

AISLAMIENTO DE HONGOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATOS DE LA RIZOSFERA DE ARAZÁ (*Eugenia stipitata*, Myrtaceae)

Isolation of phosphate solubilizer fungi from Araza rhizosphere

DIANA FERNANDA VERA¹, HERNANDO PÉREZ²
y HERNANDO VALENCIA³.

¹Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

²Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI.
Bogotá, Colombia

³Departamento de Biología, Facultad de Ciencias,
Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

RESUMEN

El Arazá (*Eugenia stipitata* McVaugh), es una planta originaria de la región amazónica, que ha sido descrita como especie promisoría ya que su fruto comestible presenta excelentes posibilidades de comercialización (Quevedo, 1995). El frutal muestra una elevada productividad aún en suelos con muy bajo contenido de fósforo. La presencia de microorganismos solubilizadores de fosfatos podría contribuir a aumentar la disponibilidad de este macroelemento. Dado que no se han publicado estudios al respecto, durante esta investigación se realizó el aislamiento y la caracterización de hongos solubilizadores a partir de 12 muestras de suelo en cultivos de Arazá, procedentes de 2 Unidades Fisiográficas (paisajes) del departamento del Guaviare (Colombia), utilizando el método de lavado de suelo. Se obtuvieron 18 aislamientos de hongos a partir de 1.152 agregados de suelo, los cuales demostraron capacidad de solubilizar fosfato no disponible, proveniente de 2 fuentes diferentes (hidrogenofosfato de calcio y fosfato de hierro III hidratados). Los principales solubilizadores del fosfato de calcio fueron *Trichoderma aureoviride*, *Aspergillus aculeatus*, *Trichoderma* cepa 1 y *Trichoderma* cepa 2 y para el fosfato de hierro: *Aspergillus oryzae*, *Paecilomyces* cepa 3, *Gongronella butleri* y *Fusarium oxysporum*.

Palabras clave: Hongos solubilizadores de fosfatos, rizosfera, Arazá, Eugenia, eficiencia solubilizadora.

ABSTRACT

Araza is an eatable plant, original from the Amazon region which has been described as a promising species for commercialization (Quevedo 1995). This plant has high productivity even in low content phosphate soil but the presence of phosphate solubilizing microorganisms may contribute to increase this element availability. In this study we report the isolation and characterization of solubilizing fungi processed using the soil washing method, from soil samples were Araza is cultivated at two regions in Guaviare, Colombia. Eighteen isolates of fungi capable of solubilizing phosphate were obtained from 2 different sources. The most important species that

solubilized phosphate from calcium were *Trichoderma aureoviride*, *Aspergillus aculeatus*, *Trichoderma* strain 1 y *Trichoderma* strain 2 and for phosphate from iron: *Aspergillus oryzae*, *Paecilomyces* strain 3, *Gongronella butleri* & *Fusarium oxysporum*

Key words: Phosphate solubilizer fungi, rhizosphere, Arazá, Eugenia, solubilizer efficiency.

