

HONGOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATOS EN FINCAS GANADERAS DEL DEPARTAMENTO DE SUCRE.

SOLUBILITY FUNGI OF PHOSPHATE IN LIVESTOCK FARMS OF THE DEPARTMENT OF SUCRE.

PEREZ, C. ALEXANDER^{1*} Dr., DE LA OSSA, V. JAIME² Dr., MONTES, V. DONICER³ Esp.

¹Grupo de investigación en Bioprospección Agropecuaria. ²Grupo de investigación Biodiversidad Tropical. ³Grupo de investigación en Genética y Mejoramiento Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Sucre.* correspondencia: alexpcor@yahoo.com.

Recibido: 11-02-12; Aceptado: 15-02-12

Resumen

El fósforo es después del Nitrógeno el elemento que más afecta el desarrollo y la producción de las plantas. Este elemento pasa rápidamente a formas solubles no disponibles para las plantas. Muchos microorganismos dentro los que se encuentran los hongos tienen la capacidad de solubilizar el fósforo y hacerlo disponibles para las plantas. El presente proyecto tuvo como objetivo aislar especies de hongos solubilizadores de fosfatos rizósfera y endófitos presente en raíces de pasto colosoana pertenecientes a fincas ganaderas del municipio de Sincé, Colombia. Se utilizó el medio con calfos (Glucosa 8 g, Extracto de malta 10 g, extracto de levadura 10 g, Neopolipeptona 1 g, Calfos 0.5 %, 0.8 %, 1.2 % y 1.5 % y agar 1.5 y agua 1000 ml) para el aislamiento de especie de hongos solubilizadores de fosfato. Fueron identificadas 53 especies de hongos en suelo y 43 en raíces, de los cuales se encontraron 3 y 6 especies solubilizadoras de fosfatos, respectivamente en las fincas ganaderas del municipio de Suce. *Penicillium* sp y *Aspergillus niger* fueron las especies solubilizadoras de fosfatos, más predominantes y *Paecilomyces* sp la de menor presencia. Estos hongos se convierten en potenciales biológicos para la conservación de la fertilidad de los suelos de las zonas estudiadas, las cuales son caracterizan por tener niveles de fósforo.

Palabras claves: Suelos, hongos endófitos, Solubilización, Fosfatos

Abstract

After nitrogen, phosphorus is the element which most affects the development and production of plants. This element becomes quickly soluble forms not

available to plants. Many microbes inside them which are fungi have the ability to solubility phosphorus and make it available to plants. The objective was isolate solubility fungi species of phosphates in rhizosphere and roots endophytes of livestock farms of the municipality of Sincé, Colombia. We used the medium with calfos (glucose 8 g, malt extract 10 g yeast extract 10 g, Neopolipeptona 1 g, Calfos 0.5%, 0.8%, 1.2% and 1.5% and agar water 1000 ml and 1.5) for isolation of species of solubilizadores fungi of phosphate. 53 Species of fungi in soil and 43 in roots, of which 3 and 6 solubilizadoras species of phosphates, were respectively found in the livestock farms of the municipality of Sincé were identified. *Penicillium* sp and *Aspergillus niger* were solubilizadoras of phosphates, more prevalent species and *Paecilomyces* sp of minor presence. These fungi are converted into biological potential for the conservation of the fertility of the soils of the studied areas, which are characterized by levels of phosphorus.

Key words: soil, fungi, Endophytes, phosphate solubilization.

Introducción

El fósforo es uno de los elementos (macronutrientes) que las plantas requieren en cantidades relativamente grandes. Este elemento en la planta es esencial porque forma parte de los fosfatos portadores de energía (ATP-ADP), fosfolípidos, ácidos nucleicos y varias coenzimas esenciales (CURTIS y BARNES 1993; ROJAS y ROVALO, 1985). Las plantas absorben la mayoría del fósforo como ion dihidrogenofosfato $H_2PO_4^-$ y pequeñas cantidades como ion hidrogenofosfato HPO_4^{2-} . Sin embargo, una gran parte de este elemento en el suelo, aproximadamente 95-99%, está presente en la forma fosfatos insolubles, los cuales no pueden ser utilizados por las plantas. (CURTIS y BARNES, 1993; KANG *et al.*, 2002).

