

**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

Facultad de Ciencias Agrarias

Escuela de Agronomía

**Solubilización de roca fosfórica por hongos  
rizosféricos aislados de especies forrajeras de  
importancia en la X Región de Chile**

Tesis presentado como parte de  
requisitos para optar al grado de  
Licenciado en Agronomía .

**Andrés Ignacio Quitral Villanueva**

Valdivia - Chile

2005

Profesor Patrocinante:

Eduardo Valenzuela F.  
Lic. Cs., M. Sc. Dr. Cs.

---

Profesor Copatrocinante:

Dante Pinochet T.  
Ing. Agr., M. Sc, Ph.D.

---

Profesor Informante:

Roberto McDonald H.  
Ing. Agr., M. Sc.

---

INSTITUTO DE INGENIERIA AGRARIA Y SUELOS

**INDICE DE MATERIAS**

Capítulo		Página
1	INTRODUCCION	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	3
2.1	Formas de fósforo en el suelo	3
2.1.1	P orgánico	3
2.1.2	P inorgánico	3
2.2	Dinámica de fósforo en el suelo	4
2.3	Extracción vegetal de fosfatos escasamente solubles	7
2.4	Microorganismos del suelo	8
2.4.1	Suelo rizosférico	9
2.4.1.1	Población microbial en la rizósfera	9
2.4.1.2	Hongos en la rizósfera	10
2.5	Microorganismos del suelo solubilizadores de fosfatos	14
2.5.1	Mecanismos utilizados por microorganismos para solubilizar P	15
2.5.4	Hongos del suelo solubilizadores de fósforo	17
2.5.5	Estudios sobre agar fosfato precipitado	18
2.5.6	Estudios en medio líquido	19
2.6	Praderas en rotación y permanentes	20
2.6.1	Especies utilizadas en el estudio	21
2.6.2	Fertilización fosforada en praderas	22
2.6.2.1	Fertilizantes fosforados	23

Capítulo		Página
3	MATERIAL Y METODO	25
3.1	Materiales	25
3.1.1	Biológico	25
3.1.2	Reactivos	25
3.1.3	Equipos	25
3.1.4	Otros	26
3.2	Métodos	26
3.2.1	Lugar de estudio	26
3.2.2	Toma de muestra	26
3.2.3	Procesamiento de las raíces de las plantas	26
3.2.4	Aislamiento de las cepas fúngicas rizosféricas	27
3.2.5	Determinación de la capacidad solubilizadora de cepas fúngicas en agar adicionados a $\text{CaHPO}_4$ y a $\text{FePO}_4$	27
3.2.5.1	Análisis estadístico para seleccionar las cepas fúngicas solubilizadoras en medio adicionado de $\text{CaHPO}_4$ y $\text{FePO}_4$	28
3.2.6	Ensayo de solubilización de roca fosfórica	28
3.2.7	Procesamiento de las muestras	29
3.2.7.1	Determinación del fósforo solubilizado	29
3.2.7.2	Determinación del pH	30
3.2.7.3	Determinación del peso seco micelial	30
3.3	Diseño experimental y estadístico	31
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	32

Capítulo		Página
4.1	Obtención de hongos a partir de la rizósfera de <i>Dactylis glomerata</i> L. (pasto ovillo), <i>Lolium perenne</i> L. (ballica inglesa), <i>Trifolium repens</i> L. (trébol blanco)	32
4.2	Determinación y selección de la capacidad de las cepas aisladas para solubilizar <i>in Vitro</i> CaHPO <sub>4</sub> y FePO <sub>4</sub>	36
4.3	Determinación del fósforo solubilizado	39
4.4	Determinación de pH	45
4.5	Determinación de peso seco micelial	51
5	CONCLUSIONES	55
6	RESUMEN	57
	SUMMARY	58
7	BIBLIOGRAFÍA	59
	ANEXOS	69

**INDICE DE CUADROS**

Cuadro		Página
1	Número de Microorganismos en la rizósfera en <i>Triticum aestivum</i> L. y suelo no rizosférico y su resultado en la relación	10
2	Diseño del ensayo de solubilización de la roca fosfórica Carolina del norte, por cepas fungicas seleccionadas	31
3	Taxa y cantidad de cepas aisladas desde la rizosfera de <i>Dactylis glomerata</i> (Pasto ovillo), <i>Lolium perenne</i> (Ballica inglesa) y <i>Trifolium repens</i> (Trébol blanco), en dos manejos culturales	33
4	Cepas fúngicas seleccionadas para la solubilización de la roca fosfórica Carolina del Norte en medio líquido	38

## INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Dinámica del fósforo en un sistema agrícola	7
2	Formación de halo de solubilidad <i>in Vitro</i> para las cepas aisladas desde la rizósfera de plantas forrajeras	37
3	Variación de las concentraciones promedio del fósforo solubilizado durante el período de incubación de las 6 cepas seleccionadas, la cepa control ( <i>Aspergillus niger</i> T.) y el Control (CM + RF)	40
4	Solubilización de roca fosfórica Carolina del Norte a través del tiempo. A= CM esterilizado + RF. B= CM esterilizado + RF tratado con <i>Micelio estéril A</i> , <i>Mucor hiemalis</i> W. y la cepa control ( <i>A. niger</i> ). C= CM esterilizado + RF tratado con <i>Gliocladium roseum</i> B., <i>P. chrysogenum</i> T. y la cepa control. D= CM esterilizado + RF tratado con <i>P. frequenstans</i> .W., <i>P.chrysogenum</i> T.**y la cepa control	41
5	Variación de valores de pH durante el período de incubación de las 6 cepas seleccionadas, la cepa control ( <i>A. niger</i> ) y el Control (CM + RF).	46
6	Variación del pH del medio de cultivo a lo largo del tiempo. A= CM esterilizado + RF. y CM esterilizado + RF tratado con <i>A. niger</i> . B= CM esterilizado + RF tratado con <i>Micelio estéril A</i> , <i>Mucor hiemalis</i> y la cepa control ( <i>A. niger</i> ). C= CM esterilizado + RF tratado con <i>Gliocladium roseum</i> , <i>P. chrysogenum</i> y la cepa control. D= CM esterilizado + RF tratado con <i>P. frequenstans</i> , <i>P.chrysogenum</i> **y la cepa control.	47

Figura	Página
7      Peso seco de micelios fúngicos en distintos periodos de incubación (0-60 días), de las 6 cepas seleccionadas, la cepa control ( <i>A.niger</i> ) y el control (CM + RF)	52
8      Peso seco micelial de las cepas a lo largo del tiempo. A= CM esterilizado + RF tratado con <i>Micelio estéril A</i> <i>Mucor hiemalis</i> y la cepa control ( <i>A. niger</i> ). B= CM esterilizado + RF tratado con <i>Gliocladium roseum</i> , <i>P. chrysogenum</i> y la cepa control. C= CM esterilizado + RF tratado con <i>P. frequenstans</i> , <i>P.chrysogenum</i> ** y la cepa control	53



## INDICES DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Valores promedios y diferencias estadísticas de la concentración de fósforo solubilizado ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en el tiempo para los diferentes tratamientos	70
2	Valores promedios y diferencias estadísticas del pH del medio de cultivo en el tiempo para los diferentes tratamientos	70
3	Valores promedios y diferencias estadísticas del peso seco de los hongos nativos y la cepa control en el tiempo	71
4	Andeva de selección de hongos para el cultivo de medio líquido Ballica inglesa, P. permanente Colonia	72
5	Andeva de selección de hongos para el cultivo de medio líquido Ballica inglesa, P. permanente Halo	72
6	Andeva de selección de hongos para el cultivo de medio líquido Ballica inglesa, P. rotación Colonia	72
7	Andeva de selección de hongos para el cultivo de medio líquido Ballica inglesa, P. rotación Halo	72
8	Andeva de selección de hongos para el cultivo de medio líquido Trébol blanco, P. permanente Colonia	73
9	Andeva de selección de hongos para el cultivo de medio líquido Trébol blanco, P. permanente Halo	73
10	Andeva de selección de hongos para el cultivo de medio líquido Trébol blanco, P. rotación Colonia	73
11	Andeva de selección de hongos para el cultivo de medio líquido Trébol blanco, P. rotación Halo	73
12	Andeva de selección de hongos para el cultivo de medio líquido Pasto oville, P. permanente Colonia	74

Anexo		Página
13	Andeva de selección de hongos para el cultivo de medio líquido Pasto ovilla, P. permanente Halo	74
14	Andeva de selección de hongos para el cultivo de medio líquido Pasto ovilla ,P. rotación Colonia	74
15	Andeva de selección de hongos para el cultivo de medio líquido Pasto ovilla. P. Rotación Halo	74
16	Gráficos de selección cepas fúngicas para la determinación de P-soluble en medio liquido	75
17	Cepas seleccionadas de la rizósfera de Ballica inglesa, P permanente, extraídas de un suelo rizosféricos	76
18	Cepas seleccionadas de la rizósfera de Ballica inglesa, P Rotación, extraídas de un suelo rizosféricos	76
19	Cepas seleccionadas de la rizósfera de Trébol blanco, P permanente, extraídas de un suelo rizosféricos	76
20	Cepas seleccionadas de la rizósfera de Trébol blanco, P Rotación, extraídas de un suelo rizosféricos	76
21	Cepas seleccionadas de la rizósfera de Pasto ovilla, P. Permanente, extraídas de un suelo rizosféricos	76
22	Cepas seleccionadas de la rizósfera de Pasto ovilla, P Rotación, extraídas de un suelo rizosféricos	77
23	Cepas seleccionadas de la rizósfera de Ballica inglesa, P permanente, extraídas de un suelo no rizosféricos	77
24	Cepas seleccionadas de la rizósfera de Ballica inglesa, P Rotación, extraídas de un suelo no rizosféricos	77
25	Cepas seleccionadas de la rizósfera de Trébol blanco, P permanente, extraídas de un suelo no rizosféricos	77
26	Cepas seleccionadas de la rizósfera de Trébol blanco, P Rotación, extraídas de un suelo no rizosféricos	77

Anexo		Página
27	Cepas seleccionadas de la rizósfera de Pasto ovilla, P. Permanente, extraídas de un suelo no rizosféricos	78
28	Cepas seleccionadas de la rizósfera de Pasto ovilla, P. Rotación, extraídas de un suelo no rizosféricos	78
29	Andeva de P- solubilizado con Micelio estéril A en los días de incubación.	78
30	Andeva de P- solubilizado con <i>Mucor hiemalis</i> W. en los días de incubación	78
31	Andeva de P- solubilizado por <i>Gliocladium roseum</i> B. en los días de incubación	78
32	Andeva de P- solubilizado por <i>Penicillium chrysogenum</i> T. en los días de incubación	78
33	Andeva de P- solubilizado por <i>Penicillium frequenstans</i> W. en los días de incubación	79
34	Andeva de P- solubilizado por <i>Penicillium chrysogenum</i> T.** en los días de incubación	79
35	Andeva de P- solubilizado por <i>Aspergillus niger</i> T. en los días de incubación	79
36	Andeva de P- solubilizado con el Control en los días de incubación	79
37	Andeva de P- solubilizado por los hongos el día 0 de incubación	79
38	Andeva de P- solubilizado por los hongos el día 7 de incubación	79
39	Andeva de P- solubilizado por los hongos el día 15 de incubación	80
40	Andeva de P- solubilizado por los hongos el día 30 de incubación	80

Anexo		Página
41	Andeva de P- solubilizado por los hongos el día 45 de incubación	80
42	Andeva de P- solubilizado por los hongos el día 60 de incubación	80
43	Andeva del pH de Micelio estéril A en los días de incubación	80
44	Andeva del pH de <i>Mucor hiemalis</i> en los días De incubación	80
45	Andeva del pH de <i>Gliocladium roseum</i> en los días de incubación	81
46	Andeva del pH de <i>Penicillium chrysogenum</i> en los días de incubación	81
47	Andeva del pH de <i>Penicillium frequenstans</i> en los días de incubación	81
48	Andeva del pH de <i>Penicillium chrysogenum</i> ** en los días de incubación	81
49	Andeva del pH de <i>Aspergillus niger</i> en los días de incubación	81
50	Andeva del pH de los hongos el día 0 de incubación	81
51	<b>Andeva del pH de los hongos el día 7 de incubación.</b>	82
52	Andeva del pH de los hongos el día 15 de incubación	82
53	Andeva del pH de los hongos el día 30 de incubación	82
54	Andeva del pH de los hongos el día 45 de incubación.	82
55	Andeva del pH de los hongos el día 60 de incubación.	82
56	Andeva del peso Micelio estéril A en los días de incubación	82
57	Andeva del peso <i>Mucor hiemalis</i> en los días de incubación	83

Anexo		Página
58	Andeva del peso <i>Gliocladium roseum</i> en los días de incubación	83
59	Andeva del peso <i>Penicillium chrysogenum</i> en los días de incubación.	83
60	Andeva del peso <i>Penicillium frequenstans</i> en los días de incubación	83
61	Andeva del peso <i>Penicillium chrysogenum</i> ** en los días de incubación	83
62	Andeva del peso <i>Aspergillus niger</i> en los días de incubación	83
63	Andeva del peso de los hongos del día 0 de incubación	84
64	Andeva del peso de los hongos del día 7 de incubación	84
65	Andeva del peso de los hongos del día 15 de incubación	84
66	Andeva del peso de los hongos del día 30 de incubación	84
67	Andeva del peso de los hongos del día 45 de incubación.	84
68	Andeva del peso de los hongos del día 60 de incubación	84
69	P-solubilizado (mg L <sup>-1</sup> ) por <i>Micelio estéril A</i> en Cultivo medio líquido	85
70	P-solubilizado (mg L <sup>-1</sup> ) por <i>Mucor hiemalis</i> en Cultivo medio líquido	85
71	P-solubilizado (mg L <sup>-1</sup> ) por <i>Gliocladium roseum</i> en Cultivo medio líquido	85
72	P-solubilizado (mg L <sup>-1</sup> ) por <i>Penicillium chrysogenum</i> en Cultivo medio líquido	85
73	P-solubilizado (mg L <sup>-1</sup> ) por <i>Penicillium frequenstans</i> en Cultivo medio líquido	86

Anexo		Página
74	P-solubilizado (mg L <sup>-1</sup> ) por <i>Penicillium chrysogenum</i> ** en Cultivo medio líquido	86
75	P-solubilizado (mg L <sup>-1</sup> ) por <i>Aspergillus niger</i> en Cultivo medio líquido	86
76	P-solubilizado (mg L <sup>-1</sup> ) por Control en Cultivo medio líquido	86
77	pH de <i>Micelio estéril A</i> en Cultivo medio líquido	87
78	pH de <i>Mucor hiemalis</i> en Cultivo medio líquido	87
79	pH de <i>Gliocladium roseum</i> en Cultivo medio líquido	87
80	pH de <i>Penicillium Chrysogenum</i> en Cultivo medio líquido	87
81	pH de <i>Penicillium frequenstans</i> en Cultivo medio líquido	87
82	pH de <i>Penicillium chrysogenum</i> ** en Cultivo medio líquido	88
83	pH de <i>Aspergillus niger</i> en Cultivo medio líquido	88
84	pH del <i>Control</i> en Cultivo medio líquido	88
85	Peso seco (g) de <i>Micelio estéril A</i> en Cultivo medio líquido	88
86	Peso seco (g) de <i>Mucor hiemalis</i> en Cultivo medio líquido	88
87	Peso seco (g) de <i>Gliocladium roseum</i> en Cultivo medio líquido	89
88	Peso seco (g) de <i>Penicillium chrysogenum</i> en Cultivo medio líquido	89
89	Peso seco (g) de <i>Penicillium frequenstans</i> en Cultivo medio líquido	89
90	Peso seco (g) de <i>Penicillium chrysogenum</i> ** en Cultivo medio líquido	89
91	Peso seco (g) de <i>Aspergillus niger</i> en Cultivo medio líquido	90

## 1 INTRODUCCIÓN

El fósforo (P) es un nutriente esencial para las plantas el cual se encuentra en baja disponibilidad en muchos suelos agrícolas del sur de Chile. Esto se debe principalmente a que parte del P soluble aplicado al suelo como fertilizante es adsorbido por las fracciones coloidales del suelo y queda poco disponible para las plantas. Las aplicaciones de fertilizantes fosforados, resultan a largo plazo, en una acumulación del P total del suelo, en formas escasamente solubles. Hongos del suelo, predominantemente del género *Aspergillus* y *Penicillium* han demostrado, *in vitro*, poseer la habilidad de solubilizar fosfatos inorgánicos insolubles mediante excreción de ácidos orgánicos. Por otra parte, diversas investigaciones han demostrado que esta capacidad solubilizadora al parecer es mayor en cepas fúngicas que forman parte de la rizósfera.

De acuerdo a lo expuesto se plantea la siguiente hipótesis:

- Cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera de tres plantas forrajeras creciendo en suelos Hapludand poseen igual o superior capacidad que una cepa control de *Aspergillus niger* (Tiegh). para solubilizar el P de la roca fosfórica Carolina del Norte

Para aceptar o rechazar esta hipótesis se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Obtener cultivos puros de hongos a partir de la rizósfera de las plantas forrajeras ballica inglesa (*Lolium perenne* L.), pasto ovilla (*Dactylis glomerata* L.) y Trébol blanco (*Trifolium repens* L.), desde un suelo Hapludand.

- Evaluar la capacidad de las cepas fúngicas aisladas para solubilizar *in vitro*  $\text{CaHPO}_4$  y  $\text{FePO}_4$ .
- Determinar y seleccionar mediante análisis estadístico las 6 mejores cepas solubilizadoras de  $\text{CaHPO}_4$  y  $\text{FePO}_4$ .
- Determinar cuantitativamente mediante el método de Murphy y Riley la capacidad de las 6 cepas seleccionadas para solubilizar el P de la Roca Carolina del Norte adicionada a un medio de cultivo líquido.
- Evaluar estadísticamente, la capacidad de las 6 cepas seleccionadas para solubilizar el P de la roca fosfórica Carolina del Norte en el tiempo.



## 2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Formas de fósforo en el suelo

Los fosfatos contenidos en el suelo pueden dividirse en forma amplia en 2 categorías: inorgánicos y orgánicos. Estas dos formas pueden llegar a ser una fuente disponible de fósforo (P) para las plantas (BLACK, 1975).

**2.1.1 P orgánico.** Se conocen tres grupos de compuestos orgánicos fosforados en el suelo (inositol fosfato o ésteres de fosfatos; ácido nucleico, y fosfolípidos). Estos se creen que son sintetizados por microorganismos del suelo, sin embargo, también pueden encontrarse en las plantas (TISDALE *et al.*, 1993; BRADY y WEIL, 1999).

El fósforo orgánico disuelto es generalmente más móvil que el fósforo inorgánico soluble, probablemente por que esté menos adsorbido en las arcillas, fenómeno que ocurre en el P inorgánico (BRADY y WEIL, 1999).

TISDALE *et al.* (1993) señalan que el P orgánico representa cerca de un 50% del P total del suelo y normalmente varía entre un 15 y 80% en la mayoría de los suelos. El mismo autor comenta que en forma similar a la materia orgánica, el P orgánico disminuye en profundidad, y la magnitud de esta disminución es variable dependiendo del tipo de suelo.

**2.1.2 P inorgánico.** La mayoría de los compuestos de P inorgánico se encuentran en dos grupos, aquellos que poseen calcio, y los que contienen hierro y Aluminio. Los primeros son más solubles y tienden a desaparecer en suelos ácidos. En suelos alcalinos en cambio, son insolubles y predominan

dentro de las formas de P inorgánicas. En contraste a los fosfatos cálcicos, los fosfatos de hierro y aluminio son los predominantes en suelos ácidos (BRADY y WEIL, 1999).

El contenido total de P, y la cantidad relativa de estas dos formas varían ampliamente según el tipo de suelo, y es dependiente también de las prácticas de fertilización que en estos se han realizado (BRADY y WEIL, 1999).

Olsen y Watanabe (1957), citados por WHITELOW (2000), determinaron que suelos ácidos fijaban el doble de la cantidad adicionada de P por unidad de área de superficie que los suelos calcáreos o neutros. Ellos también reportaron que el P fijado fue mantenido con una energía de almacenamiento cinco veces superior en suelos ácidos comparado con suelos calcáreos. La capacidad de adsorción de P de suelos calcáreos de pH neutro o de pH alto está influenciado mayormente por la cantidad de iones de calcio extractable y por el contenido de  $\text{CaCO}_3$ .

## **2.2 Dinámica del fósforo en el suelo**

BARROW (1980) propuso dividir el P del suelo desde un punto de vista funcional en tres fracciones:

- P en solución: este se encuentra inmediatamente disponible para ser absorbido por las plantas.
- P lábil: esta en equilibrio directo y rápido con el fósforo en solución y representa la cantidad de fósforo disponible durante una temporada de cultivo.
- P no lábil: este no se encuentra en equilibrio directo con el P en solución y corresponde al fósforo que no sale a la solución del suelo en una temporada de cultivo.

RODRIGUEZ (1993), indica que el fósforo que se encuentra en la solución del suelo es el que las raíces de los cultivos utilizan directamente en el proceso de absorción. Su concentración es muy baja la cual oscila entre 0,06 y 0,5 ppm y corresponde a la fracción que se encuentra en equilibrio con el fósforo lábil del suelo. Este mismo autor, señala que el fósforo lábil está constituido mayoritariamente por el fósforo adsorbido en la superficie de la fase sólida del suelo, el cual se encuentra en equilibrio con el fósforo en solución. Esta última forma de fósforo se encontraría formando una unión de ligando con el aluminio estructural de las arcillas, compartiendo un oxígeno.

PINOCHET (1995), señala que el fósforo no lábil representa aquellos compuestos fosforados en el suelo que no salen a la solución en una temporada de cultivo. El "pool" de fósforo no lábil tiene una relación de equilibrio con el "pool" de fósforo lábil, pero no directamente con el fósforo de la solución de suelo (BARROW, 1980). Es así, como un aumento en los componentes lábiles del suelo induce un aumento de los componentes no lábiles, mientras que un decrecimiento en la fracción de fósforo lábil induce un lento decrecimiento en la fracción de fósforo no lábil del suelo.

