



Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Universidad Nacional de La Pampa

Tesina presentada para obtener el grado académico de

LICENCIADO EN QUÍMICA

**Estudio cuantitativo del efecto de bacterias
solubilizadoras de fósforo sobre las distintas fracciones
de este elemento en el suelo**

Jimena Marina Giovannini

Santa Rosa (La Pampa)

Argentina

2013

PREFACIO

“Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Licenciado en Química, de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevó a cabo en el Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNLPam, durante el período comprendido entre Noviembre de 2012 y Diciembre de 2013, bajo dirección de la Dra. Patricia García y codirección de la Dra. Alicia Grassano.

Diciembre 2013

Jimena Marina Giovannini

DEPARTAMENTO DE QUIMICA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de La Pampa y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, donde comencé y finalicé mis estudios.

A la Dra. Patricia García y la Dra. Alicia Grassano, quienes con su experiencia y dedicación me guiaron para llevar a cabo este trabajo de tesis. Gracias por su confianza y afecto.

A toda la gente del Pabellón de Química con quienes compartí tanto tiempo, principalmente durante el tiempo de mi tesina. Especialmente quiero agradecer a Mónica, Javier, Gladis, Mari y Marcelo.

A la Lic. Ana Urioste por su predisposición y aportes.

Al Dr. Carlos Moldes por su asesoramiento en la realización del análisis estadístico de los resultados.

A mis compañeros de la cátedra Química Analítica II por toda la confianza y el apoyo brindado a lo largo de los años que formo parte de ella.

A mis amigos y amigas, los universitarios y los de la vida, gracias por todos los momentos vividos. Me llevo los mejores recuerdos!!!

A mi familia, que confió en mí y me dio todo, dejándome el legajo más importante que pudiera recibir, mis estudios universitarios, por lo cual estaré eternamente agradecida.

RESUMEN

La alfalfa (*Medicago sativa* L.), principal especie forrajera del país, es base de la producción de carne y leche en la Región Pampeana. De los nutrientes que consume, el nitrógeno, fósforo y con menos frecuencia el boro y azufre son los más limitantes. El fósforo está en el suelo en forma orgánica e inorgánica y procesos geoquímicos y biológicos regulan su disponibilidad. A su vez, se encuentra como: fósforo muy lábil, fósforo lábil, fósforo moderadamente lábil, fósforo inorgánico, fósforo orgánico e inorgánico en forma muy estable. Se considera que la utilización de microorganismos solubilizadores de fósforo, promoverían la disponibilidad de este elemento solubilizando las distintas fracciones presentes en el suelo.

Se plantea como objetivo de este trabajo comprobar la acción de bacterias solubilizadoras de fósforo sobre las distintas fracciones de éste, presentes en el suelo y cuantificar dicho efecto.

En este trabajo se optimizarán técnicas y se realizarán ensayos en invernadero con suelo con bajo contenido en fósforo disponible, el cual será inoculado con aislamientos de bacterias solubilizadoras de este elemento. Se cuantificará el fósforo en las distintas fracciones del suelo al comienzo y al finalizar este ensayo mediante el método colorimétrico de Murphy y Riley.

ABSTRACT

Perennial pastures are the forage basis which supports the production of meat in our country, among them alfalfa (*Medicago sativa L.*) is one of the most important forage resources. From the nutrients it consumes, nitrogen, phosphorus and less frequently, boron and sulfur, are the most limiting ones. Phosphorus is found in soil in both organic and inorganic forms, and geochemical and biological processes regulate its availability. At the same time, it can be found as: highly labile phosphorus, labile phosphorus, moderately labile phosphorus, inorganic phosphorus, organic and inorganic phosphorus in a very stable manner. It is considered that the use of phosphorus solubilizing microorganisms would promote the availability of this element solubilizing the different fractions present in soil. The aim of this work is to verify the action of phosphorus solubilizing bacteria on the different fractions of this element found in the soil and quantify this effect. In this study, techniques will be optimized and tests will be carried out in a greenhouse with soil with a low content of available phosphorus, which will be inoculated with isolates of solubilizing bacteria of this element. Phosphorus will be quantified in the different soil fractions at the beginning and the end of this essay by the colorimetric method of Murphy and Riley.

INDICE

INTRODUCCIÓN

El fósforo como nutriente	1
El fósforo y su importancia en los cultivos	4
Caracterización de las distintas formas de fósforo en el suelo	6
Fósforo: fertilizantes y problemática	7
Bacterias promotoras de crecimiento vegetal	8
Bacterias solubilizadoras de fósforo	11
HIPÓTESIS Y OBJETIVO	13
MATERIALES Y MÉTODOS	
Muestra	14
Microorganismos	14
Diseño experimental	15
Determinaciones de laboratorio	16
Descripción de la extracción secuencial	17
Análisis estadístico	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
CONCLUSIONES	28
BIBLIOGRAFÍA	29

INTRODUCCIÓN

El fósforo como nutriente

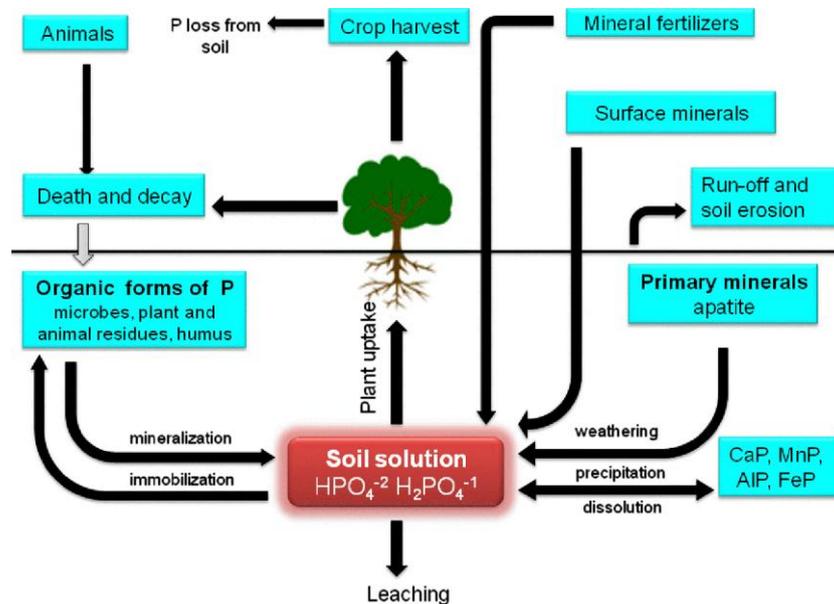
El fósforo, después del nitrógeno, es el nutriente que más frecuentemente afecta la producción de los cultivos (Fernández *et al.*, 2007). Este elemento forma parte de las enzimas, ácidos nucleicos y proteínas, y está involucrado en prácticamente todos los procesos de transferencia de energía (Leinweber *et al.*, 2002). El contenido de fósforo en el suelo está definido por el material madre y, en general, se ha observado un marcado efecto del clima, siendo zonas más húmedas, las más deficientes en este nutriente (Tisdale *et al.*, 1993). Junto con el nitrógeno y el potasio conforman el grupo de macronutrientes por las cantidades requeridas por los cultivos y por la frecuencia con que se encuentran en cantidades deficientes para estos (García, 2001). El fósforo integra todas las cadenas alimenticias pasando de un organismo a otro. Las plantas lo toman de la solución del suelo. Normalmente ésta es demasiado pobre para sostener un cultivo y debe ser retroalimentada continuamente de las formas más insolubles de fósforo del suelo, a medida que los cultivos lo extraen. La mayor parte de los suelos agrícolas son demasiado pobres como para sostener este proceso y precisan de la fertilización (Hedley *et al.*, 1982).

En las plantas, el fósforo es necesario para la respiración, fotosíntesis, funcionamiento celular y en la transferencia y reproducción de genes (Stauffer and Sulewsi, 2001). El fósforo se absorbe principalmente por las raíces desde la solución del suelo como iones H_2PO_4^- y en menor medida como HPO_4^{2-} . Las plantas en crecimiento no almacenan estos iones, exigiendo una abundante provisión desde el suelo (Mullen, 2005). Por supuesto las plantas que no obtienen de manera suficiente el fósforo necesario, sufren importantes retardos en su crecimiento. Los síntomas más típicos son la coloración verde oscura-azulada en los cereales, disminución de la tasa de formación de frutos y semillas, y un retraso en la maduración y finalización del ciclo. Los cultivos de alta producción demandan una gran cantidad de fósforo, un factor clave para lograr alto rendimiento es mantener a toda la planta bien nutrida de dicho elemento. La producción sustentable de cultivos requiere programas de fertilización fosforada que sean capaces al menos de reponer las cantidades extraídas de los campos (Jhonston, 2000).

Del fósforo total del suelo, sólo las fracciones solubles y lábiles (inorgánicas y orgánicas), están disponibles para las plantas durante el ciclo del cultivo. Una pequeña

parte de fósforo está en forma soluble, la cual está en equilibrio con la fracción lábil que comprende el fósforo orgánico fácilmente mineralizable y los fosfatos débilmente adsorbidos a las arcillas coloidales. La mayor parte del fósforo del suelo está en formas insolubles o fijadas, principalmente como minerales primarios fosfatados, humus, fosfatos insolubles de calcio, hierro y aluminio, y fosfatos fijados por los óxidos y minerales silicatados. También dependiendo del pH del suelo van a predominar unos u otros, en suelos de pH ácido predominan los fosfatos de aluminio y hierro, mientras que en suelos alcalinos predominan los de calcio (Lindsay, 1979; Tisdale *et al.*, 1993). Se sabe que algunas bacterias son capaces de solubilizar el fósforo desde la roca madre (Mullen, 2005). Los compuestos anteriormente citados son a largo plazo importantes para los cultivos porque tienen diferentes solubilidades y disponibilidades de compuestos de fósforo en el corto plazo, la absorción del fósforo puede predominar sobre la precipitación que controla la solubilidad. Todo esto se ve resumido en el ciclo del fósforo en el suelo (Figura 1).

Figura 1: Ciclo del fósforo en el suelo. (Khan *et al.* 2003)



La concentración del fósforo en la solución del suelo es muy baja (1 al 10 % del fósforo total), por lo tanto el fósforo absorbido por las raíces debe ser continuamente reabastecido. La cantidad de fósforo en la solución del suelo es generalmente 100 veces menor que la cantidad disponible oscilando entre 0,1 y 0,6 kg/ha para la capa arable. La concentración de la solución del suelo es mantenida por procesos biológicos que liberan

el fósforo de la materia orgánica, pero también por la desorción o disolución química o biológica. El fósforo orgánico en la Región Pampeana comprende entre un 40 y 70 % del fósforo total del suelo y es originado a partir de los residuos de las plantas, animales y microorganismos. Gran parte de los residuos contienen fósforo rápidamente disponible y lixiviable. De un 60 a 90 % del fósforo absorbido por una pastura es reciclado al suelo por las plantas y animales (Haynes and Williams, 1991), pero esta proporción de reciclaje de nutrientes es mucho menor en suelos bajo cultivo de cosecha.

