilitadas. Para ver la bibliografía, haz clic en Actualizar en la pestaña de Zotero.

### **3. Factores nutricionales que controlan la biosolubilización *in vitro* de roca fosfórica por el hongo *Mortierella* sp.<sup>2</sup>**

#### **3.1 Introducción**

El fosfato (P) es un macronutriente esencial para el desarrollo y crecimiento de las plantas (Narsian y Patel, 2000; Batti y Yamar, 2010; Singh y Reddy; 2011). Desafortunadamente buena parte de los suelos tropicales presentan una baja disponibilidad de éste (IGAC, 1988; Jaramillo, 2011). Para aumentar su disponibilidad en los suelos cultivados es necesario aplicar altas cantidades de fertilizantes fosfóricos solubles (Narsian y Patel, 2000; Reddy *et al.*, 2002). Sin embargo, apenas una pequeña fracción del P de los fertilizantes fosfóricos es utilizada por las plantas (5-10%) y el resto se queda retenido en el suelo en formas insolubles (Engelstad y Terman, 1980; Vassileva *et al.*, 2000; Osorio y Habte, 2009; Batti y Yamar, 2010). En consecuencia, la fertilización fosfórica se constituye en una práctica costosa, ineficiente y en algunos casos genera un alto riesgo de contaminar aguas corrientes (Sahu y Jana, 2000; Arcand y Schneider, 2006; Shigaki *et al.*, 2006).

Una alternativa para la fertilización fosfórica en los suelos es el uso de la roca fosfórica (RP); pero dada su baja solubilidad este es un fertilizante de baja efectividad agronómica

---

<sup>2</sup> Apartes de este capítulo fueron publicados:

Osorno L, Osorio N.W. Evaluación de factores que afectan la bioacidulación de roca fosfórica bajo condiciones *in vitro*. Revista Colombiana de Biotecnología ISSN: 1909-8758. v.19 N 1 53 -62, 2017.

Osorno L; Osorio N. W. Effect of Carbon and Nitrogen Source and Concentration on Rock Phosphate Dissolution Induced by Fungi. Journal of applied Biotechnology. ISSN: 2327-0640 p.32 - 42 v.2. 2014.

(Rajan *et al.*, 1996; Goenadi *et al.*, 2000; Vassileva *et al.*, 2000; Reddy *et al.*, 2002, Pramanik *et al.*, 2009). Esta se usa como materia prima para la síntesis de fertilizantes más solubles vía acidulación con ácido sulfúrico o fosfórico (Reyes *et al.*, 2001; Batti y Yamar, 2010), pero este proceso es costoso y potencialmente contaminante (Gyaneshwar *et al.*, 2002; Reddy *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 2008).

Una alternativa para mejorar la solubilidad de la RP es a través de su acidulación con microorganismos solubilizadores de fosfato (MSP), estos son capaces de producir ácidos orgánicos que la disuelven eficientemente (Whitelaw 2000; Osorio y Pérez 2000, Vassilev y Vassileva, 2003; Ramírez 2005; Jayasinghearachchi y Seneviratne, 2006; Relwani *et al.*, 2008; Singh y Reddy, 2011). Entre los MSP efectivos hay bacterias de los géneros *Pseudomonas* (Kim *et al.* 1998a; Kim *et al.* 1998b; Bar Yosef *et al.*, 1999), *Enterobacter* (Kim *et al.* 1998ab; Vásquez *et al.*, 2000), *Bacillus* (Kim *et al.* 1998ab; Vásquez *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2006), *Burkholderia* (Song *et al.*, 2008), *Serratia* (Chen *et al.*, 2006), *Citrobacter* (Patel *et al.*, 2008) y hongos de los géneros *Penicillium* (Reyes *et al.*, 2001), *Aspergillus* (Vassilev *et al.*, 1997; Vassileva *et al.*, 1998; Whitelaw 2000; Bojinova, 2008) y *Mortierella* (Osorio, 2003; Zhang *et al.*, 2011; Osorio y Habte 2013).

A pesar que se conoce la reacción de disolución de la RP (Osorio, 2011) falta precisar cuáles son los factores que optimizan el proceso en el laboratorio bajo condiciones *in vitro* y/o en la industria (Cunningham y Kuiack, 1992). Entre tales factores se destacan la nutrición con C y N que determinan bioquímicamente la producción de los ácidos orgánicos responsables de la disolución de la RP (Hameeda *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2008; Londoño, 2010; Nisha y Venkateswaran, 2011; Habte y Osorio, 2012). Esto podría ser útil en la industria de fertilizantes fosfóricos o mejorar la eficiencia del uso directo de la RP en los cultivos. Estos esfuerzos cobran mucha validez ya que se proyecta que las reservas mundiales de RP se agotaran en menos de 100 años (Gilbert, 2009). Esto pondría en riesgo la seguridad alimentaria a nivel global cuyos efectos serían más notorios en aquellos países dominados por suelos bajos en P disponible, tal como ocurre en el trópico húmedo. Por lo anterior, aumentar la solubilidad y efectividad de la RP como fertilizante es bastante estratégico y puede traer grandes beneficios en la agricultura a nivel global, reducir los costos de producción y el impacto ambiental (Zapata y Roy, 2007).

La hipótesis de esta investigación fue que la biosolubilización *in vitro* de roca fosfórica puede ser mejorada a partir del cambio de factores bioquímicos involucrados en la reacción (cantidad de inóculo, fuente y cantidad de carbono y nitrógeno, tiempo de reacción, tipo de RP). Así, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de factores bioquímicos sobre la biosolubilización de RP por el hongo *Mortierella* sp. libre.

## 3.2 Materiales y métodos

Hongo solubilizador de fósforo

El hongo *Mortierella* sp. fue originalmente aislado en la Universidad de Hawaii a partir de un Andisol (Osorio y Habte, 2001). El hongo se cultivó en medio Papa-dextrosa-agar (PDA) durante 5 días y luego se suspendió en agua destilada estéril y conservado en nevera a 4°C para su uso experimental. Antes de su uso, se realizó un conteo en el medio de cultivo PDA y arrojó una densidad de  $10^7$  Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mL.

#### Roca fosfórica

La RP es una muestra proveniente de las minas del Huila, Colombia. Su fórmula molecular es  $\text{Ca}_{9.69}\text{Na}_{0.22}\text{Mg}_{0.09}(\text{PO}_4)_{5.14}(\text{CO}_3)_{0.86}\text{F}_{2.34}$  (Chien y Hammond 1978), con una concentración de P del 12% y fue pasada a través de un tamiz de 250  $\mu\text{m}$ . La RP fue molida en un mortero de ágata y tamizados para tener un tamaño de partícula de 200–325  $\mu\text{m}$ . Luego, se sometió a difracción de rayos X, con el “Método Rietveld”, el cual se obtiene por métodos matemáticos de mínimos cuadrados derivados de muestras de referencia puras; en la fase analítica no se utilizó ningún tipo de estándar para obtener los resultados cuantitativos. Las fases cristalinas cuantificadas por el “Método Rietveld” son normalizadas al 100% y dentro de la normalización no se ha tenido en cuenta la posible presencia de materia amorfa en la muestra. La composición es  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$  en 79.4% y  $\text{SiO}_2$  20.6%.

Igualmente, la muestra se sometió a fluorescencia (FRX) (PANalytical MiniPal 2, 9 w (30 KW, 1 8 mA) tubo irradiación de cromo Si-PIN detector, 12- cambiador de posición de la muestra, 100-240 V, 9 45-65 HZ), los resultados son (%):  $\text{SiO}_2$ :17.4,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ :1.11,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ :0.58, CaO:42.5, MgO:0.13,  $\text{Na}_2\text{O}$ :0.12,  $\text{K}_2\text{O}$ :0.06,  $\text{P}_2\text{O}_5$ :30.4.

#### Medio de cultivo y condiciones de solubilización

La composición básica del medio de cultivo experimental fue ( $\text{g L}^{-1}$ ): glucosa 10,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1.34, KCl 1.87,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.2,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4 y RP 3.5 como única fuente de P (Osorio, 2008). Un alícuota de 75 mL de este medio se llevó a *erlenmeyers* de 250 mL, se esterilizó en autoclave a 120°C, 0.1 MPa, por 20 minutos. Luego, se inoculó con el hongo, se agitó continuamente a 100 rpm, 28°C, durante 7 días.

Los experimentos consistieron en modificar algunas de las condiciones de solubilización, dejando las demás constantes.

#### Dosis de inóculo

Se evaluó diferentes dosis del inóculo 0, 1, 2, 4 y 7 mL por *erlenmeyer* sobre la disolución de la RP. La concentración por mL fue de  $10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ .

#### Cantidad y fuentes de C

Se determinó el efecto de la cantidad de fuente de carbono (glucosa) sobre la disolución de la RP. Para esto, al medio de cultivo se adicionaron niveles crecientes de esta azúcar (5, 10, 15, 20 y 25  $\text{g L}^{-1}$ ). Se inoculó con 1 mL de la suspensión de *Mortierella* sp. Las demás condiciones del cultivo fueron las señaladas anteriormente.

Se usaron diferentes fuentes de C: monosacáridos (glucosa, arabinosa o fructosa), disacáridos (sacarosa o maltosa) y polisacáridos (celulosa, carboximetilcelulosa o melaza) a razón de 4 g C L<sup>-1</sup>.

#### Cantidad y fuente de N

Se determinó el efecto de la cantidad y fuentes de N sobre la disolución de la RP. Para la cantidad se adicionaron niveles crecientes de N como NH<sub>4</sub>Cl (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 g L<sup>-1</sup>). Inoculado con 1 mL de la suspensión de *Mortierella* sp. y 10 g L<sup>-1</sup> glucosa como fuente de C. Las otras condiciones del cultivo fueron las señaladas anteriormente.

Para evaluar el efecto de las fuentes de N se aplicó NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (0.61 g L<sup>-1</sup>), NH<sub>4</sub>Cl (0.5 g L<sup>-1</sup>), o KNO<sub>3</sub> (0.93 g L<sup>-1</sup>). Los erlenmeyers que contenían NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> y NH<sub>4</sub>Cl también recibieron KCl para así suplementar la misma cantidad de K en todos los tratamientos. Inoculado con 1 mL de la suspensión de *Mortierella* sp. y 10 g L<sup>-1</sup> glucosa como fuente de C. Las otras condiciones del cultivo fueron las señaladas anteriormente.

#### Tipo de RP

Se evaluó la disolución de 3 RP diferentes: Huila (H), Santander (S) y Carolina del Norte (CN) durante 5 días de incubación. Inoculado con 1 mL de la suspensión de *Mortierella* sp. y 10 g L<sup>-1</sup> glucosa como fuente de C y 0.5 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl como fuente de N. Las otras condiciones del cultivo fueron las señaladas anteriormente.

#### Variabes evaluadas

En todos los experimentos, luego del periodo de incubación de 7 días, se determinó el pH y la concentración de P del medio de cultivo. El pH se midió usando un potenciómetro (WTW electrodo Sentix 81). La concentración de P (mg L<sup>-1</sup>) se determinó mediante el método del azul-molibdato (Murphy y Riley 1962) a 890 nm (espectrofotómetro Genesys 20 Thermo Spectronic), previa filtración en papel filtro Whatman No. 42 y centrifugación (centrifuga Jouan MR 1812) a 4000 rpm (1520xg) durante 10 minutos.

#### Diseño experimental y análisis de datos

En todos los experimentos se empleó un diseño estadístico completamente al azar. Cada tratamiento tuvo 4 réplicas, incluyendo el control no inoculado. El efecto de los tratamientos se evaluó mediante análisis de varianza y cuando estos fueron significativos se utilizó la prueba de separación de medias de Duncan. Ambas pruebas se hicieron con un nivel de significancia (*P*) ≤ 0.05, mediante el uso del software STATGRAPHICS versión centurión XVI. Todos los experimentos se repitieron en el tiempo.

### 3.3 Resultados

La inoculación con el hongo disminuyó significativamente ( $P \leq 0.05$ ) el pH del medio. (

Figura 3-1). El pH más bajo se obtuvo cuando en el medio de cultivo había inicialmente 1 y 2 ml del inoculo (pH: 3.15 y 3.11, respectivamente). Con las dos densidades poblacionales más altas el pH fue un poco más alto (3.34 y 3.5, respectivamente). Por otro lado, al inocular con *Mortierella* sp. se aumentó la concentración de P en solución con respecto al control no inoculado ( $1.22 \text{ mg L}^{-1}$ ) (

Figura 3-1). La magnitud de ese efecto fue mayor cuando el medio contenía 1 ml ( $10^7$  UFC por ml) ( $70.89 \text{ mg L}^{-1}$ ). Dosis de inóculos mayores generaron concentraciones de P soluble significativamente menores ( $45 \text{ mg L}^{-1}$ ).

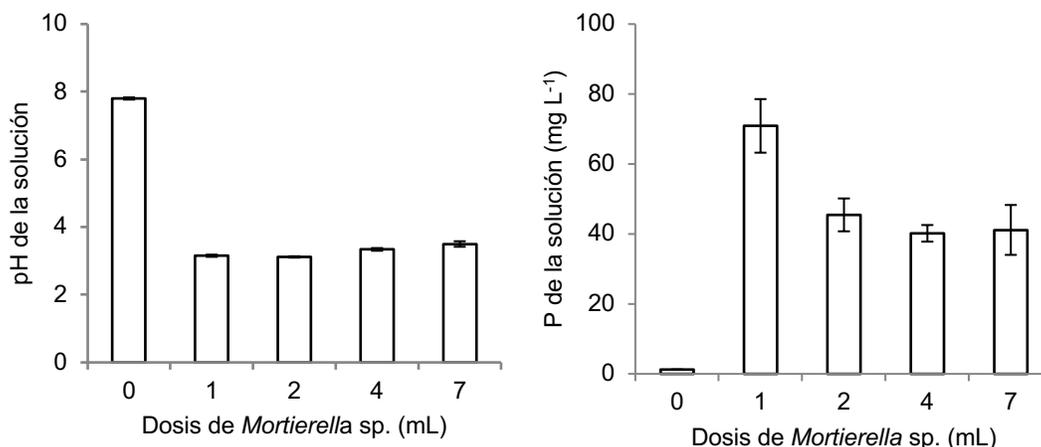


Figura 3-1. pH de la solución y Concentración de P en solución ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en función de la inoculación con cantidades crecientes de unidades formadoras de colonias (UFC) de *Mortierella* sp. Cada columna representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ).

El pH de los tratamientos no inoculados no cambiaron el valor con respecto a la adición de carbono (pH: 7.8). El pH de la solución inoculada con el hongo solo presentó diferencia significativa al adicionar 5 g de glucosa donde el valor de pH fue de 3.5, con las adiciones de 10 a 25 g de glucosa por litro no se presentó diferencia significativa (pH: 3.1) (

Figura 3-2). La concentración de P en solución aumentó significativamente con respecto al control no inoculado al adicionar cantidades crecientes de glucosa (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). *Mortierella* sp. presentó un pico de mayor concentración de P ( $118.26 \text{ mg L}^{-1}$ ) cuando la cantidad de glucosa adicionada fue de 10 g  $\text{L}^{-1}$ . Cantidades menores o mayores de glucosa no aumentaron la cantidad de P soluble en la solución.

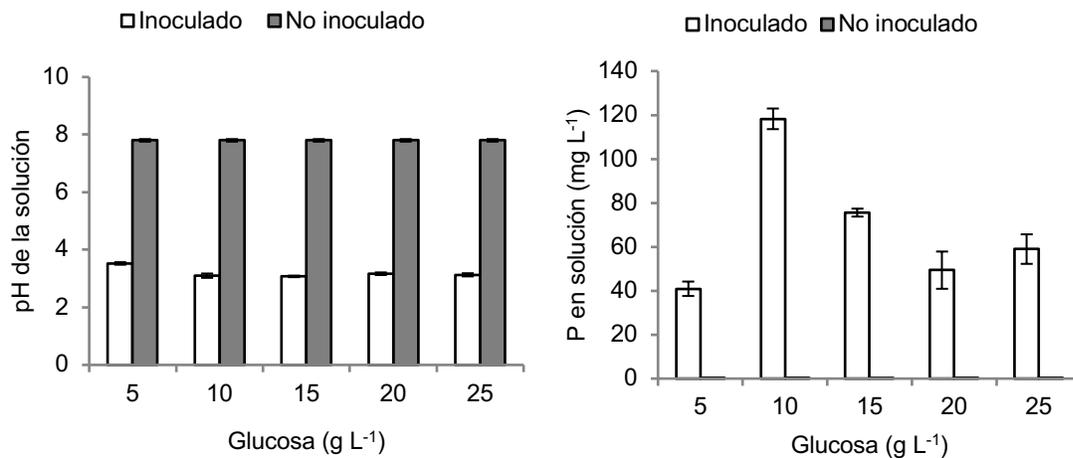


Figura 3-2. pH de la solución y Concentración de P en solución (mg L<sup>-1</sup>) en función de la cantidad de glucosa aplicada y la inoculación con *Mortierella* sp. Cada valor representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ).

La fuente de carbono tuvo efecto significativo sobre las variables evaluadas. Con la inoculación de *Mortierella* sp., el pH del medio fue significativamente menor cuando se adicionó glucosa como fuente de C y tuvieron el siguiente orden: glucosa (2.99) < arabinosa (3.6) < maltosa = fructosa = sacarosa (6.9) < melaza (7.07) < carboximetil celulosa (7.15) < celulosa (7.7) (

Figura 3-3).

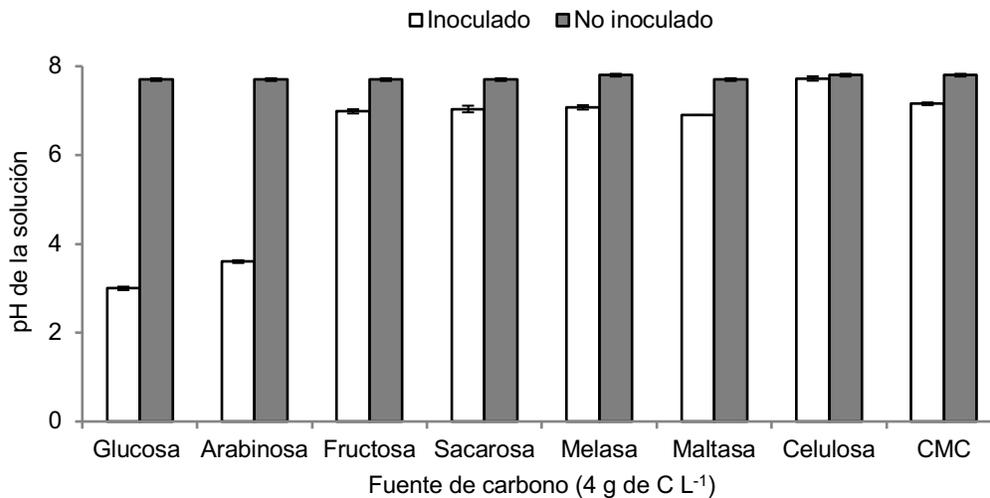


Figura 3-3. pH del medio en función del tipo de fuente de carbono y la inoculación con *Mortierella* sp. Cada valor representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación

estándar. Columnas con letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ). CMC: carboximetilcelulosa.

La fuente de carbono más efectiva para aumentar la concentración de P soluble fue la glucosa (

Figura 3-4). Con esta fuente *Mortierella* sp. exhibió un valor medio de P soluble de 81.05 mg L<sup>-1</sup>. La arabinosa tuvo una efectividad intermedia (45.7 mg L<sup>-1</sup>) y fue significativamente superior a las demás fuentes de C, las cuales no aumentaron la concentración de P soluble con respecto al control (0.2 mg L<sup>-1</sup>).

La adición de NH<sub>4</sub>Cl generó una reducción significativa en el pH del medio inoculado con el hongo, pero no en los controles no-inoculados (

Figura 3-5). La magnitud del efecto dependió de la dosis de NH<sub>4</sub>Cl. Para *Mortierella* sp. el pH del medio disminuyó desde 7.6 (control no inoculado) hasta 3.2 con las dosis de NH<sub>4</sub>Cl de 0.5, 1.0 1.5 y 2.0 g L<sup>-1</sup>; con la dosis de 2 g L<sup>-1</sup> el pH disminuyó a 3.3, lo cual resultó significativamente diferente de los anteriores.

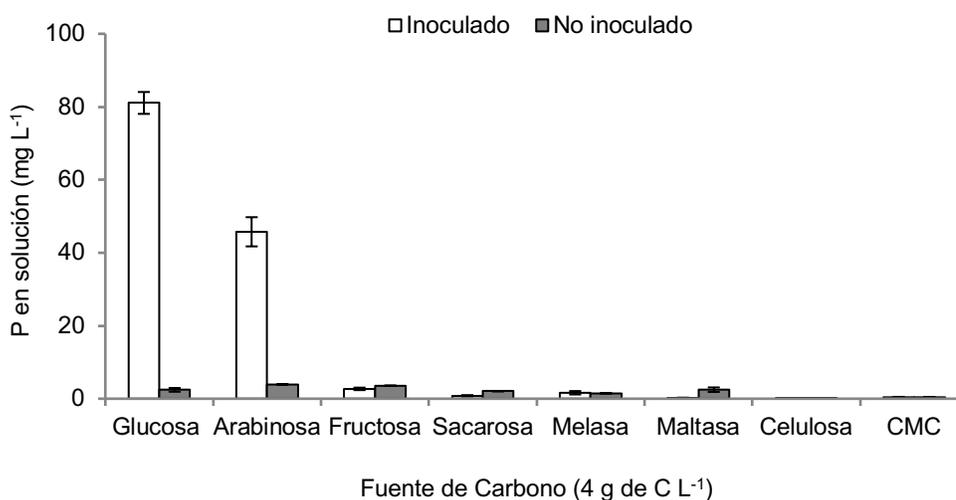


Figura 3-4. Concentración de P en solución (mg L<sup>-1</sup>) en función de la fuente de C y la inoculación con *Mortierella* sp. Cada valor representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ). CMC: carboximetilcelulosa.

El incremento en la dosis de NH<sub>4</sub>Cl en el medio disminuyó significativamente la cantidad de P soluble. La dosis más efectiva fue 0.5 g L<sup>-1</sup>, con la cual se alcanzó un valor medio de

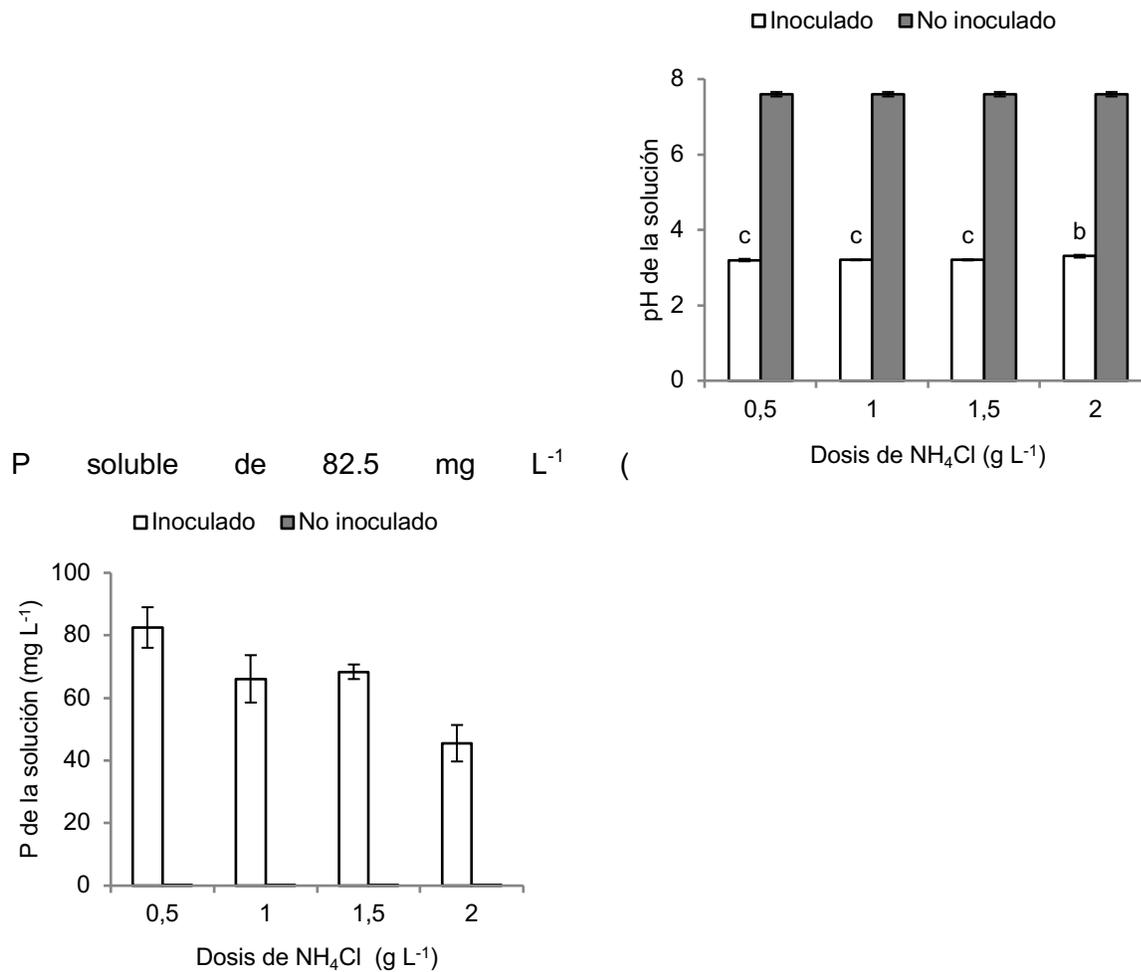


Figura 3-5). Con las dosis de 1 y 1.5 g L<sup>-1</sup> se obtuvieron valores significativamente más bajos (66.1 y 68.3 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente) y aún más bajos con la concentración más alta de NH<sub>4</sub>Cl (2 g L<sup>-1</sup>) (P soluble: 45.5 mg L<sup>-1</sup>).

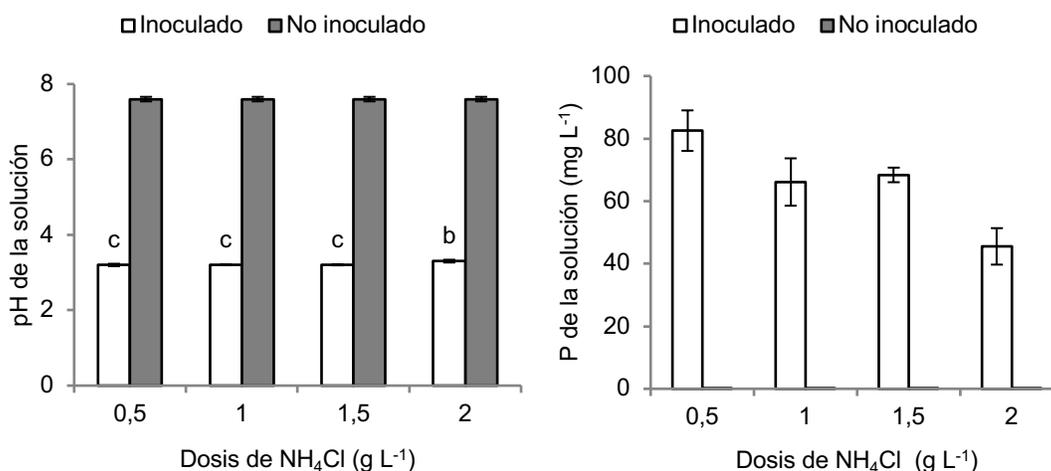


Figura 3-5. pH de la solución y Concentración de P en solución ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en función de la dosis de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $\text{g L}^{-1}$ ) y la inoculación con *Mortierella* sp. Cada valor representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ).

El efecto de la fuente de N fue significativo para las variables medidas. La inoculación con el hongo *Mortierella* sp. disminuyó significativamente el pH del medio en presencia de las tres formas de N con respecto a los controles no inoculados (pH: 7.6) (

Figura 3-6). El efecto en la reducción del pH fue significativamente mayor cuando la fuente de N fue  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (pH 3.2) que con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (pH 4.01). *Mortierella* sp. también fue capaz de disminuir el pH del medio en presencia de  $\text{KNO}_3$ , pero tal efecto fue muy bajo (pH 6.5). Consistentemente, la concentración de P soluble fue mayor cuando se adicionó  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Así, la concentración de P en solución con *Mortierella* sp. fue de 73.41, 33.74 y 0.2  $\text{mg L}^{-1}$  cuando la fuente de N fue de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $\text{KNO}_3$ , respectivamente (Figura 3-6).

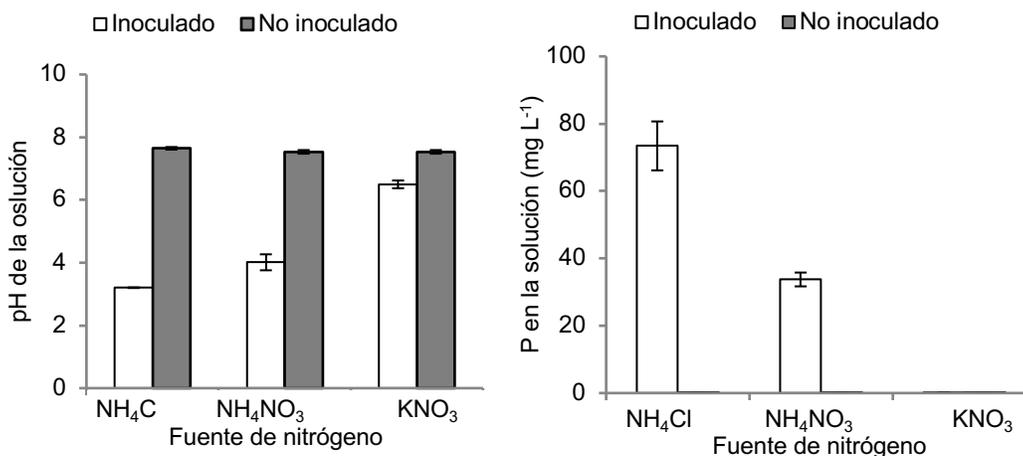


Figura 3-6. pH de la solución y Concentración de P en solución ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en función de la fuente de N y la inoculación con *Mortierella* sp. Cada valor representa el promedio de cuatro repeticiones. Las

barras indican la desviación estándar. Columnas con letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ).

La inoculación con el hongo disminuyó significativamente ( $P \leq 0.05$ ) el pH del medio con respecto a los controles no inoculados y aumento la concentración de P en solución (Figura 3-7). Con la inoculación con *Mortierella* sp. el pH alcanzó valores de 3.45, 2.92 y 2.86 para las RP de CN, H y S respectivamente. La concentración de P fue mayor cuando el medio contenía RP de Carolina del Norte ( $157.15 \text{ mg L}^{-1}$ ), para las RP del Huila ( $86.59 \text{ mg L}^{-1}$ ) y Santander ( $58.92 \text{ mg L}^{-1}$ ) el efecto fue menor.

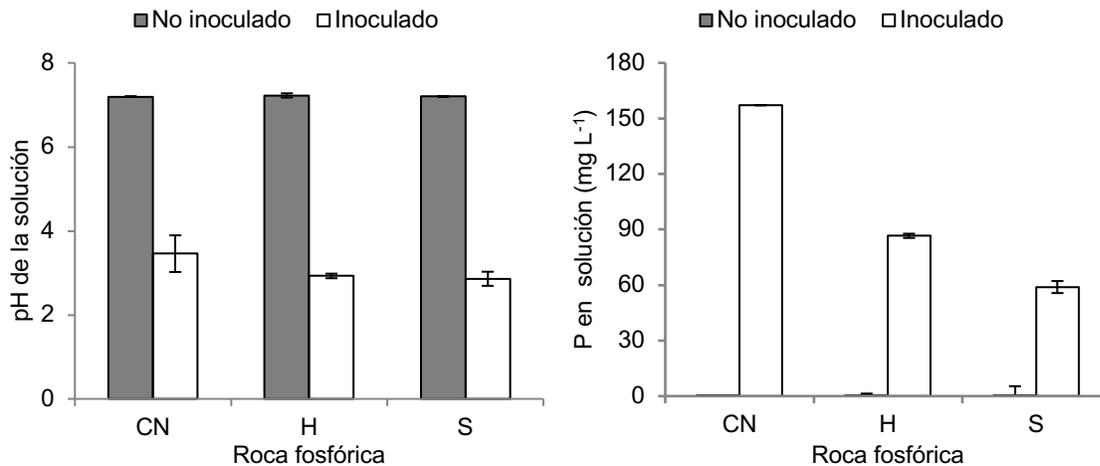
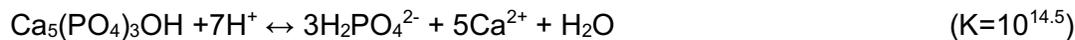


Figura 3-7. pH de la solución en función del tipo de RP inoculados con *Mortierella* sp. Cada columna representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ). CN: Carolina del Norte, H: Huila, S: Santander.