Los procesos de transferencia de fósforo que permite el equilibrio entre las fracciones ocurren mediante tres mecanismos:

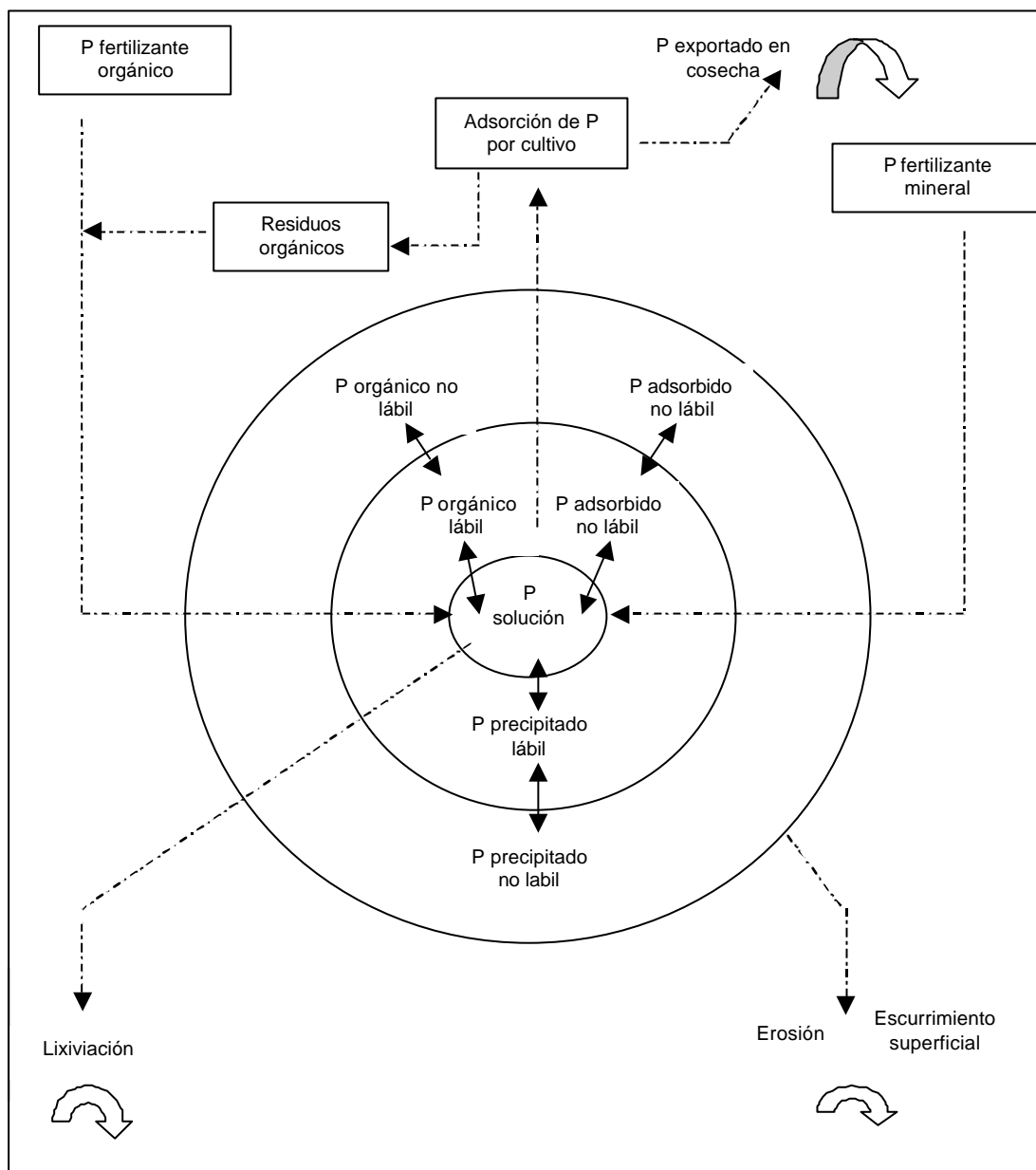
a) Adsorción - desorción a través de la reacción del fosfato con las arcillas (BARROW, 1983). PINOCHET (1998), por su parte, señala que el mecanismo de mayor importancia en el caso de este nutriente es el de la adsorción específica, es decir, al analizar el problema del fósforo, lo primordial es tener presente que tipo de arcilla es la predominante, porque la adsorción va a ser mayor en aquellas arcillas que tienen mas hidróxidos expuestos a la superficie (alofán).

b) Precipitación-disolución en la formación de compuestos fosforados en el suelo, dependiente del pH del suelo y de la concentración de iones en la solución del suelo (HAYNES, 1982).

WHITELAW (2000) señala que el tipo de formación del precipitado desde la disolución de P depende altamente del pH del suelo. En suelos ácidos, el P puede ser precipitado por  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Al}^{3+}$  liberándose cuando los hidróxidos de hierro y aluminio son descompuestos por ácido.

c) Mineralización – Inmovilización del P ligado a la materia orgánica (TISDALE *et al.*, 1993; WILD, 1988). Este mecanismo es de menor importancia, y casi irrelevante desde el punto de vista de la fertilidad del fósforo, es decir, la cantidad de fósforo que queda atrapado en la biomasa microbial, no es relevante para la nutrición de las plantas (PINOCHET, 1998).

En la Figura 1, se observa un diagrama de los componentes del fósforo en un sistema agrícola (PINOCHET, 1996). En este esquema, el fósforo en el suelo presenta un “pool” en solución, un “pool” lábil y un “pool” no lábil, incluyendo los procesos de precipitación y adsorción que afectan al fósforo aplicado mediante la fertilización. Además, incluye un “pool” orgánico lábil y “pool” orgánico no lábil, al cual llega parte del fósforo que queda como residuos de cosecha y de ingreso de otras fuentes como fecas y estiércol. Este “pool” orgánico pasará a la solución dependiendo de la mineralización de la materia orgánica del suelo (PINOCHET, 1995).



**FIGURA 1** Dinámica del fósforo en un sistema agrícola.

FUENTE: PINOCHET (1995).

### 2.3 Extracción vegetal de fosfatos escasamente solubles.

El fósforo absorbido por las plantas como ión ortofosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^{-2}$  y  $\text{HPO}_4^{-2}$ ), desde la solución del suelo, que es la forma natural estable en el cual

el átomo central de fósforo se encuentra rodeado por cuatro átomos de oxígeno (MARSCHNER, 1995). Ellos se presentan en solución en forma de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ ,  $\text{HPO}_4^{-2}$  y  $\text{PO}_4^{-3}$ . El  $\text{H}_2\text{PO}_4$  predomina solo en soluciones muy ácidas, mientras el  $\text{PO}_4^{-3}$  se encuentra solo en las muy alcalinas, situaciones que son poco frecuentes en los suelos. De esta forma, la solución de suelo esta dominada por los iones monofosfato y difosfato (BLACK, 1975).

Existen tres mecanismos principales mediante los cuales las plantas pueden ser capaces de extraer P a partir de fuentes normalmente insolubles en el suelo. Primero, la producción de ácidos (de origen vegetal o microbial) puede causar un descenso del pH de la rizósfera. Segundo, ácidos orgánicos capaces de quelar iones metálicos pueden competir con el P por los lugares de adsorción en el suelo. Tercero, ácidos orgánicos pueden formar complejos solubles con iones metálicos asociados con P insoluble ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Al}^{+3}$  y  $\text{Fe}^{+3}$ ) liberando por lo tanto P (Kepert *et al.*, 1979, citados por WHITELAW, 2000).

Trolldenier (1992) citado por WHITELAW (2000), proporcionó evidencia de la solubilización de los fosfatos de calcio debido a la acidificación de la rizósfera mediante una variedad de especies vegetales cultivadas en agar. La disolución de roca fosfórica inducida por las raíces de dos especies de lupino. El autor concluyó que la disolución fue probablemente debido a una excreción de protones, pues evidenció un descenso en el pH de la rizósfera de casi dos unidades de pH.

#### **2.4 Microorganismos del suelo**

La asociación simbiótica entre ciertas plantas y microorganismos juega un importante rol en la fertilización del suelo, aumentando el crecimiento y la nutrición mineral por parte de las plantas (DIOUF *et al.*, 2003).

OVALDE y AGUILERA (1998) señalan que la capacidad de los microorganismos para desarrollar un gran número de funciones se debe a su gran versatilidad bioquímica, basada en la posibilidad de llevar a cabo una gran cantidad de reacciones. Gran parte de la significancia de los microorganismos se expresa al mantener un balance adecuado entre el suelo, la planta y la microbiota nativa. El punto donde se llevan a cabo las interacciones más importantes es en la rizósfera, la zona de influencia de la raíz.

**2.4.1 Suelo rizosférico.** La armonía o salud del sistema planta-suelo, que es afectada por el estrés natural y las labores culturales del hombre, se debe en gran parte a los microorganismos que habitan en la interfase entre la planta y el suelo (GARZA-REQUENA y VALDES, 2000).

El suelo rizosférico puede ser definido como la parte del suelo en el cual la actividad microbial es modificada por la presencia de raíces, pero en donde el ambiente microbial es mayoritariamente original del suelo (DOMMERGUES y KRUPA, 1978). Por su parte, JONES (1998), señala que la continua deposición de los compuestos orgánicos (principalmente citrato, oxalato, malato) e inorgánicos, determina que la zona adyacente a las raíces posea características biológicas muy diferentes a las del resto del suelo.

2.4.1.1. Población microbial en la rizósfera. Un vasto número de especies de microorganismos están presentes en la rizósfera, y esa cantidad, generalmente, disminuye a medida que la distancia de la raíz se incrementa.

La medición del efecto de la rizósfera en una población en particular, se determina por la relación R/S que existe entre el número de microorganismos de la rizósfera (R), y el número de microorganismos del resto del volumen de suelo (S) no influenciado por las raíces. En el Cuadro 1, se indica el número de

microorganismos (MO) de la rizósfera de *Triticum aestivum* L. y de suelo no rizosférico y su relación.

**CUADRO 1** Número de microorganismos en la rizósfera (R) en *Triticum aestivum* y suelo no rizosférico (S) y su resultado en la relación (R/S).

Microorganismo	Rizósfera (R)	No-rizosférico (S)	Relación (R/S)
	UFC * g <sup>-1</sup> de suelo		
Bacterias	120 * 10 <sup>7</sup>	5 * 10 <sup>7</sup>	24
Hongos	12 * 10 <sup>5</sup>	1 * 10 <sup>2</sup>	12
Protozoo	24 * 10 <sup>2</sup>	10 * 10 <sup>2</sup>	2,4
Amonificante	500 * 10 <sup>6</sup>	4 * 10 <sup>6</sup>	125
Desnitrificante	1260 * 10 <sup>5</sup>	1 * 10 <sup>5</sup>	1260

\*UFC: Unidades formadoras de colonia.

\* R: rizósfera.

\* S: suelo no rizosférico

\* R/S: relación entre microorganismos rizosféricos y no rizosféricos

2.4.1.2 Hongos en la rizósfera. Aunque el conteo de hongos en la rizósfera es menor que el de las bacterias y actinomycetes, este recuento está basado en esporas y propágulos miceliares y pueden ser poco representativo (SYLVIA *et al.*, 1999). De la misma forma, SYLVIA *et al.* (1999), señalan que el número de las poblaciones fúngicas puede ser mayor que los rangos reportados, frecuentemente más del 10 al 20% del total de la microflora. PIETA *et al.* (2001), obtuvo por su parte, entre 51,38 x 10<sup>3</sup> a 69,96 x 10<sup>3</sup> colonias fúngicas en la rizósfera en un cultivo de papa, en cambio en un suelo no rizosférico el número de colonia de hongos decrece sustancialmente obteniendo entre 16,6 x 10<sup>3</sup> a 34,10 x 10<sup>3</sup> colonias. Por otro lado, ALEXANDER (1980) señala que ciertos géneros específicos de hongos son estimulados por la rizósfera, es



decir, la influencia es selectiva para el tipo, más que para el número total. Más aún, el espectro de géneros varía con las especies de plantas y su edad y con el tipo de suelo. La micoflora saprofita de la rizósfera incluye hongos benéficos y patógenos, teniendo el potencial para influenciar significativamente el crecimiento y rendimiento de los vegetales (SUSLOW y SCHROTH, 1982, SCHIPPER *et al.*, 1987).

Según ULACIO *et al.* (1997) los géneros fúngicos que dominan la rizósfera de las plantas del tabaco son *Aspergillus* y *Fusarium*. De la misma forma, estos dos géneros, sumados al género *Penicillium*, dominan en el sistema radicular de otras plantas de importancia agronómica mundial, como en el caso del trigo de invierno, papa, poroto de soya, cebolla (DEB y BORA, 1996, KALLURMATH y RAJASAB, 2000, PATKOWSKA, 2001; PIETA *et al.*, 2001).

Las comunidades de hongos de los suelos con praderas, en diferentes regiones, presentan características sorprendentemente similares. También es posible observar que algunas especies fúngicas presentes en praderas, encontrarlas en otras zonas vegetales de gran extensión (CHRISTENSEN, 1981).

Por otro lado HEREDIA *et al.* (1988), afirman que *Penicillium* y *Aspergillus niger* se han caracterizado por su abundancia en el suelo rizosférico, lo anterior confirma que se tratan de especies marcadamente saprofitas, cuya capacidad de crecer y reproducirse rápidamente en una amplia variedad de sustratos y tolerando cambios ambientales extremos, lo que los enmarcan dentro de la denominación de hongos con alta capacidad competitiva saprobiótica.

BETTUCCI, *et al.* (1993), compararon la distribución de la micoflora presente en dos sectores con praderas establecidas, el primero en un potrero

sin pastoreo durante 5 años y el segundo bajo constante pastoreo durante cerca de 100 años. El índice de similitud entre los sitios de estudio fue muy alto (68,08%), pero este índice varía dependiendo de la época de muestreo.

Ambos sitios comparten una de las especies dominantes, *Eupenicillium brefeldianu*, y otras especies codominantes fueron *Aspergillus terreus* en el sitio A y *Eupenicillium shearii* en el sitio B. Otras especies dominantes, pero en menor medida, fueron *Cladosporium cladosporoides* y *Penicillium simplicissimum*.

*Aspergillus terreus* ha sido identificado como una especie frecuentemente presente en la rizósfera de praderas establecidas en zonas áridas (CHRISTENSEN, 1981) y especies, como *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium cladosporoides* y *Penicillius masquandii* son abundante y exhiben una gran distribución en suelos expuestos a altas temperaturas (GOCHENAUR, 1981).

SYLVIA *et al.* (1999), señalan que las zoosporas de *Phytophthora*, *Phythium* y *Aphanomyces* y probablemente otros hongos, son atraídos fuertemente hacia las raíces. Por otra parte, la dinámica de la población de hongos en el medio ambiente del suelo está directamente relacionado con la cantidad de los residuos de la cosecha (PATKOWSKA, 2002). Por su parte, SMIT *et al.*, (1999), señala que los hongos juegan un importante rol en el ecosistema suelo como el mayor descomponedor de los residuos, además, libera nutrientes que sustentan y estimulan el crecimiento de las plantas.

El suelo de la rizósfera se caracteriza por su gran actividad biológica. La composición cualitativa y cuantitativa de los microorganismos en la zona radicular sufre constantes cambios bajo el efecto de los exudados radicales y los compuestos formados por la descomposición celular de las raíces. Las

sustancias incluidas, aminoácidos, azúcares solubles en agua, minerales y exudados de fenoles sirven como fuente básica de C y N para los microorganismos (PATKOWSKA, 2002).

El mismo autor señala que la diferencia de la composición química de los exudados va a depender del género, especie, cultivares y edad de la planta, además de innumerables factores bióticos y abióticos.

El diagnóstico de la micoflora radicular en algunos cultivos, a nivel mundial, ha sido determinado tomando en cuenta la edad de la planta (KULSHRESTHA 1978; MISHA, 1978, KHAN y PRAKASH, 1982). Asimismo, se ha estudiado según la condición de susceptibilidad o resistencia de los cultivares a ciertas enfermedades (SATYAPRASAD, 1982; SING *et al.*, 1982).

Algunos investigadores afirman que los microorganismos que pueden crecer en la rizósfera proveen una línea frontal de defensa para las raíces contra el ataque de los patógenos y que éstos pueden encontrar antagonistas en las rizósfera antes y durante la infección primaria y también durante el desarrollo de las raíces (BAKER, *et al.*, 1974).

Por otro lado, un efecto rizosférico positivo y una amplia biodiversidad microbial fue observado en el hábitat radicular de la planta del café. Cualitativamente las poblaciones de hongos fueron dominantes, entre otros géneros dominaron *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladisporium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Rizopus* y *Fusarium* (VELMOUROUGANE *et al.*, 2000).

Es así como la comunidad de la rizósfera está compuesta principalmente por microorganismos no patogénicos, pero las intensas interacciones biológicas entre microorganismos dañinos, benéficos y neutrales, pueden guiar a la eliminación o supresión de los patógenos y bajo ciertas condiciones, ellos

pueden ser benéficos. En muchos casos la rizósfera puede ser considerada como la zona tampón microbiológica en la cual la micoflora sirve para proteger la planta de los ataques de los patógenos (MARTIN, 1977).

## **2.5 Microorganismos del suelo solubilizadores de fosfatos**

El hecho que ciertos microorganismos del suelo son capaces de disolver relativamente compuestos insolubles de fósforo (Asea, *et al.*, 1988 citado por GOENADI, *et al.*, 2000) ha abierto la posibilidad de inducir la solubilización microbial de los fosfatos del suelo. Por esta razón, muchas plantas se ven beneficiadas por la asociación con microorganismos bajo condiciones de deficiencia de fósforo (GYANESHWAR *et al.*, 2002).

En particular, el pH de la rizósfera puede diferenciarse hasta por 2 unidades más que el resto de volumen de suelo (HINSINGER y GILKES 1997, RUBIO, 2002). Las raíces inducen a la producción de  $H^+$ ,  $HCO_3^-$ , o compuestos orgánicos los que de una u otra forma afecta a la absorción de iones y por lo tanto el pH (SYLVIA, *et al.*, 1999).

JONES (1998), por su parte afirma que el efecto principal de la acidificación de los volúmenes de suelo adyacentes a la raíz es la solubilización de fosfatos ligados al calcio. Esto resulta en que la biodisponibilidad del P difiere marcadamente en ambas zonas. Tanto el pH como la concentración de ácidos orgánicos en la rizósfera, influyen en la disponibilidad del P.

ALEXANDER (1980), señala que los compuestos de fósforo inorgánico e insoluble están en gran parte no disponible para las plantas, pero muchos microorganismos pueden llevar el fosfato a solución.

El mismo autor indica que el suelo contiene un gran número de microorganismos capaces de solubilizar fósforo insoluble. La población es

especialmente abundante en la zona radical donde la actividad bioquímica de la microflora engrandece apreciablemente la asimilación de fosfatos por las plantas.

TISDALE *et al.* (1993), señalan que diversas investigaciones han documentado el uso de microorganismos para incrementar el fósforo presente en la roca en sus formas disponibles para las plantas. Es así como en la década de 1980 se reportaron algunas cepas de hongos capaces de solubilizar roca fosfórica.

Con el tiempo se encontró que los hongos, a diferencia de las bacterias, retenían su actividad solubilizadora de P incluso después de subcultivos en serie y podían ser mantenidos activamente solubilizando P por muchos años (Kucey, 1983, citado por CUNNINGHAM y KUIACK, 1992).

Por su parte, NISHIO (1985), señaló que suelos bajo praderas dentro de los microorganismos solubilizadores de fosfato el 1% está conformado por bacterias, y el 10 % por población fúngica.

### **2.5.1 Mecanismos utilizados por microorganismos para solubilizar P**

Algunos investigadores creen que el fenómeno de la solubilización de fosfatos está directamente relacionado con la habilidad de los microorganismos de producir ácidos orgánicos seleccionados y/o polisacáridos extracelulares (KUCEY, [1983](#); ILLMER y SCHINNER, 1992).

Muchos han sugerido que el aumento en la concentración de P en los medios que contienen los hongos solubilizadores de fósforo está relacionado con la secreción de ácidos orgánicos de metabolitos, los cuales pueden correlacionarse con el pH del medio (ILLMER y SCHINNER, [1992](#); ILLMER *et al.*, [1995](#); NARSIAN *et al.*, [1995](#)). Por otra parte, KIM *et al.* ([1998](#)) afirman que

existe una fuerte relación entre una baja en el pH y un incremento drástico en la concentración de fósforo soluble.

*Aspergillum niger*, por ejemplo, parece ser capaz de producir algunos ácidos orgánicos tales como citrato, malato y piruvato. Esos ácidos, especialmente citrato y malato, son conocidos por solubilizar relativamente P insoluble (TISDALE y NELSON, 1993; SINGH y AMBERGER, [1998](#)) y efectos sinérgicos de estos ácidos solo han sido propuestos por PARKS *et al.* (1990).

ILLMER *et al.* (1995), indicaron que el nivel de ácidos orgánicos que producen una disolución significativa de P, en el orden de 3 a 30 ppm, esta muy por debajo de la lixiviación biótica. Esta investigación asume que la producción de ácidos orgánicos es un importante mecanismo de solubilización relativa de P insoluble, pero no es el único existente. Una posibilidad podría ser el intercambio del H<sup>+</sup> con la membrana citoplasmática, el cual puede pasar a cambio del catión captado (especialmente NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) o con ayuda de la traslocación enzimática del H<sup>+</sup> la cual esta localizado en la plasmalema y usa la energía para la hidrólisis del ATP ([ILLMER y SCHINNER, 1992](#)). Siguiendo esta hipótesis, estos autores asumen que la roca fosfórica puede solubilizarse directamente en la superficie de la célula. Si este es el caso, el peso seco micelial puede correlacionarse directamente con el P soluble.

Pohlman y McColl (1986), citados por KPOMBLEKOU-A y TABATABAI (1994), señalan que son varios los factores importantes en la determinación del grado o proporción de disolución de la roca fosfórica por ácidos orgánicos, estos son: **I)** proporción de difusión de ácidos orgánicos desde el volumen de solución y difusión de productos al sitio de reactividad, **II)** tiempo de contacto entre el ácido orgánico y la superficie mineral, **III)** grado de disociación del ácido orgánico, **IV)** tipo de posición de grupos funcionales y **V)** afinidades químicas de los agentes quelantes por los metales.

