

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
POSTGRADO EN BIOTECNOLOGÍA DE MICROORGANISMOS
LAB. DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO DE BACTERIAS
SOLUBILIZADORAS DE FOSFATOS MINERALES

Tesista: Lic. Miguel Sulbarán

Tutor: Dr. Andrés Yarzabal

Cotutora: Dra. María M. Ball

Mérida, Octubre 2006

DONACION

ESBIULA
María Cordero

DONACION



UNIVERSIDAD
DE LOS ANDES
MERIDA VENEZUELA

RESUMEN

La solubilización de fosfatos minerales mediada por bacterias con fenotipo MPS⁺, ha sido asociada históricamente con la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, a través de la vía de oxidación directa de la glucosa (oxidación no fosforilativa). En este trabajo se caracterizó el fenotipo MPS⁺ de las cepas MMB047 y MMB051 aisladas de regiones adyacentes a los yacimientos de hierro de la región de Guayana (Venezuela) identificadas como *Pantoea sp.* Para ello, se realizaron cinéticas de crecimiento, acidificación, consumo de glucosa y solubilización de fosfatos en medio NBRIP modificado y en medio NBRIP con roca fosfórica o mineral de hierro como única fuente de fósforo; igualmente se determinó la capacidad solubilizadora de los sobrenadantes condicionados producidos por las cepas en estudio sobre fosfato tricálcico, mineral de hierro y roca fosfórica. Por último se determinó la producción de ácido glucónico por medio de cromatografía de capa fina (TLC) y la presencia de otros ácidos por medio de la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Estas cepas, presentaron una alta capacidad acidificadora alcanzando valores de pH cercanos a 3 en aproximadamente 16 horas en medio NBRIP y en 24 horas en medio NBRIP con roca fosfórica, incluso en ausencia de crecimiento. Se demostró que el consumo de glucosa estaba directamente relacionado con la acidificación del medio obteniéndose un rendimiento de 40% con respecto a la solubilización de fosfato tricálcico. Los sobrenadantes condicionados también presentaron una alta capacidad solubilizadora de aproximadamente 70 ppm sobre fosfato tricálcico y 16 ppm sobre roca fosfórica. Finalmente, se determinó que el principal ácido implicado en la solubilización de fosfatos inorgánicos por las cepas *Pantoea sp.* MMB047 y MMB051 fue el ácido glucónico; por otra parte se determinó que existían otros ácidos (no identificados) que derivan de la oxidación directa de la glucosa. No se observó solubilización de fosfato a partir de mineral de hierro en las condiciones ensayadas. Los resultados permiten concluir que las cepas en estudio presentaron una alta capacidad solubilizadora de fosfatos de calcio inorgánicos dependiente de la producción de ácido glucónico, principalmente por la vía de oxidación directa de la glucosa.

Palabras clave: *Pantoea*, ácido glucónico, solubilización de fosfatos inorgánicos, roca fosfórica.

INDICE GENERAL

I.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.- Biogeoquímica del fósforo en el suelo.....	1
1.1.- Formas de fósforo en el ambiente terrestre.....	3
1.2.- Transformaciones del fósforo en el suelo.....	7
1.2.1.- Transformaciones de los minerales de fósforo Primarios.....	7
1.2.2.- Inmovilización del fósforo orgánico en la matriz del suelo.....	9
1.2.3.- Ciclo microbiano del fósforo.....	10
1.2.3.1.- Mineralización de fósforo orgánico.....	11
1.2.3.2.- Solubilización biológica de fósforo mineral.....	14
1.2.4.- Solubilización de fosfato de calcio.....	15
1.2.5.- Papel de las plantas en la solubilización de fosfatos orgánicos e inorgánicos.....	16
1.2.6.- Papel de las micorrizas en la solubilización de fósforo.....	18
2.- Reseña histórica y bases metabólicas y genéticas del fenotipo MPS ⁺	20
2.1.- Bacterias solubilizadoras de fosfatos minerales (fenotipo MPS ⁺).....	20
2.2.- Genética del fenotipo MPS ⁺	23
2.3.- Glucosa deshidrogenasa dependiente de PQQ.....	28
2.4.- PQQ como grupo prostético de las glucosas deshidrogenadas.....	30
2.5.- Papel ecofisiológico de la vía de oxidación directa de la glucosa.....	31
3.- Aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos MPS ⁺	32
3.1.- Bacterias MPS ⁺ como promotoras del crecimiento de las plantas.....	32
3.2.- Procesos biohidrometalúrgicos y microorganismos MPS ⁺	34
3.3.- Bioprocesamiento del mineral de roca fosfórica.....	37
4.- Antecedentes.....	41
II.- HIPÓTESIS.....	42
III.- OBJETIVOS.....	42
IV.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
1.- Material Biológico.....	43
2.- Ubicación Taxonómica.....	43
2.1.- Estudio Micromorfológico.....	43

2.2.- Estudio Macromorfológico.....	43
2.3.- Caracterización Bioquímica y Fisiológica.....	44
2.4.- Identificación molecular de las cepas aisladas.....	44
3.- Caracterización del fenotipo MPS ⁺ de las cepas MMB047 y MMB051.....	45
3.1. Preparación de los inóculos.....	45
3.2.- Pruebas preliminares de acidificación.....	45
3.3.- Determinación de la presencia de ácido glucónico en los sobrenadantes de cultivo por medio de cromatografía en capa fina.....	46
3.4.- Determinación de la presencia de ácidos orgánicos en el sobrenadante de cultivo de la cepa MMB051, por medio de la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	47
3.5.- Cinética de crecimiento, acidificación, consumo de glucosa, y solubilización de fosfato en medio NBRIP.....	48
4.- Evaluación de la capacidad solubilizadora de fosfato de las cepas MMB047 y MMB051 sobre distintos sustratos minerales.....	48
4.1.- Solubilización de fosfatos a partir de mineral de hierro en presencia de las cepas MMB047 y MMB051.....	49
4.2.- Cinética de crecimiento, acidificación, consumo de glucosa, y solubilización de fosfato de las cepas MMB047 y MMB051 en medio NBRIP con mineral de roca fosfórica como única fuente de fósforo..	49
4.3.- Determinación de la capacidad solubilizadora de los sobrenadantes condicionados de las cepas MMB047 y MMB051.....	50
4.4.- Determinación del efecto solubilizador de distintos ácidos orgánicos puros sobre el contenido de fósforo en el mineral de hierro.....	51
4.5.- Determinación de la capacidad solubilizadora de fosfato del ácido glucónico sobre fosfato tricálcico y roca fosfórica.....	52
V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
1.- Ubicación taxonómica de las cepas en estudio.....	53
1.1.- Estudio micromorfológico y macromorfológico.....	53
1.2.- Pruebas bioquímicas y fisiológicas.....	54
1.3.- Identificación molecular de las cepas aisladas.....	57
2.- Pruebas preliminares de acidificación de las cepas MMB047 y MMB051 en medio NBRIP.....	60

3.- Determinación de la presencia de ácido glucónico en los sobrenadantes de cultivo por cromatografía en capa fina (TLC).....	61
4.- Determinación de los ácidos orgánicos implicados en la solubilización de fosfato tricálcico en el sobrenadante de la cepa MMB051, por medio de la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	63
5.- Cinética de crecimiento, acidificación, consumo de glucosa, y solubilización de fosfato de las cepas MMB047 y MMB051 en medio NBRIP.....	69
6.- Aplicación biotecnológica de las cepas MMB047 y MMB051.....	77
6.1.- Bioprosesamiento del mineral de hierro.....	77
6.2.- Bioprosesamiento de la roca fosfórica.....	84
6.3.- Estudio de la capacidad solubilizadora de los sobrenadantes condicionados sobre fosfato tricálcico y roca fosfórica.....	89
VI.- CONCLUSIONES.....	96
VII.- PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.....	98
VIII.- ANEXOS.....	99
Anexo 1. Medios de caracterización bioquímica.....	99
Anexo 2. Medio NBRIP.....	103
Anexo 3. Procedimiento para la determinación de la glucosa residual en los medios de cultivo de la cepas <i>Pantoea sp.</i> MMB047 y MMB051 por medio del kit comercial Qualitest.....	104
Anexo 4. Procedimiento para la determinación de fósforo soluble en los medios de cultivo de la cepas <i>Pantoea sp.</i> MMB047 y MMB051.....	105
IX.- BIBLIOGRAFÍA.....	107

INDICE DE FIGURA.

Figura 1: Inositol fosfato: 6 átomos de fósforo sustituidos sobre el anillo forman la fitina (Inositol hexafosfato).....	5
Figura 2: Formas de fósforo orgánico presentes en los suelos.....	6
Figura 3: Procesos de desarrollo de los suelos.....	8
Figura 4: Estrategias microbianas y vegetales que permiten incrementar la disponibilidad de fósforo a nivel de la rizósfera.....	17
Figura 5: Ciclo terrestre del fósforo.....	19
Figura 6: Esquema de la vía de oxidación directa de la glucosa a nivel de la rizósfera.....	21
Figura 7: Estructura simplificada del $\alpha\beta$ -heterodímero de la MDH. La PQQ y el ion calcio (representado en forma de esfera) se encuentran en el centro de la estructura.....	29
Figura 8: Estructura química de la pirroquinolin quinona (PQQ).....	30
Figura 9: Esquema de las etapas acopladas del bioprocesamiento de la roca fosfórica a gran escala.....	39
Figura 10: Cinética de acidificación de las cepas MMB047 y MMB051 en medio NBRIP modificado.....	61
Figura 11: Determinación cualitativa de la presencia de ácido glucónico en los sobrenadantes de cultivo de las cepas MMB051 y MMB047 por TLC.....	62
Figura 12: Espectro RMNH ¹ del sobrenadante de cultivo de la cepa MMB051.....	64
Figura 13: Estructura del ácido glucónico indicando los valores teóricos de aparición de cada una de la señales de los hidrógenos sobre el espectro RMNH ¹	65
Figura 14: Espectro de RMNC ¹³ del sobrenadante de cultivo de la cepa MMB051.....	66
Figura 15: Estructura del ácido glucónico indicando los valores teóricos de aparición de cada una de la señales de los átomos de carbono sobre el espectro RMNC ¹³	66
Figura 16: Espectro experimento bidimensional HMBC del sobrenadante de la cepa MMB051.....	67

Figura 17: Estructura de las lactonas de 5 y 6 miembros indicando valores teóricos de aparición de cada una de las señales de los átomos de hidrógeno sobre el espectro RMNH ¹ (azul) y las señales de los átomos de carbono carbonilo sobre el espectro de RMNC ¹³ (rojo).....	68
Figura 18: Crecimiento y acidificación en cultivos de la cepa MMB051 en medio NBRIP.....	70
Figura 19: Consumo de glucosa y solubilización de fósforo en cultivos de la cepa MMB051 en medio NBRIP.....	72
Figura 20: Crecimiento y acidificación en cultivos de la cepa MMB047 en medio NBRIP.....	75
Figura 21: Consumo de glucosa y solubilización de fósforo en cultivos de la cepa MMB047 en medio NBRIP.....	75
Figura 22: Crecimiento y acidificación en cultivos de la cepa MMB051 en medio NBRIP con roca fosfórica.....	86
Figura 23: Consumo de glucosa y solubilización de fosfato en cultivos de la cepa MMB051, en medio NBRIP con roca fosfórica.....	87
Figura 24: Crecimiento y acidificación de la cepa MMB047 en medio NBRIP con roca fosfórica.....	88
Figura 25: Consumo de glucosa y solubilización de fosfato en cultivos de la cepa MMB047 en medio NBRIP con roca fosfórica.....	89
Figura 26: Capacidad solubilizadora de los sobrenadantes condicionados de las cepas MMB047 y MMB051 en fosfato tricálcico.....	90
Figura 27: Capacidad solubilizadora de los sobrenadantes condicionados de las cepas MMB051 y MMB047 en roca fosfórica.....	92
Figura 28: Capacidad solubilizadora del ácido glucónico puro a distintas concentraciones en 10 mg de fosfato tricálcico y 40 mg de roca fosfórica.....	94

INDICE DE TABLAS.

Tabla 1: Principales reservorios de fósforo.....	2
Tabla 2: Fosfohidrolasas producidas por algunas bacterias del suelo para la mineralización de fósforo orgánico.....	13
Tabla 3: Breves reseñas en el estudio del fenotipo MPS ⁺ en bacterias gram negativas.....	26
Tabla 4: Géneros bacterianos utilizados como bacterias promotoras del crecimiento de las plantas.....	33
Tabla 5: Perfil térmico de la amplificación por PCR.....	45
Tabla 6. Características macromorfológicas de las colonias de las cepas en estudio en agar LB.....	54
Tabla 7: Pruebas bioquímicas y fisiológicas realizadas a las cepas en estudio.....	56
Tabla 8: Resultados de la técnica de análisis comparativo de la secuencia nucleotídica del gen que codifica el ARN ribosomal 16S realizada a las cepas en estudio.....	58
Tabla 9: Valores teóricos de las señales de los átomos de carbono e hidrógenos presentes en distintos tipos de ácidos orgánicos.....	64
Tabla 10: Análisis químico realizados a las muestras de mineral de hierro.....	79
Tabla 11: Efecto de los sobrenadantes condicionados sobre el porcentaje de fósforo presente en el mineral de hierro.....	81
Tabla 12: Efecto de las soluciones de los ácidos orgánicos e inorgánicos puros sobre el contenido de fósforo en el mineral de hierro.....	81

I. INTRODUCCIÓN

1. BIOGEOQUÍMICA DEL FÓSFORO EN EL SUELO.

El fósforo es un elemento químico no metálico muy reactivo, situado en el grupo Vb de la tabla periódica y se denota con el símbolo P; posee una masa atómica de 30,974, un número atómico de 15, utiliza las valencias 3 y 5 y se encuentra generalmente en forma de fosfato.

Después del nitrógeno, el fósforo es el nutriente inorgánico de mayor importancia requerido por las plantas y los microorganismos. Debido a que no es un componente abundante del ambiente, puede agotar sus reservas en suelos con cultivos a largo plazo sin la debida fertilización. En consecuencia, existen suelos en los que el fósforo es un nutriente determinante para el desarrollo de las plantas y los microorganismos (Coyne, 2000; Wakelin y Warren, 2004).

A diferencia del carbono, el nitrógeno y el azufre, el fósforo no presenta intercambio con la atmósfera, salvo en condiciones extremas, por lo que su ciclo en la atmósfera es considerado como abierto o sedimentario (Rodríguez y Fraga, 1999; Coyne, 2000). Este ciclo ocurre por medio de los procesos de oxidación y reducción de los compuestos fosforados. Una pequeña porción del fósforo es fijada por los microorganismos y las plantas y la mayor parte del fósforo se deposita en las rocas y en el suelo; una vez vertido en el mar, se pierde casi definitivamente (Coyne, 2000; Lucas *et al.*, 1980).

Existen dos mecanismos de reciclaje del fósforo desde el océano hacia los ecosistemas terrestres. El primero lo realizan las aves marinas, que toman el fósforo que pasa a través de las cadenas alimenticias marinas y lo devuelven a tierra firme en sus excrementos. El segundo ocurre por los levantamientos geológicos de los sedimentos del océano hacia tierra firme, un proceso que tarda miles de años. Algunas estimaciones de la cantidad de fósforo alojado en reservorios terrestres y oceánicos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Principales reservorios de fósforo.

Reservorio	P _{TOTAL} (x 10 ¹² Kg)
TIERRA	
Suelo	96-160
Rocas (minas)	19
Biota	2.6
Agua (disuelto)	0.090
OCÉANO	
Sedimentos	840000
Disuelto (inorgánico)	80
Detritus (Partículas)	0.65
Biota	0.050-0.12

Bolin *et al.*, (1983).

El mayor reservorio natural de fósforo se encuentra en los sedimentos marinos, los que constituyen no solo un depósito, sino un constante vertedero de fósforo terrestre desprendido por los procesos de meteorización y la biota, así como también por el flujo de los desechos producidos por los humanos; estos desechos representan una importante fracción de la porción de fósforo terrestre que es depositada en los océanos.

Los organismos autótrofos, como las plantas, son capaces de captar directamente el fosfato aniónico inorgánico (Pi) del medio ambiente; este fosfato juega un papel de gran importancia en muchas fases del metabolismo celular, ya que puede ser incorporado a los enlaces fosfodiéster del ADN y ARN, o en forma de nucleótidos libres como monofosfatos, bifosfatos o trifosfatos, participando directamente en la generación de la energía necesaria para inducir virtualmente todos los procesos anabólicos dentro de la célula (Goldstein, 1995; Steven *et al.*, 2004). Sólo el ion ortofosfato puede ser asimilado en cantidades apreciables, y esta fracción libre de fósforo inorgánico presente en la solución del suelo, además de desempeñar un papel central en la nutrición de las plantas, tiene gran importancia en el ciclo del fósforo (Scheffer y Schachtschabel, 1992; Illmer y Schinner, 1995).

1.1. Formas de fósforo en el ambiente terrestre.

El fósforo está presente en el ambiente terrestre en distintas formas, orgánicas e inorgánicas, y en diversas concentraciones. Las formas inorgánicas incluyen a su vez dos fracciones: la primera, es la forma de fósforo que es constituyente estructural de partículas minerales del suelo (fósforo mineral), y la segunda, aquella que se encuentra en formas aniónicas (las que tienen cargas eléctricas negativas), siendo ésta la única importante para las plantas. Esta última forma recibe el nombre de fósforo adsorbido (fósforo soluble) (Coyne, 2000).

La forma adsorbida de fósforo es el anión ortofosfato, PO_4^{3-} , y para el pH en la mayoría de los suelos (pH comprendido entre 5 y 7,5), se encuentra en forma de fosfato monoácido (HPO_4^{2-}) y fosfato diácido (H_2PO_4^-) (Rodríguez y Fraga, 1999; Coyne, 2000). La concentración de fósforo en la solución del suelo se encuentra en el orden de 0.1 a 1 ppm y sólo en raras ocasiones excede este rango (Illmer and Schinner, 1995; Goldstein, 1994). Ahora bien, estos aniones fosfato son extremadamente reactivos y pueden ser precipitados en suelos básicos o neutros por la unión a cationes, como Ca^{+2} y en suelos ácidos por la unión a Mg^{+2} , Fe^{+3} y Al^{+3} ; también pueden ser adsorbidos a sesquióxidos (óxidos de hierro, óxidos de aluminio e hidróxidos), silicatos de aluminio y carbonatos de calcio. Por otra parte, dependiendo de las propiedades particulares de cada suelo, estos iones fosfato pueden ser adsorbidos sobre la superficie de arcillas minerales. Estas diversas formas de fósforo presentes en los suelos son altamente insolubles, por ende, no disponible para las plantas ni para el crecimiento microbiano (Steven *et al.*, 2004; Bolin, *et al.*, 1983).

Cuando el fósforo es incorporado al suelo como una sal soluble, una gran parte de él es retenido o enlazado dentro de la matriz del suelo y muy poco del fósforo agregado puede ser nuevamente extraído con agua (Stewart y McKercher, 1982). Esta fracción de fósforo que es retenido, puede dividirse nuevamente en dos fracciones: i) la que no puede ser extraída por medio de la utilización de ácidos diluïdos o bicarbonatos, que es designada como fracción de fósforo fijado; ii) la que puede ser extraída por este tipo de compuestos, designada como fracción de fósforo disponible, ya que representa la porción de fósforo en

el suelo que puede ser tomada por los organismos vivos. Este fósforo disponible puede ser tanto orgánico como inorgánico. La porción total del fósforo en el suelo que es extraíble, es designada también con el nombre de fósforo lábil, definida como la fracción de fósforo que puede entrar en solución por intercambio isoiónico durante un instante de tiempo dado (Bolin, et al. 1983).