INTRODUCCIÓN

Es frecuente que en los suelos tropicales, los bajos niveles de nutrientes disponibles para las plantas, principalmente aquellos indispensables como el fósforo (P), condicionen la productividad de los cultivos (Swift, 1997); especialmente en las regiones sometidas a precipitaciones copiosas y temperaturas altas. El fósforo es un limitante del crecimiento de las plantas en regiones como la Amazonía, dada su característica estabilidad al ligarse a elementos abundantes en estos suelos como el aluminio y el hierro, lo cual lo hace muy poco soluble (Fernández y Novo, 1988). El fenómeno de fijación y precipitación del fósforo en el suelo, (el cual es altamente dependiente del pH), causa una baja eficiencia de los fertilizantes fosforados solubles, como el superfosfato, el cual tiende a precipitarse en forma de fosfato dicálcico o fosfatos de aluminio y hierro (Fernández y Novo, 1988); los microorganismos solubilizadores de fosfatos son un componente del suelo, el cual puede solubilizar fósforo precipitado y otros fosfatos compuestos (Chabot *et al.*, 1993; Chabot *et al.*, 1996). El Arazá (*E. stipitata*), debe exhibir estrategias que le permitan un mejor aprovechamiento de las difíciles condiciones de estos suelos, especialmente en lo referente a la disponibilidad de fósforo; y aunque presenta un desarrollo adecuado, la fertilización fosfórica genera respuestas positivas. Los hongos filamentosos poseen ventajas en suelos ácidos y presentan características morfológicas y metabólicas que los hacen organismos promisorios. Adicionalmente, ha sido reportada una mayor habilidad de solubilizar fosfatos en relación con las bacterias (Nahas, 1996). Así, su utilización en la solubilización de este elemento podría conducir a un incremento de la productividad, y con ello permitir mayores beneficios para la comercialización de los frutos del Arazá y sus derivados. En Colombia ya se han efectuado investigaciones acerca de bacterias que realizan este proceso, pero los datos sobre hongos son particularmente escasos.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTREO. Para la realización de este estudio fueron seleccionados dos cultivos de Arazá (*E. stipitata*), cada uno con una extensión de 0.25 Ha, ubicados dentro de los paisajes: Planicies Disectadas Moderadamente Onduladas (Paisaje A) y Vallecitos y Terrazas Erosionales poco Disectadas (Paisaje B) (Fig. 1). En cada uno de ellos fueron elegidos 6 arbustos del frutal, al azar, con el fin de coleccionar una muestra representativa de suelo rizosférico y de suelo libre, ambas con un peso de 600 g y tomadas a una profundidad entre 0 y 15 cm. Las muestras fueron conservadas a 5°C hasta su procesamiento. Además, fueron recogidas muestras de suelo para el análisis químico en los laboratorios del Instituto Geográfico Agustín Codazzi (Bogotá, Colombia).

ron también utilizadas otras técnicas y medios de cultivo para inducir esporulación en los hongos recalcitrantes. Se elaboraron microcultivos y micropreparados como ayuda para la descripción y determinación taxonómica de los hongos a género y a especie para aquellos que fue posible. Para la determinación de la Eficiencia Relativa de Solubilización (ERS) de los aislamientos, se prepararon placas con el medio para solubilizadores, las cuales se inocularon con alícuotas de los aislamientos puros, por triplicado, realizando la punción en el centro de los medios de cultivo. La incubación se llevó a cabo durante 8 días a 25°C, al final de los cuales se registró tanto el diámetro promedio de las colonias como el de los halos de solubilización alrededor de éstas. Se determinó la presencia de los aislamientos por Unidad Fisiográfica, así como la ERS a partir de la evaluación cualitativa sobre placas de Petri de los diámetros relativos de solubilización de cada fosfato, para cada aislamiento, de acuerdo con la tasa: Diámetro promedio de solubilización (mm)/Diámetro promedio de la colonia (mm)* 100 (Lapeyre *et al.*, 1990).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los aislamientos y/o especies obtenidas por Unidad Fisiográfica se muestran en la Tabla 1. Se advierte el elevado potencial de los suelos pertenecientes a los paisajes en los cuales se efectuó el muestreo, como banco de micobiontes capaces de incrementar la disponibilidad de fósforo.

AISLAMIENTO	Planicies Disectadas Moderadamente Onduladas (A)	Vallecitos y Terrazas Erosionales Poco Disectadas (B)
<i>Paecilomyces</i> cepa 1	X	
<i>Paecilomyces</i> cepa 2	X	
<i>Aspergillus flavoclavatus</i>		X
<i>Paecilomyces</i> cepa 3	X	X
<i>Penicillium janthinellum</i>	X	
<i>Gliocladium catenulatum</i>		X
<i>Trichoderma</i> cepa 1 agr. <i>viride</i>	X	X
<i>Trichoderma</i> cepa 1 agr. <i>aureoviride</i>		X
<i>Fusarium oxysporum</i>	X	
<i>Paecilomyces</i> cepa 4	X	X
<i>Gongronella butleri</i>	X	X
<i>Trichoderma</i> cepa 1	X	X
<i>Aspergillus oryzae</i>		X
<i>Fusarium redolens</i>	X	X
<i>Trichoderma</i> cepa 2 agr. <i>aureoviride</i>	X	X
<i>Trichoderma</i> cepa 1 agr. <i>longibrachiatum</i>	X	X
<i>Trichoderma</i> cepa 2		X
<i>Aspergillus aculeatus</i>	X	

Tabla 1. Aislamientos registrados en cada Unidad Fisiográfica.