La aplicación de fertilizantes fosfatados ha sido utilizada para suplir la deficiencia del fósforo en el suelo, pero una parte considerable es convertida rápidamente a compuestos insolubles. Gran cantidad de los fertilizantes fosfatados que se aplican no son utilizados por las plantas, sino que se almacenan en el suelo. (NARLOCH *et al.*; 2002; KUCEY, 1983). Otra alternativa para proveer de fósforo a los suelos ha sido la utilización de las rocas fosfóricas, pero muchos estudios han demostrado perfectamente que las rocas fosfóricas tienen muy bajo contenido de fósforo soluble en agua (LEON, 1980; GOENADI *et al.*, 2000).

Si el fósforo no se encuentra en cantidades suficiente y en formas disponibles en el suelo, se retrasa la madurez de varias cosechas como arroz, maíz, algodón, soja, entre otras, debido a que su sistema radicular no se desarrolla satisfactoriamente: las plantas se quedan enanas disminuyendo enormemente la

producción. Por lo tanto las plantas deben tener fósforo disponible para su buen desarrollo (BEAR, 1969; PLASTER, 2000). El fósforo es el elemento más escaso en los suelos tropicales del mundo y de Colombia.

La baja solubilidad de las rocas fosfóricas, los altos costos de la producción de los fosfatos solubles y los bajos contenidos de P disponible en los suelos tropicales conllevan a la búsqueda de nuevos mecanismos para incrementar la disponibilidad de fosfatos para las plantas cultivables. Se ha demostrado que existen diferentes

microorganismos capaces de solubilizar formas no disponibles de fósforo y convertirlas en asimilables por las plantas. Hongos Bacterias y Actinomicetos pueden disolver fosfatos insolubles en cantidades superiores a sus demandas nutricionales. La acción solubilizadora ha sido asociada principalmente con la producción de ácidos orgánicos (láctico, glicólico, cítrico, maléico y otros) elaborados por el metabolismo microbiano (REYES, 1991a).

Se ha demostrado que muchos microorganismos del suelo como Hongos y Bacterias, incluyendo Actinomicetos, pueden solubilizar iones fosfatos ($H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}) a partir de fuentes de fósforo orgánico e inorgánico de escasa solubilidad (GUERRERO *et al.*, 1996). Para que los compuestos orgánicos del humus o de la materia orgánica recién incorporada pueda ceder fósforo a la solución del suelo y a las plantas parece necesaria la acción hidrolíticas de las fosfatasas. Algunos trabajos han demostrado que varios microorganismos del suelo poseen actividad fosfatasa. La disolución microbiológica de fosfatos insolubles debe ser entendida como la transformación de este elemento de una forma insoluble a otra soluble en agua (DYHRMAN y PALENIK, 1999; ROJAS y ROVALO, 1985; ZARPA *et al.*, 2001).

La producción de ácidos por parte de los microorganismos disuelven los minerales, de esta manera, los ácidos orgánicos (glicólico, láctico, cítrico, maléico), el ácido nítrico (producido por agentes nitrificantes), el ácido sulfúrico (producido por tóbacilos) y el ácido carbónico (H_2CO_3) liberan fósforo procedentes de formas minerales (COYNE, 2000).

Una práctica común por los Rusos desde la década de los 50 es la inoculación de "fosfobacterinas", particularmente cepas de *Bacillus megaterium* var. *fosfaticum* en suelos con bajo contenido de fósforo disponible (REYES, 1991b); antes de que existieran los fertilizantes de fósforo, un medio efectivo para solubilizar este elemento consistía en mezclar suelo, abono de estiércol, azufre y fosfato rocoso (COYNE, 2000).

Actualmente el uso de “fosfohongos”, tales como cepas de *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. están siendo utilizadas para incrementar la solubilidad de la roca fosfatada y del fósforo fijado en el suelo (REYES, 1991b). La importancia de la actividad de los microorganismos en el ciclo del fósforo se manifiesta por el alto contenido de este elemento en el tejido microbiano (El micelio de los hongos contiene entre 0.5 y 1.0% y las bacterias entre 1.5 y 2.5% de fósforo por peso seco). La mayor parte del fósforo presente en los microorganismos está en el ARN (del 30 al 50%). Las concentraciones microbianas de fósforo son diez veces más elevadas que en las plantas. A bajas concentraciones de fósforo los microorganismos acumulan un exceso de fósforo para cubrir sus necesidades (COYNE, 2000).