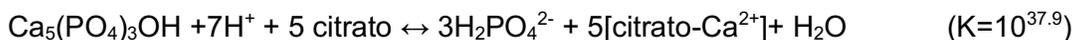
### 3.4 Discusión

Los resultados muestran claramente que al cambiar la cantidad y fuente de C y de N en el medio de cultivo se puede mejorar la capacidad del hongo *Mortierella* sp. para disolver RP. Cálculos hechos para estimar la eficiencia del hongo para disolver RP [EDRP (%) =  $100 \times (\text{P soluble} / \text{P total en RP})$ ] indican que para *Mortierella* sp. el valor fue de 18.1%.

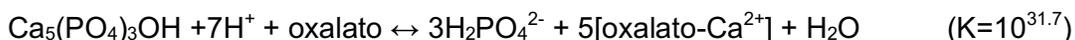
Los productos del metabolismo de este hongo son ácidos orgánicos, *Mortierella* sp. produce ácido oxálico (Osorio, 2008) en mayor proporción, seguido de ácido cítrico y otros ácidos orgánicos; ambos ácidos realizan reacciones comparables para disolver la RP (Ecuación 3-1, Ecuación 3-2 y Ecuación 3-3).



Ecuación 3-1.



Ecuación 3-2.



Ecuación 3-3.

Al introducir en la reacción citrato u oxalato ocurre la complejación de  $\text{Ca}^{2+}$  y esto incrementa la favorabilidad termodinámica de la reacción, siendo ésta más favorable con el citrato que con el oxalato. Wenzel *et al.* (1994) reportaron que la solubilización de fosfatos de zinc por *Pseudomonas fluorescens* fue debida a la excreción de protones y a la producción de ácido glucónico.

Por otro lado, la máxima capacidad de *Mortierella* sp. se detectó con el nivel poblacional más bajo ( $1 \times 10^7$  UFC/erlenmeyer) (EDRP: 16.9%) Al incrementar la densidad poblacional de *Mortierella* sp. se disminuyó su efectividad para disolver RP, lo cual puede ser debido a una competencia intraespecífica.

A partir de resultados previamente publicados (Nahas, 1996; Osorio y Habte, 2001) y los de este estudio queda clara la existencia de una relación inversamente proporcional entre el pH del medio y la concentración de P en solución a partir de la disolución de la RP.

Los resultados indican que la fuente de C más efectiva para la disolución de RP fue la glucosa. Esto no es sorprendente, ya que la glucosa es de fácil degradación y, por ende, es la fuente de C más común en los medios de cultivo microbiales. Además, varios autores han reportado mayor eficiencia microbiana en la disolución de RP con glucosa que con otras fuentes de C (Hameeda *et al.*, 2006; Reyes *et al.*, 2006; Sharan *et al.*, 2008; Nisha y Venkateswaran, 2011). En este estudio, el hongo ha sido cultivado repetitivamente con esta fuente de C y ya está adaptado a la misma. En consecuencia, al exponerlo a otras fuentes de C se puede dificultar su utilización inmediata. Resulta muy atractivo investigar si este hongo puede usar eficientemente otras fuentes de C, más económicas y de fácil consecución como la melaza o celulosa. Estos procesos de adaptación pueden tomar tiempo, pero puede ser de mucho interés si se consideran aplicaciones industriales de estos procesos en la disolución de RP. Para organismos heterótrofos como *Mortierella* sp. es muy importante determinar una adecuada fuente de C y energía que permita satisfacer su necesidad metabólica y producir metabolitos como los ácidos orgánicos. Este hongo puede metabolizar diferentes carbohidratos; sin embargo, su uso dependerá de un sistema de enzimas que pueden ser constitutivas o inducidas (Madigan, 2004). Estos azúcares pueden seguir dos vías metabólicas, en la primera la producción de ácidos orgánicos se da como metabolitos secundarios, y en la segunda como parte del metabolismo central o metabolito primario (Vinopal y Romano, 2000; Nahas, 2007).

Un ejemplo claro del control que ejercen algunos factores sobre la disolución de la RP, resulta de comparar los efectos que tiene la utilización de glucosa vs. arabinosa. *Mortierella* sp. con la primera se obtuvo una EDRP de 19.3%, mientras que con la segunda solo fue

de 10.8%. Tales diferencias pueden ser explicadas por el menor número de C que tiene la arabinosa (5C) y por la presencia de un grupo aldehído en su estructura. Así, es posible que con esta pentosa se generen otras rutas metabólicas y se disminuya la producción del ácido oxálico. Resultados similares fueron obtenidos por Cerezine (1988) quien halló que las mejores fuentes de C para disolver fluoroapatita fueron los monosacáridos fructosa y glucosa, mientras que los disacáridos y polisacáridos no fueron significativos.

La cantidad de glucosa en el medio de cultivo parece ser un factor crítico en la disolución de la RP. *Mortierella* sp. presentó una baja EDRP (9.7%) con el nivel más bajo de glucosa usado (5 g L<sup>-1</sup>), el cual incrementa a 28.1% con el nivel de 10 g L<sup>-1</sup>, pero disminuyó a 13% con el nivel más alto de glucosa. En el caso de *Mortierella* sp. la producción de ácido oxálico parece ser inducida por las condiciones del medio y, por ende, la producción de ácido oxálico dependerá de la interacción de otros factores, como disponibilidad de C, N, P, etc. (Madigan, 2004).

Xiao *et al.* (2008) evaluaron el efecto de la cantidad de C como glucosa para optimizar la solubilización de RP con *Pseudomonas expansum*, *Mucor ramoissimus* y *Candida krissii* y encontraron que con los tres microorganismos se mejoró la solubilización de la RP, pero con cantidades de C diferentes. Hameeda *et al.* (2006) encontraron que el tipo de fuente de C afectó la efectividad de solubilización de RP en *Serratia marcescens* y *Pseudomonas* sp., siendo la glucosa la mejor fuente. Reyes *et al.* (2006) compararon el efecto de la fuente de C en la solubilización de RP entre *Pseudomonas* sp. y *Azotobacter* sp. y encontraron mejores resultados al usar sacarosa que dextrosa. Por su parte, Narsia y Patel (2000) evaluaron el efecto de la fuente de C en la solubilización de RP con *A. aculeatus* y determinaron que la mejor solubilización se presentó con arabinosa como fuente de carbono. Cerezine *et al.* (1988) encontraron que la solubilización de fluorapatita con *A. niger* se favorecía con fructosa y glucosa, mientras que con sacarosa, galactosa, maltosa y almidón no hubo disolución. Nisha y Venkateswaran (2011) evaluaron el efecto de la fuente de C para la producción de ácido araquidónico por *M. alpina* y encontraron que la mejor producción de ácido se presentó con ramnosa y glucosa. Sharan *et al.* (2008) evaluaron la producción de este mismo ácido con *M. alpina* y encontraron que fue más alta con la adición de glucosa al medio, otras fuentes de C como el almidón solo mejoraron el crecimiento del hongo pero no la producción del ácido. Chen *et al.* (1997) evaluaron la eficiencia de *Xanthomonas campestris* y su mutante como solubilizadores de RP y encontraron que al variar la fuente de C la mejor solubilización se detectó con glucosa seguida de arabinosa.

El NH<sub>4</sub>Cl fue la fuente de N con la que se encontró mayor eficiencia en la disolución de RP para el hongo. Este compuesto además de suplementar N también incrementa la actividad de la bomba de protones de la membrana celular (Roos y Luckner, 1984; Illmer y Schinner, 1995; Slayman *et al.*, 1990; Cooke y Whipps, 1993). Esto es evidente a partir de los más bajos valores de pH obtenidos y, en consecuencia, mayores valores de EDRP, 17.5% para *Mortierella* sp. Vale la pena resaltar la mayor eficiencia de *Mortierella* sp. para producir acidez con el nivel más bajo de NH<sub>4</sub>Cl (0.5 g L<sup>-1</sup>), a ese nivel la EDRP fue 20%. El

incremento de la cantidad de P soluble en el medio de cultivo como resultado de la adición de  $\text{NH}_4^+$  en procesos de bioacidulación de RP ha sido reportado (Cerezine, 1988; Whitelaw *et al.*, 1999; Nahas, 2007; Habte y Osorio, 2012).

Llama la atención que *Mortierella* sp. no fue efectivo en la disminución del pH ni en la disolución de RP cuando la fuente de N fue  $\text{KNO}_3$ . Resultados similares han sido obtenidos con este mismo hongo por Habte y Osorio (2012), a un pH de 6.5 la EDRP fue sólo de 0.05%. Tal como lo reportan los autores mencionados, esta situación puede estar promoviendo una inmovilización de P en las células de *Mortierella* sp. La capacidad de producción de ácidos orgánicos por *Mortierella* sp. es inducida por las condiciones de su ambiente, entre las cuales la presencia de  $\text{NH}_4^+$  es determinante. Según Lu *et al.* (2011) las fuentes inorgánicas favorecen la producción de ácidos orgánicos (y, por ende, la disolución de la RP), mientras que las fuentes de N-orgánico favorecen el crecimiento celular.

Los resultados indican que adicionalmente al tipo de fuente de N, la cantidad de éste también tiene un efecto importante en la eficiencia del hongo para disolver RP. Con el hongo *P. rugulosum* bajas concentraciones de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en el medio disminuyeron la producción de ácido cítrico y, por ende, la solubilización de RP (Reyes *et al.*, 1999). Kara y Bozdemir (1998) encontraron que un nivel de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  de  $1.5 \text{ g L}^{-1}$  es la cantidad óptima para obtener la mayor producción de ácido glucónico por el hongo *A. foetidus*. Por otro lado, el efecto de diversas fuentes de N ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaNO}_3$ , urea y peptona) sobre la disolución de RP por *A. niger* también fue evaluado por Cerezine *et al.* (1988). En dicho estudio  $\text{NH}_4\text{Cl}$  fue la fuente que más favoreció la mayor producción de P soluble en el medio. Nahas *et al.* (1996) encontraron que el cambio de *vinaza* en el medio de cultivo por  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (como fuente de N) disminuyó la solubilización de RP, quizá debido a un alto crecimiento de hongo, a la baja producción de acidez en el medio, comparados con el control. Tanto para *A. tubigenensis* como para su mutante, la fuente de N con la que se obtuvo mayor producción de ácido succínico y acético fue  $\text{KNO}_3$  comparado con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , asparagina y triptófano (Relwani *et al.*, 2008). Por otro lado, Lu *et al.* (2011) encontraron que la producción de ácido araquidónico por *Mortierella alpina* fue mayor cuando la fuente de N fue urea que con extracto de levadura.

La cantidad de P disuelto varió entre los diferentes tipos de RP. Se obtuvieron mejores resultados con la RP de Carolina del Norte (EDRP para *Mortierella* sp: 37 %), seguido de la RP del Huila (EDRP para *Mortierella* sp: 21 %) y de Santander (EDRP para *Mortierella* sp. 14%). Tales diferencias muy probablemente se deben a diferencias en la composición mineralógica de estas.

La RP de Carolina del Norte es una roca sedimentaria (fluoroapatita carbonatada o francolita) más reactiva (Chien and Menon 1995; Schneider *et al.*, 2010) que las RP sedimentaras del Huila y de Santander y, por ende, tiene mayor efectividad agronómica (Chien y Hammond, 1978). La RP de Carolina del Norte tiene un mayor contenido de P

(13%), mientras que la del Huila y Santander contienen 9.1 y 8.0%, respectivamente (Chien y Hammond, 1978). Por otro lado, la RP de Carolina del Norte tiene un mayor contenido de carbonato  $1.23 \times \text{CO}_3$  en la fórmula que las RP de Santander y Huila ( $0.72-0.86 \times \text{CO}_3$ ) y esto le confiere un mayor índice de disolución con ácido cítrico (Van Kauwenbergh, 2006). Schneider *et al.* (2010) evaluaron la disolución de tres RP (Carolina del Norte, una de Brasil y Canadá), encontraron que *A. niger* fue más efectivo disolviendo la RP de Carolina del Norte que con otras RP. Según los autores, la razón para tales diferencias es que la primera es de origen sedimentario, mientras que las otras son de origen ígneo.

Por otro lado, las RP pueden presentar diferentes concentraciones de elementos traza tales como F, Fe, Al, Mn, As, Cd, Cu, Pb, Ni, Zn, Hg y U (Zapata y Roy, 2007) (Grewal y Kalra 1995), los cuales pueden afectar el crecimiento microbial, la capacidad del microorganismo para biosíntesis y liberar ácidos orgánicos (Schneider *et al.*, 2010). Algunos de estos compuestos pueden ser tóxicos para los microorganismos (Madigan, 2004) y las plantas que reciben su aplicación. Así, Schneider *et al.* (2010) hallaron que las RP que presentaron mayores concentraciones de Fe y Mn, disminuyeron la producción de ácido cítrico por *A. niger*.

A pesar de las diferencias detectadas entre las RP, este estudio sugiere que las RP del Huila y Santander son buenas candidatas para la disolución microbial, ya que se mejora su efectividad agronómica para su aplicación directa (Osorio 2008) o para la producción de fertilizantes más solubles. Así, promover el uso de las RP colombianas tiene grandes ventajas: están localmente disponibles (Huila, Boyacá, Santander del Norte), son económicas (Reyes *et al.*, 2001; Osorio y Habte, 2009), por ende, se puede disminuir la dependencia de fertilizantes importados, lo cual ayuda a la soberanía y seguridad alimentaria y podría disminuir los costos de producción.

La solubilización de RP es un proceso que depende del tipo de microorganismo (Narsia y Patel, 2000) y de factores nutricionales, fisiológicos y de las condiciones de crecimiento en el medio de cultivo (Cunningham y Kuiack, 1992; Ates *et al.*, 2002; Adham, 2002; Haq y Iqbal, 2003; Nahas, 2007). Los altos contenidos de P soluble generados en la disolución de la RP están relacionados con la buena adaptación del microorganismo solubilizador al ambiente de cultivo (Xiao *et al.*, 2008). Cada uno de los ensayos confirmó la importancia de determinar los parámetros apropiados de acuerdo al tipo y cantidad del microorganismo y fuente y cantidad de C y N.

El uso de MSP como parte de un proceso biotecnológico podría mejorar la efectividad agronómica de la RP cuando se usa directamente en el suelo y también puede utilizarse para la acidulación de la misma con el fin de obtener fertilizantes fosfóricos más solubles (Stewart y Howell 2003; Smith y Moore 2005).

### 3.5 Referencias

- Adham, N.Z. 2002. Attempts at improving citric acid fermentation by *Aspergillus niger* beet-molasses medium. *Bioresource Technology* 84: 97–100.
- Arcand. M. and Schneider. K. 2006. Plant and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: review. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 78: 791-807.
- Ates, S.; Dingil, N.; Bayraktar, E.; Mehmetoglu, U. 2002. Enhancement of citric acid production by immobilized and freely suspended *Aspergillus niger* using silicone oil. *Process Biochemistry* 38: 433-436.
- Bar-Yosef B, Rogers RD, Wolfram JH, Richman E. 1999. *Pseudomonas cepacia* mediated rock phosphate solubilization in kaolinite and montmorillonite suspensions. *Soil Sci Soc Am J* 63: 1703-1708.
- Batti. T. and Yamar. W. 2010. Bacterial solubilization of phosphorus from phosphate rock containing sulfur-mud. *Hidrometallurgy* 103: 54-59.
- Bojinova D., Velkova R. Ivanova R. 2008. Solubilization of Morocco phosphorite by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology* 99: 7348–7353.
- Cerezine P C, Nahas E and Banzatto D A 1988 Soluble phosphate accumulation by *Aspergillus niger* from fluorapatite. *Appl. Microbiol. Biotech.* 29: 501–505.
- 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. *Appl Soil Ecol* 34:33–41.
- Chen C C; Chang C. Chen C-X. 1997. Optimization of arachidonic acid production by *Mortierella alpine* Wuji-H4 Isolate. *JAOCs*, 74(5) 569-578.
- Chien, S. H. and Hammond, L. A. 1978. Comparison of various laboratory methods for predicting the agronomic potential of phosphate rocks for direct application. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 42: 935-939.
- Chien, S. H., y R. G. Menon. 1995. Factors Affecting the Agronomic Effectiveness of Phosphate Rock for Direct Application. *Fertilizer Research* 41, (3). 227-34.
- Cooke R. C, Whipps J. M. 1993. *Ecophysiology of Fungi*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Cunningham J, and Kuiack C. 1992. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1451-1458.
- Engelstad. O. and Terman. G. 1980. Agronomic effectiveness of phosphate fertilizer. In: Khasawneh. F., Sample. E., Kamprath. E. (eds). *The role of the phosphorus in agriculture*. Soil Science Society. Madison. WI. 311-332.
- Gilbert. N. 2009. *The disappearing nutrient*. Macmillan Publisher Limited. 716-718.
- Goenadi. D., Siswanto., Sugiarto. Y. 2000. Bioactivation of Poorly Soluble Phosphate Rocks with a Phosphorus-Solubilizing Fungus. *Soil Science Society of America*. 64: 927-932.

- Grewal H. S. and kalra K. L. 1995. Fungal production of citric acid. *Biotechnology Advances*, 13(2) 209-234.
- Gyaneshwar. P., Kumar. V., Parekh. L, Poole. S. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil* 245: 83–93.
- Habte M and Osorio N. W. 2012. Effect of Nitrogen form on the effectiveness of a Phosphate-solubilizing fungus to dissolve rock phosphate. *Biofertilizers and Biopesticides*. 3(5): 1-4.
- Hameeda. B., Kumar. Y., Rupela., O., Kumar. G., Reddy. G. 2006. Effect of carbon substrate on rock phosphate solubilization by bacteria from compost and macrofauna. *Curr Microbiol*. 53: 298-302.
- Haq, I.-U.; Ali, S. and Iqbal, J. 2003. Direct production of citric acid from raw starch by *Aspergillus niger* *Process Biochemistry*. 38: 921-924.
- IGAC. 1988. Suelos y Bosques de Colombia. Instituto Geográfico Agustín Codazzi, Bogotá, 135p.
- Illmer P, Schinner F. 1995. Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms. *Soil Biol. Biochem*. 27(3) 257-263.
- Jaramillo, D. 2011. El suelo: origen, propiedades, espacialidad. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.
- Jayasinghearachchi. H. and Seneviratne. G. 2006. Fungal solubilization of rock phosphate is enhanced by forming fungal-rhizobial biofilms. *Soil Biology and Biochemistry*. 38: 405-408.
- Kara A and Bozdemir T O 1998 Optimization of the growth parameters of *Aspergillus foetidus*. *Acta Biotech*. 18, 327–338.
- Kim, K. Y. Jordan, D. McDonald G. A. 1998a. Effect of phosphate solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biology and Fertility of Soils* 26: 79-87.
- Kim, K. Y. Jordan, D. McDonald G. A. 1998b. Enterobacter agglomerans, phosphate solubilizing bacteria and microbial activity in soils. Effect of carbon sources. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 995-1003.
- Londoño A. 2010. Efecto de la inoculación con un hongo micorrizal y un hongo solubilizador de fosforo en la adsorción de fosfato y el crecimiento de *Leucaena* en un oxisol de la estación experimental del CIAT en Santander de Quilichao. Tesis M.Sc., Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.
- Lu, J. Peng C; Ji X; You J; Cong L; Ouyang P; Huang H. 2011. Fermentation characteristics of *Mortierella alpine* in response to different nitrogen sources. *Appl Biochem Biotechnol* 164:979–990.
- Madigan M., Martinko J; Parker J. 2004. Brock Biología de los microorganismos. Décima edición. Pearson Education S.A. Madrid.
- Murphy. J. y Riley. J. P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 27: 31-35.
- Nahas E 1996 Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. *World J. Microbiol. Biotech*. 12, 567–572.

- Nahas. E. 2007. Phosphate solubilizing microorganisms: Effect of carbon, nitrogen, and phosphorus sources. E. Velazquez and C. Rodriguez-Barrueco (eds.), First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization, 111–115 Springer.
- Narsian, V., and Patel, H.H. (2000). *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. *Soil Biol. Biochem.* 32, 559–565.
- Nisha A and Venkateswaran G. 2011. Effect of Culture Variables on Mycelial Arachidonic acid Production by *Mortierella alpina*. *Food Bioprocess Technol.* 4: 232-240.
- Osorio. N.W. 2003. Aislamiento y evaluación de microorganismos solubilizadores de fósforo en suelos de Hawaii. Universidad Nacional (Medellín), Facultad de Ciencias. 57p.
- Osorio, N.W. and Habte M. 2013. Synergistic effect of a phosphate solubilizing fungus and an arbuscular mycorrhizal fungus on *Leucaena* seedlings in an oxisol fertilized with rock phosphate. *Botany* 91(4) 274-281
- Osorio, N.W. 2008. Effectiveness of microbial solubilization of phosphate in enhancing plant phosphate uptake in tropical soils and assessment of the mechanisms of solubilization. Ph.D. Dissertation. University of Hawaii, Honolulu.
- Osorio, N.W. and M. Habte. 2001. Synergistic influence of an arbuscular mycorrhizal fungus and P solubilizing fungus on growth and plant P uptake of *Leucaena leucocephala* in an Oxisol. *Arid Land Res. Mgmt.* 15:263-274.
- Osorio. N.W. and Habte M. 2009. Strategies for utilizing arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing microorganisms for enhanced phosphate uptake and grow of plants in the soils of the tropics. En: *Microbial Strategies for Crop Improvement* 325-351.
- Osorio. N. W. and Pérez. J. C. 2000. Microbial solubilization of phosphates in soils. A review. En: *Uso de microorganismos en la agricultura, materia orgánica mito o realidad. Memorias del X Congreso de la Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo* 103-116p.
- Osorio NW. 2011. Effectiveness of phosphate solubilizing microorganisms in increasing plant phosphate uptake and growth in tropical soils, 65-80 pp. In: Maheshwari DK (ed). *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management (Volume III)*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 345p (ISBN 978-3-642-21060-0).
- Patel D. K, Archana G, Kumar G. N. 2008. Variation in the nature of organic acid secretion and mineral phosphate solubilization by *Citrobacter* sp. DHRSS in the presence of different sugars. *Curr Microbiol* 56:168–174.
- Pramanik. P., Bhattacharya. S., Bhattacharyya P., Banik. P. 2009. Phosphorus solubilization from rock phosphate in presence of vermicompost in Aqualfs. *Geoderma* 152: 16-22.
- Ramírez, C.A. 2005. Aislamiento y evaluación de rizobacterias con potencial biocontrolador y promotor de crecimiento en plantas de banano. Tesis (Maestría en Biotecnología) Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia (Medellín).
- Rajan. S., Watkinson. J. H., Sinclair. A. G. 1996. Phosphate rocks for direct application to soils. *Advances in Agronomy.* 57: 77-159.
- Reddy. S., Kumar. S., Babita. K. 2002. Biosolubilization of poorly soluble rock phosphates by *Aspergillus tubigenis* and *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology* 84: 187-189.

- Relwani. L., Krishna. P., Reddy. M. 2008. Effect of carbon and nitrogen sources on phosphate solubilization by a wild-type strain and UV-induced mutants of *Aspergillus tubingensis*. *Curr Microbiol* 57:401-406.
- Reyes I, Bernier L, Simard R R and Antoun H 1999 Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by Na isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28, 281–290.
- Reyes. I., Baziramakenga. L., Bernier. H., Antoun. H. 2001. Solubilization of phosphate rocks and minerals by a wild-type strain and two UV-induced mutants of *Penicillium rugulosum*. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 1741-1747.
- Reyes. I., Valery. A., Valduz. Z. 2006. Phosphate-solubilizing microorganisms isolated from rhizospheric and bulk soils of colonizer plants at an abandoned rock phosphate mine. *Plant Soil.* 287: 69-75.
- Roos W and Luckner M 1984 Relationships between proton extrusion and fluxes of ammonium ions and organic acids in *Penicillium cyclopium*. *J. Gen. Microbiol.* 130, 1007–1014.
- Sahu. S. and Jana. B. 2000. Enhancement of the fertilizer value of rock phosphate engineered through phosphate-solubilizing bacteria. *Ecological Engineering* 15: 27-39.
- Schneider, K.D., van Straaten, P., de Orduña, R.M., Glasauer, S., Trevors, J., Fallow, D., and Smith, P.S. (2010). Comparing phosphorus mobilization strategies using *Aspergillus niger* for the mineral dissolution of three phosphate rocks. *J. Appl. Microbiol.* 108, 366–374.
- Sharan A., Shikha., Darmwal N. 2008. Efficient phosphorus solubilization by mutant strain of *Xanthomonas campestris* using different carbon, nitrogen and phosphorus sources. *World J Microbiol Biotechnol.* 24: 3087-3090.
- Shigaki. F., Sharpley. A., Prochnow. L. 2006. Animal-based agriculture, phosphorus management and water quality in Brazil: options for the future. *Science Agric.* 63: 194-209.
- Sigh. H. and Reddy. M. 2011. Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. *European Journal of soil Biology* 47: 30-34.
- Slayman CL, Kaminski P, Stetson D. 1990. Structure and function of fungal plasma membrane ATPases. *Cell Walls and Membranes in Fungi*, Springer- Verlag, Berlin, 298-316.
- Smith. D.R. and Moore. J. 2005. Soil extractable phosphorus changes with time after application of fertilizer: II. Manure from swine fed modified diets. *Soils Science* 170 (8) 640-651.
- Song O. R, Lee S. J, Lee Y. S, Lee S. C, Kim K. K, Choi Y. L. 2008. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soil. *Brazil J Microbiol* 39:151–156.
- Stewart, B. A. and Howell, T. A. 2003. *Encyclopedia of Water Science*. Marcel Dekker (Ed). New York, U.S.A. p 1076.
- Van Kauwenbergh 2006. Fertilizer Raw Material Resources of Africa. *ResearchGate*.

- 
- Vazquez P, Holguin G, Puente M, Elopez CA, Bashan Y. 2000. Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semi arid coastal lagoon. *Biol Fertil Soil* 30:460–468.
- Vassileva M, Azcon R, Barea J, Vassilev N. 1998. Application of an encapsulated filamentous fungus in solubilization of inorganic phosphate. *Journal of Biotechnology* 63: 67–72.
- Vassilev N, Vassileva M and Azcon M. 1997. Solubilization of rock phosphate by immobilized *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology* 59: 1-4.
- Vassilev. N. and Vassileva. M. 2003. Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes. *Appl Microbiol Biotechnol* 61: 435–440.
- Vassileva. M., Azcon. R., Barea. J., Vassilev. N. 2000. Rock phosphate solubilization by free and encapsulated cells of *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry* 35: 693-697.
- Vinopal R T and Romano A H. 2000. Carbohydrate synthesis and metabolism. In *Encyclopedia of Microbiology*, Vol. 1, 2nd ed. Ed. J. Lederberg. pp. 647–668. Academic, San Diego.
- Wenzel C. L, Ashford A. E. and Summerell B. A. 1994. Phosphate solubilizing bacteria associated with proteoid roots of seedlings of waratah [*Telopea speciosissima* (Sm.) R.Br.] *New Phytol.* 128, 487–496.
- Whitelaw M A, Harden T J and Helyar K R. 1999. Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. *Soil Biol. Biochem.* 31: 655–665.
- Whitelaw, M. A. 2000. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. *Advances in Agronomy* 69: 99-151.
- Xiao. C., Chi. R., Huang. X., Zhang. W., Qiu. G., Wang. D. 2008. Optimization for phosphate solubilization by phosphate-solubilizing fungi isolated from phosphate mines. *Ecological Engineering* 33: 187-193.
- Zapata F. and Roy R.N. 2007. Utilización de las rocas fosfóricas para una agricultura sostenible. *Boletín FAO fertilizantes y nutrición vegetal* 13: 3-10.
- Zhang H, Wu X, Li G and Qin P. 2011. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing fungus (*Mortierella* sp.) and their effects on *Kosteletzkya virginica* growth and enzyme activities of rhizosphere and bulk soils at different salinities. *Biology and Fertility of Soils* 47, 543–554.

## 4. Viabilidad del hongo *Mortierella* sp. inmovilizado en alginato de calcio

### 4.1 Introducción

El uso de inoculantes microbianos es muy atractivo en el contexto de la agricultura limpia, en la cual se pretende evitar o reducir el consumo de agroquímicos y mantener rendimientos satisfactorios en los cultivos (Khan et al., 2007; Cai et al., 2013; Kaur et al., 2013). Uno de los elementos más limitantes en los cultivos es el P, esto se debe a su baja disponibilidad en los suelos ya que es fijado en los minerales del suelo y, por ende, la eficiencia de su aplicación en fertilizantes solubles es muy baja (5-10%), particularmente en los suelos tropicales. Por otro lado, las altas aplicaciones de P pueden generar riesgos de arrastre por escorrentía a aguas superficiales y contaminarlas lo que puede generar eutrofización (Abouzeid, 2008; Aydin et al., 2010).

Uno de los grupos de microorganismos de interés en la agricultura son los solubilizadores de P (MSP), estos pueden aumentar la disponibilidad de P en el suelo a través de la solubilización P nativo y de minerales de baja solubilidad y así mejorar la capacidad de absorción de este por las plantas. Aunque se ha reportado efectos positivos al inocular los MSP bajo condiciones de invernadero (Aydin et al., 2010; Vassilev et al., 2001a), no existe un uso extendido de estos y varios autores reportan inconsistencias en los resultados al inocular con estos microorganismos (Osorio and Habte, 2013; Zhang et al., 2011). Entre los factores que pueden afectar la efectividad de los biofertilizantes están: (i) el tipo de inóculo y su formulación que deben mantener la supervivencia del microorganismo para que no pierda su efectividad (Jain et al., 2010; Khan et al., 2007; Whitelaw, 1999); (ii) factores ambientales tales como la sequía, el exceso de lluvia, la temperatura, entre otros; (iii) factores asociados al suelo y el cultivo, particularmente la mineralogía del suelo (capacidad de fijación de P), la cantidad de materia orgánica, el contenido de nutrientes, los efectos residuales de agroquímicos, el exceso de aluminio intercambiable y soluble y los microorganismos antagonistas (Bashan et al., 2002; Jain et al., 2010; Leung et al., 2000). El efecto que ejercen estos factores sobre los inoculantes microbiano presumiblemente se podrían amortiguar al inmovilizarlos en alginato para así prolongar su viabilidad y efectividad, tal como se ha hecho con grupos de microorganismos (de-Bashan and Bashan, 2010; Covarrubias et al., 2011; Martínez-Trujillo and García-Rivero, 2012; Vassileva et al., 2000).

El hongo *Mortierella* sp. se ha reportado como un solubilizador de minerales fosfóricos nativos y aplicados (Osorio, 2008; Osorio and Habte, 2001; Osorio and Osorio, 2014, 2017), descomponedor de materiales orgánicos (Alvarez, 2012; Tamayo-Velez and Osorio, 2016) y también se ha reportado su capacidad para desorber P fijado en el suelo (Osorio

and Habte, 2012, 2014; Osorno et al., 2018). Desafortunadamente, no hay reportes de su inmovilización en alginato y de cómo esto podría afectar su efectividad como biofertilizante.

La hipótesis de este trabajo fue que la inmovilización en alginato del hongo *Mortierella* sp. como biosolubilizador de P puede mantener su viabilidad a través del tiempo. Para probar esto, se establecieron experimentos con el objetivo de evaluar los efectos de la inmovilización en alginato de calcio (particularmente la temperatura de secado) sobre su viabilidad a través de un año de almacenamiento y su capacidad para germinación y activarse respirométricamente en experimentos *in vitro* y luego de su aplicación en suelos tropicales de mineralogía contrastante.

## 4.2 Materiales y métodos

### Microorganismo

El hongo fue originalmente aislado a partir de un Andisol y se ha demostrado su efectividad para promover el crecimiento y la absorción de P vegetal (Osorio and Habte, 2001). Este hongo se multiplicó en medio PDA durante 15 días y 25°C y luego se suspendió en agua destilada estéril y se conservó en nevera a 4°C para su uso experimental.

### Procedimiento de inmovilización

El hongo se inmovilizó usando el método descrito por de-Bashan et al. (2004). Para tal fin, 40 mL de inóculo de *Mortierella* sp. ( $10^7$  esporas mL<sup>-1</sup>) se mezclaron con 160 mL de una solución estéril de alginato de sodio al 2%, la cual se agitó por 15 min a 40 rpm. Se usó un equipo para dejar caer gotas de esta mezcla en una solución de 2% de CaCl<sub>2</sub> bajo condiciones de agitación lenta a 40 rpm y así formar perlas de alginato de calcio (de-Bashan and Bashan, 2010). Las perlas se estabilizaron por 1 h a 28 °C y se lavaron en solución salina estéril.