Existen más de 200 formas de fósforo inorgánico mineral en el suelo, muchas de las cuales son insolubles o muy poco solubles. Las rocas fosfóricas o apatitas son las principales formas de fósforo inorgánico mineral presentes en todos los tipos de material parental. El material parental o roca madre es el sustrato a partir del cual se desarrolla el suelo. De éste se deriva directamente la fracción mineral del suelo y ejerce una fuerte influencia, sobre todo en la textura del suelo.

Las rocas fosfóricas primarias (denominadas minerales de fósforo primarios, ya que son constituyentes del material parental) reciben este nombre debido a que son rocas que presentan altas concentraciones de fosfatos minerales, y representan los reservorios naturales más grandes de fósforo terrestre. La fórmula general de las apatitas es la siguiente:



Donde: $M = Ca^{+2}, Mg^{+3}$

$X = F^-, Cl^-, OH^-, CO_3^{2-}$

Las diversas sustituciones y combinaciones de M y X dan como resultado diferentes formas de fósforo presentes en la naturaleza. Por ejemplo, la fluoroapatita cuya fórmula química es $Ca_{10}(PO_4)_6F_2$ es igual al esmalte que recubre los dientes (Coyne, 2000). Los minerales secundarios de fósforo presentes en la naturaleza son formados a partir de estos minerales de fósforo primarios (McConnell, 1979).

El fósforo orgánico constituye generalmente entre un 30 a un 50% del fósforo total en muchos suelos, aunque este rango puede variar desde valores tan bajos como 5% hasta tan altos como 95% (Bolin, et al. 1983; Rodríguez y Fraga, 1999). Gran parte del fósforo orgánico que hay en el suelo se encuentra en formas no identificadas; la forma identificada más común es el inositol fosfato (figura 1). La fitina es un inositol hexafosfato, una de las formas más habituales de fósforo orgánico sintetizada por las plantas y los microorganismos, y es la forma más estable en el suelo desde el punto de vista químico. Este compuesto puede formar entre un 15 y un 50 % del fósforo orgánico total de los suelos (Harley y Smith, 1983; Dalal, 1977).

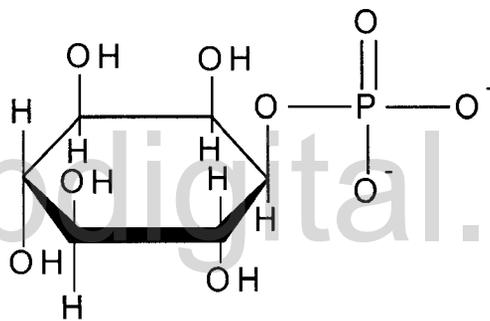
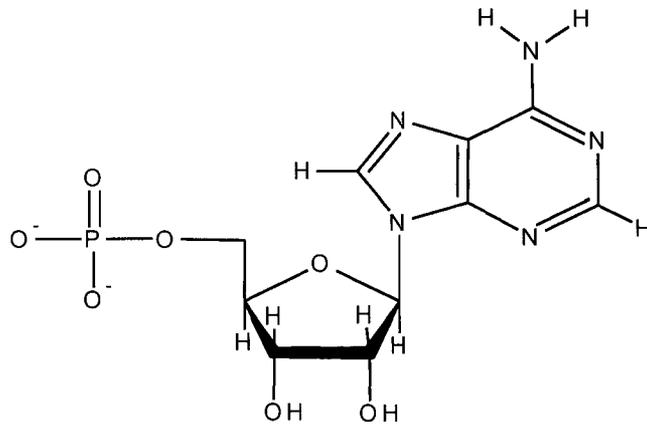
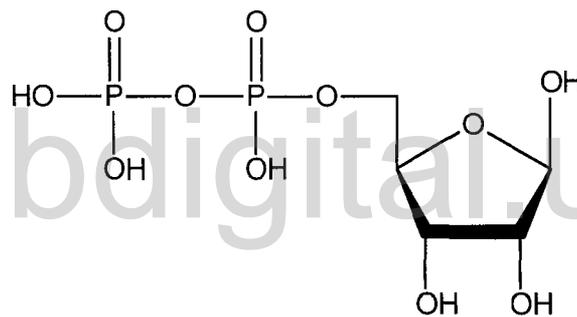


Figura 1: Inositol fosfato: 6 átomos de fósforo sustituidos sobre el anillo forman la fitina (Inositol hexafosfato).

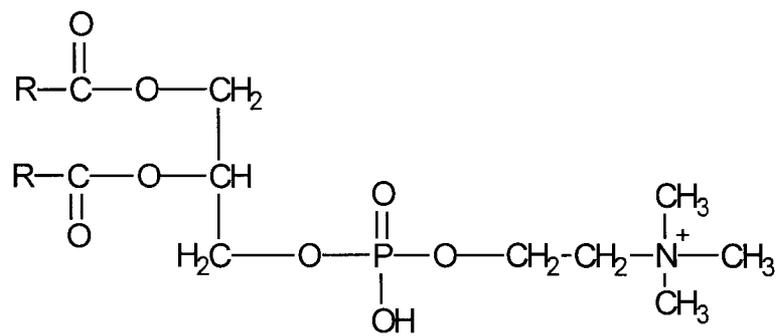
Otras formas de fósforo orgánico identificables en el suelo son los fosfomonoésteres, fosfodiésteres y fosfotriésteres, incluyendo los fosfolípidos y los ácidos nucleicos, encontrándose también trazas de azúcares fosfatados, fosfoproteínas, gliceroles fosfatos y fosfonatos (figura 2).



Adenosina 5'- fosfato (AMP)



Ribosa 5-bifosfato (Azúcar fosfatado)



Fosfoglicéridos

Figura 2: Formas de fósforo orgánico presentes en los suelos

Los nucleótidos que forman parte de los ácidos nucleicos, representan entre un 2 % a un 5 % del fósforo orgánico total del suelo. En el caso de los fosfolípidos, identificados en hidrolizados de extractos de suelos, sólo representan entre un 1 % a un 2 % del fósforo orgánico total del suelo (Coyne, 2000; Rodríguez y Fraga, 1999; Tate, 1984).

El hecho de que muy poco del fósforo orgánico en el suelo es identificado como componente de una estructura orgánica específica, se debe a que la mayoría de estos compuestos no pueden ser extraídos (Tiessen *et al.*, 1985).

1.2. Transformaciones del fósforo en el suelo.

1.2.1. Transformaciones de los minerales de fósforo primarios

Desde tiempos muy remotos, la atmósfera ha interactuado con la tierra exponiendo la corteza a procesos de meteorización; estos procesos están fuertemente influenciados por el clima y los mismos se dan por la combinación de procesos químicos y mecánicos. Existe una expresión bien conocida, que engloba la historia de los procesos de meteorización de las rocas e ilustra el importante papel que estos juegan en la historia de la tierra.

Rocas ígneas + ácidos volátiles = Rocas sedimentarias + sales oceánicas

Los procesos de meteorización de las rocas son críticos para la liberación de elementos que no tienen forma gaseosa, tales como calcio, potasio, hierro y fósforo, los cuales son nutrientes esenciales para el desarrollo de la vida en los suelos. En la figura 3, se ilustra de manera sencilla los procesos de meteorización a los cuales son sometidas las rocas primarias, dando como resultado los principales componentes del suelo.

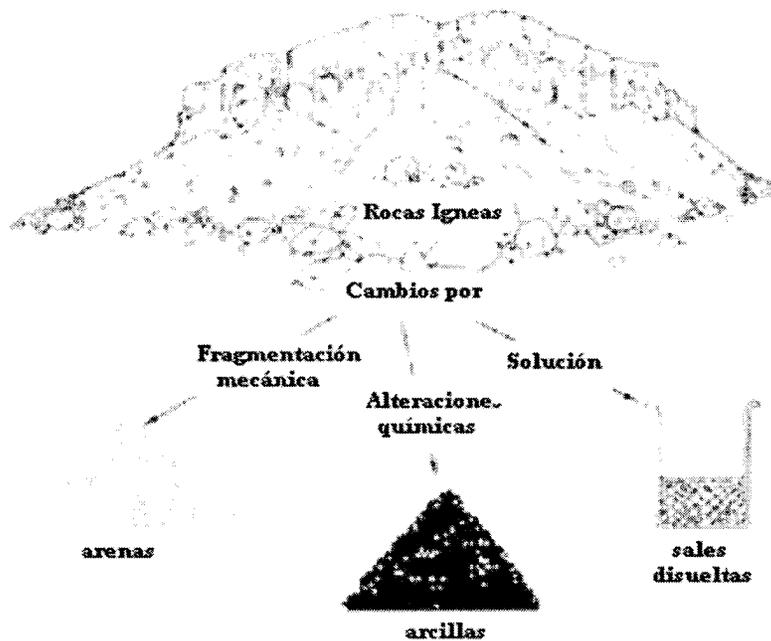


Figura 3: Procesos de desarrollo de los suelos.

Como ya se ha mencionado, el fósforo contenido en la mayoría de los suelos deriva enteramente de los materiales parentales, con excepción del fósforo proveniente de los fertilizantes, el cual es en parte, incorporado a los componentes del suelo por reacciones de intercambio. Una gran variedad de minerales primarios contienen fósforo debido a que el grupo fosfato puede sustituir isomórficamente a los silicatos en muchas estructuras cristalinas (McConnell, 1979).

La acción de los procesos químicos de meteorización sobre las fosforitas primarias (apatitas), puede ser estudiada en los grandes depósitos de fosfato de origen marino (Tiessen *et al.*, 1985). La lixiviación, por ejemplo, remueve preferiblemente carbonato de las rocas fosfóricas, al mismo tiempo que remueve pequeñas cantidades de sulfato, sodio, y otros elementos que se encuentran en formas de trazas. La pérdida de estos componentes incrementa la resistencia de las apatitas a futuros procesos de meteorización. Muchos suelos de edad pedológica relativamente joven, contienen un amplio rango de fosfatos de calcio como complejos de fosforitas primarias semejantes a las francolitas [(Ca, Na)₅

(PO_4, CO_3)₃ (F, OH)] o simplemente formas más estables como la fluoroapatita o hidroxiapatita [$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3 \text{F}$ ó OH] (McConnell, 1979).

Con excepción de algunos suelos (pedozoles de zonas boreales), la mayoría no son expuestos a procesos de meteorización ácidos en estados tempranos de su desarrollo, pero llegan a ser ácidos, como resultado de prolongados procesos de meteorización y lixiviación de todos los carbonatos y bases acompañantes (Pedro y Sieffermann, 1979). En un suelo acidificado, las apatitas son disueltas rápidamente, desprendiendo sus fosfatos dentro de la solución del suelo. El ion fosfato entonces, puede ser adsorbido a otros minerales de hierro o aluminio, sustituyéndose por silicatos, o estos pueden reaccionar con el hierro y el aluminio en solución, resultando en la neoformación de minerales de fósforo secundarios, tales como la fosfosiderita o estrengita ($\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Tiessen *et al.*, 1985).

1.2.2. Inmovilización del fósforo orgánico en la matriz del suelo.

La acumulación de fósforo orgánico en el suelo ocurre luego de la síntesis de los compuestos fosforados en las plantas y en los microorganismos del suelo. Muchos compuestos de las plantas son modificados extensamente por la acción microbiana, antes de entrar a formar parte de la materia orgánica del suelo, y la población microbiana representa también una importante fuente de fósforo orgánico, así como un significativo componente del fósforo orgánico total en el suelo (Brookes *et al.*, 1982; Hedley y Stewart, 1982).

El fósforo orgánico liberado dentro del medio ambiente del suelo puede ser estabilizado químicamente o bioquímicamente, como parte de una larga molécula humica; también puede ser adsorbido o precipitado como parte de componentes minerales del suelo, particularmente sesquióxidos. Por su alta densidad de carga, el grupo fosfato es altamente reactivo y puede contribuir ampliamente a la estabilidad de la materia orgánica, por reacciones de absorción y precipitación (Tiessen *et al.*, 1985).

La composición de fósforo orgánico en la biomasa, y las formas de fósforo orgánico presentes en el suelo son muy diferentes, como resultado de la estabilización preferencial

de compuestos de fósforo orgánico específicos en el medio ambiente del suelo. Por ejemplo, el inositol fosfato que contiene un gran número de grupos ésteres fosfatos en cercana proximidad, es adsorbido rápidamente a minerales del suelo, interactuando ampliamente con sesquióxidos, lo que explica su persistencia en el suelo. El inositol que no es degradado depende enteramente del contenido de aluminio y hierro activos presentes para las reacciones de adsorción y precipitación (Anderson *et al.*, 1974).

Los fosfodiésteres, componentes de los ácidos nucleicos y otros tipos de ésteres fosfato, tienen baja densidad de carga, y sus grupos fosfatos están generalmente protegidos de interacciones iónicas. Esto permite que sean accesibles a la degradación por enzimas, explicando las bajas concentraciones presentes en el sistema del suelo. Las bajas concentraciones de ésteres fosfatos establecidas en los suelos son probablemente estabilizadas por polisacáridos que están sobre muchas células microbianas (Dalal, 1997; Foster, 1981). La co-adsorción de hierro y otros iones metálicos, así como de fosfatos, a los polisacáridos microbianos, es reconocida como una parte importante en la purificación de desechos de aguas residuales e industriales (Brown y Lester, 1979).

Diferentes compuestos específicos de fósforo orgánico, como fosfolípidos, ácidos nucleicos, glicerol fosfatos y otros, son establecidos en los suelos en bajas concentraciones, no solo debido a la susceptibilidad de estos compuestos a la descomposición mediada por enzimas, sino también, a que pueden ser incorporados dentro de la materia orgánica estable, siendo estos dos fenómenos los responsables directos del bajo nivel de persistencia de los mismos en el suelo (Bolin *et al.*, 1983; Tiessen *et al.*, 1985).

1.2.3. Ciclo microbiano del fósforo.

El ciclo microbiano del fósforo implica la transformación del fósforo entre los depósitos orgánicos e inorgánicos, así como entre las formas solubles e insolubles. Como ya se ha mencionado, los microorganismos juegan un papel primordial en la solubilización, la inmovilización y la mineralización del fósforo (Coyne, 2000).

Al mismo tiempo que los procesos de meteorización fisicoquímicos transforman el fósforo inorgánico primario a formas secundarias, los organismos en el suelo o sobre la roca parental toman el fósforo de la solución o disuelven fósforo activamente para su consumo. El fósforo es así incorporado dentro de la biomasa y favorece la asimilación de carbono y fijación de nitrógeno (Walter y Syers, 1976; Cole y Heli, 1981).

Las concentraciones de fósforo son diez veces más elevadas en los microorganismos que en las plantas. El fósforo puede formar de 0,5 a 1 % de los micelios fúngicos, y de 1 a 3 % de la biomasa bacteriana. A concentraciones bajas de fósforo en el suelo, los microorganismos acumulan un exceso del mismo para cubrir sus necesidades metabólicas. El fósforo después de ser incorporado a las células se convierte en ésteres de fosfato o ATP y se almacena en forma de polifosfatos. El resultado final es que las bacterias pueden secuestrar e inmovilizar el fósforo, disminuyendo su disponibilidad para las plantas; esta inmovilización microbiana depende principalmente de las demandas de crecimiento de los microorganismos (Coyne, 2000).

1.2.3.1. Mineralización de fósforo orgánico

El fósforo orgánico debe solubilizarse antes de estar disponible para las plantas y los microorganismos. La solubilización del fósforo orgánico, también llamada mineralización de fósforo orgánico, ocurre en el suelo a partir de restos de plantas y animales, los cuales contienen una gran cantidad de compuestos de fósforo orgánico. La descomposición de la materia orgánica en el suelo es llevada a cabo por la acción de numerosos organismos saprofiticos, los cuales producen la liberación del radical ortofosfato de la estructura hidrocarbonada de la molécula. Igualmente estos compuestos organofosforados pueden sufrir un proceso de mineralización por la biodegradación mediada por los microorganismos (Rodríguez y Fraga, 1999).

La degradación de los compuestos de fósforo orgánico depende principalmente de las propiedades fisicoquímicas y bioquímicas particulares de cada compuesto. Como ya se ha mencionado, los fosfolípidos, los ácidos nucleicos y los azúcares fosfato son fácilmente

degradados por la acción de enzimas, pero el inositol fosfato (fitina), los polifosfatos, y los fosfonatos son mineralizados más lentamente (Rodríguez y Fraga, 1999).

La mineralización microbiana de fósforo es también influenciada por parámetros medioambientales; de hecho, una moderada alcalinidad (Paul y Clark, 1988) así como altas temperaturas y la presencia de materia orgánica rica en fósforo, favorecen la mineralización, que junto con la acción de enzimas como las fitasas (fosfatasa específica) y otras fosfatasas, constituyen los principales mecanismos implicados en la mineralización del fósforo orgánico (Coyne, 2000).

Cuando las concentraciones de fósforo inorgánico en el suelo son bajas, se estimula la producción de fosfatasas y la mineralización del fósforo orgánico lábil (Tiessen *et al.*, 1985). Los suelos con elevados niveles de fósforo inorgánico inhiben la actividad de las fosfatasas y por ende la mineralización del fósforo orgánico. Una sola fosfatasa puede tener múltiples sustratos; del mismo modo los fosfatos diésteres requieren varias enzimas para ser mineralizados por completo (Coyne, 2000).

Las fosfatasas, enzimas encargadas de mineralizar los compuestos de fósforo orgánico, son también llamadas fosfohidrolasas, debido a que las reacciones de defosforilación involucran la hidrólisis de enlaces fosfoanhídridos o fosfoésteres. Estas fosfohidrolasas se dividen en fosfohidrolasas ácidas y alcalinas. Las fosfohidrolasas ácidas muestran una actividad catalítica óptima entre valores de pH ácidos a neutros, y pueden ser clasificadas como específicas o no específicas, en relación con la especificidad por el sustrato.

Entre las fosfohidrolasas específicas con diferentes actividades se incluyen: 3' - nucleotidasa, 5'-nucleotidasa, hexosa fosfatasa y fitasa. Un grupo específico de enzimas que liberan fósforo, pueden romper enlaces carbono-fósforo de los organofosfonatos (Rodríguez y Fraga, 1999).

En la Tabla 2 se especifican algunos géneros bacterianos encontrados en los suelos, junto con el tipo de fosfohidrolasas que producen para la mineralización de algunos sustratos de fósforo orgánico.

Tabla 2: Fosfohidrolasas producidas por algunas bacterias del suelo para la mineralización de fósforo orgánico.

Géneros bacterianos	Sustratos	Tipo de enzima
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	No específica	Fosfatasa ácida
<i>Pseudomonas sp.</i>		
<i>Burkholderia cepacia</i>		
<i>Enterobacter aerogenes</i>		
<i>Enterobacter cloacae</i>		
<i>Citrobacter freundii</i>		
<i>Proteus mirabilis</i>		
<i>Serratia marcescens</i>		
<i>Bacillus subtilis</i>	Inositol fosfato	Fitasa
<i>Pseudomonas putida</i>		
<i>Pseudomonas mendocina</i>		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Fosfonoacetato	Fosfonoacetona hidrolasa
<i>Bacillus licheniformis</i>	D- α -glicerolfosfato	D- α -glicerofosfatasa
<i>Klebsiella aerogenes</i>	Fosfonato	C-P liasa

Rodríguez y Fraga, 1999.