La habilidad solubilizadora de fosfatos ha sido determinada en medios con CaHPO_4 mediante la formación de zonas claras o halos de disolución de los cristales de fosfatos alrededor de las colonias de los microorganismos que poseen esta actividad (KUCEY, 1983; REYES, 1991a). Entre los hongos solubilizadores se encuentran los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Sclerotium*, *Fusarium*, *Paecilomyces* y *Syrialidium*, Actinomicetos del género *Actinomyces*, también se han involucrado (COYNE, 2000; REYES 1991b; NARLOCH et al., 2002; ALTOMARE, 1999; CABRERA, 2000).

El presente proyecto tuvo como objetivo, aislar e identificar especies de hongos rizósfera y como endófito raíces del pasto colosoana con actividad solubilizadora de fosfatos en fincas ganaderas del municipio de Sincé-Sucre.

Materiales y métodos

El presente trabajo se realizó en fincas ganaderas ubicadas en el municipio de Sincé-Sucre-Colombia. Para el muestreo se seleccionaron predios únicamente con presencia del pasto colosoana. En cada finca se realizó un muestreo al azar, a una profundidad de 20 cm tomando al tiempo muestra de suelo y raíces. Las muestras identificadas por finca y vereda, fueron llevadas al laboratorio de investigaciones microbiológicas de la Universidad de Sucre, para el aislamiento e identificación de especies de hongos solubilizadores de fosfatos.

Aislamientos de hongos de rizósfera

Se tomó 100 g de suelo con raíces, se colocaron en un tamiz de 450 μm , se lavó con agua estéril varias veces; se seleccionaron raíces pequeñas de aproximadamente de 1 cm de largo por 1 mm de ancho y se pasaron a frascos

estériles, se sacaron las raíces pequeñas y se sembraron en el medio YGC (YGC 40 g, asparagina 0.5 g, K_2HPO_4 1g, $MgSO_4$ 0.122g, $FeSO_3$ 0.01g, agua estéril 1000 ml) e incubadas a 25°C por 7 días.

Aislamientos de hongos endófitos de raíces

Raíces pequeñas de aproximadamente del cm de largo por 1 mm de ancho, se lavaron con agua estéril dos veces, se sumergieron en solución de hipoclorito de Sodio al 1 % por un minuto, se lavaron 3 veces con agua estéril para eliminar el exceso de hipoclorito de sodio, se secaron el papel filtro y se sembraron en medios YGC a 25 °C por 7 días.

Control suelo

Para este procedimiento, se tomaron muestras de suelos, se lavaron y se seleccionaron dos terrones de aproximadamente de 2 mm de diámetro, se sembraron en medios YGC a 25 °C por 7 días.

Identificación de hongos solubilizadores de fosfatos.

Los diferentes morfotipos aislados de rizósfera, endófitos y en control suelo presentes en medios YGC se reaislaron en medios calfos (Glucosa 8g, extracto de malta 10g, extracto de levadura 10g, peptona 1g, calfos 1.5%, agar 2.5 g, agua estéril 1000 ml y pH 5.5) e incubadas a 25°C, durante 7 días, hasta obtener crecimiento que indicara la actividad solubilizadora mediante el viraje de color rojo a amarillo y formando un halo transparente (Reyes, 1991). La identificación de los hongos solubilizadores, a nivel de género, se hizo en medio de agar – malta (extracto de malta 48 g, cloranfenicol 500 mg, agar 2.5 g y agua destilada 1000 ml) a 25°C, durante 7 días, se tomaron con el asa microbiológicas muestras de los hongos aislados y se hicieron montajes en placas fijas y se llevaron a observación en el microscopio, para la identificación taxonómica se utilizó la clave taxonómica "Illustrated genera of Imperfect of fungi By H.L. Bornett, 1980", llegando en algunos a identificar las especies.

Resultados

Un total de 19 fincas ganaderas pertenecientes al municipio de Sincé fueron muestreadas y de acuerdo a los resultados de los análisis químicos de los suelos representativos de la zona en estudio, se encontró que el pH osciló entre medianamente ácido a medianamente alcalino, los contenidos de fósforo y materia

orgánica se encuentran de muy bajo a medio y los valores de calcio de bajo a muy alto.