En especial los aislamientos del género *Trichoderma*, muy representativos en este estudio, podrían constituir un elemento de notable aplicabilidad, gracias a la conocida actividad

de algunas especies como controladores biológicos de hongos fitopatógenos; siendo capaces de producir compuestos inhibidores del crecimiento micelial de una gran variedad de hongos, entre ellos *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfii* y *Sclerotinia homoeocarpa*. (Ghisalberti y Sivasithamparam, 1991; Hayes *et al.*, 1993; González *et al.*, 1999; Stefanova *et al.*, 1999; Cheah *et al.*, 2000). Algunos aislamientos de *Gliocladium catenulatum*, han sido utilizados recientemente como controladores biológicos de hongos fitopatógenos, como *Rhizoctonia* spp. (Fernández y Vega, 2001). Miembros del género *Aspergillus* han sido reportados en la literatura como los más eficaces solubilizadores de fosfatos, debido a la destacada actividad y efectividad mostradas por sus fosfatasas (Tarafdar y Rao, 1996); características que según Tarafdar *et al.* (2001), se hayan muy por encima de las evaluadas en plantas. Por las anteriores afirmaciones algunas especies de *Aspergillus* podrían ser útiles en la elaboración de biofertilizantes, de no ser porque pueden resultar patógenos bajo ciertas circunstancias y sobre algunas plantas de cultivo (Fennell y Kenneth, 1977). Por otro lado, se encontró un mayor número de colonias fúngicas solubilizadoras de fosfato de calcio ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Fig. 2), lo cual se debe a que éste presenta una constante de solubilidad de 2.18×10^{-7} , en tanto que para el fosfato de hierro ($\text{Fe PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) dicha constante es de 1.35×10^{-18} (Lutz, 1990), con lo cual el compuesto de hierro aparece como uno de los más insolubles entre los fosfatos inorgánicos, aún más que el fosfato de aluminio (Fassbender y Bornemisza, 1987). Nahas (1996), indica que la solubilización de fosfatos depende del tipo de microorganismo y el tipo de fosfato insoluble utilizado.

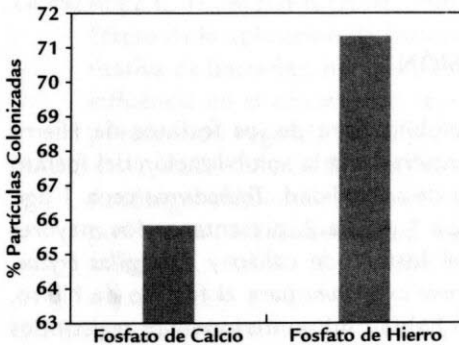


Figura 2. Porcentaje de colonias de hongos capaces de solubilizar los fosfatos utilizados en el medio de cultivo.

Con base en los datos de solubilización registrados (en términos de diámetro relativo por aislamiento), cuatro de ellos: *Trichoderma cepa* 1 agr. *aureoviride*, *Aspergillus aculeatus*, *Trichoderma cepa* 1 y cepa 2 son los solubilizadores más eficientes del fosfato de calcio, con diámetros relativos superiores al 225% (Fig. 3). Registros previos presentan a *Aspergillus aculeatus* como solubilizador de fosfatos dicálcico, tricálcico y de aluminio (Narisan *et al.*, 1995) y a *Fusarium oxysporum* (Domsch *et al.*, 1980) y *Trichoderma viride* como solubilizadores de fosfato de calcio. En lo referente a la eficiencia de solubilización para el fosfato de hierro, esta capacidad *in vitro* no es dominante entre los aislamientos obtenidos, se destacan: *Aspergillus oryzae*, *Paecilomyces cepa* 3, *Gongronella butleri* y *Fusarium redolens* con valores alrededor del 100%, ninguno de los cuales había sido anteriormente registrado como solubilizador. La utilización de algunos de estos