La mineralización del fósforo proveniente de la materia orgánica representa una contribución significativa para las necesidades de fósforo de las plantas. La mineralización y disponibilidad de esta fracción depende de la descomposición de la materia orgánica. Cualquier reducción en el aporte de materia orgánica y una aceleración de la mineralización en un suelo resulta en una mineralización neta de la materia orgánica del suelo. A medida que los residuos se descomponen para formar materia orgánica y liberar algunos de los nutrientes asociados, el fósforo es liberado en cantidades mayores que aquellas determinadas por las transformaciones inorgánicas que puede sufrir. Entonces la degradación de la materia orgánica controla la liberación de fósforo orgánico, pero una vez liberado, los sitios de absorción y las reacciones químicas compiten por la disponibilidad de éste, de manera que la mineralización de fósforo por si sola no es una medida del abastecimiento de este nutriente y gran parte del fósforo mineralizado rápidamente queda no disponible.

Si el flujo o reabastecimiento se interrumpe, el rendimiento del cultivo no será máximo. Existe un equilibrio entre el fósforo en la fase sólida y en la solución, lo que indica una liberación de iones fosfato hacia la solución del suelo. Si los iones fosfato no son absorbidos por los vegetales llegará un punto en el cuál éstos se fijarán quedando sorbidos o adsorbidos sobre la fase sólida. Este equilibrio está gobernado entre otros factores por la oferta de fósforo en la fase sólida y la demanda de los vegetales, la temperatura, el pH, la actividad microbiana y el tipo de arcilla, que determinarán la cantidad de fósforo en la solución y la tasa de reposición. La concentración de un nutriente en la solución del suelo representa la intensidad del mismo, en este caso los fosfatos en solución (Quintero, 2002).

El fósforo y su importancia en los cultivos

Los requerimientos nutricionales de los cultivos varían según el nivel de producción y el manejo al que es sometido. Además la disponibilidad de los nutrientes está determinada tanto por factores edáficos como por la capacidad de la planta para tomarlos y utilizarlos. Con una fertilización equilibrada se obtendrán, no sólo pastos de excelente calidad, sino también, un aumento en la productividad (Díaz-Zorita y Gambaudo, 2007). Así mismo hay que tener en cuenta que la agricultura continua produce, en suelos de la Región Semiárida de la Región Pampeana Central (RSPC), disminuciones considerables del fósforo asimilable y en menor medida del fósforo inorgánico total (Buschiazzo *et al.*, 1994).

Particularmente, la alfalfa (*Medicago sativa* L.) es la principal especie forrajera del país y la base de la producción de carne y leche en la Región Pampeana. La difusión del cultivo se apoya en sus altos rendimientos de materia seca (MS. ha⁻¹), su excelente calidad forrajera y su gran adaptabilidad a diversas condiciones ambientales (suelo, clima y manejo) (Basigalup and Rosanigo, 2007).

Para una alta producción de forraje la alfalfa requiere suelos profundos (>1,2m), bien aireados, de reacción más bien neutra (pH 6,5 a 7,5) y buena fertilidad. A medida que las condiciones reales se alejen de este marco ideal, el cultivo disminuye su rendimiento y persistencia.

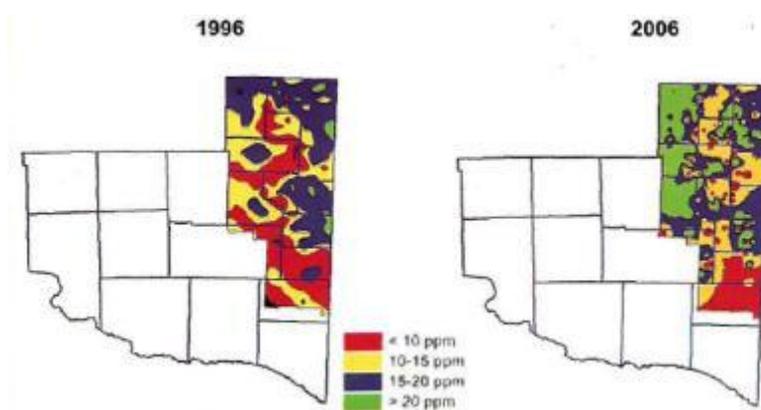
El fósforo es un elemento fundamental en la nutrición de la alfalfa porque interviene en múltiples procesos, como el desarrollo de la biomasa aérea y radicular, la capacidad de nodulación y de fijación de nitrógeno atmosférico, el funcionamiento de regiones meristemáticas, la fotosíntesis, la síntesis de carbohidratos y proteínas, la transferencia de energía (ATP), etc. Una adecuada provisión de P es fundamental no sólo para la productividad de la planta sino también para su tolerancia a factores de estrés (ej. sequía) y su persistencia. Suelos con niveles de P extractable inferiores a 25 ppm, y un pH neutro a ligeramente ácido, requieren del agregado de fertilizantes fosfatados para la correcta implantación y el desarrollo de la alfalfa. Estos niveles críticos son variables y dependen del nivel de producción y de la disponibilidad relativa de otros nutrientes (Basigalup y Rosanigo, 2007).

Se ha demostrado que las pasturas de alfalfa permiten recuperar los niveles de carbono orgánico y nitrógeno total de algunos suelos de la Región Semiárida Pampeana

Central (RSPC) (Bono and Fagioli, 1994; Loewy, 1994), pero que disminuyen significativamente sus contenidos de fósforo asimilable (Echeverría *et al.*, 1993). Los suelos de la Región Pampeana muestran una continua disminución en los niveles de fósforo disponible. Esta disminución ha sido atribuida a la mayor producción de granos y el reducido uso de fertilizantes fosfatados. El balance de fósforo de los suelos pampeanos, determinados como la diferencia entre el fósforo exportado en granos y el aplicado con los fertilizantes, sigue siendo ampliamente negativo a pesar del incremento de uso de fertilizantes observado en la última década (García, 2001). En la Región Semiárida Pampeana (RSP), en 1980 las áreas con deficiencias de fósforo (valores menores a 10 ppm) se localizaban en los departamentos Guatraché, parte de Hucal y Utracán y ocasionalmente aparecían en otros lugares. Tanto los departamentos mencionados como Trenel se encuentran afectados casi en su totalidad. Zonas con niveles medios a deficientes comienzan a ser frecuentes en los departamentos Capital y Toay. Los departamentos Realicó, Maracó, Quemú, Catrilo, Atreuco y Chapaleufú, presentan aún zonas con buena a mediana disponibilidad (Montoya y otros, 1999).

En el año 2006 se realizó una actualización del mapa de fósforo asimilable, en el cual no predominaron las áreas de deficiencia como ocurrió en el mapa del año 1996 (Romano y Roberto, 2007). De todas maneras la zona de la planicie con tosca presentó valores deficientes de fósforo asimilable, al igual que los departamentos del sur de la provincia tal como Guatraché y Hucal. Las diferencias entre los mapas de 1996 y 2006 (Figura 2) fueron en mayor medida debido a diferencias metodológicas y en función a la respuesta al fósforo en los cultivos se puede pensar que la disponibilidad del nutriente es congruente con las determinaciones anteriores.

Figura 2: Evolución de los contenidos de fósforo para el período 1996-2006. (Montoya y otros, 1999; Romano y Roberto, 2007).



Caracterización de las distintas formas de fósforo en el suelo

En el suelo, el fósforo se encuentra tanto en formas orgánicas como inorgánicas y su disponibilidad para las plantas está condicionada por reacciones fisicoquímicas y biológicas (Boschetti *et al.*, 2003). El movimiento del fósforo del suelo hacia las raíces ocurre en una pequeña área alrededor de las raíces, y esta transferencia de fósforo es afectada por las interacciones entre el suelo y la planta. Para la determinación de las diversas formas de fósforo presentes en el suelo una de las técnicas más difundidas fue la propuesta por Hedley *et al.* (1982), quienes desarrollaron un método de fraccionamiento secuencial de este elemento del suelo para caracterizar diferentes fracciones de acuerdo a su grado de disponibilidad y asociación con distintos compuestos (Tabla 1).

Tabla 1: Fraccionamiento secuencial de fósforo modificado de Hedley y designación de las fracciones.

Reactivo	Fracción	Interpretación
NaHCO₃ 0,5M pH 8,5	Pi-HCO ₃	Pi lábil
	Po-HCO ₃	Po lábil (microbial)
NaOH 0,1 M	Pi-NaOH	Pi moderadamente lábil retenido por quimioadsorción superficial en compuestos de Fe y Al
	Po-NaOH	Po moderadamente lábil ligado a ácidos húmicos y fúlvicos
HCl 1 M	Pi-HCl	Pi protegido físicamente en microagregados

Este fraccionamiento tiene por objetivo determinar el fósforo lábil (extraído con resinas de intercambio aniónico y NaHCO₃), fósforo asociado con hierro y aluminio (extraído con NaOH), fósforo asociado con calcio (extraído con HCl) y formas más resistentes de fósforo extraídas por digestión. En las extracciones con NaHCO₃ y NaOH las fracciones de fósforo se subdividen en orgánicas e inorgánicas (Tiessen and Moir, 1993).

Las plantas absorberían más fácilmente las fracciones inorgánicas extraídas con resinas, NaHCO_3 y NaOH . En tanto que la fracción obtenida con HCl sería la de menor disponibilidad. Con respecto al fósforo orgánico, la fracción extraída con NaHCO_3 correspondería al fósforo inmovilizado por los microorganismos presentes en la rizósfera y en consecuencia, de rápida mineralización. El fósforo orgánico extraído con NaOH correspondería a los fosfatos asociados en estructuras orgánicas más estables. La fracción de fósforo extraíble con HCl se estima que corresponde a compuestos de fósforo asociados al calcio, que aumentan su solubilidad cuando el pH disminuye.

Fósforo: fertilizantes y problemática

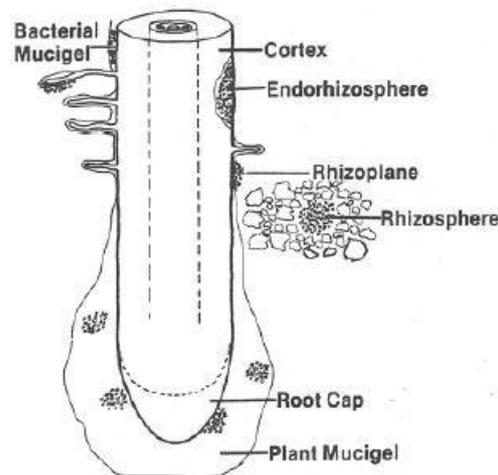
Cuando aplicamos fertilizantes fosfatados estos se difunden en el suelo y si no son absorbidos por las raíces de las plantas, serán absorbidos por las partículas del suelo o precipitarán de manera que su disponibilidad se reducirá en el tiempo. La cantidad de fósforo total en los suelos es muy superior a lo que necesitan los cultivos, pero la baja solubilidad de los compuestos que forma y los sitios de absorción que compiten por fósforo con las plantas generan una baja disponibilidad. Cuando los suelos son cultivados, esta baja disponibilidad se traduce en una deficiencia de este elemento que tendrá que ser compensada con fertilización (Loewy, 1994). El resto del fósforo que se aplica como fertilizante, no aprovechable por el cultivo, contribuye a aumentar la reserva del suelo, pero es de lenta residualidad. Pero una aplicación regular de fertilizantes fosforados no solo implica un costo económico, sino también ambiental, lo cual resulta indeseable. Esto ha llevado a la búsqueda de una alternativa, que sea rentable ecológica y económicamente para la producción en suelos con bajos niveles de fósforo. En este contexto, es que surgen los biofertilizantes o inoculantes, los cuales aprovechan los beneficios que aportan microorganismos denominados PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) en contacto con el suelo y el cultivo para ejercer la función de fertilización. Específicamente para el caso del fósforo, microorganismos con actividad solubilizadora de fósforo pueden proveer de formas solubles de este elemento a las plantas y por ende se convierten en una buena opción para la sustitución de los fertilizantes químicos (Rodríguez and Fraga, 1999).

