

AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN DE MICROORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FÓSFORO DE ANDISOLES DE COSTA RICA¹

Paola Vargas-Barrantes*, Leida Castro-Barquero^{2/*}

Palabras clave: Microorganismos solubilizadores de P; inmovilización microbiana de P; inoculantes microbianos; Andisoles; técnicas agrícolas sostenibles.

Keywords: Phosphorus solubilizing microorganisms; phosphorus microbial immobilization; microbial inoculants; Andisols; sustainable agricultural techniques.

Recibido: 28/11/17

Aceptado: 27/06/18

RESUMEN

Con el objetivo de desarrollar una metodología para evaluar microorganismos capaces de solubilizar fósforo, se aislaron 54 cepas de un Andisol de Costa Rica, y se cuantificó su potencial de solubilización in vitro. Para los hongos se empleó como criterio de selección el halo de solubilización en medio sólido y para las bacterias y levaduras el pH y el P en solución, en medio líquido. Ante la manipulación in vitro, los hongos presentaron mayor estabilidad para conservar su habilidad para solubilizar P. Posteriormente, se realizaron dos ensayos en invernadero utilizando el Andisol y arroz como planta indicadora. En el primer ensayo se compararon los mejores microorganismos evaluados in vitro, a saber *Aspergillus flavus*, *Pseudomonas fragi*, *Pichia anomala* y un testigo absoluto. Las plantas se cosecharon a los 100 días, el tratamiento con *A. flavus* aumentó el peso seco de la raíz, pero la relación raíz/tallo fue menor a 1 y no se incrementó el P foliar (0,13%). Sin embargo, en el suelo del tratamiento con *A. flavus* se incrementó 100 veces la población de solubilizadores y el P soluble se elevó en 2,67 mg.l⁻¹ respecto al testigo sin que las plantas mostraran beneficio,

ABSTRACT

Isolation and evaluation of phosphorus solubilizing microorganisms from Andisol soils in Costa Rica. In order to develop a methodology to evaluate microorganisms capable of solubilizing phosphorus, 54 strains were isolated from a Costa Rican Andisol, and their solubilization potential was quantified under in vitro conditions. For fungi, the solubilization halo in solid medium was used as a selection criteria, and for bacteria and yeasts, pH and P in solution in liquid medium were the criteria used for selection. As for the in vitro manipulation, fungi showed greater stability to preserve their ability to solubilize P. Subsequently, two trials were conducted in greenhouse using Andisol soil and rice as an indicator plant. In the first trial, the best microorganisms evaluated in vitro were compared, namely *Aspergillus flavus*, *Pseudomonas fragi*, *Pichia anomala* and an absolute control. Plants were harvested at 100 days, the treatment with *A. flavus* increased dry weight of the root, but the root/stem ratio was less than 1 and the foliar P was not increased (0.13%). However, in the soil of the *A. flavus* treatment, population of solubilizers was increased 100-fold

1 Parte de los datos mostrados pertenecen a la tesis de grado en Agronomía, bajo el marco del proyecto VI-UCR-733-B3-094.

2 Autora para correspondencia. Correo electrónico: leida.castro@ucr.ac.cr

* Laboratorio de Microbiología Agrícola, Centro de Investigaciones Agronómicas, UCR.

probablemente debido a que el P en la solución del suelo no aumentó lo suficiente por la propiedad de los Andisoles de retener el elemento. Debido a la ineffectividad de la bacteria y levadura evaluadas, en el segundo ensayo, se trató de incrementar la cantidad de P foliar inoculando de manera individual los siguientes hongos: *Aspergillus flavus*, *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma longibrachiatum*, junto con roca fosfórica (RF). Con la adición de RF, los hongos inoculados incrementaron el peso fresco radical hasta en 131%, la relación R/T en fresco mostró valores superiores a 1 y se incrementó la concentración del P foliar hasta en 13% respecto al testigo con RF.

and soluble P rose by 2.67 mg.l⁻¹ over the control without plants showing any benefit, probably because P in the soil solution did not increase enough due the property of Andisols to retain this element. Due to the ineffectiveness of bacteria and yeast evaluated, in the second trial, an attempt was made to increase the amount of foliar P by individually inoculating the following fungi: *Aspergillus flavus*, *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma longibrachiatum*, together with phosphate rock (RF). With the addition of RF, the inoculated fungi increased root fresh weight up to 131%, the R/T ratio in fresh showed values higher than 1 and the foliar P concentration increased by 13% compared to the control with RF.

INTRODUCCIÓN

La agricultura es el producto de una red compleja de interacciones dinámicas entre factores abióticos y bióticos, como aquellas establecidas entre tipos de suelo, microorganismos y plantas. Esta organización ecosistémica en completo acoplamiento estructural ha sido soslayada por el sistema agroindustrial, cuya técnica ha promovido un uso insostenible de los recursos naturales (Giraldo 2015); este es el caso para el recurso fósforo (P), que es un nutriente limitante en más del 30% de los suelos cultivables del mundo y cuyas fuentes de acceso conocidas están siendo consumidas a una velocidad que probablemente generará escasez dentro de pocos años (Raghotama 1999, Vance *et al.* 2003, Fernández y González 2014).

Por otro lado, los Andisoles han sido reconocidos desde la década de los sesentas como un orden de suelos en los que la retención de P es de las más elevadas (Fassbender 1969, Andriessse y Muller 1973). Para el caso de los Andisoles de Costa Rica, el 74% de las muestras analizadas presentan deficiencias de P disponible (Bertsch 1995), debido a la alta retención, que en algunas ocasiones puede llegar fácilmente a 92%

(Henríquez 2005). Aunque en Costa Rica los Andisoles no son tan abundantes, ya que abarcan el 16% del área nacional (Mata *et al.* 2013), son importantes porque sobre ellos se producen la ganadería de leche de altura, las hortalizas de consumo nacional y algunos cultivos de exportación como café, caña de azúcar, hortalizas, flores, helechos y fresas. La retención de P en estos suelos es relevante, en el tanto en que su disponibilidad es baja, a pesar de que en términos de P total su contenido es de los más altos en suelos tropicales. Particularmente en Costa Rica, el contenido de P total en Andisoles puede oscilar entre 800 y 5500 mg.l⁻¹, sin embargo, el P disponible está entre 6 y 161 mg.l⁻¹ (Soto 1998). Alvarado *et al.* (2009) mencionan algunos de los hallazgos obtenidos en investigaciones realizadas para mejorar la disponibilidad de P en diversos cultivos, donde se propone emplear fertilizantes de granulometría grande, localizar el fertilizante en vez de aplicarlo al voleo, adicionar Si y cal, dosificar el fertilizante de manera sincronizada con el crecimiento del cultivo, entre otros. En el presente trabajo se considera el empleo de microorganismos solubilizadores de P como posibilidad para mejorar su disponibilidad, reducir

costos y producir alimentos de una manera mejor acoplada con el ecosistema (Giraldo 2015).

Según Alvarado *et al.* (2014), la mayoría de los Andisoles de Costa Rica presentan una mineralogía de arcillas de bajo grado de cristalización (anteriormente conocidas como amorfas o alófanas) las cuales forman complejos organominerales difíciles de descomponer; la retención de P en este orden de suelos se relaciona con la clasificación de los mismos (Vitrandis < Ustandis < Udands < Aquands) y variables químicas como el Al amorfo y el pH (Canessa *et al.* 1987). Por lo anterior, es considerado que el P se liga con los complejos organominerales o precipita con el hierro y el aluminio, lo que hace que la disponibilidad de este elemento para las plantas sea baja (Bertsch 1995, Alvarado *et al.* 2009).

Aunque las plantas requieren fósforo en cantidades muy bajas, este elemento presenta una alta limitación para la producción, debido a su baja disponibilidad (Sanzano 2013). El P brinda calidad y precocidad a los frutos, se encuentra tanto en tejidos jóvenes como en aquellos de mayor edad fisiológica, así como en órganos de reserva. Dentro de sus funciones está el acumular energía y combustible para todas las actividades metabólicas, ya que forma parte del adenosín trifosfato (ATP) (Sanzano 2013, Fallas 2013).

Los microorganismos ejercen un importante rol sobre los tres principales componentes del ciclo de P en el suelo: disolución-precipitación, sorción-desorción y mineralización-inmovilización; debido a ello tienen un papel determinante para la disponibilidad de este elemento para las plantas (Richardson *et al.* 2009, Kucey 1987, Whitelaw 1999, Cepeda *et al.* 2005). Entre los microorganismos del suelo, los más conocidos por su efecto sobre la solubilización de P, son aquellos géneros de hongos reconocidos como micorrizas (Richardson *et al.* 2009), sin embargo, una gran diversidad de microorganismos cuentan con esta habilidad. Los microorganismos pueden incrementar la capacidad de las plantas para adquirir P del suelo, a través de varios mecanismos tales como: 1-Aumento del crecimiento radical, debido a la promoción de asociaciones radicales existentes

como las micorrizas, o por estimulación hormonal que provoque aumento en las ramificaciones radicales y/o aumento en la cantidad de pelos radicales; 2-Alteraciones en el equilibrio de sorción-desorción de P, que incrementen la transferencia neta de iones de ortofosfato dentro de la solución del suelo o que faciliten la movilidad de P orgánico a través del ciclaje microbiano; y 3-Inducción de procesos metabólicos que solubilizan y mineralizan P de formas poco disponibles, como el flujo de protones y aniones orgánicos, la producción de sideróforos y la liberación de enzimas fosfatasas y celulolíticas, necesarias para la hidrólisis de P orgánico o la mineralización de la materia orgánica (Richardson y Simpson 2011, Jones y Oburger 2011).