Algunas fosfohidrolasas son secretadas fuera de la membrana plasmática, permaneciendo en la solución del suelo en formas solubles y activas; también pueden ser retenidas por proteínas enlazantes de membranas. Esta localización a nivel de la membrana permite que estas fosfatasa funcionen como enzimas carroñeras sobre fosfoésteres orgánicos, componentes de estructuras de alto peso molecular que no pueden cruzar la membrana citoplasmática. Estas estructuras de alto peso molecular pueden ser primero convertidas en compuestos de bajo peso molecular y posteriormente mineralizadas por la acción de las fosfohidrolasas, en procesos que pueden ocurrir en forma secuencial. Por ejemplo, la transformación de ARN y ADN a nucleótidos monofosfatos vía RNasa y DNasa respectivamente, seguida de la liberación de fósforo y productos orgánicos secundarios vía fosfohidrolasas, proveen a las células de nutrientes esenciales para su desarrollo (Goldstein, 1994).

1.2.3.2. Solubilización biológica de fósforo mineral

Existen 3 mecanismos básicos para la solubilización de fósforo mineral: quelación, reducción del hierro y acidificación. Todos estos métodos desestabilizan la estructura cristalina de los minerales que contienen fósforo (Coyne, 2000).

Las bacterias y hongos que solubilizan activamente el fósforo mineral representan un 10% de la población microbiana del suelo. Se trata fundamentalmente de organismos de la rizósfera, que incluyen tanto géneros aeróbicos como anaeróbicos, con una prevalencia de géneros aeróbicos en suelos sumergidos (Rodríguez y Fraga, 1999; Coyne, 2000).

El mecanismo principal implicado en la solubilización de fosfatos minerales, ocurre por la acción de los ácidos orgánicos sintetizados por los microorganismos (Rodríguez y Fraga, 1999). La producción de ácidos orgánicos genera la acidificación del medio extracelular, provocando el desprendimiento del fosfato inorgánico del sustrato mineral por reacciones de sustitución protónica y aniónica (Goldstein, 1994).

La producción de ácidos orgánicos por bacterias solubilizadoras de fosfatos inorgánicos, ha sido bien documentada: entre los principales ácidos orgánicos identificados como agentes solubilizadores de fosfatos se encuentra el ácido glucónico. Este ácido es reportado como el principal ácido orgánico producido por bacterias solubilizadoras de fosfatos, tales como *Pseudomonas sp.* (Illmer y Schinner, 1992), *Erwinia herbicola* (Liu *et al.*, 1992), *Pseudomonas cepacia* (Goldstein *et al.*, 1993) y *B. cepacia* (Rodríguez *et al.*, 2004). Otros ácidos orgánicos identificados en géneros que presentan actividad solubilizadora de fosfatos inorgánicos son el 2-ceto-glucónico, presente en *Rhizobium leguminosarum* (Halder *et al.*, 1990), *Rhizobium meliloti* (Halder y Chakrabarty, 1993), *Bacillus firmus* (Banik y Dev, 1982), así como también mezclas de ácido láctico, isovalérico, isobutírico y acético, producidos por géneros de *Bacillus liqueniformis* y *amyloliquefaciens*. Algunos ácidos orgánicos, tales como el glicólico, malónico y el succínico, también han sido identificados como agentes solubilizadores de fosfatos minerales (Babenko *et al.*, 1984; Banik y Dev 1982).

Diversos reportes ponen en evidencia el papel de los ácidos orgánicos en la solubilización de fosfatos minerales. Por ejemplo Halder *et al.*, (1990) demostraron que los ácidos orgánicos aislados de un cultivo de *R. leguminosarum*, solubilizaron una cantidad de fósforo casi equivalente a la cantidad que fue solubilizada por las células en cultivo. Además, estos autores, demostraron que el tratamiento con acetona de los sobrenadantes de cultivo de diferentes especies de *Rhizobium* para remover las proteínas por precipitación no afectó la capacidad solubilizadora de fosfatos minerales de los mismos. Contrariamente, la neutralización de los sobrenadantes de cultivo con NaOH, eliminó la actividad solubilizadora, demostrando que este proceso solo depende de la presencia de los ácidos y no es un proceso mediado enzimáticamente. Goldstein (1994, 1995) propuso que la oxidación directa de la glucosa a ácido glucónico (y frecuentemente a ácido 2-ceto-glucónico) a nivel del periplasma, constituye una de las bases metabólicas del fenotipo de solubilización de fosfatos minerales (MPS, del inglés Mineral Phosphate Solubilization) en algunas bacterias gramnegativas.

Otras alternativas, para explicar la solubilización de fosfatos minerales, distintas a la producción de ácidos orgánicos, han sido propuestas; las mismas están basadas en la ausencia de una correlación lineal entre el pH y la cantidad de fosfato solubilizado (Asea *et al.*, 1988; Illmer y Schimer, 1992). Ahora bien, la efectividad de estos procesos ha sido cuestionada ya que su contribución en la liberación de fosfato soluble en el suelo es muy pequeña (Rodríguez y Fraga, 1999).

1.2.4. Solubilización de fosfato de calcio.

La solubilización de fosfato de calcio en agua depende de las proporciones de calcio y fósforo presentes en los compuestos a ser disueltos; en general, la solubilidad sigue una relación inversa con respecto a las proporciones de calcio y fósforo presentes en el compuesto. Muchos compuestos de fosfato de calcio presentes en el suelo tienen un amplio rango de solubilización, que varía desde compuestos altamente solubles, hasta compuestos que presentan poca solubilidad en agua; por ejemplo, el fosfato monocálcico $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, tiene una solubilidad en agua a pH 7 de aproximadamente 150,000 ppm, mientras que la

fluoroapatita cuya fórmula química es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$, presenta una solubilidad de 0,003 ppm (Goldstein, 1995), lo que indica que a medida que aumenta la proporción de los iones de calcio en el compuesto o de otros iones que puedan interactuar con el fosfato, se ve disminuida la solubilidad debido a la estabilización de los compuestos fosforados.

Los fosfatos minerales poco solubles, tales como la fluoroapatita o hidroxiapatita, solo pueden ser solubilizados en soluciones acuosas bajo condiciones ácidas. Esta disolución es el resultado de una sustitución de los protones por los iones de calcio, mediada por los ácidos; por tal razón, los minerales de fosfato de calcio presentes comúnmente en el suelo son considerados muy poco solubles. Desde un punto de vista práctico estos fosfatos son considerados insolubles y no pueden ser utilizados como fertilizantes en cultivos de plantas anuales (Goldstein, 1995).

1.2.5. Papel de las plantas en la solubilización de fosfatos orgánicos e inorgánicos.

La competencia por el fósforo presente en la solución del suelo se hace mucho más intensa a nivel de la rizósfera, en comparación con las regiones donde no existen raíces, ya que las plantas y los microorganismos en esta región compiten activamente por el fósforo en solución. Esto ha traído como consecuencia el desarrollo de distintas estrategias que les permiten a estos seres vivos disponer de un suministro de fósforo adecuado para realizar sus funciones básicas (Tate, 1984).

Las plantas, por ejemplo, pueden cambiar el pH de la rizósfera por medio de la producción de ácidos orgánicos o la excreción de protones o iones HCO_3^- , liberados a través de los exudados de las raíces, solubilizando así el fosfato mineral inorgánico contenido en esta región del suelo. Asimismo, las plantas también pueden liberar el fósforo inorgánico de las formas orgánicas, principalmente ésteres fosfatos, por la acción de fosfohidrolasas extracelulares excretadas en los exudados de las raíces, producidas en respuesta a las bajas concentraciones de fósforo presentes en la solución del suelo (Tate, 1984). En la Figura 4,

se esquematizan las distintas estrategias utilizadas por las plantas y los microorganismos para incrementar la disponibilidad de fósforo en la rizósfera.

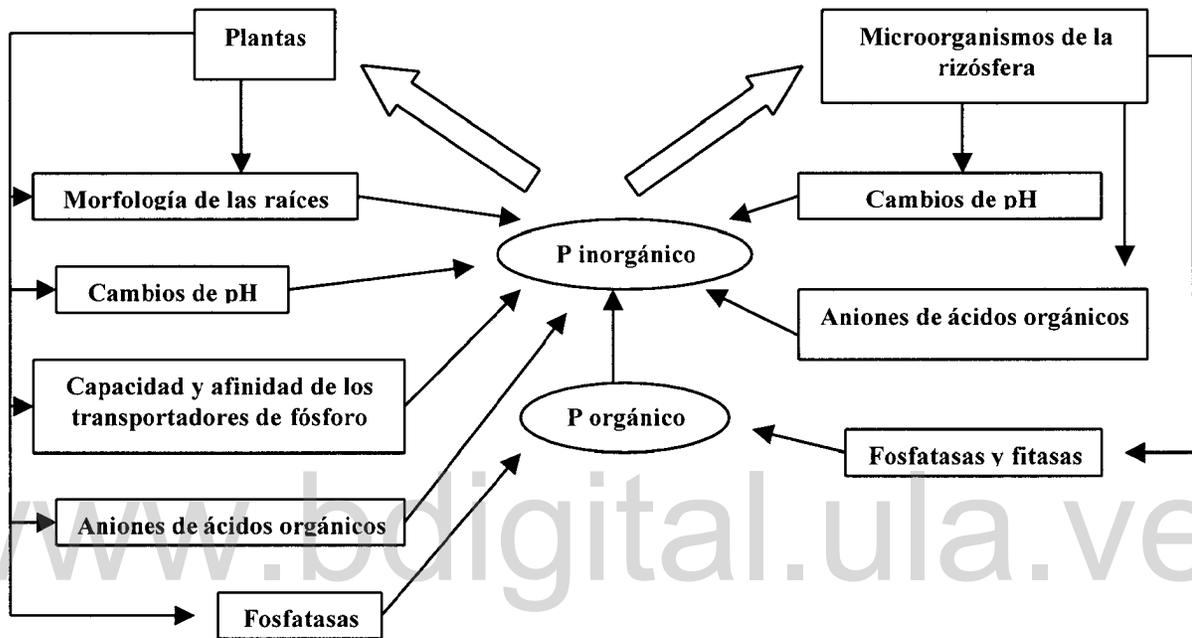


Figura 4: Estrategias microbianas y vegetales que permiten incrementar la disponibilidad de fósforo a nivel de la rizósfera (Rengel y Marschner, 2005).

Otro mecanismo por el cual las plantas pueden incrementar la capacidad en la toma del fósforo en solución, es por medio del incremento en la longitud de sus raíces, lo que les permite aumentar el área de contacto con los diferentes compuestos de fósforo orgánico e inorgánico presentes en los suelos. Además, las plantas pueden cambiar la capacidad y/o afinidad de sus transportadores membranales de P, para adaptarse a las condiciones del suelo en el cual se desarrollan (Rengel y Marschner, 2005).

1.2.6. Papel de las micorrizas en la solubilización de fósforo

Las micorrizas son hongos que infectan las raíces de las plantas, en ocasiones en relaciones simbióticas obligatorias. Estos hongos juegan un papel importante en el ciclo terrestre del fósforo y un papel primordial en la nutrición mineral de las plantas terrestres. Las micorrizas están presentes en casi todas las plantas, de allí que este tipo de simbiosis no sea tan específica como la simbiosis que ocurre en la fijación de nitrógeno (Coyne, 2000).

El desarrollo de la simbiosis depende de la fertilidad del suelo. Un suelo muy fértil genera una escasa infección por micorrizas y una simbiosis pobre; mientras que un suelo poco fértil genera una infección elevada por micorrizas y simbiosis efectivas, siempre que las micorrizas apropiadas estén presentes. De esta manera, las micorrizas contribuyen en la captación del fósforo por parte de las plantas mediante cuatro estrategias fundamentales:

La primera estrategia se basa en la solubilización de fosfatos minerales por la producción de ácidos orgánicos y CO₂ durante la respiración (Gyaneshwar *et al.*, 2002). Una segunda estrategia ocurre por la expansión de la superficie de contacto en el suelo, desde el cual se absorbe el fosfato, puesto que las micorrizas crecen a partir de las raíces de las plantas, aumentando el área de contacto para la toma del fosfato de los minerales que contienen fósforo. La tercera estrategia se basa en las concentraciones de fosfatos requeridas por las micorrizas, ya que esta captación de fosfato se produce en menores concentraciones que la que ocurre a nivel de las raíces de las plantas, lo que permite que el fosfato solubilizado sea aprovechado mayormente por las plantas. Una cuarta estrategia, se basa en la producción de fosfotransferasas, lo que les permite participar también en la solubilización del fosfato orgánico presente en el suelo (Coyne, 2000; Gyaneshwar *et al.*, 2002; Koide y Schreiner, 1992).

En la Figura 5 se muestra un esquema del ciclo terrestre del fósforo, donde se describen, de manera general, algunos de los procesos y estrategias que participan en la inmovilización y solubilización de las distintas formas de fósforo tanto orgánicas como inorgánicas presentes en los suelos.

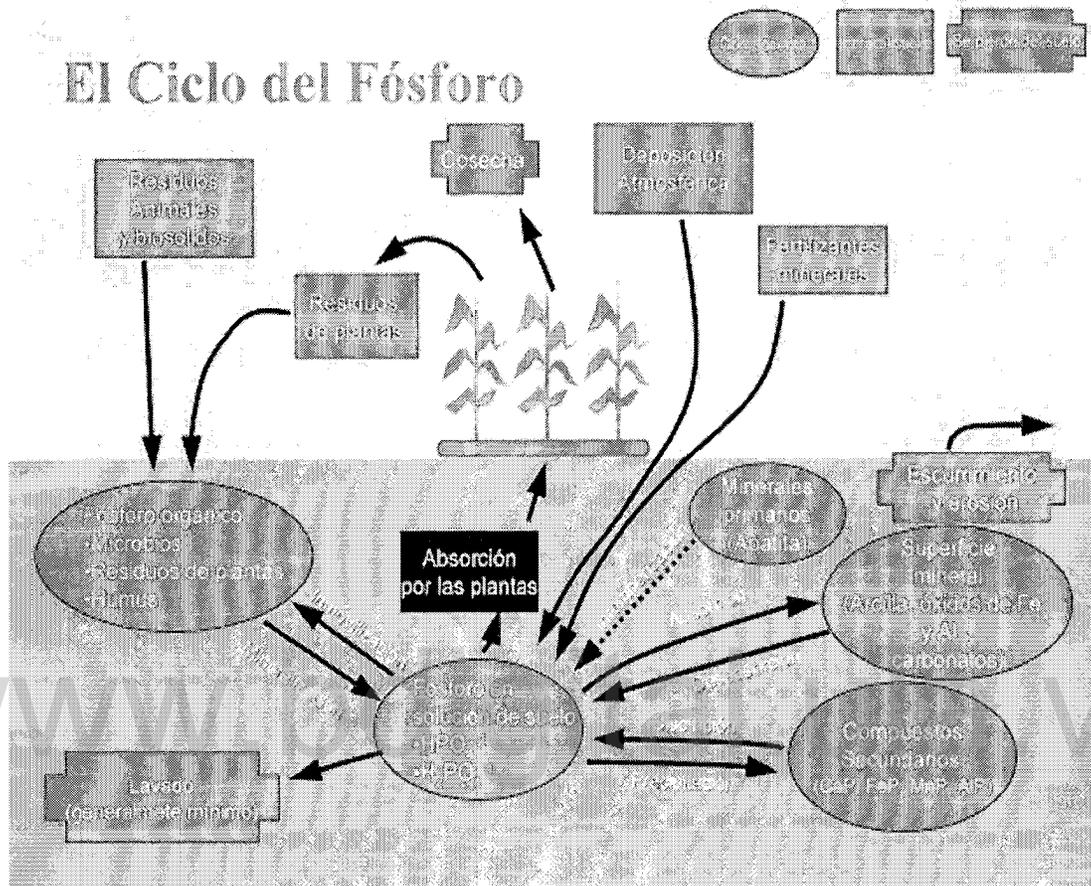


Figura 5: Ciclo terrestre del fósforo.

2. RESEÑA HISTÓRICA Y BASES METABÓLICAS Y GENÉTICAS DEL FENOTIPO MPS⁺

2.1. Bacterias solubilizadoras de fosfatos minerales (fenotipo MPS⁺)

Las bacterias solubilizadoras de fosfatos minerales, conocidas como bacterias con fenotipo MPS⁺, históricamente han sido asociadas con la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular (Goldstein, 1986). En la década de los ochenta, se establecieron las bases metabólicas y genéticas de la solubilización eficiente de fosfatos de calcio poco solubles (Liu *et al.*, 1992; Goldstein *et al.*, 1993). Los experimentos realizados por estos investigadores demostraron que la solubilización de los fosfatos inorgánicos es el resultado de la acidificación del espacio periplásmico, como consecuencia de la oxidación directa de la glucosa (oxidación no fosforilativa) u otros azúcares. Esta vía de oxidación directa de la glucosa (Figura 6), representa una de las cuatro rutas metabólicas principales que intervienen en la asimilación de azúcares en bacterias (Goldstein, 1995).

Las enzimas implicadas en el mecanismo de oxidación directa de la glucosa se encuentran orientadas de forma que los ácidos orgánicos producidos por esta vía son liberados dentro del espacio periplásmico y éstos, a su vez, pueden difundir hacia el medio extracelular. En esta ruta metabólica, la glucosa es oxidada inicialmente a ácido glucónico por la acción de la quinoproteína glucosa deshidrogenasa membranal (GDHm) (Duine *et al.*, 1979; Anthony, 1988; Duine, 1991; Goldstein, 1995). Dependiendo de cada especie bacteriana, el ácido glucónico puede sufrir adicionalmente dos oxidaciones sucesivas: la primera oxidación resulta en la producción de ácido 2-cetoglucónico, y la oxidación posterior da como producto el ácido 2,5-cetoglucónico (Anderson *et al.*, 1985; Anthony, 1988). El ácido 2-cetoglucónico es uno de los ácidos orgánicos más fuertes producidos naturalmente, presentando un pKa aproximado de 2,4 contra un pKa de 3,6 para el ácido glucónico (Goldstein, 1995).