Bacterias promotoras de crecimiento vegetal

De los ambientes en los cuales crecen las plantas, el suelo es el más complejo ya que no solo afecta directamente el desarrollo de las raíces sino que influye en el crecimiento y los rendimientos de las partes aéreas. La coordinación entre los procesos de desarrollo de las diferentes partes de la planta se evidencia en sus cambios de tamaño a medida que ocurre el crecimiento. En éste influyen factores edafoclimáticos, químicos y biológicos, ninguno de los cuales debe obviarse al momento de estudiar algún proceso que involucre un vegetal y su entorno (Gárate y Bonilla, 2000). Las interacciones entre planta-suelo-microorganismo tienen gran importancia en la producción de los cultivos y la fertilidad del suelo. Ese ambiente, bajo la influencia de las raíces es llamado “rizósfera” (Figura 3) (Lynch and Whipps, 1990). La densidad y la distribución bacteriana en el ambiente, obedecen principalmente al tipo y cantidad de excreciones de la raíz, a la genética y edad de la planta y a las condiciones ambientales (Paul and Clark, 1989; Primavesi, 1984; Alexander^a, 1980).

Figura 3: La raíz y su zona de influencia.

http://heartspring.net/compost_tea_disease_control.html

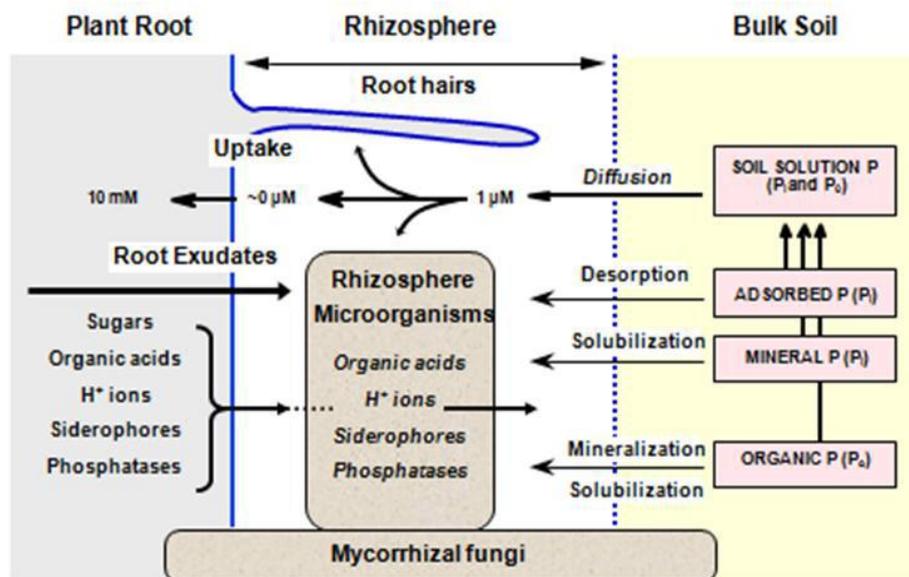


La rizósfera es dinámica, puede cambiar rápidamente en espacio y tiempo lo suficiente como para alterar sus características. Estos cambios pueden influenciar las asociaciones entre la planta y la comunidad microbiana. Los límites de la rizósfera son difíciles de definir. Una solución sencilla a este problema podría ser dividir a esta área en rizósfera, endorizósfera, rizoplaneo y raíz. Además, dentro de las partes de la raíz podemos destacar el ápice radical, que tiene como función primaria proteger el meristema de la raíz a medida que esta se mueve por el suelo. El ápice produce mucílago y otras sustancias para mejorar el crecimiento de las células (Kennedy, 2005).

El mucigel constituye un material gelatinoso de la superficie de las raíces que incluyen mucílagos vegetales, células bacterianas y sus productos metabólicos así como coloides minerales y materia orgánica del suelo. Esta zona es muy importante ya que mantiene a las raíces y al suelo en contacto y es un reservorio de nutrientes y agua para el vegetal. Su extensión a lo largo del sistema radical es variable (Frioni, 1999).

Diversos factores ambientales, tales como el carbono y las fuentes de energía, los nutrientes minerales, los factores de crecimiento, los iones presentes, el agua disponible, la temperatura, la presión, la composición del aire, la radiación electromagnética, el pH, los potenciales de oxido-reducción, las superficies, las relaciones espaciales, la genética de los microorganismos y la interacción entre ellos, pueden afectar la ecología, la actividad y la dinámica de la población microbiana en el suelo (Figura 4). Estos factores ambientales pueden cambiar notablemente, por lo tanto el suelo es un sistema dinámico (Nannipieri *et al.*, 2003).

Figura 4: Representación esquemática de los procesos fisiológicos y químicos que influyen en la disponibilidad del fósforo en la rizósfera (Richardson, 2007).



Los microorganismos del suelo constituyen un factor clave en el ciclaje de los nutrientes y la fertilidad de los suelos. Las rizobacterias que establecen interacciones positivas con las raíces de las plantas, juegan un rol fundamental en los ambientes agrícolas y son promisorias por su uso potencial en una agricultura sostenible (Kloepper, 1996; Glick, 1995).

En el suelo se encuentran dos tipos de bacterias que producen beneficios a las plantas, aquellas que forman una relación simbiótica y las que no son simbióticas también denominadas de “vida libre”. Estas últimas a menudo se encuentran cerca o sobre las raíces o aún dentro de las mismas (endófitos) (Kloepper *et al.*, 1989; Frommel *et al.*, 1991). Generalmente son conocidas como “Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal”, denominadas PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacterias*) (Kloepper *et al.*, 1989). Dentro de los mecanismos PGPR podemos encontrar: la fijación biológica de nitrógeno, la producción de sideróforos, la solubilización de fósforo, la producción de fitohormonas, la producción de antibióticos, etc. Bashan y Holguin (1998) propusieron un concepto para definir científicamente las PGPR: por un lado las denominadas bacterias promotoras del crecimiento vegetal por biocontrol (Biocontrol-PGPB), que incluye a las bacterias que suprimen el desarrollo de patógenos, ya sea por producción de sustancias inhibitorias o por incremento de la resistencia natural de la planta, y las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), aplicables a las bacterias que afectan a las plantas por medio de otros mecanismos diferentes al biocontrol. Hay suficiente evidencia de que el modo de acción de muchos microorganismos promotores del crecimiento vegetal es por incrementar la disponibilidad de nutrientes en la rizósfera de las plantas. La manera por la cual estas bacterias producen esta mayor disponibilidad implica la solubilización de nutrientes o la producción de determinadas sustancias, que ayudan facilitando el transporte de estos (Vessey, 2003). Con estos términos se incluyen todos los grupos bacterianos que son beneficiosos para las plantas, y que podrían utilizarse en la promoción del crecimiento vegetal (Carletti y otros, 2003).

Es indiscutible que el conocimiento de estos microorganismos usados como inoculantes simples o coinoculados mejoran la producción de numerosos cultivos, tal como lo informado por Fulchieri and Frioni (1994) en maíz; Halverson and Haldeman (1991) y Dasthi *et al.*, (1998) en soja; aumentando la disponibilidad de nutrientes o estimulando la infección y en consecuencia la fijación de nitrógeno.

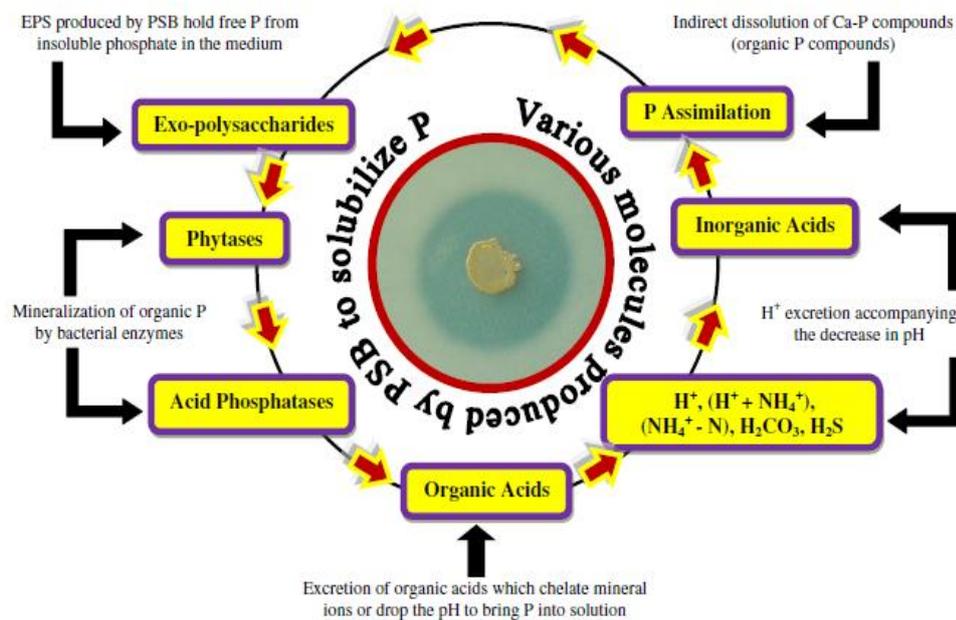
El manejo biotecnológico de los microorganismos del suelo, como de la rizósfera para promover el crecimiento de las plantas y lograr el control biológico de los patógenos, es un tema prioritario en el campo de la investigación.