En la tabla 1, se observa el total de grupos y/o especies de hongos aislados de rizósfera y como endófitos en raíces de pasto colosoana. Un total de 51 morfotipos fueron aislados de rizósfera y 43 como endófitos. Los resultados indican que la mayor diversidad de aislados correspondió al grupo de Deuteromycetes en ambas condiciones. En la misma tabla se observa que la mayor actividad como solubilizadores de fosfatos se encontró en hongos como endófitos presentes en raíces de pasto colosoana.

Tabla 1. Grupos y/o especies de hongos aislados de rizósfera y como endófitos de raíces de pasto colosoana y actividad solubilizadora de fosfatos.

Grupo y/o especie	Rizósfera	ASP	Endófitos en raíz	ASP
Deteuomicetes	47	-	36	-
<i>Penicillium</i> sp	2	+	3	+
<i>Aspergillus</i> niger	1	+	2	+
Zygomycetes	1	-	1	-
<i>Paecilomyces</i> sp	0	-	1	+
TOTAL	51		42	

ASP:actividadsolubilizadora de fosfatos

La actividad solubilizadora de fosfatos fue evaluada en medio calfos. La actividad positiva fue observada por la acidificación del medio, la cual fue identificada mediante el viraje de color rojo a amarillo y formando un halo transparente (Reyes, 1991)(Figura 1.).

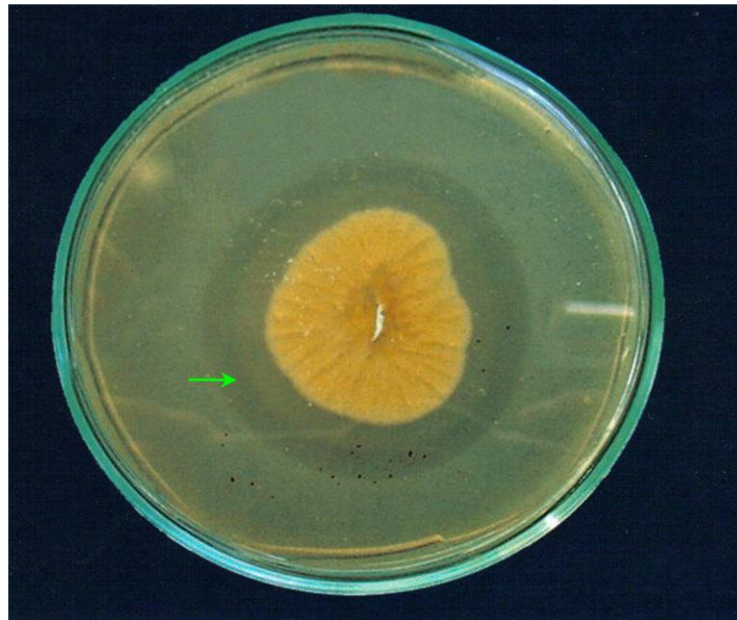


Figura 1. Actividad solubilizadora de fosfatos de hongos en medio calfos. Fuente: Alexander Pérez Cordero, 2011.

Los géneros de hongos aislados con actividad solubilizadora de fosfatos fueron identificado como: *Aspergillus*, *Penicillium* y *Paecilomyces*. Los de mayor presencia correspondió a *Aspergillus* identificándose cuatro especies *A. candidus*, *A. niger*, *A. flavus* y *A. terreus* (Figura 2.).