Uno de los mecanismos más conocidos de solubilización del fosfato del suelo es la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular por parte de los microorganismos. Estos emplean 3 estrategias para movilizar el P del suelo, la acidificación, la liberación de aniones orgánicos ácidos (citrato, oxalato, gluconato entre otros) y la liberación de fosfatasas y fitasas. La capacidad de los ácidos orgánicos para aumentar la disponibilidad de P se debe a la acidificación en la rizósfera, a su capacidad de formar complejos estables con el aluminio y el hierro, y a otros mecanismos aún no muy bien entendidos (Paredes y Espinosa 2010, Jones y Oburger 2011, de Oliveira *et al.* 2014).

Los microorganismos solubilizadores de fósforo son una importante e interesante alternativa para el suplemento de este elemento a las plantas, ya sea al promover la utilización del fósforo, que se encuentra en el suelo, o el que es adicionado (Cracogna *et al.* 2003, López *et al.* 2008, Bhattacharyya *et al.* 2016). Estos microorganismos tienen el potencial de promover una utilización y reciclaje eficiente de este y otros nutrientes, además su uso representa un esfuerzo en la búsqueda de técnicas agrícolas sostenibles que se acoplen a la organización ecosistémica (Giraldo 2015), por lo que son a la vez viables ecológica y económicamente.

Debido a esto, el presente trabajo se realizó con el objetivo de desarrollar una metodología para aislar y evaluar microorganismos capaces

de solubilizar fósforo a partir de formas poco disponibles para la planta, como las formas encontradas en los Andisoles y en enmiendas como la roca fosfórica.

MATERIALES Y MÉTODOS

El suelo utilizado en el estudio fue tomado en la localidad de Rancho Redondo (9°57'41" N; 83°57'01" W) y corresponde a un Andisol con alta fijación de P (Cuadro 1), como también lo mencionan varios autores (Alvarado *et al.* 2009, Fallas 2013, Mata *et al.* 2013). En el

presente trabajo se utilizó para el aislamiento de los microorganismos, una muestra compuesta tomada de 1000 m² de una zona boscosa (10 sitios), de los primeros 5 centímetros de mantillo en donde se eliminó la hojarasca superficial y para utilizar en los ensayos en invernadero, suelo de pastizal de la misma localidad. Las muestras de suelo se trasladaron al Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica (CIA/UCR), donde se realizaron los aislamientos de aquellos microorganismos identificados como solubilizadores de fósforo.

Cuadro 1. Análisis químico del suelo del distrito de Rancho Redondo ubicado en el cantón Goicoechea y utilizado para el ensayo en invernadero.

pH H ₂ O	P disponible mg.l ⁻¹	P total mg.l ⁻¹	%		Relación C/N
			C	N	
5,3	6	900	3	0,31	9,7

Fósforo disponible determinado mediante Olsen modificado y valorado por Colorimetría con el Analizador de Inyección de Flujo (FIA); Fósforo total determinado mediante digestión húmeda con HNO₃ y determinación por Espectrometría de Emisión Atómica con Plasma (ICP); el % C y N totales se determinaron con el Autoanalizador de C/N por combustión seca.

Aislamiento de microorganismos solubilizadores de fósforo: con el fin de promover la multiplicación de los microorganismos (Castro *et al.* 2015) se incubó 500 ml de la muestra con 250 ml de semolina y 50 ml de melaza a un nivel de humedad adecuado. El material se dividió en 2 botellas de 1 L cerradas y con una salida para el gas, producto de la respiración de los microorganismos y se dejaron reposar en oscuridad por un período de un mes (Figura 1). Después de la incubación del material sólido, se tomaron 20 g del contenido de cada una de las botellas y se mezclaron con 500 ml de agua sin cloro y 18,4 ml de melaza, y se dejaron en oscuridad durante 12 días. Luego se procedió a aislar tanto del componente sólido como del líquido, los microorganismos con capacidad

solubilizadora de P, para lo que se utilizó el medio del cultivo Osorio y Habte (2001) al cual se le adicionó roca fosfórica con un tamaño de partícula entre 90 y 500 μm y utilizando la metodología de diluciones seriadas (Lorch 1995). A partir del día 2 se aislaron las colonias que mostraron habilidad para solubilizar P, las cuales se identificaron por la producción de un halo amarillo (Figura 2A) como consecuencia de un cambio en el pH (Kim *et al.* 1997, Osorio y Habte 2001), ya que el verde de bromocresol es color azul a pH mayor a 5,4 y cambia a amarillo por debajo de este valor. Seguidamente, se realizaron los aislamientos necesarios para obtener colonias de microorganismos puros y monitorear que conservaran su habilidad solubilizadora (Figura 2B).



Fig. 1. Incubación del mantillo de bosque.

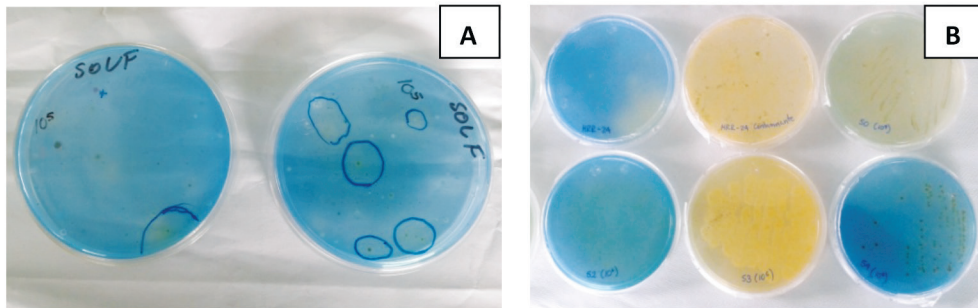


Fig. 2. Microorganismos aislados del suelo Andisol elegido.
 A) Selección de microorganismos por medio de la aparición de halo color amarillo.
 B) Re aislamiento y purificación de los microorganismos con esta capacidad.

Pruebas de solubilización de fósforo in vitro: del material aislado se utilizaron cepas de 8 hongos, 6 levaduras y 5 bacterias. En el caso de los hongos, las cepas se colocaron en placas petri con el medio propuesto por Osorio y Habte (2001), se consideraron 4 partes iguales separadas imaginariamente por líneas perpendiculares en su centro, de donde se retiró una porción circular de medio, para colocar una porción circular de

igual tamaño con el hongo de interés (Figura 3). Para cada hongo se midió, en 4 platos (repeticiones), la formación de halo y el viraje a color amarillo del medio durante una semana, los platos se dejaron en incubación a 25°C y se evaluaron a los 3 y 5 días, momento en que se realizaron las mediciones del radio del halo de solubilización sobre las líneas de los puntos: A-B, C-D de cada plato (Figura 3).

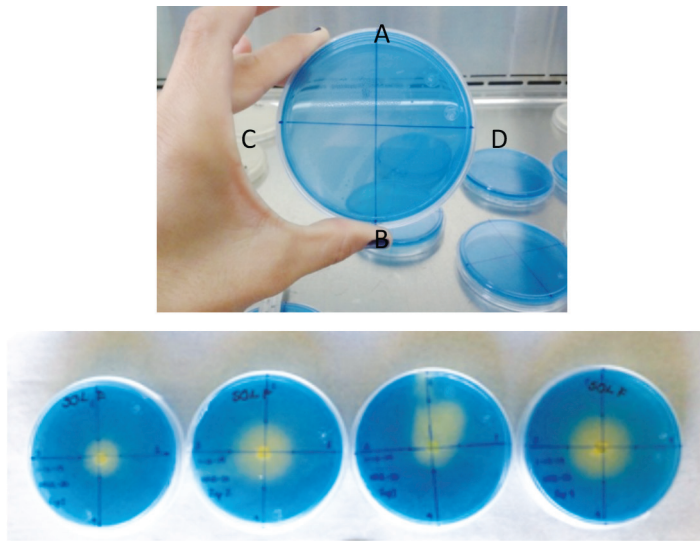


Fig. 3. Evaluación in vitro de la capacidad solubilizadora de P de los hongos.

En el caso de las bacterias y levaduras se utilizó el medio de Osorio y Habte (2001) en medio líquido empleando tubos de ensayo con 9,9 ml del medio y a cada tubo se le agregó 100 μ L del caldo microbiano preparado en solución salina al 0,85% con una turbidez de 10^8 , según el estándar de turbidez McFarland y se realizaron 3 repeticiones por cada bacteria o levadura. Una vez inoculados los tubos se incubaron a 25°C y a 200 rpm, al cabo de una semana los caldos se filtraron utilizando papel filtro Fisherbrand P8, con retención de partículas mayores a los 20 μ m. A cada una de las repeticiones se le midió el pH y la cantidad de P en solución, por medio de Espectroscopia de Emisión Óptica de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES), los valores se compararon con un testigo, al cual no se le realizó la inoculación de ningún microorganismo. El análisis estadístico se realizó por medio de un ANDEVA y se empleó como separador de medias la prueba de Tukey al 5%. Todas las cepas microbianas se almacenaron en refrigeración y se eligieron los microorganismos H-20 (hongo), L-9 (levadura) y B-19 (bacteria), para ser utilizados en el primer

ensayo en invernadero y las cepas de hongos H-20, H-23, H-25 y H-29 para el segundo ensayo.

Identificación de los microorganismos:

todos los microorganismos utilizados en los ensayos de invernadero fueron caracterizados por observación microscópica (100x) e identificados en el Laboratorio de Técnicas Moleculares del Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos (CIPROC), utilizando el Gen Bank-NCBI (BLAST) como referencia.

Pruebas en invernadero: todos los ensayos se realizaron en los invernaderos del Centro de Investigaciones Agronómicas durante el transcurso del 2015 y 2016, donde se elaboraron también los almácigos de arroz Palmar 18 en bandejas de 200 celdas, con una mezcla de 75% del suelo Andisol de Rancho Redondo y 25% de peatmoss (Figura 4), con el fin de mejorar el drenaje y la aireación del sustrato. Trece días después de la siembra, las plantas fueron trasplantadas a celdas de 200 cc de capacidad, las cuales se llenaron con el suelo de Rancho Redondo (Figura 4).