#### 2.5.4 Hongos del suelo solubilizadores de fósforo

Entre los hongos aislados del suelo destacan por su predominio el genero *Aspergillus* y *Penicillium*, estos son los más citados por la literatura (NUNES *et al.*, 2002). En tanto, en relación con su eficiencia, existen controversias.

BANIK y DEY (1982), señalan que dos géneros, uno del género *Aspergillus* fueron los más eficientes. De la misma forma, KHAN, M. y KHAN, S. (2001), reportó buenos resultados de solubilización por 2 especies de *Aspergillus* y una de *Penicillium*.

Por otro lado, NARSIAN y PATEL (2000), obtuvieron buenos resultados de solubilización de *Aspergillus aculeatus*, testeado con rocas fosfóricas de distintas procedencias y en medios de cultivos adicionados con distintos compuestos, que tenían por finalidad, aumentar la eficiencia de solubilización del hongo.

WHITELAW *et al.* (1999), experimentaron con *Penicillium radicum*, cepa que fue aislada desde la rizósfera de una planta de trigo. La capacidad de este hongo para solubilizar fosfato inorgánico fue estudiada *in vitro*. El hongo creció en medios de cultivo líquido que contenían amonio o nitrato como única fuente de N adicionado con P insoluble o escasamente soluble. Los mejores resultados de solubilidad fueron obtenidos a partir del medio adicionado con fosfato cálcico monohidrógeno ( $\text{CaHPO}_4$ ).

NAHAS (1996), por su parte, trabajando con hongos de distintas procedencias, verificó que las más eficientes fueron las del género *Penicillium*. Por su parte SILVA FILHO *et al.* (2002) trabajando en medio sólido, verificaron que en el potencial de solubilización de estos mismos géneros, era mayor la del genero *Penicillium*. De la misma manera, ALTOMARE *et al.* (1999) reportaron

por primera vez una cepa de *Trichoderma*, específicamente *Trichoderma harzianum*, capaz de solubilizar minerales insolubles o poco solubles.

NUNES *et al.* (2002), concluyeron que los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* tienen mayor potencial solubilizador de fosfatos naturales que otros hongos aislados desde el suelo. Por su parte, Burgstaller *et al.* (1992) citados por ILLMER *et al.* (1995), señalan que *Aspergillus niger* y *Penicillium simplicissimum* son conocidos por ser organismos lixiviantes poderosos capaces de producir grandes cantidades de ácidos orgánicos, que es un importante mecanismo para la solubilización de fosfatos (ILLMER *et al.*, 1995). SPERBER (1958), por su parte, observó un predominio en la eficiencia de hongos obtenidos en la rizósfera.

**2.5.5 Estudios sobre agar fosfato precipitado.** De acuerdo a Sackett, *et al.* (1994), citado por WITHELAW (2000) la solubilización de varias formas de fosfato de calcio precipitado en placas con medio agar sólido no tamponado ha sido usada ampliamente como el criterio inicial para el aislamiento de microorganismos solubilizadores de P. Estos mismos autores señalan que los microorganismos cultivados sobre agar  $\text{CaHPO}_4$  precipitado producen zonas más claras alrededor de sus colonias, si ellos son capaces de solubilizar minerales de fosfato cálcicos. Otras formas de P escasamente solubles, tales como el  $\text{FePO}_4$  o  $\text{AlPO}_4$  también han sido incluidas en el agar fosfato precipitado para el aislamiento de microorganismos solubilizadores de P.

WITHELAW (2000), indica que las técnicas de agar fosfato precipitado son útiles para aislar y seleccionar microorganismos para investigaciones posteriores, pero tienen sensibilidad limitada. Factores tales como la tasa de difusión de los ácidos orgánicos excretados y la tasa de crecimiento de la colonia afectan el tamaño de la zona más clara.



CUNNINGHAM y KUIACK (1992), reportaron que tanto la composición de nutrientes (por ejemplo, fuente de carbono y fuente de nitrógeno) como la capacidad tampón del medio, incidirían en el diámetro de la zona de solubilización del  $\text{CaHPO}_4$ .

KHAN, M. y KHAN, S. (2001), señalan que los hongos solubilizadores de P, mostraron una actividad solubilizadora de P mayor que las bacterias, tanto sobre agar fosfato precipitado como en medio líquido. En los estudios se mostró que en cultivo líquido, las hifas del hongo estaban adheridas a partículas de P mineral, mientras que las bacterias no. Los hongos en el suelo son capaces de abarcar una mayor superficie que las bacterias y por lo tanto pueden ser más importantes para la solubilización del P.

**2.5.6 Estudios en medio líquido.** WITHELAW (2000), señala que se han realizado investigaciones acerca de la habilidad de los hongos del suelo para solubilizar fosfatos inorgánicos escasamente solubles en cultivos puros en medio líquido no tamponado. La solubilización de P fue a menudo más alta cuando los niveles de P insoluble eran altos, siempre que el volumen del medio líquido fuese adecuado para la disolución.

Por su parte GOENADI *et al.* (2000) trabajaron con *Aspergillus niger* en la solubilización de roca fosfórica en medio líquido. El desarrollo de la biomasa fúngica necesitó un período de incubación considerablemente largo para incrementar el fósforo soluble. Este fenómeno lo atribuyeron al periodo necesario para que los hongos crezcan y produzcan una cantidad suficiente de ácidos orgánicos que solubilizan el fósforo.

NARCIAN y PATEL (2000) compararon la eficiencia de solubilización de *Aspergillus aculeatus* con distintos tipos de roca fosfórica, concluyendo que la

solubilización dependía del tipo de roca y los organismos a utilizar, además de la cantidad y naturaleza de ácidos orgánicos secretados al medio.

Por su parte BARRERA *et al.* (2002) en su investigación evidenciaron la eficiencia de *Aspergillus niger* en su capacidad de solubilizar la roca fosfórica Carolina del Norte, además de una disminución en los valores de pH en el medio de cultivo utilizado.

## **2.6 Praderas en rotación y permanentes**

BALOCCHI, *et al.* (1998) señalan que de un total de 1.500.000 ha de la X Región, 850.000 corresponderían a praderas naturalizadas y el resto a praderas mejoradas y sembradas. Los mismos autores señalan que las praderas de la zona sur de Chile son principalmente praderas naturalizadas y praderas mejoradas.

El mejoramiento de la pradera naturalizada, se orienta a aumentar la cantidad de forraje disponible, a mejorar la participación de las especies más productivas y a conseguir una distribución anual homogénea de la productividad. Al mejorar las condiciones de manejo, en las praderas, aparece un dominio de *Lolium perenne* (ballica inglesa), *Trifolium repens* (trébol blanco), *Dactylis glomerata* (pasto ovilla). En general, el objetivo principal del mejoramiento de las praderas de la zona sur, ha estado orientado a establecer una pradera mejorada con un contenido equilibrado de gramíneas y de leguminosas.

Las praderas sembradas presentan un alto potencial de rendimiento en el llano longitudinal y costero de la décima región y, como consecuencia de las características del clima y del suelo; las cantidades varían de norte a sur (RUIZ, 1996). El mismo autor indica que la distribución botánica de la pradera en esta

región, es diferente según el manejo que a tenido la pradera a través del tiempo.

**2.6.1 Especies utilizadas en el estudio.** Pasto ovillo: Es una especie forrajera originaria de la región mediterránea de Europa de gran aceptación en nuestro país, de preferencia en la zona de lluvias, tanto en praderas de pastoreo como de corte (AGUILA, 1997).

El mismo autor señala que dentro de las gramíneas, esta planta es una de las más valiosas, por la calidad de su forraje, por su persistencia y por la versatilidad de su utilización. Por agresividad capacidad de recuperación después del corte y talajeo, por su resistencia al pisoteo, persistencia y larga vida, es una planta que se presta para ser incluida en mezcla de pastoreo. Sin embargo, es apta para ser cortada en prácticas de henificación y ensilaje, debido a su crecimiento erecto y abundante desarrollo primaveral, pero, solamente en el primer corte, a causa que sus requerimientos y proporción en la mezcla disminuyen notoriamente por efecto de su receso estival.

Ballica inglesa: Junto con el pasto ovillo es una de las plantas forrajeras más antiguas del país. Actualmente ésta especie puede ser cultivada en cualquier zona del país donde existan condiciones favorables para su establecimiento especialmente, en zonas regadas o zona de lluvias (AGUILA, 1997).

La Ballica inglesa presenta grandes posibilidades en el país, para ser cultivadas en mezcla con otras leguminosas, para pastoreo o corte. Para cualquier fin, la ballica inglesa es una de las mejores especies forrajeras, por su alto valor nutritivo y por el agrado con que es consumida por toda clase de ganado. Para ensilaje, su elevado tenor en hidratos de carbono, superior al de

otras gramíneas, con toda seguridad ha de conducir a la obtención de forrajes de alta calidad, sea en mezcla con trébol o simplemente cultivada sola.

Trébol blanco: En Chile es una leguminosa ampliamente conocida y esta distribuida a lo largo y ancho de nuestro territorio, donde quiera que encuentre humedad suficiente para su desarrollo, desde los terrenos regados de la zona central hasta el extremo sur, y de la zona de la costa hasta la cordillera, a 2000 y más metros de altura sobre el nivel del mar (AGUILA, 1997).

El mismo autor indica que las características que distinguen a esta especie hacen que estén especialmente adaptados para el pastoreo, para ser utilizados en periodos bastante largo durante la temporada de crecimiento de los pastos, en mezclas con otras gramíneas. Aunque también se pueden emplear, son menos apropiados para henificación por el problema que presentan para cegarlos y su alto contenido de humedad que dificulta el curado. Este trébol tiene un excelente valor alimenticio, están especialmente indicados para servir como forraje de animales de alta producción lechera.

**2.6.2 Fertilización fosforada en praderas.** El nivel a alcanzar de P en los suelos, es dependiente del tipo de pradera, siendo mucho más exigente en la medida que tiene un contenido importante de trébol en praderas mixtas, ya que si este esta bajo los requerimientos de trébol, esta especie se encontrará en competencia con ballica, la cual es mucho más eficiente para obtener desde el suelo el P necesario para sus requerimientos (BALOCCHI *et al.*, 1998).

En general es aceptado que la fertilización obedece a los requerimientos dados por el potencial productivo del agroecosistema, en donde se desea fertilizar, o a una productividad inferior a la de su potencial productivo que puede ser fijada económicamente por el agricultor (demanda nutricional). El estado nutricional de un suelo con pradera (capacidad de suministro del suelo)

debe ser determinado antes de programar la fertilización, razón por la cual es necesario hacer un análisis químico del suelo (BALOCCHI *et al.*, 1998). El método químico de análisis de suelo más usado en la zona sur de Chile es el método P- OLSEN (LOPETEGUI, 2001). La fertilización de fósforo a seguir para obtener el nivel a alcanzar de P-Olsen, dependerá del nivel inicial presente en el suelo (medido a través de un análisis de suelo), capacidad de retención de P del suelo (dependiente de las reacciones rápidas y lentas de los fosfatos de los suelos), y de la pérdida por extracción de P a la cual está sometida la pradera (dependiente a su vez de la eficiencia de la utilización de la pradera, el tipo animal en pastoreo y la topografía del terreno) (BALOCCHI *et al.*, 1998).

2.6.2.1 Fertilizantes fosforados. La fuente original en las primeras fabricaciones de fertilizantes fosforados fueron los huesos, pero esta fuente fue posteriormente agotada. En la actualidad la roca fosfórica (RF) es el principal y casi único material importante para la fabricación de fertilizantes fosforados (TISDALE *et al.*, 1993).

2.6.2.2 Roca fosfórica. La roca fosfórica ha sido reconocida como una valiosa alternativa como fuente de fertilizante fosforado, especialmente en suelos ácidos. El valor económico de las rocas ha aumentado considerablemente con el aumento de los costos de producción de otros fertilizantes como el superfosfato (GOENADI, 2000).

CAMPILLO (1990) señala que casi sin excepción las rocas fosfóricas (RF) son minerales fosfóricos nativos que contienen poco o nada de fósforo soluble al agua y cantidades variables de fósforo soluble en citrato, que es un solvente utilizado por la industria para medir solubilidad en las rocas. TISDALE *et al.* (1993), a su vez indica que después de varios procesos y pasos de purificación, la roca fosfórica contiene entre 1,5% y 17,5% de P (27% a 41%  $P_2O_5$ , usualmente 30%). La RF puede ser utilizada como fertilizante de

aplicación directa bajo ciertas condiciones. La disolución de la roca en el suelo está influida por su reactividad química y las propiedades del suelo. Influyen factores como pH,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Al}^{3+}$  intercambiables, contenido de fósforo en solución y el porcentaje de materia orgánica del suelo. Para que su efectividad sea mayor debe estar finamente molida y debe ser mezclada con el suelo (TISDALE., 1993). HAMMOND y RAMIREZ (1990), por su parte indicaron que la reactividad de la roca fosfórica varía dependiendo de la sustitución de fosfato por carbonato dentro de la estructura de la apatita. Una alta reactividad, debido a un alto grado de sustitución, está estrechamente relacionado con un aumento en la disponibilidad de fósforo para las plantas.

### 3 MATERIAL Y METODO

#### 3.1 Materiales

Los materiales utilizados para la realización del estudio se describen a continuación.

**3.1.1 Biológico.** Plantas de ballica inglesa (*Lolium perenne*), pasto ovillo (*Dactylis glomerata*), trébol blanco (*Trifolium repens*) con sus respectivas raíces. 600 cepas fúngicas fueron aisladas desde la rizósfera de las plantas anteriormente señaladas.

**3.1.2 Reactivos.** Los reactivos utilizados en la parte práctica del trabajo se señalarán con las abreviaturas usadas en el texto: agar extracto de malta al 2% (AEM), agua destilada, alcohol 96%, caldo malta al 2% (CM), agar papa dextrosa (PDA), fosfato de calcio ( $\text{CaHPO}_4$ ), fosfato de hierro ( $\text{FePO}_4$ ), roca fosfórica Carolina del Norte (RF), solución A (constituida por molibdato de amonio, tartrato de antimonio y potasio, ácido sulfúrico concentrado y agua destilada), Solución B (constituida por solución A adicionada de ácido ascórbico), solución C (solución estándar de fosfato dihidrógeno monopotásico 1000 mg/L de fósforo) y soluciones 0.4, 1.0, 2.0, 3.0 y 5.0 mg/L de fósforo (preparadas a partir de la solución C).

**3.1.3 Equipos.** Agitador orbital Lab Line, autoclave Orthmann, balanzas (analítica Sartorius y precise 2000 C), cámara de incubación J. Kottermann, espectrofotómetro GBC (UV/VIS 916) estufa de secado, pHmetro Zeiss, refrigerador Trotter.

**3.1.4 Otros.** Adhesivos de identificación, algodones, asas de siembra, baguetas, capilar, lápices marcadores, matraces, pipetas, papel metálico, placas Petri, pinzas, vasos precipitados, sacabocado, tubos de ensayo.

## **3.2 MÉTODOS.**

Los métodos utilizados para la obtención de cepas fúngicas rizosféricas, la capacidad de estas cepas para solubilizar 2 fuentes de fosfato *in vitro* y su capacidad de solubilizar roca fosfórica en un medio líquido se describen en los puntos siguientes.

**3.2.1 Lugar de estudio.** El muestreo se realizó en la comuna de San José de la Mariquina en el predio perteneciente a Don Klaus Prehn en un suelo Hapludand (673,75 **E**; 5625,5 **N** UTM., Cuadrante H18).

Según GASTO, *et al.*, (1987), corresponde a la provincia húmeda de verano fresco o valdiviano y que algunas de las especies que se establecen en la provincia son *Lolium perenne* (ballica inglesa), *Trifolium repens* (trébol blanco), *Dactylis glomerata* (pasto ovillo), *Festuca arundinacea* (festuca).

**3.2.2 Toma de muestra** Se extrajeron en total 60 plantas. 30 provinieron de pradera en rotación y 30 de praderas permanentes: de las 30 plantas extraídas a los distintos manejos culturales, 10 corresponden a ballica inglesa, 10 a pasto ovillo y 10 a trébol blanco. Cada una de las plantas fue extraída desde el suelo con ayuda de una pala estéril, obtenida, la planta respectiva fué sacudida para eliminar parte de la tierra adherida a sus raíces y a continuación la planta fue depositada en una bolsa plástica previamente rotulada.

**3.2.3 Procesamiento de las raíces de las plantas.** A cada planta individualmente se les extrajeron las raíces, posteriormente las raíces fueron lavadas en tres ocasiones con agua destilada estéril como se indica a



continuación: Primer lavado, las raíces se lavaron con 100 mL de agua destilada estéril, el agua del lavado respectivo fue recolectada en un matraz estéril. Segundo lavado: las raíces anteriormente señaladas fueron lavadas con 50 mL de agua destilada estéril, el agua del lavado respectivo fue recolectada en un matraz estéril. Tercer lavado: Las raíces se depositaron en un matraz estéril, se les adicionaron 200 mL de agua destilada estéril y el conjunto se depositó en un agitador orbital a 1500 rpm por 20 minutos tras lo cual se extrajeron las raíces desde el matraz.

**3.2.4 Aislamiento de cepas fúngicas rizosféricas.** Para el aislamiento de las cepas fúngicas se empleó la técnica de las diluciones seriadas como se describe a continuación: el agua del primer y segundo lavado obtenida de las raíces de la especie vegetal respectiva se mezclaron para conformar una muestra única, a continuación con ayuda de una pipeta estéril se extrajo 1 mL de la muestra única y se depositó en un tubo que contenía 9 mL de agua destilada estéril (dilución  $10^{-1}$ ), a continuación este tubo fue agitado manualmente y a partir de él se extrajeron con una nueva pipeta estéril 1 mL y se depositó en un nuevo tubo que contenía 9 mL de agua destilada estéril (dilución  $10^{-2}$ ). Esta metodología se realizó hasta obtener una dilución de  $10^{-6}$ . Cada dilución obtenida fue sembrada en forma individual y por triplicado en placas Petri que contenían 10 mL de AEM adicionado de antibiótico. Sembradas las placas se incubaron a  $23 \pm 2$  °C por 10 días, periódicamente se rescataron las colonias fúngicas que fueron apareciendo en cada placa las cuales fueron repicadas en tubos que contendrán AEM inclinado. De igual manera y bajo las mismas condiciones de cultivo se procedió con las muestras de agua del tercer lavado de las raíces.

**3.2.5 Determinación de la capacidad solubilizadora de cepas fúngicas en agar adicionados a  $\text{CaHPO}_4$  y a  $\text{FePO}_4$ .** Cada una de las cepas fúngicas aisladas fue sembrada por duplicado en placas que contenían 10 mL de PDA

adicionado de 0.4 g  $\text{CaHPO}_4$  y 2 mL de rojo alzarín que cumple la función de indicador de solubilización en 200 mL del medio. También cada cepa fúngicas fue sembrada por duplicado en placas que contenían 10 mL de PDA adicionado de 0.4 g  $\text{FePO}_4$  y rojo alzarín en 200 mL del medio. Sembradas las placas se incubaron a  $23 \pm 2$  °C por 5 días, período en el cual se midió el halo de solubilización producido por la cepa en estudio.

Como control se utilizó una cepa de *Aspergillus niger* proveniente del CBS.

3.2.5.1 Análisis estadístico para seleccionar las cepas fúngicas solubilizadoras en medio adicionado de  $\text{CaHPO}_4$  y  $\text{FePO}_4$ . Las mediciones de los halos de solubilización producida por cada cepa fúngica en los agares señalados en el punto 3.2.3 fueron sometidos a un análisis de varianza y una prueba de rangos múltiples con el fin de comparar los promedios, para lo cual se utilizó el programa estadístico Statgraphics plus.

Cada una de las cepas cultivadas en ambos medios que contenían las fuentes de fósforo a solubilizar fueron comparadas entre ellas, con relación al tamaño de crecimiento de la colonia y del halo de solubilización formado después del quinto día de incubación. Las cepas seleccionadas requieren tener buenos rangos de crecimiento de la colonia y solubilización tanto para el medio ácido ( $\text{FePO}_4$ ) como para el medio básico ( $\text{CaHPO}_4$ ).

**3.2.6 Ensayo de solubilización de roca fosfórica** Las cepas fúngicas a ensayar y los controles fueron procesados individualmente y por triplicado. De cada una de las cepas, cultivadas como se indica en el punto 3.2.4, con ayuda de un sacabocado estéril se extrajeron tres discos de agar con micelio (de 1 cm de diámetro) y se inocularon en cada una de los matraces que contenía el

medio de cultivo líquido adicionado y sin adicionar con roca fosfórica Carolina del Norte.

Los matraces sembrados y no sembrados con las cepas fúngicas se incubaron en un agitador orbital a 1500 rpm, a 20 °C en oscuridad hasta por 60 días. En cada uno de los tiempos de incubación (0, 7, 15, 30, 45 y 60 días) se retiraron 3 matraces inoculados con cada cepa fúngica en estudio y/o control. Para determinar la solubilización del fósforo, pH del medio de cultivo y el peso seco de los micelios.

**3.2.7 Procesamiento de las muestras.** Una vez finalizado los períodos de incubación respectivos, se filtró el contenido de cada matraz y se depositaron alícuotas de 10 mL en matraces para la posterior determinación del fósforo solubilizado y pH. Lo que quedó retenido en el filtro (micelio fúngico) se utilizó para establecer el peso micelial. El contenido de los controles sin inóculo fúngico se filtró y a las alícuotas de 10 mL se les determinó el fósforo soluble y pH.

**3.2.7.1 Determinación del fósforo solubilizado.** A las alícuotas de 10 mL obtenidas en las muestras procesadas, se le determinó la concentración de fósforo soluble mediante el método Murphy y Riley. Previo a esta determinación se realizó una curva de calibración. Para ello, a partir de la solución C se prepararon volúmenes que contenían 0.4, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 mg/L de fósforo, como blanco se utilizó agua destilada. De cada una de las soluciones y del blanco en forma independiente se extrajeron 5 mL y se depositaron en matraces aforados de 50 mL, se agregaron 20 mL de solución B y se aforó con agua destilada, mezclándola. Después de 30 minutos la mezcla obtenida fue leída a una longitud de onda 880 nm en el espectrofotómetro.

3.2.7.2 Determinación del pH. A las alícuotas de 10 mL obtenidas de las muestras procesadas como se señaló en el punto 3.2.5 se les determinó pH, mediante un pHmetro.