hongos como componentes de fertilizantes biológicos podría ser implementada, en razón de que ensayos realizados por varios investigadores (Young, 1990; Chabot *et al.*, 1996; Tarafdar y Rao, 1996; Vázquez *et al.*, 2000), utilizando diversos vegetales, han indicado que los hongos solubilizadores de fosfatos pueden acentuar directamente la disponibilidad del fósforo en suelos fertilizados y no fertilizados, demostrando su aplicabilidad en el incremento de la productividad de diferentes cultivos.

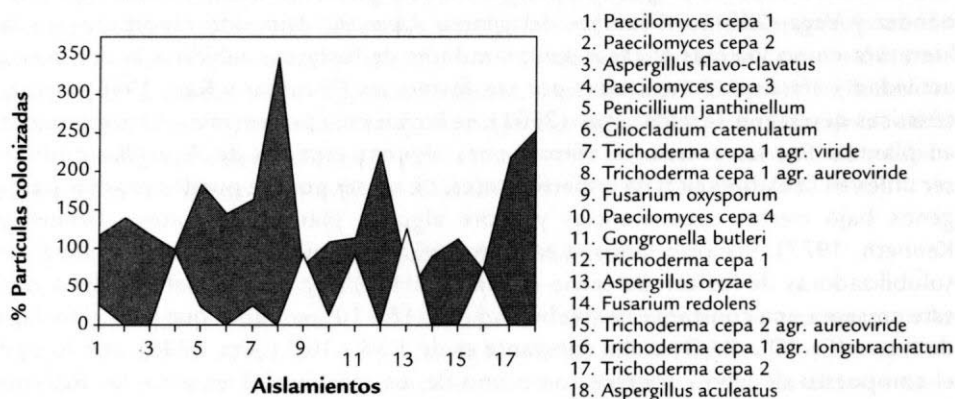


Figura 3. Diámetro relativo de solubilización de fosfatos para cada uno de los aislamientos, ERS. Ca (■), fosfato de calcio; Fe (□), fosfato de hierro.