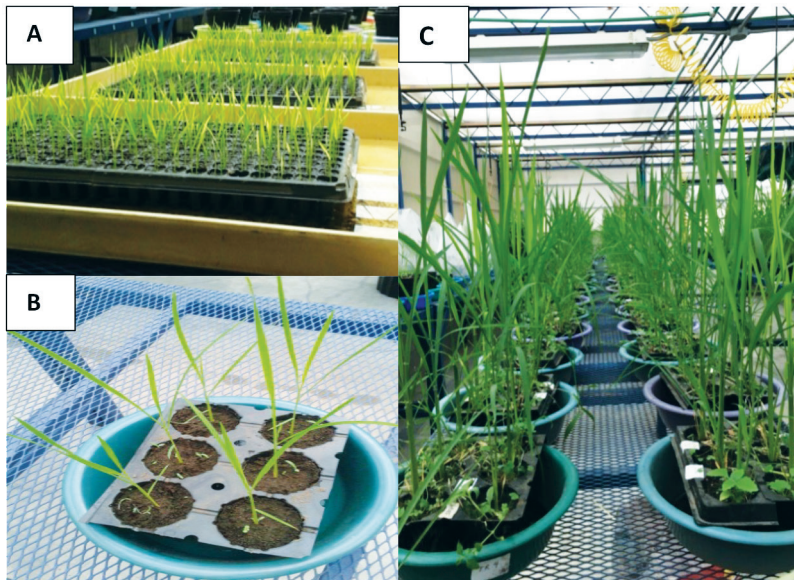


Fig. 4. A) Siembra de almácigo de arroz Palmar 18 y B) su posterior trasplante a celdas de 200cc para conformar las repeticiones. C) Vista general del ensayo.

Evaluación de las cepas H-20, B-19 y L-9

Diseño experimental: en el primer ensayo se utilizó un diseño experimental irrestricto al azar, con previa aleatorización de los 4 tratamientos conformados por 4 repeticiones. Cada repetición contó con 12 plantas, divididas en 2 bandejas con 6 plantas cada una (Figura 4), se mantuvo el suelo a capacidad de campo. Los 2 recipientes por repetición conformaron la unidad experimental. Los tratamientos evaluados fueron: Testigo absoluto, donde no se aplica ninguna inoculación (T), Hongo solubilizador de fósforo (*Aspergillus flavus* H-20), Bacteria solubilizadora de fósforo (*Pseudomonas fragi* B-19), Levadura solubilizadora de fósforo (*Pichia anomala* L-9).

Inoculaciones: las inoculaciones de los microorganismos se realizaron un día después del trasplante, a los 14 días después de la siembra (dds), a los 22 (36 dds) y 44 días (57 dds) después del trasplante. Para la primera inoculación, se aplicaron 2 ml del caldo de microorganismos

(según el tratamiento) por planta, y para la segunda y tercera inoculación se aplicaron 5ml por cada planta. Los microorganismos escogidos se cultivaron en medio agar nutritivo (bacterias y levaduras) y agar papa dextrosa (hongos) una semana antes de realizar la inoculación. El día de la aplicación, se agregaron aproximadamente 4 ml de agua estéril a los platos donde crecían los microorganismos y con un aplicador se suspendió todo el crecimiento de los mismos; el caldo resultante (caldo microbiano) se pasó a botellas plásticas, las cuales contenían agua estéril. De las mismas se tomaron los volúmenes necesarios para hacer las inoculaciones de los microorganismos según los tratamientos. Para cada suspensión se determinó la concentración en que cada microorganismo fue inoculado y siempre fueron mayores a 1×10^8 ufc.ml⁻¹.

Toma de datos: a los 102 días después de la siembra, se realizó la cosecha de la plantas y las evaluaciones de las variables, peso fresco

y seco de raíz, y parte aérea, índice raíz/tallo y contenido de P y N foliar.

Población de microorganismos solubilizadores de P y determinación del P soluble en el suelo: para la determinación de P en solución (Espectroscopia de Emisión Óptica de Plasma Acoplado Inductivamente) y la población de solubilizadores de P se tomó y analizó, 3 meses después de la cosecha, una muestra del suelo de cada una de las repeticiones de cada tratamiento. La población de solubilizadores de P se determinó utilizando la técnica de NMP (Lorch *et al.* 1995) en el medio de Osorio y Habte (2001), según una metodología propuesta por la

co-autora de este documento Castro L. (LMA-CIA 2015) para esta investigación, validada y utilizada en el Laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas. Para tal fin, se colocaron de 4 diluciones conocidas (una para cada placa petri), 10 μ l en 3 puntos equidistantes de una placa petri que contenía el medio. Las placas se incubaron a 25°C y se revisaron por 6 días para observar los cambios de color de azul a amarillo, al aparecer el color amarillo, los puntos se marcaron con una equis; al finalizar los 6 días, las observaciones se consultaron en una tabla de NMP de 3 observaciones, para así determinar la población presente (Figura 5).

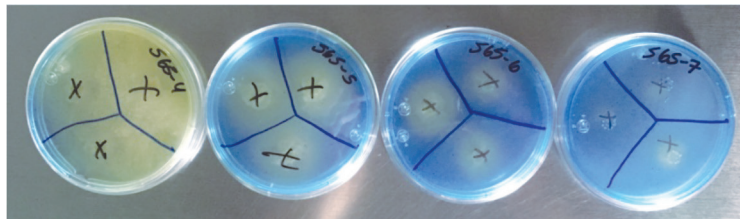


Fig. 5. Determinación del NMP de solubilizadores de P.

Una vez realizada la toma de datos de todas las variables evaluadas, se procedió a realizar el análisis estadístico por medio del análisis ANDEVA. Para la separación de medias se utilizó una prueba de Tukey al 5%.

Evaluación de las cepas H20, H23, H25 y H29 en presencia de roca fosfórica

Utilizando la misma metodología del ensayo descrito anteriormente, se evaluaron los tratamientos: Testigo absoluto, donde no se realizó inoculación ni aplicación de RF (T), Testigo con roca fosfórica (TRF), hongo H-20 (*Aspergillus flavus*) y roca fosfórica (H20RF), hongo H-23 (*Cladosporium* sp) y roca fosfórica (H23RF),

hongo H-25 (*Penicillium* sp) y roca fosfórica (H25RF), hongo H-29 (*Trichoderma longibrachiatum*) y roca fosfórica (H29RF). La dosis de roca fosfórica (32% P_2O_5), para los tratamientos que lo requerían, fue de 0,9 g de RF planta⁻¹ y se aplicó N a razón de 100 kg.ha⁻¹ al estimar una densidad de siembra de 200 plantas m². Se utilizó un diseño experimental irrestricto al azar, con previa aleatorización de los tratamientos y a los 95 días se realizaron las evaluaciones de las variables: peso fresco y seco de raíz y parte aérea, índice raíz/tallo y contenido de N y P foliar. Los datos se analizaron por medio del ANDEVA y, para la separación de medias, se utilizó la prueba de Tukey al 5%. Para la separación de medias del análisis químico foliar (N y P), se utilizó la

prueba de LSD Fisher al 5%, la cual permitió una mejor separación de medias.

Se realizó un ensayo preliminar a este, para evaluar el posible efecto de la fertilización nitrogenada ($100 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ a razón de 200 plantas m^2), sobre la absorción de P. Se evaluaron 4 tratamientos, con 4 repeticiones: control con N, control sin N, inoculación de *A. flavus* e inoculación de *A. flavus* más fertilización nitrogenada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de los microorganismos

Del mantillo de bosque se aislaron inicialmente in vitro, 54 microorganismos con capacidad de solubilizar P, capacidad evidenciada mediante el cambio de color de azul a amarillo del medio utilizado (Figura 2). Bernal (2010) utilizó el mismo medio de cultivo para la selección de microorganismos solubilizadores de P en raíces de plantas de vainilla y propone que aquellas colonias que exhiben un cambio de azul a amarillo a su alrededor, lo hacen debido a la producción de ácidos orgánicos con capacidad de solubilizar P, en el presente caso de solubilizar la roca fosfórica adicionada al medio de cultivo. De los 54 microorganismos identificados inicialmente, se redujeron a 19, ya que muchos de ellos perdieron su capacidad de solubilizar P con los pasajes sucesivos y el almacenamiento en condiciones de refrigeración, lo que coincide con los hallazgos de Sperber (1958), quien menciona que muchas de las bacterias solubilizadoras de fosfatos pierden esta capacidad con el cultivo en serie, y de Kucey (1983) señala que los hongos solubilizadores de P preservan mejor y por algunos años su actividad después del cultivo. En el Cuadro 2 se muestran los aislamientos de 8 hongos, 6 levaduras y 5 bacterias, microorganismos estables aislados del suelo de Rancho Redondo y con capacidad de solubilizar fósforo.

Cuadro 2. Microorganismos aislados de un suelo Andisol, con capacidad solubilizadora de fósforo (P).

Lista de Microorganismos Seleccionados		
ID Hongos	ID Levaduras	ID Bacterias
HRR-14	LRR-8	BRR-18
HRR-18	LRR-9	BRR-19
HRR-19	LRR-11	BRR-50
HRR-20	LRR-21	BRR-52
HRR-25	LRR-22	BRR-55
HRR-29	LRR-51	
HRR-31		
HRR-23		

Pruebas de solubilización de P in vitro

La capacidad de solubilizar P de los hongos se evaluó en medio líquido sin que produjeran cambio de color, ni de pH en el medio de cultivo. Por esta razón, se optó por la evaluación del halo de solubilización en medio sólido y no se encontraron diferencias significativas entre ellos (Cuadro 3, Figura 3), todas mostraron la misma habilidad.

Cuadro 3. Crecimiento de halo de solubilización de hongos en prueba in vitro.