3.2.7.3 Determinación del peso seco micelial. A partir del micelio fúngico que quedó retenido en el papel filtro se determinará el incremento de masa micelial en los distintos períodos de incubación. El micelio obtenido se lavó con agua destilada hasta eliminar la roca fosfórica, se le quitó el exceso de agua y se pesó (peso fresco), luego se depositó en placas Petri y se secó por 24 h en una estufa a 105 °C (peso seco).

### 3.3. **Diseño experimental y estadístico.**

Utilizando un diseño completamente al azar se realizó un experimento de incubación a través del tiempo para estudiar la solubilización de Roca Fosfórica tras la adición de cepas fúngicas en estudio, la variación del peso micelial y el pH del medio de incubación. Se trabajó por triplicado cada una de las cepas en estudio y controles y se incubaron por 0, 7, 15, 30, 45 y 60 días. En el Cuadro 2 se presenta un resumen de lo señalado. Los valores obtenidos de los tratamientos, con sus respectivos días de incubación y ordenados en el tiempo fueron analizados por el programa estadístico Statgraphics plus. Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA). Se utilizó la prueba de Tukey, considerando un 5% de significancia para detectar si existen diferencias estadísticamente significativas de los tratamientos en el tiempo y entre tratamiento.

**CUADRO 2** Diseño del ensayo de solubilización de la roca fosfórica Carolina del norte, por cepas fúngicas seleccionadas.

Grupo de tratamiento	Días de incubación					
Controles						
CM + RF esterilizado	0	7	15	30	45	60
CM + RF + A. niger	0	7	15	30	45	60
Tratamientos						
P.O cepa 1 + RF+ CM	0	7	15	30	45	60
P.O cepa 2 + RF + CM	0	7	15	30	45	60
B.I cepa 1 + RF+ CM	0	7	15	30	45	60
B.I cepa 2 + RF+ CM	0	7	15	30	45	60
T.B cepa 1 + RF+ CM	0	7	15	30	45	60
T.B cepa 2 + RF+ CM	0	7	15	30	45	60

CM=Caldo malta al 2%; RF= Roca fosfórica Carolina del Norte, P.O=Cepa fúngica aislada de la rizosfera de pasto ovillo; B.I=Cepa fúngica aislada de la rizósfera de ballica inglesa; T.B=Cepa fúngica aislada de la rizósfera de trébol blanco.

## 4 PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 4.1 Obtención de hongos a partir de la rizósfera de *Dactylis glomerata* (Pasto ovillo), *Lolium perenne* (Ballica inglesa) y *Trifolium repens* (Trébol blanco).

En el Cuadro 3, se indican las taxa fúngicas determinadas a partir de la rizósfera de *Dactylis glomerata* (pasto ovillo), *Lolium perenne* (ballica inglesa), *Trifolium repens* (trébol blanco). En este cuadro se señala la cantidad de cepas aisladas desde las rizósferas en estudio.

Como se observa en el Cuadro 3, se aislaron un total de 300 cepas fúngicas, las cuales taxonómicamente se encasillaron en 46 especies y 7 micelios estériles (estos últimos no se pudieron identificar debido a la ausencia de sus estructuras reproductivas o de resistencia). Además, como se puede observar el mayor número de taxa (14) desde la rizósfera de *Lolium perenne* (ballica inglesa) se determinó desde el suelo no rizosférico, es decir, la zona más alejada del plano radicular. Por su parte, el menor número de taxa (11) se determinó igualmente desde esta fracción de suelo. Ambos datos se obtuvieron desde la pradera permanente.

**CUADRO 3** Taxa y cantidad de cepas aisladas desde la rizósfera de *Dactylis glomerata*, *Lolium perenne* y *Trifolium repens*, en dos manejos culturales.

Taxa	Práctica de manejo											
	Pradera permanente						Pradera en rotación					
	A		B		C		A		B		C	
	NR	R	NR	R	NR	R	NR	R	NR	R	NR	R
<i>Absidia cilindrospora</i>	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	2
<i>Absidia glauca</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0
<i>Absidia spinosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2
<i>Acremonium breve</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Acremonium fusidioides</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Acremonium strictum</i>	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aspergillum niger</i>	0	1	0	2	1	0	0	1	2	3	0	0
<i>Aspergillum subsessilis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Aspergillum terreus</i>	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Asterofora parasitaria</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Beauveria bassiana</i>	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetomium globosum</i>	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0
<i>Cladosporium cladosporoides</i>	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>Eladia sacula</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Epiccocum purpurascens</i>	0	0	2	1	2	0	0	0	0	2	0	0
<i>Eurotium amstelodami</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Exophiala jeanselmi var heteromorfa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fusarium oxysporum</i>	0	0	1	0	1	3	1	1	1	0	1	0
<i>Fusarium solanii</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Geotrichum candidum</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Gliocladium catelonatum</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Gliocladium roseum</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
<i>Humicola fuscoatra</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
<i>Humicola grisea</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
<i>Microsporium gypseum</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Mortierella vinacea</i>	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	2	0
<i>Mucor hiemalis</i>	2	1	1	1	0	0	2	2	1	1	1	0
<i>Paecilomyces inflatus</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Paecilomyces marquandii</i>	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
<i>Penicillium chrysogenum</i>	5	2	3	3	2	1	4	1	0	2	0	2
<i>Penicillium commune</i>	0	3	3	2	1	0	1	0	1	0	2	0
<i>Penicillium expansum</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Penicillium frequentans</i>	5	0	4	0	8	6	4	0	2	1	0	5
<i>Penicillium purpurascens</i>	3	3	1	0	1	1	2	1	5	0	1	1
<i>Penicillium raistrickii</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Penicillium restrictum</i>	4	3	4	6	4	5	8	6	4	7	13	4
<i>Penicillium serie raistricke</i>	0	2	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0
<i>Phialophora mutabilis</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Phoma medicaginis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Phytium debarryanum=P.irregulare</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
<i>Talaromyces flavus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Trichoderma hamatum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0
<i>Trichoderma koningii</i>	2	0	2	1	1	2	0	0	0	1	0	1
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Trichoderma piluliferum</i>	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>Zygorhynchus moelleri</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1
Totales parciales de las cepas	30	+19	28	+19	28	+20	29	+20	30	+20	30	+20

Continuación Cuadro 3

Micelios Estériles	Práctica de manejo											
	Pradera permanente						Pradera en rotación					
	A		B		C		A		B		C	
	NR	R	NR	R	NR	R	NR	R	NR	R	NR	R
Micelio estéril "2"	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Micelio estéril "A"	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Micelio estéril "1"	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Micelio estéril "B"	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Micelio estéril Demataceus "C"	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Micelio estéril Demataceus "d"	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Micelio estéril Demataceus "e"	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total de micelios estériles	1		3		2		1		0		0	
<b>Total de cepas</b>	50		50		50		50		50		50	

A= *Lolium perenne*; B= *Trifolium repens*; C= *Dactylis glomerata*

NR= suelo no rizosférico; R= suelo rizosférico

Para el caso de *Trifolium repens* (Trébol blanco) la mayor cantidad de taxas aisladas (18) se determinó desde el suelo no rizosférico en pradera en rotación. El menor número de taxas (10) se determinó igualmente desde el suelo no rizosférico, tanto en el caso de pradera permanente como en rotación.

Para *Dactylis glomerata* (Pasto ovillo), se observó que el mayor número de taxas aisladas (16) se determinó desde el suelo no rizosférico extraído desde la pradera permanente. Por el contrario, el menor número de taxas aisladas se obtuvo del suelo rizosférico muestreado en el mismo manejo cultural.

Como se observa en el Cuadro 3, en ambos sistemas de manejo y para todas las especies forrajeras estudiadas, el género fúngico que se determinó con mayor frecuencia en la rizósfera fue *Penicillium*. Como lo señala ALEXANDER (1980), la presencia de especies de hongos encontrados en la rizósfera depende de la especie forrajera muestreada y de la distancia a la raíz de la muestra de suelo.



El Cuadro 3, muestra que los hongos que dominan la zona no rizosférica de la especie forrajera *Dactylis glomerata* (pasto ovillo) fueron el género *Penicillium*, en especial las especies *P. chrysogenum*, *P. frequentans*, *P. restrictum* y de igual forma, pero en menor cantidad se presentan las especies *Mucor hiemalis* y *Trichoderma koningii*. En el suelo rizosférico, las taxas dominantes fueron *P. commune*, *P. purpurascens* y *P. restrictum*, coincidiendo con lo reportado por BETTUCCI (1993), con hongos aislados de praderas bajo pastoreo, en donde la especie dominante fue *Eupenicillium brefeldianu* y en menor medida *Aspergillus terreus*, *Eupenicillium shearii* y *Penicillium simplicissimum*.

En la rizósfera de *Lolium perenne* (Ballica inglesa) bajo pradera permanente (Cuadro 3), el género *Penicillium* fue el dominante, destacándose en la zona no rizosférica las especies *P. frequentans* y *P. restrictum* y en menor proporción *Trichoderma koningii*, *Epiccocum purpurascens* y *Acremonium strictum*. Para el caso del rizoplano, las especies encontradas con mayor frecuencia fueron *P. restrictum*, *P. chrysogenum* y *Aspergillus niger*. Estos datos son similares a los datos encontrados por PATKOWSKA (2001), quien señala que para el caso de otras gramíneas, como el trigo, los géneros dominantes son *Penicillium* y *Aspergillus*.

El género encontrado en la rizósfera de la especie forrajera *Trifolium repens*, en el manejo de pradera permanente y, al igual que en las especies forrajeras anteriores fue *Penicillium*, en donde destaca la especie *P. frequentans*, la cual dominó en las dos áreas rizosféricas estudiadas, seguida por la especie *P. restrictum* que también estuvo presente en toda la rizósfera. *Fusarium oxisporum* y *Trichoderma koningii* se encontraron en una porción externa del rizoplano de la leguminosa.

Al comparar los dos sistemas de manejo (pradera permanente y en rotación) no existe diferencia significativa en la distribución de los géneros fúngicos presentes en la rizósfera de las plantas estudiadas, lo que concuerda con lo señalado por CHRISTENSEN (1981) quien señala que algunas especies fúngicas presentes en praderas, es posible encontrarlas en otras zonas vegetales. Sin embargo, existen diferencias entre las especies del género *Penicillium* dependiendo de las especies forrajeras y el manejo cultural de la pradera (Cuadro 3).

Para el caso de *Dactylis glomerata* en pradera rotación, la zona no rizosférica fue dominada por *P. restrictum* seguido por *P. chrysogenum* y *P. frequentans*. El rizoplano, por otra parte, fue dominado por *P. restrictum* seguido *Chaetomium globosum*.

Para la especie *Lolium perenne* en pradera de rotación, *P. purpurascens* estuvo presente en mayor cantidad en la zona no rizosférica, seguido por *P. restrictum* y *Trichoderma hammatum*. En cambio *P. restrictum* fue el más representativo en el rizoplano, seguido por *Aspergillus niger* y *Eppicocum purpurascens*.

Para la especie *Trifolium repens* en pradera en rotación, la cepa fúngica que dominó la zona no rizosférica fue *P. restrictum*, con una marcada diferencia con las demás especies presentes. En el caso del rizoplano la especie dominante fue *P. purpurascens* seguido por *P. restrictum*.

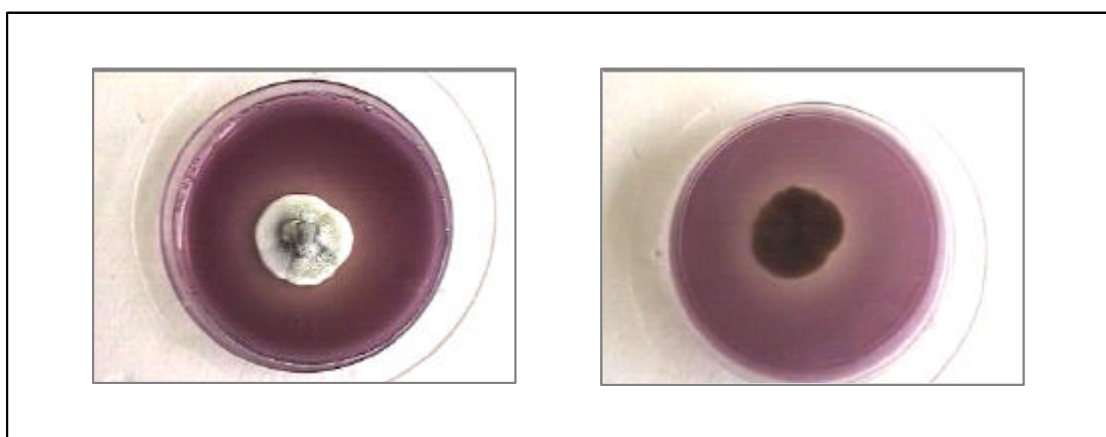
#### **4.2 Determinación y selección de la capacidad de las cepas aisladas para solubilizar *in vitro* CaHPO<sub>4</sub> y FePO<sub>4</sub>.**

Tras cultivar todas las cepas aisladas en un medio adicionado de CaHPO<sub>4</sub> y otro con FePO<sub>4</sub>, se seleccionaron en total 6 cepas fúngicas, 2 por cada tipo de especie vegetal y manejo cultural. Las cepas se seleccionaron

mediante un análisis de varianza de los halos de solubilización y el diámetro de la colonia y posteriormente fueron comparadas con la cepa control (*Aspergillus niger*) en un medio de cultivo líquido adicionado con roca fosfórica Carolina del Norte. En la Figura 2 se muestran los halos de solubilización de las cepas fúngicas.

En el Cuadro 4, se muestran las cepas solubilizadoras de  $\text{CaHPO}_4$  y  $\text{FePO}_4$  que obtuvieron mejor resultado y en la última columna se indican las cepas seleccionadas de acuerdo al P-value obtenido para diámetro de la colonia y el halo de solubilización.

La Cepa 4 aislada desde Ballica Inglesa de P. permanente, corresponde a Micelio estéril A. La Cepa 4 aislada desde ballica inglesa de P. rotación, corresponde a *Mucor hiemalis*. La Cepa 18 aislada desde trébol blanco de P. permanente, corresponde a *Gliocladium roseum*. La Cepa 7 aislada desde a trébol blanco de P. rotación, corresponde a *Penicillium chrysogenum*. La Cepa 18 aislada desde a pasto ovilla de P. permanente, corresponde a *Penicillium frequenstans*. La Cepa 12 aislada desde pasto ovilla de P. rotación, corresponde a *Penicillium chrysogenum*\*\*.



**FIGURA 2** Formación de halo de solubilidad *in vitro* para las cepas aisladas desde la rizósfera de plantas forrajeras.

**CUADRO 4 Cepas fúngicas seleccionadas para la solubilización de la roca fosfórica Carolina del Norte en medio líquido.**

Especie	Cepa fúngica				
	parámetros	Cepa	Diámetro (cm)	P-value	Cepa seleccionada
BI.PP	Colonia	11	2,84	0,0007	4
		4	4,28		
	Halo	11	2,90	0,0064	
		4	3,60		
BI.PR	Colonia	15	2,81	0,012	4
		4	3,33		
	Halo	15	2,81	0,012	
		4	3,33		
TB.PP	Colonia	18	1,81	0,0051	18
		11	2,05		
	Halo	18	2,28	0,71	
		11	2,24		
TB.PR	Colonia	7	1,38	0,64	7
		8	1,45		
	Halo	7	2,00	0,027	
		8	1,57		
PO.PP	Colonia	18	2,06	0,001	18
		15	2,63		
	Halo	18	2,89	0,0005	
		15	2,10		
PO.PR	Colonia	16	1,26	0,057	12
		12	1,40		
	Halo	16	1,98	0,0007	
		12	2,75		

BI.PP=Ballica inglesa (P.permanente); BI.PR=Ballica inglesa (P. rotación); TB.PP=Trébol blanco (P.permanente); TB.PR=Trébol blanco (P. rotación); PO.PP= Pasto ovillo (P.permanente); PO.PR= Pasto ovillo (P. rotación).

CUNNINGHAM y KUIACK (1992), utilizaron el mismo método de solubilización *in vitro* en un medio básico ( $\text{CaHPO}_4$ ) para el hongo *Penicillium bilaii*, obtuvieron valores de diámetro de colonia y de halo de solubilidad de  $2,7 \pm 0,1$  y  $6,4 \pm 0,4$  respectivamente. Los resultados en relación al tamaño de la colonia se asemejan a los obtenidos en el presente estudio, a si por ejemplo, la

cepa 18 obtenida desde PO.PP (*Penicillium frequentans*), formó una colonia cuyo diámetro fue de 2,63 cm. También en el presente estudio se obtuvieron colonias de tamaño menor a la señalada por los autores anteriormente citados, así por ejemplo la cepa 16 de PO.PR (*Penicillium restrictum*), desarrolló una colonia de 1,13 cm (Anexo 16).

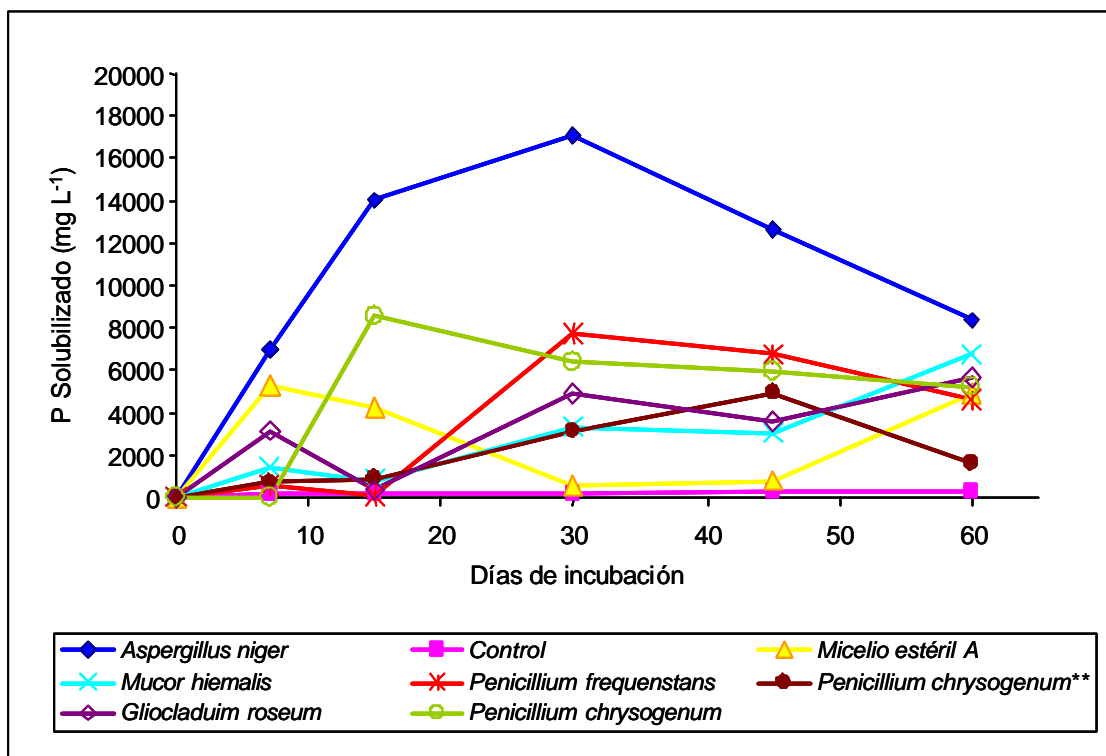
No se encontró información o valores de solubilidad en un medio *in vitro* para algunos de los hongos estudiados en la presente investigación.

#### **4.3 Determinación del fósforo solubilizado**

Son pocos los estudios de solubilización de roca fosfórica por hongos en medio líquido (GOENADI *et al.*, 2000; NARCIAN y PATEL, 2000) y la investigación realizada por BARRERA (2001), es la única realizada en un medio de cultivo caldo malta adicionado de roca fosfórica Carolina del Norte.

En la Figura 3, se muestra la variación de las concentraciones de fósforo solubilizado de la roca fosfórica Carolina del Norte (RF) adicionada a caldo malta al 2% (CM), para distintos períodos de incubación (0 a 60 días). Los tratamientos se indican en el Cuadro 2 con sus respectivos controles.

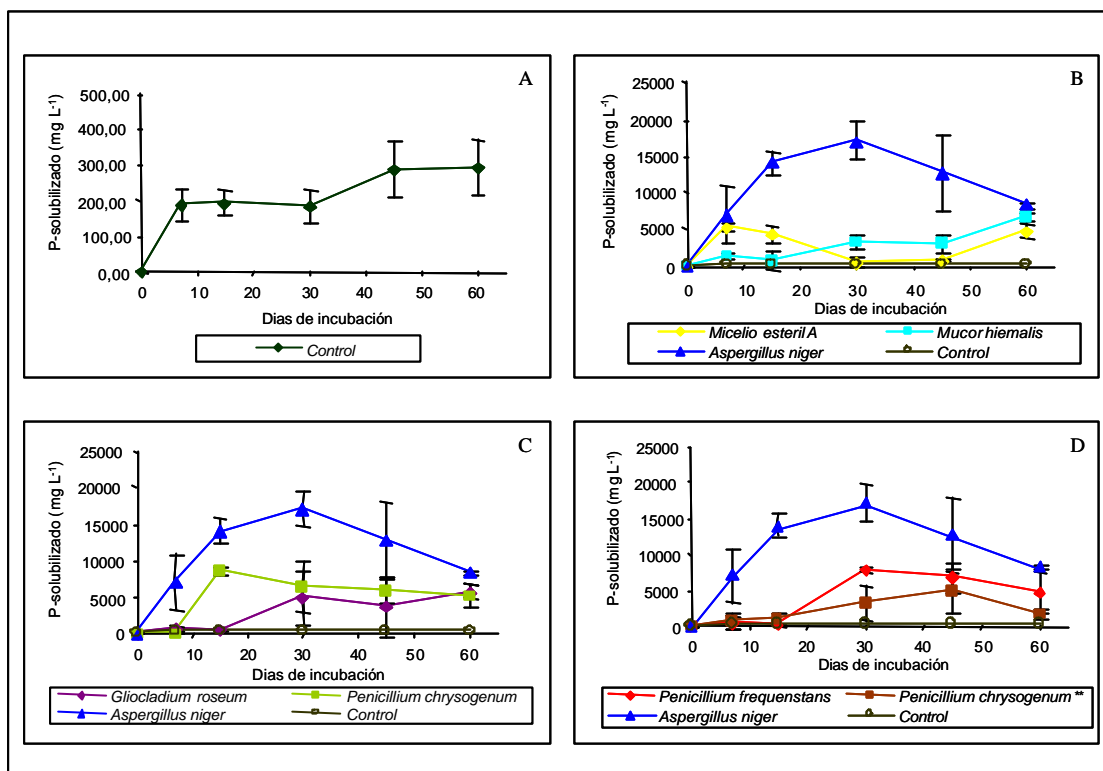
Como se desprender de la Figura 3, los niveles de solubilización de P del medio inoculado con la cepa control *Aspergillus niger* fue superior a todas las cepas nativas seleccionadas durante todo el periodo de incubación.