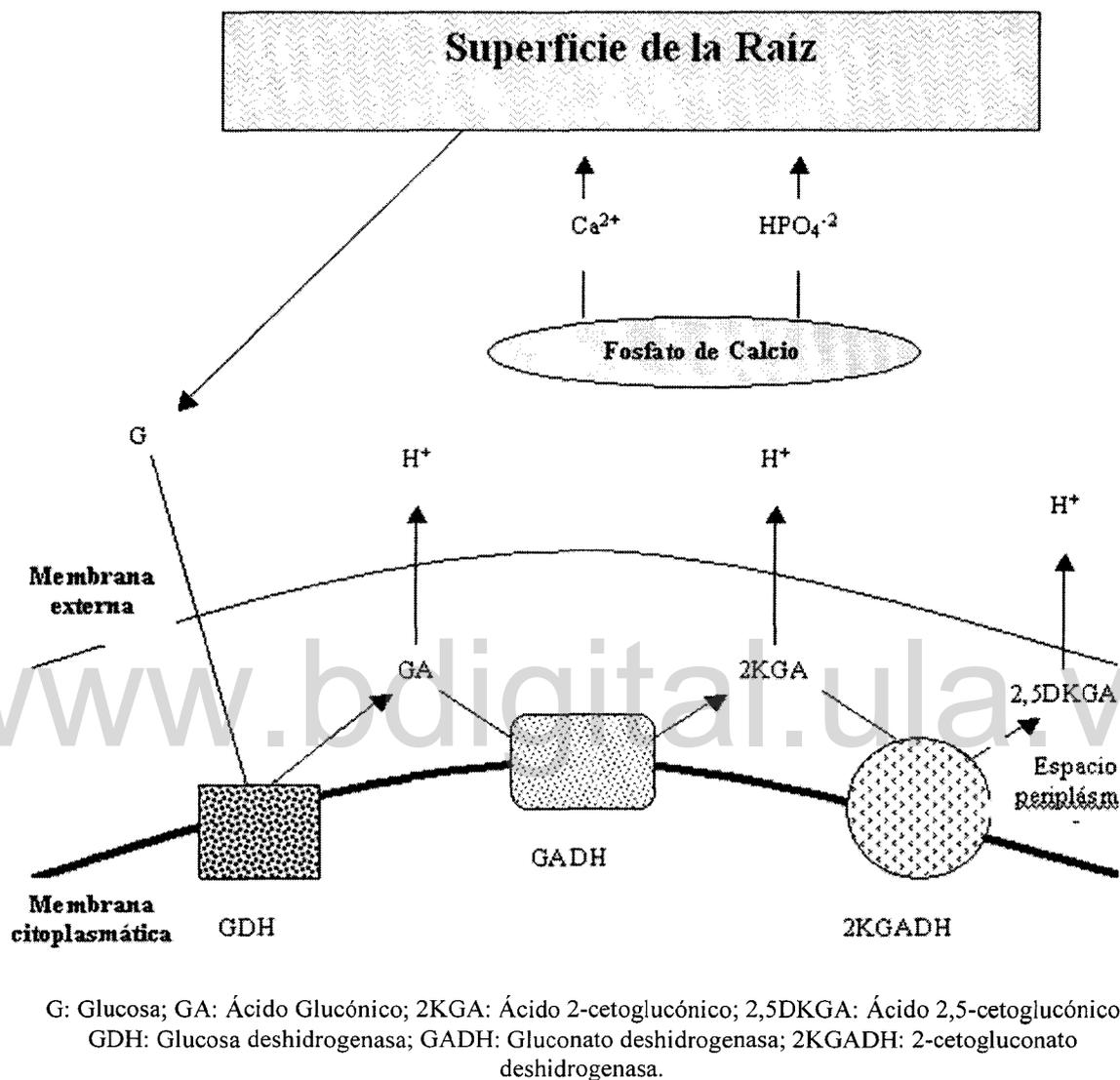


Figura 6: Esquema de la vía de oxidación directa de la glucosa a nivel de la rizósfera (tomado de Goldstein, 1995).

La vía de oxidación directa de la glucosa está ampliamente distribuida en una gran cantidad de géneros gram negativos, pero hasta ahora no ha sido posible identificar la ventaja bioenergética que esta ruta confiere, así como su papel fisiológico. De aquí nace el término “dissimilatory bypass”, el cual es usado para describir la utilización aparentemente deficiente del poder reductor generado por esta vía. Por ejemplo, muchos géneros pertenecientes a la familia de las *Pseudomonadaceae* expresan la vía de oxidación directa

en presencia de glucosa, pero oxidan menos del 1% de la misma en el medio, lo que estaría indicando la ineficiente utilización de esta vía a nivel de esta familia de bacterias (Goldstein, 1995).

Dentro de la gran variedad de microorganismos poseedores del fenotipo MPS⁺, encontramos a especies de *Pseudomonas sp.* (Illmer y Schinner, 1992), *E. herbicola* (Liu *et al.*, 1992), *P. cepacia* (Goldstein *et al.*, 1993), *Gluconobacter sp.* (Deppenmeier *et al.*, 2002), *B. cepacia*, *Serratia sp.*, *Acetobacter sp.*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter intermedium* (Hwangbo *et al.*, 2003), *Acinetobacter calcoaceticus* (Anne-Marie, 1998) y *Pantoea citrea* (Pujol y Kado, 2000), entre otros. Todos estos microorganismos han sido reportados como productores de ácido glucónico y, en algunos casos, de ácido 2-cetoglucónico y 2,5 dicetoglucónico en cultivo. Asimismo, ciertas especies de *Azospirillum sp.*, han sido reportadas como productoras de ácido glucónico y aplicadas en ensayos de biofertilización como bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR, del inglés Plant Growth Promoting Rhizobacterias) (Rodríguez *et al.*, 2004; Deubel *et al.*, 2000).

Por el contrario, algunas especies de *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, y hongos como *Aspergillus sp.* y *Penicilium sp.* (Maliha *et al.*, 2004; Steven *et al.*, 2004), han sido reportados como microorganismos solubilizadores de fosfatos minerales, produciendo principalmente ácido oxálico y cítrico en medios de cultivo. En otros estudios, especies de *P. fluorescens* y *Pantoea agglomerans* han sido reportadas como productoras de ácido succínico, láctico e hidroxiglutarico, a partir de diferentes azúcares como fuentes de carbono y energía (Deubel *et al.*, 2000). Estos resultados experimentales indican que dependiendo tanto de los microorganismos como de las condiciones a las cuales se sometan los cultivos, se puede inducir la producción de distintos ácidos orgánicos, los cuales participan en la solubilización de fosfatos minerales (Rodríguez y Fraga, 1999).

El conocimiento de las enzimas, productos y algunos genes de la vía de oxidación directa de la glucosa ha permitido estudiar la distribución de este rasgo en las poblaciones microbianas y su papel en el ciclo del fósforo inorgánico en suelos (Goldstein, 1995).

Los productos de la vía de oxidación directa de la glucosa pueden ser usados para caracterizar bacterias que presentan el fenotipo MPS⁺. Por ejemplo, ciertas bacterias gram negativas poseen enzimas GDH no dependientes de Pirrolin Quinolin Quinona (PQQ) el cual es el grupo prostético necesario para la formación de la holoenzima GDHm; aunque estas enzimas son intracelulares, los productos de las mismas pueden ser detectados en cultivos lisados. Por esta razón, es conveniente realizar ensayos que permitan detectar el ácido 2-cetoglucónico siempre que sea posible ya que las bacterias que producen ácido glucónico, no necesariamente producen el ácido 2-cetoglucónico.

En experimentos realizados por Goldstein en el 2000, se demostró que una cepa perteneciente al género de *P. cepacia*, con una mutación en la vía de oxidación directa de la glucosa, no produjo ácido glucónico, en comparación con la cepa silvestre MPS⁺. Ahora bien, ambas cepas acidificaron los medios de cultivos mínimos con glucosa en la misma proporción, pero sólo la cepa silvestre fue capaz de disolver el fosfato de calcio en placas de hidroxiapatita. Estos resultados permitieron concluir que la presencia de la vía de oxidación directa de la glucosa era importante para la solubilización de fosfatos de calcio por bacterias gram negativas.

2.2. Genética del fenotipo MPS⁺.

Las bases genéticas de la vía de oxidación directa de la glucosa (fenotipo MPS⁺) todavía no han sido bien establecidas. Algunos experimentos han permitido identificar genes implicados en la solubilización de fosfatos minerales (Rodríguez y Fraga, 1999). Por ejemplo, Goldstein y Liu (1987) clonaron, en *Escherichia coli* HB101, un gen de *E. herbícola* que participaba en la solubilización de fosfatos minerales; el “screening” de los clones recombinantes resultó en el aislamiento de un clon de *E. coli* capaz de solubilizar la hidroxiapatita, como única fuente de fósforo. Liu *et al.*, (1992) analizaron la secuencia de este gen, indicando su posible participación en la síntesis de la enzima PQQ sintetasa.

Siguiendo una estrategia similar, Babu-Khan *et al.*, (1995) aislaron un gen de *P. cepacia* implicado en la solubilización de fosfatos minerales. Este gen designado (*gabY*) fue

clonado dando origen a los plásmidos (pSLY4 y pGAB1); su expresión fue monitoreada en *E. coli* JM109 y HB101, mediante la visualización de la inducción del fenotipo MPS⁺ vía producción de ácido glucónico, en un medio conteniendo hidroxapatita como única fuente de fósforo. El gen *gabY* no presentó homología con el gen de la PQQ sintetasa clonado previamente (Liu *et al.*, 1992) pero presentó homología con una histidina permeasa, componente de un sistema de proteínas enlazantes de membrana. En presencia de 1 μM de PQQ exógeno y *E. coli* JM109 (pSLY4) o JM109 (pGAB1) se produjo 10 veces más ácido glucónico que el producido por cada uno por separado. Este resultado indicó que *gabY* podría jugar un papel alternativo en la regulación de la vía de oxidación directa de la glucosa en *P. cepacia*.

En otros experimentos realizados por Cleton-Jansen *et al.*, (1990) y Cleton-Jansen, (1991) se sintetizaron sondas de ADN homólogas al gen que codifica para la GDHm, sobre la base de las secuencias de ADN de los genes *gdh* de *A. calcoaceticus*, *E. coli* y *Gluconobacter oxydans*. El análisis bioinformático de las secuencias homólogas de las GDHm clonadas y de otras deshidrogenasas dependientes de PQQ, resultó en la identificación de una región de aminoácidos de alta homología, la cual puede formar un componente esencial del dominio enlazante de PQQ de la apoenzima. Varios experimentos han demostrado la presencia de esta secuencia homóloga en bacterias gram negativas que presentan el fenotipo MPS⁺, aisladas principalmente de la rizósfera de plantas del desierto, y su ausencia en bacterias que carecen de este fenotipo (MPS⁻).

Rodríguez *et al.*, (2000) clonaron los genes de la PQQ sintetasa de *E. herbicola* y luego lo transfirieron a *B. cepacia* IS-16 y *Pseudomonas sp.* PSS. Los clones que contenían el plásmido recombinante producían halos de solubilización más grandes (en placas con fosfato insoluble como única fuente de fósforo) demostrando la expresión heteróloga de los genes de *E. herbicola* en los géneros receptores. Este resultado representó el primer reporte sobre la aplicación de la tecnología del ADN recombinante para la obtención de rizobacterias con actividad MPS⁺, mejoradas con propósitos de biofertilización.

En lo que se refiere a la regulación de la expresión de los genes *mps*, es muy poco lo que se conoce. De hecho, la información acerca de los mecanismos genéticos y bioquímicos responsables de la síntesis de la holoenzima GDH-PQQ es escasa. Por otra parte, se han observado especies bacterianas que presentan un fenotipo MPS⁺ inducible y otras un fenotipo constitutivo (Goldstein, 1994). Los géneros que presentan un fenotipo inducible, tienen como principales inductores de la vía de la oxidación directa de la glucosa a la glucosa, el gluconato, el manitol, y el glicerol (Goldstein, 2000; Rodríguez y Fraga, 1999).

Con respecto al posible efecto del fósforo soluble sobre la expresión de la actividad MPS, Goldstein y Liu, (1987) establecieron que el fenotipo MPS⁺ en *E. herbicola* y *E. coli* es inducido por el carenciamiento de fósforo y reprimido por concentraciones altas de fósforo exógeno (mayores de 1mM). Además, se determinó que estas 2 especies de bacterias diferían en la capacidad solubilizadora de fosfatos, ya que *E. herbicola* era capaz de solubilizar tanto fosfato de calcio, como hidroxapatita; en cambio *E. coli*, solo podía solubilizar fosfato dicálcico bajo las condiciones de estudio a las cuales eran sometidas. Como se mencionó anteriormente, esta capacidad de solubilizar hidroxapatita fue transferida de *E. herbicola* a *E. coli*. Estos datos condujeron a postular la existencia de genes *mps* que mejoran la capacidad solubilizadora de fosfato de algunos géneros bacterianos bajo condiciones de carenciamiento.

Algunas especies de *B. cepacia* han demostrado también una disminución en la actividad solubilizadora de fosfato tricálcico, al aumentar las concentraciones de fosfatos solubles en el medio (mayores de 2 mM) (Rodríguez y Fraga, 1999). Sin embargo, Halder *et al.* (1990) no observaron ningún efecto del fósforo soluble sobre la solubilización de la roca fosfórica en cultivos de *R. leguminosarum*. En otras investigaciones, Mikanova *et al.* (1997) aislaron un cierto número de cepas MPS⁺, encontrando que en algunas de estas cepas se observaba una inhibición de la capacidad solubilizadora de fosfatos minerales en presencia de fósforo soluble, mientras que en otras no se observaba. Esto indicaría que el fósforo soluble no afecta la actividad MPS de todos los géneros bacterianos que presentan este fenotipo. Alternativamente podría suceder que las concentraciones de fósforo soluble utilizadas en estos experimentos fueron muy bajas.

A continuación se presenta una breve reseña de los estudios del fenotipo MPS⁺ en bacterias gram negativas (Tabla 3).

Tabla 3. Breves reseñas en el estudio del fenotipo MPS⁺ en bacterias gram negativas.

Fecha	Investigador (es)	Observaciones	Importancia
1908	Sackett <i>et al.</i>	36 bacterias aisladas del suelo fueron capaces de solubilizar roca fosfórica	Primer reporte en la literatura científica sobre el fenotipo MPS
1948	Gerretsen	Desarrollo de placas de agar con fosfato para visualizar el fenotipo MPS en bacterias	Demostración de la capacidad de una bacteria para aumentar la disponibilidad de P en la rizósfera
1957	Sperber	Caracterización de ácidos orgánicos producidos por bacterias MPS aisladas del suelo. 84 de 291 fueron MPS ⁺ . Todas ellas produjeron ácidos orgánicos disminuyendo el pH del medio.	Primera demostración de que el fenotipo MPS fue el resultado de la producción de ácidos orgánicos
1958	Sperber	Demostración de la presencia en la rizósfera de bacterias MPS en mayor proporción que la encontrada en el suelo adyacente	Primera demostración <i>in vivo</i> de una función potencial para bacterias MPS
1959	Duff y Webley	Se propuso que el ácido 2-cetoglucónico tiene una función importante en la solubilización de fosfatos minerales en suelos	Primera evidencia de que la vía de oxidación directa de la glucosa constituye una de las bases metabólicas para el fenotipo MPS
1962	Katznelson <i>et al.</i>	Demostración de que bacterias MPS aisladas de la rizósfera de plantas de trigo, fueron mas efectivas en la oxidación de la glucosa que aquellas bacterias aisladas solamente del suelo	Evidencia adicional que apoyaba la función asignada para la vía de la oxidación directa de la glucosa en el fenotipo MPS
1978	Moghimi <i>et al.</i>	Confirmación de que el ácido 2-cetoglucónico fue el principal compuesto solubilizador producido por rizobacterias de plantas de trigo	Evidencia adicional que apoyaba la función asignada para la vía de la oxidación directa de la glucosa en el fenotipo MPS

Fecha	Investigador (es)	Observaciones	Importancia
1987	Goldstein y Liu	Produjeron una cepa de <i>E. coli</i> recombinante capaz de expresar un gen MPS de <i>E. herbicola</i> , el cual le confería la capacidad de disolver hidroxapatita	Primera bacteria MPS producida por la tecnología del ADN recombinante (Ingeniería genética)
1992	Liu <i>et al.</i>	Se demostró por la técnica de secuenciamiento del ADN, que el gen MPS clonado en 1987 codificaba para una PQQ sintetasa. PQQ es el cofactor redox esencial para la glucosa deshidrogenasa, la enzima que oxida la glucosa a ácido glucónico en bacterias gram negativas	Primera demostración de que la vía de oxidación directa de la glucosa es la responsable del fenotipo MPS en bacterias gramnegativas
1993	Goldstein <i>et al.</i>	Primera publicación en la literatura científica que muestra la eficacia del bioprosamiento de mineral de roca fosfórica mediada por <i>P. cepacia</i> en un birreactor	Demostración preliminar de la factibilidad del bioprosamiento de mineral de roca fosfórica
1994	Goldstein <i>et al.</i>	Un mutante de <i>P. cepacia</i> carente de un gen funcional codificante de la glucosa deshidrogenasa, produjo la disminución del pH del medio en la misma forma cómo lo hacía la cepa salvaje, sin embargo, no demostró capacidad de solubilizar hidroxapatita	Primera prueba concluyente de que la vía de oxidación directa de la glucosa es esencial para la solubilización de fosfatos de calcio mediada por bacterias Gram negativas
1999	Goldstein y Braverman	Una cepa de <i>E. cloacae</i> aislada de las raíces de plantas del desierto de Mojave en EEUU, mostró dependencia del exudado de las raíces para inducir la actividad MPS	Primera demostración directa en un ecosistema natural sobre el mutualismo existente entre las bacterias MPS y las plantas

Tomado de Goldstein (2000).

2.3. Glucosa deshidrogenasa dependiente de PQQ

La glucosa deshidrogenasa (GDH), es una quinoproteína que está presente tanto en bacterias aeróbicas gram negativas, como en anaerobios facultativos, tales como, *Acinetobacter sp*, *Zimomonas sp*, bacterias entéricas, *Pseudomonadaceas* y bacterias ácido acéticas (Christopher, 2004). La GDH cataliza la oxidación periplasmática de la glucosa por la vía de oxidación directa, para producir ácido glucónico (Flores-Encarnación *et al.*, 2004). Esta oxidación se lleva a cabo en la superficie externa de la membrana citoplasmática y está acoplada a la cadena transportadora de electrones (Matsushita *et al.*, 1989; Matsushita *et al.*, 1990).

Hasta ahora se conocen dos tipos de GDH: la membranal (GDHm) o glucosa deshidrogenasa A (GDH-A), presente en *Pseudomonas sp.*, *A. aceti*, *G. diazotrophicus*, *Gluconobacter suboxydans*, y la forma soluble (GDHs o GDH-B), que solo se ha encontrado en *A. calcoaceticus* (Matsushita *et al.*, 1994). La GDHm es una proteína dimérica, de peso molecular aproximadamente de 100 kDa; cada subunidad tiene una molécula de PQQ y un ión de Ca^{2+} . Existen diferencias estructurales dentro del mismo tipo de enzima: un ejemplo de ello lo representan las GDHm de tipo I, presente en *Pseudomonas sp.* y *E. coli* en las que el grupo prostético es removido empleando EDTA y las GDHm de tipo II, presente en *A. calcoaceticus*, *Gluconobacter diazotrophicus* y *G. suboxydans* en las que el grupo prostético no es removido (Flores-Encarnación *et al.*, 2004).

La GDHm es la primera enzima que participa en la vía de oxidación directa de la glucosa y pertenece a un grupo heterogéneo de proteínas que difieren completamente de aquellas enzimas que dependen de nicotín y flavín nucleótidos, las cuales catalizan sus reacciones sobre la superficie externa de la membrana citoplasmática (Oubrie, citado por Flores-Encarnación *et al.*, 2004). Esta quinoproteína utiliza como cofactor la *o*-quinona para convertir ciertos azúcares en sus productos correspondientes. De los cuatro tipos de *o*-quinonas que forman parte de las distintas quinoproteínas, la quinona de pirrolo-quinolina (también conocida como la PQQ) es el cofactor utilizado por la GDHm para catalizar la

conversión de glucosa en ácido glucónico (Anthony; Duine, citado por Flores-Encarnación *et al.*, 2004).

En base a la estructura reportada para la metanol deshidrogenasa (MDH) de *Methylobacterium extorquens* se pudo establecer la estructura de la GDHm de *E. coli* (Cozier y Anthony, 1995; Oubrie *et al.*, 1999) (ver figura 7).