ID Hongo	1° evaluación 3er día Radio (mm)	2° evaluación 5to día Radio (mm)
HRR-29	9,63	32,08
HRR-31	15,69	31,81
HRR-14	14,56	21,25
HRR-23	18,50	29,88
HRR-25	8,38	30,13
HRR-18	8,44	28,81
HRR-19	9,56	26,19
HRR-20	16,19	32,44

La solubilización de fosfatos por microorganismos depende de su capacidad solubilizadora, los ácidos orgánicos que producen, el tipo de compuesto fosfatado sobre el que actúan y la fuente de C y N que utilicen para el medio de cultivo (Barroso y Nahas 2005, Pradham y Sukla 2005, Souchie *et al.* 2006, Richardson y Simpson 2011). En el caso de los hongos la producción de los ácidos cítrico, oxálico, málico y glucónico se relaciona con la solubilización de complejos insolubles de P en el suelo (Alam *et al.* 2002, Chun-Chao *et al.* 2007, Dighton 2007, Gómez-Guiñán y Zabala 2001, Prahm y Sukla 2005). Hernández *et al.* (2011), tampoco hallaron diferencias significativas del halo de solubilización en medio Pikovskaya-agar modificado, en pruebas in vitro con *Paecilomyces lilacinus*, cuando utilizaron fuentes de fosfato de calcio y fosfatos de hierro en el sustrato. Nahas (2007) menciona que la producción de las sustancias implicadas en la solubilización de P, requiere la

absorción de nutrientes por parte de los microorganismos, razón por la cual la fuente de C, N y P que se utilicen en el medio de cultivo, influyen notablemente sobre la solubilización y el crecimiento de los hongos.

En las pruebas in vitro para las bacterias y levaduras se utilizó el medio líquido de Osorio y Habte (2001), en el cual se observaron los cambios en la coloración, a los 7 días a partir de las inoculaciones (Figura 6). También se determinaron diferencias del pH del medio, causadas por los microorganismos con respecto al testigo, sobre todo en el caso de las levaduras (Figura 7). De manera similar, Cordero *et al.* (2008) mencionan una disminución del pH del medio de 7,0 a 4,6 en pruebas con *Pantoea* sp. en medio líquido; los valores de P en solución en el trabajo de Cordero *et al.* (2008) fue de $1128 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, valores más elevados que los incrementos de 38 y $510 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ P en medio líquido mencionados al utilizar *Enterobacter absuriae* (Gyaneshwar *et al.* 1999).

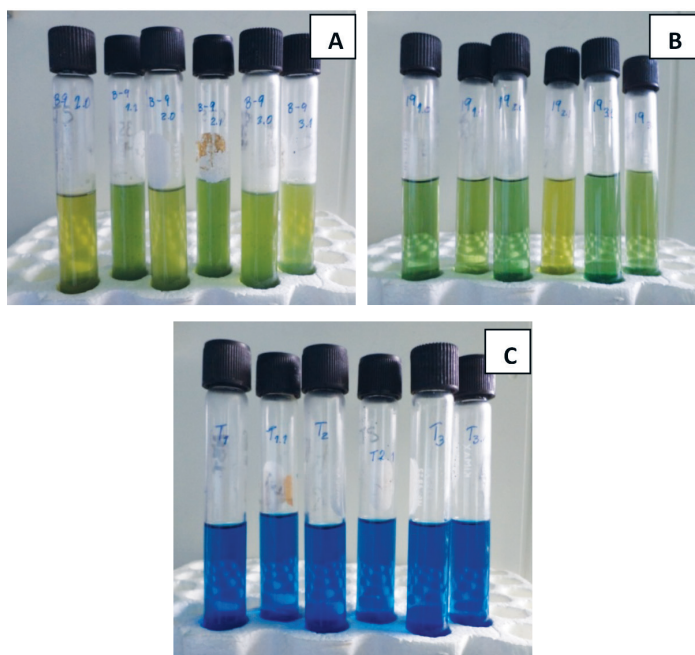


Fig. 6. Pruebas de solubilización de P para bacterias y levaduras, a los 7 días después de la inoculación en condiciones de 27°C de temperatura y 200rpm de agitación. A) Levadura L-9, B) Bacteria B-19 y C) Testigo.

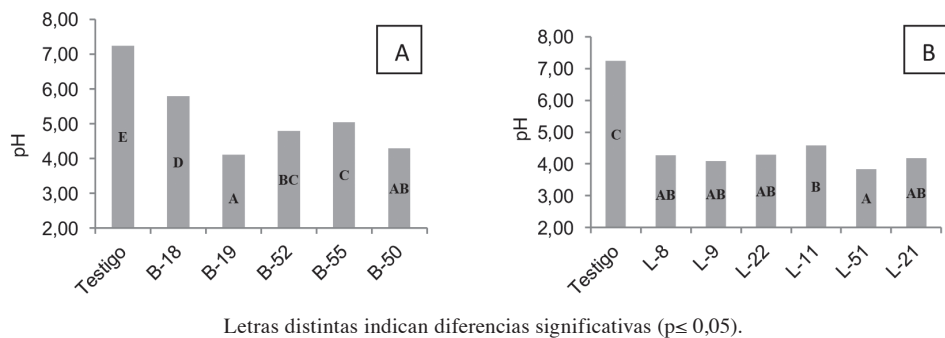


Fig. 7. pH del medio en las pruebas de solubilización de las bacterias (A) y levaduras (B) evaluadas in vitro, a los 7 días después de la inoculación.

En la presente investigación, el pH del medio disminuyó de 7,2 en el testigo, a 4,1 en el caso de la bacteria B-19 (Figura 7) y en el caso de la levadura L-51, se encontró la mayor reducción del pH con un valor de 3,8 (Figura 7). Los contenidos de P en solución más elevados se observaron con la bacteria B-19 (3,8 mg.l^{-1} P) en concordancia con los valores de pH más bajos que se obtuvieron. La levadura L-9 presentó una solubilización de P más alta

(17,4 mg.l^{-1} P) que la de las bacterias (Figura 8), sin que se diera una relación tan directa con el pH (Figura 7). Aunque las levaduras in vitro presentan una mayor solubilización de P con respecto a las bacterias, es necesario mencionar que estos microorganismos perdieron rápidamente su habilidad como solubilizadores bajo condiciones de almacenaje en el laboratorio, lo que limita sus posibilidades para ser utilizadas como posibles inoculantes.

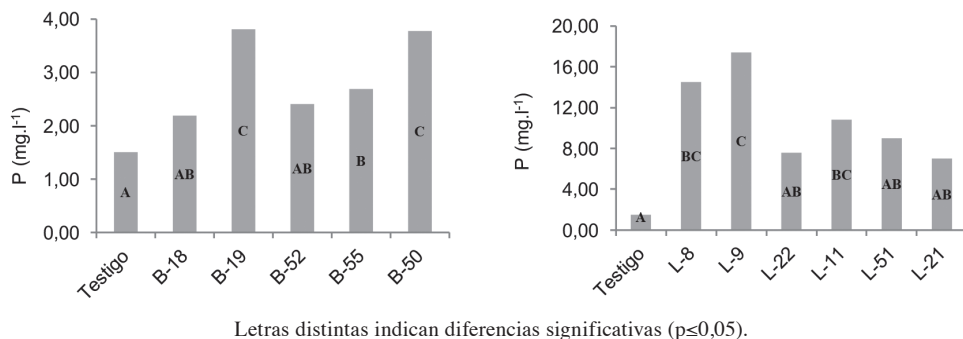


Fig. 8. Concentración de fósforo en solución para las pruebas de solubilización de bacterias y levaduras evaluadas in vitro, a los 7 días después de la inoculación.

Evaluación de microorganismos solubilizadores de fósforo a nivel de invernadero

Primer ensayo

Los cepas microbianas (Figura 9), utilizadas en esta prueba, se clasificaron de la siguiente

manera, en el caso de la bacteria B-19 se obtuvo un 99% de correspondencia con *Pseudomonas fragi* (Figura 9A), el caso de la levadura L-9 como *Wickerhamomyces anomalus*, también conocida como *Pichia anomala* o *Hansenula anómala*, con un 99% de correspondencia con patrones internacionales (Figura 9B) para el hongo H-20 se obtuvo 100% de similitud con *Aspergillus flavus*

(Figura 9C), para H-25 un 99% de similitud con *Penicillium* sp (Figura 9D), para H-29 un 100% de correspondencia con *Trichoderma longibrachiatum* (Figura 9E) y para H-23 un 100% de correspondencia con *Cladosporium* sp (Figura 9F). El género *Aspergillus* se considera uno de los más importantes en cuanto a la solubilización de P en el suelo (Motsara *et al.* 1995); como corroboran Rashid *et al.* (2004) en un ensayo para determinar la capacidad de producción de ácidos

orgánicos y la solubilización de fosfatos, en condiciones in vitro, de diez cepas bacterianas y de los hongos *A. flavus* (1RF), *Penicillium canescens* (4RF) y *Aspergillus niger* (8RF); se encontró que todos los microorganismos produjeron ácidos glucónico, fumárico, succínico, acético y otros ácidos en cantidades pequeñas, mientras que *A. flavus* produjo cantidades mayores de ácidos en comparación a las otras cepas de hongos, en particular de ácido oxálico y cítrico.