**FIGURA 3** Variación de las concentraciones promedio del fósforo solubilizado durante el período de incubación de las 6 cepas seleccionadas, la cepa control (*A.niger*) y el Control (CM + RF)

CM+RF= Caldo malta al 2% adicionado de roca fosfórica Carolina del Norte

Como se observa en la Figura 4A, el control presenta una ligera solubilidad de la RF, esto se puede deber principalmente al contenido de P que contiene el medio de cultivo (BARRERA, 2002) ya que la cantidad de P significativa soluble que posee la roca es prácticamente nula. Existió una variación en la concentración de P soluble en los primeros 7 días ( $187,39 \text{ mg L}^{-1}$ ) del ensayo, manteniéndose estable hasta el día 30 ( $182,27 \text{ mg L}^{-1}$ ) donde existe un aumento en la variación del P soluble hasta el día 45 del ensayo ( $289,19 \text{ mg L}^{-1}$ ), tendiendo a mantenerse estable hasta el último día del ensayo ( $292,34 \text{ mg L}^{-1}$ ).



**FIGURA 4 Solubilización de roca fosfórica Carolina del Norte a través del tiempo.** A= CM esterilizado + RF. B= CM esterilizado + RF tratado con *Micelio estéril A*, *Mucor hiemalis* y la cepa control (*A. niger*). C= CM esterilizado + RF tratado con *Gliocladium roseum*, *P. chrysogenum* y la cepa control. D= CM esterilizado + RF tratado con *P. frequenstans*, *P.chrysogenum\*\** y la cepa control. Las barras de error indican las desviaciones estándar de las determinaciones en triplicado.

Como se describe en la Figura 4B, 4C y 4D, *Aspergillus niger* muestra un aumento en sus índices de solubilidad muy superiores a las cepas nativas a partir del día 15 del ensayo, en donde existió un aumento progresivo de la solubilidad hasta el día 30, en donde alcanzó su punto más alto, pero sin mostrar diferencias estadísticas respecto al día 15 (Anexo 1). BARRERA, (2002) encontró que los valores más altos de solubilización se presentaron el día 45 de la incubación con dos cepas de *A. niger*, incubados bajo las mismas

condiciones, llegando a valores de solubilidad superiores a los descritos por otros investigadores, pero similares a los obtenidos en el presente experimento. A partir del día 45, existe una disminución en la concentración de P soluble que solo es significativa al llegar al día 60 de la incubación. NARSIAN *et al* (1995), indica que la solubilización de P soluble disminuye debido a que otras formas de P han sido solubilizadas. Otra explicación de esto, es la formación de compuestos órgano fosforados inducidos por liberación de metabolitos orgánicos, que, a su vez, reduce la cantidad de P disponible (ILLMER y SCHINNER, 1992).

GOENADI *et al* (2000) determinaron los efectos de dosificaciones de *A. niger* en un medio de cultivo. Se determinó que la solubilización del fosfato aumenta cuadráticamente en el punto más alto de solubilidad. Muchos sugieren que el aumento en la concentración de P en medio que contienen hongos solubilizadores de P, está relacionado con la secreción de ácidos orgánicos tipo metabolitos, los cuales muestran correlación con el pH del medio (ILLMER Y SCHINNER, 1992; ILLMER *et al.*, 1995; NARSIAN *et al.*, 1995).

Bojinova *et al* (1997) citados por BARRERA (2002), estudiaron la bioconversión de fosfato de roca utilizando diferentes cepas de *Aspergillus niger* y concluyeron que el tiempo de incubación, tipo de cepa y medio nutritivo son factores que influirían significativamente en este proceso.

En relación al fósforo solubilizado por las cepas aisladas desde ballica Inglesa (Figura 4 B), ambas presentaron índices de solubilidad superiores al control y valores inferiores a los registrados por *Aspergillus niger*. Micelio estéril A, obtuvo su mayor índice de solubilidad el día 7 (5949,93 mg L<sup>-1</sup>), manteniéndose estable hasta el día 15 (4234,31 mg L<sup>-1</sup>), en donde empieza una disminución estadísticamente significativa durante los días 30 y 45 (576,39 y 825,44 mg L<sup>-1</sup>. respectivamente). El día 60 existió un aumento en los índices de



P soluble similares a los registrados durante el día 7 y 15 del ciclo de incubación ( $4912,8 \text{ mg L}^{-1}$ ). Por su parte, *Mucor hiemalis*, presenta un aumento poco significativo del P soluble durante los tres primeros períodos del ensayo, registrándose los menores valores los días 15 y 7 ( $788,17$  y  $1402,6 \text{ mg L}^{-1}$  respectivamente), aumentando progresivamente hasta el día 60, en donde se registra un aumento significativo en los valores de solubilidad ( $6721,19 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Como se muestra en la Figura 4C, las cepas aisladas desde Trébol blanco, fueron significativamente superior que el control, y a la vez inferior a la cepa *Aspergillus niger* (P-Value < 0,05). En el caso de *Penicillium chrysogenum*, no existió variaciones significativas en los valores de solubilidad durante los 7 primeros días del ensayo ( $26,8 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Anexo 1). A partir del día 15, en donde se alcanzó los valores más altos de solubilidad ( $8571,05 \text{ mg L}^{-1}$ ), existió variaciones significativas en los niveles de P-soluble, que se mantuvieron hasta el fin del período de incubación. En el caso de *Gliocladium roseum*, no existió diferencia significativa en los niveles de P soluble durante todo el período de incubación.

En la Figura 4D, se puede observar que las cepas seleccionadas y aisladas desde pasto ovillo fueron superiores al control. En tanto, la solubilización de *A. niger* con respecto a las cepas nativas, es altamente significativa (P-Value < 0,05). En el caso de *Penicillium frequenstans*, no existió diferencia significativa en los valores de solubilidad durante los primeros 15 días de incubación, pero a partir del día 30 ( $7749,03 \text{ mg L}^{-1}$ ) existe un aumento estadísticamente significativo que se mantuvo con valores estables de solubilidad hasta el día 60 ( $4584,02 \text{ mg L}^{-1}$ ). Con respecto a la cepa *Penicillium chrysogenum*, presentó niveles bajos de solubilidad al día 0 ( $2,76$ ) como en el resto de las cepas del ensayo, en tanto durante la mayor parte del período de incubación, esta cepa presentó valores que no difieren estadísticamente entre un período y otro.

Según las figuras 3 y 4 la cepa control *Aspergillus niger* y los hongos nativos *Penicillium chrysogenum* y *Penicillium frequenstans* fueron los que obtuvieron mayores índices de solubilidad en el medio líquido CM + RF, lo que concuerda con lo señalado por muchos investigadores BANIK y DEY, 1982; ILLMER y SCHINNER, 1992; GOENADI *et al.*, 2000, KHAN, 2001; NUNES *et al.*, 2002) que señalan a los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* por ser reconocidos en su capacidad de solubilizar fósforo.

NARSIAN y PATEL (2000) compararon la eficiencia relativa de *Aspergillus aculeatus* en la solubilización de distintos tipos de roca fosfórica. Pudieron determinar que *A. aculeatus* fue capaz de solubilizar todas las formas naturales de fosfatos probadas. También observaron que la eficiencia relativa de *A. aculeatus* usando diferentes rocas fosfóricas, depende de la naturaleza de la roca y de los organismos utilizados, sin olvidar la importancia que tiene la naturaleza y la calidad de los ácidos orgánicos secretados en el medio.

Por otro lado WHITELAW *et al.* (1999), señalan que la inoculación en medio líquido con *Penicillium radicum* altera significativamente la cantidad de P solubilizado y el pH. La solubilización de fosfatos por *P. radicum* desde otras fuentes minerales ligadas a Fe y Al fue inferior que aquellas ligadas al Ca. Stumm y Morgan (1995), citados por WHITELAW *et al.* (1999), señalan que esto es debido probablemente a la alta solubilidad de los minerales de fosfato de Ca y al pH del medio inoculado con *P. radicum*. La habilidad de este hongo para solubilizar cantidades significativas de  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (dos formas comunes de fosfato de Ca encontrados en el suelo) y coloides asociados a Al-P (la mayor forma de fosfato encontrado en suelos ácidos) podría indicar que la inoculación por hongos facilita la utilización de fosfatos parcialmente solubles del suelo por las plantas.

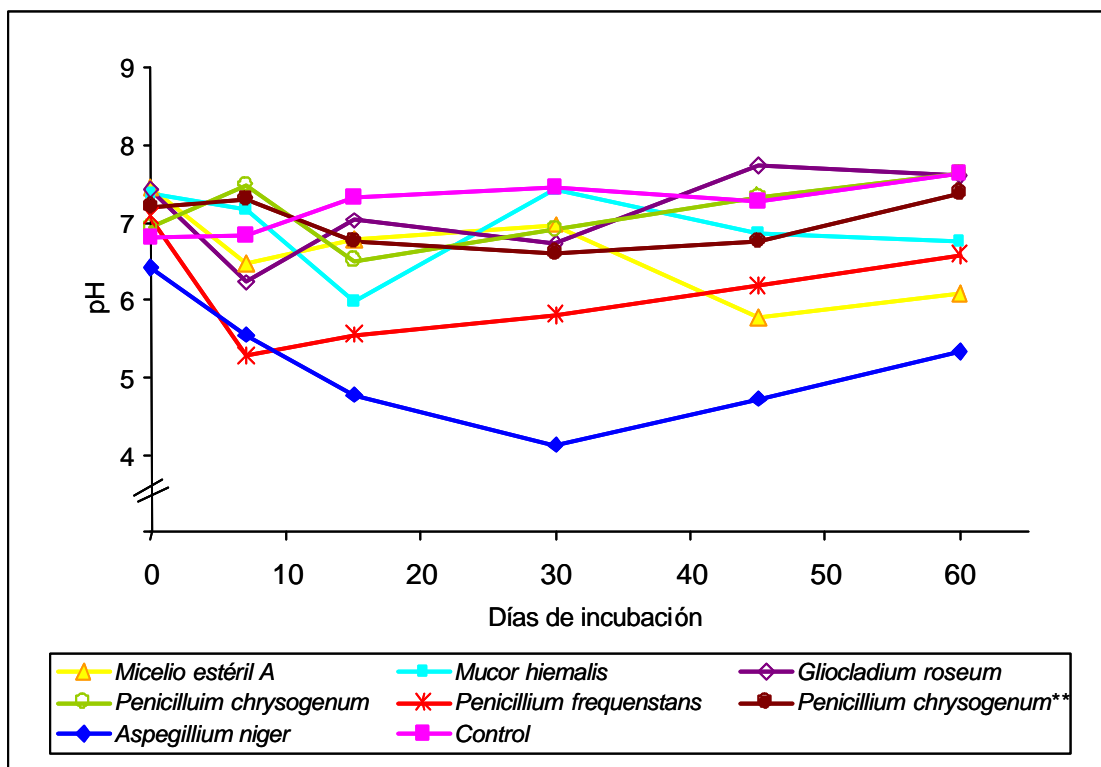
Por su parte, ASEA *et al.*, (1988), aislaron dos hongos, *Penicillium bilaii* y *Penicillium cf. fuscum* que fueron capaces de solubilizar diferentes cantidades de roca fosfórica en un medio de cultivo líquido. La solubilización del fósforo inorgánico se relacionó directamente con la caída del pH generado por cada una de las cepas.

#### 4.4 Determinación de pH

Numerosos estudios demuestran que el pH del suelo es una propiedad crítica que influye sobre la disolución de RF. (Kanabo y Gilkes, 1987; Bolan y Hedley, 1990, citados por HINSINGER y GILKES, 1997) y la importancia que tiene el pH dentro de la solubilización de P escasamente soluble por parte de los microorganismos del suelo, es un tema discutido y analizados por muchos investigadores (ASEA, *et al.*, 1988; ILLMER y SCHINNER, 1992; ILLMER *et al.*, 1995; NARSIAN *et al.*, 1995; KIM *et al.*, 1998; WHITELAW, *et al.*, 1999; NARSIAN y PATEL, 2000; BARRERA, 2002).

En la Figura 5, se muestran las curvas de variación del pH de la roca fosfórica Carolina de Norte (RF) adicionada al caldo malta al 2% (CM) en distintos períodos de incubación (0 a 60 días). Las cepas fúngicas seleccionadas los respectivos controles que se muestran en la Figura 4 se indican en el Cuadro 3.

Como es posible observar en la Figura 5, el medio inoculado con la cepa control *Aspergillus niger* fue la que demostró alcanzar los mayores niveles de acidez, superando a todas las cepas seleccionadas durante casi todo el periodo de duración del ensayo, con excepción del pH alcanzado por *Penicillium frequenstans* en el día 7 (5,28).

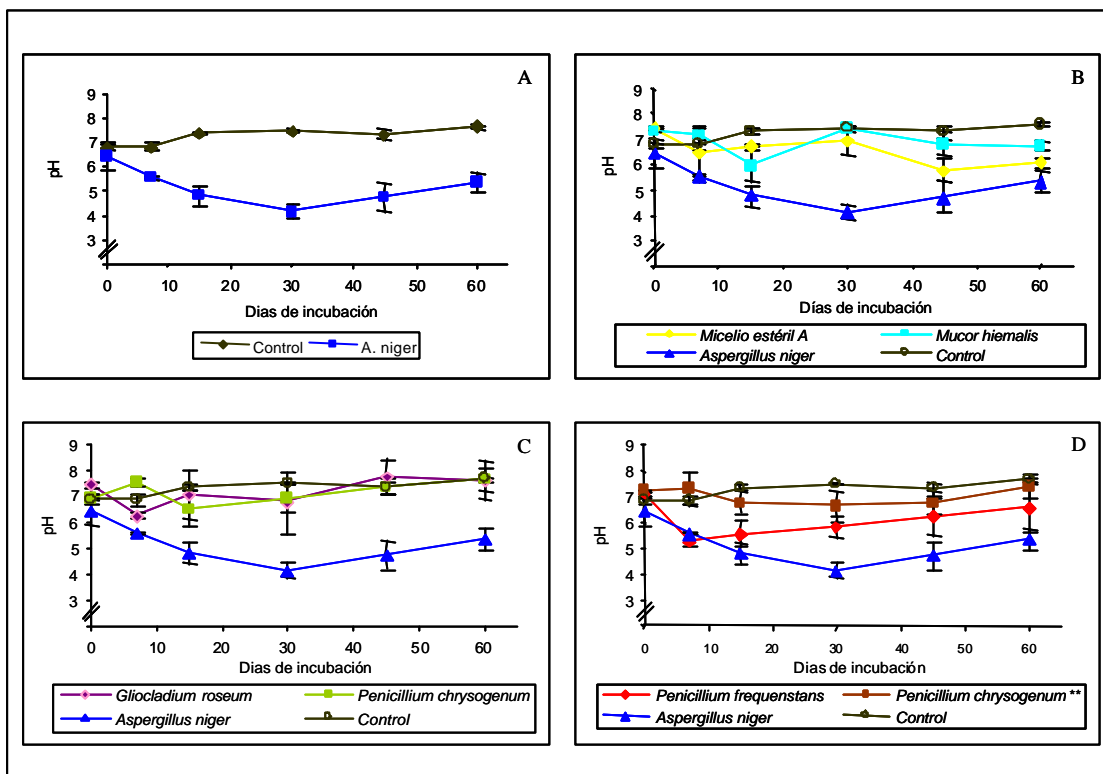


**FIGURA 5** Variación de valores de pH durante el período de incubación de las 6 cepas seleccionadas, la cepa control (*A. niger*) y el Control (CM + RF).

CM+RF= Caldo malta al 2% adicionado de roca fosfórica Carolina del Norte.

Como se observa en la Figura 6A, el Control no registran variaciones significativas en los valores de pH durante los primeros 7 días, siendo su valor de 6,81. Sin embargo, a partir del día 15 su valor varía a 7,39, existiendo un aumento significativo del pH que se mantiene constante hasta el fin del periodo de incubación (Anexo2).

El medio inoculado con *Aspergillus niger* sufrió un descenso significativo de pH de casi 2 puntos al día 15 de incubación, alcanzando el valor más bajo el día 30 (4,12) manteniéndose estable hasta el día 60 del ensayo, en donde se determinó un leve aumento (5,3) (Anexo 2).



**FIGURA 6** Variación del pH del medio de cultivo a lo largo del tiempo. A= CM esterilizado + RF. y CM esterilizado + RF tratado con *A. niger*. B= CM esterilizado + RF tratado con Micelio estéril A, *Mucor hiemalis* y la cepa control (*A. niger*). C= CM esterilizado + RF tratado con *Gliocladium roseum*, *P. chrysogenum* y la cepa control. D= CM esterilizado + RF tratado con *P. frequenstans*, *P.chrysogenum*\*\* y la cepa control. Las barras de error indican las desviaciones estándar producidas por las diferencias entre repeticiones.

Niveles altos de solubilización de fósforo a menudo están asociados a pH bajo del medio de cultivo (BARRERA, 2002). Sin embargo, el mismo autor detecto en algunos casos una alta solubilización de fósforo en el filtrado de medios de cultivo con un pH relativamente alto.

Como se observa en la figura 6B, no existe diferencia significativa entre las cepas aisladas de Ballica inglesa ni con los controles durante los primeros 7

días de la incubación. Sin embargo, a partir del día 15 los valores de pH del medio inoculado con la cepa control *A. niger* comenzaron a bajar y a diferenciarse estadísticamente de las cepas nativas y el control mantuvo esta diferencia hasta el día 30 de la incubación. A partir del día 45 los niveles de *A. niger* sufren un ascenso en sus valores (4,72), igualando estadísticamente a *Micelio estéril A*, pero aun las diferencias con el Control y *Mucor hiemalis* son significativas. Al finalizar el periodo de incubación, no existen diferencias estadísticas significativas entre las cepas nativas y los controles (Anexo 2).

KIM *et al.* (1998) determinaron una fuerte relación entre la caída del pH y un aumento drástico de la concentración del fosfato solubilizado. En este trabajo existe una alta relación entre el pH y la cantidad de fósforo disuelto. Fox, *et al.* (1990), citado por WHITELAW (1999), indicaron que en variados estudios de laboratorio, se ha demostrado que la solubilización de fosfatos se debe principalmente a la excreción de ácidos orgánicos, que a su vez, son los responsables de la disminución del pH del medio.

*Aspergillus niger* parece capaz de producir algunos ácidos orgánicos. Un análisis de cromatografía demuestra una producción de 0,8 ( $\mu\text{M mL}^{-1}$ ) de citrato, 1,6 ( $\mu\text{M mL}^{-1}$ ) malato, 0,3 ( $\mu\text{M mL}^{-1}$ ), y 0,1 ( $\mu\text{M mL}^{-1}$ ). Estos ácidos, especialmente citrato y malato son conocidos como solubilizadores relativos de P insolubles (TISDALE *et al.*, 1993; SINGH y AMBERGER, 1998). Por su parte ILLMER *et al.*, (1995) indica que los niveles de ácidos orgánicos significantes para la disolución de fosfatos son del orden de 3 a 30 ( $\mu\text{M mL}^{-1}$ ) indistintamente por debajo de la eficiencia biótica de lixiviación. Estos investigadores asumen que la producción de ácidos orgánicos es un importante mecanismo para la solubilización de P relativamente insoluble, pero no es el único posible. WHITELAW *et al.* (1999), por su parte, señalan que la complejación de cationes que están unidos con el P, relacionado a su vez por el tipo de ácido orgánico

presente en el medio, puede ser un importante mecanismo de solubilidad de P en casos donde la estructura del ácido orgánico la favorezca.

Con respecto a los valores de pH de Micelio estéril A no sufre diferencias estadísticamente significativas, durante todo el período de incubación. Sin embargo, *Mucor hiemalis* presenta el día 15 (5,97) una disminución en los índices de pH presentando diferencias significativas respecto del día 7 (7,16) y el día 30 (7,42). Esta diferencia desaparece a partir del día 45 (6,84) hasta el final de la incubación

Por otra parte, en la Figura 6C las cepas *G. roseum* y *P. chrysogenum* aislados desde la rizósfera de Trébol blanco, no mostraron diferencias significativas para el pH entre ellas y con el control durante todo el periodo de incubación. Sin embargo, existió diferencias estadísticas con *A. niger* a partir del día 15 diferencia que se mantuvo hasta el fin del periodo de incubación. En relación a la variación del pH del medio inoculado con estas cepas nativas en forma individual, en ambos casos no existieron diferencias significativas durante los 60 días de incubación.

Para el caso de las cepas aisladas desde Pasto ovilla (Fig. 6D), la cepa *P.frequenstans* presentó bajos índices de pH al igual que *A. niger*, diferenciándose estadísticamente con *P.chrysogenum*\*\* y el control. Los valores de pH se igualaron entre las cepas nativas y el control, diferenciándose estadísticamente con *A. niger*. Esta diferencia se mantiene hasta el día 60 del ensayo en donde la cepa control se iguala estadísticamente con la cepa *P.frequenstans*, pero mantiene una diferencia significativa con *P.chrysogenum*\*\* y el control.

La variación del pH durante los primeros 7 días del medio inoculado con *Penicillium frequenstans* fue significativa. A partir del día 15, el índice de acidez

tendió a estabilizarse, no mostrando diferencias estadísticas significativas. La acidez del medio inoculado con *Penicillium chrysogenum* se mantuvo estable durante todo el periodo de incubación.