### Secado de perlas

Las perlas húmedas se sometieron a tres temperaturas para su secado en un horno (30, 35 y 40 °C), estas se pesaron cada 2 h y después de las 30 h se midió cada hora. Se tomaron muestras de 200 g de perlas con tres repeticiones por temperatura.

Con el fin de determinar la liberación y respiración de los microorganismos inmovilizados en el suelo se determinó la producción de CO<sub>2</sub>. Para ello, 50 g de suelo (oxisol) esterilizado (autoclave a 121 °C, 0.1 MPa en dos ciclos de 1 h cada uno) y tamizado (4 mm) se llevaron a capacidad de campo con agua destilada estéril (autoclave a 121 °C, 0.1 Mpa por 20 min), se colocaron en recipientes estériles de 500 ml de capacidad, y se mezclaron con 150 mg de perlas de alginato con *Mortierella* sp. (dos meses de almacenamiento). El CO<sub>2</sub> liberado durante el período de incubación (21 días a 28°C), fue atrapado en una solución de NaOH (0.1 M) y titulado con HCl (0.1 M). Se utilizó un control abiótico sin suelo y sin hongo, y un

control con suelo sin hongo. Cada tratamiento tuvo 3 repeticiones. Se realizaron medidas diarias hasta que la producción de CO<sub>2</sub> fue constante.

Para determinar que la perla de alginato se disuelve en diferentes tipos de suelo, se evaluó la respirometría (producción de CO<sub>2</sub>) en tres suelos de Colombia (Tabla 4-1): un Oxisol, un Andisol y un Mollisol, de acuerdo a la metodología descrita anteriormente. La inoculación se realizó con el hongo *Mortierella* sp. tanto inmovilizado en alginato (150 mg de perla) (dos meses de almacenamiento) y sin inmovilizar (1 mL de inóculo), para determinar el efecto de la inmovilización en la respiración.

Tabla 4-1. Clasificación taxonómica de los suelos, ubicación, pH y materia orgánica (MO).

Serie de suelos	Familia de suelo	Latitud, Longitud	pH (H <sub>2</sub> O, 1:2)	MO (g kg <sup>-1</sup> )
Carimagua	Haplustox, Oxisol	4°34'N, 71°20'W	4.9	23.5
Neira	Haplustoll, Mollisol	5°08'N, 75°35'W	5.7	35.0
Guarne	Melanudand, Andisol	6°15'N, 75°30'W	5.0	125.5

#### Análisis estadístico

En todos los experimentos se empleó un diseño estadístico completamente al azar. Cada tratamiento tuvo repeticiones, incluyendo el control no inoculado. El efecto de los tratamientos se evaluó mediante análisis de varianza y cuando estos fueron significativos se utilizó la prueba de separación de medias de Duncan. Los análisis se hicieron con un nivel de significancia ( $P$ )  $\leq 0.05$ , mediante el uso software STATGRAPHICS versión centurión XVI. Todos los experimentos se repitieron en el tiempo.

### 4.3 Resultados y discusión

El método de inmovilización de hongos y bacterias ha sido aceptado en el campo de las fermentaciones en las que se espera tener el microorganismo atrapado durante todo el tiempo, que no afecte la reología del sistema (hongos filamentosos), y que se pueda usar por varios ciclos. Se han inmovilizado algunos microorganismos solubilizadores de P como *Aspergillus niger* (Vassilev et al., 1995), *Penicillium variable* (Vassilev et al., 1996), *Yarrowia lipolytica* (Vassilev et al., 2001), *Aspergillus awamori* (Jain et al., 2010) en procesos de fermentación para solubilizar roca fosfórica.

En este estudio se busca usar la inmovilización en la preparación de formulaciones de inoculantes, donde el microorganismo no pierda su viabilidad y se libere completamente en el suelo para que colonice la rizosfera o la raíz y así tener un efecto benéfico en la

planta. Con este propósito se han inmovilizado bacterianas como *Rhizobium* (Rivera et al., 2016), *Azospirillum* (Bashan, 1986) entre otras.

Con el proceso de inmovilización se obtuvieron perlas con esporas de *Mortierella* sp. en alginato de calcio húmedas o frescas. Luego se someten a un proceso de secado (40 °C por 40 horas) con el fin de disminuir la humedad para evitar germinación de esporas. En este proceso el tamaño, el peso y el aspecto físico de las perlas cambia como se puede observar en la Tabla 4-2 y en la Figura 4-1, debido que la mayoría de su contenido es agua. Al secarse pierden un 58.6% del tamaño y un 89.9% del peso.

Tabla 4-2. Características físicas de las perlas de *Mortierella* sp. en alginato de calcio antes (húmedas) y después del proceso de secado (40°C por 40 horas). Los datos son el promedio de 10 perlas.

Características	Perlas húmedas	Perlas secas
Diámetro promedio (mm)	2.9 a	1.7 b
Peso promedio (mg)	19.7 a	1.98 b

Letras minúsculas diferentes indican siferecncia significativa de los tratamientos.

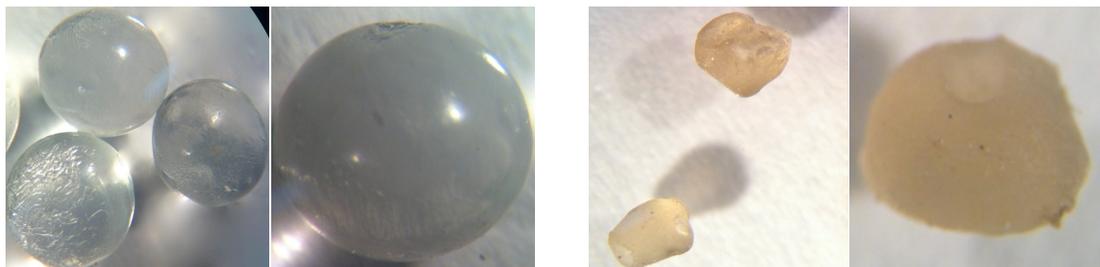


Figura 4-1. Perlas de *Mortierella* sp. inmovilizadas en alginato de calcio. A la derecha: perlas frescas o húmedas, a la izquierda: perlas secas después de 40 horas a 40 °C.

El proceso de secado es importante ya que se espera que las esporas no germinen en el tiempo, pero que la temperatura no las afecte. Para esto se usó un rango de temperatura de 30 a 40 °C y se valió en el tiempo (Figura 4-2). Durante el proceso de secado las perlas frescas presentaron una pérdida de peso (humedad) diferente de acuerdo a la temperatura usada. El efecto fue significativamente mayor con la temperatura más alta (40°C), alcanzando un peso constante a partir de las 38 h. Las temperaturas de 30 y 35 °C no alcanzaron un peso constante en las 45 h.

Después de secadas se realizaron conteos de esporas y este se comparó con el contenido de esporas en las perlas húmedas como se puede ver en la

Figura 4-3, el proceso de secado no disminuyó el contenido de esporas por perla.

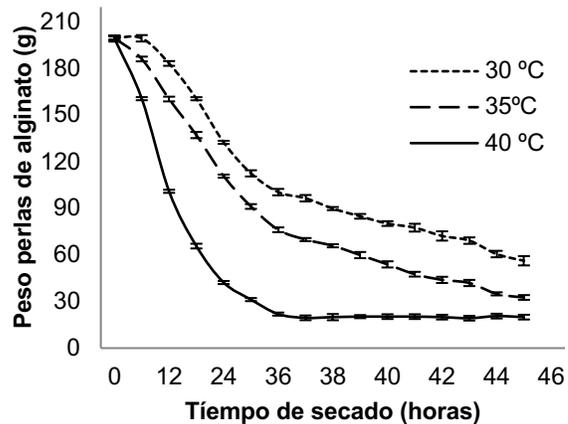


Figura 4-2. Peso (g) de perlas de alginato de calcio con *Mortierella* sp. en función del tiempo (horas) de secado a tres temperaturas (30, 35 y 40 °C). Las barras indican la desviación estándar, cada punto es el promedio de tres repeticiones.

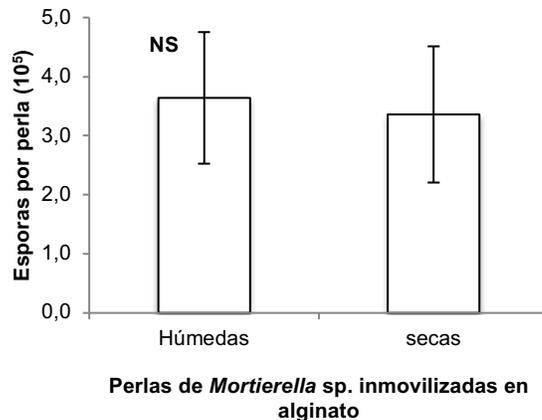


Figura 4-3 Contenido de esporas de *Mortierella* sp. por perla de alginato de Ca húmedas y secas. Cada columna representa el promedio de 10 repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. NS: no hay diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ).

Uno de los aspectos más importantes del secado es disminuir el porcentaje de humedad para que las esporas del hongo no germinen, pero que esta temperatura no afecte su viabilidad para germinar. Estas variables se midieron cada mes durante doce meses. El crecimiento del hongo *Mortierella* sp. inmobilizado en las perlas secas se evidenció en el medio PDA al tercer día de la siembra (

Figura 4-4) incubadas a 28 °C, en el que a partir de cada perla crece por lo menos una colonia del hongo y este crecimiento permanece en el tiempo desde el primer mes de inmobilizados y secados hasta después del mes 12.

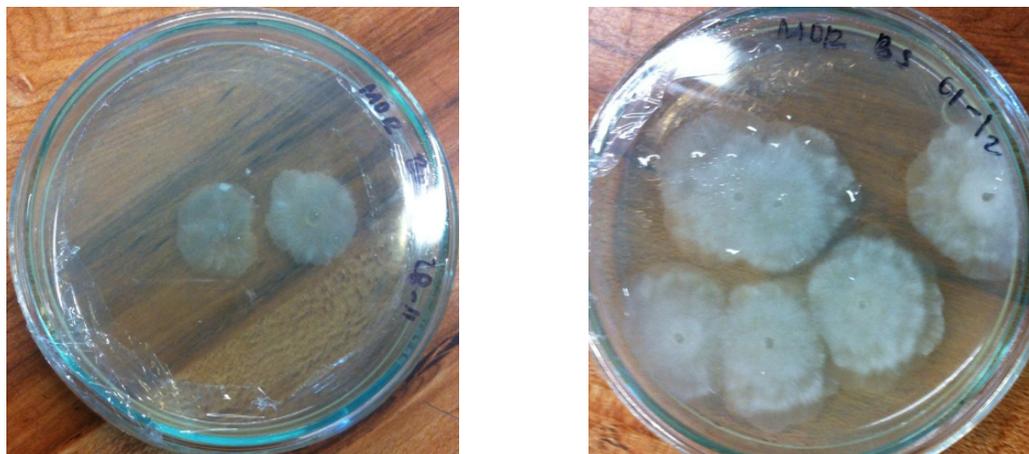


Figura 4-4. Crecimiento de *Mortierella* sp. inmovilizada a partir de perlas de alginato de calcio en medio PDA al tercer día de incubación a 28°C.

En la Figura 4-5 se puede observar el porcentaje de germinación del hongo inmovilizado en alginato en el tiempo, durante 12 meses. Las perlas presentaron crecimiento de por lo menos una colonia en medio de cultivo PDA, presentando índices de germinación (IG) del 100% durante el tiempo, este se midió como el número de colonias sobre el número de perlas secas por 100.

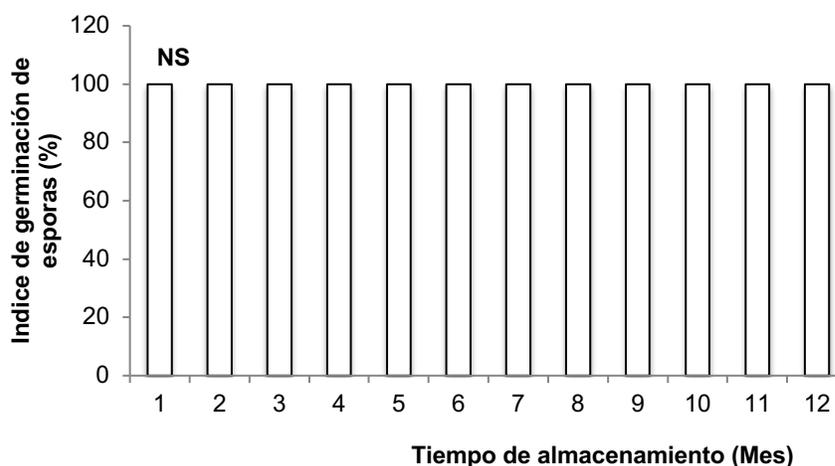


Figura 4-5. Índice de germinación es esporas (%) de *Mortierella* sp. por perla seca en medio cultivo PDA en función del tiempo. Cada columna representa el promedio de 5 repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. NS: no hay diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ). Las perlas fueron conservadas a temperatura ambiente en un ambiente estéril.

Además de observar el crecimiento de las colonias por perlas se hicieron conteos de las esporas por perla cada mes durante un año. El número de esporas no presentó diferencia

significativa con el tiempo como se puede ver en la Figura 4-6, los valores permanecieron en un promedio de  $3.6 \times 10^5$  esporas por perla seca de alginato de Ca.

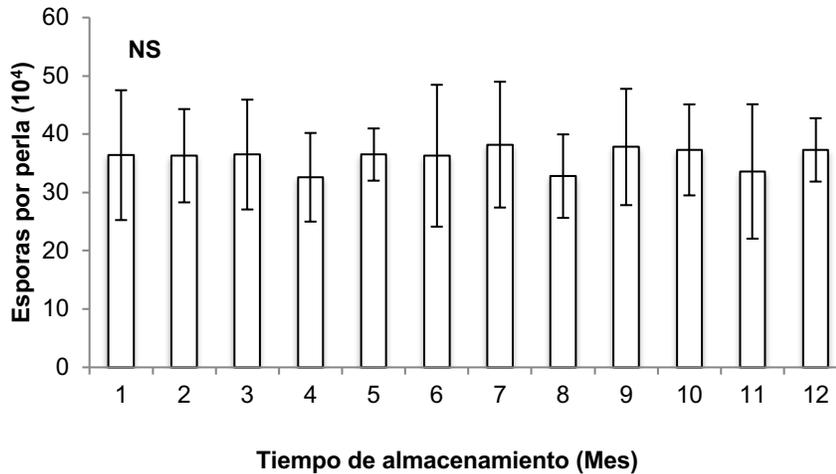


Figura 4-6 Contenido de esporas de *Mortierella* sp. por perla seca en función del tiempo (12 meses). Cada columna representa el promedio de 10 repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. NS: no hay diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ). Las perlas fueron conservadas a temperatura ambiente en un ambiente estéril.

El hongo *Mortierella* sp. se pudo inmovilizar en alginato de calcio. Las perlas presentaron una cantidad adecuada de esporas del hongo ( $10^5$  esporas por perla). Esta cantidad no disminuyó con el proceso de secado, lo que indica que una temperatura de  $40^\circ\text{C}$  por 40 horas fue adecuada para este microorganismo, ya que no se perdieron esporas y tampoco germinaron prematuramente durante el tiempo de almacenamiento. Al sembrarlas en medio de cultivo se observó porcentajes de germinación del 100% durante un año, lo cual indica que no están perdiendo su viabilidad.

Aunque el crecimiento en medio de cultivo es importante, en el suelo es un aspecto relevante para la agricultura. Con este fin se realizaron pruebas de respiración del hongo inmovilizado en perlas en suelo estéril. La respiración se determinó a través de la producción de  $\text{CO}_2$  en el tiempo. Esta aumentó significativamente al pasar los días como se puede ver en la

Figura 4-7. La respiración empezó a partir del día 3, lo cual coincide con el crecimiento del hongo inmovilizado en medio PDA. A medida que avanza el tiempo, la respiración presentó un crecimiento constante hasta el día 15, en el que se estabiliza hasta el día 21. El hongo inmovilizado es capaz de crecer y respirar en el suelo sin adición de nutrientes.

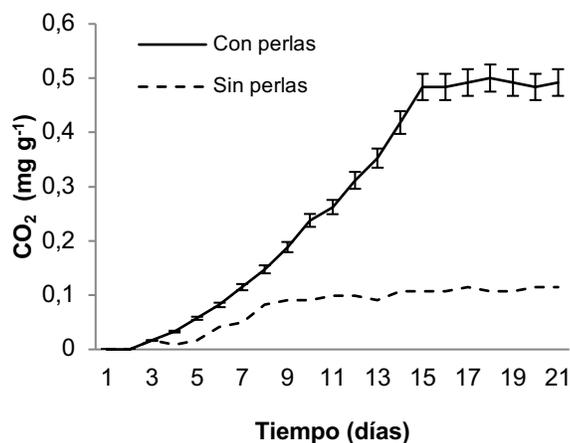


Figura 4-7. Producción de CO<sub>2</sub> (mg g<sup>-1</sup>) a partir de la inoculación o no (control) con perlas de alginato (dos meses de almacenamiento) con *Mortierella* sp. en un oxisol. Las barras indican la desviación estándar. NS: no hay diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ). Las perlas fueron previamente conservadas a temperatura ambiente en un ambiente estéril sellado.

En los primeros días de respiración se observó una actividad más lenta con el microorganismo inmovilizado, con el paso del tiempo los valores de producción de CO<sub>2</sub> se llegaron a equilibrar alrededor de un valor de 0.5 mg g<sup>-1</sup>, lo cual sugiere que mientras se disuelve la perla de alginato el microorganismo se encuentra en una especie de latencia. El microorganismo inmovilizado se va liberando conforme las capas de la perla se van disolviendo y así el hongo cuando germina empieza a respirar. Con el objetivo de ver si este efecto fue igual en diferentes órdenes de suelos se usó además del Oxisol (Carimagua), un Andisol (Guarne) y un Mollisol (Neira). En la Figura 4-8 se puede observar como de acuerdo al tipo de suelo la respiración es más lenta o rápida. Es posible que esto este asociado a la materia orgánica que es fuente de carbono y energía para *Mortierella* sp. El hongo empieza a respirar más rápido en el andisol que es el suelo con mayor contenido de materia orgánica (12.5 %), seguido del Mollisol (materia orgánica: 3.5 %) y por último el oxisol que es el que tiene menor cantidad de materia orgánica (2.3 %). Sin embargo al final del proceso independiente del tipo del suelo ya que la respiración alcanzó valores similares. Se puede observar una diferencia significativa entre inocular o no los suelos. Los controles no superaron el valor de CO<sub>2</sub> de 0.1 mg g<sup>-1</sup>. Sólo en los primeros días no se presentaron diferencias significativas al inocular el microorganismo inmovilizado y sin inmovilizar.

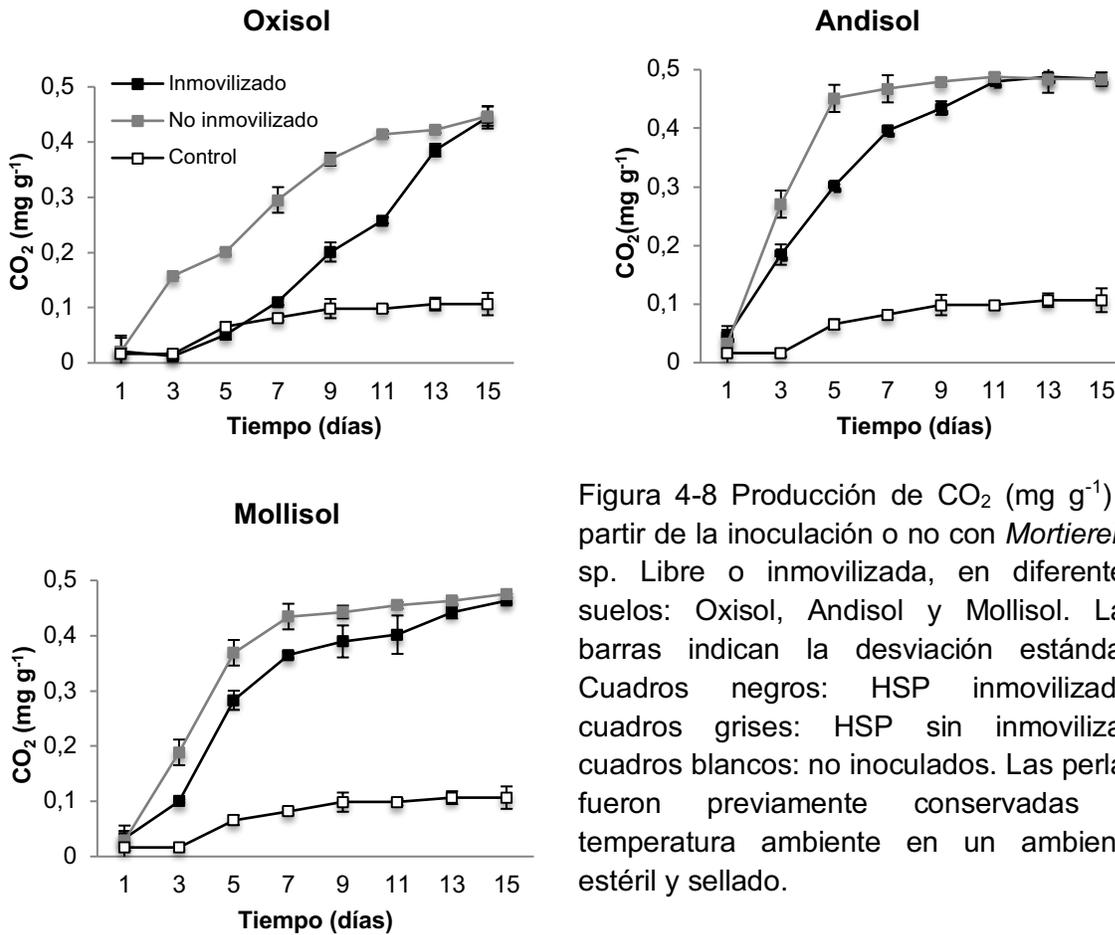


Figura 4-8 Producción de CO<sub>2</sub> (mg g<sup>-1</sup>) a partir de la inoculación o no con *Mortierella* sp. Libre o inmovilizada, en diferentes suelos: Oxisol, Andisol y Mollisol. Las barras indican la desviación estándar. Cuadros negros: HSP inmovilizado, cuadros grises: HSP sin inmovilizar, cuadros blancos: no inoculados. Las perlas fueron previamente conservadas a temperatura ambiente en un ambiente estéril y sellado.

El microorganismo sin inmovilizar empezó a respirar más rápido que el inmovilizado, mientras que la perla de alginato se fue disolviendo y así liberó las esporas del hongo. Para el día 13 en los tres suelos se da la misma tasa de respiración independientemente de la inmovilización o no. Aunque la inmovilización retrasó un poco la actividad del microorganismo al liberarse de la perla, el hongo inmovilizado no pierde su capacidad para germinar y respirar. La tasa de respiración no presenta diferencia significativa entre inocular el microorganismo libre o inmovilizado.

En la Figura 4-9 se presenta un diagrama de disolución de la perla de alginato y liberación de las esporas de *Mortierella* sp. en el tiempo en presencia de suelo. En la inoculación (tiempo 0) se adiciona la perla de alginato de Ca seca, que contiene esporas del hongo sin germinar. La perla se disuelve de las capas más externas a las internas, en cada una de ellas contiene esporas que se van liberando y al estar en el suelo empiezan a germinar. En las primeras 24 horas (1 d) la perla se hidrata y se disuelve la primera capa de alginato. A partir de este momento la disolución de la perla se acelera y empieza la primera liberación

de esporas hasta los días 9-13 en los que se da la disolución total de la perla de alginato y liberación del hongo.

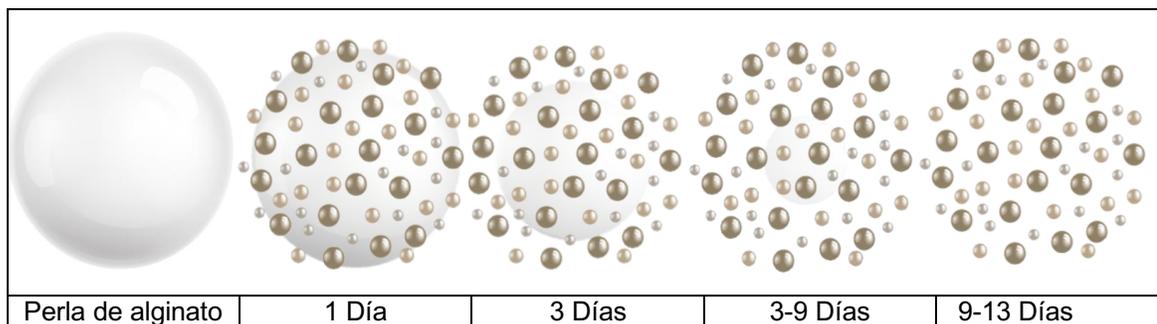


Figura 4-9. Diagrama de disolución de la perla de alginato de calcio y liberación de esporas del hongo *Mortierella* sp. en el tiempo en presencia de suelo.

La inmovilización del hongo *Mortierella* sp. en perlas secas de alginato de calcio tiene no solo beneficios en la conservación del microorganismo sino también prácticos en la agricultura como:

- A diferencia de un inoculante sin inmovilizar, el microorganismo se va liberando lentamente de la perla, lo que le da ventajas en la adaptación al nuevo ambiente de crecimiento, le da una protección temporal por lavados, agroquímicos, antagonistas entre otros.
- Se requiere pequeñas dosis por planta (mg), por lo tanto es más económico almacenar, transportar y aplicar el inoculante.
- Ocupa poco espacio para su almacenamiento, no requiere cadena de frío, se puede almacenar a temperatura ambiente en un recipiente sellado.
- Las perlas secas se pueden mezclar con otros fertilizantes, enmiendas o semillas. Aunque este microorganismo se puede aplicar en cualquier etapa de la planta, idealmente se deben adicionar al momento de la siembra y posteriormente en etapas de establecimiento.
- Las perlas secas son sólidas, estables, con una composición definida por perla, fáciles de manejar y previenen la contaminación del microorganismo en su interior.
- Al disolverse la perla además de liberar las esporas, se obtiene alginato y Ca, los cuales son inocuos y son nutrientes para microorganismo y para la planta.

#### 4.4 Conclusiones

- La inmovilización del biosolubilizador *Mortierella* sp. proporcionó un entorno definido para el hongo, consistente en calidad y número de esporas por perla. Cada perla seca contiene  $10^5$  esporas, este valor no cambia en el tiempo durante su almacenamiento (hasta 12 meses), cada una ocupa poco volumen ( $2.6 \text{ mm}^3$  de diámetro) y son de bajo peso (2 mg).

- Las perlas de alginato no son solubles en agua o por humedad, por lo tanto las esporas no germinan durante el transporte y almacenamiento. Las perlas solo se disuelven en medio de cultivo, suelos o soluciones ácidas.
- Los suelos de diferente mineralogía pueden afectar la viabilidad del hongo inmovilizado solo en las primeras etapas de adaptación y disolución de la perla. Sin embargo, el microorganismo alcanza tasa de respiración muy similares independientemente del tipo de suelo e incluso de la cantidad de materia orgánica.

## 4.5 Referencias

- Abouzeid, A.-Z.M. (2008). Physical and thermal treatment of phosphate ores — An overview. *Int. J. Miner. Process.* 85, 59–84.
- Alvarez, C. (2012). Identificación y caracterización bioquímica, morfológica y molecular de microorganismos cultivables asociados a la rizosfera y al sustrato de plantas de vainilla. Maestría en Ciencias geomorfología y suelos. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.
- Aydin, I., Aydin, F., Saydut, A., Bakirdere, E.G., and Hamamci, C. (2010). Hazardous metal geochemistry of sedimentary phosphate rock used for fertilizer (Mazıdag, SE Anatolia, Turkey). *Microchem. J.* 96, 247–251.
- Bashan, Y. (1986). Alginate Beads as Synthetic Inoculant Carriers for Slow Release of Bacteria That Affect Plant Growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 1089–1098.
- Bashan, Y., Hernandez, J.-P., Leyva, L.A., and Bacilio, M. (2002). Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biol. Fertil. Soils* 35, 359–368.
- de-Bashan, L.E., and Bashan, Y. (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresour. Technol.* 101, 1611–1627.
- de-Bashan, L.E., Hernandez, J.-P., Morey, T., and Bashan, Y. (2004). Microalgae growth-promoting bacteria as “helpers” for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. *Water Res.* 38, 466–474.
- Cai, L., Xiao, H.-R., Huang, S.-M., Li, H., and Zhou, G.-T. (2013). Solubilization of Magnesium-Bearing Silicate Minerals and the Subsequent Formation of Glushinskite by *Aspergillus niger*. *Geomicrobiol. J.* 30, 302–312.
- Covarrubias, S.A., de-Bashan, L.E., Moreno, M., and Bashan, Y. (2011). Alginate beads provide a beneficial physical barrier against native microorganisms in wastewater treated with immobilized bacteria and microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 2669–2680.
- Jain, R., Saxena, J., and Sharma, V. (2010). The evaluation of free and encapsulated *Aspergillus awamori* for phosphate solubilization in fermentation and soil–plant system. *Appl. Soil Ecol.* 46, 90–94.
- Kaur, S., Dhillon, G.S., Brar, S.K., Chauhan, V.B., Chand, R., and Verma, M. (2013). Potential Eco-friendly Soil Microorganisms: Road Towards Green and Sustainable

- Agriculture. In *Management of Microbial Resources in the Environment*, A. Malik, E. Grohmann, and M. Alves, eds. (Springer Netherlands), pp. 249–287.
- Khan, M.S., Zaidi, A., and Wani, P.A. (2007). Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture — A review. *Agron. Sustain. Dev.* 27, 29–43.
- Kucey, R.M.N. (1983). Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin alberta soils. *Can. J. Soil Sci.* 63, 671–678.
- Leung, K.T., So, J.-S., Kostrzynska, M., Lee, H., and Trevors, J.T. (2000). Using a green fluorescent protein gene-labeled p-nitrophenol-degrading *Moraxella* strain to examine the protective effect of alginate encapsulation against protozoan grazing. *J. Microbiol. Methods* 39, 205–211.
- Martínez-Trujillo, M.A., and García-Rivero, M. (2012). Revisión: Aplicaciones ambientales de microorganismos inmovilizados. *Rev. Mex. Ing. Quím.* 11, 55–73.
- Osorio, N.W. (2008). Effectiveness of microbial solubilization of phosphate in enhancing plant phosphate uptake in tropical soils and assessment of the mechanisms of solubilization. Thesis.
- Osorio, N.W., and Habte, M. (2001). Synergistic Influence of an Arbuscular Mycorrhizal Fungus and a P Solubilizing Fungus on Growth and P Uptake of *Leucaena leucocephala* in an Oxisol. *Arid Land Res. Manag.* 15, 263–274.
- Osorio, N.W., and Habte, M. (2012). Phosphate desorption from the surface of soil mineral particles by a phosphate-solubilizing fungus. *Biol. Fertil. Soils* 49, 481–486.
- Osorio, N.W., and Habte, M. (2013). Synergistic effect of a phosphate-solubilizing fungus and an arbuscular mycorrhizal fungus on *leucaena* seedlings in an Oxisol fertilized with rock phosphate. *Botany* 91, 274–281.
- Osorio, N.W., and Habte, M. (2014). Soil Phosphate Desorption Induced by a Phosphate-Solubilizing Fungus. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 45, 451–460.
- Osorno, L., and Osorio, N.W. (2014). Effect of Carbon and Nitrogen Source and Concentration on Rock Phosphate Dissolution Induced by Fungi. *J. Appl. Biotechnol.* 2, 1–11.
- Osorno, L., Osorio, N.W., and Habte, M. (2018). Phosphate desorption by a soil fungus in selected Hawaiian soils differing in their mineralogy. *Trop. Agric.* 95, 154–166.
- Rivera, D., Obando, M., Rojas-Tapias, D.F., Bonilla-Buitrago, R., and Barbosa, H. (2016). Entrapment of *Rhizobium* sp. by fluidized bed technique using polymers as coating materials. *Univ. Sci.* 21, 117–128.
- Tamayo-Velez, A., and Osorio, N.W. (2016). Coinoculation with an Arbuscular Mycorrhizal Fungus and a Phosphate Solubilizing Fungus Promotes Plant Growth and Phosphate Uptake of Avocado Plantlets at Nursery. *Botany*.
- Vassilev, N., Baca, M.T., Vassileva, M., Franco, I., and Azcon, R. (1995). Rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* grown on sugar-beet waste medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44, 546–549.
- Vassilev, N., Fenice, M., and Federici, F. (1996). Rock phosphate solubilization with gluconic acid produced by immobilized *Penicillium variable*P16. *Biotechnol. Tech.* 10, 585–588.