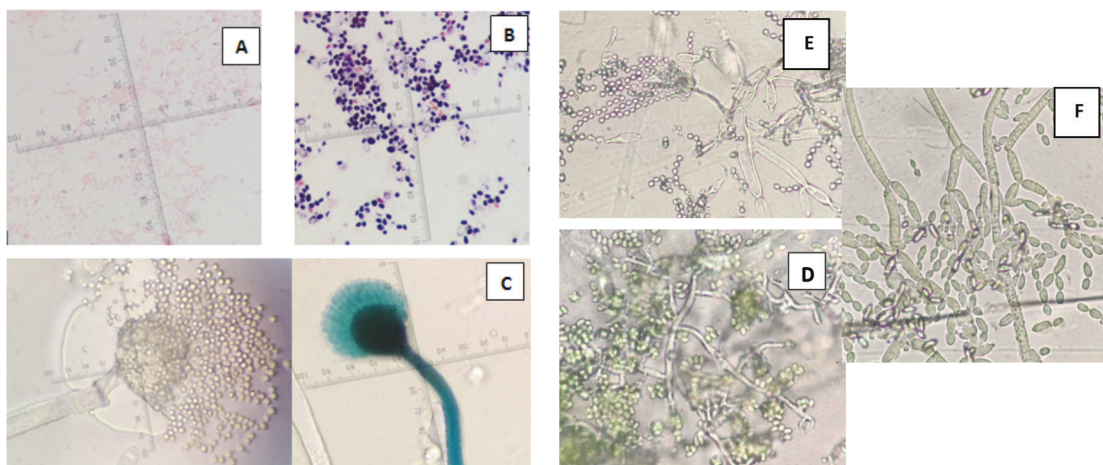


Fig. 9. Tinción de Gram y observación microscópica realizada a los microorganismos seleccionados para los ensayos en invernadero. A) B-19 (bacteria Gram negativa) y B) L-9 (levadura); C) conidióforo y cabeza aspergilar de H-20 (hongo); D) Conidias y conidióforos de H-25; E) Conidias y conidióforos de H-29; F) Conidias y conidióforos de H-23. Todas las observaciones realizadas por medio de microscopio con aumento de 100x.

Selvakumar *et al.* (2009) reportan la solubilización de P y la promoción en el crecimiento de plantas de trigo en presencia de *Pseudomonas fragi* CS11RH1. Esta bacteria presentó capacidad para producir ácido indolacético (IAA) y cianuro de hidrógeno (HCN). Martin *et al.* (2003), por su parte, reportan en plantas de fresa mayores porcentajes de P en plantas inoculadas con dicha bacteria.

En cuanto a la levadura, *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala* o *Hansenula anomala*), no se tienen reportes de capacidad de solubilización de fosfatos para este organismo, no obstante, Nakamura *et al.* (2000) hacen mención

de esta levadura como un organismo capaz de secretar fitasas.

Yasser *et al.* (2014) reportan el potencial de *Trichoderma longibrachiatum* para solubilizar P, mientras que Singh y Kapoor (1998) indican esta misma característica para *Cladosporium herbarum*.

Variables evaluadas

Peso fresco y seco foliar

No se encontraron diferencias entre los tratamientos al evaluar el peso fresco foliar

(Cuadro 4); en el caso del peso seco aéreo, el tratamiento testigo mostró el mayor valor con 0,92 g, el cual es estadísticamente igual al tratamiento con adición del hongo (0,89 g) y mayor a los tratamientos con levadura y bacteria, los cuales obtuvieron 0,82 g. El peso fresco radical fue mayor para el testigo (1,64 g), mientras que el peso seco radical fue estadísticamente menor para el tratamiento con la aplicación de levadura (0,41 g) e igual para el testigo (0,64 g) y el tratamiento con adición del hongo (0,58 g) y la bacteria (0,46 g) (Cuadro 4). Como se detalla a continuación en otras investigaciones se ha

encontrado un mayor crecimiento de las plantas inoculadas con microorganismos solubilizadores de P en comparación a las no inoculadas; López *et al.* (2008) mencionan aumentos en la altura de planta, largo y ancho de hoja de las plantas de maíz (*Zea mays*) inoculadas con *Bacillus megatherium* var. *Phosphaticum* (solubilizador de P) y *Azotobacter* sp. (fijador de N) en comparación al testigo, y Echeverría (2012) un aumento en el crecimiento aéreo y radical, una mayor absorción de P y N en plantas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) inoculadas con *Pseudomonas fluorescens*.

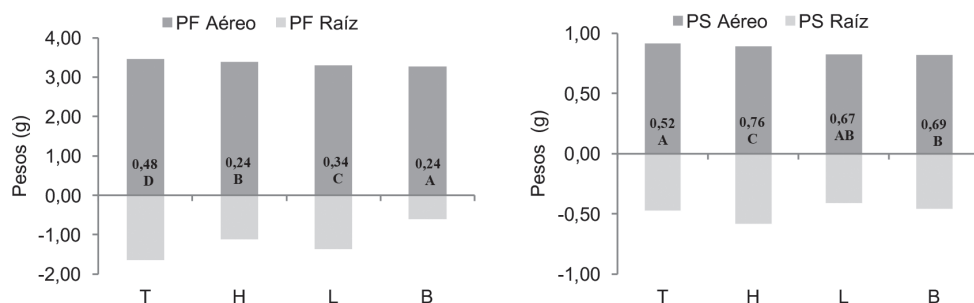
Cuadro 4. Pesos frescos y secos de parte aérea y radical de plantas de arroz a los 102 días después de su siembra, en invernadero.

Tratamiento	Peso Fresco Aéreo (g)	Peso Seco Aéreo (g)	Peso Fresco radical (g)	Peso seco radical (g)
Testigo	3,46	0,92b	1,64d	0,47b
Hongo	3,38	0,89ab	1,12b	0,58b
Levadura	3,29	0,82a	1,37c	0,41ab
Bacteria	3,27	0,82a	0,61a	0,46a

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Al evaluar el índice R/T (peso raíz/peso foliar) en seco, se determinó que esta relación fue mayor en el tratamiento inoculado con el hongo, mientras que en fresco fue mayor en el testigo (Figura 10). Este índice es dependiente de la concentración de nutrientes en el suelo y las condiciones físicas, químicas y microbiológicas que pueden afectar la formación de

raíces y su actividad (Lynch *et al.* 2012), esto varía entre especies y es fuertemente modificado por factores externos. Un importante mecanismo que regula este índice, es el control hormonal de las plantas, debido a que necesitan mantener un “equilibrio funcional” entre la parte aérea y radical (Liu *et al.* 2005, Lynch *et al.* 2012).



Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Fig. 10. Relación de pesos frescos y secos de raíz sobre pesos frescos y secos de parte aérea (Índice raíz/tallo) de plantas de arroz de 102 días después de su siembra, bajo diferentes tratamientos evaluados en invernadero.

Desde el punto de vista nutricional, Pellny *et al.* (2008) mencionan que en caso del N, valores mayores a 1 en índice R/T significan un contenido apropiado del elemento en las plantas, por lo que los resultados encontrados en este ensayo indican valores deficientes de este elemento en todos los tratamientos. Lynch *et al.* (2012), Cakmak *et al.* (2000) y Nigussie *et al.* (2003) mencionan que aquellos suelos con deficiencias nutricionales se correlacionan con un aumento en el crecimiento de raíces de las plantas, y en el caso específico de las deficiencias de P, las plantas incrementan la longitud de raíces y producen raíces más finas, con el fin de aumentar el área superficial radical, y así, mejorar la adquisición de P del suelo.

Los diferentes resultados encontrados en los tratamientos en cuanto a índice R/T seco y fresco (particularmente en el caso del hongo y la bacteria), y en relación con el testigo, constituyen un indicador de que los microorganismos afectan el crecimiento y la producción de materia seca, lo cual concuerda así, con lo reportado por Echeverría (2012), López *et al.* (2008), Martínez-Viera *et al.* (2007) y Zaady y Perevolotsky (1995).

En este caso, el tratamiento con *A. flavus* (H) produjo raíces con menor peso fresco, pero mayor materia seca comparado con el testigo y logró un mejor equilibrio funcional,

de las plantas inoculadas con este microorganismo, respecto a su relación R/T en seco. Estas diferencias, sin embargo, no ocasionaron cambios en el peso fresco y seco aéreo de las plantas (Cuadro 4), posiblemente debido a que las limitaciones nutricionales para el crecimiento normal se mantuvieron.

Fósforo foliar

Ninguno de los tratamientos comparados hizo variar significativamente el contenido foliar de N y P en las plantas de arroz (Cuadro 5). Los contenidos de estos elementos fueron muy bajos comparados a los niveles críticos adecuados en los análisis foliares para esta planta, los cuales van de 2,6% a 4,2% en el caso del N, y de 0,25% a 0,48% en el caso del P (Rodríguez y Frago 1999).

Cuadro 5. Análisis foliar de plantas de arroz a los 102 días después de la siembra, bajo diferentes tratamientos probados en invernadero.

Tratamiento	%	
	N	P
Testigo	0,97	0,13
Hongo	0,99	0,13
Levadura	0,87	0,13
Bacteria	0,91	0,13

Este resultado difiere de otros autores, por ejemplo, Salih *et al.* (1989) mencionan que 2 cepas de *Aspergillus foetidus* y una cepa de *Penicillium* sp. incrementaron el peso de las plantas y la adquisición de P en sorgo. Gaur *et al.* (1980) encontraron incrementos en la adquisición de P en plantas de trigo (*Triticum* spp.) y *Vigna radiata* inoculados con *Pseudomonas striata* y *Aspergillus awamori* junto con la aplicación de roca fosfórica. Kucey (1987, 1983) y Asea *et al.* (1988) mencionan incrementos en el peso de plantas de trigo y los contenidos de P foliar, con la inoculación de *Penicillium bilaii* tanto en experimentos de invernadero como en campo. Sin embargo, López *et al.* (2008) al evaluar el efecto de *Azotobacter* sp. y *Bacillus megatherium* var. *Phosphaticum* (cepa solubilizadora de fósforo) sobre el crecimiento de maíz en un Vertisol y en un Ultisol bajo condiciones de invernadero, encontraron que en el Ultisol el tratamiento que no recibió fertilizante con P, pero que fue inoculado con el solubilizador, las plantas alcanzaron un desarrollo estadísticamente semejante al tratamiento sin los microorganismos, que recibió 100% de la dosis recomendada de fertilizante fosfórico; sin embargo, en el Vertisol no se obtuvo respuesta significativa con el uso de los solubilizadores de P.

Ñústez y Acevedo (2005) tampoco encontraron respuesta a la aplicación de *Penicillium janthinellum* en papa, para las variables de concentración foliar de P en prefloración, materia seca de hojas, tallos y tubérculos en floración, gravedad específica y rendimiento del tubérculo, en un Andisol de Colombia.