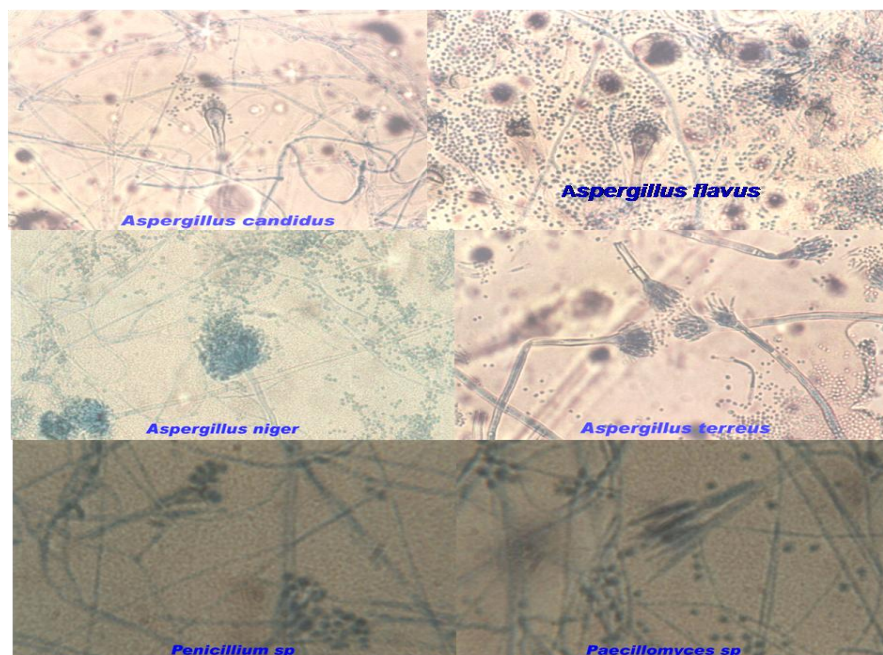


Figura 2. Especies de hongos solubilizadores de fosfatos encontradas en rizósfera y como endófitos en raíces de pasto colosoana en fincas ganaderas Del municipio de Sincé. Alexander Pérez Cordero, 2012.

DISCUSIÓN

Muchas de la literaturas acerca de la solubilización de minerales en el suelo por parte de microorganismos y su uso potencial para aumentar la fertilidad del suelo está centrada en hongos formadores de micorrizas arbusculares y las bacterias solubilizadoras de fosfatos; sin embargo se conocen pocos géneros de hongos filamentosos, no micorrízicos solubilizadores de fosfatos, los cuales han sido mostrados (ALTOMARE, 1999).

Los hongos endófitos forman con las plantas interacciones simbióticas complejas, y en la actualidad existe muchos de interrogantes acerca del funcionamiento de esta simbiosis. Como primera inquietud es importante conocer el beneficio que cada uno recibe de esta relación simbiótica. En las pasturas tropicales no existe ninguna evidencia comprobada del mutualismo entre endófitos y pasturas. Existe un grupo de hongos endófitos en pastos de zona templada que les proveen protección contra herbívoros y la depredación de semillas mediante producción de toxinas. A cambio los hongos reciben alimento, protección y, en algunos casos, dispersión a través de la semilla de su hospedero (JOHNSON *et al.*, 1985, CLAY, 1988; KNOCH *et al.*, 1993).

Los géneros de hongos aislados con actividad solubilizadora de fosfatos correspondieron *Aspergillus candidus*, *A. niger*, *A. flavus* y *A. terreus*, *Penicillium* y *Paecilomyces*. En estudio realizados sobre la actividad solubilizadora de fosfatos aislados de yacimientos de rocas fosfóricas, identificaron a *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Fusarium* sp. con esta actividad REYES, (1991a). En trabajos realizados por SALIH *et al.*; 1989; KUCEY, (1983), señalan que *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. han mostrado *in vitro* actividad positiva como solubilizadora de fosfatos. Entre tanto CABRERA, (2000) identificó además de los géneros anteriormente a *Paecilomyces* sp. y *Sytalidium* sp. con alta actividad solubilizadora de fosfatos en suelos ultisoles y oxisoles de la Amazonía Colombiana. Actividad solubilizadora de fosfatos para la especie de *Trichoderma harzianum* la reportó (ALTOMARE, 1999) el cual concluyó que esta especie posee diferentes mecanismos enzimáticos para la solubilización de fosfatos.

Como perspectivas futura se plantea realizar exploración de hongos solubilizadores en diferentes subregiones fisiográficas del departamento de Sucre, así mismo se procederá a la evaluación *in vivo* de estos hongos en especies de pasturas de importancia económica y se plantea desarrollar técnicas específicas para la producción masiva de estas especies de hongos para su utilización como alternativa biológica como fertilizantes para que contribuyan al mejoramiento y conservación de la fertilidad de los suelos, principalmente en aquellas regiones

donde existen problemas de baja contenido del elemento fósforo, como las objetos del presente proyecto.

Agradecimiento

A los autores expresan sus agradecimientos al laboratorio de investigaciones microbiológicas de la Universidad de Sucre.

Referencias

ALTOMARE C.; NORVELL T.; BJÖRKMAN E.H. 1999.Solubilization of Phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *American Society for Microbiology*. 65 (87): 2926-2933.