De la misma forma como ocurrió con las cepas aisladas desde la leguminosa, las cepas nativas aisladas desde la rizósfera de Pasto ovillo, tampoco mostraron diferencias significativas cuando estas fueron analizadas individualmente durante el periodo de incubación.

*Aspergillus niger*, es el único hongo que muestra una clara relación entre el fósforo soluble y la caída del pH, resultado concordante con lo planteado por GOENARDI *et al.* (2000) en estudios de solubilización de roca fosfórica con *A. niger* en donde encontraron una estrecha relación entre el pH del medio y el fósforo solubilizado.

Por otra parte, WHITELAW *et al.* (1999), señalaron que el mayor mecanismo de solubilización de fosfato mineral por *Penicillium radicum* pudo haber sido la acidificación o la disminución del pH a valores en los cuales estos compuestos fueron mas solubles. Sin embargo, los mismos autores señalan que la tendencia para la correlación entre el fósforo solubilizado y el pH es menos significativa después de la máxima solubilización. Se indica también que la declinación en la concentración del P soluble es debido probablemente a otros factores independientes del pH.

Ninguna de las cepas nativas analizadas en el presente estudio muestra una clara relación entre la solubilidad de fósforo en el medio y una disminución del pH. Lo que coincide con lo señalado por NARSIAN y PATEL (2000) y BARRERA (2002).

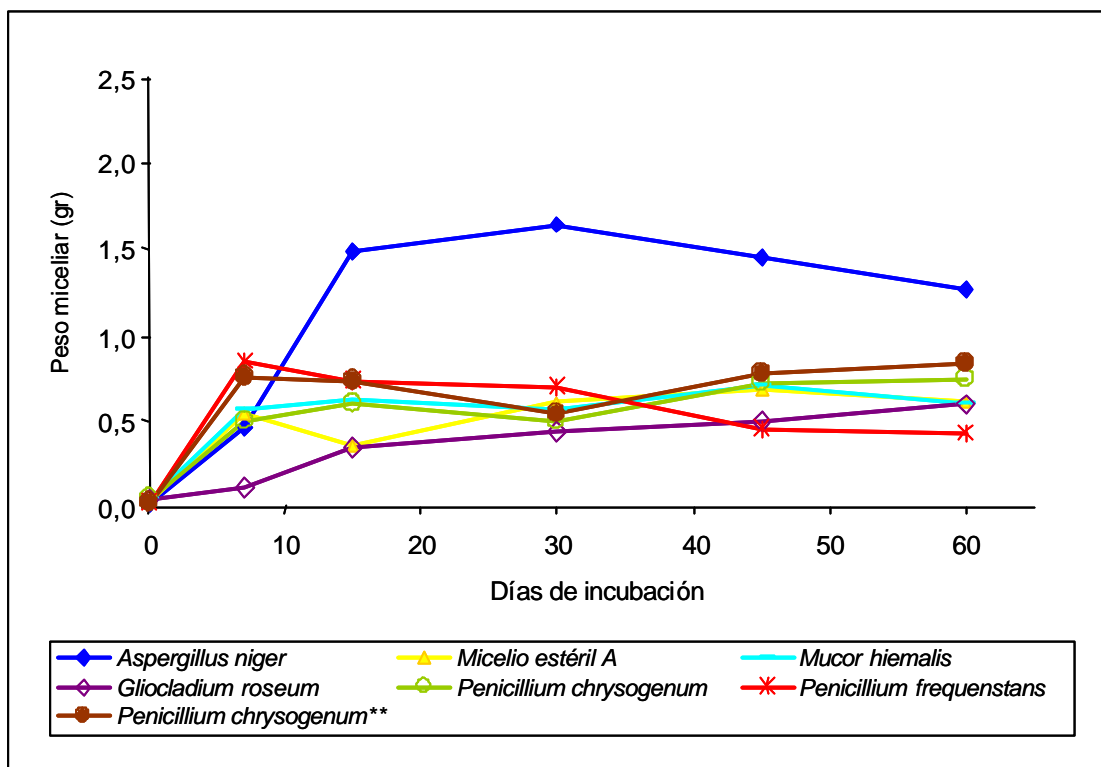


Por otra parte, la disminución del pH, puede ser el mecanismo más importante de solubilización de P antes del punto de máxima solubilidad, pero la disminución de la concentración no parece deberse a un aumento del pH. Al parecer son dos los mecanismos que afectan el aumento y la disminución de la concentración de fósforo soluble; antes y después de la máxima solubilidad. La tendencia de relación entre solubilidad del P y pH se vuelve menos significativa después de llegar a su óptimo. Lo mismo fue observado en la solubilización con *Aspergillus aculeatus* (NARSIAN, *et al.*, 1995) y *Penicillium simplicissimum* (ILLMER y SCHINNER, 1992).

#### **4.5 Determinación de peso seco micelial**

En algunos casos se ha reportado solubilización de fósforo inorgánico en ausencia de ácidos orgánicos, principalmente como resultado de la acidificación del medio de cultivo (ASEA *et al.*, 1988). Según ILLMER y SCHINNER (1995) la explicación más probable, estaría dada por la excreción de protones del citoplasma a la superficie externa de la célula. Esta hipótesis permitiría asumir que la roca fosfórica puede ser solubilizada desde la superficie de la célula. Si esto fuera efectivo, entonces el peso seco de los micelios debería estar directamente relacionado con el fósforo solubilizado.

En la Figura 7, se muestra el gráfico de variación del peso micelial de las cepas fúngicas ensayadas y control inoculado en el caldo malta al 2% (CM) adicionado con la roca fosfórica Carolina del Norte (RF). El parámetro fue determinado a entre los días 0 a 60.

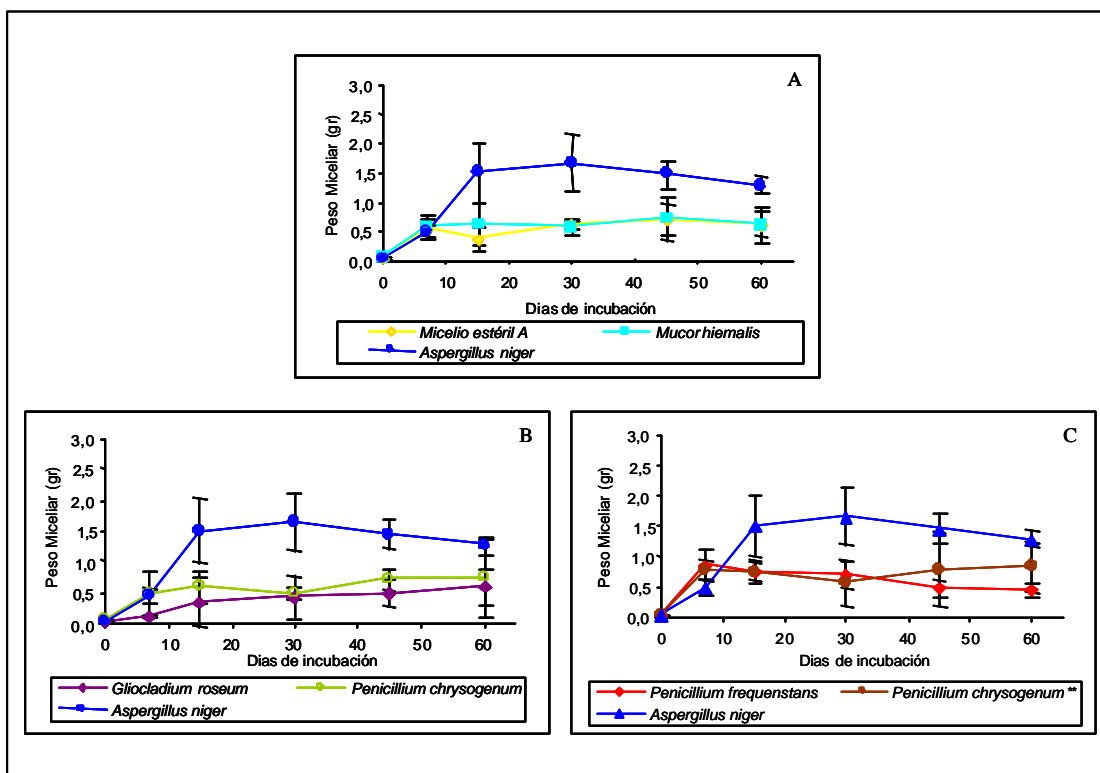


**FIGURA 7** Peso seco de micelios fúngicos en distintos períodos de incubación (0-60 días), de las 6 cepas seleccionadas, la cepa control (*A.niger*) y el Control (CM + RF).

CM+RF= Caldo malta al 2% adicionado de roca fosfórica Carolina del Norte

Como se observa en la Figura 7, durante los primeros 7 días del ensayo la variación del peso micelial se mantuvo estable en la mayoría de las cepas estudiadas, sólo *Gliocladium roseum* tuvo un crecimiento menor, presentando diferencias significativas para *P. chrysogenum\*\** y *P. frecuenstans* estas cepas presentaron mayor peso seco en este período. A partir del día 30 esta diferencia desaparece. Las cepas nativas no presentan diferencias entre ellas, pero si existe diferencia significativas con la cepa control *A. niger* que a partir del día 30 ya denota un aumento en el peso micelial superior a las otras cepas estudiadas (Anexo 3). Esto concuerda con lo señalado con BARRERA (2002), quien determinó que dos cepas de *A. niger* utilizadas en sus ensayos, crecieron

y solubilizaron grandes cantidades de fósforo. Al igual que en el estudio de BARRERA (2002) en el presente trabajo no se estableció si la acidificación del medio de cultivo se debió a la excreción de protones o a la producción de ácidos orgánicos o a su acción conjunta.



**FIGURA 8** Peso seco micelial de las cepas a lo largo del tiempo. A= CM esterilizado + RF tratado con *Micelio estéril A*, *Mucor hiemalis* y la cepa control (*A. niger*). B= CM esterilizado + RF tratado con *Gliocladium roseum*, *P. chrysogenum* y la cepa control. C= CM esterilizado + RF tratado con *P. frequenstans*, *P.chrysogenum\*\** y la cepa control. Las barras de error indican las desviaciones estándar de las determinaciones en triplicado.

Como se observa en la Figura 8A, las cepas aisladas desde ballica inglesa, no presentan diferencia en sus tasas de crecimiento hasta el día 15. En contraposición *Aspergillus niger* presenta un aumento en su peso micelial, diferenciándose estadísticamente con el micelio estéril A, lo que no ocurre con

*Mucor hiemalis*. Al día 30, la cepa control *A. niger*, presenta un aumento significativo en relación a las cepas nativas. Si embargo, esta diferencia no se mantiene en el tiempo. Al día 60 no existe diferencia estadística significativa entre las cepas nativas y la cepa control.

Como se puede observar en la Figura 8B, las cepas aisladas desde la rizósfera de trébol blanco no muestra diferencia significativa hasta el día 15 en donde la cepa control *A. niger*, muestra un aumento en su masa micelial, diferenciándose estadísticamente de las cepas nativas. Sin embargo, *G. roseum* y *P. chrysogenum*, no presentan diferencia entre ellos. Esta tendencia se mantuvo hasta el día 45, en donde *P. chrysogenum* se iguala estadísticamente a la cepa control, en cambio *G. roseum* mantiene diferencias significativas con *A. niger*. Al día 60 los pesos de los micelios no demuestran diferencias estadísticas significativas entre las cepas y el control.

En la Figura 8C se puede observar la tendencia del peso micelial de las cepas aisladas desde la rizósfera de pasto ovillo. No existen diferencias significativas entre las cepas nativas y la cepa control durante los tres primeros periodos del ensayo (Anexo 3). Solo a partir del día 30, se puede observar un aumento significativo de *A. niger* en comparación con las cepas nativas aisladas desde la gramínea. Para el día 45, los valores de *P.chrysogenum*\*\* se igualaron estadísticamente con la cepa control, sin embargo *P.frequenstans* mantiene la diferencia con *A. niger*. Para el día 60 de la incubación, las diferencias entre las cepas nativas y la cepa control no son significativas.

## 5 CONCLUSIONES

De las cepas nativas aisladas desde la rizósfera de las plantas forrajeras *Lolium perenne* (ballica inglesa), *Trifolium repens* (trébol blanco) y *Dactylis glomerata* (pasto ovilla), las correspondiente al genero *Penicillium* son las que se encontraron con mayor frecuencia, independiente al manejo cultural de la pradera.

Existen especies de hongos nativos capaces de solubilizar *in vitro*  $\text{CaHPO}_4$  y  $\text{FePO}_4$ , los cuales parecen ser específicos de la rizósfera muestreada. Estadísticamente las mejores cepas capaces de solubilizar  $\text{CaHPO}_4$  y  $\text{FePO}_4$  *in vitro* fueron Micelio estéril A aislada desde b. inglesa (pradera permanente), *Mucor hiemalis* aislada desde b. inglesa (pradera en rotación), *Gliocladium roseum* aislada desde t. blanco (pradera permanente), *Penicillium chrysogenum* aislada desde t. blanco (pradera en rotación), *Penicillium frequentans* aislada desde p. ovilla (pradera permanente) y finalmente *Penicillium chrysogenum*\*\* aislado desde p. ovilla (pradera en rotación).

La solubilización de P desde roca fosfórica Carolina del Norte adicionada a un medio de cultivo fue superior para la cepa control, que la realizada por las cepas nativas seleccionadas. La cepa control *Aspergillus niger* CBS mostró gran eficiencia para solubilizar alcanzando una solubilización de hasta  $17145,2 \text{ mg L}^{-1}$ . Las cepas nativas *P. chrysogenum* y *P. frequentans* fueron las que alcanzaron los mayores índices de solubilidad dentro de las nativas, con un máximo de  $8561,1 \text{ mg L}^{-1}$  y  $7749,03 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente.

La solubilización del P desde la roca por control *Aspergillus niger* está asociada a una acidificación del medio de cultivo, sugiriendo que existe un mecanismo que le permite a través de acidificación la solubilización P. El pH de los medios de cultivos inoculados con la cepa control fueron 4,7 y 4,1 (al día 15 y día 30, respectivamente). Las cepas nativas no mostraron una clara relación entre el P soluble y una disminución de los valores de pH del medio de cultivo, sugiriendo otros mecanismos para solubilizar P desde las fuentes agregadas.

Durante el período de incubación la cepa control *A. niger* fue la que mostró los valores más altos de peso seco micelial (1,49 y 1,65 g), diferenciándose estadísticamente de todas las cepas nativas en estudio, en donde no se registró una variación significativa del peso micelial durante todo el período de incubación.

## 6 RESUMEN

Se seleccionaron 6 cepas fúngicas nativas de un total de 300 aisladas desde la rizósfera de *Lolium perenne*, *Trifolium repens* y *Dactylis glomerata*. Esta selección se llevó a cabo a través de pruebas de solubilización *in vitro* en donde se evaluó el tamaño de colonia y el halo de solubilización, como parámetros de selección.

Las cepas seleccionadas más una cepa control (*Aspergillus niger*), fueron inoculadas en un medio líquido adicionado con roca fosfórica Carolina del Norte. El objetivo fue comparar la capacidad de solubilizar formas insolubles de P por las cepas las cepas nativas y la cepa control durante un periodo de incubación de 60 días.

*Aspergillus niger* fue la cepa que solubilizó mayor cantidad de P insoluble del medio de cultivo, diferenciándose estadísticamente de todas las cepas nativas incluidas en el ensayo. El pH del medio de cultivo inoculado con *A. niger* fue el que arrojó los valores mas bajos durante el ensayo, coincidiendo con los días en que se registraron los índices mas altos de solubilización de P. De igual forma la cepa control fue la que alcanzó los mayores valores de peso micelial, diferenciándose estadísticamente de las cepas nativas, que no presentaron un crecimiento significativo durante todo el periodo de ensayo.

## 6 SUMMARY

In this study six native fungi were selected from a total of 300 isolated from the rizosphere of *Lolium perenne*, *Trifolium repens* and *Dactylis glomerata*, three forages species of agronomic importance in the X Region of Chile. The selection was carried out through solubilization *in vitro* test, where was evaluated the colony size and the relationship between microbial growth and solubilization halo as selection parameters.

The fungi selected and the fungi control used (*Aspergillus niger*), were inoculated in a liquid medium enriched with North Carolina phosphoric rock. The objective of this research was to compare the capacity of solubilizity insoluble P forms by the native and the control during in incubation period of 60 days.

*Aspergillus niger* was the fungus that solubilizate the greatest amount of insoluble P from the cultivate medium, being statistically differently with all the native fungi included in this work. The lower value of pH was from the cultivate medium with *A. niger*, coinciding with the days in which was registered the highest indices of P solubilization. The control fungi reach the highest values of dry micelial weight, being statistic differently from the native fungi which do not present any significant growth during the experiment period.



## 7 BIBLIOGRAFIA

- AGUILA, H, 1997. Pastos y Empastadas. 8<sup>a</sup> ed. Santiago, Chile. Universitaria 314p.
- ALEXANDER, M. 1980. Introduction to soil microbiology.. USA. Wiley. 472p.
- ALTOMARE, C. NORVELL, W. BJÖRKMAN, y T. HARMAN G. 1999. Solubilization of Phosphates and Micronutrients by the Plant-Growth-Promoting and Biocontrol Fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. Applied and Environmental Microbiology.65 (7): 2926–2933.
- ASEA, P. KUCEY, R. y STEWART, J. 1988. inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil, soil Biol.. Biochem. 20: 459-464.
- BAKER; K., COOK, J. y GARRETT, S. 1974. Biological control of plant pathogens. Freeman. 433p.
- BALOCCHI, O., CARRILLO, R., FUENTES, R., NISSEN, J. y PINOCHET, D. 1998. Apuntes de Manejo de Praderas. Instituto de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile. 187p.
- BANIK, S. y DEY, B. 1982. Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing microorganisms. Plant and Soil, The Hague. 69 (3): 353-364.

- BARRERA, S. 2002. Solubilización de Roca Fosfórica Carolina del norte por hongos nativos aislados de un suelo trumao de la X Región. Tesis Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile. 57p.
- BARRERA, S., VALENZUELA, E., PINOCHET, D., 2002. Solubilización de Roca Fosfórica Carolina del Norte con cepas de *Aspergillus niger* aisladas desde un suelo trumao. Boletín Micológico 17:81-88.
- BARROW, N. 1980. Evaluation and utilization of residual phosphorus in Agriculture. F. E. Khasawneh, E. C. Sample and E. J. Kamprath (eds). ASA: CSSSA – SAA, Madison, USA. pp: 333-359.
- BARROW, N. 1983. A mechanistic model for describing the sorption and desorption of phosphate by soil. Journal of soil science 34: 733 - 750.
- BETTUCCI, L., RODRIGUEZ, C. y INDARTE, R. 1993. Fungal communities of two grazing-land soil in Uruguay. Pedobiología. 37: 72-82.
- BLACK, C.A. 1975. Relaciones Suelo- planta. Buenos Aires. Argentina. Hemisferio Sur. 866p.
- BRADY, N.C y WEIL, R.R. 1999. The nature and properties of soils. 12 th ed. New Jersey. USA. Prentice Hall. 881p.
- CAMPILLO, R. 1990. Roca fosfórica. Nueva alternativa para la fertilización de pradera. Investigación y progreso Agropecuario Carillanca, Chile. 9 (3): 31-34.

- CHRISTENSEN, M., 1981. Species diversity and dominance in fungal communities. The fungal community. New York, Marcel Dekker, pp: 201-232.
- CUNNINGHAM, J. y KUIACK, C. 1992. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. 58 (5): 1451-1458.
- DEB, B. y BORA, K. 1996. Effect of chemical fertilizer on the rhizosphere mycoflora and nodulation of pea plant. : Environment-and-Ecology. 14: (4): 747-751.
- DIOUF, D. DIOP, A. y NJOYE, I. 2003. Actinorhizal, mycorrhizal and rhizobial symbioses: how much do we know? African journal Biotechnology. 2 (1). 1-7.
- DOMMERMUES, Y. y KRUPA, S. 1978. Interactions between non-pathogenic soil microorganisms and plants. Elsevier scientific publishing company. 475p.
- GARZA-REQUENA, F. y VALDEZ, M. 2000. Tamaño de la población microbiana del suelo y desarrollo inicial de *Demanthus virgatus* (L.) Willd. Agrociencia. 34: 445-451.
- GASTO, J., GALLARDO, S. y CONTRERAS, D. 1987. Caracterización de los Pastisales de Chile. Reinos, Dominios y Provincias. Sistemas de Agricultura. Teoría-Avances. Santiago. Chile. 9: 24p.
- GOCHENAUR, S. 1981. Response of the soil fungal communities to disturbance. The fungal community. New York, Marcel Dekker, 459-479.

- GOENADI, D., SISWANTO y SUGIARTO, Y. 2000. Bioactivation of poorly soluble phosphate rocks with a phosphate rocks with a phosphorus-solubilizing fungus. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64: 927-932.
- GYANESHWAR, P., NARESH KUMAR, G., PAREKH, J. L., y POOLE, P. S., 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and soil* 245: 83-93.
- HAMMOND, L. y RAMIREZ. G. 1990. Potencial Agronómico de la roca fosfórica Carolina del Norte en la Agricultura de América Latina: Conferencia latinoamericana de intercambio regional sobre fertilizantes, San José, Costa Rica. 69p.
- HAYNES, R. 1982. Effects of liming on phosphate availability in acids soils. *Plant Soil* 68, pp: 289-309.
- HEREDIA, G., ULLOA, M y SOSA, V. 1988. Estudio comparativo entre comunidades fúngicas del suelo y de la rizósfera de plantas de espinaca cultivadas bajo el sistema de chinampas. *Lat-amer. Microbiol.* 30:155-161.
- HISSINGER, P. y GILKES, R. 1997. Dissolution of phosphate rock in the rhizosphere of five plant species grown in the acid, P-fixing mineral substrate. *Geoderma* 75: 231-249.
- ILLMER P. y SCHINNER F. 1992. Solubilization of inorganic phosphate by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 24: 389-395.