Los datos previos son un indicio de que el tipo de suelo tiene un efecto sobre la efectividad de las inoculaciones microbianas, el hecho de que los microorganismos utilizados en este primer ensayo no fueron capaces de promover un aumento en la concentración de P en el tejido foliar bajo las condiciones evaluadas, podría relacionarse a las características propias del suelo en estudio. Como mencionan Osorio y Habte (2013), la adsorción de P inorgánico en suelos volcánicos es muy alta y representa un factor limitante en la

eficiencia de fertilización y en la productividad de las plantas. Los autores indican que en suelos Andisoles, los materiales como la alofana, la ferrihedrita y la goetita son los responsables de la alta adsorción de P.

He *et al.* (2002) encontraron que una bacteria identificada como *Moraxella* sp. fue capaz de desorber P inorgánico de la superficie de la goetita, montmorillonita y la caolinita, no así en la alofana. Osorio y Habte (2013) al trabajar con *Mortierella* sp., organismo conocido como solubilizador de P, en 4 tipos de suelos encontraron que la cantidad de P en solución, según el tipo de material y debido a la inoculación del microorganismo, fue ordenada de la siguiente manera: montmorillonita (1,86-2,33%) > caolinita (3,73-5,45%) > goetita (0,23-0,8%) > alofana (0,001-0,005%). Los autores concluyen que las cantidades liberadas por *Mortierella* sp. de P inorgánico a la solución, dependieron del mineral presente en el suelo y de la cantidad de P inicialmente adsorbido en la superficie de los minerales. Este P liberado a la solución aumenta con el incremento en la cantidad de P inorgánico adsorbido. En este mismo sentido, Do Carmo Harta y Torrent (2007) mencionan que el incremento en la concentración de P inorgánico, en la solución, depende de la fuerza con que el elemento es adsorbido en la superficie del mineral. Esta fuerza decrece conforme incrementa la saturación del elemento en los sitios de adsorción en la superficie del mismo.

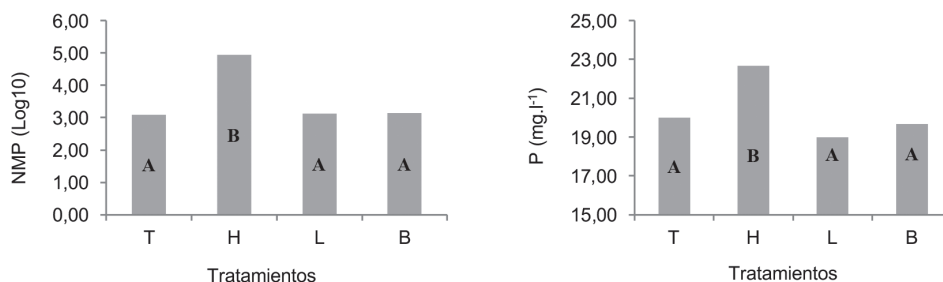
La efectividad de los microorganismos para desorber P inorgánico, por tanto, depende de la capacidad de adsorción del mineral, lo cual deja de manifiesto la relación directa entre el tipo de arcillas presentes y la eficiencia de los microorganismos.

En el presente ensayo se utilizó un Andisol entre los 1400 y los 2000 msnm, lo cual lo ubica en el piso altitudinal medio (régimen údico isotérmico), donde se da una alta retención de P (Alvarado *et al.* 2001). Además, Soto (1998) menciona que en los Andisoles de Costa Rica la cantidad de P total a una profundidad entre 0-0,4m oscila entre 817 y 5460 mg.kg⁻¹.

Debido a lo anterior, se podría deducir que el suelo utilizado tiene un alto potencial de adsorber P, ya que solo presentó un contenido de P total de 900 mg.l⁻¹ (Cuadro 1), por lo que cuenta con una alta capacidad de adsorción. Este hecho afectó la eficiencia de los microorganismos evaluados, lo que los hace poco efectivos en hacer disponible este elemento para las plantas, por lo que se presenta más bien una inmovilización microbiana (Richardson 2009), de esta manera, los tratamientos en los cuales se realizaron inoculaciones, no afectaron las concentraciones foliares de este elemento (Cuadro 5).

Se refuerzan los resultados al realizar el recuento de los microorganismos solubilizadores de P presentes en el suelo 3 meses después de la cosecha, ya que se determinó que la población (NMP) fue casi 100 veces mayor en el tratamiento inoculado con *Aspergillus flavus* (H) en comparación al testigo (T) (Figura 11), población atribuida al efecto del microorganismo inoculado. Por otro lado, la cantidad de P soluble en el suelo fue 2,67 mg.l⁻¹.3 meses⁻¹ mayor en este mismo tratamiento con respecto al Testigo (Figura 11).

Este poco aumento de la concentración del P disponible en el suelo con *A. flavus*, comparado al testigo, puede ser relevante si se considera que, por ejemplo, para la producción de papa en el campo es necesaria la aplicación de al menos 450 kg.ha⁻¹ de P₂O₅, para conseguir un aumento de 2-3 mg.l⁻¹año⁻¹ de P disponible en este tipo de suelo (Alvarado *et al.* 2009), lo cual hace pensar que la aplicación de estos microorganismos podría ser efectiva en estos suelos, si los niveles en la concentración de P logran superar la inmovilización microbiana y la fuerza de adsorción del P en los complejos de arcilla. Jones y Oburger (2011) indican que los microorganismos solubilizadores de P pueden competir con la planta por el P solubilizado. El P en la solución del suelo solo se incrementa cuando el P solubilizado de los minerales del suelo y mineralizado de la materia orgánica o, de la biomasa microbiana, excede el P inmovilizado (incorporado en la biomasa microbiana) y sorbido en los minerales del suelo, es hasta entonces que el P puede ser capturado por las plantas, todo ello en un proceso dinámico.



Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Fig. 11. Población de microorganismos solubilizadores de P y fósforo en solución presentes en el suelo, 3 meses después de la cosecha de las plantas de arroz.

Lo anterior, se consolida con los datos, aportados por Marín (2015), en un estudio realizado en papa en un Andisol de la zona de Zarco con manejo convencional (esto es con altas fertilizaciones químicas y un contenido de P en solución de 376 mg.l⁻¹) y manejo orgánico (con

fertilizaciones orgánicas). En dicho estudio se obtuvo un efecto mayor en el rendimiento de la papa con la adición de microorganismos solubilizadores de P, cuando estos se aplicaron al suelo con manejo convencional, es decir contenidos muy altos de P en solución.

Segundo ensayo

Debido a que las plantas del ensayo anterior presentaron contenidos de N muy bajos, se realizó un ensayo previo antes de ejecutar el segundo ensayo, para evaluar el posible efecto de

la fertilización nitrogenada (100 kg.ha⁻¹ a razón de 200 plantas m²) sobre los contenidos de P foliar. Se encontró que la fertilización nitrogenada aumentó el peso seco foliar de las plantas y el contenido foliar de N y no así el contenido foliar de P (Cuadro 6).

Cuadro 6. Peso seco y contenido de N y P foliar de plantas de arroz con y sin fertilización nitrogenada.

Tratamiento	Peso seco foliar	Contenido foliar de N (%)	Contenido foliar de P (%)
N+	0,69 B	2,49 b	0,14
N-	0,47 A	1,50 a	0,14
<i>A. flavus</i>	0,44 A	1,46 a	0,14
<i>A. flavus</i> +N	0,64 B	2,57 b	0,14

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Una vez descartado el efecto de la fertilización nitrogenada sobre los contenidos de P foliar y al considerar la mayor estabilidad de los hongos para conservar su capacidad solubilizadora, se procedió a evaluar el efecto de la inoculación con 4 hongos con la aplicación de roca fosfórica (RF). En este caso se encontró que el peso fresco y seco foliar fue estadísticamente igual para todos los tratamientos, incluso el testigo (Cuadro 7). Para la variable peso fresco radical, la prueba testigo presentó el menor valor (Cuadro 7) y fue estadísticamente igual al testigo con RF; el procedimiento con el hongo H-29 presentó valores mayores al

testigo y los tratamientos inoculados con los hongos H-20, H-23 y H-25 presentaron pesos frescos radicales mayores que el testigo con RF hasta en el orden de 131%. Por otro lado el peso seco radical no mostró diferencias entre los tratamientos (Cuadro 7). La aplicación de RF por sí misma fue insuficiente para afectar el crecimiento de las raíces de las plantas, pero su adición con cualquiera de los microorganismos provocó un aumento en el peso fresco de las raíces debido a la acumulación de agua en los tejidos radicales (lo cual le permitió un mayor volumen de la raíz) y no al aumento de la masa radical (peso seco).

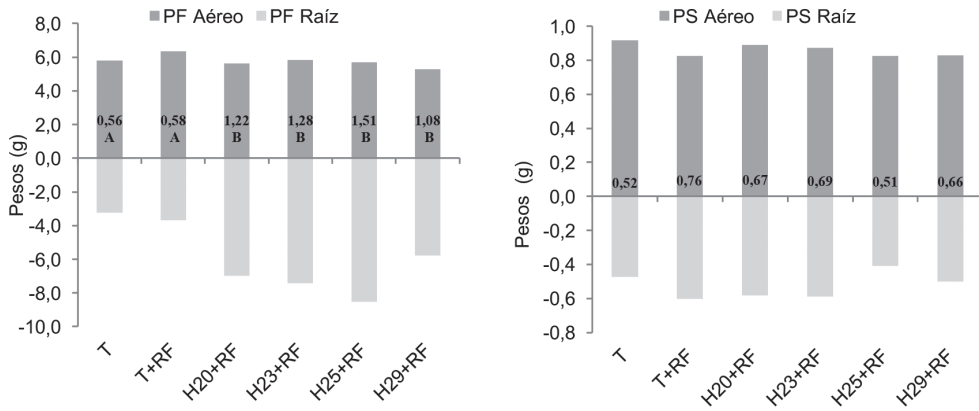
Cuadro 7. Peso fresco y seco, foliar y radical de plantas de arroz sometidas a la inoculación con 4 hongos solubilizadores de P y aplicación de roca fosfórica.