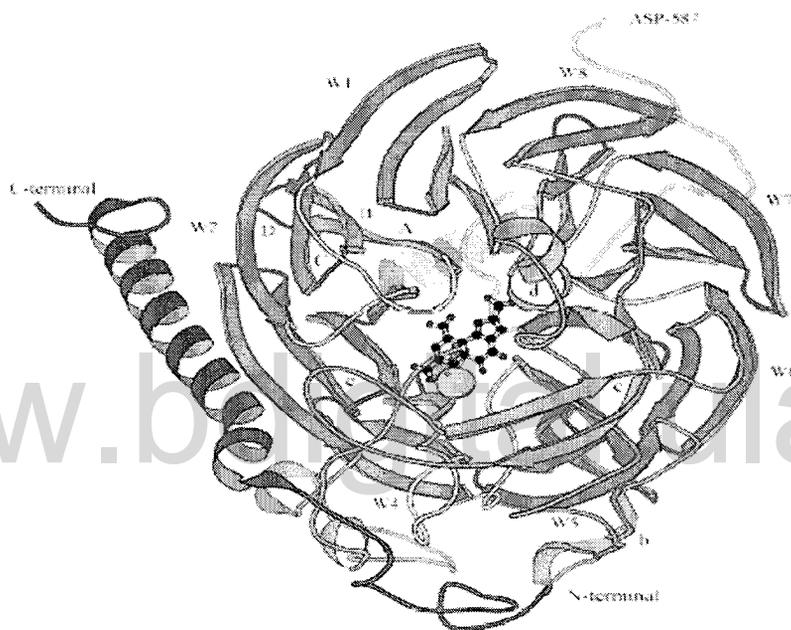


Figura 7: Estructura simplificada del $\alpha\beta$ -heterodímero de la MDH. La PQQ y el ion calcio (representado en forma de esfera) se encuentran en el centro de la estructura (tomado de Christopher, 2004)

La GDHm presenta la estructura típica de superbaril, con la notable presencia de un residuo de histidina (His-262), que se encuentra en la parte superior de la hendidura hidrofóbica (Cozier y Anthony, 1995). La histidina sustituye al doble anillo disulfuro encontrado en la MDH de *M. extorquens* y su función es mantener unido al grupo PQQ en el sitio catalítico de la GDHm. Su interacción con el grupo PQQ es más débil que la que puede proporcionar el doble anillo disulfuro en la MDH, la cual puede ser una de las razones por las que el grupo PQQ puede ser removido de algunas GDH con mayor facilidad (Cozier y Anthony, 1995; Cozier *et al.*, 1999).

La GDHm cataliza la oxidación de una gran cantidad de hexosas y pentosas, pero raramente oxida disacáridos, como se demostró en un estudio sobre los sustratos utilizados por la enzima de *E. coli* (Cozier *et al.*, 1999). La energía de activación para la oxidación de hexosas y pentosas es la misma, indicando que la oxidación de este tipo de azúcares sigue el mismo mecanismo.

2.4. PQQ como grupo prostético de las glucosas deshidrogenasas

El grupo prostético PQQ (Figura 8), se purificó por primera vez desnaturalizando la enzima metanol deshidrogenasa. Muchas bacterias lo producen en grandes cantidades y lo excretan al medio. Dentro de las especies bacterianas que sintetizan este grupo prostético tenemos a *A. calcoaceticus*, *P. fluorescens*, *Klebsiella aerogenes*, *G. oxidans* y *E. herbicola* (Pujol y Kado, 1999). La cantidad de PQQ excretado puede variar entre 1 µg/ml a 1 mg/ml, lo cual depende de la composición del medio de crecimiento. La posición C-5 del carbonilo del grupo PQQ es muy reactiva y susceptible de ataque nucleofílico (Figura 8) y en presencia de ácidos fuertes el PQQ promueve la formación de una lactona interna (Duine, 1991). Se sabe que la tirosina y el ácido glutámico son los precursores del grupo PQQ, pero existe poca información acerca de la vía de biosíntesis de este cofactor (Flores-Encarnación *et al.*, 2004). En todos los casos el aceptor de electrones provenientes del PQQ es la ubiquinona, la cual es posteriormente oxidada por una quinol oxidasa, como en *E. coli*, o por vía de un complejo citocromo bc₁, citocromo c, y una citocromo oxidasa (Christopher, 2004).

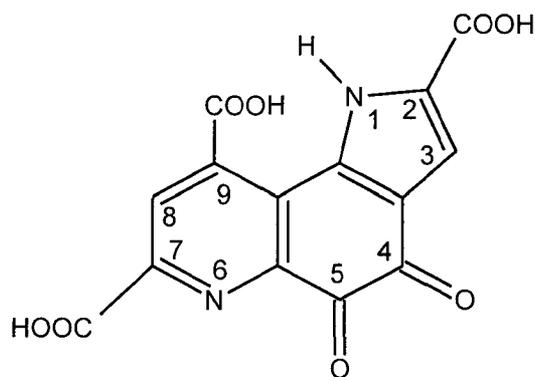


Figura 8: Estructura química de la pirroquinolin quinona (PQQ)

En *E coli*, *Acinetobacter iwoffii*, y *Klebsiella pneumoniae*, la GDHm se sintetiza como una apoenzima. En estas bacterias la GDHm es inactiva, debido a que la vía de síntesis del grupo PQQ está alterada. La actividad de estas deshidrogenasas puede restablecerse mediante la adición exógena del grupo PQQ (Pujol y Kado, 1999; Matsushita *et al.*, 1994).

Esta apoenzima GDHm parece estar distribuida ampliamente entre las bacterias (Stites *et al.*, 2000). Según Oubrie y Dijkstra (2000) la apoenzima de *E. coli*, reconstituye prontamente su actividad en presencia de iones magnesio y no de iones calcio. Como ya se sabe, el calcio juega un papel de gran importancia en el mecanismo enzimático de todas las deshidrogenadas que contienen PQQ, en cuyas estructuras se ha determinado la presencia de este ion como el que participa en la unión del cofactor PQQ al sitio activo de la enzima (Flores-Encarnación *et al.*, 2004). Esto indica que el ion magnesio puede reemplazar, sorprendentemente, a los iones de calcio en el sitio activo de una amplia variedad de deshidrogenasas dependientes de PQQ.

2.5. Papel ecofisiológico de la vía de oxidación directa de la glucosa.

Como ya se ha mencionado, el término “Dissimilatory bypass” fue utilizado para describir el papel metabólico no definido de la vía de oxidación directa de la glucosa en una especie particular. En un trabajo realizado por Lessie *et al.* (1979), una cepa de *P. cepacia* mutante para la actividad glucosa deshidrogenasa, creció igual que la cepa salvaje con glucosa como fuente de carbono, indicando la escasa importancia (aparente) de este mecanismo en lo que a bioenergética se refiere. Este y otros trabajos permitieron proponer que, por lo menos para algunos géneros bacterianos, el papel primario de la acidificación extracelular debía ser ecológico, antes que bioenergético (Goldstein, 1994).

La hipótesis que propone un posible papel eco-fisiológico de la vía de oxidación directa, se basó en el hecho de que la solubilización de fosfatos a partir de fosfatos de calcio era mucho mayor en las proximidades de la rizósfera. En esta región la glucosa podía ser suministrada por las plantas, ya sea como un producto de secreción, o como el resultado de

la biodegradación de los polímeros de carbohidratos desprendidos a partir de la materia muerta (Anderson *et al.*, 1985 y Goldstein, 1994).

Por otra parte, el papel eco-fisiológico de la vía de oxidación directa, pudo ser establecido en los suelos de regiones áridas y semi-áridas. Estos suelos tienden a tener limitaciones de fósforo inorgánico debido a su pH alcalino, el cual favorece la precipitación de fosfatos de calcio poco solubles. En este caso, el mecanismo de oxidación directa de la glucosa jugaría un papel central, incrementando la disponibilidad del fósforo inorgánico para que pueda ser captado por las plantas predominantes en estas regiones (Goldstein, 1994).

3. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LOS MICROORGANISMOS MPS⁺

En la nueva era de la industrialización global, donde la importancia de muchas industrias clásicas se ve disminuida y redirigida hacia tecnologías emergentes, la biotecnología es un pilar desafiante que está abriendo y examinando distintas oportunidades. El descubrimiento de las bases metabólicas y genéticas del fenotipo MPS⁺ en los microorganismos, ha permitido desarrollar distintas aplicaciones en procesos biotecnológicos, para aprovechar el gran potencial de estos microorganismos relacionado con la producción de ácidos orgánicos y su capacidad de acidificación.

3.1. Bacterias MPS⁺ como promotoras del crecimiento de las plantas.

La revolución verde en la agricultura fue uno de los aciertos humanos más fructíferos realizados en el siglo pasado. Esta revolución, aparte de garantizar la disponibilidad de alimento global, jugó un importante papel en la transformación y desarrollo de las ciudades. Ahora bien, el incremento en la producción de los campos ha sido contrarrestado por un constante incremento en la población humana, y hoy en día la disponibilidad de alimento se ve nuevamente amenazada (Gyaneshwar *et al.*, 2002).

Aunque en el suelo existe una gran cantidad de bacterias solubilizadoras de fosfato, usualmente no se encuentran en grandes concentraciones como para competir exitosamente con otras bacterias establecidas en la rizósfera. Así, la cantidad de fósforo liberado por estas bacterias generalmente no es suficiente para incrementar sustancialmente el crecimiento de las plantas. La inoculación de la rizósfera con microorganismos MPS⁺ para aumentar su concentración en el suelo, es necesaria para aprovechar las propiedades de estos microorganismos para favorecer el crecimiento de la plantas (Rodríguez y Fraga, 1999).

Existen reportes sobre la promoción del crecimiento de las plantas por bacterias que tienen la habilidad de solubilizar fósforo orgánico e inorgánico del suelo, luego de su inoculación en el mismo (Kloepper *et al.*, 1988). La producción por estos géneros bacterianos de otros metabolitos beneficiosos para la planta tales como fitohormonas, antibióticos o sideróforos, entre otros, crea confusión acerca del papel específico de la solubilización de fosfatos en el crecimiento de las plantas y en la estimulación del rendimiento (Kloepper *et al.*, 1989). Sin embargo, existen evidencias que soportan el papel de este mecanismo en estos procesos. Por ejemplo, diferentes microorganismos del suelo, incluyendo bacterias, mejoran la disponibilidad de fósforo para las plantas como consecuencia de su capacidad para solubilizar fósforo orgánico e inorgánico. Considerando que la disponibilidad de fósforo es un paso limitante en la nutrición de la planta, estas evidencias sugieren una contribución fundamental de las bacterias MPS⁺ en la nutrición de las plantas (Rodríguez y Fraga, 1999). En la tabla 4, se muestran algunos géneros bacterianos utilizados como bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR) y el tipo de cultivo en el cual han sido utilizadas.

Tabla 4: Géneros bacterianos utilizados como bacterias promotoras del crecimiento de las plantas.

Género bacteriano	Tipo de cultivo	Referencia
<i>B. cepacia</i>	maíz , lechuga, tomate y otros	Chabot, <i>et al.</i> , 1993
<i>R. leguminosarum</i>	lechuga y maíz	Chabot <i>et al.</i> , 1996
<i>P. putida</i>	Canola	Lifshitz <i>et al.</i> , 1987
<i>Azospirillum lipoferum</i>	Arroz	Murty y Ladha, 1988
<i>B. firmus</i>	Lechuga, café	Datta <i>et al.</i> , 1982
<i>Bacillus polymyxa</i>	Banana, tomate	Gaur y Ostwal, 1972
<i>Bacillus cereus</i>	arroz, maíz	Fernández <i>et al.</i> , 1984

Otra alternativa para el aprovechamiento de bacterias MPS⁺ como PGPR, es en el uso de cultivos mixtos o la co-inoculación con otros microorganismos. Diferentes estudios han demostrado un beneficio en el desarrollo de las plantas influenciado por la inoculación combinada de bacterias solubilizadoras de fosfatos, lo que da mejores resultados que la inoculación por separado de las mismas (Rodríguez y Fraga, 1999).

Los mecanismos por los cuales las PGPR pueden ejercer un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas puede ser de dos tipos: directo e indirecto (Glick, 1995). El mecanismo directo tiene relación con la síntesis de fitohormonas (Xie *et al.*, 1996), la fijación de nitrógeno (Christiansen-Weneger, 1992), la reducción del potencial de membrana de las raíces (Bashan y Levanony, 1991), la síntesis de algunas enzimas como la ACC deaminasa que modula los niveles de hormonas de las plantas (Glick, *et al.*, 1998), y por último, la solubilización de fosfatos tanto orgánicos como inorgánicos (Krasilnikov, 1961; Gaur y Ostwal, 1972; Subba Rao, 1982). Por otra parte, el mecanismo indirecto se relaciona con la disminución (o eliminación) de los efectos dañinos causados por microorganismos patógenos, principalmente debido a la síntesis de antibióticos (Sivan y Chet, 1992) o sideróforos por estas bacterias PGPR (Leong, 1986; Rodríguez, 2000).

La utilización de bacterias con fenotipo MPS⁺ como inoculantes para mejorar el crecimiento de las plantas en campos de cultivo, puede presentar muchas variables que hay que tomar en cuenta a la hora de ser utilizadas (Gyaneshwar *et al.*, 2002):

1. La supervivencia y colonización de los inoculados en la rizósfera.
2. La competencia con los microorganismos nativos.
3. La naturaleza y propiedades del suelo y las variedades de plantas.
4. La deficiencia de nutrientes a nivel de la rizósfera.

3.2. Procesos biohidrometalúrgicos y microorganismos MPS⁺

Con el avance de las civilizaciones y las tecnologías, el consumo de diversos productos minerales se ha visto incrementado en alto grado. Esto ha traído como consecuencia

problemas en la producción de metales, debido a que muchos de los depósitos minerales de alto tenor han sido agotados. Por esta razón, la producción de metales se ha orientado hacia la obtención de los mismos a partir de depósitos de minerales complejos o de bajo tenor en minas y desechos industriales (Torma, 1986).

Los métodos pirometalúrgicos e hidrometalúrgicos no ofrecen una buena alternativa para la obtención de los metales a partir de estos minerales, ya que el producto recobrado por estos métodos es muy pobre; aunado a esto, estos procesos involucran un alto costo energético y un incremento significativo en la contaminación de los recursos hídricos. En consecuencia, ha surgido un creciente interés en los procesos biohidrometalúrgicos, motivado por el hecho de que son relativamente económicos, requieren bajo consumo de energía, y son seguros para el medio ambiente (Jain y Sharma, 2004).

La biohidrometalurgia representa una tecnología simple y efectiva para la extracción de metales valiosos, tales como cobre, oro, zinc, uranio, níquel, cobalto y muchos otros, a partir de minerales de bajo tenor, rocas y materiales de desecho; estas tecnologías explotan las propiedades de los microorganismos para solubilizar y acumular metales. Además de las aplicaciones industriales que pueden tener estos microorganismos en el suplemento de materia prima para algunas industrias, la lixiviación microbiana (Biolixiviación) puede tener un gran potencial en la biorremediación de los sitios de extracción, en el tratamiento de metales contaminados, productos de desechos y en la destoxificación de lodos residuales (Bosecker, 2001).

La biolixiviación aplicada como una tecnología para la extracción de metales a partir de minerales sulfurosos, utiliza bacterias quimiolitotrofas tales como *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Nelly y Wood 2000) y *Thiobacillus thiooxidans*. Estos procesos son bien conocidos y son usados comercialmente en la recuperación de cobre (Brierley y Brierley 2001; Pinches et al. 1997; Schnell 1997), oro (Aswegwn 1993; Brierley 1994, 1997; Brierley et al. 1995; Olson 1994), uranio (Khalid et al, 1993; McCready y Gould 1990), cobalto (Briggs y Millard 1997; D'Hugues et al. 1999), níquel y zinc (Dew y Millard 1997), citados por Jain y Sharma 2004) a partir de sus respectivos minerales de bajo tenor. Sin

embargo, la extracción microbiana de metales a partir de minerales no sulfurosos ha recibido hasta ahora poca atención.

Los minerales no sulfurosos como los óxidos, los carbonatos y los silicatos, no contienen fuente de energía para ser utilizada por los microorganismos. Por lo tanto tales minerales pueden ser lixiviados usando bacterias heterotróficas y hongos, los cuales requieren una fuente de carbono orgánico o una fuente de energía y carbono exógeno para su crecimiento. La biolixiviación de minerales no sulfurosos puede ser utilizada en la recuperación de metales valiosos a partir de minerales de bajo tenor, en el mejoramiento de minerales para su uso como materia prima, en la recuperación de metales a partir de desechos y en la destoxificación de metales pesados en los suelos y en residuos sólidos (Jain y Sharma, 2004).

Los mecanismos implicados en la lixiviación de minerales mediante el uso de bacterias heterotróficas son: biorreducción, acidificación y producción de ligandos o agentes acomplejantes (Gadd, 1999). Los microorganismos MPS⁺ ocupan una posición central en estos mecanismos, ya que los mismos liberan protones al medio provocando la acidificación, a la vez que producen agentes acomplejantes (ácidos orgánicos) en forma ionizada.

Hasta ahora se ha demostrado que ciertos microorganismos heterotróficos pueden incrementar la movilización de algunos elementos como Si, Al, Fe, K, Li, Ni, Zn y Mg a partir de rocas, contribuyendo así a la formación de minerales secundarios a partir de las mismas (Groudev, 1987).

Con respecto a la recuperación de metales valiosos a partir de minerales de bajo tenor y minerales concentrados, Groudev y Groudeva (1986) observaron la solubilización del aluminio presente en arcillas, por medio de bacterias y hongos heterótrofos que producían ácidos orgánicos, determinando que el mejor agente biolixivante en este proceso fue el hongo *Aspergillus niger*. Por su parte, Agatzini y Tzeferis (1997) lixivieron de un 50% a un 60% del Ni y Co respectivamente, contenidos en minerales de níquel no sulfurosos, usando

Aspergillus sp. y *Penicillium sp.* En ese trabajo, fue demostrada la importancia de ácidos orgánicos tales como cítrico y oxálico entre otros, indicando el papel de estos ácidos en los procesos de biolixiviación y recuperación de metales.

El biomejoramiento de minerales se refiere a la disolución selectiva de componentes minerales no deseados, por medio de la acción de microorganismos que permiten mejorar la calidad del mineral a ser mejorado. Un ejemplo de esto lo representa el bioprocesamiento de la bauxita de bajo tenor (menos del 50% de aluminio). Esta fuente de aluminio es usada en la manufacturación de bases de alúmina abrasivas y refractarias. Ahora bien, la presencia de un exceso de Ca^{+2} y Fe^{+3} (mas de 0,5% como CaO y 1% como Fe_2O_3), en minerales de bauxita de bajo tenor, hace a los mismos no aptos para ser utilizados como abrasivos y en aplicaciones refractarias. Anand *et al.* (1996) utilizaron a *P. polymyxa* para remover Ca^{+2} y Fe^{+3} selectivamente de la bauxita, mejorando de esta manera la calidad de dicho mineral, para su uso como materia prima.

Styriakova *et al.*, (2003), demostraron la destrucción de la mica mediada por *B. cereus*, durante el biotratamiento de caolinita y arenas de cuarzo. La mica es un componente no deseado presente en la caolinita y arenas de cuarzo, los cuales son utilizados como materia prima para la industria de la cerámica. En ese trabajo, se observó el efecto de los ácidos orgánicos producidos por *B. cereus*, en la destrucción de la estructura cristalina de la mica, como consecuencia de la remoción selectiva de los átomos de hierro presentes en la misma.

Los microorganismos heterotróficos MPS⁺, pueden ser aplicados también en procesos de biorremediación de suelos contaminados con metales pesados, ya que debido a las propiedades de los mismos pueden contribuir a la solubilización de estos metales a nivel de los suelos o a partir de desechos sólidos (Groudev, 1987).

3.3. Bioprocesamiento del mineral de roca fosfórica.

Como ya se ha mencionado anteriormente, el fósforo es un macronutriente mineral esencial para el crecimiento de las plantas, y sólo puede ser absorbido en forma de anión

ortofosfato, a partir de la solución del suelo. Debido a esto, el crecimiento de las plantas puede verse limitado por bajas concentraciones de fosfato soluble a nivel de la rizósfera. Estas concentraciones son tan bajas algunas veces, que suelos que están siendo cultivados deben de ser suplementados o fertilizados por la adición directa de sales de fosfato (Goldstein *et al.*, 1993).