- Vassilev, N., Vassileva, M., Azcon, R., and Medina, A. (2001a). Application of free and Calcium-alginate-entrapped *Glomus deserticola* and *Yarrowia lipolytica* in a soil-plant system. *J. Biotechnol.* 91, 237–242.
- Vassilev, N., Vassileva, M., Azcon, R., and Medina, A. (2001b). Preparation of gel-entrapped mycorrhizal inoculum in the presence or absence of *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Lett.* 23, 907–909.
- Vassileva, M., Azcon, R., Barea, J.-M., and Vassilev, N. (2000). Rock phosphate solubilization by free and encapsulated cells of *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochem.* 35, 693–697.
- Whitelaw, M.A. (1999). Growth Promotion of Plants Inoculated with Phosphate-Solubilizing Fungi. In *Advances in Agronomy*, D.L. Sparks, ed. (Academic Press), pp. 99–151.
- Zhang, H., Wu, X., Li, G., and Qin, P. (2011). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing fungus (*Mortierella* sp.) and their effects on *Kosteletzkya virginica* growth and enzyme activities of rhizosphere and bulk soils at different salinities. *Biol. Fertil. Soils* 47, 543–554.

## **5. Efectividad del hongo *Mortierella* sp. inmovilizado en alginato para biosolubilizar roca fosfórica**

### **5.1 Introducción**

La deficiencia de fósforo (P) es un factor limitante para el desarrollo, crecimiento y productividad vegetal (Scholz et al., 2013; Ulrich and Frossard, 2014). Para corregir este problema se usan altas dosis de fertilizantes fosfóricos solubles (Asci et al., 2015; Heisey and Norton, 2007; Hue and Fox, 2010), pero su eficiencia usualmente es muy baja, esta entre un 5-10% (Bhatti and Yawar, 2010). Infortunadamente, estos fertilizantes son costosos (Cordell et al., 2009; Zhang et al., 2011; Walan et al., 2014), generan riesgos de contaminar el ambiente (Abouzeid, 2008; Aydin et al., 2010), en su mayoría importados y esto genera a su vez riesgos en la soberanía y seguridad alimentaria de los países que lo consumen (Cordell et al., 2009; Kaur et al., 2013; de Oliveira Souza et al., 2014; Pérez, 2014).

Hay un creciente interés en mejorar la eficiencia de la roca fosfórica como fertilizante y su uso en la síntesis de otros fertilizantes (Lassis et al., 2015; Siminovich and Joao, 2014). Entre las alternativas biotecnológicas para mejorar la disponibilidad de P en el suelo y la capacidad de absorción de este por las plantas está el uso de hongos solubilizadores de P (HSP) (Khan et al., 2007; Osorno and Osorio, 2014; Singh and Reddy, 2011). Los HSP disuelven minerales fosfóricos y además pueden desorber P fijado en los suelos (Chen et al., 2006; Osorio and Habte, 2014; Pandey et al., 2006). El uso de estos microorganismos es muy atractivo en el contexto de la agricultura más limpia (Khan et al., 2007; Cai et al., 2013; Kaur et al., 2013) donde se pretende evitar o reducir el consumo de agroquímicos y mantener rendimientos satisfactorios en los cultivos (Aydin et al., 2010; Vassilev et al., 2001a). Aunque se ha reportado efectos positivos al inocular los HSP (Osorio and Habte, 2013; Zhang et al., 2011), no existe un uso extendido de estos y varios autores reportan inconsistencias en los resultados al inocular con estos microorganismos (Jain et al., 2010; Khan et al., 2007; Whitelaw, 1999). Existen factores que pueden afectar los inóculos microbianos en la agricultura asociados al inóculo: formulación, supervivencia del microorganismo y efectividad de este (Bashan et al., 2002; Jain et al., 2010; Leung et al.,

2000), a factores ambientales: sequía o exceso de lluvia y factores asociados al suelo como la mineralogía (Osorio and Habte, 2014), contenido de nutrientes, efectos residuales de fertilizantes, fungicidas o agroquímicos, exceso de aluminio y antagonistas.

Presumiblemente, estos HSP podrían tolerar mejor las condiciones de almacenamiento, transporte y uso, si están inmovilizados en alginato para así prolongar su viabilidad y efectividad, tal como se ha hecho con otros microorganismos (Bashan, 1998; Bashan et al., 2014). La inmovilización puede mejorar la duración del inóculo en empaques, reducir impacto de antagonistas, facilitar la aplicación con otros insumos (semillas, minerales, otros microorganismos). Desafortunadamente, no hay reportes para la inmovilización en alginato de *Mortierella* sp. para solubilizar minerales fosfóricos, por lo cual no se tiene certeza que esta técnica sea efectiva para mantener la efectividad del microorganismo.

La hipótesis de este trabajo fue que la inoculación con el HSP inmovilizado en alginato favorece la disolución *in vitro* de roca fosfórica y así libera nutrientes; el efecto puede estar controlado por la dosis del microorganismo inmovilizado y por el tiempo de incubación. En consecuencia, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la dosis creciente del hongo *Mortierella* sp. inmovilizado en perlas de alginato para disolver roca fosfórica y evaluar el proceso de biosolubilización de RP por *Mortierella* sp. inmovilizada a través del tiempo de incubación *in vitro*.

## 5.2 Materiales y métodos

### Microorganismo

El HSP fue *Mortierella* sp. originalmente aislado a partir de un Andisol y del cual se ha demostrado su efectividad para promover el crecimiento y la absorción de P vegetal (Osorio y Habte, 2001). Este hongo se multiplicó en medio PDA durante 15 días y 25°C y luego se suspendió en agua destilada estéril y se conservará en nevera a 4°C para su uso experimental.

### Procedimiento de inmovilización

El hongo se inmovilizó siguiendo el método descrito por de-Bashan et al. (2004) para bacterias. Para tal fin, 40 mL de inóculo de *Mortierella* sp. ( $10^7$  esporas mL<sup>-1</sup>) se mezclaron con 160 mL de una solución estéril de alginato de sodio al 2%, la cual se agitó por 15 min a 40 rpm. Luego, se dejaron caer gotas de esta mezcla en una solución de CaCl<sub>2</sub> al 2% con agitación a 40 rpm y así formar las perlas de alginato de calcio (de-Bashan and Bashan, 2010). Posteriormente, las perlas se mantuvieron en CaCl<sub>2</sub> al 2% para su estabilización por 1 h a 28 °C y finalmente se lavaron en solución salina estéril y agua destilada y se secaron en una estufa a 40 °C por 48 h.

### Medio de cultivo y condiciones de biosolubilización de RP por el HSP inmovilizado

La composición básica del medio de cultivo fue (g L<sup>-1</sup>): glucosa: 10, NH<sub>4</sub>Cl: 1, KCl: 1.87, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O: 0.2, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O: 0.4 y RP: 3.5 como única fuente de P (Osorio, 2008). Erlenmeyer de 250 mL que contengan 75 mL de este medio se esterilizaran en autoclave a 120°C, 0.1 MPa, por 20 minutos. Una vez inoculados los *erlenmeyers* con el HSP inmovilizado se agitaron continuamente a 100 rpm, 28°C, durante 7 días.

La roca fosfórica (RP) usada fue una muestra comercial proveniente de las minas del Huila, Colombia, pasada a través de un tamiz de 250 µm. Su fórmula molecular es Ca<sub>9.69</sub>Na<sub>0.22</sub>Mg<sub>0.09</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>5.14</sub>(CO<sub>3</sub>)<sub>0.86</sub>F<sub>2.34</sub> (Chien and Hammond, 1978), con una concentración de P del 12%.

Para determinar el efecto de la inmovilización del HSP en la biosolubilización del RP se realizaron los siguientes experimentos:

- Evaluación de dosis de perlas de alginato de calcio con HSP para biosolubilizar RP bajo condiciones *in vitro* por 7 días. Cada erlenmeyer se inoculó con cantidades crecientes de perlas: 0 (control), 150, 300, 450 y 500 mg de perlas con *Mortierella* sp. inmovilizado en alginato de calcio.
- Evaluación de la biosolubilización de RP con el HSP inmovilizado en alginato (150 mg de perla por erlenmeyer), en función del tiempo, se midió el día 0, 1 y luego cada 2 días por 21 días.

#### Variables evaluadas

Luego del periodo de incubación para los ensayos de biosolubilización de RP, se determinó el pH y la concentración de P y Ca del medio de cultivo, conductividad eléctrica y biomasa. El pH se midió usando un potenciómetro (WTW electrodo Sentix 81). La concentración de P (mg L<sup>-1</sup>) se determinó mediante el método del azul-molibdato (Murphy y Riley 1962) a 890 nm (espectrofotómetro Genesys 20 Thermo Spectronic), previa filtración en papel filtro Whatman No. 42 y centrifugación (centrifuga Jouan MR 1812) a 4000 rpm (1520xg) durante 10 minutos, para cada medida se realizó una curva de calibración. Ca se midió por espectrofotometría de absorción atómica Perkin Elmer 2380. La conductividad eléctrica se midió directamente en la solución sin diluir con un electrodo Schoott LF413T.

#### Análisis estadístico

En todos los experimentos se empleó un diseño estadístico completamente al azar. Cada tratamiento tuvo cinco réplicas, incluyendo el control no inoculado. El efecto de los tratamientos se evaluó mediante análisis de varianza y cuando estos fueron significativos se utilizó la prueba de separación de medias de Duncan y la diferencia mínima significativa (LSD). Los análisis se hicieron con un nivel de significancia (*P*) ≤0.05, mediante el software STATGRAPHICS versión centurión XVI. Todos los experimentos se repitieron en el tiempo.

### 5.3 Resultados y discusión

#### Biosolubilización de RP usando diferentes dosis (mg) del hongo *Mortierella* sp. inmovilizado en alginato de Ca

La inoculación con el hongo inmovilizado en alginato de calcio presentó un efecto significativo en la biosolubilización de RP con respecto a los controles no inoculados (dosis: 0 mg). Se conoce que el mecanismo de biosolubilización de RP del HSP es la producción de ácidos orgánicos, lo cual se evidenció por la disminución del pH en la solución. Este efecto tuvo diferencias de acuerdo a la dosis de perlas de alginato con el hongo. Así, a 7 días del proceso el pH del control fue de 5.5, mientras que al inocular con la menor dosis de *Mortierella* sp. inmovilizado (150 mg) el pH disminuyó significativamente a 2.9, con la dosis de 300 mg a pH de 3.2 y con las mayores dosis (450 y 600 mg) a pH de 3.5.

Por su parte, la conductividad eléctrica del medio también cambio significativamente y se usó como una medida indirecta de la actividad del hongo. Este valor aumentó al inocular el microorganismo en el medio de cultivo pasando de valores de  $3.7 \text{ mS cm}^{-1}$  en el control (0 mg) a valores de 3.9, 4.12, 4.33 y  $4.53 \text{ mS cm}^{-1}$  con las aplicaciones de 150, 300, 450 y 600 mg de perla por *erlenmeyer*, respectivamente (

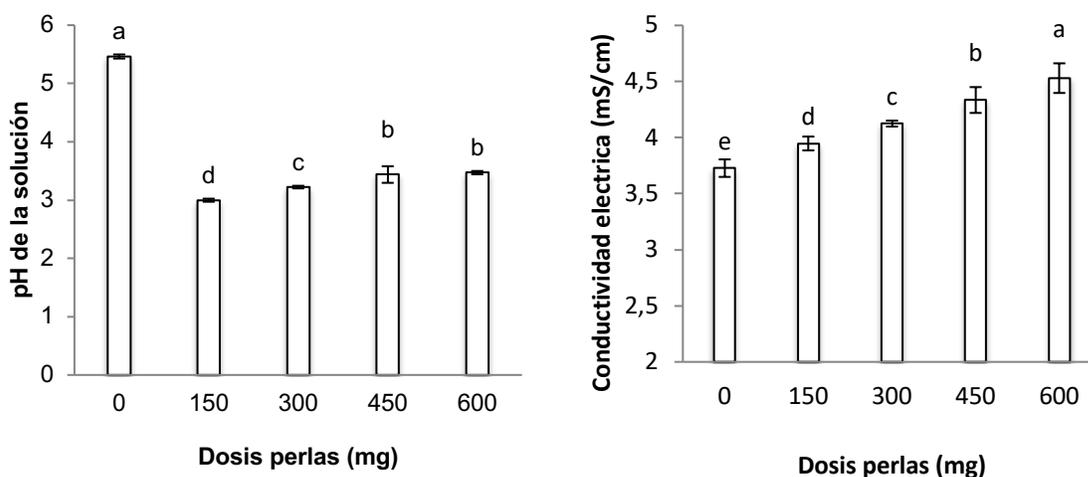


Figura 5-1).

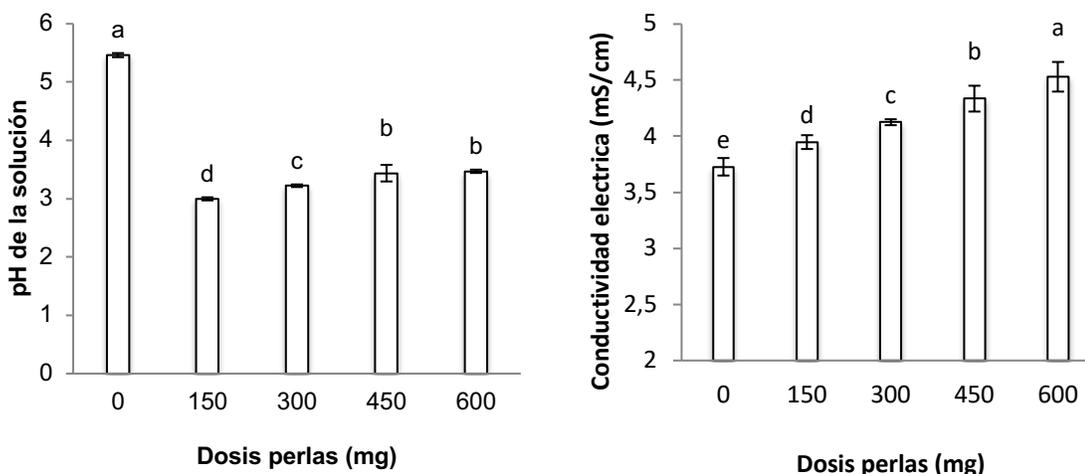


Figura 5-1. pH y conductividad eléctrica de la solución ( $\text{mS cm}^{-1}$ ) en función de la dosis de perlas de *Mortierella* sp. inoculadas (0, 150, 300, 450 y 600 mg) en la biosolubilización de roca fosfórica. Cada columna representa el promedio de cinco repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ).

La concentración de P en solución resultado de la biosolubilización de la RP aumentó significativamente con la inoculación del hongo con respecto al control no inoculado ( $0.53 \text{ mg L}^{-1}$ ). Sin embargo, las dosis de perlas no generaron diferencia significativa en esta variable, el valor promedio fue de  $68.1 \text{ mg L}^{-1}$ , tal como se puede ver en la

Figura 5-2.

A diferencia del P, la concentración de Ca en el medio si presentó una diferencia significativa con respecto a las diferentes dosis de las perlas de *Mortierella* sp. y con respecto al control no inoculado (

Figura 5-2). El contenido de calcio en solución fue mayor al aumentar la dosis del microorganismo inoculado, pasando de  $52.6 \text{ mg L}^{-1}$  en el control, a valores de 290, 386, 444 y  $621 \text{ mg L}^{-1}$  con el incremento de las dosis respectivas. Este efecto es debido a la mayor proporción de Ca en la RP con respecto al P, además hay una pequeña proporción del Ca contenido en la perla de alginato. De tal manera que al disolverse las perlas se libera este catión que es encargado de polimerizar el alginato; el aporte de Ca por las perlas de alginato estimado fue de 14, 28, 42 y 56 mg de Ca por litro con las dosis de 150, 300, 450 y 600 mg, respectivamente.

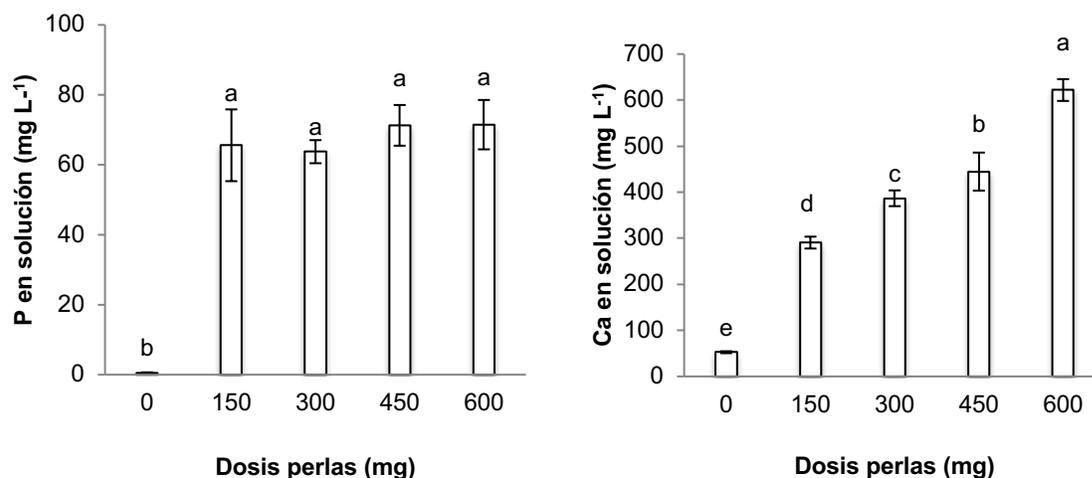


Figura 5-2. Concentración de P y Ca en la solución ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en función de la dosis de perlas de *Mortierella* sp. inoculadas (0, 150, 300, 450 y 600 mg) en la biosolubilización de roca fosfórica. Cada columna representa el promedio de cinco repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ).

El número de esporas y la biomasa seca del hongo (mg) fueron significativamente afectadas por los tratamientos. Así, al aumentar la dosis el número de esporas por erlenmeyer aumentó de la siguiente forma: con la menor dosis (150 mg) hubo  $6.2 \times 10^5$  esporas por mL, con las dosis de 300 y 450 mg el número de esporas pasó a  $61.7$  y  $77.3 \times 10^5$  por mL; con la mayor dosis (600 mg) el número de esporas alcanzó valores de  $12.5 \times 10^7$  por mL. De manera similar, la biomasa del hongo aumentó a medida que la dosis inicial del inóculo fue mayor (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Con las menores dosis (150-300 mg) la biomasa promedio fue de 0.32 mg por erlenmeyer, mientras que con las dos dosis más altas (450-600 mg) esta fue significativamente mayor y alcanzó un valor promedio de 0.50 mg.

A manera de resumen se ve que es claro que el hongo *Mortierella* sp. inmovilizado en alginato no perdió su viabilidad y pudo crecer en el medio de cultivo durante los 7 días de incubación y así biosolubilizar RP. Las perlas de alginato se disolvieron (al final del proceso no fueron visibles) y liberaron las esporas del HSP como se mencionó anteriormente (Figura 5-3). Esto estuvo acompañado de la disminución en el pH del medio y en el aumento en la concentración de P y Ca en la solución con respecto al control. Por lo anterior, se puede considerar que la dosis a usar en futuros estudios debería ser al menos de 150 mg de perlas por 100 mL de medio de cultivo; esta dosis equivale a usar  $1 \times 10^7$  esporas por erlenmeyer cuyos efectos reportados en el capítulo 3 y por Osorno y Osorio (2017) sugieren que es una dosis adecuada para bioacidular RP en este sistema.

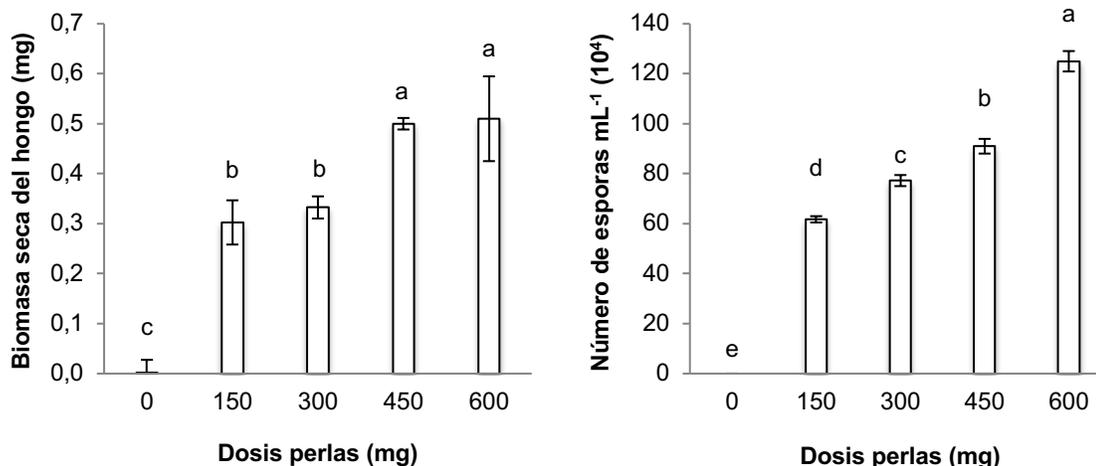


Figura 5-3. Biomasa seca (mg) y número de esporas del hongo (esporas mL<sup>-1</sup>) en función de la dosis de perlas de *Mortierella* sp. inoculadas (0, 150, 300, 450 y 600 mg) en la biosolubilización de roca fosfórica. Cada columna representa el promedio de cinco repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ).

### Biosolubilización de RP con el HSP inmovilizado en alginato en el tiempo

En la Figura 5-4 se puede ver los resultados encontrados en pH, número de esporas, P y Ca en solución en función de la inoculación y el tiempo para la biosolubilización de la RP por el hongo inmovilizado en alginato. Se puede observar que en todas las variables hubo diferencias significativas con los factores y la interacción de ambos.

Los resultados detectados de esporas, P y Ca muestran claramente un modelo tipo Michaelis-Menten en procesos biológicos discontinuos en el que se pueden describir 4 fases como se propone en la Tabla 5-1. La Biomasa describe el crecimiento microbiano en el tiempo, el valor de pH indirectamente la producción de ácidos orgánicos por el hongo como metabolitos secundarios y la concentración de P y Ca en solución como resultado de la biosolubilización de la RP.

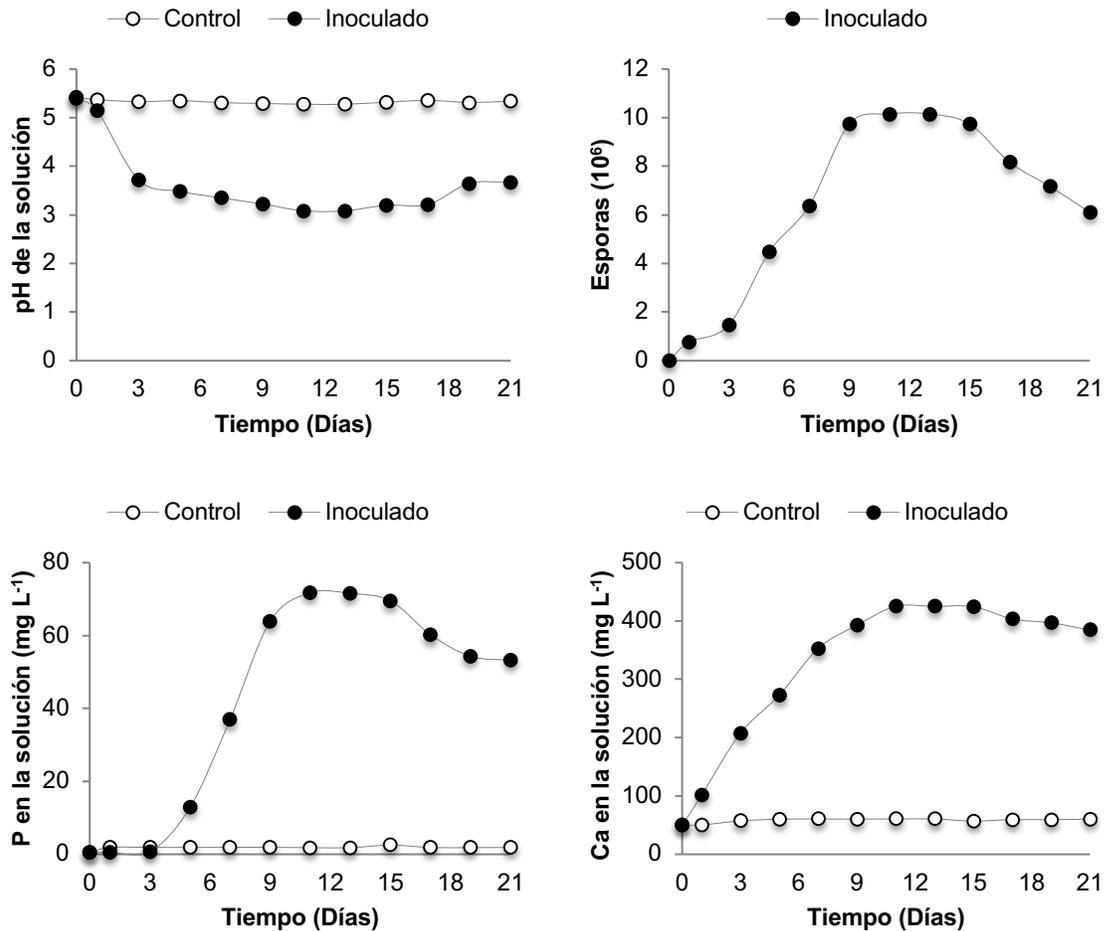


Figura 5-4. pH, número de esporas ( $1 \text{ mL}^{-1}$ ), concentración de P y Ca en la solución ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en el tiempo (días) en función de la inoculación (perlas de *Mortierella* sp.) o no (Control). Cada punto representa el promedio de cuatro repeticiones. La barra indica la mínima diferencia significativa (LSD). Los valores del LSD para pH, esporas, P y Ca soluble fueron 0.5, 10, 10 y 51, respectivamente.

Durante el proceso estudiado es claro que para que se de la biosolubilización de RP por el hongo inmovilizado, primero se debe disolver la perla de alginato liberando las esporas de *Mortierella* sp. Luego, estas germinan en el medio (crecimiento del hongo), donde se dan conversiones químicas asociadas a su metabolismo en el cual se transforma la fuente de carbono y energía (glucosa) en ácidos orgánicos (principalmente ácido oxálico) (Nahas, 2007). La producción de este ácido es inducido por la ausencia de P en el medio, entre otros factores (Osorno and Osorio, 2014), este es asociado con la disminución del pH, luego reacciona con la RP y empieza gradualmente a disolverla y, de esta manera, libera P y Ca. Por lo tanto, la concentración de P como Ca son inversamente proporcionales al valor de pH en el medio. Ciertamente una pequeña parte la consume el microorganismo y la mayor cantidad queda en solución.

Varios autores han reportado la disolución microbiana de RP en diferentes tiempos de incubación, se han reportado resultados a 3 días (Chen et al., 2006), 4 días (Relwani et al., 2008), 6 días (Jain et al., 2012), 7 días (Alam et al., 2002; Barroso et al., 2006; Osorio et al., 2012), 8 días (Kucey, 1983, Xiao et al., 2008; Schneider et al., 2010), 10 días (Collavino et al., 2010) y 30 días (Sahu and Jana, 2000). La concentración de P liberado en solución también puede cambiar de acuerdo al microorganismo usado y a las condiciones del medio de cultivo. Por ejemplo, Bojinova y colaboradores (2008) estudiaron la disolución de RP con *A. niger* a diferentes días (1, 4, 7 y 10) y encontraron que entre el día 4 y 7 la cantidad de P soluble fue mayor. Igualmente, Vassileva y colaboradores (1998) evaluaron el proceso de disolución de RP entre 3-17 d con *A. niger* y encontraron que en el día 9 se dio la mayor concentración de P soluble. Por su parte, Ivanova et al. (2006) evaluaron la disolución de RP por *Erwinia* y *Azotobacter* entre 3-15 d y encontraron que para *Erwinia* se necesitaron 6 d para encontrar el valor máximo de P soluble en el medio, mientras que *Azotobacter* necesitó 12 d. Sahu y Jana (2000) evaluaron 30 d del proceso y encontraron que para *Bacillus* la máxima concentración de P soluble ocurrió a los 12 d de incubación. Osorio y Osorio, (2017) evaluaron el efecto de *Mortierella* sp. (sin inmovilizar) para disolver RP durante 15 d y encontraron que se alcanzó la mayor concentración de P soluble luego de 5 d de incubación. En el presente estudio *Mortierella* sp., inmovilizado en perlas de alginato, alcanzó la concentración máxima de P en el 11 d, es decir, en el doble de tiempo que sin inmovilizar. Esto sugiere que con la inmovilización debe ocurrir un proceso de disolución de la perla de alginato y, en consecuencia, ocurre la liberación de esporas del hongo.

Tabla 5-1. Parámetros de la biosolubilización de roca fosfórica por el hongo *Mortierella* sp. inmovilizado en alginato de calcio en el tiempo.

Tiempo		Parámetros							
		Biomasa		pH		P (mg L <sup>-1</sup> )		Ca (mg L <sup>-1</sup> )	
Días	Fase	NI	I (MSP)	NI	I (MSP)	NI	I (MSP)	NI	I (MSP)
0-3	Adaptación	0	1.5X10 <sup>6</sup>	5.3	5.4-3.7	1.8	0.5-0.7	57.9	49.7-207.5
3-11	Exponencial	0	1.2x10 <sup>7</sup>	5.3	3.7-3.8	1.8	0.7-71.8	57.9	207.5-425
11-15	Estacionaria	0	9.7X10 <sup>6</sup>	5.3	3.8-3.3	1.8	71.8-69.5	57.9	425.0-424.0
15-21	Declinación	0	6.1x10 <sup>6</sup>	5.3	3.2-3.7	1.8	69.5-53.2	57.9	424-384.7

I: inoculado con *Mortierella* sp. inmovilizado en alginato de Ca, Ni: no Inoculado (control).

Teniendo en cuenta que es un bioproceso *in vitro* tipo “batch” o por lotes con una duración de 21 días, se puede ver que presenta diferentes comportamientos en el tiempo (Figura 5-4), que pueden agruparse en cuatro fases (Tabla 5-1). Estas fases se designan como (i) adaptación, (ii) exponencial, (iii) estacionaria y (iv) declinación (o de muerte celular), las cuales coinciden con diferentes tasas de producción de esporas, metabolitos y productos esperados de la biosolubilización tales como el P y Ca.

Fase de adaptación: en esta fase se disuelve la perla de alginato, liberando las esporas de *Mortierella* sp., para su germinación. El hongo reconoce el nuevo medio y sensa los nutrientes, entre ellos uno de los aspectos más importantes es que no hay P soluble inicial (el valor no cambia significativamente en los 3 primeros días). Esto induce al hongo a la

producción de ácidos orgánicos; a partir de las 24 h se detecta una disminución en el pH, y un aumento en la concentración de Ca (debido quizá al mismo aporte de calcio de las perlas) y el número de esporas que se liberan de la perla; sin embargo, la producción de esporas es muy baja.

Fase exponencial: las esporas del hongo se encuentran libres y empiezan a germinar. En esta fase el crecimiento del hongo alcanza su velocidad máxima. El microorganismo empieza a producir significativamente ácidos orgánicos (disminución del pH) y estos a su vez empiezan a solubilizar la RP, se presenta aumento en la concentración de P y Ca en solución. En esta etapa la reacción es de orden 1, donde la velocidad de la disolución de RP depende de la biomasa del hongo y su producción de ácidos orgánicos.

Fase estacionaria: en esta fase se sospecha que se da un equilibrio entre los microorganismos que nacen y mueren, el crecimiento aunque es constate es más lento, debido a que al parecer se están agotando los nutrientes del medio. Se estabiliza la producción de ácidos (no hay cambios en el pH) y así también se estabiliza la concentración de P y Ca. En esta etapa la reacción es de orden 0, la velocidad de la biosolubilización de RP es constante e independiente de la concentración de glucosa para ser convertida a ácidos orgánicos.

Fase de declinación: a medida que transcurre el tiempo la cantidad de fuente de carbono y otros nutrientes empieza a disminuir o se pueden agotar por completo (es más evidente en esta fase). Por lo tanto, no hay más producción de ácidos orgánicos (aumento en el valor de pH), es posible que el metabolismo empiece a cambiar y quizá el ácido orgánico se convierta en una nueva fuente de carbono, o que se generen desechos o sustancias que podrían ser tóxicas para el hongo. La biomasa empieza a disminuir en el tiempo, ya que el crecimiento cesa y los valores de P y Ca en solución aunque presentan una disminución en la concentración el valor no presenta cambios al final del proceso.