Tratamiento	Peso fresco foliar (g)	Peso seco foliar (g)	Peso fresco radical (g)	Peso seco radical (g)
T	5,80	1,54	3,25 A	0,86
T+RF	6,35	1,75	3,69 AB	0,79
HRR20	5,63	1,49	6,85 CD	0,80
HRR23	5,85	1,57	7,42 CD	0,83
HRR25	5,69	1,50	8,53 D	0,83
HRR29	5,29	1,43	5,76 BC	0,66

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

La relación R/T (Figura 12) en fresco fue menor que 1 y estadísticamente igual para los tratamientos T (0,56) y T+RF (0,58), mientras que para los inoculados con roca fosfórica y los 4 hongos, fueron mayores a 1 y estadísticamente superiores a

los tratamientos T y T+RF. La relación R/T en seco no mostró diferencias entre los ensayos. Un dato significativo es que el valor de R/T seco obtenido, en este caso para el tratamiento testigo, fue idéntico al obtenido para el testigo del primer ensayo.

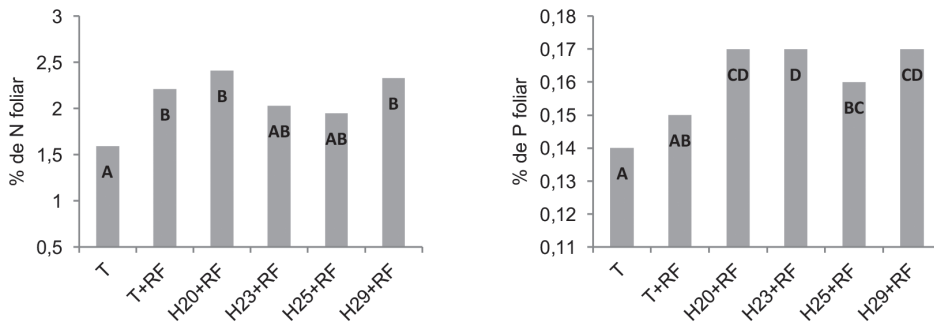


Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Fig. 12. Relación de pesos frescos y secos de raíz sobre pesos frescos y secos de parte aérea (Índice raíz/tallo) de plantas de arroz de 102 días después de su siembra, bajo diferentes tratamientos evaluados en invernadero.

Al analizar las concentraciones de N y P foliar (Figura 13) se determinó que la aplicación de RF permitió que se incrementaran los contenidos de N foliar, mientras la adición de RF no fue suficiente para aumentar los contenidos de P foliar de manera significativa. Pero

cuando el suelo se inoculó con los hongos y se adicionó también RF, la concentración de P foliar se incrementó hasta en un 13% sobre el tratamiento al que se le aplicó solo RF (Figura 13) y en un 21% si se compara con el testigo sin RF.



Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Fig. 13. Contenido de N y P foliar de plantas de arroz de 102 días después de su siembra, inoculadas 4 hongos solubilizadores de P y aplicación de roca fosfórica.

Se concluye que la metodología utilizada, para la evaluación de las cepas a nivel *in vitro* e invernadero, es apropiada para la identificación de microorganismos potenciales solubilizadores de P. Los microorganismos así seleccionados pueden ser utilizados para mejorar el aprovechamiento de la aplicación de enmiendas fosfóricas en diversos suelos, y en el caso específico de los Andisoles, del fósforo presente en suelos con altas fertilizaciones fosfóricas previas (de Oliveira *et al.* 2014); es decir, mayores cantidades de fósforo adsorbido, donde las fuerzas de retención del elemento sean menores y por lo tanto, la liberación del elemento se facilite y se superen los límites de inmovilización microbiana. Para la presente investigación los hongos *Aspergillus flavus* (H-20), *Cladosporium* sp (H-23) y *Trichoderma longibrachiatum* (H-29) mostraron potencial para ser considerados como posibles inoculantes microbianos para incrementar la eficiencia en el uso de P en sistemas agrícolas sostenibles (Kaur y Reddy 2015), lo cual abre la posibilidad de utilizar estos microorganismos en diversos suelos y condiciones.

AGRADECIMIENTOS

Al personal de los Laboratorios de Suelos y Foliares y Microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas y al Laboratorio de Técnicas Moleculares del Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos (CIPROC), todos de la Universidad de Costa Rica, por su colaboración.

LITERATURA CITADA

- Alam, S; Khalil, S; Ayub, N; Rashid, M. 2002. *In vitro* solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) from maize rhizosphere. *Int. J. Agr. Biol.* 4:454-458.
- Alvarado, A; Bertsch, F; Bornemisza, E; Cabalceta, G; Forsythe, W; Henríquez, C; Mata, R; Molina, E; Salas, R. 2001. Suelos derivados de cenizas volcánicas (Andisoles) de Costa Rica. *Asociación Costarricense de la Ciencia del Suelo*. San José, Costa Rica. 112 p.
- Alvarado, A; Iturriaga, I; Smyth, J; Portuguez, E; Ureña, J. 2009. Efecto residual del fertilizante fosfatado adicionado al cultivo de la papa en un Andisol de Juan Viñas, Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 33(1):63-76.
- Alvarado, A; Mata, R; Chinchilla, M. 2014. Arcillas identificadas en suelos de costa rica a nivel generalizado durante el período 1931-2014: i. Historia, metodología de análisis y mineralogía de arcillas en suelos derivados de cenizas volcánicas. *Agronomía Costarricense* 38(1):75-106.
- Andriese, J; Muller, A. 1973. Mineralogical properties of two profiles of volcanic ash soil from Costa Rica. *Turrialba* 23(3):303-317.
- Asea, P; Kucey, R; Stewart, J. 1988. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. *Soil Biol Biochem.* 20:459-464.
- Barroso, C; Nahas, E. 2005. The status of soil fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. *Appl. Soil. Ecol.* 29:73-83.
- Bernal, L. 2010. Aislamiento de microorganismos solubilizadores de P (PSM) de las raíces de Vainilla sp. Tesis Lic. Bogotá, Colombia, Pontificia Universidad Javeriana. 30 p.
- Bertsch, F. 1995. La fertilidad de los suelos y su manejo. 1ª ed. San José, CR. *Asociación Costarricense de la Ciencia del Suelo*. 157 p.
- Cakmak, I; Welch, R; Erenoglu, B; Römheld, V; Norvell, W; Kochian, L. 2000. Influence of varied zinc supply on re-translocation of cadmium (109Cd) and rubidium (86Rb) applied on mature leaf of durum wheat seedlings. *Plant Soil* 219:279-284.
- Canessa, J; Sancho, F; Alvarado, A. 1987. Retención de fosfatos en andepts de Costa Rica, II. Respuesta a la fertilización fosfórica. *Turrialba (Costa Rica)*. 37(2):211-218.
- Castro, L; Murillo, M; Uribe, L; Mata R. 2015. Inoculación al suelo con *Pseudomonas fluorescens*, *Azospirillum oryzae*, *Bacillus subtilis* y microorganismos de montaña (MM) y su efecto sobre un sistema de rotación soya-tomate bajo condiciones de invernadero. *Agronomía Costarricense* 39(3):21-36.
- Cepeda, M; Gamboa, A; Valencia, H; Lozano, A. 2005. Estrategias adaptativas de plantas del páramo y del bosque altoandino en la cordillera oriental de Colombia: Hongos solubilizadores de fosfatos minerales aislados de la rizósfera de *Espeletia grandiflora* del páramo El Granizo. Bonilla, M. Bogotá, CO. Universidad Nacional de Colombia. 356 p.
- Chun-Chao, C; Yu-Lin, K; Chen-Ching, C; Wei-Liang, C. 2007. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. *Biol. Fertil. Soils* 43:575-584.
- Cordero, J; Ortega, P; Ortega, E. 2008. La inoculación de plantas con *Pantoea* sp. incrementa la concentración