La principal fuente para el suplemento de fósforo inorgánico deriva de la extracción y el procesamiento químico de los minerales de roca fosfórica, principalmente de tipo fluoroapatita. El ortofosfato soluble es extraído a partir de estos minerales por acidificación, comúnmente llevada a cabo por el uso de ácido sulfúrico concentrado a altas temperaturas. Esto genera contaminantes no deseados para el medio ambiente, incluyendo la solubilización de radioisótopos. Por el contrario, en el bioprocesamiento de la roca fosfórica, la misma entra en contacto con las bacterias bajo condiciones apropiadas. En estos bioprocesos, las bacterias oxidan los carbohidratos que actúan como fuente de energía para las reacciones de solubilización produciendo ácidos orgánicos fuertes; estos ácidos solubilizan el grupo fosfato, dando como resultado el producto final deseado: ácido fosfórico (Goldstein *et al.*, 1993; Goldstein, 2000).

Los bioprocesos tecnológicos son desarrollados comúnmente en dos etapas:

La primera etapa, se basa en la bioconversión, a gran escala, de carbohidratos de bajo costo a glucosa. Los carbohidratos, frecuentemente almidón, son tratados con microorganismos capaces de convertir enzimáticamente estos sustratos a glucosa. Mucha de esta glucosa es usada como alimento, o como sustrato para la producción de etanol vía fermentativa, obteniéndose bebidas alcohólicas o combustible. Esta misma conversión a gran escala puede ser directamente adaptada para el bioprocesamiento de la roca fosfórica (Figura 9).

En la segunda etapa, la glucosa obtenida en el primer paso es mezclada con roca fosfórica y bacterias de tipo MPS⁺. Esta mezcla puede realizarse en un recipiente llamado biorreactor de contacto, el cual es esencialmente un tanque con agitación, donde los tres componentes pueden ser mezclados y aireados manteniendo una temperatura apropiada. Bajo estas

condiciones, las bacterias entran en contacto simultáneamente con el mineral y oxidan la glucosa hasta ácidos orgánicos fuertes, los cuales disuelven el fosfato de calcio en la roca fosfórica (Goldstein, 2000).

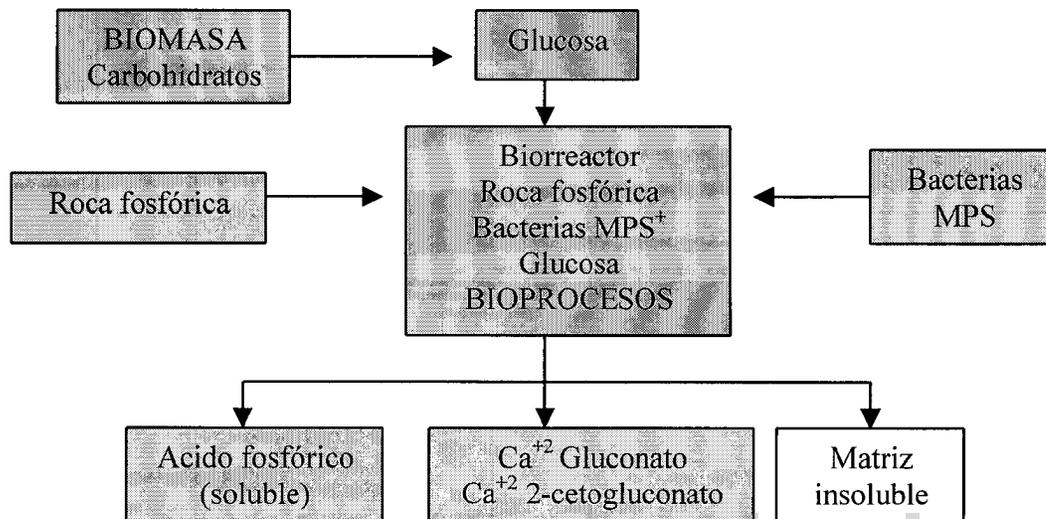


Figura 9: Esquema de las etapas acopladas del bioprocesamiento de la roca fosfórica a gran escala. (Goldstein, 2000)

Dentro de las ventajas de estos bioprocesos podemos mencionar:

1.- Estos bioprocesos no son dañinos para el medio ambiente. En los procesos convencionales, las reacciones del mineral de fosfato con el ácido sulfúrico a altas temperaturas resulta en la disolución casi completa del mineral. Como resultado, contaminantes no deseables son liberados, tanto en el flujo del gas liberado en el proceso, como dentro del flujo de los productos de fosfato. Estos contaminantes deben entonces ser tratados, lo que conlleva a la contaminación potencial del aire y de las aguas del medio ambiente.

2.- La solubilización de radioisótopos por estos bioprocesos aparentemente no ocurre. De acuerdo con lo especificado a nivel mundial, la radioactividad extraída en los bioprocesos de la roca fosfórica no es significativa.

3.- Estos procesos pueden ser menos costosos que las tecnologías comúnmente aplicadas, ya que la disminución en la contaminación representa una rebaja significativa del capital en los costos de procesamiento de la industria.

4.- Los procesos convencionales para el tratamiento del mineral requieren minerales de alto tenor, mientras que, en los bioprocesos se usan comúnmente minerales de bajo tenor.

Dentro de los microorganismos reportados hasta ahora como solubilizadores de minerales de roca fosfórica, susceptibles de ser utilizados en estos bioprocesos, se encuentran: *P. cepacia*, *E. herbicola* (Goldstein *et al.*, 1993) y *A. niger* (Didiek *et al.*, 2000).

www.bdigital.ula.ve

4. ANTECEDENTES

Para la realización de este trabajo, se contó con 10 cepas aisladas en experimentos anteriores a partir de muestras recolectadas en zonas adyacentes a los yacimientos de hierro de Altamira y Los Barrancos en la región de Guayana (Venezuela). Las muestras incluyeron material sólido particulado, así como material líquido proveniente de las aguas de drenaje y/o embalses de los yacimientos.

Estas 10 cepas fueron seleccionadas en base a su actividad solubilizadora de fosfatos inorgánicos. Esta actividad se evaluó en medio agarizado (NBRIP: Nacional Botanical Research Institute's Phosphate) y en medio líquido (NBRIP-BPB) el cual tiene un indicador de pH (azul de bromofenol). El medio NBRIP es un medio que sirve para aislar e identificar cepas bacterianas MPS⁺. Dicho medio se caracteriza por incluir entre sus componentes, fosfato tricálcico insoluble Ca₃(PO₄)₂ como única fuente de fósforo; favoreciendo de esta manera el crecimiento de cepas MPS⁺ (Nautiyal, 1999).

La capacidad bacteriana para solubilizar fosfatos en medio NBRIP agarizado puede ser detectada mediante la observación, a simple vista, de zonas claras (halos) formadas alrededor de colonias aisladas, producidas por la liberación y difusión de ácidos orgánicos al medio extracelular (Liu y col., 1992). Sin embargo, tomando en cuenta que muchas cepas son incapaces de formar halo de solubilización en medio sólido, debido a una tasa diferencial de difusión de los ácidos orgánicos entre distintas cepas (Nautiyal, 1999) y son buenas solubilizadoras en medio líquido, se utilizó medio líquido NBRIP-BPB el cual es un método semi-cuantitativo que permite determinar la capacidad acidificadora de las cepas en estudio, así como detectar las más eficientes en cuanto a la solubilización de fosfato basado en la observación visual (Sangeeta y Nautiyal, 2001).

Los resultados obtenidos indicaron que de un total de 130 cepas analizadas, 10 presentaron una excelente actividad solubilizadora y 30 una actividad significativamente superior a los controles negativos.

II. HIPÓTESIS

La utilización de bacterias solubilizadoras de fosfatos minerales (MPS⁺) para el bioprocesamiento de minerales de tipo no sulfurosos actualmente sub-explotados o no explotados, permitirá el aprovechamiento y la comercialización de los mismos.

III. OBJETIVOS

General:

Evaluar el potencial biotecnológico de las bacterias solubilizadoras de fosfatos minerales (MPS⁺) para el procesamiento de minerales no sulfurosos.

Específicos:

Identificar y caracterizar, desde el punto de vista genético, bioquímico y fisiológico, cepas bacterianas que presenten actividad MPS.

Caracterizar la actividad solubilizadora de fosfatos minerales de estas cepas.

Identificar algunos de los metabolitos bacterianos implicados en el proceso de solubilización de fosfatos minerales.

Evaluar, a escala de laboratorio, la aplicación biotecnológica de estas bacterias y/o sus metabolitos sobre sustratos minerales de tipo no sulfuroso.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material Biológico

Se utilizaron 10 cepas aisladas en experimentos anteriores a partir de muestras recolectadas en zonas adyacentes a los yacimientos de hierro de Altamira y Los Barrancos en la región de Guayana, las cuales pertenecen al Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología (MMB) de la Facultad de Ciencias Universidad de los Andes. Dichas cepas son denominadas (MMB040, MMB047, MMB051, MMB066, MMB070, MMB075, MMB087, MMB088, MMB107, MMB127). Estas cepas fueron seleccionadas en base a su actividad solubilizadora de fosfatos inorgánicos. Con la finalidad de reactivarlas y además, obtener colonias aisladas, las cepas conservadas en glicerol al 20% y -70 °C, fueron repicadas en cajas de Petri con medio LB agarizado e incubadas a 30 °C por 12 horas.

2. Ubicación Taxonómica

2.1. Estudio Micromorfológico

Con la finalidad de observar motilidad y forma de las colonias, se observaron las células al fresco provenientes de cultivos líquidos en medio LB. Para conocer la naturaleza bioquímica de la pared, se observó la coloración de las células mediante la tinción de Gram.

2.2. Estudio Macromorfológico

Este ensayo consistió en la observación de características macroscópicas como color, forma y aspecto de las colonias, así como la producción de pigmentos. Las cepas se cultivaron en cajas de Petri con agar LB y sus características macromorfológicas fueron observadas al cabo de 24 horas de incubación a 30°C.

2.3. Caracterización Bioquímica y Fisiológica

Con el fin de identificar a las cepas en estudio y lograr una ubicación taxonómica preliminar a nivel de grupo o familia, se realizaron las siguientes pruebas: Caldo glucosa Rojo Fenol, Caldo Lactosa Rojo Fenol, Agar Triple Azúcar Hierro (TSI), Caldo Rojo Metilo-Voges Proskauer, Caldo Nitrato, Oxidasa, Catalasa, Medio de Huhg y Leifson, Hidrólisis de Gelatina Nutritiva, Crecimiento en Citrato de Simmons (anexos 1). Estas son las principales pruebas bioquímicas y fisiológicas para lograr una ubicación taxonómica preliminar (Reino, Clase, Orden, Familia) con la ayuda de las claves de identificación de bacterias del suelo.

2.4. Identificación molecular de las cepas aisladas

Con el objetivo de realizar la identificación taxonómica hasta nivel de género de los diferentes aislados, se empleó la técnica de análisis comparativo de la secuencia nucleotídica del gen que codifica el ARN ribosomal 16S (ADNr 16S). Esta técnica de identificación molecular es la más difundida en la actualidad para identificar cepas provenientes de muestras ambientales y permite, en muchos casos, llevar la identificación a nivel de especie.

Para ello, se amplificó por PCR (del inglés, Polymerase Chain Reaction) el ADNr 16S usando oligonucleótidos “cebadores” universales para el dominio bacteria (“*primers*”). Como ADN blanco se utilizaron células completas: se tomó una colonia de cada una de las cepas a ser identificadas aislada previamente en cajas de agar LB, y se suspendieron en 1 mL de H₂O estéril, tomando esta mezcla como fuente de ADN molde para las reacciones de PCR. Los primers utilizados fueron fd1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y rd1 (5'-AAGGAGGTGATCCGACC-3') (Weisburg *et al.*, 1991) a una concentración final de 0,25 µM; los dNTPs se emplearon a una concentración final de 0,2 mM y la Taq polimerasa a una concentración final de 0,05 U/µl. La reacción de PCR se realizó usando el perfil térmico especificado en la Tabla 5.

Tabla 5: Perfil térmico de la amplificación por PCR.

Paso	Temperatura	Tiempo (min)
1	95 °C	3
2	94 °C	1
3	55 °C	1
4	72 °C	1
Pasos de 2 a 4 x 35 ciclos		
5	72 °C	3

Los productos de la amplificación fueron purificados a partir de los geles de agarosa usando el kit NucleoSpin® Extract (Macherey-Nagel) y estos productos fueron posteriormente secuenciados por la compañía Sequetech Corporation (Mountain View, CA). Las secuencias obtenidas fueron analizadas utilizando la herramienta bioinformática BlastN y la base de datos del GenBank.

3. Caracterización del fenotipo MPS⁺ de las cepas MMB047 y MMB051.

3.1. Preparación de los inóculos

Las cepas fueron inoculadas con asa de platino a partir de colonias frescas en condiciones de esterilidad en 30 mL de caldo LB estéril e incubadas a 30 °C y agitación constante por 12 horas. Los cultivos así obtenidos fueron centrifugados a 5500 x g por 10 min. Se descartó el sobrenadante y se procedió a realizar 2 lavados por cada cepa, para posteriormente resuspenderlas. Tanto los lavados como la resuspensión se realizaron con sales del medio NBRIP (Nautiyal, 1999) (anexo 2). Esto constituyó los inóculos para las pruebas posteriores.

3.2. Pruebas preliminares de acidificación.

Con la finalidad de determinar la capacidad acidificadora de las cepas en estudio, se procedió a realizar pruebas preliminares de acidificación. Los cultivos se realizaron en fiolas de 125 mL que contenían 50 mL de medio NBRIP estéril (Nautiyal 1999, modificado

en relación a la concentración de fosfato tricalcico de 5 g/L a 1 g/L; esta concentración se usó en todas las experiencias) pH 6,7 +/- 0,3. Los inóculos (preparados según se describe en el paso 3.1) fueron agregados a una concentración inicial de 5 % v/v. Estos cultivos fueron incubados a una temperatura de 30°C y en agitación constante. Para esta experiencia se realizó un control de acidificación de cada una de las cepas en medio NBRIP sin fosfato añadido; igualmente se siguió la variación de pH en el medio NBRIP sin inocular. El valor de pH fue determinado a distintos intervalos de tiempo a lo largo del experimento. La variación en el pH fue seguida durante 24 horas.

3.3. Determinación de la presencia de ácido glucónico en los sobrenadantes de cultivo por medio de cromatografía en capa fina.

Debido a que el ácido glucónico es uno de los principales ácidos orgánicos implicados en la solubilización de fosfatos minerales, se procedió a realizar su detección en los sobrenadantes de cultivo por medio de la técnica de TLC (del inglés, Thin Layer Chromatography). La cromatografía de capa fina es una técnica de análisis químico utilizada para separar sustancias puras de mezclas complejas. Esta técnica se basa en el principio de adsorción selectiva y el uso de la misma está ampliamente extendido en el análisis de alimentos, medicinas, sangre, productos petrolíferos y productos de origen biológico.

Para la realización de esta prueba los sobrenadantes de cultivo fueron obtenidos según se describe en el punto 3.2. La detección cualitativa del ácido glucónico por la cromatografía de capa fina se hizo en base a lo reportado por Joveva et al. (1991) con ligeras modificaciones. Esta prueba se realizó sobre láminas preparativas de capa fina con Silicagel 60 F₂₅₄ de 0,25 mm de espesor (Merck). La misma fue impregnada con ácido metafosfórico al 5%; una vez seca, se procedió a agregar 3 µL de cada muestra (sobrenadantes de cultivo y patrones estándar) sobre la placa. La mezcla de los solventes utilizados para la migración fue la siguiente: isopropanol, piridina, ácido acético y agua en una proporción de 8:8:4:3. El revelado de la placa se realizó con una mezcla reveladora que contenía *p*-anisaldehído al

0,5% en metanol, ácido sulfúrico y ácido acético en una proporción de 9:9:5. Finalmente la placa fue incubada a 120 °C por 15 min.

3.4. Determinación de la presencia de ácidos orgánicos en el sobrenadante de cultivo de la cepa MMB051, por medio de la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Con la finalidad de corroborar la presencia del ácido glucónico y detectar otros ácidos orgánicos presentes en el sobrenadante de cultivo, que pudiesen estar implicados en la solubilización de fosfato tricalcico, se utilizó la técnica de RMN. La espectroscopia de resonancia magnética nuclear es la herramienta más poderosa de que se dispone para la determinación de las estructuras de los compuestos orgánicos. Es un método de análisis no destructivo, que se basa en la absorción de energía en la zona de la radiofrecuencia por parte de los núcleos de algunos átomos, cuando se colocan éstos en un campo magnético intenso y de alta homogeneidad. La técnica de RMN se emplea para estudiar una gran variedad de núcleos incluyendo al ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F y ^{31}P .

Para este experimento se disminuyó la concentración de glucosa de 10 g/L a 6 g/L en el medio NBRIP, ya que en experimentos previos, se determinó que las señales en el espectro de RMN que indicaban la presencia de la glucosa residual interferían con las señales de los ácidos orgánicos derivados de la oxidación de la glucosa. El inóculo (preparado según lo indicado en el paso 3.1) fue agregado a una concentración de 0,2% v/v del medio. El cultivo se incubó a una temperatura de 30°C con agitación constante por 24 horas. Posteriormente el cultivo fue centrifugado a 3000 g por 10 min a 4°C y filtrado con filtros millipore de 0,45 μM , para luego ser liofilizado. El sobrenadante de cultivo liofilizado fue resuspendido en 2mL de agua deuterada para los análisis correspondientes por RMN.

3.5. Cinética de crecimiento, acidificación, consumo de glucosa, y solubilización de fosfato en medio NBRIP.

Con el propósito de evaluar el comportamiento de las cepas en estudio con respecto a la solubilización de fosfatos inorgánicos, se realizaron estudios cinéticos de crecimiento, acidificación, consumo de glucosa y solubilización de fosfatos, para lo cual se procedió de la siguiente manera: los cultivos se realizaron en fiolas de 250 mL que contenían 75 mL de medio NBRIP estéril, pH 6,7 +/- 0,3. Los inóculos (preparados según se describe en el paso 3.1) fueron agregados a una concentración de 0,2% v/v del medio. Cada cepa se cultivó por duplicado y los cultivos fueron incubados a 30°C con agitación constante por 24 horas. Para esta experiencia se realizó un control de acidificación de cada una de las cepas en medio NBRIP sin fosfato añadido; igualmente se siguió la variación de pH en el medio NBRIP sin inocular. El crecimiento a lo largo del experimento fue determinado por titulación en placas de agar LB. La glucosa fue cuantificada por el método enzimático comercial Kit Qualitest (ver anexo 3). El fósforo soluble fue determinado por medio del método de azul de molibdeno (Olsen y Dean, 1965) modificado para las condiciones de trabajo (anexo 4).

El método de azul de molibdeno es un método cuantitativo que permite determinar fósforo soluble y se basa en la formación de un complejo fosfomolibdico entre los iones ortofosfato de la solución y el molibdato ácido que se adiciona. El complejo fosfomolibdico, por acción de agentes reductores, como el cloruro estanoso, produce el colorante azul de molibdeno. La intensidad del color azul es directamente proporcional a la concentración de fósforo soluble presente en la solución.

4. Evaluación de la capacidad solubilizadora de fosfato de las cepas MMB047 y MMB051 sobre distintos sustratos minerales.

Con la finalidad de evaluar la capacidad solubilizadora de las cepas en estudio, con miras a la aplicación de las mismas en procesos de solubilización de fosfato a partir de minerales de bajo tenor y/o minerales altamente concentrados, como es el caso del mineral de hierro y el mineral de roca fosfórica, se procedieron a realizar los experimentos siguientes.