- ILLMER P., BARBATO A. y SCHINNER F. 1995. Solubilization of hardly-soluble  $\text{AlPO}_4$  with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* 27: 265-270.
- JONES, D. 1998. Organics acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant soil.* 166: 247-257.
- KALLURMATH, RS. y RAJASAB, AH. 2000. Rhizosphere mycoflora of onion (*Allium cepa* L.) crop with special reference to *Aspergillus niger* V. Tieghem. *Journal-of-Mycology-and-Plant-Pathology.* 30 (3): 339-342.
- KHAN, A. y PRAKASH, D. 1982. Rhizosphere and rhizoplane mycoflora of gram as affected by plant growth. *Indian Phytopathol.* 35: 717-718.
- KHAN, M. y KHAN, S. 2001. Biomangment of fusarium kilt of tomato by the soil application of certain phosphate solubilizing microorganisms. *International journal of pest management.* 47(3): 227-231.
- KIM K.Y., JORDAN D. y McDONALD G. 1998. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biol. Fertil. Soils.* 26: 79-87.
- KPOMBLEKOU-A, K. y TABATABAI, M. 1994. Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks. *Soil Science.* 158(6): 442-453.
- KUCEY R. 1983. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. *Can. J. Soil Sci.* 63: 671-678
- KULSHRESTHA. D. D. 1978. Rhizoplane mycoflora on maize in relation to plant growth. *Indian Phytopathol.* 31: 539.

- MARSCHNER, H. 1995. Mineral Nutrition of higher plant. 2<sup>a</sup> ed. London. Academic Press. 889p.
- MARTIN, A. 1977. Introduction to Soil Microbiology.. New York. Wiley. 470P.
- MISHA, K. B. 1978. Rhizoplane mycoflora of fiebre-yielding misha plants. Indian Phytopathol. 31:21-23.
- NAHAS, E. 1996. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. World Journal of Microbiology and Biotechnology, Oxford, 12 (6): 567-572.
- NARSIAN, V., THAKKAR J. y PUTEI H. 1995. Mineral phosphate solubilization by *Aspergillus aculeatus*. Ind. J. Exp. Biol. 33: 91-93
- NARSIAN, V. y PATEL, H. 2000. *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizar. Soil Biology & Biochemistry 32: 559-565.
- NISHIO, M. 1985. Some ecological features of phosphate-solubilizing microorganisms in grassland soils. *Proceedings of the XV International Grassland Congress, Kyoto Japan*. pp: 483-485.
- NUNES SILVA, G. NARLOCH, C., y SCHARF, R. 2002. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 37 (6).
- OVALDE, V. y AGUILERA, L. 1998. Microorganismos y Biodiversidad. Terra Vol 16 (3): 289-292.

- LOPETEGUI, J. 2001 Evaluación de tres fuentes de fósforo de distinto grado de solubilidad en una Pradera Permanente de la X región. Tesis In. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. 117p.
- PARKS E., OLSON G., BRINCKMAN F. y BALDI, F. 1990. Characterization by high performance liquid chromatography (HPLC) of the solubilization of phosphorus in iron ore by a fungus. *J. Indust. Microbiol.* 5: 183-190.
- PATKOWSKA, E. 2001. Bacterial and fungal populations in the rhizosphere of various plants as related to root exudates. *Journal of Plant Protection Research*, 41(3): 240-249.
- PATKOWSKA, E. 2002.. The role of rhizosphere antagonistic microorganisms in limiting the infection of underground parts of the spring wheat. *Electronic Journal of Polish (on line). Serie Horticulture. Volume 5, issue 2.* <<http://www.ejpau.media.pl/series/volume5/issue2/horticulture/art-04.html>> (15 ago. 2004)
- PIETA. D y PATKOWSKA, E. 2001. Effect of root exudates of various plants on composition of bacteria and fungi communities with special regard to pathogenic soil-borne fungi. *Acta-Agrobotanica.* 54 (1): 95-104.
- PIETA, D; PATKOWSKA, E; y PASTUCHA, A. 2001, Communities of fungi and bacteria in the rhizosphere of potato and their effect on phytopathogens. *Journal of Plant Protection Research.* 41 (2): 131-141.
- PINOCHET, D. 1995. The residual effect of applications of phosphate fertilizer measured by olsen method. Ph. D. Thesis. The University of Reading, England. U.K. 296p.

- PINOCHET, D 1996. Estrategia de fertilización fosforada en pradera. In: Avances en Producción Animal. Luis Latrille (ed). Instituto de Producción Animal, Facultad de Agronomía, Universidad Austral de Chile., Valdivia, Chile. pp:181-209.
- PINOCHET, D. 1998. Apuntes de la cátedra de nutrición vegetal. Instituto de Ingeniería Agraria y Suelos. Universidad Austral de Chile.
- RODRIGUEZ, J. 1993. La fertilización de los cultivos, un método racional. Colección en agricultura. Facultad de agronomía, Pontificia Universidad Católica de Chile. 290p.
- RUBIO, G. 2002. Conectando fósforo del suelo con la planta. Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires. <[http://www.ppi-far.org/ppiweb/iaarg.nsf/\\$webindex/7E5F39920730D97F03256CB000489D8B/\\$file/nota5.pdf](http://www.ppi-far.org/ppiweb/iaarg.nsf/$webindex/7E5F39920730D97F03256CB000489D8B/$file/nota5.pdf) >(2 sep 2004).
- RUIZ, I. 1996. Praderas para Chile. Instituto de investigación agropecuaria. 2º ed. Santiago, Chile. 734p.
- SATYAPRASAD, K. 1982. Rhizosphere and rhizoplane mycoflora of walt resistant and chickpea. Indian Phytopathol. 35:153-155.
- SCHIPPERS, B., BAKKER. A. y BAKKER, P. 1987. Interacions of deleterius and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. Ann. Rev. Phytopathol. 25: 339-358.
- SILVA FILHO, G., NARLOCH, C., y SCHARF, R. 2002. solubilization of natural phosphates by microorganisms isolated from pinus and eucaliptos



- plantations in Santa Catalina, Brasil. *Pesq. Agropec. Brasil.* 37(6): 847-854.
- SING, K., SING, N. y MISRA S. 1982. Rhizosphere mycoflora associated to sugar cane plants affected by red rot. *Indian Phytopathol.* 35(2): 310-313.
- SINGH, C. y AMBERGER A. 1998. Organic acids and phosphorus solubilization in straw composted with rock phosphate. *Bioresource Technol.* 63:13-16.
- SMIT, E., LEEFLANG, P., GLANDORF, B., VAN ELSAS, J. y WERNARS, K. 1999. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology.* 65 (6): 2614-2621.
- SPERBER, J. 1958. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Australian Journal of Agricultural Research*, Melbourne, 9(6): 778-781.
- SUSLOW, T. y M.N SCHROTH. 1982. Role de deleterious rhizobacteria as minor pathogens in reducing crop growth. *Phytopathology* 72: 111-115.
- SYLVIA, D. FUHRMANN, J. HARTEL, P. y ZUBERER, D. 1999. *Principes and Applications of Soil Microbiology.* 550p.

- TISDALE, S., NELSON, W., BEATON, J. y HAVLIN, J. 1993. Soil fertility and fertilizers 5<sup>a</sup> ed.. New York, USA. MacMillan 634 p.
- ULACIO, D. PEREZ, C. y PINEDA, J. 1997. Micoflora asociada a las raices de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) proveniente del estado de portuguesa. Bioagro. 9(1): 3-11.
- VELMOUROUGANE, K., PANNEERSELVAM, P., SHANMUKHAPPA, D., GOPINANDAN, T., SRINIVASAN, C. y NAIDU, R. 2000. Microflora associated with high and low grown arabica and robusta coffee. Journal of Coffee Research. 28: 1-2, 9-19.
- WHITELAW, M., HARDEN, T. y HELYAR, K. 1999. Phosphate solubilization in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. Soil Biology & Biochemistry 31: 655-665.
- WHITELAW, M. 2000. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. Advances in Agronomy. 69: 99-152.
- WILD, A. 1988. Plant nutrient in soils phophate. In: Russell's soil condition and plant growth. Wild, A. (ed). 11<sup>th</sup>. ed. Departament of Soils Science. University of Reading. Longman Scientific & technical. U.K. pp: 695-742.

**ANEXOS**

**ANEXO 1. Valores promedios y diferencias estadísticas de la concentración de fósforo solubilizado (mg L<sup>-1</sup>) en el tiempo para los diferentes tratamientos.**

Tiempo (día) Tratamiento	0		7		15		30		45		60	
M. estéril A	3,22	ab (a)	5349,93	bc (b)	4234,31	bc (b)	576,39	a (a)	825,44	a (a)	4912,80	bcd (b)
M hiemalis	2,27	a (a)	1402,66	ab (abc)	788,17	a (ab)	3321,05	bc (c)	3043,02	abc (bc)	6721,19	cd (d)
G. roseum	2,28	a (a)	799,04	abc (a)	368,41	a (a)	4963,62	bc (a)	3608,60	abc (a)	5702,72	cd (a)
P. chrysogenum	2,23	a (a)	26,80	a (a)	8561,05	c (b)	6369,47	c (b)	5953,99	bc (b)	5197,32	bcd (b)
P. frequenstans	2,30	a (a)	525,97	a (a)	128,17	a (a)	7749,03	c (b)	6793,71	bc (b)	4584,02	abc (b)
P. chrysogenum **	2,76	ab (a)	724,46	a (ab)	921,28	ab (ab)	3117,76	abc (ab)	4929,61	abc (b)	1654,16	ab (ab)
A. niger	2,80	ab (a)	7006,47	c (ab)	14084,58	c (bc)	17145,27	d (c)	12725,25	c (bc)	8352,51	d (b)
Control	1,90	a (a)	187,39	a (ab)	192,20	ab (ab)	182,27	ab (ab)	289,19	ab (c)	292,34	a (bc)

Letras distintas entre paréntesis difieren significativamente a través de la fila y letras distintas sin paréntesis difieren significativamente en la columna (P<0,05).

**ANEXO 2 Valores promedios y diferencias estadísticas del pH del medio de cultivo en el tiempo para los diferentes tratamientos.**

Tiempo (día) Tratamiento	0		7		15		30		45		60	
M. estéril A	7,44	a (b)	6,46	abc (ab)	6,76	bc (ab)	6,97	bc (ab)	5,77	ab (a)	6,07	ab (ab)
M hiemalis	7,38	a (b)	7,17	c (b)	5,97	abc (a)	7,42	bc (b)	6,84	bcd (ab)	6,76	abc (ab)
G. roseum	7,42	a (a)	6,23	abc (a)	7,04	bc (a)	6,72	bc (a)	7,71	d (a)	7,59	c (a)
P. chrysogenum	6,92	abc (a)	7,48	c (a)	6,51	bc (a)	6,90	bc (a)	7,32	cd (a)	7,61	c (a)
P. frequenstans	7,08	ab (c)	5,28	a (a)	5,54	ab (ab)	5,8	b (ab)	6,18	bc (abc)	6,58	abc (bc)
P. chrysogenum **	7,20	ab (a)	7,29	c (a)	6,76	bc (a)	6,61	bc (a)	6,75	bcd (a)	7,38	bc (a)
A. niger	6,43	c (c)	5,56	ab (bc)	4,76	a (ab)	4,13	a (a)	4,72	cd (ab)	5,32	c (bc)
Control	6,80	bc (a)	6,82	bc (a)	7,33	c (b)	7,46	c (b)	7,28	a (b)	7,61	a (b)

Letras distintas entre paréntesis difieren significativamente a través de la fila y letras distintas sin paréntesis difieren significativamente en la columna (P<0,05).

**ANEXO 3 Valores promedios y diferencias estadísticas del peso seco de los hongos nativos y la cepa control en el tiempo.**

Tiempo (día) Tratamiento	0			7			15			30			45			60		
M. estéril A	0,03	a	(a)	0,54	ab	(b)	0,36	a	(ab)	0,61	a	(b)	0,69	ab	(b)	0,61	a	(b)
M. hiemalis	0,05	a	(a)	0,57	ab	(a)	0,62	ab	(a)	0,57	a	(a)	0,71	ab	(a)	0,60	a	(a)
G. roseum	0,04	a	(a)	0,11	a	(a)	0,35	a	(a)	0,44	a	(a)	0,50	a	(a)	0,60	a	(a)
P. chrysogenum	0,05	a	(a)	0,50	ab	(a)	0,60	a	(a)	0,50	a	(a)	0,72	ab	(a)	0,75	a	(a)
P. frequenstans	0,03	a	(a)	0,85	b	(b)	0,74	ab	(b)	0,71	a	(b)	0,46	a	(ab)	0,43	a	(ab)
P. chrysogenum *	0,02	a	(a)	0,76	b	(a)	0,73	ab	(a)	0,55	a	(a)	0,78	ab	(a)	0,83	a	(a)
A. niger	0,02	a	(ab)	0,47	ab	(a)	1,50	b	(b)	1,65	b	(b)	1,46	b	(b)	1,27	a	(ab)

Letras distintas entre paréntesis difieren significativamente a través de la fila y letras distintas sin paréntesis difieren significativamente en la columna ( $P < 0,05$ ).

**ANEXO 4 Andeva de selección de hongos para el cultivo de medio líquido BI.PP Colonia.**

F.V	S.C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
A.-Medio	10,22	1	10,21	214,04	0,0001
B.-Hongo	4,17	1	4,17	87,5	0,0007
Interacción AB	1,674	1	1,67	35,09	0,0041
Error	0,19	4	0,047		
Total	16,25				

**ANEXO 5 Andeva de selección de hongos para el cultivo de medio líquido BI.PP Halo.**

F.V	S. C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
A.-Medio	16,44	1	16,44	437,81	0
B.-Hongo	1,029	1	1,029	27,41	0,0064
Interacción AB	0,07	1	0,07	1,87	0,243
Error	0,15	4	0,037		
Total	17,695	7			

**ANEXO 6 Andeva de selección de hongos para el cultivo de medio líquido BI.PR Colonia**

F.V	S.C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
A.-Medio	9,68	1	9,68	321,86	0,0001
B.-Hongo	0,561	1	0,561	18,68	0,012
Interacción AB	9,9	1	9,901	329,22	0,0001
Error	0,12	4	0,03		
Total	20,26	7			

**ANEXO 7 Andeva de selección de hongos para el cultivo de medio líquido BI.PR Halo**

F.V	S. C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
A.-Medio	9,68	1	9,68	321,86	0,0001
B.-Hongo	0,561	1	0,561	18,68	0,012
Interacción AB	9,9	1	9,901	329,22	0,0001
Error	0,12	4	0,03		
Total	20,26	7			

**ANEXO 8 Andeva de selección de hongos para el cultivo de medio líquido TB.PP Colonia**

F.V	S. C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
A.-Medio	1,24	1	1,24	340,98	0,0001
B.-Hongo	0,112	1	0,112	31,01	0,0051
Interacción AB	2,86	1	2,868	788,4	0,000
Error	0,014	4	0,0036		
Total	4,23	7			

**ANEXO 9 Andeva de selección de hongos para el cultivo de medio líquido TB.PP Halo**

F.V	S. C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
A.-Medio	1,095	1	1,095	41,92	0,0029
B.-Hongo	0,00405	1	0,004	0,16	0,713
Interacción AB	1,513	1	1,513	57,94	0,0016
Error	0,104	4	0,0261		
Total	2,715	7			

**ANEXO 10 Andeva de selección de hongos para el cultivo de medio líquido TB.PR Colonia**

F.V	S. C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
A.-Medio	0,068	1	0,068	1,96	0,2337
B.-Hongo	0,0084	1	0,0084	0,24	0,6482
Interacción AB	0,1741	1	0,174	4,99	0,0891
Error	0,139	4	0,174		
Total	0,3903	7			

**ANEXO 11 Andeva de selección de hongos para el cultivo de medio líquido TB.PR Halo.**

F.V	S. C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
A.-Medio	0,3362	1	0,33	10,7	0,0308
B.-Hongo	0,3612	1	0,3612	11,5	0,027
Interacción AB	1,786	1	1,786	56,84	0,0017
Error	0,125	4	0,0314		
Total	2,609	7			

**ANEXO 12 Andeva de selección de hongos para el cultivo de medio líquido PO.PP Colonia**

F.V	S. C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
A.-Medio	1,629	1	1,62	184,85	0,0002
B.-Hongo	0,667	1	0,667	75,69	0,001
Interacción AB	8,343	1	8,3436	946,79	0,000
Error	0,035	4	0,0088		
Total	10,674	7			

**ANEXO 13 Andeva de selección de hongos para el cultivo de medio líquido PO.PP Halo.**

F.V	S.C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
A.-Medio	2,257	1	2,257	185,64	0,0002
B.-Hongo	1,256	1	1,256	103,25	0,0005
Interacción AB	0,567	1	0,567	46,63	0,0024
Error	0,048	4	0,0121		
Total	4,129	7			

**ANEXO 14 Andeva de selección de hongos para el cultivo de medio líquido PO.PR Colonia.**

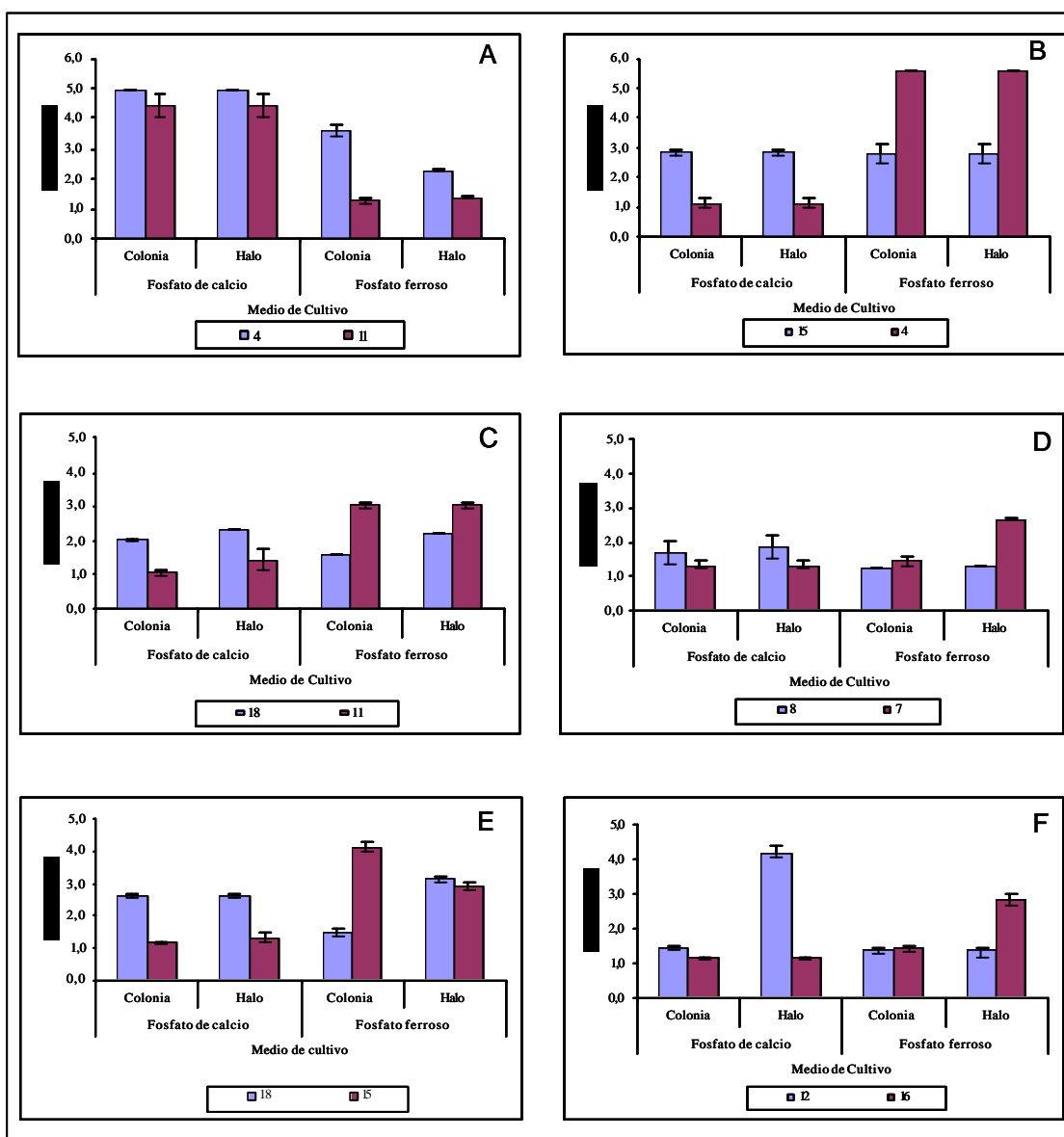
F.V	S.C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
A.-Medio	0,028	1	0,028	5,51	0,078
B.-Hongo	0,036	1	0,036	6,98	0,057
Interacción AB	0,054	1	0,054	10,42	0,032
Error	0,021	4	0,0052		
Total	0,1406	7			

**ANEXO 15 Andeva de selección de hongos para el cultivo de medio líquido PO.PR Halo**

F.V	S. C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
A.-Medio	1,193	1	1,193	43,42	0,0027
B.-Hongo	0,525	1	0,525	19,11	0,012
Interacción AB	9,87	1	9,879	359,4	0
Error	0,10	4	0,027		
Total	11,707	7			



**ANEXO 16 Gráficos de selección cepas fúngicas para la determinación de P-soluble en medio líquido. A= cepas aislados Ballica inglesa, p. permanente; B= cepas aislados de Ballica inglesa, p. rotación; C= cepas aisladas de Trébol blanco p. permanente; D= cepas aisladas de Trébol blanco, p. rotación; E= cepas aisladas de Pasto ovido, p. permanente; F= cepas aisladas de Pasto ovido, p. rotación.**



**ANEXO 17 Cepas seleccionadas de la rizósfera de Ballica inglesa, P permanente, extraídas de un suelo rizosféricos**

	Fosfato de calcio		Fosfato de fierro	
	Colonia	Halo	Colonia	Halo
11	4,43	4,43	1,26	1,38
10	1,17	1,40	1,25	1,41
3	1,21	1,49	2,28	2,28

**ANEXO 18 Cepas seleccionadas de la rizósfera de Ballica inglesa, P Rotación, extraídas de un suelo rizosféricos**

	Fosfato de calcio		Fosfato de fierro	
	Colonia	Halo	Colonia	Halo
1	1,34	1,34	4,92	4,92
4	1,13	1,13	5,55	5,55
16	2,21	1,18	5,05	5,55