- de P en los tejidos foliares. *Revista Colombiana de Biotecnología* 10(1):111-121.
- Cracogna, M; Iglesias, M; Diaz, I; Gonzáles, N; Carbajal, M. 2003. Utilización de *Azospirillum* y bacterias solubilizadoras de fósforo en el cultivo de trigo. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*, Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes, Argentina. 3 p.
- Bhattacharyya, P; Goswami, M; Bhattacharyya, L. 2016. Perspective of beneficial microbes in agriculture under changing climatic scenario: A review. *Journal of Phytology* 8:26-41.
- de Oliveira Mendes, G; Moreira de Freitas, A; Liparini Pereira, O; Ribeiro da Silva, I; Bojkov Vassilev, N; Dutra Costa, M. 2014. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. *Annals of Microbiology* 64:239-249.
- Dighton, J. 2007. Nutrient cycling by saprotrophic fungi in terrestrial habitats. In Kubicek, CP; Druzhinina, IS. (eds.). *Environmental and Microbial Relationships*. Second edition. The Mycota. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. p. 287-300.
- Do Carmo Harta, M; Torrent, J. 2007. Phosphorus desorption kinetics in relation to phosphorus forms and sorption properties of portuguese acid soils. *Soil Sci.* 172:631-638.
- Echeverría, E. 2012. Efecto de la interacción de hongos micorrízicos arbusculares y *Pseudomonas fluorescens* sobre el desarrollo y la nutrición de plántulas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) durante las primeras fases de crecimiento. Tesis Lic. Sangolquí, Ecuador, Escuela Politécnica del Ejército. 92 p.
- Fallas, R. 2013. Avaliação e calibração de extratores de fósforo em três diferentes ordens de solo da Costa Rica. Dissertação (Mestrado). Piracicaba-SP. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo. 100 p.
- Fassbender, H. 1969. Deficiencias y fijación de fósforo en suelos derivados de cenizas volcánicas en América Central. Suelos derivados de cenizas volcánicas de América Latina. IICA. B4.1-B4.10.
- Fernández Durán R; González Reyes, L. 2014. En la espiral de la energía Vol. 1 y Vol. 2. Libros en Acción / Baladre, Madrid, España. 944 p.
- Gaur, A; Mathur, R; Sadasivam, K. 1980. Effect of organic materials and phosphate-dissolving culture on the yield of wheat and greengram. *Indian Journal of Agronomy* 25:501-503.
- Giraldo, O. 2015. Agroecología y complejidad. Acoplamiento de la técnica a la organización ecosistémica. Polis. 41:1-20.
- Gómez-Guiñán, Y; Zabala, M. 2001. Determinación de la capacidad solubilizadora del P en hongos aislados de la rizósfera del maní (*Arachis hypogea* L.). *Saber* 13:8-13.
- Gyaneshwar, P; Parekh, L; Archana, G; Poole, P; Collins, M; Hutson, R; Naresh, K. 1999. Involvement of a phosphate starvation inducible glucose dehydrogenase in soil phosphate solubilization by *Enterobacter absuriae*. *FEMS Microbiology Letters* 171:223-229.
- He, Z; Bian, W; Zhu, J. 2002. Screening and identification of microorganisms capable of utilizing phosphate absorbed by goethite. *Commun Soil Sci Plant Anal.* 33:647-663.
- Henríquez, C. 2005. Sorción y desorción de fósforo en un Andisol de Costa Rica dedicado al cultivo del café, caña de azúcar y bosque. *Agronomía Costarricense* 29(3):97-105.
- Hernández, T; Carrión, G; Heredia, G. 2011. Solubilización in vitro de fosfatos por una cepa de *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson. *Agrociencia* 45:881-892.
- Jones, D; Oburger, E. 2011. Chapter 7 Solubilization of Phosphorus by Soil Microorganisms. In Bunemann, EK; et al. (eds.). *Phosphorus in Action, Soil Biology* 26:169-198.
- Kaur, G; Reddy, M. 2015. Effects of phosphate-solubilizing bacteria, rock phosphate and chemical fertilizers on maize-wheat cropping cycle and economics. *Pedosphere* 25(3):428-437.
- Kim, K; Jordan, D; McDonald, A. 1997. Effect of phosphate solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biology and Fertility of Soils* 26:79-87.
- Kucey, R. 1983. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. *Can J Soil Sci* 63:671-678.
- Kucey, R. 1987. Increased phosphorus uptake by wheat and field beans inoculated with a phosphorus-solubilizing *Penicillium bilaji* strain and with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Environmental Microbiology* 53:2699-2703.
- Liu, J; Samac, D; Bucciarelli, B; Allan, D; Vance, C. 2005. Signaling of phosphorus deficiency-induced gene expression in white lupin requires sugar and phloem transport. *Plant J.* 41:257-268.
- LMA-CIA (Laboratorio de Microbiología Agrícola-Centro de Investigaciones Agronómicas). 2015. Metodología propuesta para la evaluación de microorganismos solubilizadores de P. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 47 p.
- López, M; Martínez, R; Brossard, M; Bolívar, A; Alfonso, N; Alba, A; Pereira, H. 2008. Efecto de biofertilizantes bacterianos sobre el crecimiento de un cultivar de maíz en dos suelos contrastantes venezolanos. *Agronomía Tropical* 58(4):391-401.
- Lorch, H; Benckieser, G; Ottow, J. 1995. Basic methods for counting microorganisms in soil and water. In Alef, K; Nannipieri, P (eds.). *Methods in applied soil*

- microbiology and biochemistry. Academic Press. p. 146-191.
- Lynch, J; Marschner, P; Rengel Z. 2012. Chapter 13 - Effect of Internal and External Factors on Root Growth and Development. In Marschner, P (ed.). Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants, San Diego, USA, Academic Press. p. 331-346.
- Marín, S. 2015. Comparación de un Andisol manejado convencional y orgánicamente mediante la respuesta de la papa en invernadero a prácticas de fertilización convencional, orgánica y de aplicación de solubilizadores de fósforo. Tesis Lic. San José, CR. UCR. 61 p.
- Martin, L; Velázquez, E; Rivas, R; Mateos, P; Martínez-Molina, E; Rodríguez-Barrueco, C; Peix, A. 2003. Effect of inoculation with a strain of *Pseudomonas fragi* on the growth and phosphorus content of strawberry plants. In Velazquez, E; Rodriguez-Barrueco, C (eds.). First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization (19-22 July 2002, Salamanca, Spain), Springer, The Netherlands. p. 309-315.
- Martínez-Viera, R; López, B; Dibut, A; Parra, Z; Rodríguez, S. 2007. La fijación biológica de nitrógeno atmosférico en condiciones tropicales. Publicación especial del Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierra. 172 p.
- Mata, R; Rosales, A; Vásquez, A; Sandoval, D. 2013. Mapa de Órdenes de Suelos de Costa Rica. 2a Ed. San José, Costa Rica. Asociación Costarricense de la Ciencia del Suelo. Esc 1: 200.000. Color.
- Motsara, M; Bhattacharyya, P; Srivastava, B. 1995. Biofertiliser Technology, Marketing and Usage. Fertiliser Development and Consultation Organisation. New Delhi, India. p. 1-58.
- Nahas, E. 2007. Phosphate solubilising microorganisms: Effect of carbon, nitrogen and phosphorus sources. In Valázquez, E; Rodríguez-Barrueco, C (eds.). First international meeting on microbial phosphate solubilization. Developments in Plant and Soil Science, vol 102. Springer, Dordrecht, p. 111-115.
- Nakamura, Y; Fukuhara, H; Sano, K. 2000. Secreted phytase activities of yeasts. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64(4):841-844.
- Nigussie, D; Schenk, M; Claassen, N; Steingrobe, B. 2003. Phosphorus efficiency of cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*), carrot (*Daucus carota* L.), and potato (*Solanum tuberosum* L.). Plant Soil 250:215-224.
- Núñez, C; Acevedo, J. 2005. Evaluación del uso de *Penicillium janthinellum* Biourge sobre la eficiencia de la fertilización fosfórica en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L. var. Diacol Capiro). Agronomía Colombiana 23(2):290-298.
- Osorio, N; Habte, M. 2001. Synergistic influence of an arbuscular mycorrhizal fungus and a P solubilizing fungus on growth and P uptake of *Leucaena leucocephala* in a Oxisol. Arid Land Research and Management 15:263-274.
- Osorio, N; Habte, M. 2013. Phosphate desorption from the surface of soil mineral particles by a phosphate-solubilizing fungus. Biol Fertil Soils 49:481-486.
- Paredes M; Espinosa D. 2010. Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. Terra Latinoamericana 28(1):61-70.
- Pellny, T; Van Aken, O; Dutilleul, C; Wolff, T; Groten, K; Bor, M; De Paepe, R; Reys, A; Van Breusegem, F; Noctor, G; Foyer, C. 2008. Mitochondrial respiratory pathways modulate nitrate sensing and nitrogen-dependent regulation of plant architecture in *Nicotiana glauca*. Plant J. 54:976-992.
- Pradhan, N; Sukla, L. 2005. Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. Afr. J. Biotechnol. 5:850-854.
- Raghothama, K. 1999. Phosphate acquisition. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 50:665-693.
- Rashid, M; Khalil, S; Ayub, N; Alam, S; Latif, F. 2004. Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. Pakistan Journal of Biological Sciences 7(2):187-196.
- Richardson, A; Barea, J; McNeill, A; Prigent, C. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. Plant Soil (321):305-339.
- Richardson, A; Simpson, R. 2011. Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability. Plant Physiology 156:989-996.
- Rodríguez, H; Frago, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnol Adv. 17:319-339.
- Salih, H; Yahya, A; Abdul-Rahem, A; Munam, B. 1989. Availability of phosphorous in a calcareous soil treated with rock phosphate or superphosphate as affected by phosphate-dissolving fungi. Plant Soil 120:181-185.
- Sanzano, A. 2013. El fósforo del suelo (en línea). Cátedra de Edafología. Tucumán, AR. Consultado 19 nov. 2013. Disponible en <http://www.edafo.com.ar/Descargas/Cartillas/Fosforo%20del%20Suelo.pdf>
- Selvakumar, G; Joshi, P; Nazim, S; Mishra, P; Bisht, J; Gupta, H. 2009. Phosphate solubilization and growth promotion by *Pseudomonas fragi* CS11RH1 (MTCC 8984), a psychrotolerant bacterium isolated from a high altitude Himalayan rhizosphere. Biologia 64(2):239-245.
- Singh, S; Kapoor, K. 1998. Effects of inoculation of phosphate-solubilizer microorganisms and an arbuscular mycorrhizal fungus on mungbean grown under natural soil conditions. Mycorrhiza 7:249-253.

- Soto, J. 1998. Formas de fósforo y su liberación en Andisoles de la región central oriental de Costa Rica. Tesis Ph.D. España, Universidad de Córdoba. 155 p.
- Souchie, E; Azcón, R; Barea, J; Saggin-Júnior, O; Ribeiro-Da Silva, E. 2006. Phosphate solubilization and synergism between P-solubilizing and arbuscular mycorrhizal fungi. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 41:1405-1411.
- Sperber, J. 1958. The incidence of apatite-solubilising organisms in the rhizosphere and soil. *Australian Journal of Agricultural Research* 9:778-781.
- Vance, C; Uhde-Stone, C; Allan, D. 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist*, Oak Ridge 157:423-447.
- Whitelaw, M. 1999. Growth promoting of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Advanced in Agronomy* 69:99-151.
- Yasser, M; Mousa, A; Massoud, O; Nasr, S. 2014. Solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing fungi isolated from Egyptian soils. *J. Biol Earth Sci.* 4(1):B83-B90.
- Zaady, E; Perevolotsky, A. 1995. Enhancement of growth and establishment of oak seedlings (*Quercus ithaburensis* Decaisne) by inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Forest Ecology and Management* 72(1):81-83.



Todos los derechos reservados. Universidad de Costa Rica. Este artículo se encuentra licenciado con Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Costa Rica. Para mayor información escribir a rac.cia@ucr.ac.cr