De manera global, el bioproceso requiere un tiempo de liberación de las esporas del hongo a partir de la perla de alginato. Las esporas liberadas empiezan su ciclo de vida. A partir de la germinación, crecimiento micelial y reproducción (formación de esporangióforo). Durante el ciclo de vida del hongo, en el citoplasma ocurren una serie de procesos metabólicos en los que la fuente de carbono (glucosa) es transformada (vía glucólisis y ciclo de Krebs) en ácidos orgánicos tales como oxálico y cítrico. Adicionalmente, la asimilación de  $\text{NH}_4^+$  por parte del hongo genera los protones ( $\text{H}^+$ ) que reaccionan conjuntamente con la roca fosfórica para así biosolubilizarla. Por lo tanto, en la solución quedan iones de P y Ca biodisponibles que pueden ser usados por el hongo, o eventualmente por otro organismo (planta, hongo micorrizal) (Figura 5-5).

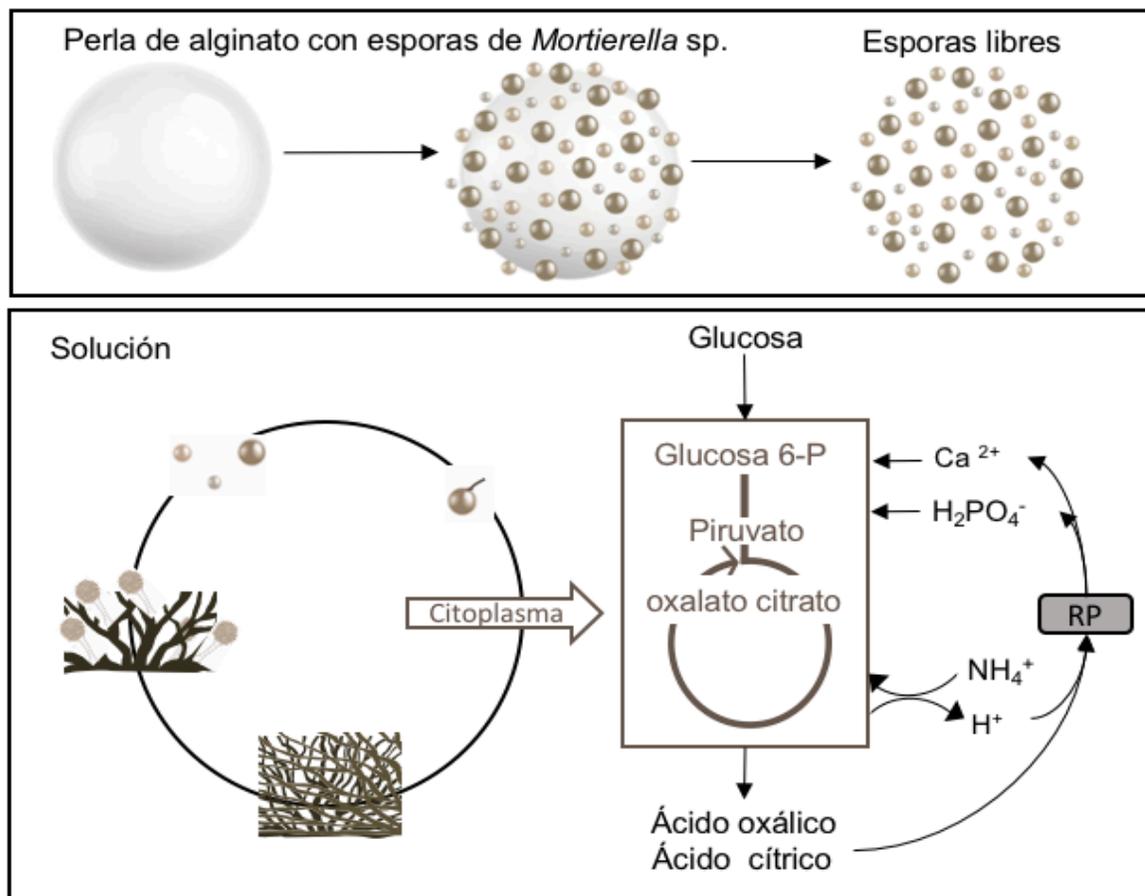


Figura 5-5. Diagrama de disolución de la perla de alginato para la liberación de esporas de *Mortierella* sp., ciclo de crecimiento y reproducción del hongo y la solubilización de la RP (roca fosfórica) por los ácidos orgánicos producidos por el hongo y los protones generados por el consumo de fuentes amoniacales. Elaboración propia.

Un punto a resaltar es que el hongo al ser inmovilizado no pierde viabilidad ni efectividad para biosolubilizar RP. Otros microorganismos solubilizadores han sido inmovilizados en diferentes matrices, *A. awamori* en agar y alginato de calcio (Jain et al., 2012), *A. niger* en agar, alginato de calcio, espuma de poliuretano (PUF) y carragina (Vassilev et al., 1995; Vassileva et al., 1998; Ates et al., 2002), *Yarrowia lipotilica* en agar (Vassilev et al., 2001, 2001; Vassileva et al., 2000), *Penicillium variable* en espuma de poliuretano (PUF), alginato de calcio y agar (Fenice et al., 2000; Vassilev et al., 1996) y *Enterobacter* en agar (Vassilev et al., 1997) y han mantenido o aún mejorado su capacidad para disolver RP (Cassidy et al., 1996; Vassilev et al., 2001). Así mismo, otros microorganismos (p.e., *Rhizobium*, *Azospirillum*, macroalgas) se han inmovilizado en alginato como inoculantes con efectos biofertilizantes en agricultura y en biorremediación (Bashan, 1998; de-Bashan and Bashan, 2010; Cassidy et al., 1996; Covarrubias et al., 2011; Rivera et al., 2016).

## 5.4 Conclusiones

La inmovilización de *Mortierella* sp. en alginato de calcio mantiene la viabilidad y la efectividad del hongo para biosolubilizar roca fosfórica bajo condiciones *in vitro*.

La biosolubilización de la roca fosfórica se ve favorecido al usar dosis pequeñas del microorganismo (1 mg perlas secas). El tiempo en el que se alcanza la máxima concentración de P es de 11 días.

El tiempo juega un papel importante ya que existen diferentes fases que implican la disolución de la perla y, por ende, la liberación de esporas, su crecimiento micelial y reproducción. Durante estas etapas el hongo produce ácidos orgánicos que biosolubilizan la RP.

## 5.5 Referencias

- Abouzeid, A.-Z.M. (2008). Physical and thermal treatment of phosphate ores — An overview. *Int. J. Miner. Process.* 85, 59–84.
- Alam, S., Khalil, S., Ayub, N., and Rashid, M. (2002). In vitro Solubilization of Inorganic Phosphate by Phosphate Solubilizing Microorganisms (PSM) from Maize Rhizosphere. *Int. J. Jpurnal Agric. Biol.* 4, 454–458.
- Ates, S., Dingil, N., Bayraktar, E., and Mehmetoglu, U. (2002). Enhancement of citric acid production by immobilized and freely suspended *Aspergillus niger* using silicone oil. *Process Biochem.* 38, 433–436.
- Aydin, I., Aydin, F., Saydut, A., Bakirdere, E.G., and Hamamci, C. (2010). Hazardous metal geochemistry of sedimentary phosphate rock used for fertilizer (Mazıdag, SE Anatolia, Turkey). *Microchem. J.* 96, 247–251.
- Barroso, C.B., Pereira, G.T., and Nahas, E. (2006). Solubilization of CaHPO<sub>4</sub> and AlPO<sub>4</sub> by *Aspergillus niger* in culture media with different carbon and nitrogen sources. *Braz. J. Microbiol.* 37, 434–438.
- Bashan, Y. (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol. Adv.* 16, 729–770.
- Bashan, Y., Hernandez, J.-P., Leyva, L.A., and Bacilio, M. (2002). Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biol. Fertil. Soils* 35, 359–368.
- Bashan, Y., de-Bashan, L.E., Prabhu, S., and Hernandez, J. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology-formulations and practical perspectives. *Plant Soil* 378, 1–33.
- de-Bashan, L.E., and Bashan, Y. (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresour. Technol.* 101, 1611–1627.
- de-Bashan, L.E., Hernandez, J.-P., Morey, T., and Bashan, Y. (2004). Microalgae growth-promoting bacteria as “helpers” for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. *Water Res.* 38, 466–474.

- 
- Bhatti, T.M., and Yawar, W. (2010). Bacterial solubilization of phosphorus from phosphate rock containing sulfur-mud. *Hydrometallurgy* 103, 54–59.
- Bojinova, D., Velkova, R., and Ivanova, R. (2008). Solubilization of Morocco phosphorite by *Aspergillus niger*. *Bioresour. Technol.* 99, 7348–7353.
- Cai, L., Xiao, H.-R., Huang, S.-M., Li, H., and Zhou, G.-T. (2013). Solubilization of Magnesium-Bearing Silicate Minerals and the Subsequent Formation of Glushinskite by *Aspergillus niger*. *Geomicrobiol. J.* 30, 302–312.
- Cassidy, M., Lee, H., and Trevors, J. (1996). Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. *J Ind Microbiol* 16, 79–101.
- Chen, Y.P., Rekha, P.D., Arun, A.B., Shen, F.T., Lai, W.-A., and Young, C.C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl. Soil Ecol.* 34, 33–41.
- Chien, S.H., and Hammond, L.L. (1978). A Comparison of Various Laboratory Methods for Predicting the Agronomic Potential of Phosphate Rocks for Direct Application. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 42, 935.
- Collavino, M.M., Sansberro, P.A., Mroginski, L.A., and Aguilar, O.M. (2010). Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. *Biol. Fertil. Soils* 46, 727–738.
- Cordell, D., Drangert, J.-O., and White, S. (2009). The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Glob. Environ. Change* 19, 292–305.
- Covarrubias, S.A., de-Bashan, L.E., Moreno, M., and Bashan, Y. (2011). Alginate beads provide a beneficial physical barrier against native microorganisms in wastewater treated with immobilized bacteria and microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 2669–2680.
- Fenice, M., Selbman, L., Federici, F., and Vassilev, N. (2000). Application of encapsulated *Penicillium variabile* P16 in solubilization of rock phosphate. *Bioresour. Technol.* 73, 157–162.
- Heisey, P.W., and Norton, G.W. (2007). Chapter 53 Fertilizers and other farm chemicals. In *Handbook of Agricultural Economics*, R.E. and P. Pingali, ed. (Elsevier), pp. 2741–2777.
- Hue, N.V., and Fox, R.L. (2010). Predicting Plant Phosphorus Requirements for Hawaii Soils using a Combination of Phosphorus Sorption Isotherms and Chemical Extraction Methods. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 41, 133–143.
- Ivanova, R., Bojinova, D., & Nedialkova, K. (2006). Rock phosphate solubilization by soil bacteria. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 41(3), 297–302.
- Jain, R., Saxena, J., and Sharma, V. (2010). The evaluation of free and encapsulated *Aspergillus awamori* for phosphate solubilization in fermentation and soil–plant system. *Appl. Soil Ecol.* 46, 90–94.
- Jain, R., Saxena, J., and Sharma, V. (2012). Effect of phosphate-solubilizing fungi *Aspergillus awamori* S29 on mungbean (*Vigna radiata* cv. RMG 492) growth. *Folia Microbiol. (Praha)* 57, 533–541.

- Kaur, S., Dhillon, G.S., Brar, S.K., Chauhan, V.B., Chand, R., and Verma, M. (2013). Potential Eco-friendly Soil Microorganisms: Road Towards Green and Sustainable Agriculture. In Management of Microbial Resources in the Environment, A. Malik, E. Grohmann, and M. Alves, eds. (Springer Netherlands), pp. 249–287.
- Khan, M.S., Zaidi, A., and Wani, P.A. (2007). Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture — A review. *Agron. Sustain. Dev.* 27, 29–43.
- Lassis, M., Mizane, A., Dadda, N., and Rehamnia, R. (2015). Dissolution of Djebel Onk phosphate ore using sulfuric acid. *Environ. Nanotechnol. Monit. Manag.*
- Leung, K.T., So, J.-S., Kostrzynska, M., Lee, H., and Trevors, J.T. (2000). Using a green fluorescent protein gene-labeled p-nitrophenol-degrading *Moraxella* strain to examine the protective effect of alginate encapsulation against protozoan grazing. *J. Microbiol. Methods* 39, 205–211.
- Martínez-Trujillo, M.A., and García-Rivero, M. (2012). Revisión: Aplicaciones ambientales de microorganismos inmovilizados. *Rev. Mex. Ing. Quím.* 11, 55–73.
- Nahas, E. (2007). Phosphate solubilizing microorganisms: Effect of carbon, nitrogen, and phosphorus sources. In First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization, (Springer, Dordrecht), pp. 111–115.
- de Oliveira Souza, S., da Costa, S.S.L., Santos, D.M., dos Santos Pinto, J., Garcia, C.A.B., Alves, J. do P.H., and Araujo, R.G.O. (2014). Simultaneous determination of macronutrients, micronutrients and trace elements in mineral fertilizers by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 96, 1–7.
- Osorio, N.W. (2008). Effectiveness of microbial solubilization of phosphate in enhancing plant phosphate uptake in tropical soils and assessment of the mechanisms of solubilization. Thesis.
- Osorio, N.W., and Habte, M. (2001). Synergistic Influence of an Arbuscular Mycorrhizal Fungus and a P Solubilizing Fungus on Growth and P Uptake of *Leucaena leucocephala* in an Oxisol. *Arid Land Res. Manag.* 15, 263–274.
- Osorio, N.W., and Habte, M. (2013). Synergistic effect of a phosphate-solubilizing fungus and an arbuscular mycorrhizal fungus on leucaena seedlings in an Oxisol fertilized with rock phosphate. *Botany* 91, 274–281.
- Osorio, N.W., and Habte, M. (2014). Soil Phosphate Desorption Induced by a Phosphate-Solubilizing Fungus. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 45, 451–460.
- Osorio, N.W., Serna, S.L., and Montoya, B.E. (2012). Use of soil microorganisms as a biotechnological strategy to enhance avocado (*Persea americana*)-plant phosphate uptake and growth. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín* 65, 6645–6657.
- Osorno, L., and Osorio, N.W. (2014). Effect of Carbon and Nitrogen Source and Concentration on Rock Phosphate Dissolution Induced by Fungi. *J. Appl. Biotechnol.* 2, 1–11.
- Osorno, L., and Osorio, N.W. (2017). Evaluación de factores que afectan la bioacidulación de roca fosfórica bajo condiciones in vitro. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 19, 53–62.

- Pandey, A., Trivedi, P., Kumar, B., and Palni, L.M.S. (2006). Characterization of a Phosphate Solubilizing and Antagonistic Strain of *Pseudomonas putida* (B0) Isolated from a Sub-Alpine Location in the Indian Central Himalaya. *Curr. Microbiol.* 53, 102–107.
- Pérez, J.P. (2014). *Uso de los fertilizantes y su impacto en la producción agrícola*. masters. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.
- Relwani, L., Krishna, P., and Reddy, M.S. (2008). Effect of Carbon and Nitrogen Sources on Phosphate Solubilization by a Wild-Type Strain and UV-Induced Mutants of *Aspergillus tubingensis*. *Curr. Microbiol.* 57, 401–406.
- Rivera, D., Obando, M., Rojas-Tapias, D.F., Bonilla-Buitrago, R., and Barbosa, H. (2016). Entrapment of *Rhizobium* sp. by fluidized bed technique using polymers as coating materials. *Univ. Sci.* 21, 117–128.
- Sahu, S.N., and Jana, B.B. (2000). Enhancement of the fertilizer value of rock phosphate engineered through phosphate-solubilizing bacteria. *Ecol. Eng.* 15, 27–39.
- Schneider, K.D., van Straaten, P., de Orduña, R.M., Glasauer, S., Trevors, J., Fallow, D., and Smith, P.S. (2010). Comparing phosphorus mobilization strategies using *Aspergillus niger* for the mineral dissolution of three phosphate rocks. *J. Appl. Microbiol.* 108, 366–374.
- Scholz, R.W., Ulrich, A.E., Eilittä, M., and Roy, A. (2013). Sustainable use of phosphorus: A finite resource. *Sci. Total Environ.* 461–462, 799–803.
- Siminovich, C., and Joao, S. (2014). Dynamic Operator Training Simulators for Sulphuric Acid, Phosphoric Acid, and DAP Production Units. *Procedia Eng.* 83, 215–224.
- Singh, H., and Reddy, M.S. (2011). Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. *Eur. J. Soil Biol.* 47, 30–34.
- Ulrich, A.E., and Frossard, E. (2014). On the history of a reoccurring concept: Phosphorus scarcity. *Sci. Total Environ.* 490, 694–707.
- Vassilev, N., Baca, M.T., Vassileva, M., Franco, I., and Azcon, R. (1995). Rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* grown on sugar-beet waste medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44, 546–549.
- Vassilev, N., Fenice, M., and Federici, F. (1996). Rock phosphate solubilization with gluconic acid produced by immobilized *Penicillium variable*P16. *Biotechnol. Tech.* 10, 585–588.
- Vassilev, N., Toro, M., Vassileva, M., Azcon, R., and Barea, J.M. (1997). Rock phosphate solubilization by immobilized cells of *Enterobacter* sp. in fermentation and soil conditions. *Bioresour. Technol.* 61, 29–32.
- Vassilev, N., Vassileva, M., Azcon, R., and Medina, A. (2001a). Application of free and Calcium alginate-entrapped *Glomus deserticola* and *Yarrowia lipolytica* in a soil–plant system. *J. Biotechnol.* 91, 237–242.
- Vassilev, N., Vassileva, M., Fenice, M., and Federici, F. (2001b). Immobilized cell technology applied in solubilization of insoluble inorganic (rock) phosphates and P plant acquisition. *Bioresour. Technol.* 79, 263–271.

- Vassileva, M., Azcon, R., Barea, J.M., and Vassilev, N. (1998). Application of an encapsulated filamentous fungus in solubilization of inorganic phosphate. *J. Biotechnol.* 63, 67–72.
- Vassileva, M., Azcon, R., Barea, J.-M., and Vassilev, N. (2000). Rock phosphate solubilization by free and encapsulated cells of *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochem.* 35, 693–697.
- Walan, P., Davidsson, S., Johansson, S., and Höök, M. (2014). Phosphate rock production and depletion: Regional disaggregated modeling and global implications. *Resour. Conserv. Recycl.* 93, 178–187.
- Whitelaw, M.A. (1999). Growth Promotion of Plants Inoculated with Phosphate-Solubilizing Fungi. In *Advances in Agronomy*, D.L. Sparks, ed. (Academic Press), pp. 99–151.
- Xiao, C.-Q., Chi, R.-A., Huang, X.-H., Zhang, W.-X., Qiu, G.-Z., and Wang, D.-Z. (2008). Optimization for rock phosphate solubilization by phosphate-solubilizing fungi isolated from phosphate mines. *Ecol. Eng.* 33, 187–193.
- Zhang, H., Wu, X., Li, G., and Qin, P. (2011). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing fungus (*Mortierella* sp.) and their effects on *Kosteletzkya virginica* growth and enzyme activities of rhizosphere and bulk soils at different salinities. *Biol. Fertil. Soils* 47, 543–554.

---

## 6. Desorción de P adsorbido de suelos tropicales por un hongo solubilizador de P libre e inmovilizado<sup>3</sup>

### 6.1 Introducción

En comparación con otros nutrientes el fosfato (P) es uno de los elementos menos móvil y poco disponible para las raíces de las plantas (Hinsinger 2001). Esto es debido a procesos de adsorción, donde el P disponible de la solución del suelo se incorpora en la fase sólida (Oberson et al., 2011). Esta reacción es particularmente fuerte en suelos tropicales altamente meteorizados dominados por óxidos e hidroxidos de hierro y aluminio (Shen et al., 2011; Liu et al., 2012; Martins da Costa, et al., 2015; de Campos et al., 2016), con bajas concentraciones de P en solución y eficiencia de la fertilización fosforica (<5%) (Gyaneshwar et al., 2002; Bhatti y Yawar 2010). Para mejorar la disponibilidad de P en estos suelos, se requieren altas tasas de fertilización (Hue y Fox 2010; Asci et al., 2015), lo que aumenta los costos de producción (Xiao et al., 2008; de Oliveira Souza et al., 2014).

Dada la creciente demanda de fertilizantes de P en la producción agrícola y la escasez de P que se producirá en las próximas décadas, los investigadores predicen una crisis de P que puede tener un impacto global en la seguridad alimentaria (Cordell et al., 2009; Gilbert 2009; Shen et al. al. 2011; Neset y Cordell 2012; de Oliveira Souza et al. 2014). Por lo tanto, es fundamental desarrollar estrategias que aumenten la disponibilidad de P y la eficiencia de absorción de este por las plantas (Cordell et al., 2009; Cordell y Neset 2014).

Diferentes estudios han identificado microorganismos del suelo que tienen la capacidad de solubilizar compuestos de P (Gyaneshwar et al., 2002; Bashan et al., 2012; Osorno y Osorio, 2014). Estos microorganismos tiene diferentes mecanismos de solubilización como He y Zhu 1998, Whitelaw 1999, Hameeda et al. 2006): liberación ácidos orgánicos y

---

<sup>3</sup> Apartes de este capítulo fueron publicados:

Osorno L, Osorio N.W. (2018). Phosphate Desorption by a Soil Fungus in Selected Hawaiian Soils Differing in their Minerology. *Tropical Agriculture*. V.95 (2). 154-166.

prontones que disuelven materiales de P nativos o añadidos con baja solubilidad (por ejemplo, roca fosfórica) (Reddy et al., 2002; Osorio y Osorio 2014), ayudan a formación complejos entre aniones orgánicos con cationes ( $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) y desorción P que ha sido adsorbido por las superficies de minerales y materia orgánica del suelo (He y Zhu, 1998; Osorio y Habte, 2012). Este enfoque biotecnológico puede aumentar la eficiencia de la fertilización P y permitir que las raíces de las plantas accedan a P previamente adsorbido en el suelo (Osorio y Habte 2014).

A pesar de este enfoque biotecnológico, existen lagunas de conocimiento que deben completarse. Una de estas se refiere a la eficacia con la que estos microorganismos desorben P en diferentes condiciones del suelo. La hipótesis de este trabajo fue que la efectividad de microorganismos no inmovilizados e inmovilizados para desorber P esta controlada por la capacidad del suelo para adsorber este elemento y el nivel de P adsorbido en el suelo. Para esto se establecieron dos experimento, con el primero el objetivo fue evaluar la efectividad del hongo *Mortierella* sp. no inmovilizado (libre) para desorber P previamente adsorbido a suelos tropicales con diferente mineralogía y diferentes concentraciones de P en el suelo. En el segundo, se evaluo si el hongo inmovilizado mantiene su capacidad para desorber P.

## 6.2 Materiales y métodos

### Microorganismo

El hongo *Mortierella* sp. fue originalmente aislado a partir de un Andisol y del cual se ha demostrado su efectividad para promover el crecimiento y la absorción de P vegetal (Osorio y Habte, 2001). Este hongo se multiplicó en medio PDA durante 15 días y 25°C y luego se suspendió en agua destilada estéril y se conservará en nevera a 4°C para su uso experimental.

### Procedimiento de inmovilización

El hongo se inmovilizó siguiendo el método descrito por Las actualizaciones automáticas de citas están deshabilitadas. Para ver la bibliografía, haga clic en Actualizar en la pestaña Zotero.) para bacetrias. Para tal fin, 40 mL de inóculo de *Mortierella* sp. ( $10^7$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ ) se mezclaron con 160 mL de una solución estéril de alginato de sodio al 2%, la cual se agitó por 15 min a 40 rpm. Luego, se dejaron caer gotas de esta mezcla en una solución de  $\text{CaCl}_2$  al 2% con agitación a 40 rpm y así formar las perlas de alginato de calcio (de-Bashan and Bashan, 2010). Posteriormente, las perlas se mantuvieron en  $\text{CaCl}_2$  al 2% para su estabilización por 1 h a 28 °C y finalmente se lavaron en solución salina estéril y agua destilada y se secaron en una estufa a 40 °C por 48 h.

### Suelos

Los suelos usados fueron suelos tropicales de Estados Unidos y Colombia, en la Tabla 6-1 se describen algunas de las propiedades relevantes, incluyendo la adsorción de P y la taxonomía.

Tabla 6-1. Clasificación de suelos, ubicación, pH, valor  $P_{0.2}$  y categoría de adsorción de P de acuerdo a (Juo y Fox, 1977).

Serie de suelos	Familia de suelo	Latitud Longitud	pH (Agua, 1:2)	MO (g kg <sup>-1</sup> )	Contenido de arcilla (g kg <sup>-1</sup> )	Valor $P_{0.2}$ (mg kg <sup>-1</sup> ) $\Psi$	Categoría de adsorción de P $\Psi$
Lualualei (Estados Unidos)	Fino, esmectítico, isohypertermico Typic Gypsite (Vertisol)	21°25'N 158°09'W	6.7	12.1	520	54	Baja
Wahiawa (Estados Unidos)	Muy fino, caolinitico, isohypertermico Rhodic Haplustox (Oxisol)	21°32'N, 158°04'W	5.2	28.9	437	374	Media
Makapili (Estados Unidos)	Muy fino, sesquico, isohypertermico Anionic Acrudox (Oxisol)	22°13'N, 159°28'W	4.5	85.5	450	1056	Muy alta
Carimagua (Colombia)	Haplustox (Oxisol)	4°34'N 71°20'W	4,9	23.5	140	151	Media

$\Psi$ : datos obtenidos a partir de las isotermas de adsorción

#### Isotermas de adsorción P

Inicialmente se hicieron isotermas de adsorción de P por triplicado siguiendo el procedimiento desarrollado de Fox y Kamprath (1970) para determinar la fertilización fosfórica del suelo.

Se desarrolló el procedimiento de desorción de acuerdo a los descrito por Osorio y Habte (2014) y las isotermas de adsorción. Se tomaron 2 g de suelo, en base seca y se transfieren a tubos de centrifuga de plástico de 50 ml, y luego se adicionó 20 ml de solución de  $\text{CaCl}_2$  0.01 M y cantidades crecientes de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Para evitar microbiana actividad, los tubos y sus contenidos se esterilizaron en autoclave (120 °C, 0,1 MPa durante 30 min). Los tubos de centrifuga y sus contenidos se agitaron horizontalmente (dos veces al día, 30 minutos cada vez) en un agitador recíproco durante 7 días para alcanzar el equilibrio de la concentración de P. Después de esto, el contenido de P en el sobrenadante fue estimado después de la centrifugación para determinar el valor  $P_{0.2}$ . Este valor indica la cantidad de P (mg kg<sup>-1</sup>) necesaria para obtener una concentración de P de 0.2 mg L<sup>-1</sup>. Estos valores hacen posible cuantificar la capacidad de adsorción de P del suelo de acuerdo a su clasificación Tabla 6-2.

Tabla 6-2. Cantidad de P adicionado ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) al suelo para alcanzar cuatro concentraciones de P en solución.

Solución ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Lualualei (0.02) <sup>a</sup>	Wahiawa (0.01)	Makapili (0.01)	Carimagua (0.005)
Original	0	0	0	0
0.05	19	137	624	29
0.1	31	227	840	90
0.2	54	374	1056	151

<sup>a</sup> Niveles de P ( $\text{mg L}^{-1}$ ) originales sin la adición de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

#### Desorción microbial de P

Con base en los resultados de las isotermas, a cada suelo se le aplicó  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  con el fin de obtener concentraciones crecientes de P en solución (original, 0.05, 0.1 y 0.2  $\text{mg L}^{-1}$ ) y se esterilizó en autoclave (120 °C, 30 min, 0.1 MPa). Después de una incubación de 6 días a 100 rpm, la solución se retiró por centrifugación a 2500×g, y los suelos se lavaron tres veces con agua destilada estéril. El P restante en el suelo se consideraron como adsorbido. Después de eso, los suelos se secaron en horno a 60 °C durante 2 días.

Al final del tratamiento de secado, cada tubo recibió 19 mL de una solución con nutrientes de 1.0 g de NaCl, 0.2 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.4 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.0 g de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , y 10.0 g de glucosa por L. La única fuente de P fue el P adsorbido en el suelo. Los tubos y su contenido se esterilizaron de nuevo en autoclave (120 °C, 30 min, 0.1 MPa).

El hongo no inmovilizado e inmovilizado se inoculó asepticamente en los tubos de centrifuga 1 mL por tubo para los no inmovilizados y 150 mg de perlas para los inmovilizados, los cuales se agitaron de forma continua en un agitador recíproco (100 rpm) durante 6 días a 25 °C.

Después de esta incubación, la suspensión de suelo se centrifugó a 2500×g durante 15 min, y el sobrenadante se filtró a través de un papel filtro Whatman No. 42 y membrana Millipore (0.45  $\mu\text{m}$ ). La concentración P en solución de los filtrados se determinó utilizando el método del azul-molibdato (Murphy y Riley 1962).

#### Variabes evaluadas

Luego del periodo de incubación para los ensayos de desorción de P, se determinó el pH y la concentración de P del medio de cultivo. El pH se midió usando un potenciómetro (WTW electrodo Sentix 81). La concentración de P ( $\text{mg L}^{-1}$ ) se determinó mediante el método del azul-molibdato (Murphy y Riley 1962) a 890 nm (espectrofotómetro Genesys 20 Thermo Spectronic), previa filtración en papel filtro Whatman No. 42 y centrifugación (centrifuga Jouan MR 1812) a 4000 rpm (1520×g) durante 10 minutos, para cada medida

se realizará curva de calibración. Además se determinó la presencia del hongo al final del experimento en un medio selectivo (Osorio and Habte, 2013).

#### Análisis estadístico

Cada suelo se evaluó como un experimento separado. En todos los experimentos se empleó un diseño estadístico completamente al azar. Cada tratamiento tuvo 4 réplicas, incluyendo el control no inoculado. El efecto de los tratamientos se evaluará mediante análisis de varianza y cuando estos sean significativos se utilizará la prueba de separación de medias de Duncan. Los análisis se harán con un nivel de significancia ( $P$ )  $\leq 0.05$ , mediante el software STATGRAPHICS versión centurión XVI. Todos los experimentos se repitieron en el tiempo.

### 6.3 Resultados y discusión

#### Experimento 1. Efectividad del hongo *Mortierella* sp. resorbiendo P de suelos con mineralogía contrastante.

Se seleccionaron tres suelos tropicales con diferente capacidad de adsorción de P entre bajo, media a muy alto Tabla 6-1. Clasificación de suelos, ubicación, pH, valor  $P_{0.2}$  y categoría de adsorción de P de acuerdo a (Juo y Fox, 1977). Esto es consistente con la mineralogía de cada suelo, los cuales muestran un incremento en la capacidad de adsorción: montmorillonita (suelo Lualualei) < caolinita (suelo Wahiawa) < óxidos e hidróxidos de hierro y aluminio (suelo Makapili) (Bortoluzzi et al., 2015; de Campos et al., 2016; Fink et al., 2016; Liu et al., 2012; Shen et al., 2011). El suelo de Lualualei exhibió una baja capacidad de adsorción de P ( $P_{0.2} < 100 \text{ mg kg}^{-1}$ ). El de Wahiawa tiene una capacidad media de adsorción de P ( $100 < P_{0.2} < 500 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Makapili presentó una alta capacidad de fijación de P ( $P_{0.2} > 1000 \text{ mg kg}^{-1}$ ).

La inoculación con el hongo *Mortierella* sp. aumentó significativamente la concentración de P en la solución en el suelo de Lualualei, en todas las concentraciones iniciales de P. En el suelo de Wahiawa el aumento fue evidente en las tres concentraciones más altas de solución P (0.05, 0.1 y 0.2  $\text{mg L}^{-1}$ ). Por el contrario, la desorción de P no se observó en el suelo de Makapili dominados por óxidos de hierro y, en consecuencia, con una mayor capacidad de adsorción de P (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

En este experimento hay una interacción entre los tres factores: tipo de suelo, la concentración inicial de P y la inoculación con el hongo y estas fueron significativa. En todos los casos, el pH de la solución final fue menor cuando los suelos se inocularon con *Mortierella* sp. que cuando no fue inoculado. La disminución en el pH de la solución es probablemente debido a la producción de ácido oxálico por *Mortierella* sp. (Bortoluzzi et al., 2015; de Campos et al., 2016; Fink et al., 2016; Liu et al., 2012; Shen et al., 2011). El anión oxalato se intercambió presumiblemente con aniones P en los sitios de adsorción en

la superficie de los minerales del suelo. Los ácidos orgánicos compiten con el P por los sitios de adsorción y modifican la energía de unión del P adsorbido (Osorio, 2008, 2011). El hecho de que el pH disminuya en todos los suelos, incluidos aquellos con una alta capacidad de sorción de P, sugiere que el microorganismo está activo, aunque la producción de ácido no fue un buen predictor de la desorción de P. La desorción de P parece estar controlada en gran medida por la mineralogía del suelo.