BEAR F.E. 1969. *Los suelos con relación el crecimiento de los cultivos*. Barcelona: OMEGA, p 221.

CABRERA, L. T. A. 2000. Aporte al Conocimiento de la Microbiota Fúngica, con énfasis en tres grupos funcionales. Santa fe de Bogota: (Tesis Biólogo). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. www.control-biologico.com/monog.lilacinol.htm.

CLAY K. 1988. Fungal Endophytes of Grasses: A Defensive Mutualism Between Plants and Fungi. *Ecology*, 69:10-16.

COYNÉ M. 2000. *Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio*. Madrid: Editorial panamericana, p 180 – 185.

CURTIS H.; BARNES N.S. 1993. *Invitación a la biología*. Buenos Aires: panamericana S.A, p 432 – 433.

DYHRMAN S. T.; PALENIK B. 1999. Phosphate Stress in cultures and field populations of *Dinoflagellate prorocentrum minimum* detected by a single-cell alkaline phosphate assay. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (7): 3205–3212. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC91475/pdf/am003205.pdf>.

GOENADI D.H.;SISWANTO A.;SUGIARTO Y. 2000.Bioactivation of poorly soluble phosphate rocks with a phosphorus – solubilizing fungus. Soil Science Society of America Journal. 64(3): 297 – 325 – Available from Internet: < WWW. Go. Com >

GUERRERO E.C.; OROZCO A.; RIVILLAS C. 1996. *Micorrizas: Recursos biológicos del suelo*. Bogotá: Fondo Fen Colombia, p 56 – 57.

JOHNSON M.C.; DAHLMAN D.L.; SIEGEL MR.; BUSH L.P.; LATCH G.C.M, POTTER D.A.; VARNEY D.R. 1985. Insect Feeding Deterrents in Endophyte-Infected Tall Fescue. Applied and Environmental Microbiology;49:568-571.

KANG S.CH.; CH G.H.A.; LEE T.G.; D.K. MAHESWARI. 2002. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by a soil – inhabiting fungus *Formitopsis* sp. Ps 102. Current Science. 82(4): 439 – 441.

KNOCH TR.; STANLEY H.F.; ARNOTT D.L. 1993. Endophytic Fungi Alter Foraging and Dispersal by Desert Seed-Harvesting Ants. Oecologia;95:470-473.

KUCEY R.N.M. 1983. Phosphate – solubilizing bacteria and fungi various cultivated and virgin. Alberta Soils. Can. J. Soil Sci. 63: 671 – 678.

LEON L.A. 1980. El uso de roca fosfórica en suelos ácidos del trópico americano Bogotá: Sociedad Colombiana de la ciencia del suelo (SCCS). p 211 – 215.

NARLOCH CH.; OLIVEIRA V.L.; TERNES J.; SILVA G.N.. 2002. Respostas da cultura do robanete a inoculação dos fungos solubilizadores de fosfatos. Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira., 37(6): 2002. p 841 – 845.

PLASTER E. J. 2000. *La ciencia del suelo y su manejo*. Madrid: Paraninfo, 2000. p 199.

REYES I. 1991a. Cuantificación de microorganismos solubilizadores de fosfatos en suelos del yacimiento de roca fosfórica de monte fresco. Revista facultad de Agronomía, Vol. 17(1-4): 373 – 397.

REYES I. 1991b. Dinámica del fósforo y asilamiento de algunos microorganismos en la mezcla pulpa café – roca fosfórica. En: revista Facultad de Agronomía, 7(1-4): 397 – 408.

ROJAS M.; ROVALO M. 1985. *Fisiología Vegetal aplicada*. Mexico: McGraw – Hill, p 130 – 145.

SALIH H.M.; YAHYA A.M; RAHEM A.; MUNAM B.H. 1989. Availability of Phosphorus in a calcareous soil treated with rock-phosphat dissolving fungi. *Plant and soil*. 120: 181-185.

ZARPA S.J.L; ROLLAND Y.; FLAMENT I. 2001. Characterization of a Highly Thermostable Alkaline phosphatase from the Euryarchaeon *pyrococcus abissi*. *Applied and Environmental microbiology*, 67(10):4504–4511. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC93196/pdf/am1001004504.pdf>.