Bacterias solubilizadoras de fósforo

Como ya se dijo el fósforo es uno de los principales macronutrientes esenciales para el crecimiento y desarrollo de plantas y microorganismos (Abd-Alla, 1994; Yadav and Dadarwal, 1997; Illmer and Shinner, 1992; Fernández *et al.*, 2005). La mayoría de los suelos agrícolas contienen grandes reservas de fósforo total y una parte de la acumulación de este elemento depende de la aplicación regular de fertilizantes químicos (Gyaneshwar *et al.*, 2002; de Bashan and Bashan, 2004). Las plantas deben absorberlo del suelo, donde se encuentra en muy baja concentración disponible, normalmente varía entre 5 y 30 mg/kg. Estos índices bajos del nutriente se deben a que el fósforo soluble reacciona con iones como el calcio, el hierro o el aluminio que provocan su precipitación o fijación, disminuyendo su disponibilidad para los vegetales (Rodríguez and Fraga, 1999; Fernández *et al.*, 2007). Para evitar el problema de la deficiencia del fósforo, se añaden abonos químicos a los suelos. La producción de fertilizantes químicos fosfatados es un proceso que requiere gran cantidad de energía cuyo costo asciende a 4 mil millones de dólares por año con el fin de satisfacer la necesidad mundial (Goldstein *et al.*, 1993). Los fosfatos inorgánicos aplicados como fertilizantes químicos también son inmovilizados en el suelo y como consecuencia no están solubles para ser aprovechados por los cultivos (Peix *et al.*, 2001). Entonces se produce un exceso descontrolado en la aplicación de fertilizantes que contienen fósforo que se conocen como la causa de problemas económicos y medioambientales. Por otra parte la producción tradicional de fertilizantes se basa en el proceso químico a partir de un mineral insoluble con alta cantidad de fosfato, el cual implica un tratamiento energético intensivo con ácido sulfúrico y alta temperatura. Este proceso es indeseable a nivel medioambiental, por la liberación de contaminantes que tienen que ser manejados convenientemente para preservar recursos como el agua y el aire. Además el uso de fósforo se ha transformado en una práctica de alto costo por el agotamiento que se está produciendo de las fuentes de calidad de fósforo, lo que implica aplicar los tratamientos industriales a rocas de menor calidad, incrementando los costos para obtener los mismos resultados y esto conduce a la necesidad de buscar alternativas (Isherwood, 2000). Algunos microorganismos, conocidos como solubilizadores de fósforo (PSB), transforman el fósforo insoluble en soluble a través del proceso de acidificación, quelación e intercambio de iones. Este proceso no solo compensa los altos costos de manufactura de los fertilizantes sino que moviliza los

fertilizantes agregados al suelo. Por lo tanto muchos investigadores han tratado de aumentar la fracción de fosfato disponible para las plantas por medio de bacterias solubilizadoras de fósforo, tales como *Pseudomonas* (Suh *et al.*, 1995), *Bacillus* (Raj *et al.*, 1981), *Enterobacter* (Laheurte and Berthelin, 1988), *Agrobacterium* y *Aspergillus* (Varsha and Patel, 2000). Estos microorganismos crecen en medios con fosfato tricálcico, apatita o materiales insolubles similares como única fuente de fosfato y no solo asimilan el elemento sino que solubilizan una gran proporción del mismo, liberándolo en cantidades superiores a sus demandas nutricionales (Figura 5) (Fernández *et al.*, 2005).

Figura 5: Sustancias orgánicas e inorgánicas producidas por PSB (Zaidi *et al.* 2009)



HIPÓTESIS Y OBJETIVO

El fósforo total presenta en los suelos de la Región Semiárida Pampeana valores que fluctúan entre medios y bajos y existe una predominancia de los fosfatos inorgánicos de calcio, como hidroxiapatita y fluorapatita (Buschiazzo *et al.*, 1994), que son los menos solubles.

Los fosfatos de calcio son solubles en diversos grados en presencia de una amplia gama de ácidos orgánicos producidos por microorganismos. Existen otros mecanismos de solubilización, por lo que la conversión de fosfatos minerales a fósforo disponible se atribuye genéricamente a los microorganismos en la mayoría de las representaciones del ciclo del fósforo (Figura 1).

En función de los antecedentes citados se plantea como hipótesis de este trabajo que **“las bacterias solubilizadoras de fósforo actúan sobre las distintas fracciones de este elemento aumentando su disponibilidad para satisfacer los requerimientos de la alfalfa (*Medicago sativa* L.)”**

El objetivo del presente trabajo es **“Comprobar la acción de bacterias solubilizadoras de fósforo sobre las distintas fracciones de este elemento en el suelo y cuantificar su disponibilidad”**.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra

Se tomó una muestra de la capa arable de un suelo de la Región Semiárida Pampeana, perteneciente al campo de enseñanza de la UNLPam, teniendo en cuenta que éste no se encontrara fertilizado. Además, se tuvo en consideración que el suelo utilizado para el ensayo contuviera una baja concentración de fósforo disponible. Este suelo sin tratar es el que se utilizó como control del ensayo.

Microorganismos

Se utilizaron dos aislamientos de nuestro laboratorio X5-2 y 8W (del género *Burkholderia* y *Pseudomonas*, respectivamente) y una cepa de referencia 21 (*Pseudomona putida*), suministradas por la Dra. Susana Rosas de la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC) (García, 2011).

Para el aislamiento de bacterias solubilizadoras de fósforo se utilizó el medio indicado por Frioni (1999) con modificaciones realizadas en nuestro laboratorio. Éstas se conservaron con glicerol a bajas temperaturas hasta el momento del ensayo; para lo cual fueron reactivadas en el mismo medio de cultivo que se utilizó para el aislamiento, cuya composición se detalla en la siguiente tabla (tabla 2).

Tabla 2: Medio de Cultivo para PSB

Componente	Concentración (g/L)
Caldo Nutritivo	8
Extracto de Levadura	2
Glucosa	20
CaHPO ₄	4
Agar	22

pH 7

Se utilizó como fuente de fosfato insoluble fosfato de calcio (Ca₃(PO₄)₂) o fosfato ácido de calcio (CaHPO₄) por ser característicos de los suelos de esta región donde fueron aisladas las bacterias. Una vez estéril, el medio de cultivo se extendió en placa de Petri

formando una capa fina manteniendo, mediante agitación, la homogeneidad del fosfato insoluble en la totalidad de la placa. La solubilización se determinó por el halo de aclaración que se produce alrededor de la colonia que posee la capacidad solubilizadora (Figura 6). Este medio tiene la particularidad de que el halo se ve más rápido y por lo tanto, los aislamientos se detectan antes de que las placas se contaminen con otros microorganismos.

Figura 6: Placa con medio Frioni modificado inoculada con dilución de suelo.



Diseño experimental

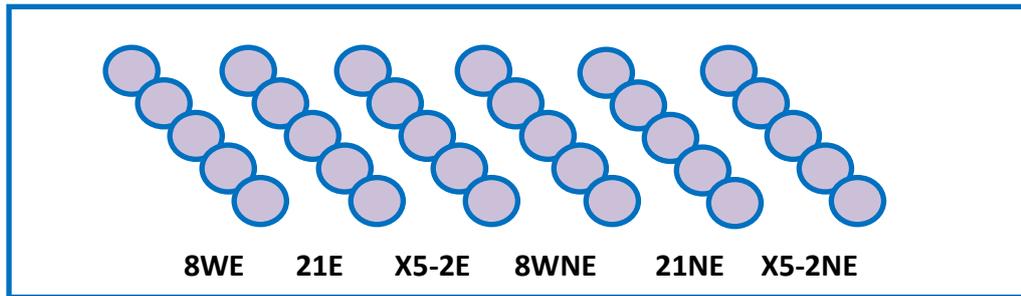
El estudio se llevó a cabo en un ensayo que consistió en colocar el suelo en macetas, para lo cual se emplearon tubos de PCV de 8,5 cm de diámetro y 49 cm de alto. Una vez llenas las macetas con suelo, éstas fueron inoculadas con X5-2, 8W y 21.

A su vez, se evaluó si se encontraría diferencia entre un suelo no estéril (NE) y uno esterilizado (E) (Figura 7).

Para cada tratamiento y el control se utilizaron cinco macetas, es decir que en total se tuvo treinta y cinco macetas de las cuales se tomaron muestra para realizar a cada una las determinaciones de laboratorio.

Para la inoculación de las macetas se tuvo en cuenta el tamaño de las mismas y la cantidad de suelo que contenía cada una; de esta forma se logró que cada tratamiento contuviera la misma carga bacteriana.

Figura 7: Esquema del diseño experimental



Durante los dos meses de ensayo las macetas fueron regadas periódicamente con agua de lluvia para mantener la humedad del suelo. Al cabo de este tiempo, se tomaron muestras representativas para realizar diferentes determinaciones. Antes de ello, las muestras secas al aire, fueron molidas con un mortero y tamizadas por una malla de 0,5 mm (Selles *et al.*, 1999).

Determinaciones de Laboratorio

A todas las muestras del ensayo en condiciones controladas de laboratorio se les realizaron las siguientes determinaciones:

- ✓ pH en agua relación 1:2,5 por el método potenciométrico
- ✓ Fósforo disponible por Bray-Kurtz
- ✓ Fracciones de fósforo orgánico e inorgánico (Hedley *et al.*, 1982)
- ✓ Fósforo Total (PT) por calcinación y extracción con H₂SO₄ 0,2 N, fósforo Inorgánico (PI) por extracción con H₂SO₄ 0,2 N, fósforo Orgánico (PO) obtenido por diferencia entre PT y PI (Kaila, 1962)

Para la determinación de fósforo disponible en suelo se utilizó la técnica propuesta por Bray y Kurtz en 1945 que se conoce como Bray-Kurtz n°1. Se trata de una extracción con una solución que se prepara con fluoruro de amonio 0,03 N y HCl 0,025 N.

Para el fraccionamiento de fósforo se empleó el método secuencial originalmente propuesto por Hedley *et al.*, (1982), y posteriormente modificado por Tiessen and Moir (1993) para extraer las fracciones de Po (P Orgánico) y Pi (P inorgánico). El P se extrajo secuencialmente, en una muestra de 0,5 g de suelo con 30 mL de NaHCO₃ 0,5M a pH 8,5, con 30 mL de NaOH 0,1M, y con 30 mL de HCl 1M. En cada extracción, las muestras se agitaron durante 16 horas, luego se centrifugaron, filtraron, y posteriormente se determinó Pi en el sobrenadante.

En los extractos de NaHCO₃ y NaOH además de Pi se cuantificó P total (Pt), autoclavándolos conjuntamente con el agregado de Persulfato de Potasio y H₂SO₄ 5,5M, para poder oxidar las formas orgánicas de P a Pi (Picone *et al.*, 2007). Se estimaron el Po-NaHCO₃ y Po-NaOH calculando la diferencia entre Pt y Pi de los correspondientes extractos.

La concentración de P, en todos los casos, se determinó colorimétricamente utilizando el método del molibdato-ácido ascórbico (Murphy and Riley, 1962) previo ajuste del pH entre 5,4-6,6 con H₂SO₄ o NaOH, y empleando p-nitrofenol como indicador. La longitud de onda a la cual se determina la concentración de fósforo es 882nm. Este es un método colorimétrico por el cual se determina el fósforo bajo la forma de ortofosfato soluble o asimilable que así se encuentra en la muestra o todas aquellas especies fosforadas que se transformen en él. El principio del método se basa en que el molibdato de amonio y el tartrato de antimonio y potasio reaccionan en medio ácido con el ortofosfato presente en la muestra para formar un heteropoliácido (o ácido molibdofosfórico) que se reduce a azul de molibdeno, de color azul intenso por acción del ácido ascórbico. Estos compuestos, denominados heteropoliácidos, se forman por enlaces de coordinación donde el fósforo actúa como ión central al cual se le unen 4 grupos moleculares de molibdeno (cada uno reemplaza un átomo de oxígeno del ortofosfato).