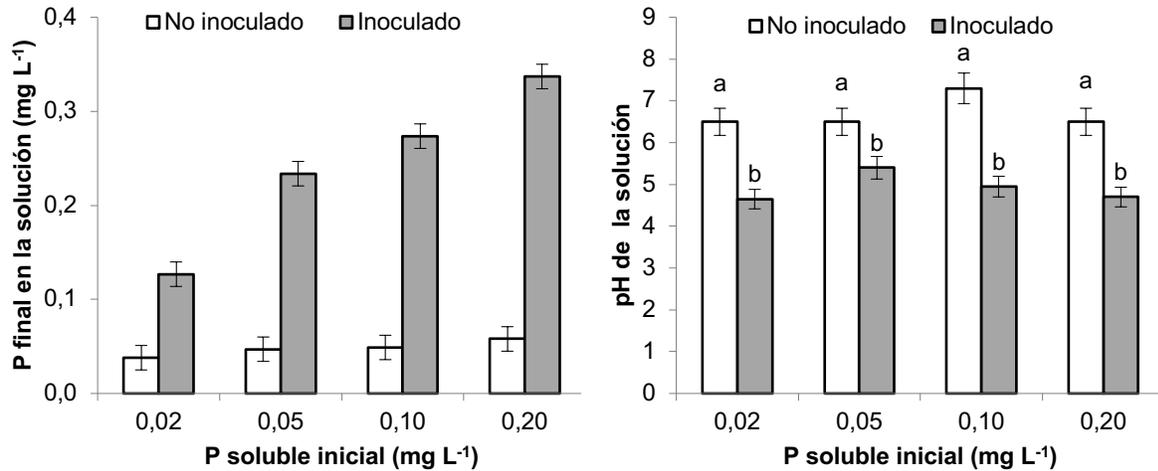


Figura 6-1. Concentración de P ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (izquierda) y pH de la solución (derecha) para el suelo Lualuei en cuatro concentraciones iniciales de P (original, 0.05, 0.1, and 0.2  $\text{mg L}^{-1}$ ). No inoculado (columnas blancas) e inoculado (columnas grises) con *Mortierella* sp. Cada columna representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ).

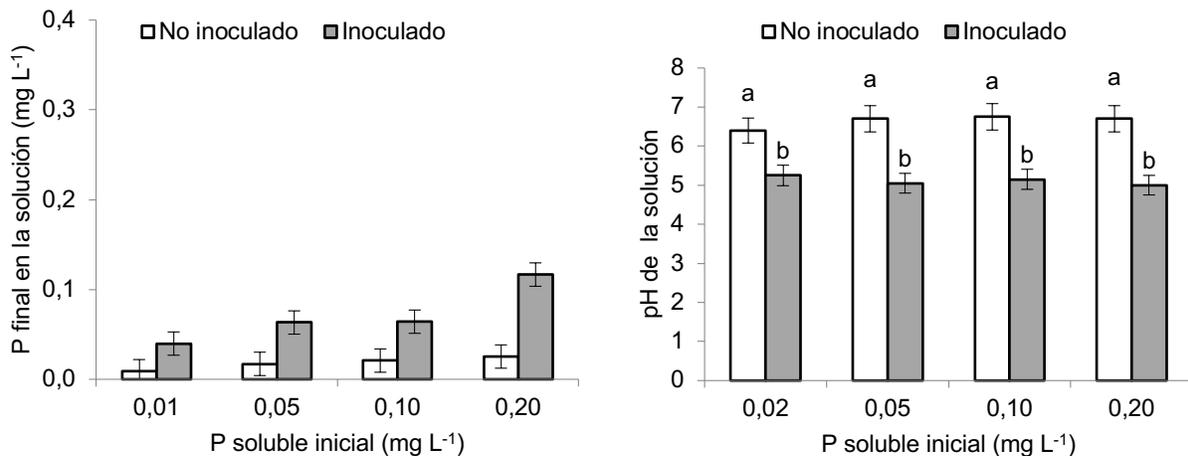


Figura 6-2. Concentración de P ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (izquierda) y pH de la solución (derecha) para el suelo Wahiawa en cuatro cocentraciones iniciales de P (original, 0.05, 0.1, and 0.2  $\text{mg L}^{-1}$ ). No inoculado (columnas blancas) e inoculado (columnas grises) con *Mortierella* sp. Cada columna representa el

promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ).

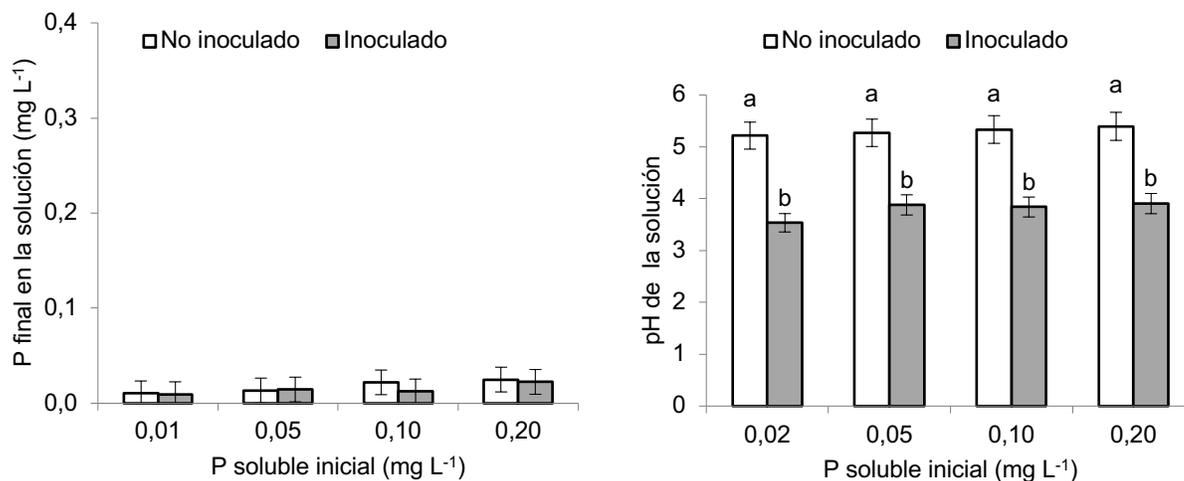


Figura 6-3. Concentración de P ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (izquierda) y pH de la solución (derecha) para el suelo Makapilli en cuatro concentraciones iniciales de P (original, 0.05, 0.1, and 0.2  $\text{mg L}^{-1}$ ). No inoculado (columnas blancas) e inoculado (columnas grises) con *Mortierella* sp. Cada columna representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ).

### Experimento 2. Efectividad del hongo *Mortierella* sp. no inmovilizado e inmovilizado en alginato de calcio para desorber P de un oxisol.

En este experimento se usó el suelo de Carimagua, un oxisol con una capacidad media de adsorción de P (Tabla 6-1). El suelo se llevó a cuatro concentraciones crecientes de P en solución de acuerdo a las isoterma de P (Tabla 6-2). Después de 6 días de incubación con el hongo inmovilizado y sin inmovilizar se midió el P en solución, el pH y el número de esporas.

En la Figura 6-4 se puede ver como el hongo *Mortierella* sp. inmovilizado en alginato de calcio no pierde su efectividad para desorber P del suelo comparado con el hongo sin inmovilizar. *Mortierella* sp. fue capaz de desorber P del suelo de Carimagua en diferentes concentraciones de P inicial en el suelo. Este efecto es mayor cuando la concentración inicial de P es mayor (0.1 y 0.2  $\text{mg L}^{-1}$ ). El pH del suelo es ligeramente menor al inocular el hongo en el suelo, comparados con el control no inoculado (pH:4.7), los valores son menores cuando el hongo no está inmovilizado (pH: 3.4). Esto puede ser debido a que el microorganismo inmovilizado se va liberando de manera gradual en el tiempo.

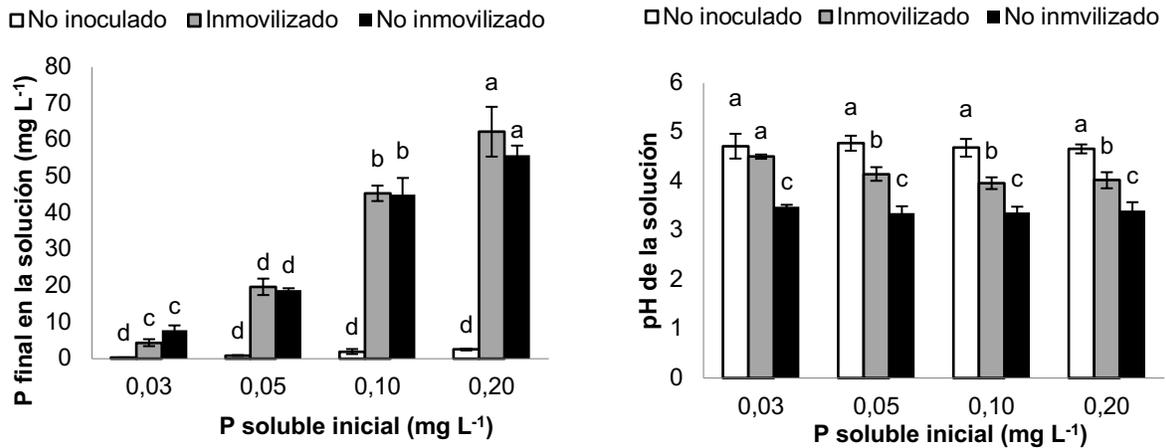


Figura 6-4. Concentración de P ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (izquierda) y pH de la solución (derecha) para el suelo Makapilli en cuatro concentraciones iniciales de P (original, 0.05, 0.1, and 0.2  $\text{mg L}^{-1}$ ). No inoculado (columnas blancas) e inoculado (columnas grises) con *Mortierella* sp. Cada columna representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ).

En la Figura 6-5. Se puede ver como la inmovilización en alginato de Ca no cambia significativamente el número de esporas en el suelo comparado con la inoculación sin inmovilizar. No se presentan diferencias significativas con las diferentes concentraciones de P en el suelo, las esporas solo disminuyen en la concentración original del suelo, es probable que la cantidad de P en el suelo sea incluso pequeña para el hongo.

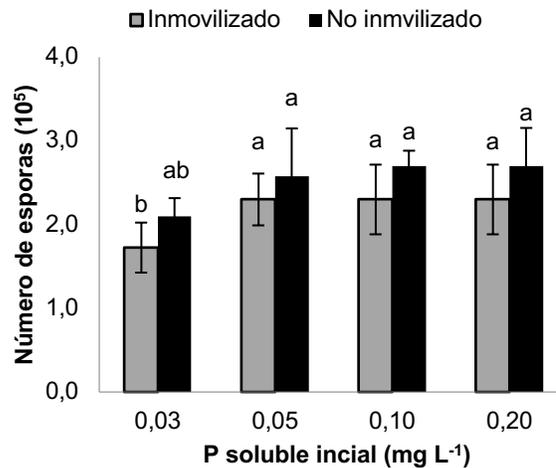


Figura 6-5. Número de esporas para el suelo de Carimagua en cuatro concentraciones iniciales de P (original, 0.05, 0.1, and 0.2  $\text{mg L}^{-1}$ ). No inoculado (columnas blancas) e inoculado (columnas grises) con *Mortierella* sp. Cada columna representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras

---

indican la desviación estándar. Columnas con las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ).

La capacidad de *Mortierella* sp. para aumentar la concentración de P está directamente relacionada con la cantidad de P adsorbido en la superficie de los suelos. Esto no es sorprendente porque es bien sabido que la fuerza con la que se adsorbe P disminuye con el aumento en el grado en que las superficies de adsorción se saturan con P (Lindegren and Persson, 2009).

El uso de microorganismos capaces de desorber P en el suelo es una estrategia atractiva en el manejo sostenible del suelo y la nutrición de las plantas. Esto podría ser útil para usar P que se aplicó previamente pero que se encuentra adsorbido en los suelos. Estos estudios son relevantes por la tendencia en la reducción de las reservas naturales de roca fosfórica, lo que podría amenazar la seguridad alimentaria a nivel mundial (do Carmo Horta y Torrent, 2007). El uso de microorganismos para la desorción de P en el suelo puede ayudar a reducir las dosis de fertilizante P y consecuentemente reducir los costos de producción para los agricultores (Cordell and Neset, 2014; Cordell et al., 2009; Neset y Cordell, 2012). Varios autores han propuesto el uso de este enfoque biotecnológico para liberar P de minerales portadores de P por microorganismos productores de ácido orgánico porque es más rentable y debido a su menor demanda de energía en comparación con los enfoques químicos convencionales (Martins da Costa et al., 2015).

Con este estudio, está claro que la mineralogía del suelo (y su capacidad de absorción de P asociada) juega un papel importante en la efectividad de esta biotecnología aplicada. La inmovilización del hongo solubilizador presenta una ventaja extra al ser inoculado, por la protección y lenta liberación que tiene en el suelo. Además no se presentaron diferencias significativas entre el proceso de desorción con *Mortierella* sp. inmovilizado o no en alginato de calcio.

## 6.4 Conclusión

La efectividad de *Mortierella* sp. no inmovilizados e inmovilizados para desorber P está controlada por la capacidad del suelo para adsorber este elemento y el nivel de P adsorbido en él. El hongo tiene la capacidad de producir ácidos orgánicos en diferentes tipos de suelo, sin embargo, de acuerdo a la mineralogía del suelo estos ácidos podrán desorber P o no. La inmovilización del hongo en alginato de calcio no afectó el proceso de desorción de P en el suelo.

## 6.5 Referencias

- Asci, S., Borisova, T., and VanSickle, J.J. (2015). Role of economics in developing fertilizer best management practices. *Agric. Water Manag.* 152, 251–261.
- Bashan, Y., Kamnev, A.A., and de-Bashan, L.E. (2012). Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biol. Fertil. Soils* 49, 465–479.
- de-Bashan, L.E., and Bashan, Y. (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresour. Technol.* 101, 1611–1627.
- de-Bashan, L.E., Hernandez, J.-P., Morey, T., and Bashan, Y. (2004). Microalgae growth-promoting bacteria as “helpers” for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. *Water Res.* 38, 466–474.
- Bhatti, T.M., and Yawar, W. (2010). Bacterial solubilization of phosphorus from phosphate rock containing sulfur-mud. *Hydrometallurgy* 103, 54–59.
- Bortoluzzi, E.C., Pérez, C.A.S., Ardisson, J.D., Tiecher, T., and Caner, L. (2015). Occurrence of iron and aluminum sesquioxides and their implications for the P sorption in subtropical soils. *Appl. Clay Sci.* 104, 196–204.
- de Campos, M., Antonangelo, J.A., and Alleoni, L.R.F. (2016). Phosphorus sorption index in humid tropical soils. *Soil Tillage Res.* 156, 110–118.
- do Carmo Horta, M., and Torrent, J. (2007). Phosphorus desorption kinetics in relation to phosphorus forms and sorption properties of portuguese acid soils. *Soil Sci.* 172, 631–638.
- Cordell, D., and Neset, T.-S.S. (2014). Phosphorus vulnerability: A qualitative framework for assessing the vulnerability of national and regional food systems to the multi-dimensional stressors of phosphorus scarcity. *Glob. Environ. Change* 24, 108–122.
- Cordell, D., Drangert, J.-O., and White, S. (2009). The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Glob. Environ. Change* 19, 292–305.
- Fink, J.R., Inda, A.V., Bavaresco, J., Barrón, V., Torrent, J., and Bayer, C. (2016). Adsorption and desorption of phosphorus in subtropical soils as affected by management system and mineralogy. *Soil Tillage Res.* 155, 62–68.
- Fox, R.L., and Kamprath, E.J. (1970). Phosphate Sorption Isotherms for Evaluating the Phosphate Requirements of Soils. *Soil Science Society of America Journal* 34, 902–907.
- Gilbert, N. (2009). Environment: The disappearing nutrient. *Nat. News* 461, 716–718.
- Gyaneshwar, P., Kumar, V., Parekh, L, Poole, S. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil* 245: 83–93.
- He, Z., and Zhu, J. (1998). Microbial utilization and transformation of phosphate adsorbed by variable charge minerals. *Soil Biol. Biochem.* 30, 917–923.
- Hinsinger, P. (2001). Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant Soil* 237, 173–195.

- Hue, N.V., and Fox, R.L. (2010). Predicting Plant Phosphorus Requirements for Hawaii Soils using a Combination of Phosphorus Sorption Isotherms and Chemical Extraction Methods. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 41, 133–143.
- Juo, A.S.R., and Fox, R.L. (1977). Phosphate sorption capacity of some benchmark soils in West Africa. *Soil Sci. - SOIL SCI* 124, 370–376.
- Lindegren, M., and Persson, P. (2009). Competitive adsorption between phosphate and carboxylic acids: quantitative effects and molecular mechanisms. *Eur. J. Soil Sci.* 60, 982–993.
- Liu, L., Gundersen, P., Zhang, T., and Mo, J. (2012). Effects of phosphorus addition on soil microbial biomass and community composition in three forest types in tropical China. *Soil Biol. Biochem.* 44, 31–38.
- Martins da Costa, E., de Lima, W., Oliveira-Longatti, S.M., and de Souza, F.M. (2015). Phosphate-solubilising bacteria enhance *Oryza sativa* growth and nutrient accumulation in an oxisol fertilized with rock phosphate. *Ecol. Eng.* 83, 380–385.
- Murphy, J., and Riley, J.P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 27, 31–36.
- Neset, T.-S.S., and Cordell, D. (2012). Global phosphorus scarcity: identifying synergies for a sustainable future. *J. Sci. Food Agric.* 92, 2–6.
- Oberson, A., Pypers, P., Bünemann, E.K., and Frossard, E. (2011). Management Impacts on Biological Phosphorus Cycling in Cropped Soils. In *Phosphorus in Action*, E. Bünemann, A. Oberson, and E. Frossard, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 431–458.
- de Oliveira Souza, S., da Costa, S.S.L., Santos, D.M., dos Santos Pinto, J., Garcia, C.A.B., Alves, J. do P.H., and Araujo, R.G.O. (2014). Simultaneous determination of macronutrients, micronutrients and trace elements in mineral fertilizers by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 96, 1–7.
- Osorio, N.W. (2008). Effectiveness of microbial solubilization of phosphate in enhancing plant phosphate uptake in tropical soils and assessment of the mechanisms of solubilization. Thesis.
- Osorio, N.W. (2011). Effectiveness of Phosphate Solubilizing Microorganism in Increasing Plant Phosphate Uptake and Growth in Tropical Soils. In *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management*, D.K. Maheshwari, ed. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 65–80.
- Osorio, N.W., and Habte, M. (2012). Phosphate desorption from the surface of soil mineral particles by a phosphate-solubilizing fungus. *Biol. Fertil. Soils* 49, 481–486.
- Osorio, N.W., and Habte, M. (2013). Synergistic effect of a phosphate-solubilizing fungus and an arbuscular mycorrhizal fungus on leucaena seedlings in an Oxisol fertilized with rock phosphate. *Botany* 91, 274–281.
- Osorio, N.W., and Habte, M. (2014). Soil Phosphate Desorption Induced by a Phosphate-Solubilizing Fungus. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 45, 451–460.
- Osorno, L., and Osorio, N.W. (2014). Effect of Carbon and Nitrogen Source and Concentration on Rock Phosphate Dissolution Induced by Fungi. *J. Appl. Biotechnol.* 2, 1–11.

- Reddy, M.S., Kumar, S., Babita, K., and Reddy, M.S. (2002). Biosolubilization of poorly soluble rock phosphates by *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger*. *Bioresour. Technol.* 84, 187–189.
- Sahu, S.N., and Jana, B.B. (2000). Enhancement of the fertilizer value of rock phosphate engineered through phosphate-solubilizing bacteria. *Ecol. Eng.* 15, 27–39.
- Shen, J., Yuan, L., Zhang, J., Li, H., Bai, Z., Chen, X., Zhang, W., and Zhang, F. (2011). Phosphorus Dynamics: From Soil to Plant. *Plant Physiol.* 156, 997–1005.
- Sieverding, E., da Silva, G.A., Berndt, R., and Oehl, F. (2015). *Rhizoglosum*, a new genus of the Glomeraceae. *Mycotaxon* 129, 373–386.
- Whitelaw, M.A. (1999). Growth Promotion of Plants Inoculated with Phosphate-Solubilizing Fungi. In *Advances in Agronomy*, D.L. Sparks, ed. (Academic Press), pp. 99–151.
- Xiao, C.-Q., Chi, R.-A., Huang, X.-H., Zhang, W.-X., Qiu, G.-Z., and Wang, D.-Z. (2008). Optimization for rock phosphate solubilization by phosphate-solubilizing fungi isolated from phosphate mines. *Ecol. Eng.* 33, 187–193.

# **7. Promoción del crecimiento vegetal y absorción de P por un hongo solubilizador inmovilizado en plantas micorrizadas en diferentes suelos tropicales**

## **7.1 Introducción**

La deficiencia de fósforo (P) es un factor limitante para el desarrollo, crecimiento y productividad vegetal (Scholz et al. 2013; Ulrich and Frossard 2014), afectando 2016 millones ha a nivel global (Fairhurst et al. 1999). Esta deficiencia es causada por reacciones de fijación de P que adsorben y precipitan fosfato en el suelo (Meason et al. 2009; Oberson et al. 2011). La deficiencia es particularmente severa en suelos altamente meteorizados y en suelos derivados de cenizas volcánicas (Liu et al. 2012).

Tradicionalmente para corregir esto se usan altas dosis de fertilizantes fosfóricos solubles (Heisey and Norton 2007; Hue and Fox 2010; Asci et al. 2015), pero su eficiencia es muy baja (5-10%) (Bhatti and Yawar 2010). Además, estos fertilizantes son costosos (Cordell et al. 2009; Zhang et al. 2011; Walan et al. 2014) y generan riesgos de contaminar el ambiente (Abouzeid 2008; Aydin et al. 2010). Entre las alternativas biotecnológicas para mejorar la disponibilidad de P, esta el uso de hongos solubilizadores de P (HSP) y hongos micorrízico arbusculares (HMA). Mientras los primeros pueden disolver minerales fosfóricos y desorber P del suelo (Khan et al. 2007; Singh and Reddy 2011; Osorno and Osorio 2014), los segundos ayudan a que las plantas lo absorban (Habte 2006). El uso de estos microorganismos es atractivo en la agricultura sostenible, en la cual se pretende evitar o reducir el consumo de agroquímicos manteniendo rendimientos satisfactorios en los cultivos (Vassilev et al. 2001a; Aydin et al. 2010).

Aunque se ha reportado efectos positivos al inocular estos microorganismos (Zhang et al. 2011; Osorio and Habte 2013), algunos autores reportan inconsistencias en los resultados (Whitelaw 1999; Khan et al. 2007; Jain et al. 2010) debido a factores como la formulación, la competencia entre los microorganismos, la pérdida de la viabilidad de estos (Leung et al. 2000; Bashan et al. 2002; Jain et al. 2010) y diferentes efectos al inocular en suelos

diferentes (Osorio and Habte 2014). Estas limitaciones se podrían aliviar inmovilizando los HSP en alginato para prolongar su viabilidad y efectividad, tal como se ha hecho con otros microorganismos (Bashan et al., 2002; de-Bashan and Bashan, 2010; Covarrubias et al., 2011). Además, se considera que la inmovilización libera lentamente el microorganismo solubilizador permitiendo su establecimiento gradual en la rizosfera y rizoplasma.

La hipótesis de esta investigación fue que la coinoculación con el hongo solubilizador de P inmovilizado en perlas de alginato y un hongo micorrizico arbuscular puede mejorar la absorción de P y el crecimiento vegetal en suelos tropicales, tal efecto puede depender de la dosis del HSP inmovilizado y la capacidad de adsorción de P del suelo.

Para esto se estableció una serie de experimentos con el objetivo de evaluar la efectividad de *Mortierella* sp. inmovilizado en alginato para promover la absorción de P y el crecimiento de plantas leucaena no-micorrizadas y micorrizadas con *R. fasciculatum* en relación con dosis crecientes del inóculo inmovilizado y la influencia que podría ejercer la capacidad de adsorción de P de suelos con diferente mineralogía.

## 7.2 Materiales y métodos

### Suelos

Se usaron tres suelos tropicales colombianos de la superficie (0-20 cm) de un Haplustox (Oxisol) de la Estación Experimental Carimagua en los Llanos Orientales de Colombia, un Melanudand (Andisol) de Guarne, Antioquia, y un Haplustoll (Mollisol) de Neira, Caldas. Las muestras de suelo se secaron y se analizaron en el Laboratorio de Suelos de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín (Tabla 7-1). Las Muestras de suelos se incubaron con dosis crecientes de carbonato de calcio para determinar el requerimiento de cal (R Uchida and Hue, 2000), se realizaron isotermas de adsorción de fosfato (Fox and Kamprath, 1970), y se determinó la máxima capacidad de retención de humedad.

Tabla 7-1. Clasificación de los suelos usados, y análisis físico químicos de estos.

Serie de suelos	Familia de suelo	Latitud Longitud	pH (H <sub>2</sub> O, 1:2)	MO (g kg <sup>-1</sup> )	P soluble (mg L <sup>-1</sup> )	Valor P <sub>0.2</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	Categoría de adsorción de P
Neira	Haplustoll (Mollisol)	5°08'N 75°35'W	5.7	35.0	0.043	70	Baja
Carimagua	Haplustox (Oxisol)	4°34'N 71°20'W	4.9	23.5	0.036	151	Media
Guarne	Melanudand (Andisol)	6°15'N 75°30'W	5.0	125.5	0.021	2020	Muy alta

MO: materia orgánica, método por Walkley Black.

Tabla 7-1: (Continuación) Clasificación de los suelos usados, y análisis físico químicos de estos.

Suelo	A	L	Ar	Textura	CICE	Al	Ca	Mg	K	P	S	Fe	Mn	Cu	Zn	B
-------	---	---	----	---------	------	----	----	----	---	---	---	----	----	----	----	---

	%				cmol(+) kg <sup>-1</sup>							mg kg <sup>-1</sup>				
Mollisol	52	22	26	FArA	8.2	NA	5.0	3.0	0.16	5	3	51	2	1	3	0.1
Oxisol	54	32	14	FA	0.2	1.9	0.12	0.06	0.03	4	ND	72	1	1	1	0.34
Andisol	64	30	6	FA	3.7	0.7	2.4	0.64	0.21	14	16	73	12	2	2	0.2

A: arena, L: limo, Ar: Arcilla; Textura: Bouyoucos. CICE: (Capacidad de intercambio catiónico efectiva), Suma de cationes de cambio, Al: KCl 1M; Ca, Mg, K: Acetato de amonio 1M; P: Bray II; S: Fosfato monocalcico 0.008M; Fe, Mn, Cu, Zn: Olsen -EDTA; B: Agua caliente; NA: no analizado, ND: no determinado.

Los suelos se esterilizaron en autoclave por dos ciclos de 1 h (121 °C, 0.1 MPa). Luego, se secaron al aire, se pasaron por un tamiz (4 mm) y se transfirieron a macetas a razón de 1000 g de suelo (base seca). El suelo de Carimagua recibió cuarzo en una proporción 4 (suelo):1(cuarzo), para mejorar la infiltración y aireación, para facilitar el crecimiento de raíces. Luego el suelo de cada maceta se fertilizó de acuerdo a los requerimientos de cada uno para llevarlos a los mismo niveles y un valor de pH de 6.0.

### Microorganismos

El hongo *Mortierella* sp. fue originalmente aislado a partir de un Andisol, del cual se ha demostrado su efectividad para promover el crecimiento y la absorción de P vegetal (Osorio y Habte, 2001). Este hongo se multiplicó en medio PDA durante 3 días y 28°C y luego se suspendió en agua destilada estéril para luego ser inmovilizado en alginato de calcio. Esto se hizo siguiendo el método descrito por de-Bashan et al. (2004) para inmovilizar bacterias. Para tal fin, 40 mL de inóculo de *Mortierella* sp. ( $10^7$  esporas mL<sup>-1</sup>) se mezclaron con 160 mL de una solución estéril de alginato de sodio al 2%, la cual se agitó por 15 min a 40 rpm. Luego, se dejaron caer gotas de esta mezcla en una solución de CaCl<sub>2</sub> al 2% con agitación a 40 rpm y así formar las perlas de alginato de calcio (de-Bashan and Bashan, 2010). Posteriormente, las perlas se mantuvieron en CaCl<sub>2</sub> al 2% para su estabilización por 1 h a 28 °C y finalmente se lavaron en solución salina estéril y agua destilada y se secaron en una estufa a 40 °C por 48 h.

El HMA *Rhizoglyphus fasciculatum* (Sieverding et al., 2015), llamado también *Rhizofagus fasciculatum* por Schüßler and Walker (2010), se cultivó en un sustrato estéril suelo-arena (4:1) con maíz, con 400 esporas por g de inóculo. La cantidad de propágulos micorrizales infectivos g<sup>-1</sup> de inóculo se midió con el método del número más probable (Porter, 1979) con un valor 57.

### Plantas

Las semillas de *Leucaena leucocephala* se escarificaron con ácido sulfúrico concentrado por 20 min y se dejaron germinar por 2 días en cámara húmeda. En cada maceta se sembraron tres plántulas y luego de dos semanas de crecimiento se realizó un raleo, dejando solo una. Cada maceta recibió solución nutritiva Hoagland libre de P una vez por semana. La frecuencia de riego o fertirriego fue la necesaria para conservar la humedad del suelo al 50% de la máxima capacidad de retención.

La leucaena leucocephala es una leguminosa con un alta dependencia micorrizal (Habte y Manjunath, 1987), es una planta indicadora de deficiencia de P y en ella se establecieron los ensayos para el método del pinulo de P foliar sin destrucción de planta (Habte y Osorio, 2001).

#### Experimento No. 1.

El Oxisol se inoculó o no con *R. fasciculatum* a razón de 35 g por kg de suelo, los cuales se mezclaron homogéneamente con el suelo. El suelo no inoculado recibió 15 mL kg<sup>-1</sup> de los filtrados (papel filtro Whatman No. 42) de una suspensión del inóculo micorrizal al 10%, para así aportar la microbiota acompañante del HMA. El suelo se inoculó o no con *Mortierella* sp. inmovilizado a diferentes dosis de perlas de alginato secas (0, 150, 300 y 600 mg/planta) que se aplicaron en el sitio de siembra. Luego de la inoculación las plantas crecieron por 6 semanas.

El diseño experimental fue completamente al azar, los tratamientos tuvieron un arreglo factorial 2x4 (2 niveles de inoculación micorrizal, 4 niveles de inoculación con el HSP inmovilizado en alginato). Cada tratamiento tuvo 5 repeticiones.

#### Experimento No. 2.

En este experimento se usaron los tres suelos (Mollisol, Oxisol y Andisol) que se llevaron a los materos donde se inocularon o no con *R. fasciculatum* a razón de 35 g por kg de suelo (los no inoculados se trataron de la misma forma descrita arriba) y con el hongo *Mortierella* sp. inmovilizado a una sola dosis de perlas de alginato secas 150 mg/planta (basado en el resultado del experimento No. 1).

Cada suelo se consideró como un experimento separado. El diseño experimental de cada uno fue completamente al azar, los tratamientos tuvieron un arreglo factorial 2x2 (2 niveles de inoculación micorrizal, 2 niveles de inoculación con el HSP inmovilizado en alginato). Cada tratamiento tuvo 4 repeticiones.

Los experimentos 1 y 2 se llevaron a cabo en el invernadero de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Al final de estos experimentos (6 semanas) las variables evaluadas fueron: biomasa aérea seca (g) (60 °C por 72 h) y contenido de P foliar (%) a través de muestreos no destructivos (Aziz and Habte, 1987) y de la determinación cuantitativa de P por el método del azul de molibdato (Murphy and Riley, 1962). La colonización micorrizal, se determinó por tinción con fuscina ácida (0.15%) por 48 h (Kormanik et al., 1980), y se cuantificó la intensidad de la colonización micorrizal mediante las líneas de intercepción (Giovannetti and Mosse, 1980). Igualmente, en las raíces se cuantificó la colonización del HSP.