4.1. Solubilización de fosfatos a partir de mineral de hierro en presencia de las cepas MMB047 y MMB051.

Los cultivos se realizaron en fiolas de 250 mL que contenían 50 mL de medio NBRIP estéril, pH 6,7 +/- 0,3 con 5 gramos de mineral de hierro como única fuente de fósforo. Para esta experiencia se trabajó con mineral pulverizado, perteneciente al yacimiento de hierro de Los Barrancos de la región de Guayana. Un segundo experimento se realizó en las condiciones mencionadas anteriormente, pero agregándole al medio 100 ppm de fósforo soluble (KH_2PO_4) con el fin de estimular el crecimiento de estas cepas en presencia del mineral de hierro. Los inóculos (preparados en el paso 3.1) fueron agregados a una concentración inicial de 5 % v/v. Los cultivos fueron mantenidos por 1 mes a una temperatura de 30°C y con agitación constante. Ambos experimentos se realizaron por triplicado. Como controles se utilizaron los medios de cultivo de cada experiencia sin inocular. El porcentaje de fósforo en las muestras de mineral de hierro tratadas, fue determinado al final del período de incubación por medio de la técnica de espectrofotometría de Absorción Atómica (análisis realizado por la empresa CVG-Ferrominera del Orinoco, Edo. Bolívar).

4.2. Cinética de crecimiento, acidificación, consumo de glucosa, y solubilización de fosfato de las cepas MMB047 y MMB051 en medio NBRIP con mineral de roca fosfórica como única fuente de fósforo.

Los cultivos se realizaron en fiolas de 250 mL que contenían 75 mL de medio NBRIP estéril, pH (6,7 ± 0,3) con 0,1g de mineral de roca fosfórica como única fuente de fósforo. Los inóculos (preparados según lo indicado en el paso 3.1) fueron agregados a una concentración de 0,2% v/v. Cada cepa se cultivó por duplicado a una temperatura de 30°C en agitación constante. El crecimiento fue seguido durante 24 horas. Las muestras fueron recolectadas a distintos intervalos de tiempo. Para esta experiencia se realizó un control de acidificación de cada una de las cepas en medio NBRIP sin fosfato añadido; igualmente se siguió la variación de pH en el medio NBRIP con roca fosfórica como única fuente de

fósforo sin inocular. El crecimiento a lo largo del experimento fue cuantificado por titulación en placas de agar LB. La glucosa fue cuantificada por medio de un método enzimático comercial Kit Qualitest (ver anexos 3). El fósforo soluble fue determinado por medio del método de azul de molibdeno (ver anexo 4).

4.3. Determinación de la capacidad solubilizadora de los sobrenadantes condicionados de las cepas MMB047 y MMB051.

Con la finalidad de evaluar la capacidad solubilizadora de los sobrenadantes de cultivo (condicionados), se procedió de la siguiente manera para la preparación de los mismos.

Los cultivos se realizaron en fiolas de 500 mL que contenían 150 mL de medio NBRIP estéril, pH $6,7 \pm 0,3$ sin fuente de fósforo. Los inóculos (preparados según lo indicado en el paso 3.1) fueron agregados a una concentración de 20% v/v del medio. Esto se realizó con la finalidad de obtener altas concentraciones de los ácidos orgánicos (y demás metabolitos) producidos por estas cepas en el sobrenadante de cultivo, disminuyendo así la presencia de iones quelantes como es el caso del calcio presente en el fosfato tricálcico. Estos cultivos fueron incubados a una temperatura de 30°C con agitación constante. La incubación fue detenida al momento en el que el pH llegó a 3 unidades (aproximadamente 12 horas).

Una vez alcanzado este pH, los cultivos fueron centrifugados a 3000 g por 10 min y 4°C. Los sobrenadantes fueron esterilizados por filtración con filtros millipore de 0,45µm. Posteriormente, a un volumen fijo de sobrenadante, se le agregaron cantidades variables (en gramos) de fosfato tricálcico, roca fosfórica o mineral de hierro previamente esterilizados.

Para evaluar el efecto de los sobrenadantes condicionados sobre el mineral de hierro, se agregaron 5 gramos de mineral del yacimiento de Los Barrancos en 50 ml de los sobrenadantes condicionados de las cepas MMB047 y MMB051. Los controles se realizaron con 5 gramos de mineral de hierro en 50 ml de medio NBRIP sin inocular. La incubación se realizó por un mes a 30°C. El porcentaje de fósforo en el mineral así

procesado fue determinado por Espectrofotometría de Absorción Atómica (análisis realizado por la empresa CVG-Ferromineras del Orinoco, Edo. Bolívar).

Para evaluar el efecto de los sobrenadantes condicionados sobre la roca fosfórica, se agregaron a un volumen fijo de sobrenadante condicionado (10 mL), distintas cantidades de roca fosfórica (5 – 10 – 20 – 30 – 40 mg). Con respecto al fosfato tricálcico se agregaron a un volumen fijo de sobrenadante (10 mL) distintas cantidades de fosfato tricálcico (1 – 1,5 – 2 – 4 – 5 – 10 mg). Estas experiencias se realizaron con el fin de determinar la máxima capacidad solubilizadora de estos sobrenadantes condicionados (nivel de saturación). En ambos casos los controles se realizaron con cada una de las cantidades de roca fosfórica y fosfato tricálcico utilizadas en 10 mL de medio NBRIP. La medida del fósforo soluble se realizó a las 24 horas. El fósforo fue determinado por el método de azul de molibdeno (ver anexo 4).

4.4. Determinación del efecto solubilizador de distintos ácidos orgánicos puros sobre el contenido de fósforo en el mineral de hierro.

Con el fin de determinar el efecto solubilizador de distintos ácidos orgánicos puros sobre el contenido de fósforo en el mineral de hierro, se utilizaron soluciones de ácido glucónico, cítrico y acético a una concentración de 100 mM. Además se evaluó el efecto de un ácido inorgánico como el HCL sobre el fósforo presente en el mineral de hierro, a la misma concentración. Esta concentración utilizada para los ácidos orgánicos se encuentra por encima de la concentración producida por bacterias en cultivos batch (Deubel *et al.*, 2000; Maliha *et al.*, 2004). Finalmente se preparó una mezcla de estos ácidos a una concentración final para cada ácido de 100mM, con el fin de observar el efecto conjunto de estos ácidos sobre el fósforo presente en el mineral de hierro.

Para cada experiencia se mezcló un volumen de 10mL de cada una de las soluciones de ácidos incluyendo la mezcla, con 5 gramos de mineral de hierro; estas muestras fueron incubadas a 30 °C. El control contenía 5 gramos de mineral de hierro en 10 mL de agua destilada. El porcentaje de fósforo en la muestra fue determinado por Espectrofotometría de

Absorción Atómica (análisis realizado por la empresa CVG-Ferrominera del Orinoco, Edo. Bolívar).

4.5. Determinación de la capacidad solubilizadora de fosfato del ácido glucónico sobre fosfato tricálcico y roca fosfórica.

Con el propósito de evaluar la capacidad solubilizadora de distintas soluciones de ácido orgánico puro sobre fosfato tricálcico y roca fosfórica, se prepararon varias soluciones de ácido glucónico a distintas concentraciones (250 – 125 – 62,5 – 31,25 – 15,6 mM). A 10 mL de cada solución se le agregaron por separado, 10 mg de fosfato de calcio y 40 mg de roca fosfórica estériles. Los tubos fueron incubados a 30 °C con agitación constante por 12 horas. Esta experiencia se realizó por duplicado. Los controles utilizados fueron: las distintas soluciones de ácido glucónico además de soluciones de roca fosfórica y fosfato tricálcico en agua. El fósforo soluble fue determinado por el método del azul de molibdeno (anexos 4).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1. Ubicación taxonómica de las cepas en estudio.

La ubicación taxonómica de las bacterias se refiere a la división sistemática de microorganismos en grupos relacionados por sus características similares e incluye a la especie como el nivel de división más pequeño y definido. Aunque phylum o división, subphylum, clase, subclase, orden, suborden y superfamilia son grupos taxonómicos (taxones) progresivamente más amplios dentro de los reinos de las plantas superiores y los animales, los taxones que comprenden familia, género y especie son los niveles de clasificación más usados para las bacterias, los protozoos y los hongos. Debido a esto, con la finalidad de identificar adecuadamente a las cepas en estudio, se realizó la caracterización fenotípica y genotípica de las mismas (Sección 2, Materiales y Métodos).

1.1. Estudio micromorfológico y macromorfológico.

A partir de las observaciones de las células al fresco provenientes de cultivos líquidos en medio LB y teñidas con el reactivo de Gram (estudio micromorfológico), se pudo apreciar que las 10 cepas estudiadas son bacilos móviles rectos gram negativos (la movilidad en este caso, es una evidencia indirecta de la presencia de flagelos en dichas células).

Desde el punto de vista macromorfológico, se estudiaron características como tamaño, forma, elevación, superficie, densidad, consistencia y color de las colonias. Las características macromorfológicas que se estudiaron se presentan en la Tabla 6. Los resultados expresados en esta tabla, muestran similitudes entre las cepas en estudio en cuanto a: tamaño, forma consistencia y color. En base a estas similitudes las 10 cepas se dividieron en tres grupos, el primero incluyó las cepas denominadas MMB040, MMB075, MMB087, MMB088 y MMB127; el segundo grupo las cepas MMB066, MMB070, MMB107 y un tercer grupo constituido por la pareja MMB047 y MMB051. Estas

observaciones sugerían que cada uno de estos grupos pudiera estar constituido por cepas bacterianas pertenecientes a un mismo taxon (género o familia).

Tabla 6. Características macromorfológicas de las colonias de las cepas en estudio en agar LB

	MMB040	MMB047	MMB051	MMB066	MMB070	MMB075	MMB087	MMB088	MMB107	MMB127
Tamaño	≤ 1mm	2mm	2mm	≥ 2mm	≥ 2mm	≤ 1mm	≤ 1mm	1mm	2mm	1mm
Forma	C ó P	C	C	C ó I	C ó I	C ó P	C ó P	C ó P	C ó I	C ó P
Elevación	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
Superficie	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
Densidad	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Consistencia	Va S	Va S	Va S	Cr	Cr	Va S	Va S	Va S	Cr	Va S
Color	Bo	A	A	B	B	Bo	Bo	Bo	B	Bo

C: circular; P: puntiforme; I: irregular; B: brillante; E: elevada, O: opaca; S: seca; V: viscosa; Cr: cremosa; A: amarillo; B: blanco; Bo: blanco opaco.

1.2. Pruebas bioquímicas y fisiológicas

Para lograr una ubicación taxonómica preliminar de las cepas en estudio, se realizaron pruebas bioquímicas y fisiológicas (Sección 2.3, Materiales y Métodos); estas pruebas, junto con el estudio micromorfológico y macromorfológico, permitieron ubicar a las cepas en estudio a nivel de grupo o familia, por medio de la comparación con pruebas de cepas de referencia descritas por Koneman *et al.*, (1999).

Los resultados obtenidos en estas pruebas se presentan en la Tabla 7. En el caso de las cepas MMB047, MMB051, MMB066, MMB070, MMB107, el primer aspecto importante que se observa, es la correlación que existe entre las pruebas de fermentación de la glucosa (positiva), citocromo oxidasa (negativa) y reducción de nitrato a nitrito (positiva), ya que se ha reportado, con muy pocas excepciones, que todos los miembros de la familia de las *Enterobacteriaceae* muestran estas características. Estas observaciones preliminares, unidas a las pruebas micromorfológicas y macromorfológicas permiten asegurar que el microorganismo con el que se está trabajando pertenece a este taxon (Koneman *et al.*, 1999).

Con respecto a la prueba de agar hierro triple azúcar (TSI), la misma permite identificar microorganismos capaces de fermentar principalmente la glucosa: una reacción negativa donde no se observe cambio de color ni en la superficie inclinada ni en el fondo del tubo, es suficiente para excluir a este microorganismo de la familia de las *Enterobacteriaceae*. Esto apoya los resultados obtenidos para las cepas MMB047, MMB051, MMB066, MMB070, MMB107, las cuales resultaron positivas para esta prueba. Con respecto a la prueba de Hugh Leifson para este grupo de cepas, la misma resultó positiva tanto para el metabolismo oxidativo, como para el fermentativo, lo que es característico de bacterias anaerobias facultativas, como es el caso de las *Enterobacteriaceae*.

Comparando estos resultados con los obtenidos por medio de los estudios micro y macromorfológicos, se observa una estrecha correspondencia entre los mismos, ya que se ha reportado que las cepas pertenecientes a los géneros ubicados dentro de la familia de las *Enterobacteriaceae* son generalmente bacilos móviles gram negativos cortos, que producen colonias viscosas o secas relativamente grandes, elevadas y con variaciones de color de blanco a crema en agar LB (Koneman *et al.*, 1999).

Para las cepas MMB040, MMB075, MMB088 y MMB127, la prueba de agar triple azúcar hierro fue negativa, lo que indica la falta de producción de ácidos por la incapacidad de estos microorganismos para fermentar los azúcares presentes. Unido a esto, la falta de reacción en los medios de glucosa y lactosa rojo fenol, así como la observación de un mecanismo oxidativo y no fermentativo en el medio Hugh Leifson (medio que sirve para determinar si un microorganismos es capaz de oxidar o fermentar la glucosa) y una reacción negativa en el caldo Rojo Metilo Voges-Proskauer, indican que estas cepas se encuentran dentro del grupo de los bacilos gram negativos no fermentativos (BNF).

Comparando estos resultados con los obtenidos en los estudios micromorfológicos y macromorfológicos, los mismos coinciden con las cepas de referencia pertenecientes a este grupo de bacterias, ya que son bacilos gram negativos móviles no fermentativos, de tamaños variables en algunos casos con colonias de lento desarrollo y muy pequeñas.

Según Koneman (op. cit.) a diferencia de lo que ocurre con las *Enterobacteriaceae*, los bacilos BNF no se pueden clasificar convenientemente en una única familia y la ubicación taxonómica correcta de muchos de ellos permanece sin resolver. En consecuencia, el estudio de los no fermentadores con frecuencia es confuso. Los principales géneros de bacilos gram negativos no fermentadores han sido clasificados dentro de cinco familias (*Alcaligenaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Methylococcaceae*, *Pseudomonadaceae* y *Rhizobiaceae*), otros géneros restantes pertenecientes a este grupo aun no han sido asignados a una familia y se agrupan bajo el título “Microorganismos cuya posición taxonómica es dudosa”.

Tabla 7: Pruebas bioquímicas y fisiológicas realizadas a las cepas en estudio.

Medios/cepas	Control	40	47	51	66	70	75	87	88	107	127
Glucosa Rojo Fenol	Rojo	-					-	-	-		-
Lactosa Rojo Fenol	Rojo	-					-	-	-		-
TSI Taco	Rojo	-					-	-	-		-
Cuña		-					-	-	-		-
Hugh Leifson	Verde claro	F-					F-	F-	F-		F-
								O+			
Citrato Simmons	Verde		-	-				+			
Caldo Nitrato							-	+			
Catalasa								+			
Oxidasa		-	-	-	-	-		-	-	-	-
Caldo Rojo Metilo	Amarillo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer		-					-	-	-		-
Gelatina nutritiva			-	-			-	+		-	

+ : 90% o más de las cepas son positivas; - : 90% o más de las cepas son negativas

+ : de 50%-90% de las cepas positivas; - : de 50%-90% de las cepas negativas

F+: metabolismo fermentativo positivo; F-: metabolismo fermentativo negativo

O+: metabolismo oxidativo positivo

Con respecto a las pruebas complementarias (Citrato de Simmons, Catalasa, Oxidasa, Caldo Rojo Metilo Vogues-Proskauer y Gelatina Nutritiva) realizadas al grupo de las *Enterobacteriaceae*, los resultados coinciden con las cepas tipo reportados en Koneman (op. cit.). Es importante resaltar que en el caso de los resultados obtenidos para la prueba de

Voges-Proskauer (Tabla 7), existen muy pocos géneros dentro de esta familia de las *Enterobacteriaceae* que son positivos para esta prueba, dentro de los cuales resaltan *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Hafnia*, *Pantoea sp.*, y *Serratia sp.*, ya que la mayoría de los géneros pertenecientes a esta familia son positivos para la vía de la fermentación ácido mixta (Rojo Metilo) y negativos para la vía de la fermentación Butilenglicólica (Voges-Proskauer); esta prueba es considerada una prueba clave para identificar estos géneros dentro de la familia de las *Enterobacteriaceae*.

1.3. Identificación molecular de las cepas aisladas.

Para realizar la identificación taxonómica hasta nivel de género de los diferentes aislados, se realizó la técnica de análisis comparativo de la secuencia nucleotídica del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S (Sección 2.4, Materiales y Métodos). Los resultados de esta prueba son presentados en la Tabla 8, en la cual se indican los porcentajes de identidad obtenidos y las especies más cercanas filogenéticamente para cada una de las cepas en estudio. En base a estos resultados, se estableció que de las diez cepas, nueve (ya que el ADNr de la cepa MMB087 no pudo ser amplificado) pertenecen a dos grandes grupos taxonómicos de bacterias: la familia de las *Enterobacteriaceae*, las cuales son clasificadas como bacilos gram negativos anaerobios facultativos (Koneman, 1999) y la familia de las *Pseudomonadaceae*, clasificadas como bacilos gram negativos no fermentativos (Brock, 2004). Estos resultados corroboran los resultados preliminares obtenidos por medio de los estudios micromorfológicos, macromorfológicos y las pruebas bioquímicas y fisiológicas realizadas a estas cepas.

Dentro de los géneros identificados pertenecientes a la familia de las *Enterobacteriaceae* se encuentran las cepas MMB047 y MMB051 pertenecientes al género de *Pantoea*, las cepas MMB066 y MMB070 pertenecientes al género *Serratia* y la MMB107 perteneciente al género *Enterobacter*. Las cepas MMB040, MMB088 y MMB127 pertenecientes al género *Burkholderia*, y la MMB075 perteneciente al género *Ralstonia*, se encuentran dentro de los géneros identificados pertenecientes a la familia de las *Pseudomonadaceae* (Tabla 8).

Tabla 8: Resultados de la técnica de análisis comparativo de la secuencia nucleotídica del gen que codifica el ARN ribosomal 16S realizada a las cepas en estudio.

Cepas	Longitud del fragmento de rRNA 16S secuenciado (pb)	% de Identidad	Especie más cercana filogenéticamente
MMB040	979	98	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>
MMB047	979	98	<i>Pantoea agglomerans</i>
MMB051	987	98	<i>Pantoea agglomerans</i>
MMB066	391	99	<i>Serratia marcescens</i>
MMB070	549	99	<i>Serratia marcescens</i>
MMB075	984	98	<i>Ralstonia pickettii</i>
MMB087	ND		ND
MMB088	980	99	<i>Burkholderia cepacia</i>
MMB107	986	88	<i>Enterobacter sp.</i>
MMB127	982	99	<i>Burkholderia cepacia</i>

Es importante resaltar que en el caso de las cepas identificadas como pertenecientes al género *Pantoea* existe una característica particular que define a este género: la producción de un pigmento de color amarillo que colorea a las colonias que crecen en agar LB. Este pigmento no difunde al medio y permite diferenciar a las colonias de *Pantoea* de las colonias de los demás géneros del grupo de las *Enterobacteriaceae*. Esta característica fue observada en el estudio macromorfológico realizado a las cepas MMB047 y MMB051 identificadas como *Pantoea agglomerans* (especie más cercana filogenéticamente).