Descripción de la extracción secuencial

En el procedimiento de extracción secuencial (Figura 8) los extractantes fueron seleccionados tal que remuevan primero las formas más lábiles de fósforo inorgánico y orgánico seguido de la remoción de formas más estables de fósforo con extractantes más fuertes.

El primer extractante, NaHCO₃ (ac) fue usado para remover el fósforo orgánico (Po-HCO₃) e inorgánico (Pi-HCO₃) lábiles sorbidos en la superficie del suelo más una pequeña cantidad de fósforo microbiológico.

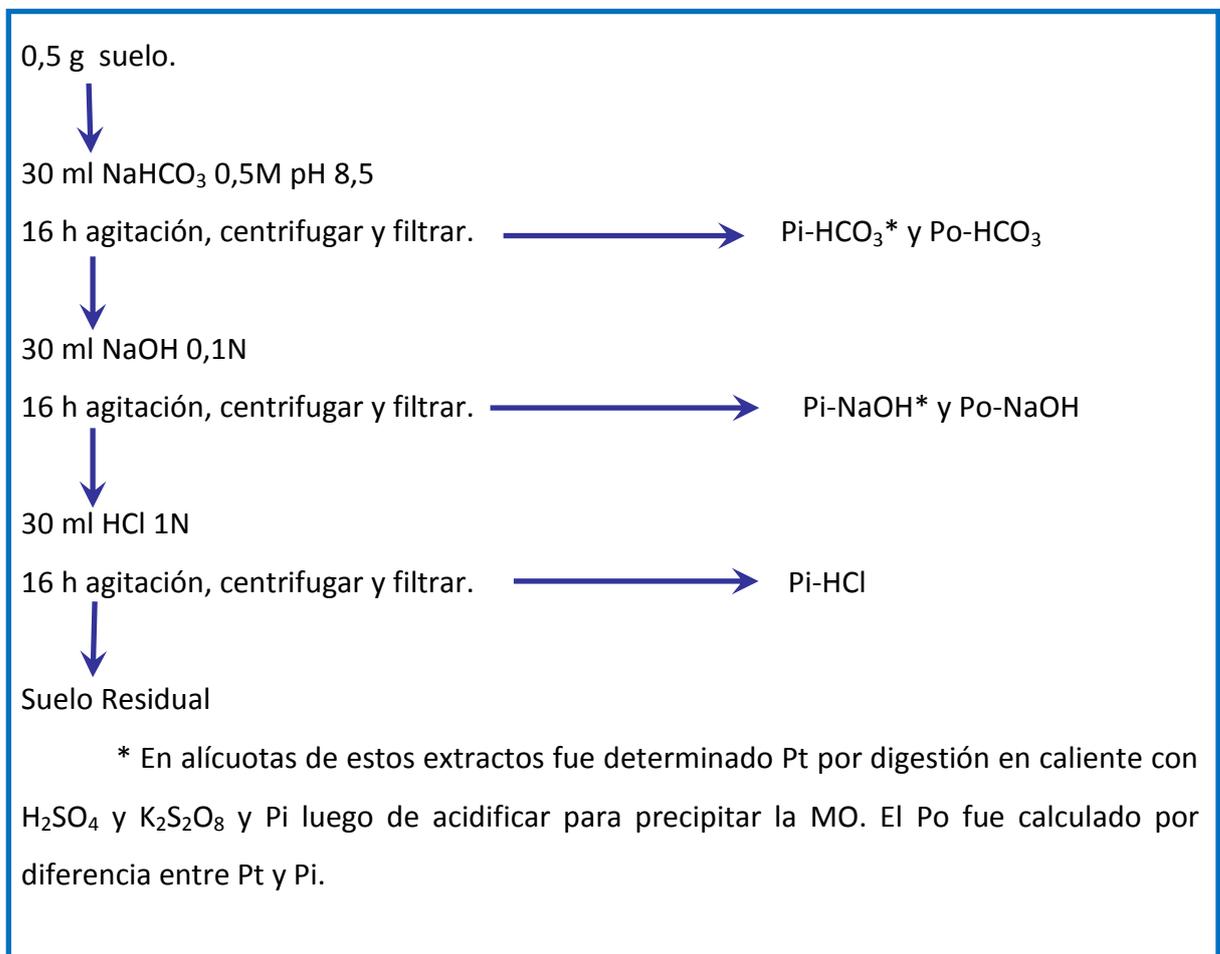
El NaOH (ac) remueve el fósforo enlazado a compuestos de hierro y aluminio (Pi-NaOH) y el asociado a compuestos húmicos (Po-NaOH).

El procedimiento de Hedley contempla una segunda extracción con NaOH después del tratamiento de las muestras con ultrasonido. En este trabajo esta fracción

correspondiente al fósforo ocluido ligado al hierro y aluminio no fue determinada dado que estudios realizados por Hepper *et al.*, (1996) y Urioste *et al.*, (1996) en suelos de esta región indican que la cantidad de esta fracción de fósforo es despreciable. Por este motivo se decidió eliminar esta etapa y proceder a la extracción con HCl que fue usado para remover los minerales relativamente insolubles tipo apatita (Pi-HCl).

El residuo de suelo de esta extracción secuencial conteniendo fósforo inorgánico insoluble y las formas más estables de fósforo orgánico tampoco fue determinado, ya que para este ensayo no era una fracción relevante para cuantificarse debido a que las bacterias solubilizadoras no ejercen su acción sobre esta fracción.

Figura 8: Esquema de Extracción secuencial modificado.



Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó aplicando ANOVA y Test de Tukey utilizando el programa INFOSTAT.

En cada caso se comparó la media del control con la media de cada tratamiento inoculado para cada fracción.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La razón de medir conjuntamente el pH y la solubilización de fósforo es para establecer una relación entre estos dos parámetros, ya que se sabe que el principal mecanismo microbiológico por el cual los compuestos fosfatados son movilizados es la disminución del pH del medio por la liberación de ácidos orgánicos (Alexander, 1980; Kim *et al.*, 1998; Rashid *et al.*, 2004). En la tabla 3 se presentan los resultados obtenidos para las medidas de pH. Estos valores oscilan entre 6,5 y 7,3. Si bien se ve que hay una disminución en los valores para los tratamientos con suelo no esterilizado (NE) respecto de los tratamientos con suelo estéril (E) esta diferencia no es significativa. Esto es de esperarse, debido a que si bien los microorganismos presentes en el suelo producen ácidos orgánicos que provocan la disminución del pH del mismo, éstos son de carácter débil. Además es sabido que en el proceso de solubilización, el tipo de ácido secretado por el microorganismo es más importante que la cantidad (Gyaneshwar *et al.*, 1998, Halder *et al.*, 1990). Igualmente, el mismo suelo cuenta con un sistema buffer que tiene la capacidad de amortiguar estos cambios evitando que se modifique la interacción entre él y los cultivos.

Tabla 3: Datos de pH determinados en el control y los distintos tratamientos.

Tratamiento	pH
CONTROL	6,9
X5-2 NE	6,7
8W NE	6,5
21 NE	6,8
X5-2 E	7,2
8W E	7,3
21 E	7,3

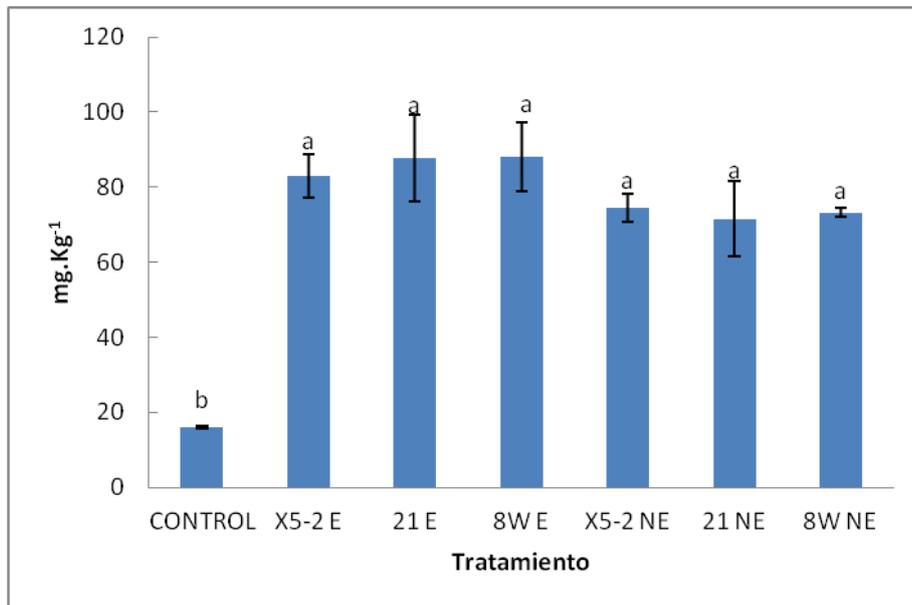
NE: No Esterilizado; E: Esterilizado

Para el caso de fósforo extraíble por Bray-Kurtz, los datos son presentados en el gráfico 2. Haciendo un análisis de estos datos se puede ver que todos los tratamientos inoculados presentan una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la concentración de fósforo respecto al control. Esto coincide con lo informado por Nahas (1996); Kumar *et al.*, (2001) los cuales encontraron, en condiciones de laboratorio, que las bacterias solubilizadoras de fósforo crecen en medios con fosfato tricálcico, apatita o materiales insolubles similares como única fuente de fosfato y no sólo asimilan el elemento sino que solubilizan una gran proporción del mismo, liberándolo en cantidades superiores a sus demandas nutricionales.

Como se ve en el gráfico 2 la concentración inicial de P disponible en el suelo estudiado es $16,1 \text{ mg.Kg}^{-1}$, mientras que después de los dos meses de ensayo y para cada tratamiento estos valores aumentan a concentraciones entre $70\text{-}80 \text{ mg.Kg}^{-1}$. Estos resultados son coincidentes con Fernández *et al.*, (2005) quienes estudiaron el efecto solubilizador de diferentes aislamientos de suelos cultivados con soja. Uno de los aislamientos obtenidos por ellos corresponden a bacterias del género *Bradyrhizobium* y éstas mostraron resultados comparables a los obtenidos en este trabajo ($71\text{-}85 \text{ mg.Kg}^{-1}$).

Por otra parte, al relacionar los valores de pH y fósforo disponible se ve que si bien hay un gran aumento en la concentración de P, el pH del suelo no sufre gran cambio. Esta falta de relación observada entre el pH y el contenido de fósforo solubilizado sugiere que podrían existir otros mecanismos involucrados en la solubilización de los compuestos de fósforo, como observaron otros autores (Illmer y Schinner, 1992), sumados a la capacidad reguladora del suelo como se mencionó anteriormente (pag.19).