#### Experimento No. 3.

Este experimento se realizó bajo condiciones *in vitro* para evaluar la biosolubilización de RP con el HSP inmovilizado en alginato en presencia de muestras de los tres suelos (Mollisol, Oxisol y Andisol) y así obtener información que permita explicar las interacciones detectadas en los experimentos previos. La composición básica del medio de cultivo fue ( $\text{g L}^{-1}$ ): glucosa: 10,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ : 1,  $\text{KCl}$ : 1.87,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : 0.2,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 0.4 y RP: 3.5 como única fuente de P (Osorio, 2008). Erlenmeyer de 250 mL que contengan 75 mL de este medio se esterilizará en autoclave a  $120^\circ\text{C}$ , 0.1 MPa, por 20 minutos. Una vez inoculados los *erlenmeyers* con el HSP inmovilizado se agitaron continuamente a 100 rpm,  $28^\circ\text{C}$ , durante 13 días.

La roca fosfórica (RP) usada fue una muestra comercial proveniente de las minas del Huila, Colombia, pasada a través de un tamiz de 250  $\mu\text{m}$ . Su fórmula molecular es  $\text{Ca}_{9.69}\text{Na}_{0.22}\text{Mg}_{0.09}(\text{PO}_4)_{5.14}(\text{CO}_3)_{0.86}\text{F}_{2.34}$ , con una concentración de P del 12%.

Luego del periodo de incubación, se determinó el pH y la concentración de P, Ca, Mg y K y elementos menores del medio de cultivo Cu, Fe, Mn y Zn, y número de esporas. El pH se midió usando un potenciómetro (WTW electrodo Sentix 81). La concentración de P ( $\text{mg L}^{-1}$ ) se determinó mediante el método del azul-molibdato (Murphy y Riley 1962) a 890 nm (espectrofotómetro Genesys 20 Thermo Spectronic), previa filtración en papel filtro Whatman No. 42 y centrifugación (centrifuga Jouan MR 1812) a 4000 rpm (1520xg) durante 10 minutos, para cada medida se realizó una curva de calibración. Ca, Mg, K, Fe Mn, Cu y Zn, se midieron por Espectrofotometría de absorción atómica Perkin Elmer 2380. La conductividad eléctrica con un electrodo Schoott LF413T.

El diseño experimental fue completamente al azar, los tratamientos tuvieron un arreglo factorial  $3 \times 2$  (3 suelos, 2 niveles de inoculación con el HSP inmovilizado en alginato). Cada tratamiento tuvo 4 repeticiones.

#### Análisis estadístico

En todos los experimentos el efecto de los tratamientos se evaluó mediante análisis de varianza y cuando estos tuvieron efectos significativos se utilizó la prueba de separación de medias de Duncan. Los análisis se hicieron con un nivel de significancia ( $P$ )  $\leq 0.05$ , mediante el software STATGRAPHICS versión centurión XVI. Todos los experimentos se repitieron en el tiempo.

## 7.3 Resultados y discusión

### Experimento No. 1.

Ambos hongos promovieron el desarrollo vegetal de las plantas con respecto al control, tal como se puede ver en la Figura 7-1. Altura de planta (cm), masa seca aérea (g) y contenido de P foliar ( $\mu\text{g}$ ) en función de las dosis de perlas de alginato conteniendo *Mortierella* sp. inmovilizado (0, 150, 300 y 600 mg por planta) y la inoculación micorrizal con *R. fasciculatum* en el suelo de

Carimagua. No micorrizado (columnas blancas) e inoculado con *Mortierella* sp. (columnas negras). Cada columna representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ). Claramente la inmovilización en las perlas no afectó ni la viabilidad ni la efectividad de este hongo ya reportada en previos trabajos (Osorio and Habte, 2013; Zhang et al., 2011). Es relevante que este es uno de los primeros reportes de uso de este microorganismo solubilizador inmovilizado y que resultó exitoso (Vassilev et al., 2001, 2006). Nótese que la masa seca aérea de las plantas de leucaena no micorrizadas aumentó significativamente con la dosis creciente de *Mortierella* sp. inmovilizado con respecto al control no inoculado (0.157 g). Los efectos de las dosis de perlas de 150 y 300 mg no presentaron diferencia significativa entre ellas (promedio de 0.302 g) y con la dosis mayor de perlas de 600 mg la masa seca aérea fue de 0.58 g. La altura presentó un comportamiento similar al de la biomasa, donde al aumentar la dosis del HSP se mejoró la altura de la Leucena. En las plantas no inoculadas la altura fue de 7,4 cm y con 600 mg de HSP inmovilizado fue de 12 cm.

Es claro que la inoculación con el hongo *Mortierella* sp. mejora las variables biométricas de la planta de leucaena, resultados similares se han encontrado con otros microorganismos solubilizadores de P. Por ejemplo, Singh y Reddy, (2011) evaluaron los efectos positivos al inocular el hongo *Penicillium oxalicum* sin inmovilizar en plantas de maíz y encontraron que la biomasa fue el doble de las plantas control no inoculadas. Jain y colaboradores (2010) evaluaron el efecto de la inmovilización del hongo solubilizador *Aspergillus awamori* en alginato de calcio y agar en el crecimiento de plantas de frijol y solubilización de roca fosfórica y encontraron que la inoculación mejoró con respecto al control, pero no se presentaron diferencias significativas entre tener el hongo libre o inmovilizado.

Es importante resaltar que el crecimiento de las plantas micorrizadas fue significativamente mayor que las no inoculadas. Y en estas también hubo efecto promotor de crecimiento con la adición de las perlas de alginato con el hongo *Mortierella* sp. Mientras que estas plantas micorrizadas, pero no inoculadas con el HSP, presentaron valores de masa seca aérea de 0.803 g, las inoculadas con 150 y 300 mg de perlas alcanzaron valores significativamente más altos (1.553 y 1.493 g, sin diferencia significativa entre ellos). Con la dosis de perla más alta la masa seca aérea fue de 1.267 g, la cual fue significativamente superior a las del control, pero menor que las anteriores (Figura 7.3). De nuevo, la altura tuvo un comportamiento comparable. Plantas micorrizadas pero sin el HSP inmovilizado tuvieron una altura de 19.4 cm, al co-inocular con el HSP el efecto fue mayor, siendo mejor con la dosis de 150 mg de perlas (28.3 cm) que con las dosis de 300 y 600 mg (21.7 y 22.3 cm).

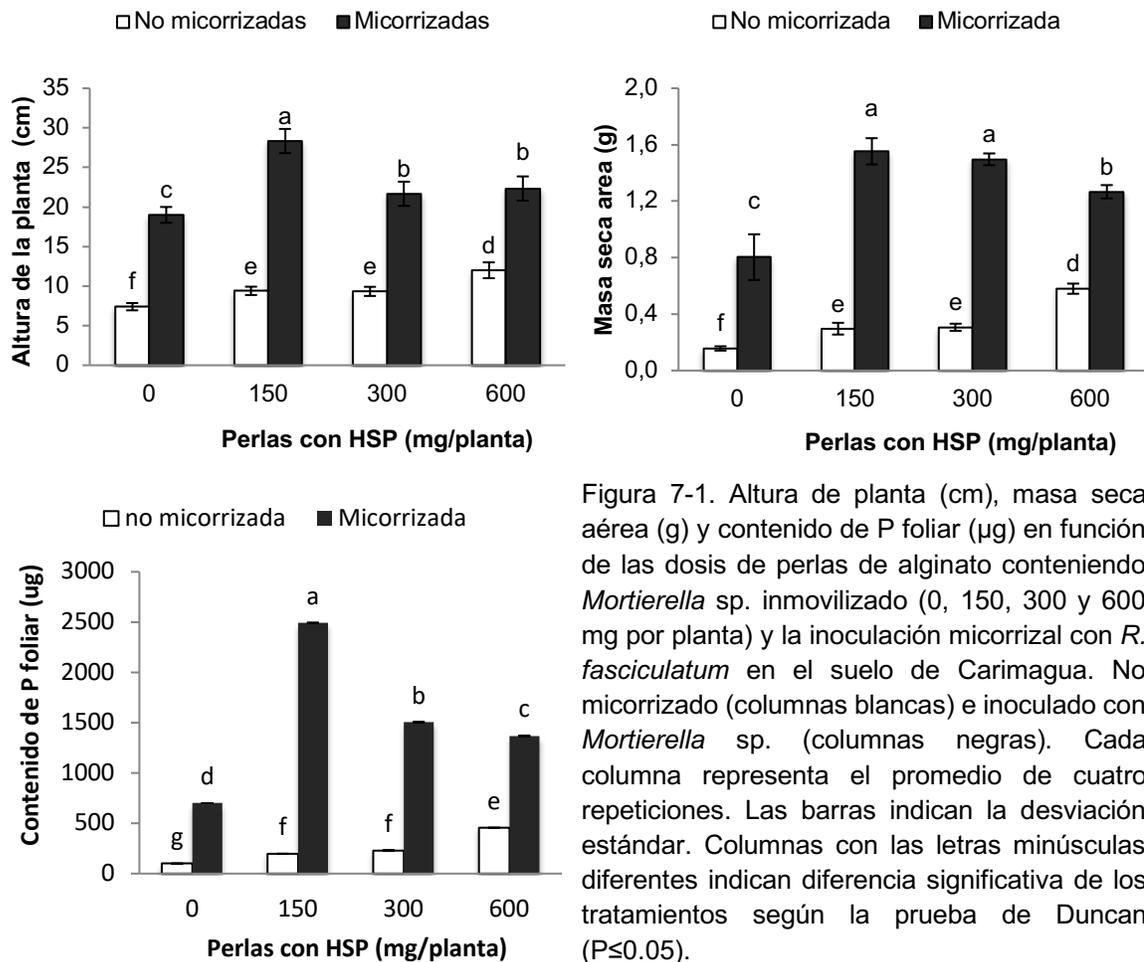


Figura 7-1. Altura de planta (cm), masa seca aérea (g) y contenido de P foliar ( $\mu\text{g}$ ) en función de las dosis de perlas de alginato conteniendo *Mortierella* sp. inmovilizado (0, 150, 300 y 600 mg por planta) y la inoculación micorrizal con *R. fasciculatum* en el suelo de Carimagua. No micorrizado (columnas blancas) e inoculado con *Mortierella* sp. (columnas negras). Cada columna representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ).

El contenido de P foliar en las plantas de leucaena tuvo un efecto similar al de la altura y masa seca aérea. Así, las plantas no inoculadas (sin micorriza y sin HSP inmovilizado) tuvieron un valor medio de P de  $99.7 \mu\text{g/planta}$ ; la inoculación con 150 y 300 mg de perlas de alginato en plantas libre de micorriza aumentó el valor significativamente a  $197.1$  y  $230.9 \mu\text{g}$  de P/planta (sin diferencias entre estos dos valores) y a  $455.3 \mu\text{g}$  con la dosis mayor. Si bien estos resultados con las perlas de *Mortierella* sp. son significativos y bastante altos (2.0 a 4.61 veces más que las plantas no inoculadas), el efecto fue significativamente mayor en plantas micorrizadas. Las plantas micorrizadas, pero sin perlas, tuvieron un contenido de P de  $700.3 \mu\text{g}$  de P/planta (7 veces más), al aplicar 150 mg de perlas el valor aumentó a  $2492.5 \mu\text{g}$  de P/planta (25 veces más); con la dosis de 300 mg de perlas el contenido fue de  $1505.3 \mu\text{g}$  de P/planta (15 veces más) y con 600 mg el valor fue de  $1368.4 \mu\text{g}$  de P/planta (13.7 veces más) (Figura 7.3).

Jeffries y colaboradores (2003) sugieren que el contenido de nutrientes en la planta es el mejor indicador de la efectividad de las micorrizas, ya que tiene en cuenta no sólo la adquisición equilibrada de nutrientes, sino también los efectos positivos en la biomasa. En

este caso en contenido de P foliar es un indicador tanto de la efectividad micorrizal, como la del HSP y la coinoculación con ambos.

La colonización de ambos microorganismos fue medida al finalizar el experimento. En el caso de la colonización micorrizal, esta sólo se presentó cuando el HMA fue inoculado, alcanzando valores de 72% en ausencia del solubilizador (Figura 7.3). Este valor disminuyó significativamente con el incremento de la dosis de perla del HSP a 61, 52 y 34%, respectivamente. En contraste, la colonización del solubilizador no se vio afectado ni con la dosis perlas aplicadas ni con la presencia del hongo micorrizal, y se mantuvo en 100%.

Aunque la presencia del HSP disminuye el porcentaje de colonización micorrizal, el mejor resultado en términos de contenido de P y crecimiento vegetal se obtuvo con la dosis de 150 mg de perlas de *Mortierella* sp. inmovilizado. La disminución en la colonización micorrizal al coinocular con el HSP *Aspergillus niger* se ha reportado en *D. pentaphyllum* inoculada con los HMA *G. intraradices* y *G. deserticola* (Caravaca et al., 2004). Osorio y Habte (2013, 2015) también reportaron este efecto con *G. fasciculatum* y *Mortierella* sp. y *Claroideoglossum claroideum* y *Mortierella* sp. no inmovilizada en leucaena. Es importante resaltar que esta disminución se da cuando en el suelo se tienen niveles de P en solución cercanos a los 0.02 mg L<sup>-1</sup>. Cuando este valor es menor es posible que al coinocular el HSP más el HMA se aumenten los porcentajes de colonización micorrizal como lo encontrado por (Cabral et al., 2012; Yousefi et al., 2011) y Osorio y Habte, (2001) al adicionar fertilizantes fosfóricos y cambiar el contenido de P en la solución del suelo. En cualquier caso es importante mencionar que *Mortierella* sp. también actúa como un endofito a diferencia de otros HSP que no se consideran endofitos.

La disminución en el porcentaje de colonización micorrizal en las plantas se puede deber a:

- Ambos hongos son endófitos, así al aumentar la dosis de HSP se puede dar mayor competencia por colonizar la raíz.
- Al aumentar la dosis del HSP se generó una mayor concentración de P, por lo tanto, la planta disminuye un poco la extensión del HMA en su raíz. Este efecto se puede ver en el porcentaje de la colonización micorrizal con las mayores dosis del HSP, sin embargo, los efectos alcanzados por el HMA siguen siendo mayores que al no inocular el HSP. La colonización micorrizal se ve favorecida con bajas concentraciones de P en solución (Lebrón et al., 2012; Senna et al., 2014; Eskandari et al., 2017; Osorio and Habte, 2015), y a su vez disminuye con mayor biodisponibilidad de P en el suelo (Cardoso et al., 2017), lo que se puede relacionar directamente con el aumento en la dosis del HSP. A mayor dosis de HSP por planta, mayor P en la solución del suelo, lo que se ve reflejado en el aumento del contenido de P foliar en la planta **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

Los efectos positivos en las plantas por la inoculación individual de HMA y microorganismos solubilizadores han sido reportados (Jeffries et al., 2003; Khan et al., 2009). Por lo tanto, es atractivo usar los microorganismos coinoculados buscando efectos sinérgicos o aditivos para la planta. En este experimento, si bien cada microorganismo de forma individual tuvo una respuesta significativa con respecto al control, en la coinoculación se alcanzan mejores resultados. Algunos autores reportan que el HMA estimula la efectividad de los HSP en la rizosfera (Osorio and Habte, 2001; Zhang et al., 2011). Las micorrizas liberan compuestos orgánicos a la rizosfera (Amos and Walters, 2006; Nguyen, 2003). Estos pueden ser usados por el HSP (hongo heterótrofo) para producir ácidos orgánicos y mejorar la concentración de P en la solución del suelo (Hameeda et al., 2006; Osorno and Osorio, 2014, 2017; Reyes et al., 2007).

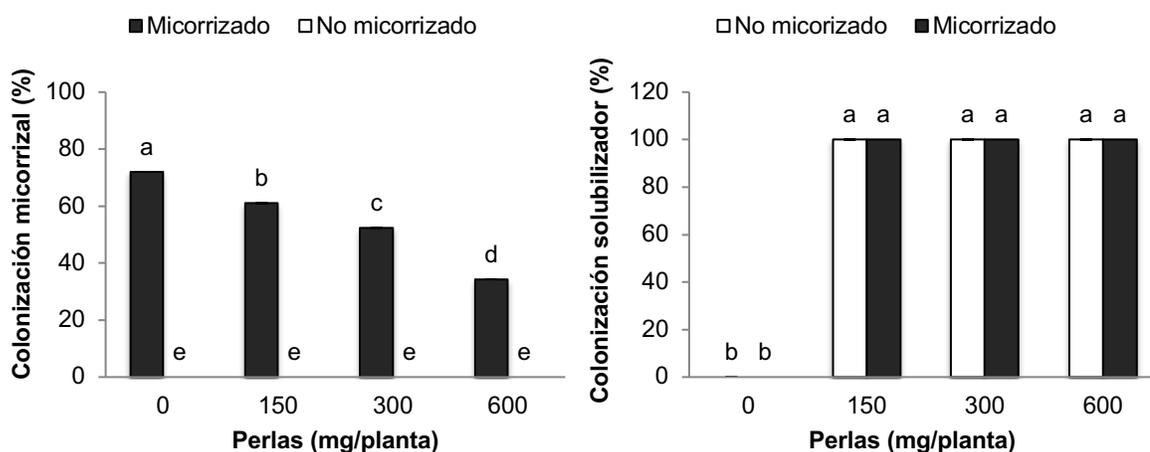


Figura 7-2. Colonización (%) micorrizal (izquierda), del solubilizador (derecha), en función de la inoculación micorrizal (*R. fasciculatum*) y la inoculación con *Mortierella* sp. inmovilizado alginato de calcio en diferentes concentraciones (0, 150, 300 y 600 mg por planta) en el oxisol. No micorrizado (columnas blancas) e inoculado (columnas grises) con *Mortierella* sp. Cada columna representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ).

El HSP inmovilizado presenta un efecto significativo en el desarrollo de la planta, este efecto es mayor al aumentar la dosis del solubilizador por planta. La inoculación micorrizal presenta mejores efecto que el HSP, pero este valor se puede potencializar al coinocular los dos microorganismos. El consorcio entre el HSP inmovilizado y el HMA mejora el desarrollo de la planta. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el HSP debe ir en dosis relativamente pequeñas para no afecta los beneficios del hongo micorrizal. La inmovilización del HSP puede favorecer el establecimiento de la colonización micorrizal y evitar competencia por la rizosfera durante este proceso.

## Experimento No. 2.

En este experimento el objetivo fue evaluar el efecto que pueden tener suelos con diferentes capacidades de fijación de P en la respuesta de los inoculantes. De acuerdo a los resultados del experimento No.1, cuando se inoculo de manera individual el HSP inmovilizado se usó una dosis de 600 mg por planta, pero cuando se coinoculo con el hongo micorrizico arbuscular se usó una dosis de 150 mg por planta, con el fin de potencializar el efecto tanto de los hongos de manera individual como dual. Esto es particularmente importante en suelos tropicales con alta capacidad de fijación de P en donde la coinoculación con ambos microorganismos produce un mejor resultado (Osorio and Habte, 2015).

Los tratamientos con los microorganismos HSP inmovilizado y HMA tuvieron un efecto significativo sobre el crecimiento de las plantas de leucaena, tanto de manera individual como combinada. El efecto fue mayor con el HMA que con el HSP inmovilizado. Por ejemplo, en la altura de las plantas la inoculación con HSP fue 1.4-1.5 veces más que la del control no inoculado (NI) en los tres suelos (Figura 7-3); con el HMA la altura fue 2.9 a 3.9 veces más que en el control, siendo mejor en Mollisol de baja capacidad de adsorción de P. Con la coinoculación (HMA+HSP) la altura fluctuó entre 3.9 a 4.9 veces más que el control no inoculado. Similarmente, la masa seca aérea fue mejorado con las inoculaciones individuales y la coinoculación en los tres suelos, excepto con el HSP en el Andisol, en el que no se presenta diferencia significativa con respecto al control (Figura 7-4).

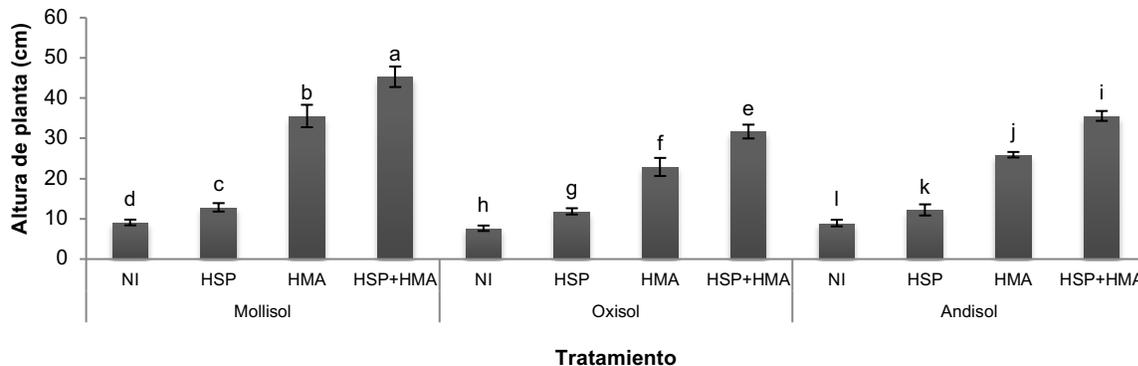


Figura 7-3. Altura de planta (cm) en función de la inoculación individual y combinada con el HSP (*Mortierella* sp., inmovilizado) y HMA (*R. fasciculatum*) en tres suelos (Mollisol, Oxisol, Andisol). Cada columna representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ). Cada suelo es un experimento separado y por ello no comparten letras para comparación.

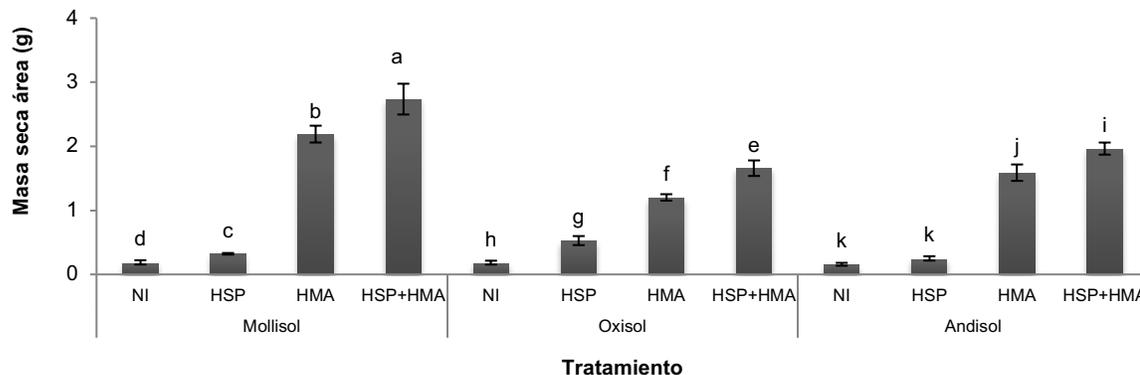


Figura 7-4. Masa seca aérea (g) en función de la inoculación individual y combinada con el HSPi (*Mortierella* sp., inmovilizado) y HMA (*R. fasciculatum*) en tres suelos (Mollisol, Oxisol, Andisol). Cada columna representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ). Cada suelo es un experimento separado y por ello no comparten letras para comparación.

El contenido de P foliar fue afectado significativamente con los tratamientos en cada uno de los suelos Figura 7-5. De esta manera, el contenido de P aumentó 1.3-4.6 veces más que el control no inoculado al inocular el HSP, este efecto fue mayor en el oxisol (suelo con capacidad media de fijación de P). En presencia del HMA el efecto fue mayor con valores entre 7-27.4, veces más que el control (NI), donde en el Mollisol se dieron los mejores resultados. En la coinoculación HSP+HMA el contenido de P en las plantas de leucaena fue aún mayor en los tres suelos con incrementos entre 29.4-40.1 veces más que las plantas no inoculadas, este efecto fue de nuevo mejor en el Mollisol (baja capacidad de fijación), seguido del Oxisol (media capacidad de fijación) y el Andisol (alta capacidad de fijación) como se puede ver en la Tabla 7-2.

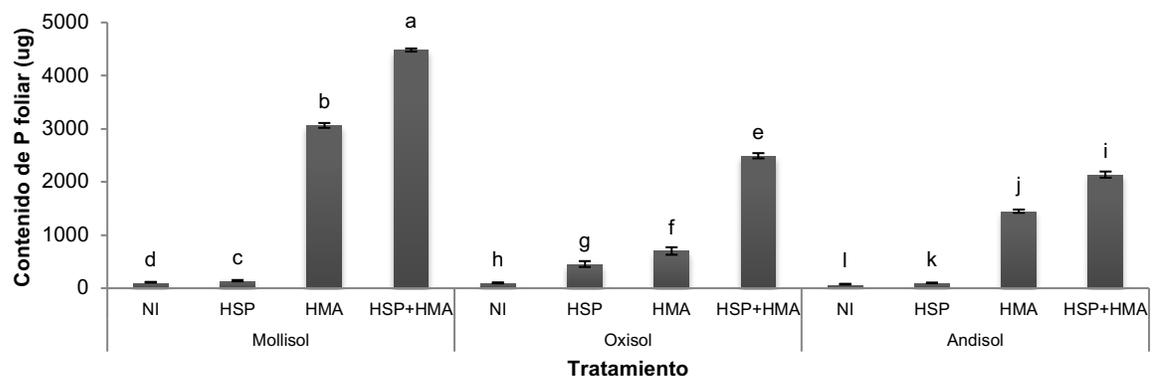


Figura 7-5 Contenido de P foliar ( $\mu\text{g}$ ) en función de la inoculación individual y combinada con el HSPi (*Mortierella* sp., inmovilizado) y HMA (*R. fasciculatum*) en tres suelos (Mollisol, Oxisol, Andisol). Cada columna representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ). Cada suelo es un experimento separado y por ello no comparten letras para comparación.

La colonización del solubilizador solo se encontró cuando *Mortierella* sp. fue inoculado en las plantas (HSP y HSP+HMA) Figura 7-6. Este fue del 100% tanto para cuando el HSP se inoculo de manera individual como coinoculada con el HMA, para los tres suelos sin diferencias significativas. De manera similar, la colonización micorrizal solo se encontró cuando solo se inoculo con *R. fasciculatum*. El porcentaje de colonización de la raíz por este hongo fue de 72-78 % cuando se inoculo de manera individual y disminuyó de manera significativa con la presencia del HSP fue de 61-65 %. Estos resultados son similares a los encontrado en el experimento 1 y el trabajo realizado por (Osorio and Habte, 2015).

Tabla 7-2. Incrementos relativos al inocular HSP (*Mortierella* sp.), HMA (*R. fasciculatum*) y HSP+HMA en plantas de leucaenas con respecto al control no inoculado, en tres suelos con diferentes capacidades de fijación de P, baja (Mollisol), media (Oxisol) y alta (Andisol). Cada valor corresponde al valor del tratamiento dividido el valor de los controles.

Suelo	Altura			Masa seca aérea			Contenido de P foliar		
	HSP	HMA	HSP+HMA	HSP	HMA	HSP+HMA	HSP	HMA	HSP+HMA
Mollisol	1.4	3.9	4.9	1.7	11.6	14.5	1.3	27.4	40.1
Oxisol	1.4	2.9	4.1	2.9	6.5	9.0	4.6	7.0	24.9
Andisol	1.5	2.9	3.9	1.6	10.1	12.4	1.3	19.2	28.3

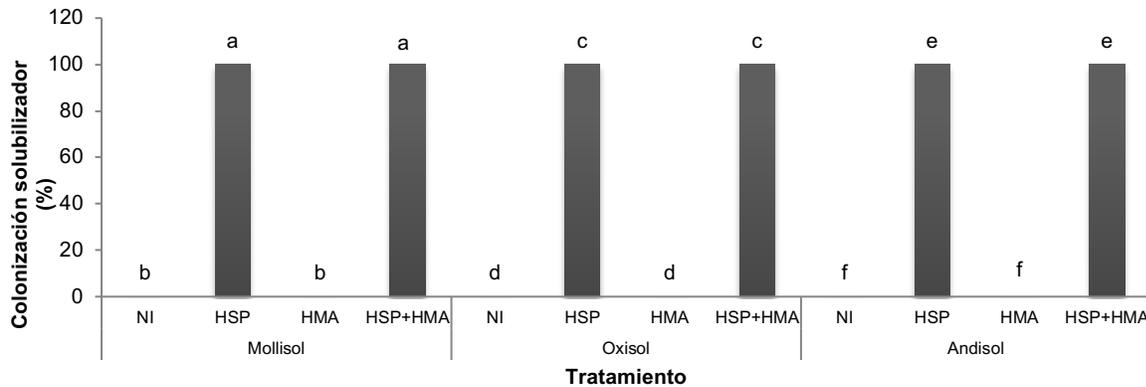


Figura 7-6. Colonización del solubilizador (%) en función de la inoculación individual y combinada con el HSPi (*Mortierella* sp., inmovilizado) y HMA (*R. fasciculatum*) en tres suelos (Mollisol, Oxisol, Andisol). Cada columna representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ). Cada suelo es un experimento separado y por ello no comparten letras para comparación.

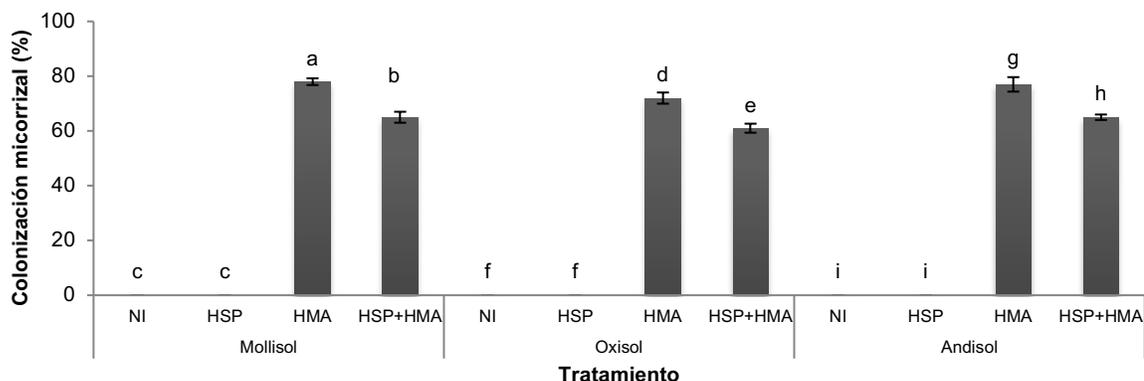


Figura 7-7. Colonización micorrizal (%) en función de la inoculación individual y combinada con el HSPi (*Mortierella* sp., inmovilizado) y HMA (*R. fasciculatum*) en tres suelos (Mollisol, Oxisol, Andisol). Cada columna representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ). Cada suelo es un experimento separado y por ello no comparten letras para comparación.

De acuerdo a los resultados se puede ver que cada microorganismo mejora el desarrollo de la planta en los suelos tropicales, sin embargo, los efectos de la coinoculación son mayores comparados con los controles no inoculados (Tabla 7-2). Como lo encontrado por Moreno et al., (2016) en un Andisol con especies forestales inoculado con el HSP *Mortierella* sp. y el HMA *R. fasciculatum*; y los resultados reportados por Osorio y Habte, (2015) en un Mollisol, Oxisol y Andisol en plantas de leucaena inoculados con *Mortierella* sp. (HSP) y *Claroideoglomus claroideum* (HMA). Si bien estos microorganismos tienen muy buenos efectos en las plantas creciendo en suelos con baja capacidad de fijación de P (Mollisol), es muy atractivo en los suelos tropicales donde el P es fijado rápidamente. Además del P en los suelos tropicales se presentan toxicidades por Al y Mn, y deficiencias de elementos menores como Cu, Mn, Fe y Zn, estos microorganismos mejoran tanto los problemas de toxicidad (Nogueira and Cardoso, 2003; Seguel et al., 2013) como la solubilización- desorción (do Carmo Horta and Torrent, 2007; Li et al., 2015; Osorio and Habte, 2012, 2014; Osorno et al., 2018) y absorción de estos micronutrientes (Chen et al., 2003) y macronutrientes (Aziz and Habte, 1987; Bonfante and Genre, 2010; Azcón-Aguilar and Barea, 2015), mejorando la fertilidad de estos suelos (Cardoso and Kuyper, 2006; Osorio, 2011; Osorio and Osorno, 2014; Cardoso et al., 2017; Osorio et al., 2017).

La coinoculación de HSP y HMA presentan un efecto sinérgico mejorando los efectos que cada hongo uno por separado en la planta, independientemente del suelo. Sin embargo la capacidad de fijación de P del suelo es un factor importante para determinar el efecto de los este consorcio microbiano (Osorio and Osorno, 2014; Osorio and Habte, 2015; Moreno et al., 2016; Osorio et al., 2017).