CONCLUSIÓN

Los aislamientos demostraron capacidad solubilizadora de los fosfatos de Hierro y Calcio *in vitro*, encontrándose mayor propensión hacia la solubilización del fosfato de calcio explicable por su mayor constante de solubilidad. *Trichoderma cepa 1 agr. aureoviride*, *Aspergillus aculeatus* y *Trichoderma cepa 1* y *cepa 2*, presentaron los mayores diámetros relativos de solubilización para el fosfato de calcio y *Aspergillus oryzae*, *Paecilomyces cepa 3*, *Gongronella butleri* y *Fusarium oxysporum* para el fosfato de hierro. Algunos de los aislamientos encontrados no habían sido anteriormente registrados como solubilizadores de fosfatos, destacándose la presencia de seis especies y/o aislamientos de *Trichoderma*, constituyendo esta investigación una importante contribución al conocimiento de las especies en referencia.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas - SINCHI por la aceptación de la realización del proyecto y la colaboración brindada. A COLCIENCIAS por la financiación. A Yoav Bashan investigador del Center for Biological Research (México) por su ayuda en la consecución y envío de artículos de investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- CHABOT R., ANTOUN H. & CESCAS M. P. 1993. Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. *Canadian Journal of Microbiology*, 39: 941-947.
- _____. 1996. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum biovar. Phaseoli*. *Plant and Soil*, 184: 311-321.
- CHEAH L. H., VEEKARONES S. & KENT G. 2000. Biological control of clubroot on cauliflower with *Trichoderma* and *Streptomyces* spp. *New Zealand Plant Protection*, 53: 18-21.
- DOMSCH K., GAMS W. & TRAUTE-HEIDE A. 1980. Compendium of soil fungi. Vol. 1. Academic Press, London, UK. 430 p.
- FASSBENDER H. W. & BORNEMISZA E. 1987. Química de Suelos. Con énfasis en suelos en América Latina. IICA, San José, Costa Rica. 398 p.
- FENNELL D. & KENNETH B. 1977. The genus *Aspergillus*. Robert E. Krieger Publishing Co., New York, USA. 686 p.
- FERNÁNDEZ C. & NOVO R. 1988. Vida Microbiana en el Suelo, II. Editorial Pueblo y Educación, La Habana, Cuba. 220 p.
- FERNÁNDEZ O. & VEGA L. 2001. Microorganismos Antagonistas para el Control Fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas*, 62: 96-100.
- GHISALBERTI E. L. & SIVASITHAMPARAM K. 1991. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biology and Biochemistry*, 23(11): 1011-1020.
- GONZÁLEZ C. H., RODRÍGUEZ L., ARJONA C., PUERTAS A. & FONSECA M. 1999. Efecto de la aplicación de *Trichoderma harzianum* R. sobre la composición cuantitativa de bacterias, hongos y actinomicetos de la rizosfera de solanáceas y su influencia en el crecimiento vegetativo. *Investigación Agrícola: Productividad y Protección Vegetal*, 14(1-2): 297-306.
- HAYES C. K., PETERBAUER C., TRONSMO A., KLEMSDAL S. & HARMAN G. E. 1993. Antifungal chitinolytic enzymes from *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* purification, characterization, biological activity and molecular cloning. In: Muzzarelli, R.A.A. (Ed.). *Chitin Enzymology and European Chitin Society*, Ancona, Italy. p.383-392.
- LAPEYRE F., RANGER J. & VAIRELLES D. 1990. Phosphate - solubilizing activity of ectomycorrhizal fungi *in vitro*. *Canadian Journal of Botany*, 69: 342-346.
- LUTZ H. 1990. Geomicrobiology. Marcel Dekker Publisher, New York, USA. 768 p.
- NAHAS E. 1996. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12: 567-572.
- NARISAN V., THAKKAR J. & PATEL H. H. 1995. Mineral phosphate solubilization by *Aspergillus aculeatus*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 33(2): 91-93.
- QUEVEDO E. 1995. Aspectos agronómicos sobre el cultivo del Arazá (*Eugenia stipitata* McVaugh). *Frutal promisorio de la Amazonía colombiana. Agronomía Colombiana*, 12(1): 21-65.
- STEFANOVA M., LEIVA A., LARRINAGA L. & CORONADO M. F. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 16: 509-516.

- SUNDARA R. & SINHA M. 1963. Organisms phosphate solubilizers in soil. *Indian Journal of Agriculture Science*, 33: 272-278.
- SWIFT M. J. 1997. Biological management of soil fertility as a component of sustainable agriculture: Perspectives and prospects with particular reference to tropical regions. In: Brussaard, L. & Ferrera, R. (Eds.). *Soil: Ecology in sustainable agricultural systems*. Lewis Publishers, New York, USA. 169 p.
- TARAFDAR J. C. & RAO A. V. 1996. Contribution of *Aspergillus* strains to acquisition of phosphorus by wheat (*Triticum aestivum* L.) and chick pea (*Cicer arietinum* Linn.) grown in a loamy sand soil. *Applied Soil Ecology*, 3: 109-114.
- _____, YADAV R. S. & MEENA S. C. 2001. Comparative efficiency of acid phosphatase originated from plant and fungal sources. *Journal of Plant Nutrition and Soil Sciences*, 164: 279-282.
- VÁZQUEZ P., HOLGUÍN G., PUENTE M. E., LÓPEZ A. & BASHAN Y. 2000. Phosphate - solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of semiarid mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biology and Fertility of Soils*, 30(5-6): 460-468.
- YOUNG C. C. 1990. Effects of phosphorus solubilizing bacteria and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of tree species in subtropical-tropical soils. *Soil Science and Plant Nutrition*, 36(2): 225-231.