Gráfico 2: Determinación de fósforo disponible extraído por Bray-Kurtz



En la tabla 4 se presenta el valor promedio de las fracciones de fósforo para cada tratamiento. Si observamos los valores de Pi (fósforo inorgánico) para cada extractante (NaHCO_3 , NaOH y HCl), en general los contenidos más altos corresponden a Pi- HCl ($214,3\text{-}302,8 \text{ mg.Kg}^{-1}$) y los más bajos a Pi- NaOH ($6,5\text{-}32,9 \text{ mg.Kg}^{-1}$), mientras que Pi- NaHCO_3 presentó valores intermedios ($21,1\text{-}94,9 \text{ mg.Kg}^{-1}$). Estos valores se corresponden los obtenidos con Hepper *et al.*, 1996, quienes estudiaron el efecto de la agricultura sobre fracciones de fósforo en suelos de la Región Semiárida Pampeana Central.

En cuanto al Po, se puede decir que los valores más altos se atribuyen al extraído con NaOH ($16,4\text{-}21,1 \text{ mg.Kg}^{-1}$) y los más bajos corresponden al extraído con NaHCO_3 ($4,5\text{-}11,4 \text{ mg.Kg}^{-1}$). Se sabe que el mayor contenido de fósforo orgánico determina un aumento de las formas de mayor asimilabilidad (Po- HCO_3 y Po- NaOH), que por posterior mineralización se transformarían en Pi- HCO_3 (Cross and Schelesinger, 1995).

Estos resultados indican que en situaciones de déficit como de exceso de P deberían producirse, con el tiempo, cambios en la distribución de algunas de las fracciones que se verían reflejados en la capacidad de reabastecimiento del P del suelo. Por lo tanto, la acción conjunta de las bacterias solubilizadoras, junto con la dinámica del suelo parece ser una solución a la problemática que presentan los suelos con bajos contenidos de fósforo.

Tabla 4: Contenido de P en las diferentes fracciones orgánicas e inorgánicas obtenidas mediante extracción secuencial (Hedley *et al.*, 1982).

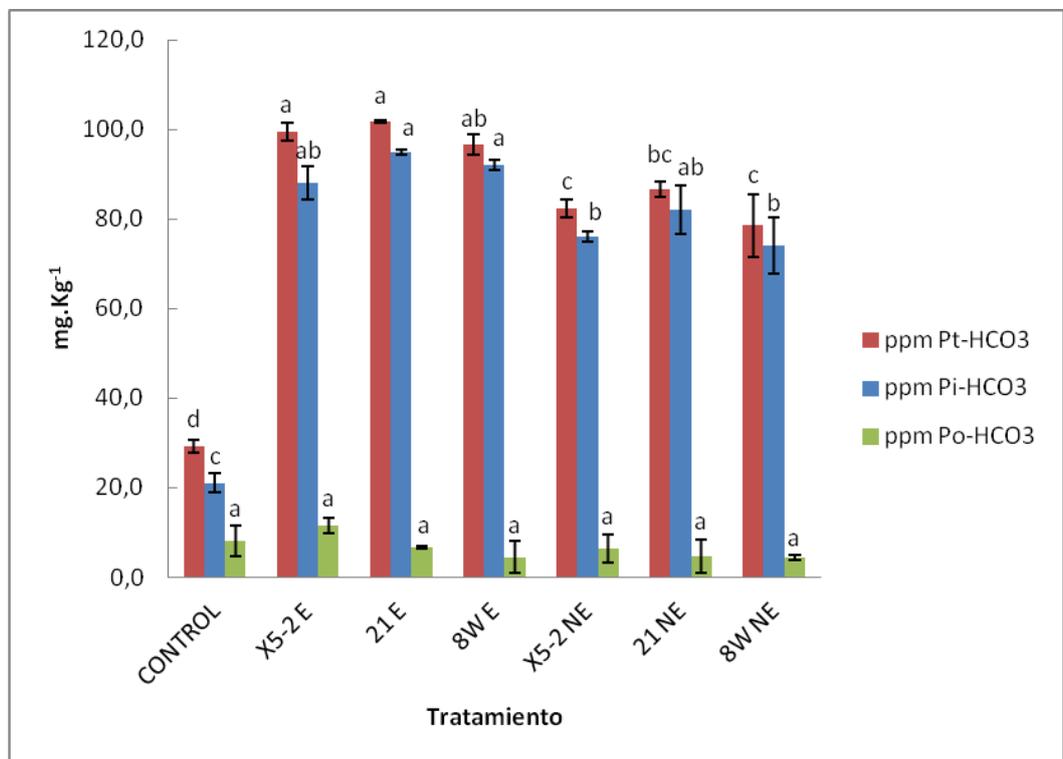
Muestra	Pi	Pt	Po	Pi	Pt	Po	Pi
	NaHCO ₃	NaHCO ₃	NaHCO ₃	NaOH	NaOH	NaOH	HCl
(mg.Kg ⁻¹)							
CONTROL	21,1±2,0	29,3±1,4	8,2±3,5	6,5±3,8	26,6±3,5	20,1±0,3	214,3±2,3
X5-2E	88,1±3,8	99,6±2,0	11,4±1,7	32,9±4,2	54,0±4,0	21,1±0,2	297,0±8,9
21E	94,9±0,6	101,6±0,3	6,7±0,3	28,2±0,7	44,6±0,6	16,4±0,1	285,6±18,6
8WE	92,0±1,2	96,5±2,3	4,5±3,5	30,5±0,4	50,5±3,8	20,0±4,2	302,8±0,0
X5-2NE	76,1±1,2	82,4±2,0	6,3±3,2	22,5±5,1	42,4±7,8	19,8±2,7	281,9±1,2
21 NE	82,0±5,5	86,7±1,7	4,7±3,8	20,9±0,2	39,7±2,3	18,8±2,1	242,6±37,2
8W NE	74,1±6,4	78,6±7,0	4,5±0,6	16,8±2,3	36,8±2,9	20,0±0,7	281,9±19,2

Estos resultados se representan gráficamente agrupando para cada tratamiento todas las fracciones correspondientes a cada uno de los extractantes NaHCO₃, NaOH y HCl (Gráfico 3, 4 y 5).

Para el caso del extractante NaHCO₃ (Gráfico 3) analizando la fracción para Pt-HCO₃ se puede apreciar que existe una diferencia estadísticamente significativa en todos los tratamientos al compararlos con el control. Este incremento se debe a que existe un aumento en la fracción Pi-HCO₃ en todos los tratamientos. Este mayor nivel de Pi lábil indica que hay una mayor cantidad de P biológicamente disponible, lo cual es consistente con la tendencia de una concentración mayor de P-BrayKurtz. Este resultado demuestra que la acción solubilizadora de los microorganismos es ejercida de manera tal que incrementa dicha fracción y por lo tanto, produce un aumento en la concentración de P disponible para la nutrición y desarrollo de las plantas. Es un resultado favorable, ya que las formas lábiles de fósforo, que son estimadas por la suma del P extraído con membrana de intercambio aniónico más el extraído con bicarbonato de sodio, por lo general presentan valores bajos y por lo tanto la cantidad de fósforo que está disponible para las plantas es una mínima porción del total (Boschetti *et al.*, 2003).

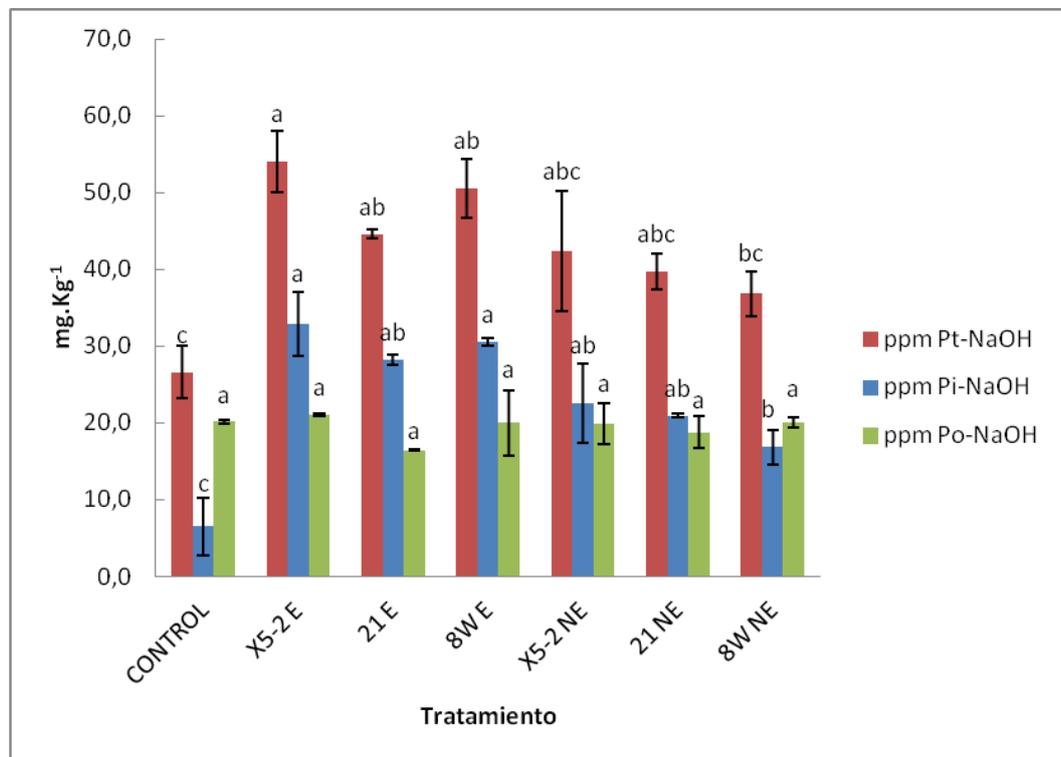
Los resultados obtenidos concuerdan con los logrados por otros autores quienes mostraron un incremento en las fracciones inorgánicas lábiles y moderadamente lábiles con la aplicación de P como fertilizante (Zhang and McKenzie, 1997). Por lo tanto, esto demuestra que la utilización de bacterias solubilizadoras de fósforo es una buena alternativa al uso de fertilizantes químicos ya que se obtienen resultados comparables, además de tener en cuenta que éstos no traen aparejado el problema de la contaminación del medio ambiente (Rodríguez and Fraga, 1999).

Gráfico 3: Determinación de fósforo para las fracciones extraídas con NaHCO_3 . Se comparan todos los tratamientos para cada una de las fracciones. Letras distintas indican diferencias significativas.