**ANEXO 19 Cepas seleccionadas de la rizósfera de Trébol blanco, P permanente, extraídas de un suelo rizosféricos**

	Fosfato de calcio		Fosfato de fierro	
	Colonia	Halo	Colonia	Halo
3	1,17	1,34	2,07	2,37
11	1,06	1,43	3,04	3,04
15	1,56	2,43	1,21	1,49

**ANEXO 20 Cepas seleccionadas de la rizósfera de Trébol blanco, P Rotación, extraídas de un suelo rizosféricos**

	Fosfato de calcio		Fosfato de fierro	
	Colonia	Halo	Colonia	Halo
7	1,33	1,33	1,44	2,68
8	1,20	1,20	1,13	2,67
15	1,11	1,11	1,39	2,40

**ANEXO 21 Cepas seleccionadas de la rizósfera de Pasto ovido, P. Permanente, extraídas de un suelo rizosféricos**

	Fosfato de calcio		Fosfato de fierro	
	Colonia	Halo	Colonia	Halo
3	0,36	1,05	2,125	2,125
15	1,17	1,31	4,11	2,9
9	4,63	2,56	0,925	1,08

**ANEXO 22 Cepas seleccionadas de la rizósfera de Pasto oville, P Rotación, extraídas de un suelo rizosféricos**

	Fosfato de calcio		Fosfato de fierro	
	Colonia	Halo	Colonia	Halo
8	1,31	1,31	1,28	1,75
16	1,13	1,13	1,41	2,84

**ANEXO 23 Cepas seleccionadas de la rizósfera de Ballica inglesa, P permanente, extraídas de un suelo no rizosféricos**

	Fosfato de calcio		Fosfato de fierro	
	Colonia	Halo	Colonia	Halo
4	4,96	4,96	3,62	2,28
9	1,11	1,45	0,79	1,45
28	2,33	2,33	1,54	1,54

**ANEXO 24 Cepas seleccionadas de la rizósfera de Ballica inglesa, P Rotación, extraídas de un suelo no rizosféricos**

	Fosfato de calcio		Fosfato de fierro	
	Colonia	Halo	Colonia	Halo
15	2,82	2,82	2,80	2,80
10	1,28	1,57	1,46	1,62
19	1,70	1,70	1,48	1,61

**ANEXO 25 Cepas seleccionadas de la rizósfera de Trébol blanco, P permanente, extraídas de un suelo no rizosféricos**

	Fosfato de calcio		Fosfato de fierro	
	Colonia	Halo	Colonia	Halo
4	4,01	4,16	1,74	1,73
18	2,02	2,35	1,61	2,22
26	1,39	1,39	1,32	1,48

**ANEXO 26 Cepas seleccionadas de la rizósfera de Trébol blanco, P Rotación, extraídas de un suelo no rizosféricos**

	Fosfato de calcio		Fosfato de fierro	
	Colonia	Halo	Colonia	Halo
21	1,38	1,56	1,15	1,23
16	0,70	1,37	1,25	1,25
8	1,69	1,85	1,21	1,31

**ANEXO 27 Cepas seleccionadas de la rizósfera de Pasto ovido, P. Permanente, extraídas de un suelo no rizosféricos**

	Fosfato de calcio		Fosfato de fierro	
	Colonia	Halo	Colonia	Halo
14	1,55	2,39	1,26	2,59
18	2,63	2,63	1,49	3,16
23	1,17	1,24	1,67	1,97

**ANEXO 28 Cepas seleccionadas de la rizósfera de Pasto ovido, P Rotación, extraídas de un suelo no rizosféricos**

	Fosfato de calcio		Fosfato de fierro	
	Colonia	Halo	Colonia	Halo
12	1,43	4,12	1,38	1,39
30	1,31	2,31	1,37	2,04
1	1,46	1,41	1,32	1,32

**ANEXO 29 Análisis de varianza de P- solubilizado con Micelio estéril A en los días de incubación.**

F.V	S. C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	8,866E 7	5	1,773E8	35,99	0
Dentro grupo	1,014E 8	12	492646		
Total	6,616E7	17			

**ANEXO 30 Análisis de varianza de P- solubilizado con *Mucor hiemalisen* los días de incubación.**

F.V	S.C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	8744E7	5	1748E7	22,12	0
Dentro grupo	9,486E6	12	790583		
Total	9,693E7	17			

**ANEXO 31 Análisis de varianza de P- solubilizado por *Gliocladium roseum* en los días de incubación.**

F.V	S.C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	9,359E7	5	1,871E7	3,52	0,0345
Dentro grupo	6,386E7	12	5,321E6		
Total	1,574E8	17			

**ANEXO 32 Análisis de varianza de P- solubilizado por *Penicillium chrysogenum* en los días de incubación.**

F.V	S. C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	1,88 E 8	5	3,761 E 7	11,15	0,0004
Dentro grupo	4,048 E 7	12	3,373 E 7		
Total	2,285 E 8	17			

**ANEXO 33 Análisis de varianza de P- solubilizado por *Penicillium frequenstans* en los días de incubación.**

	S.C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	1,868 <sub>E8</sub>	5	3,736 <sub>E6</sub>	17,39	0
Dentro grupo	2,577 <sub>E7</sub>	12	2,148 <sub>E7</sub>		
Total	2,126 <sub>E8</sub>	17			

**ANEXO 34 Análisis de varianza de P- solubilizado por *Penicillium chrysogenum* \*\* en los días de incubación.**

F:V	S. C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	4,998 <sub>E 7</sub>	5	9,99 <sub>E 6</sub>	3,3	0,041
Dentro grupo	3,634 <sub>E 7</sub>	12	3,029 <sub>E6</sub>		
Total	8,633 <sub>E 7</sub>	17			

**ANEXO 35 Análisis de varianza de P- solubilizado por *Aspergillus niger* en los días de incubación.**

	S.C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	5,601 <sub>E 8</sub>	5	1,438 <sub>E 6</sub>	13,25	0,0002
Dentro grupo	1,014 <sub>E 8</sub>	12	8,374 <sub>E 8</sub>		
Total	6,616 <sub>E 8</sub>	17			

**ANEXO 36 Análisis de varianza de P-solubilizado con el Control en los días de incubación.**

F.V	S. C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	8,160 <sub>E6</sub>	5	1,632 <sub>E6</sub>	25,11	0
Dentro grupo	780105	12	65008,8		
Total	8,940 <sub>E6</sub>	17			

**ANEXO 37 Análisis de varianza de P- solubilizado por los hongos el día 0 de incubación**

	S.C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	10,891	8	1,361	5,46	0,001
Dentro grupo	4,467	18	0,248		
Total	15,35	26			

**ANEXO 38 Análisis de varianza de P- solubilizado por los hongos el día 7 de incubación.**

F.V	S.C	G.C	CM	F. Cal	P-Valor
Entre Grupos	1,395 <sub>E 8</sub>	7	1,993 <sub>E 7</sub>	9,15	0,0001
Dentro grupo	3,484 <sub>E 7</sub>	16	2,177 <sub>E 6</sub>		
Total	1,744 <sub>E 8</sub>	23			

**ANEXO 39 Análisis de varianza de P solubilizado por los hongos el día 15 de incubación**

F.V	S.C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	66,45	7	9,49	13,54	0
Dentro grupo	11,21	16	0,701		
Total	77,67	23			

**ANEXO 40 Análisis de varianza de P solubilizado por los hongos el día 30 de incubación.**

F.V	S.C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	32,44	7	4,634	9,04	0.0001
Dentro grupo	8,206	16	0,512		
Total	40,64	23			

**ANEXO 41 Análisis de varianza de P solubilizado por los hongos el día 45 de incubación**

	S. C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	16,478	7	2,345	5,66	0,002
Dentro grupo	6,632	16	0,414		
Total	23,051	23			

**ANEXO 42 Análisis de varianza de P solubilizado por los hongos el día 60 de incubación**

	S.C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	1,2E8	7	1,714 E 7	10,43	0,0001
Dentro grupo	2,63 E 7	16	1,644 E 6		
Total	1,463 E 8	23			

**ANEXO 43 Análisis de Varianza del pH de Micelio estéril A en los días de incubación**

	S.C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	5,599	5	1,119	3,71	0,0292
Dentro grupo	3,622	12	0,301		
Total	9,221	17			

**ANEXO 44 Análisis de Varianza del pH de *Mucor hiemalis* en los días De incubación.**

	S.C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	4,363	5	0,872	7,25	0,0024
Dentro grupo	1,443	12	0,120		
Total	5,806	17			

**ANEXO 45 Análisis de Varianza del pH de *Gliocladium roseum* en los días de incubación.**

	S.C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	4,867	5	0,973	1,73	0,202
Dentro grupo	6,751	12	0,652		
Total	11,619	17			

**ANEXO 46 Análisis de Varianza del pH de *Penicillium chrysogenum* en los días de incubación.**

	S. C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	2,626	5	0,525	2,78	0,067
Dentro grupo	2,265	12	0,188		
Total	4,892	17			

**ANEXO 47 Análisis de Varianza del pH de *Penicillium frequenstans* en los días de incubación.**

	S. C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	7,345	5	1,469	7,36	0,023
Dentro grupo	2,393	12	0,199		
Total	9,739	17			

**ANEXO 48 Análisis de Varianza del pH de *Penicillium chrysogenum* \*\* en los días de incubación.**

	S.C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	1,631	5	0,326	1,61	0,231
Dentro grupo	2,433	12	0,202		
Total	4,065	17			

**ANEXO 49 Análisis de Varianza del pH de *Aspergillus niger* en los días de incubación.**

	S.C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	9,671	5	1,934	10,52	0,0005
Dentro grupo	2,207	12	0,183		
Total	11,878	17			

**ANEXO 50 Análisis de Varianza del pH de los hongos el día 0 de incubación.**

	S.C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	1,147 <sub>E</sub> -5	7	1,63 <sub>E</sub> -6	9,36	0,0001
Dentro grupo	2,8 <sub>E</sub> -6	16	1,75 <sub>E</sub> -7		
Total	1,427 <sub>E</sub> -5	23			

**ANEXO 51 Análisis de Varianza del pH de los hongos el día 7 de incubación.**

	S. C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	13,718	7	1,959	8,75	0,0002
Dentro grupo	3,584	16	0,224		
Total	17,303	23			

**ANEXO 52 Análisis de Varianza del pH de los hongos el día 15 de incubación.**

	S. C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	15,325	7	2,189	7,44	0,0005
Dentro grupo	4,707	16	0,294		
Total	20,033	23			

**ANEXO 53 Análisis de Varianza del pH de los hongos el día 30 de incubación.**

	S. C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	24,99	7	3,57	10,81	0,0001
Dentro grupo	5,282	16	0,33		
Total	30,272	23			

**ANEXO 54 Análisis de Varianza del pH de los hongos el día 45 de incubación.**

	S. C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	20,08	7	2,868	10,77	0,0001
Dentro grupo	4,26	16	0,266		
Total	24,34	23			

**ANEXO 55 Análisis de Varianza del pH de los hongos el día 60 de incubación.**

	S. C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	15,068	7	2,152	7,83	0,0003
Dentro grupo	4,398	16	0,274		
Total	19,467	23			

**ANEXO 56 Análisis de Varianza del peso Micelio estéril A en los días de incubación.**

	S. C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	0,895	5	0,179	5,3	0,008
Dentro grupo	0,405	12	0,033		
Total	67,84	17			



**ANEXO 57 Análisis de Varianza del peso *Mucor hiemalis* en los días de incubación.**

	S.C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	0,846	5	0,169	2,4	0,099
Dentro grupo	0,846	12	0,07		
Total	1,693	17			

**ANEXO 58 Análisis de Varianza del peso *Gliocladium roseum* en los días de incubación.**

	S. C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	0,723	5	0,144	2,16	0,127
Dentro grupo	0,803	12	0,066		
Total	1,527	17			

**ANEXO 59 Análisis de Varianza del peso *Penicillium chrysogenum* en los días de incubación.**

	S. C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	0,961	5	0,192	1,79	0,188
Dentro grupo	1,286	12	0,107		
Total	2,247	17			

**ANEXO 60 Análisis de Varianza del peso *Penicillium frequenstans* en los días de incubación.**

	S. C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	1,321	5	0,264	9,13	0,0009
Dentro grupo	0,347	12	0,028		
Total	1,669	17			

**ANEXO 61 Análisis de Varianza del peso *Penicillium chrysogenum*\*\* en los días de incubación.**

	S.C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	1,403	5	0,280	2,35	0,104
Dentro grupo	1,431	12	0,119		
Total	2,835	17			

**ANEXO 62 Análisis de Varianza del peso *Aspergillus niger* en los días de incubación.**

	S. C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	3,106	5	0,621	4,94	0,011
Dentro grupo	1,509	12	0,125		
Total	4,616	17			

**ANEXO 63 Análisis de Varianza del peso de los hongos del día 0 de incubación.**

	S. C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	0,0024	6	0,00041	1,48	0,25
Dentro grupo	0,0039	14	0,00028		
Total	0,0064	20			

**ANEXO 64 Análisis de Varianza del peso de los hongos del día 7 de incubación.**

	S.C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	0,993	6	0,165	3,76	0,019
Dentro grupo	0,617	14	0,044		
Total	1,61	20			

**ANEXO 65 Análisis de Varianza del peso de los hongos del día 15 de incubación.**

	S.C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	2,673	6	0,445	4,39	0,0106
Dentro grupo	1,421	14	0,101		
Total	4,094	20			

**ANEXO 66 Análisis de Varianza del peso de los hongos del día 30 de incubación.**

	S. C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	3,189	6	0,531	6,5	0,0019
Dentro grupo	1,145	14	0,081		
Total	4,334	20			

**ANEXO 67 Análisis de Varianza del peso de los hongos del día 45 de incubación.**

	S.C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	1,959	6	0,326	3,19	0,034
Dentro grupo	1,434	14	0,102		
Total	3,393	20			

**ANEXO 68 Análisis de Varianza del peso de los hongos del día 60 de incubación**

	S.C	G.C	CM	F. Cal	P.Valor
Entre Grupos	1,318	6	0,219	1,85	0,16
Dentro grupo	1,66	14	0,116		
Total	2,979	20			

**ANEXO 69 P-solubilizado (mg/L) por *Micelio estéril A* en Cultivo medio líquido**

Repetición	Días de incubación					
	0	7	15	30	45	60
I	3,29	6085,25	5343,61	1293,98	668,95	4188,68
II	3,20	4804,71	4187,38	245,86	739,40	4558,95
III	3,15	5159,84	3171,94	189,34	1067,98	5990,76

**ANEXO 70 P-solubilizado (mg/L) por *Mucor hiemalis* en Cultivo medio líquido**

Repetición	Días de incubación					
	0	7	15	30	45	60
I	2,55	1366,85	62,16	4482,03	4482,03	6734,50
II	2,57	878,65	52,94	2920,75	2560,36	6273,27
III	1,71	1962,49	2249,42	2560,36	2086,66	7155,81

**ANEXO 71 P-solubilizado (mg/L) por *Gliocladium roseum* en Cultivo medio líquido**

Repetición	Días de incubación.					
	0	7	15	30	45	60
I	3,07	1015,06	326,45	879,95	1730,56	4624,00
II	1,63	592,44	510,22	7762,31	653,31	5916,69
III	2,15	789,61	268,57	6248,59	8441,93	6567,48

**ANEXO 72 P-solubilizado (mg/L) por *Penicillium chrysogenum* en Cultivo medio líquido**

Repetición	Días de incubación					
	0	7	15	30	45	60
I	2,42	40,60	8998,42	7430,44	6355,28	4060,24
II	1,72	23,70	8557,36	9510,15	3923,77	4629,44
III	2,56	16,10	8127,38	2167,83	7582,93	6902,29

**ANEXO 73 P-solubilizado (mg/L) por *Penicillium frequenstans* en Cultivo medio líquido**

Repetición	Días de incubación					
	0	7	15	30	45	60
I	1,74	81,07	67,11	7779,24	8941,59	5727,46
II	2,51	1333,71	194,77	7252,23	4872,04	1366,04
III	2,64	163,12	122,63	8215,61	6567,48	6658,56

**ANEXO 74 P-solubilizado (mg/L) por *Penicillium chrysogenum*\*\* en Cultivo medio líquido**

Repetición	Días de incubación					
	0	7	15	30	45	60
I	2,55	1934,94	1829,44	2550,65	6966,24	1902,70
II	3,39	131,52	432,64	952,83	6457,73	769,95
III	2,36	106,92	501,76	5849,80	1364,86	2289,81

**ANEXO 75 P-solubilizado (mg/L) por *Aspergillus niger* en Cultivo medio líquido**

Repetición	Días de incubación					
	0	7	15	30	45	60
I	3,03	10234,9	15129,0	19751,4	13243,4	8686,24
II	3,08	7953,79	14830,3	16800,3	17720,9	8020,99
III	2,31	2830,67	12294,3	14884,0	7211,41	8350,30

**ANEXO 76 P-solubilizado (mg/L) por Control en Cultivo medio líquido**

Repetición	Días de incubación					
	0	7	15	30	45	60
I	1,75	236,54	226,20	177,64	199,37	336,36
II	2,21	170,56	160,07	141,51	331,24	337,09
III	1,73	155,05	190,33	227,65	336,94	203,58

**ANEXO 77 pH de *Micelio estéril A* en Cultivo medio líquido**

Repetición	Días de incubación					
	0	7	15	30	45	60
I	7,4	6,43	6,8	6,73	6,15	6,04
II	7,43	5,36	6,71	6,58	5,25	6,24
III	7,49	7,6	6,78	7,61	5,9	5,92

**ANEXO 78 pH de *Mucor hiemalis* en Cultivo medio líquido**

Repetición	Días de incubación					
	0	7	15	30	45	60
I	7,32	6,88	6,67	7,39	6,5	6,72
II	7,4	7,19	5,51	7,53	7,39	6,62
III	7,41	7,43	5,73	7,34	6,64	6,93

**ANEXO 79 pH de *Gliocladium roseum* en Cultivo medio líquido**

Repetición	Días de incubación					
	0	7	15	30	45	60
I	7,32	6,34	6,46	7,49	7,43	7,74
II	7,48	6,14	8,11	5,34	8,52	8,25
III	7,46	6,21	6,54	7,34	7,19	6,79

**ANEXO 80 pH de *Penicillium Chrysogenum* en Cultivo medio líquido**

Repetición	Días de incubación					
	0	7	15	30	45	60
I	6,88	7,41	6,07	7,22	7,03	7,31
II	7,04	7,41	6,13	6,26	7,64	7,41
III	6,83	7,63	7,33	7,23	7,29	8,12

**ANEXO 81 pH de *Penicillium frequenstans* en Cultivo medio líquido**

Repetición	Días de incubación					
	0	7	15	30	45	60
I	7,05	5,28	5,32	6,23	5,42	6,95
II	7,02	5,03	5,18	5,47	6,28	7,35
III	7,17	5,54	6,14	5,72	6,85	5,44

**ANEXO 82 pH de *Penicillium chrysogenum*\*\* en Cultivo medio líquido**

Repetición	Días de incubación					
	0	7	15	30	45	60
I	7,26	6,62	6,33	6,06	6,97	7,64
II	7,17	7,7	6,86	7,2	6,25	7,64
III	7,18	7,56	7,09	6,57	7,03	6,86

**ANEXO 83 pH de *Aspergillus niger* en Cultivo medio líquido**

Repetición	Días de incubación					
	0	7	15	30	45	60
I	6,79	5,53	4,46	3,82	4,11	5,80
II	6,74	5,61	4,59	4,43	5,25	5,14
III	5,77	5,53	5,24	4,13	4,80	5,03

**ANEXO 84 pH del *Control* en Cultivo medio líquido**

Repetición	Días de incubación					
	0	7	15	30	45	60
I	6,71	6,67	7,35	7,5	7,53	7,5
II	6,78	6,97	7,4	7,45	7,22	7,73
III	6,91	6,80	7,25	7,43	7,08	7,61

**ANEXO 85 Peso seco (g) de *Micelio estéril A* en Cultivo medio líquido**

Repetición	Días de incubación					
	0	7	15	30	45	60
I	0,049	0,360	0,262	0,658	0,847	0,860
II	0,019	0,570	0,594	0,549	0,858	0,554
III	0,019	0,690	0,223	0,613	0,365	0,420

**ANEXO 86 Peso seco (g) de *Mucor hiemalis* en Cultivo medio líquido**

Repetición	Días de incubación					
	0	7	15	30	45	60
I	0,034	0,383	0,402	0,571	0,907	0,920
II	0,052	0,774	1,038	0,714	0,940	0,564
III	0,050	0,556	0,425	0,413	0,279	0,312

**ANEXO 87 Peso seco (g) de *Gliocladium roseum* en Cultivo medio líquido**

Repetición	Días de incubación					
	0	7	15	30	45	60
I	0,040	0,122	0,098	0,221	0,267	0,267
II	0,040	0,109	0,819	0,825	0,676	0,776
III	0,040	0,113	0,147	0,263	0,549	0,749

**ANEXO 88 Peso seco (g) de *Penicillium chrysogenum* en Cultivo medio líquido**

Repetición	Días de incubación					
	0	7	15	30	45	60
I	0,030	0,106	0,716	0,568	0,874	0,294
II	0,026	0,827	0,775	0,569	0,749	0,481
III	0,094	0,576	0,305	0,373	0,539	1,472

**ANEXO 89 Peso seco (g) de *Penicillium frequenstans* en Cultivo medio líquido**

Repetición	Días de incubación					
	0	7	15	30	45	60
I	0,031	1,049	0,582	0,475	0,597	0,532
II	0,025	0,546	0,866	0,720	0,466	0,316
III	0,026	0,947	0,759	0,921	0,311	0,456

**ANEXO 90 Peso seco (g) de *Penicillium chrysogenum*\*\* en Cultivo medio líquido**

Repetición	Días de incubación					
	0	7	15	30	45	60
I	0,024	0,763	0,646	0,276	0,285	1,312
II	0,009	0,606	0,930	0,974	1,434	0,633
III	0,026	0,910	0,619	0,393	0,619	0,553

**ANEXO 91 Peso seco (g) de *Aspergillus niger* en Cultivo medio líquido**

Repetición	Días de incubación					
	0	7	15	30	45	60
I	0,020	0,606	1,646	1,127	1,313	1,418
II	0,023	0,404	0,930	2,070	1,322	1,161
III	0,024	0,392	1,919	1,760	1,731	1,233