Es claro que tanto los HSP y MHA y su co-inoculación tiene un papel importante en el crecimiento y desarrollo de las plantas, pero la magnitud de este efecto puede depender

del suelo y su capacidad de fijación de P. En los suelos tropicales estos microorganismos adquieren más importancia por las siguientes razones:

- El HSP mantiene biodisponible el P en el suelo por fenómenos de solubilización y desorción.
- El HMA mejora la absorción de P, agua y otros nutrientes por la planta.
- El HMA disminuye los efectos de toxicidad por Al, Fe y Mn en las plantas, si por el contrario son deficientes, mejoran la absorción de estos.
- El HMA potencializa el efecto encontrado por el HSP de manera individual.
- La asociación de los microorganismos con la planta puede prevalecer en el tiempo, mientras que la adición de fertilizantes es consumida o retenida rápidamente.
- La coinoculación mejora la eficiencia de la fertilización P.
- Se puede reducir el uso de fertilizantes fosfóricos de síntesis química, o se pueden usar fuentes minerales (sin tratamientos químicos) como la roca fosfórica; lo que se traduce en ahorros económicos y disminución de posibles contaminaciones.
- El uso de HSP y HMA no solo mejoran el crecimiento de la planta sino también la fertilidad y física de suelo.

### Experimento No. 3.

Bajo condiciones *in vitro* los tres suelos al ser inoculados con el hongo *Mortierella* sp. inmovilizado en alginato presentaron un aumento significativo en la biodisponibilidad del P, Ca, Mg, Fe y Mn con respecto al control no inoculado (Figura 7-8). En el caso de K, Cu y Zn no se presentaron diferencias significativas entre los suelos no inoculados e inoculados (datos no mostrados). El aumento en la concentración de los nutrientes dependió de cada tipo de suelo usado.

En el caso de P el suelo de Carimagua (Oxisol) aumentó 20 veces más que el control no inoculado, en el suelo de Guarne (Andisol) el aumento fue de 30 veces y el suelo de Neira (Mollisol) 70 veces más que el control no inoculado. Para calcio los valores cambiaron de 312.9, 94.9 y 87.4 a 455.4, 374.8 y 371.0 mg L<sup>-1</sup> para el Oxisol, Andisol y Mollisol, respectivamente. Para Mg en el suelo de Carimagua el aumento absoluto fue de 19.2 mg L<sup>-1</sup>, en Guarne fue de 9.2 mg L<sup>-1</sup> y en Neira de 14.6 mg L<sup>-1</sup>. Para los micronutrientes en el suelo de Carimagua los valores de Fe y Mn aumentaron con respecto al control de 0.4 a 6.74 y de 0.13 a 0.38 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente; para Guarne los valores de Fe y Mn fueron de 0.002 a 5.60 y de 0.25 a 0.95 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Para el suelo de Neira los valores de Fe y Mn fueron de 0.004 a 13.45 y de 0.35 a 1.58 mg L<sup>-1</sup> respectivamente.

Varios autores han demostrado los efectos de la biosolubilización de RP bajo condiciones *in vitro* con diferentes microorganismos inmovilizados (Fenice et al., 2000; Jain et al., 2010; Vassilev et al., 1995, 2006) y sin inmovilizar (Bojinova et al., 2008; Hamdali et al., 2008; Narsian and Patel, 2000; Osorno and Osorio, 2014). Pero hay pocos reportes en los que

---

evalúa el efecto que puede tener el suelo o arcillas del suelo en la biosolubilización de la RP (Bar-Yosef et al., 1999; Osorio, 2008).

Al adicionar suelo en el sistema *in vitro*, además de simular lo que puede pasar en la solución del suelo, aumenta la intensidad de las reacciones y los sitios de adsorción de los elementos. En este experimento se puede ver que en presencia de suelo hubo biosolubilización de la RP, tal como se deduce del aumento en solución de P y Ca. Además, la inoculación con el hongo aumentó la concentración de otros nutrientes en solución (Mg, Fe y Mn) que en el sistema suelo podrían quedar disponibles para las plantas. Estos nutrientes pueden provenir del suelo o de minerales acompañantes de la RP.

La magnitud de este efecto depende del tipo de suelo, su contenido de materia orgánica, nutrientes, y el tipo y la cantidad de arcilla. Las arcillas del suelo y los óxidos e hidroxidos de Fe y Al son determinantes para determinar la capacidad de adsorción de P (Bortoluzzi et al., 2015; Osorio and Habte, 2014; Osorno et al., 2018). En cada suelo predomina un tipo de arcilla diferente. Así, en el Mollisol la arcilla que esta en mayor proporción es la montmorillonita que tiene baja fijación de P, mientras que en este Oxisol predomina la caolinita (arcillas con capacidad media de fijación de P). En contraste, en el Andisol predomina la alófana, la cual tiene una alta capacidad de adsorción (Bolan et al., 1994; Osorio, 2008).

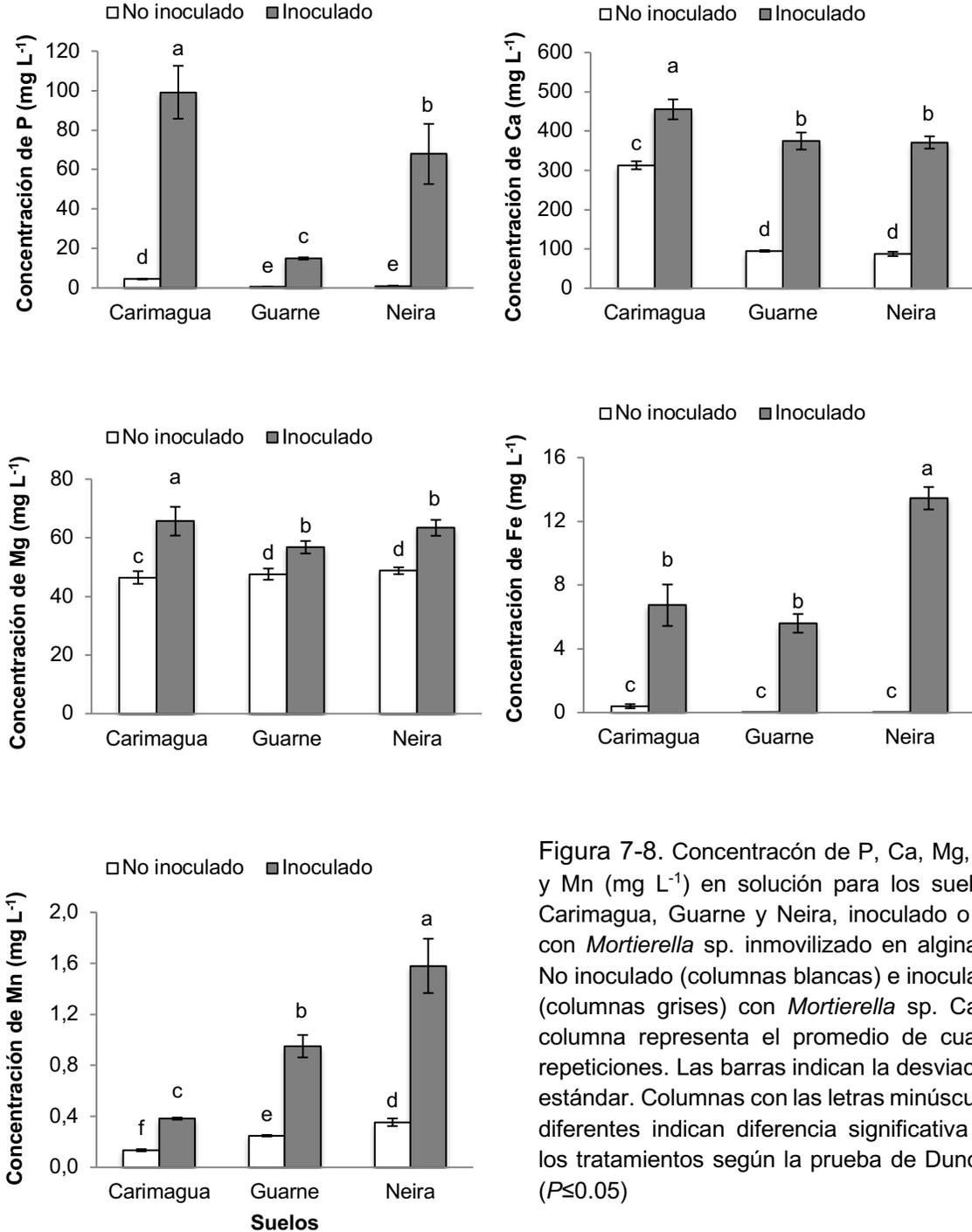


Figura 7-8. Concentración de P, Ca, Mg, Fe y Mn ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en solución para los suelos: Carimagua, Guarne y Neira, inoculado o no con *Mortierella* sp. inmovilizado en alginato. No inoculado (columnas blancas) e inoculado (columnas grises) con *Mortierella* sp. Cada columna representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ )

En la Figura 7-9 se puede observar como el pH del medio de cultivo *in vitro* disminuyó significativamente al inocular con el microorganismo inmovilizado pasando de valores de 5.03-5.35 de los controles a 3.24-3.64. La cantidad de esporas ( $5.4 \times 10^5$  por mL) no

presentó diferencia significativa entre los tres suelos, pero si con el control no inoculado en el que por supuesto no se encontraron esporas de *Mortierella* sp.

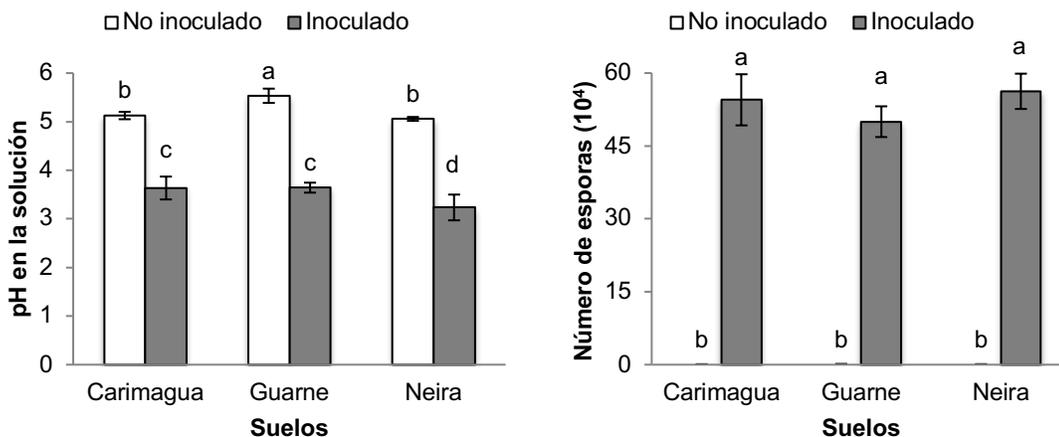


Figura 7-9. pH de la solución y número de esporas de *Mortierella* sp. para los suelos de Carimagua, Guarne y Neira No inoculado (columnas blancas) e inoculado (columnas grises) con *Mortierella* sp. Cada columna representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ).

El hongo *Mortierella* sp. inmovilizado en alginato de calcio biosolubilizó RP bajo condiciones *in vitro*, este efecto está afectado por la presencia de diferentes tipos de suelos y su capacidad de fijación de P. La inoculación además de biosolubilizar la RP mejora la fertilidad química del suelo, debido a que además del P y Ca, nutrientes proporcionados por la RP se mejora la biodisponibilidad de otros nutrientes como Mg, Fe y Mn.

## 7.4 Conclusión

La coinoculación del hongo micorrícico arbuscular (*R. fasciculatum*) y un hongo solubilizador de P (*Mortierella* sp.) inmovilizado en alginato de calcio mejoró el crecimiento vegetal y la absorción de P en diferentes suelos tropicales (Oxisol, Andisol y Mollisol). Estos microorganismos presentan efectos positivos al ser inoculado de manera independiente. Cuando el HSP es inoculado solo presenta mejores efectos en mayores dosis (600 mg), el HMA presenta también buenos resultados al ser inoculado solo, sin embargo, la coinoculación presenta efectos sinérgicos en el desarrollo de la planta, y este efecto es mayor cuando la dosis del HSP es menor (150 mg). La inmovilización del HSP es una estrategia que permite mantener la viabilidad y efectividad del solubilizador y

lo va liberando lentamente al suelo, permitiendo que se forme la asociación micorrizal. Además, de la solubilización de P, *Mortierella* sp. también mejora la biodisponibilidad de otros nutrientes en el suelo mejorando las propiedades químicas de este para el establecimiento de las plantas.

El HSP es en realidad un hongo solubilizador de nutrientes que aumenta la biodisponibilidad de estos en el suelo, así, el HMA le ayuda a la planta a tomar estos nutrientes, esto es particularmente importante en suelos tropicales.

## 7.5 Referencias

- Abouzeid, A.-Z.M. (2008). Physical and thermal treatment of phosphate ores — An overview. *Int. J. Miner. Process.* 85, 59–84.
- Amos, B., and Walters, D.T. (2006). Maize Root Biomass and Net Rhizodeposited Carbon. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 70, 1489–1503.
- Asci, S., Borisova, T., and VanSickle, J.J. (2015). Role of economics in developing fertilizer best management practices. *Agric. Water Manag.* 152, 251–261.
- Aydin, I., Aydin, F., Saydut, A., Bakirdere, E.G., and Hamamci, C. (2010). Hazardous metal geochemistry of sedimentary phosphate rock used for fertilizer (Mazıdag, SE Anatolia, Turkey). *Microchem. J.* 96, 247–251.
- Azcón-Aguilar, C., and Barea, J.M. (2015). Nutrient cycling in the mycorrhizosphere. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 15, 372–396.
- Aziz, T., and Habte, M. (1987). Determining vesicular–arbuscular mycorrhizal effectiveness by monitoring P status of leaf disks. *Can. J. Microbiol.* 33, 1097–1101.
- Bar-Yosef, B., Rogers, R.D., Wolfram, J.H., and Richman, E. (1999). *Pseudomonas cepacia* –Mediated Rock Phosphate Solubilization in Kaolinite and Montmorillonite Suspensions. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 63, 1703–1708.
- Bashan, Y., Hernandez, J.-P., Leyva, L.A., and Bacilio, M. (2002). Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biol. Fertil. Soils* 35, 359–368.
- de-Bashan, L.E., and Bashan, Y. (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresour. Technol.* 101, 1611–1627.
- de-Bashan, L.E., Hernandez, J.-P., Morey, T., and Bashan, Y. (2004). Microalgae growth-promoting bacteria as “helpers” for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. *Water Res.* 38, 466–474.
- Bhatti, T.M., and Yawar, W. (2010). Bacterial solubilization of phosphorus from phosphate rock containing sulfur-mud. *Hydrometallurgy* 103, 54–59.
- Bojinova, D., Velkova, R., and Ivanova, R. (2008). Solubilization of Morocco phosphorite by *Aspergillus niger*. *Bioresour. Technol.* 99, 7348–7353.

- Bolan, N.S., Naidu, R., Mahimairaja, S., and Baskaran, S. (1994). Influence of low-molecular-weight organic acids on the solubilization of phosphates. *Biol. Fertil. Soils* 18, 311–319.
- Bonfante, P., and Genre, A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nat. Commun.* 48, 1–11.
- Bortoluzzi, E.C., Pérez, C.A.S., Ardisson, J.D., Tiecher, T., and Caner, L. (2015). Occurrence of iron and aluminum sesquioxides and their implications for the P sorption in subtropical soils. *Appl. Clay Sci.* 104, 196–204.
- Cabral, J.S.R., Assis, K.C., Silva, F.G., Souchie, E.L., and Carneiro, M.A.C. (2012). Plántulas de anacardo del cerrado brasileño inoculadas con hongos micorrízicos arbusculares y microorganismos solubilizadores de fosfato. *Agrociencia* 46, 809–821.
- Caravaca, F., Alguacil, M.M., Azcón, R., Díaz, G., and Roldán, A. (2004). Comparing the effectiveness of mycorrhizal inoculation and amendment with sugar beet, rock phosphate and *Aspergillus niger* to enhance field performance of the leguminous shrub *Dorycnium pentaphyllum* L. *Appl. Soil Ecol.* 25, 169–180.
- Cardoso, I.M., and Kuyper, T.W. (2006). Mycorrhizas and tropical soil fertility. *Agric. Ecosyst. Environ.* 116, 72–84.
- Cardoso, E.J.B.N., Nogueira, M.A., and Zangaro, W. (2017). Importance of Mycorrhizae in Tropical Soils. In *Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics*, (Springer, Cham), pp. 245–267.
- do Carmo Horta, M., and Torrent, J. (2007). Phosphorus desorption kinetics in relation to phosphorus forms and sorption properties of portuguese acid soils. *Soil Sci.* 172, 631–638.
- Chen, B.D., Li, X.L., Tao, H.Q., Christie, P., and Wong, M.H. (2003). The role of arbuscular mycorrhiza in zinc uptake by red clover growing in a calcareous soil spiked with various quantities of zinc. *Chemosphere* 50, 839–846.
- Cordell, D., Drangert, J.-O., and White, S. (2009). The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Glob. Environ. Change* 19, 292–305.
- Covarrubias, S.A., de-Bashan, L.E., Moreno, M., and Bashan, Y. (2011). Alginate beads provide a beneficial physical barrier against native microorganisms in wastewater treated with immobilized bacteria and microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 2669–2680.
- Eskandari, S., Guppy, C.N., Knox, O.G.G., Flavel, R.J., Backhouse, D., and Haling, R.E. (2017). Mycorrhizal contribution to phosphorus nutrition of cotton in low and highly sodic soils using dual isotope labelling ( $^{32}\text{P}$  and  $^{33}\text{P}$ ). *Soil Biol. Biochem.* 105, 37–44.
- Fairhurst, T., Lefroy, R., Metert, E., and Batjes, N. (1999). The importance, distribution and causes of phosphorus deficiency as constraint to crop production in the tropics. *Agroforestry Forum* 9, 2–8.
- Fenice, M., Selbman, L., Federici, F., and Vassilev, N. (2000). Application of encapsulated *Penicillium variabile* P16 in solubilization of rock phosphate. *Bioresour. Technol.* 73, 157–162.

- Fox, R.L., and Kamprath, E.J. (1970). Phosphate Sorption Isotherms for Evaluating the Phosphate Requirements of Soils. *Soil Science Society of America Journal* 34, 902–907.
- Giovannetti, M., and Mosse, B. (1980). An Evaluation of Techniques for Measuring Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Infection in Roots. *New Phytol.* 84, 489–500.
- Habte, M. (2006). The Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant and Soil Health. In *Biological Approaches to Sustainable Soil Systems*, (CRC Press), pp. 129–147.
- Habte, M., y A. Manjunath. «Soil Solution Phosphorus Status and Mycorrhizal Dependency in *Leucaena Leucocephala*». *Applied and Environmental Microbiology* 53, n.º 4 (abril de 1987): 797–801.
- Habte, M., y N. W. Osorio. *Arbuscular Mycorrhizas: Producing and Applying Arbuscular Mycorrhizal Inoculum*. University of Hawaii, 2001. <http://scholarspace.manoa.hawaii.edu/handle/10125/25589>.
- Hamdali, H., Hafidi, M., Virolle, M.J., and Ouhdouch, Y. (2008). Rock phosphate-solubilizing Actinomycetes: screening for plant growth-promoting activities. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 2565–2575.
- Hameeda, B., Reddy, Y.H.K., Rupela, O.P., Kumar, G.N., and Reddy, G. (2006). Effect of carbon substrates on rock phosphate solubilization by bacteria from composts and macrofauna. *Curr. Microbiol.* 53, 298–302.
- Heisey, P.W., and Norton, G.W. (2007). Chapter 53 Fertilizers and other farm chemicals. In *Handbook of Agricultural Economics*, R.E. and P. Pingali, ed. (Elsevier), pp. 2741–2777.
- Hue, N.V., and Fox, R.L. (2010). Predicting Plant Phosphorus Requirements for Hawaii Soils using a Combination of Phosphorus Sorption Isotherms and Chemical Extraction Methods. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 41, 133–143.
- Jain, R., Saxena, J., and Sharma, V. (2010). The evaluation of free and encapsulated *Aspergillus awamori* for phosphate solubilization in fermentation and soil–plant system. *Appl. Soil Ecol.* 46, 90–94.
- Jeffries, P., Gianinazzi, S., Perotto, S., Turnau, K., and Barea, J.-M. (2003). The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biol. Fertil. Soils* 37, 1–16.
- Khan, A.A., Jilani, G., Akhtar, M.S., and Saqlan, S.M. (2009). Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production. *J. Agric. Biol. Sci.* 1, 48–58.
- Khan, M.S., Zaidi, A., and Wani, P.A. (2007). Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture — A review. *Agron. Sustain. Dev.* 27, 29–43.
- Kormanik, P.P., Bryan, W.C., and Schultz, R.C. (1980). Procedures and equipment for staining large numbers of plant root samples for endomycorrhizal assay. *Can. J. Microbiol.* 26, 536–538.
- Lebrón, L., Lodge, D.J., and Bayman, P. (2012). Differences in Arbuscular Mycorrhizal Fungi among Three Coffee Cultivars in Puerto Rico.

- Leung, K.T., So, J.-S., Kostrzynska, M., Lee, H., and Trevors, J.T. (2000). Using a green fluorescent protein gene-labeled p-nitrophenol-degrading *Moraxella* strain to examine the protective effect of alginate encapsulation against protozoan grazing. *J. Microbiol. Methods* 39, 205–211.
- Li, R.-X., Cai, F., Pang, G., Shen, Q.-R., Li, R., and Chen, W. (2015). Solubilisation of Phosphate and Micronutrients by *Trichoderma harzianum* and Its Relationship with the Promotion of Tomato Plant Growth. *PLOS ONE* 10, e0130081.
- Liu, L., Gundersen, P., Zhang, T., and Mo, J. (2012). Effects of phosphorus addition on soil microbial biomass and community composition in three forest types in tropical China. *Soil Biol. Biochem.* 44, 31–38.
- Meason, D.F., Idol, T.W., Friday, J.B., and Scowcroft, P.G. (2009). Effects of fertilisation on phosphorus pools in the volcanic soil of a managed tropical forest. *For. Ecol. Manag.* 258, 2199–2206.
- Moreno, J., León, J.D., and Osorio, N.W. (2016). Tree seedling growth promotion by dual inoculation with *Rhizoglyphus fasciculatum* (Thaxt.) Sieverding, Silva & Oehl and *Mortierella* sp., rhizosphere fungi for reforestation purposes, to promote plant P uptake and growth at the nursery state. *Acta Agronómica* 65, 239–247.
- Murphy, J., and Riley, J.P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 27, 31–36.
- Narsian, V., and Patel, H.H. (2000). *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. *Soil Biol. Biochem.* 32, 559–565.
- Nguyen, C. (2003). Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agronomie* 23, 375–396.
- Nogueira, M.A., and Cardoso, E.J.B.N. (2003). Mycorrhizal effectiveness and manganese toxicity in soybean as affected by soil type and endophyte. *Sci. Agric.* 60, 329–335.
- Oberson, A., Pypers, P., Bünemann, E.K., and Frossard, E. (2011). Management Impacts on Biological Phosphorus Cycling in Cropped Soils. In *Phosphorus in Action*, E. Bünemann, A. Oberson, and E. Frossard, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 431–458.
- Osorio, N.W. (2008). Effectiveness of microbial solubilization of phosphate in enhancing plant phosphate uptake in tropical soils and assessment of the mechanisms of solubilization. Thesis.
- Osorio, N.W. (2011). Effectiveness of Phosphate Solubilizing Microorganism in Increasing Plant Phosphate Uptake and Growth in Tropical Soils. In *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management*, D.K. Maheshwari, ed. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 65–80.
- Osorio, N.W., and Habte, M. (2001). Synergistic Influence of an Arbuscular Mycorrhizal Fungus and a P Solubilizing Fungus on Growth and P Uptake of *Leucaena leucocephala* in an Oxisol. *Arid Land Res. Manag.* 15, 263–274.
- Osorio, N.W., and Habte, M. (2012). Phosphate desorption from the surface of soil mineral particles by a phosphate-solubilizing fungus. *Biol. Fertil. Soils* 49, 481–486.

- Osorio, N.W., and Habte, M. (2013). Synergistic effect of a phosphate-solubilizing fungus and an arbuscular mycorrhizal fungus on leucaena seedlings in an Oxisol fertilized with rock phosphate. *Botany* 91, 274–281.
- Osorio, N.W., and Habte, M. (2014). Soil Phosphate Desorption Induced by a Phosphate-Solubilizing Fungus. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 45, 451–460.
- Osorio, N.W., and Habte, M. (2015). Effect of a phosphate-solubilizing fungus and an arbuscular mycorrhizal fungus on leucaena seedlings in tropical soils with contrasting phosphate sorption capacity. *Plant Soil* 389, 375–385.
- Osorio, N.W., and Osorno, L. (2014). Biofertilization with Mycorrhizal Fungi and Phosphate Solubilizing Microorganisms Enhance Effectiveness of Phosphate Fertilizers in Tropical Soils. In *Fertilizer Technology Vol. II: Biofertilizers*, Sih, K., Pant, and J. Govil, eds. pp. 298–326.
- Osorio, N.W., Osorno, L., Leon, J.D., and Álvarez, C. (2017). Plant-Microbe Interactions for Phosphate Management in Tropical Soils. In *Essential Plant Nutrients*, (Springer, Cham), pp. 491–512.
- Osorno, L., and Osorio, N.W. (2014). Effect of Carbon and Nitrogen Source and Concentration on Rock Phosphate Dissolution Induced by Fungi. *J. Appl. Biotechnol.* 2, 1–11.
- Osorno, L., and Osorio, N.W. (2017). Evaluación de factores que afectan la bioacidulación de roca fosfórica bajo condiciones in vitro. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 19, 53–62.
- Osorno, L., Osorio, N.W., and Habte, M. (2018). Phosphate desorption by a soil fungus in selected Hawaiian soils differing in their mineralogy. *Trop. Agric.* 95, 154–166.
- Porter, W. (1979). The “most probable number” method for enumerating infective propagules of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Soil Res.* 17, 515–519.
- Reyes, I., Valery, A., and Valduz, Z. (2007). Phosphate-solubilizing microorganisms isolated from rhizospheric and bulk soils of colonizer plants at an abandoned rock phosphate mine. In *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*, (Springer, Dordrecht), pp. 69–75.
- Scholz, R.W., Ulrich, A.E., Eilittä, M., and Roy, A. (2013). Sustainable use of phosphorus: A finite resource. *Sci. Total Environ.* 461–462, 799–803.
- Schüßler, A., and Walker, C. (2010). *The Glomeromycota: A species list with new families and new genera* (The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatsammlung Munich, and Oregon State University, 19. Chicago).
- Seguel, A., Cumming, J.R., Klugh-Stewart, K., Cornejo, P., and Borie, F. (2013). The role of arbuscular mycorrhizas in decreasing aluminium phytotoxicity in acidic soils: a review. *Mycorrhiza* 23, 167–183.
- Senna, J.O.A. de, Stefanutti, R., Donha, R.M.A., and Cardoso, E.J.B.N. (2014). Cinética de absorção com doses de fósforo e fungos micorrízicos arbusculares em *Nicotiana tabacum*. *Científica* 42, 294–298.
- Singh, H., and Reddy, M.S. (2011). Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. *Eur. J. Soil Biol.* 47, 30–34.

- 
- Ulrich, A.E., and Frossard, E. (2014). On the history of a reoccurring concept: Phosphorus scarcity. *Sci. Total Environ.* 490, 694–707.
- Vassilev, N., Baca, M.T., Vassileva, M., Franco, I., and Azcon, R. (1995). Rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* grown on sugar-beet waste medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44, 546–549.
- Vassilev, N., Vassileva, M., Azcon, R., and Medina, A. (2001a). Application of free and Ca-alginate-entrapped *Glomus deserticola* and *Yarrowia lipolytica* in a soil–plant system. *J. Biotechnol.* 91, 237–242.
- Vassilev, N., Vassileva, M., Azcon, R., and Medina, A. (2001b). Preparation of gel-entrapped mycorrhizal inoculum in the presence or absence of *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Lett.* 23, 907–909.
- Vassilev, N., Medina, A., Azcon, R., and Vassileva, M. (2006). Microbial solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes and effect of the resulting products on plant growth and P uptake. *Plant Soil* 287, 77.
- Walan, P., Davidsson, S., Johansson, S., and Höök, M. (2014). Phosphate rock production and depletion: Regional disaggregated modeling and global implications. *Resour. Conserv. Recycl.* 93, 178–187.
- Yousefi, A.A., Khavazi, K., Moezi, A.A., Rejali, F., and Nadian, H.A. (2011). Phosphate Solubilizing Bacteria and Arbuscular Mycorrhizal Fungi Impacts on Inorganic Phosphorus Fractions and Wheat Growth. *World Appl. Sci. J.* 15, 1310–1318.
- Zhang, H., Wu, X., Li, G., and Qin, P. (2011). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing fungus (*Mortierella* sp.) and their effects on *Kosteletzkya virginica* growth and enzyme activities of rhizosphere and bulk soils at different salinities. *Biol. Fertil. Soils* 47, 543–554.

## 8. Conclusiones y recomendaciones

### 8.1 Conclusiones

- La inmovilización del hongo biosolubilizador *Mortierella* sp. proporcionó un entorno definido para el hongo, consistente en calidad y número de esporas por perla. Las perlas se disuelven en el suelo, liberando el microorganismo que mantiene la misma actividad que el hongo sin inmovilizar.
- Los suelos de diferente mineralogía pueden afectar la viabilidad del hongo inmovilizado solo en las primeras etapas de adaptación y disolución de la perla. Sin embargo, el microorganismo alcanza tasa de respiración muy similares independientemente del tipo de suelo e incluso de la cantidad de materia orgánica.
- La inmovilización de *Mortierella* sp. en alginato de calcio mantiene la viabilidad y la efectividad del hongo para biosolubilizar roca fosfórica bajo condiciones *in vitro*.
- La biosolubilización de la roca fosfórica se ve favorecido al usar dosis pequeñas del microorganismo (1 mg perlas secas). El tiempo en el que se alcanza la máxima concentración de P es de 11 días.
- El tiempo juega un papel importante ya que existen diferentes fases que implican la disolución de la perla y, por ende, la liberación de esporas, su crecimiento micelial y reproducción. Durante estas etapas el hongo produce ácidos orgánicos que biosolubilizan la RP.
- La coinoculación del hongo micorrizico arbuscular (*R. fasciculatum*) y un hongo solubilizador de P (*Mortierella* sp.) inmovilizado en alginato de calcio mejoró el crecimiento vegetal y la absorción de P en diferentes suelos tropicales (oxisol, andisol y mollisol). Estos microorganismos presentan efectos positivos al ser inoculado de manera independiente. Cuando el HSP es inoculado solo presenta mejores efectos en mayores dosis (600 mg), el HMA presenta también buenos resultados al ser inoculado solo, sin embargo, la coinoculación presenta efectos sinérgicos en el desarrollo de la planta, y este efecto es mayor cuando la dosis del HSP es menor (150 mg). La inmovilización del HSP es una estrategia que

---

permite mantener la viabilidad y efectividad del solubilizador y lo va liberando lentamente al suelo, permitiendo que se forme la asociación micorrizal. Además, de la solubilización de P, *Mortierella* sp. también mejora la biodisponibilidad de otros nutrientes en el suelo mejorando las propiedades químicas de este para el establecimiento de las plantas.

- El HSP es en realidad un hongo solubilizador de nutrientes que aumenta la biodisponibilidad de estos en el suelo, así, el HMA le ayuda a la planta a tomar estos nutrientes, esto es particularmente importante en suelos tropicales.
- La efectividad de *Mortierella* sp. no inmovilizados e inmovilizados para desorber P está controlada por la capacidad del suelo para adsorber este elemento y el nivel de P adsorbido en él. El hongo tiene la capacidad de producir ácidos orgánicos en diferentes tipos de suelo, sin embargo, de acuerdo a la mineralogía del suelo estos ácidos podrán desorber P o no. La inmovilización del hongo en alginato de calcio no afectó el proceso de desorción de P en el suelo.

## 8.2 Recomendaciones

- Usar dosis diferentes de HSP inmovilizado a las usadas en este estudio, menores a 150 mg de perlas secas tanto bajo condiciones *in vitro* como en planta.
- Usar los microorganismos HMA y HSP en suelo no esteriles y con estas especies de plantas diferentes.
- Evaluar la efectividad de los HSP inmovilizados en alginato en el tiempo, a los dos años o más.