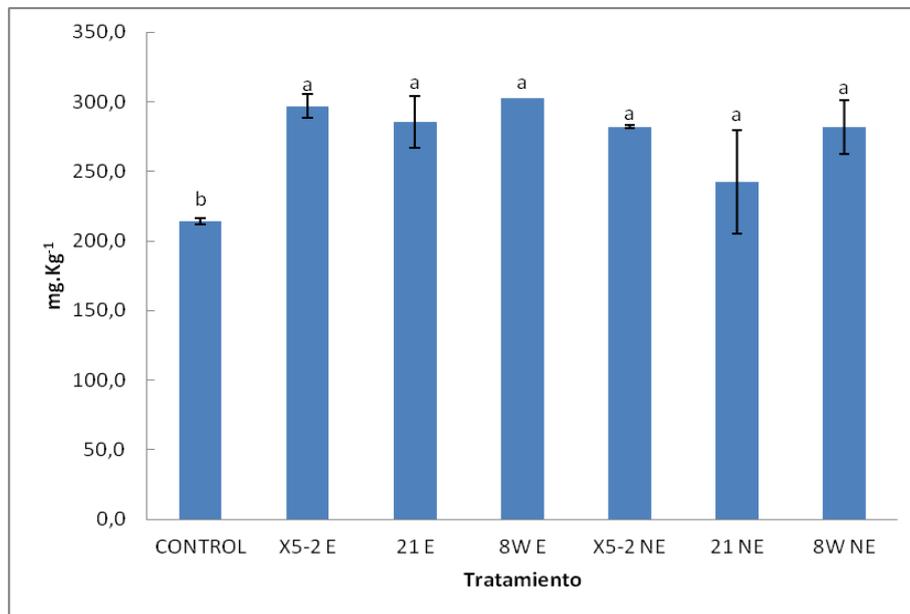
Para el caso del extractante NaOH (Gráfico 4) si bien se ve un aumento en todas las fracciones para todos los tratamientos, éste no es significativo en todos los casos. Esto demuestra que la acción solubilizadora de los microorganismos se centra principalmente en la fracción más lábil. Por ende, no se evidencian grandes cambios respecto al valor inicial de concentración de fósforo. Esto podría explicarse por lo expuesto por Van Getsel *et al.*, (1991) quien consideró que esta fracción se halla protegida del ataque microbiano por la adsorción a las partículas de arcilla.

Gráfico 4: Determinación de fósforo para las fracciones extraídas con NaOH. Se comparan todos los tratamientos para cada una de las fracciones. Letras distintas indican diferencias significativas.



Para el caso del extractante HCl (Gráfico 5) se observa que hay diferencia significativa de todos los tratamientos respecto al control. Los resultados para Pi-HCl, que corresponde al Pi más estable en minerales primarios de baja solubilidad como la apatita, muestran valores que oscilan entre 214,3-302,8 mg.Kg⁻¹. Estos valores coinciden con los obtenidos por Hepper *et al.*, (1996). Una razón por la cual podría explicarse este aumento de concentración en esta fracción es la propuesta por Lindsay (1979) quien indica que a partir de pH 6,5 existen condiciones favorables para la formación de fosfatos de calcio, los cuales se extraen con HCl. Estas concentraciones elevadas muestran que gran parte del fósforo presente en el suelo se encuentra de manera no disponible para ser utilizado por los cultivos, de forma que esta fracción representa una reserva de este elemento pero que de manera tal no puede ser aprovechada. Por ende, el suelo dispone del él pero no puede utilizarlo.

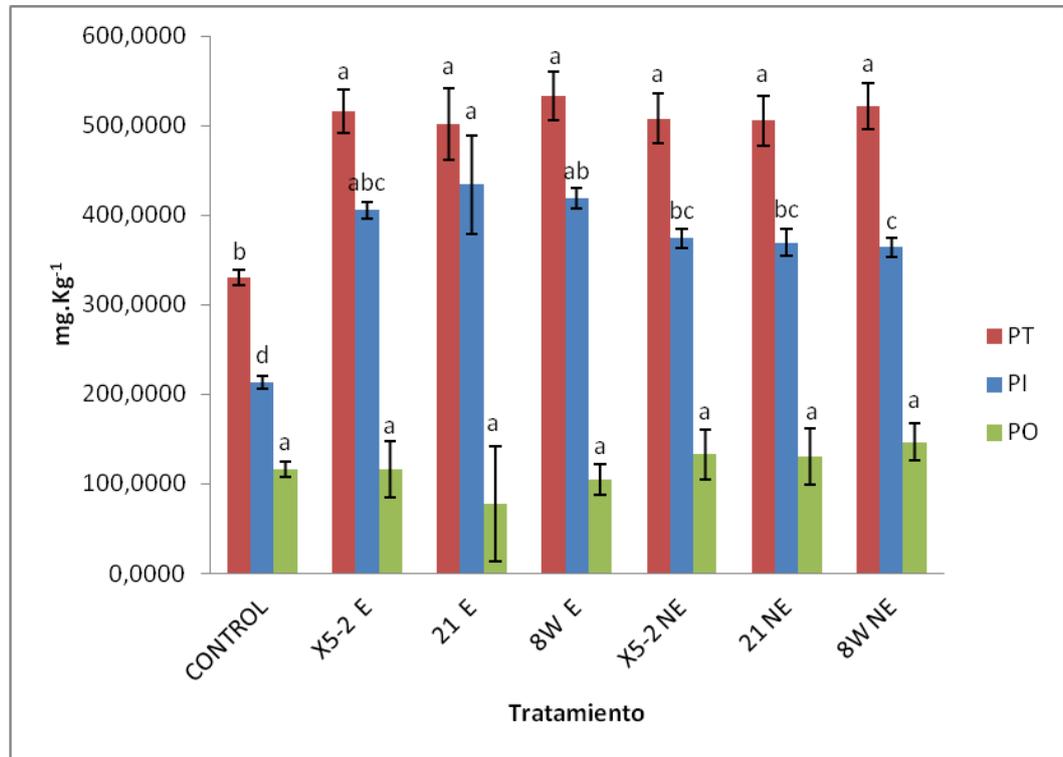
Gráfico 5: Determinación de fósforo para las fracciones extraídas con HCl. Se comparan todos los tratamientos. Letras distintas indican diferencias significativas.



En el Gráfico 6 se presentan los resultados para fósforo total, fósforo total inorgánico y fósforo total orgánico. Esta determinación se hizo con el fin de corroborar si los datos obtenidos en la extracción secuencial eran coherentes. Los valores de PT calculados por la sumatoria de las fracciones individuales fueron menores que el PT valorado en las muestras digeridas solamente para PT, esto se atribuye a que existen algunas formas muy recalcitrantes de Pi y Po que no serían totalmente extraídas durante el fraccionamiento (Cross and Schelesinger, 1995).

Confirmando observaciones previas, se concluye que la disponibilidad de P en estos suelos no estaría limitada por la concentración de P total sino por la proporción elevada de P en formas no lábiles, que a través de procesos biológicos, como la mineralización, microbiológicos, como la solubilización, y físico-químicos, como la desorción, regulan la concentración de P disponible.

Gráfico 6: Determinación de fósforo Total, Inorgánico y Orgánico. Se comparan todos los tratamientos para cada una de las fracciones. Letras distintas indican diferencias significativas.



De acuerdo al objetivo de este trabajo se confirmaría el incremento de la fracción inorgánica de los tratamientos inoculados con respecto al control, demostrando la acción de las bacterias solubilizadoras de fósforo.

CONCLUSIONES

La actividad solubilizadora de los microorganismos se centra principalmente en la fracción más lábil e inorgánica. Convirtiendo las fracciones no disponibles para los cultivos en formas asimilables para lograr el desarrollo y crecimiento.

La acción conjunta de las bacterias solubilizadoras, junto con la dinámica del suelo parece ser una solución a la problemática que presentan los suelos con bajos contenidos de fósforo disponible.

En general, no se observan diferencias en la acción de las bacterias utilizadas respecto a la extracción de las distintas fracciones consideradas, lo que estaría indicando que el mecanismo que ejercen es similar.

La utilización de bacterias solubilizadoras de fósforo es una buena alternativa al uso de fertilizantes químicos ya que se obtienen resultados comparables, además de tener en cuenta que éstos no traen aparejado el problema de la contaminación del medio ambiente.

Si bien se comprobó la acción positiva de las bacterias utilizadas, se debería probar si éstas se mantienen o potencian en presencia de plantas, dado que el cultivo sería una fuente adicional de moléculas de los exudados radiculares y de la interacción de otros mecanismos que contribuyen al efecto de las BSP.

BIBLIOGRAFIA

- Abd-Alla, M. H. 1994. Use of organic phosphorus by *Rhizobium leguminosarum biovar viciae* phosphatases. Biol. Fertil. Soils. 18: 216-218.
- Alexander, M. a 1980. Introducción a la Microbiología de Suelo. Jhon Wiley and Inc. Sons. Pag: 447-461.
- Alexander, M. b 1980. Transformaciones microbianas del fósforo. Introducción a la microbiología del suelo. AGT editor, México, 491: 355-371.
- Bashan, Y and Holguín, G. 1998. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth promoting bacteria) and PGPB. Soil Biol. Biochem. 30: 1225 – 1228.
- Basigalup, D. H. y Rossanigo, R. 2007. El cultivo de la alfalfa en la argentina. Cap. 1: 15-24. Ed, por D. H. Basigalup. INTA.
- Bono A, Fagioli M. 1994. Eficiencia de la alfalfa en la recuperación de la fertilidad nitrogenada del suelo en la región semiárida pampeana. Publicación Técnica N° 45. EEA Anguil, INTA. 11p.
- Boschetti NG, Quintero CE, Benavidez RA, Giuffre L. 2003. Cuantificación de las fracciones orgánicas e inorgánicas de Fósforo en suelos de la Mesopotamia argentina. Ciencia del Suelo 21 (1)
- Bray R and Kurtz L. 1945. Determination of total organic and available forms of phosphorus in soils. Soil Sci. 59:39-45.
- Buschiazzo, D.E.; Hevia, G.G.; Urioste, A.M.; Hepper, E.N. 1994. Phosphate forms and sorption in virgin and cultivated soils of the Semiarid Argentinian Pampas. XV int. Congress Soil Sei. 97-98.
- Carletti, S. M.; Rodríguez Cáceres, E. A.; Llorente, B. E. 2003. Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en la micropopagación de plantas. Microbiología agrícola: Un aporte de la investigación Argentina. Santiago del Estero. Pp: 119-129.
- Cross A.F, Schelesinger W.H. 1995. A literature review and evaluation of the Hendley fractionation: Applications to the biogeochemical cycle of soil phosphorus in natural ecosystems. Geoderma 64: 197-214.

- Dasthi, N.; Zhang, F.; Hynes, R. Smith, D. L. 1998. Plant Growth Promoting Rhizobacteria Accelerate Nodulation and Increase Nitrogen Fixation Activity by Field Grown Soybean (*Glicine max* (L) Merr.) Under Short Season Conditions *Plant and Soil*. 200: 205-213.
- de Bashan, L. E.; Bashan, Y. 2004. Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertilizer. *Water Res.* 38: 4222-4246.
- Díaz-Zorita M. y Gambaudo S. 2007. Fertilización y encalado en alfalfa. En *El Cultivo de la Alfalfa en la Argentina* Ed. D.H. Basigalup. Ediciones del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Cap. 11 pp: 229-246
- Echeverría N, Grossi T, Puricelli C A, Pelta H. 1993. Evolucion de cuatro parámetros del suelo en dos manejos contrastados. XIV Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. 305
- Fernández L.A; Zalba P; Gómez M.A. 2005. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Ciencias del Suelo*. 23: 31-37.
- Fernández, L. A.; Zalba, P.; Gómez, M. A. and Zagardoy, M. A. 2007. Phosphate-solubilization activity of bacterial strains in soil and their effect on soybean growth under greenhouse conditions. *Biol. Fert. Soils*. 43: 805-809.
- Frioni, L. 1999. Procesos microbiológicos. Editorial de la Fundación Universidad Nacional de Rio Cuarto. Tomo II. Cap I y II.
- Frommel, M. I.; Nowak, J. and Lazarovits, G. 1991. Growth enhancement and developmental modifications of in vitro growth potato (*Solanum tuberosum* ssp. *Tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiol*. 96: 928 – 936.
- Fulchieri, M. and Frioni, L 1994. *Azospirillum* Inoculation on Maize (*Zea mays*). Effect on Yield in a Field Experiment in Central Argentina. *Soil Biol. Biochem* 26 (7) Pag: 921-923.
- Gárate, A. Bonilla, I. 2000. Nutrición mineral y producción vegetal.
- García, F. O. 2001. Balance del Fósforo en los suelos de la Región Pampeana, *informaciones agronómicas del Cono Sur*, 9: 1 - 3, INPOFOS.

- García, P. 2011. Estudio de microorganismos promotores de crecimiento vegetal en rizósfera de alfalfa. Su incidencia en la simbiosis *Medicago sativa-Sinorhizobium meliloti*. Tesis doctoral
- Glick, B. R. 1995. The Enhancement of Plant Growth by Free-living Bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41: 107-120.
- Goldstein, A. H.; Rogers, R. D. and Mead, G. 1993. Separating phosphate from ores via bioprocessing. *Bio/Technology.* 11: 1250-1254.
- Gyaneshwar, P.; Naresh Kumar, G.; Parekh, L. J. and Poole, P. S. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil.* 245: 83-93.
- Gyaneshwar, P; K.G Naresh and L.J Parekh. 1998. Effects of buffering on the phosphate-solubilizing ability of microorganisms. *World J. Microbiol. Biotech.* 14: 669-673.
- Halder, A.K; A.K Mishra; P Bhattacharyya and P.K Chakrabarty. 1990. Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 38: 325-330.
- Halverson, L. J. and Haldeman, J. 1991. Enhancement of soybean nodulation by *Bacillus cereus* UW 85 in the field and a growth chamber. *Appl. environ. Microbiol.* 27: 2767-2770. 1991.
- Haynes, R. J. y Williams, P. H. 1991. Nutrient cycling and soil fertility in the grazed pasture ecosystem. *Adv. Agron.* 49: 119-199.
- Hedley, M; Stewart, J. W. B. y Chauhan, B.S. 1982. Changes inorganic and organic soil phosphorous fractions induced by cultivation practices and by laboratory incubations. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 46: 970-976.
- Hepper, E.N.; Hevia, G.G.; Buschiazzo, D.E.; Urioste, A.M.; Bono, A.A. 1996. Efectos de la agricultura sobre fracciones de Fósforo en suelos de la Región Semiárida Pampeana Central (Argentina). *Ciencia del Suelo.* 14(2): 96-99.
- Hirsch, A.; Lum, M. R. and Downie, A. 2001. What makes the rhizobia – legume symbiosis so especial?. *Plant Physiology.* Vol 127, pp. 1484 – 1492.
- Illmer, P and F Schinner. 1992. Solubilization of inorganic phosphate by microorganisms isolate from forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 24: 389-395.

- Isherwood, K. F. 2000. Mineral fertilizer use and the environment. International Fertilizer Industry Association/United Nations Environment Programme, Paris.
- Jhonston, A.E. 2000. Oklahoma soil fertility handbook. Oklahoma St. University. (disponible on-line <http://www.dasnr.okstate.edu/NPK>).
- Kaila A. 1962. Determination of total organic phosphorus in samples of mineral soils. Sci. Agr. Soc. Finland. 34:187-196.
- Kennedy, A. C. 2005. Rhizosphere. In Sylvia, D. M.; Fuhrmann, J. J.; Hartel, P. G. and Zuberer, D. A. (Eds.) Principles and applications of soil microbiology. pp: 242-262. Pearson Prentice Hall: Upper Saddle River, N. J.
- Kim K.Y, Jordan D, McDonald G.A. 1998. *Enterobacter agglomerans*, phosphate solubilizing bacteria, and microbial activity in soil: effect of carbon sources. Soil Biol. Biochem. 30: 995-1003.
- Kloepper, J. W. 1996. Host specificity in Microbe-Microbe Interactions. Bio Science 46: 406-409.
- Kumar, V; R.B Rishi Kumar and N Narula. 2001. Establishment of phosphate-solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under green house conditions. Microbiol. Res. 156: 87-93.
- Laheurte, F. and Berthelin, J. 1988. Effect of a phosphate solubilizing bacteria on maize growth and root exudation over four levels of labile phosphorus. Plant Soil. 105, 11 – 17.
- Leinweber P, Turner BL. And Meissner R.2002. Phosphorus. In: Agriculture, Hydrology and Water Quality. P M. Haygarth and S. C. Jarvis (eds) pp.29-55. CAB International. Wallingford, Oxon. UK.
- Lindsay, W. L. 1979. Chemical equilibria in soils. John Wiley and Sons, New York.
- Loewy, T. 1994. Fertilización de pasturas perennes. EEA INTA Bordenave. Boletín de divulgación N° 35.
- Lynch J.M and Whipps J.M. 1990 Substrate flow in the rhizosphere. Plant Soil. 120; 1-10.

- Montoya, J. C.; Bono, A.; Suárez, A.; Babinec, F. y Darwich, N. 1999. Cambios en el contenido de Fósforo asimilable en suelos desarrollados del este de la provincia de La Pampa, Argentina. *Ciencia del Suelo* 17 (1): 45-48.
- Mullen M.D. 2005. Phosphorus and other elements. *Principles and Applications of Soil Microbiology*. Eds.: Sylvia D.; Fuhrmann J.; Hartel P. And Zuberer D. Pearson- Prentice Hall, 2nd. Edition. Cap. 18 pp: 463-488.
- Murphy, J & JP Riley. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta.* 27: 31-36.
- Nahas, E. 1996. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolate from soils. *World J. Microbiol. Biotech.* 12: 567-572.
- Nannipieri, P.; Ascher, J.; Ceccherini, M. T.; Landi, L.; Pietramellara, G.; Renella, G. 2003. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science.* 54: 655-670.
- Paul, E.A. and Clark, F.E. 1989. *Soil microbiology and biochemistry*. Academic Press, San Diego, California. Pag: 74-88.
- Peix, A.; Rivas-Boyer, A.A.; Mateos, P. F.; Rodríguez-Barrueco, C.; Martínez-Molina, E. and Velázquez, E. 2001. Growth promotion of chickpea and barley by phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil Biol. Biochem.* 33: 103 – 110.
- Picone, L; Capozzi, I; Zamuner, E; Echeverría, H; Sainz Rojas, H. 2007. Transformaciones de Fósforo en un monisol bajo sistemas de labranza contrastes. *Ciencia del Suelo* 25(2): 99-107.
- Primavesi, A. 1984. Manejo ecológico del suelo. *El Ateneo*. Pag: 64; 86-88.
- Quintero, C. 2002. Dosificación del Fósforo según tipos de suelo. *Informaciones Agronómicas del Cono Sur Simposio: “Enfoque sistémico de la fertilización fosfórica”*. Nº 16. Diciembre 2002.
- Raj, J.; Bagyaraj, D. J. and Manjunath, A. 1981. Influence of soil inoculation with vasicular-arbuscular mycorrhiza and phosphate dissolving bacterium on plant growth and P – uptake. *Soil Biol. Biochem.* 13, 105 – 108.

- 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. Pak. J. Biol. Sci. 7: 187-196.
- Richardson, A. E. 2007. Making microorganisms mobilize soil phosphorus. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization, 85–90. E. Velázquez and C. Rodríguez-Barrueco (eds.), Springer.
- Rodríguez H. and Fraga R. (1999). “Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion”. Biotechnology Advances. 17: 319-339.
- Romano, N. F. y Roberto, Z. 2007. Contenido de Fósforo extractable, pH y materia orgánica en los suelos del este de la provincia de La Pampa. International Plant Nutrition Institute (IPNI), pág 1-6.
- Selles, F; BG Mc Conkey & CA Campbell. 1999. Distribution and forms of P under cultivator-and zero- tillage for continuous-and fallow- wheat cropping systems in the semi-arid Canadian prairies. Soil Till. Res. 51: 47-59.
- Stauffer, D. y Sulewsi, G. 2001. Fósforo: un nutriente esencial para la vida. Simposio: El Fósforo en la agricultura Argentina. INPOFOS Cono Sur. Pág. 4-7.
- Suh, J. S.; Lee, S. K.; Kim, K. S. and Seong, K. Y. 1995^a. Solubilization of insoluble phosphate by *Pseudomonas putida*, *Penicillium sp.* and *Aspergillus niger* isolated from Korean soils. J. Kor. Soc. Soil Sci. Ferti. 28, 278 – 286.
- Tiessen, H & JO Moir. 1993. Characterization of available P by sequential extraction. Pp 75-86. En: MR Carter (ed.) Soil Sampling and Methods of Analysis. Canadian Soc. Soil Sci. Lewis Publ., Boca Raton, FL, USA.
- Tisdale, S.; Nelson W.; Beaton, J. y Halvin, J. 1993. Soil fertility and fertilizers. Ed: Macmillan Publishing Company. Chapter 10: 364 – 404.
- Urioste, A.M.; Bono, A.A.; Buschiazzo, D.E.; Hevia, G.G.; Hepper, E.N. 1996. Fracciones de Fósforo en suelos agrícolas y pastoriles de la Región Semiárida Pampeana Central (Argentina). Ciencia del Suelo. 14(2): 92-95.
- Van Getsel M, Ladd J.N, Amato M. 1991. Carbon and nitrogen mineralization from two soils of contrasting texture and microaggregate stability: influence of sequential fumigation, drying and storage. Soil Biol. And Biochem. 23: 313-322.

- Varsha, N. and Patel, H. H. 2000. *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. *Soil Biol. Biochem.* 32, 559 – 565.
- Vessey, J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil.* 255: 571 – 586.
- Yadav, K. S. and Dadarwal, K. R. 1997. Phosphate solubilization and movilization through soil mocoorganisms. In: *Biotechnological Approaches in Soils fpr Sustainable Crop Production.* (Dadarwal, K. R., Ed.) pp 293 – 308. Scientific Publishers, Jodhpur.
- Zaidi, A., Khan M.S., Ahemad, M., Oves, M., 2009. Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta Microbiol. Inmunol. Hung.* 56, 263-284.
- Loewy, T. 1994. Fertilización de pasturas perennes. EEA INTA Bordenave. Boletín de divulgación N° 35.
- Zhang, T.Q and A.F McKenzie. 1997. Changes of phosphorus fractions under continuous corn production in a temperate clay soil. *Plan and Soil.* 192: 133-139.