Las especies del género *Serratia* son únicas dentro de la familia de las *Enterobacteriaceae* debido a que producen tres enzimas hidrolíticas: lipasa, gelatinasa y DNasa, siendo este género uno de los pocos dentro de esta familia que es positivo para la prueba de gelatina nutritiva. Esta prueba resultó positiva para las cepas MMB066 y MMB070 identificadas como *Serratia marcescens* (especie más cercana filogenéticamente).

Con respecto a la prueba de la oxidasa, en el caso de los bacilos gram negativos no fermentadores, resultó negativa para las cepas identificadas como pertenecientes al género *Burkholderia*. A pesar de que estas cepas son oxidasa positivas, algunas especies de este

género, principalmente *Burkholderia cepacia*, presentan actividad oxidasa débilmente positiva (Koneman, op. cit.), lo que lleva en ocasiones a clasificarlas como cepas bacterianas con actividad oxidasa negativa. Las cepas del género *Ralstonia*, son generalmente oxidasa fuertemente positiva. Estos resultados respaldan la prueba de identificación molecular para estos aislados bacterianos.

En conclusión, tanto los estudios micromorfológicos, macromorfológicos, así como las pruebas bioquímicas y fisiológicas y la identificación molecular realizada a las cepas en estudio, permitieron obtener una identificación taxonómica adecuada, ubicando a las cepas en estudio a nivel de familia y género.

Dentro del grupo de las bacterias no fermentativas, se conocen especies como *B. vietnamiensis*, *B. multivorans*, *B. cepacia* genomovar III, *B. cepacia* genomovar VI, *B. pyrrocinia*, *B. stabilis*, *B. ambifaria*, *B. cepacia* genomovar I por su alto grado de patogenicidad y se han relacionado con pacientes que sufren de fibrosis quística (Coenye *et al.*, 2001). *R. pickettii*, ha sido asociada con numerosas infecciones nosocomiales debido a la contaminación de las soluciones de cuidado de los pacientes en el laboratorio (Estudio Especial del Departamento de Salud de U.S.A). Se ha demostrado que bacterias que pertenecen al género *Ralstonia* (en particular *R. pickettii* y *R. mannitolilytica*) se pueden encontrar en pacientes con fibrosis quística.

También, dentro de la familia de las *Enterobacteraceae*, es bien conocida la alta patogenicidad de la especie de *Serratia marcescens*, reconocida como un patógeno oportunista implicado en infecciones del tracto urinario y respiratorio, bacteremia, conjuntivitis, endocarditis, meningitis y otras (Su *et al.*, 2003).

Por su parte, el género *Enterobacter* incluye once especies de bacterias altamente móviles, que son similares bioquímicamente a *Klebsiella*. Aunque estas bacterias forman parte de la flora del tracto intestinal de humanos, muchas especies causan infecciones oportunistas del tracto urinario así como de otras partes del cuerpo. *E. aerogenes* y *E. cloacae* son dos de estas especies patógenas que no causan diarreas, pero que se encuentran asociadas con infecciones urinarias y respiratorias (Ronald, 2002).

En el caso del género *Pantoea*, la mayoría de sus miembros son clasificados como patógenos de plantas y existen muy pocos reportes sobre su patogenicidad en humanos; en la mayoría de los casos esta patogenicidad está asociada con infecciones accidentales (Baere *et al.*, 2004).

En base a estos resultados y a la capacidad solubilizadora de fosfato tricálcico, analizada en ensayos preliminares en medio NBRIP-BPB y NBRIP agarizado (tesis de maestría Julio Montilla, en curso) se tomó la decisión de continuar nuestros estudios únicamente con las cepas MMB051 y MMB047, con miras a ser utilizadas en procesos biotecnológicos, relacionados con el biomejoramiento de minerales valiosos para la industria así como en la recuperación de elementos (metales y no metales) de interés a partir de sus minerales de bajo tenor o minerales altamente concentrados.

2. Pruebas preliminares de acidificación de las cepas MMB047 y MMB051 en medio NBRIP.

Debido a que la habilidad para solubilizar complejos de fosfatos de calcio ha sido atribuida a la capacidad de las bacterias para disminuir el pH de su entorno (Gyaneshwar *et al.*, 2002), se realizaron pruebas preliminares de acidificación con la finalidad de analizar la capacidad acidificadora de las cepas en estudio en el medio de cultivo NBRIP a lo largo del tiempo (Sección 3.2, Materiales y Métodos).

Como se observa en la Figura 10, las cepas MMB047 y MMB051 acidificaron rápidamente el medio de cultivo en las primeras 5 horas de incubación, en las condiciones a las cuales fueron sometidas, alcanzando valores de pH por debajo de tres unidades al final de la experiencia. Por otra parte, a este pH se observó la solubilización total del fosfato tricálcico presente en el medio de cultivo.

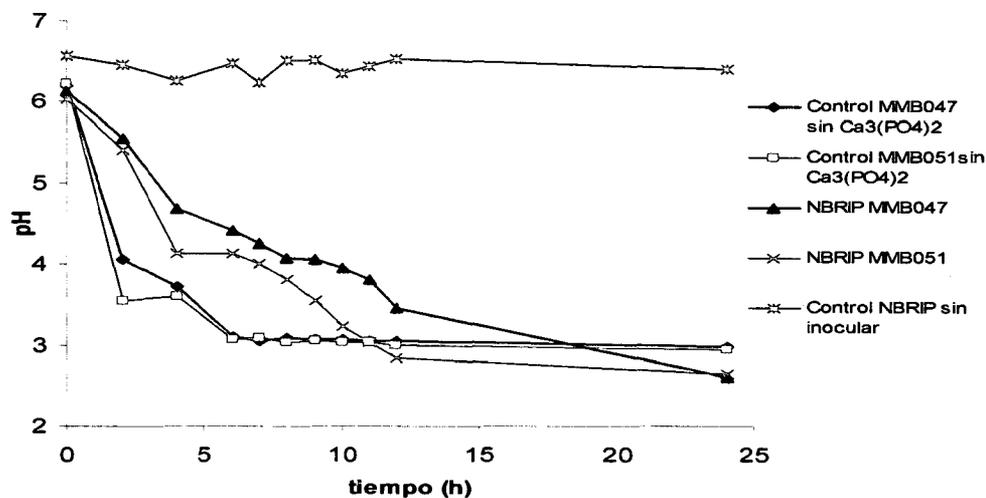


Figura 10: Cinética de acidificación de las cepas MMB047 y MMB051 en medio NBRIP modificado.

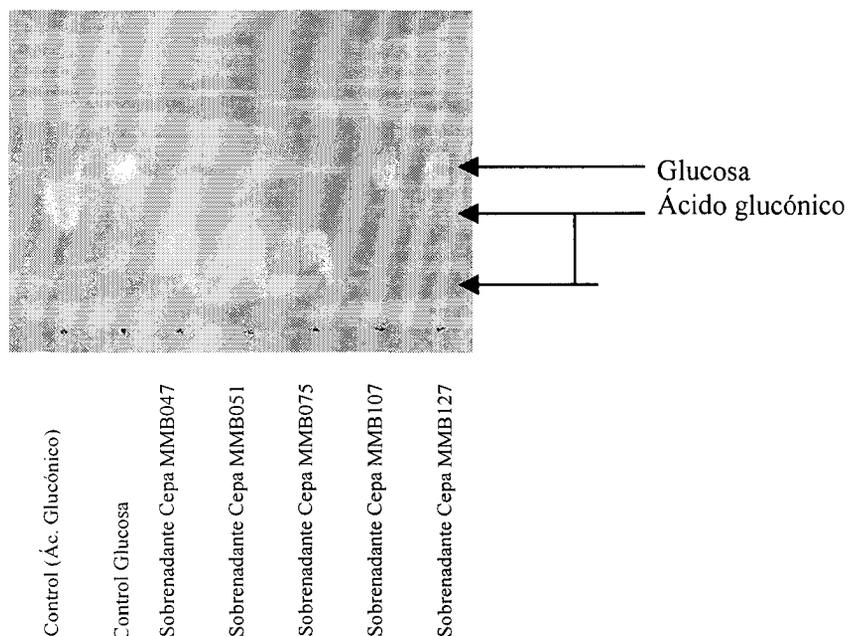
Es importante resaltar, la acelerada disminución de pH que se observa en los controles inoculados con las cepas en estudio, pero que no contienen fosfato tricálcico. Este resultado sugirió que las cepas acidifican el medio en ausencia de crecimiento, ya que no existe una fuente de fósforo en el medio necesaria para el crecimiento de las mismas. Adicional a esto, se observa que los controles inoculados disminuyen el pH del medio en menor tiempo que los cultivos con fosfato tricálcico; esto pudo deberse al efecto tamponador que ejerce el fosfato tricálcico al ser solubilizado.

3.- Determinación de la presencia de ácido glucónico en los sobrenadantes de cultivo por cromatografía en capa fina (TLC).

El principal mecanismo implicado en la solubilización de fosfatos minerales, está representado por la acción de los ácidos orgánicos sintetizados esencialmente por los microorganismos. El ácido glucónico es uno de los principales ácidos orgánicos sintetizado por bacterias con actividad MPS (Liu *et al.*, 1992; Rodríguez *et al.*, 2004). Este ácido es el primer compuesto producido por la vía de oxidación directa de la glucosa u otros azúcares, la cual es una de las principales rutas metabólicas implicadas en la solubilización de fosfato inorgánico (Duine, 1991; Goldstein, 1995). Por tal razón, se procedió a determinar la

presencia de ácido glucónico en los sobrenadantes de cultivo de las cepas MMB047 y MMB051 por medio de la técnica de cromatografía en capa fina, con el fin de identificar si este compuesto estaba presente y, en consecuencia, involucrado en la solubilización de fosfato mediada por estas cepas (Sección 3.3, Materiales y Métodos).

En la Figura 11 se observan los resultados de la cromatografía de capa fina realizada a los sobrenadantes de cultivo de las cepas MMB047 y MMB051 y su comparación con sobrenadantes de otras cepas, MMB075, MMB107 y MMB127, así como los controles de ácido glucónico y glucosa. En esta experiencia se observó que los sobrenadantes de las cepas MMB047 y MMB051 producían una mancha sobre la placa de TLC, con un R_f similar al R_f determinado para la mancha correspondiente al control de ácido glucónico puro. Esto indicó que el ácido glucónico está relacionado con la acidificación del medio y que, posiblemente, participa en la solubilización de fosfato tricálcico. Además, la presencia de ácido glucónico y la identidad de estas dos cepas (*Pantoea agglomerans*) permitió sugerir que estas bacterias presentaban la vía de oxidación directa de la glucosa y que la misma podría estar implicada en la solubilización de fosfatos inorgánicos (Hong-Joo *et al.*, 2006).



R_f Glucosa = 0,5 ; R_f ácido Glucónico = 0,32; R_f de las soluciones = 0,31

Figura 11: Determinación cualitativa de la presencia de ácido glucónico en los sobrenadantes de cultivo de las cepas MMB051 y MMB047 por TLC

Es importante señalar que las manchas sobre la placa, al momento de ser reveladas, presentaron un color azul claro tanto en el caso del control de ácido glucónico como de las muestras de los sobrenadantes de cultivo. Según Pujol y Kado (2000) se trata de un color característico que produce el ácido glucónico al reaccionar con la mezcla reveladora utilizada, resultado que ayuda a corroborar la presencia de este ácido en los sobrenadantes de cultivo. Adicionalmente la cepa MMB075, presentó esta misma mancha sobre la placa, con un Rf similar, lo que permitió suponer que dicha cepa también presentaba esta vía de oxidación directa de la glucosa. Este no fue el caso para las cepas MMB107 y MMB127. En este caso se observa la mancha correspondiente a la glucosa, lo cual indica que esta no fue transformada o que muy poca fue transformada en ácido glucónico.

4. Determinación de los ácidos orgánicos implicados en la solubilización de fosfato tricálcico en el sobrenadante de la cepa MMB051, por medio de la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Debido a que existen reportes de que la actividad MPS está relacionada con la presencia de muchos tipos de ácidos orgánicos, tales como oxálico, cítrico, malónico, láctico, succínico, málico, acético, fumárico, adípico, 2-ceto-glucónico y glucónico (Rodríguez y Fraga, 1999), se utilizó la técnica de RMN, con la finalidad de corroborar la presencia del ácido glucónico y detectar otros ácidos orgánicos presentes en el sobrenadante de cultivo de la cepa MMB051 que puedan estar involucrados en la solubilización de fosfato tricálcico. Para ello se realizó el espectro protónico (${}^1\text{H-NMR}$) y de carbono 13 (${}^{13}\text{C-NMR}$), así como el experimento bidimensional HMBC (del inglés Heteronuclear Multiple Bond Correlations) (Sección 3.4, Materiales y Métodos).

En la Tabla 9 se muestran los valores teóricos de las diferentes señales tanto de los átomos de hidrógeno en el espectro ${}^1\text{H-NMR}$, como de los átomos de carbono en el espectro de ${}^{13}\text{C-NMR}$ de los grupos alcohol, metilo, metileno, metino y carbonilo del ácido, presentes en diferentes tipos de ácidos orgánicos que han sido identificados en bacterias con fenotipo MPS⁺. Estos valores fueron obtenidos con el programa Chem Draw Ultra 9.0 (2005) que

permite hacer el cálculo teórico del desplazamiento químico de las señales de los grupos de los compuestos estudiados en base a su estructura.

Tabla 9: Valores teóricos de las señales de los átomos de carbono e hidrógenos presentes en distintos tipos de ácidos orgánicos.

Grupos funcionales Ácidos Orgánicos	Alcohol (OH)	Metilo (CH ₃)		Metileno (CH ₂)		Metino (CH)		Carbonilo (C=O) del carboxílico
	H ¹	H ¹	C ¹³	H ¹	C ¹³	H ¹	C ¹³	C ¹³
Acético	----	2,08	22,9	----	----	----	----	176,8
Oxálico	----	----	----	----	----	----	----	2(160,8)
Malónico	----	----	----	2,40	45,2	----	----	2(171,6)
Succínico	----	----	----	2(2,50)	2(31,4)	----	----	2(177,3)
Fumárico	----	----	----	----	----	2(7,03)	2(134,2)	2(170,6)
Láctico	4,14	1,34	18,4	----	----	4,27	67,7	173,1
Cítrico	----	----	----	2(2,61)	2(44,3)	----	----	2(177,3);175,3
Adípico	----	----	----	2(1,56) 2(2,23)	2(24,1) 2(35,8)	----	----	2(177,3)
Málico	4,14	----	----	2,53	39,9	4,42	69,5	173,1; 177,3

H¹: señales de los hidrógenos en el espectro de RMNH¹; C¹³: señales de los carbonos en el espectro de RMNC¹³

Comparando estos valores (de los átomos de hidrógeno) con los valores de las señales obtenidas en el espectro de RMNH¹ del sobrenadante de cultivo de la cepa MMB051 (Figura 12), fue posible descartar la presencia de los ácidos orgánicos tales como el acético, malónico, succínico, fumárico, láctico, cítrico, adípico y málico ya que estos ácidos presentan señales de los grupos CH₃, CH₂, CH, sobre el espectro protónico en la región comprendida entre 1.00 ppm y 3.00 ppm, las cuales no se observan sobre el espectro.

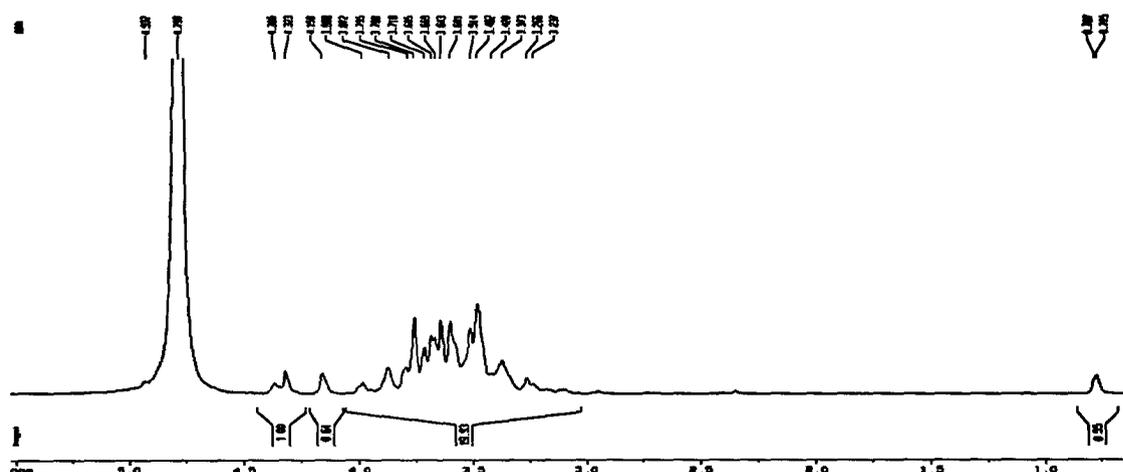


Figura 12: Espectro RMNH¹ del sobrenadante de cultivo de la cepa MMB051.

En el caso del ácido glucónico, los átomos de hidrógeno de este compuesto presentan un rango de señales que van desde 3.37 ppm hasta 4.81 ppm (ver Figura 13). Estas señales fueron claramente observadas sobre el espectro protónico del sobrenadante de la cepa MMB051 (Figura 12). Algunas señales de este compuesto se encuentran solapadas por la intensa señal correspondiente al agua (4,790 ppm) solvente utilizado para diluir las muestras (agua deuterada).

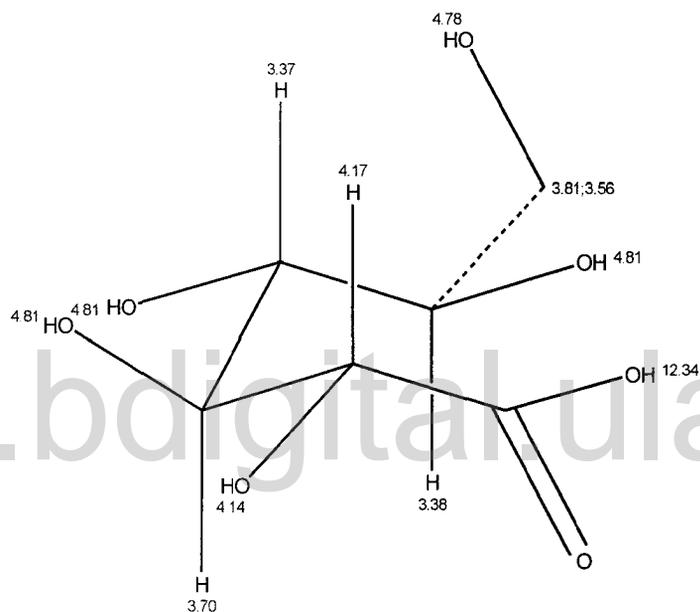


Figura 13: Estructura del ácido glucónico indicando los valores teóricos de aparición de cada una de la señales de los hidrógenos sobre el espectro RMNH^I.

En la Figura 14 se presenta el espectro de carbono 13 realizado al sobrenadante de la cepa MMB051. Por comparación con los valores teóricos presentados en la Tabla 11, fue posible descartar las señales de los átomos de carbono de los grupos metilo, metileno y metino, de los ácidos acético, malónico, succínico, fumárico, cítrico, adípico y málico, lo que confirmó nuevamente la ausencia de estos ácidos en el sobrenadante de cultivo. Con respecto a las señales de los átomos de carbono de los grupos carbonilos pertenecientes a los ácidos carboxílicos, se evidenció, la ausencia de señales cerca de 160 ppm sobre el espectro, lo que permitió descartar la presencia del ácido oxálico en el sobrenadante de cultivo.

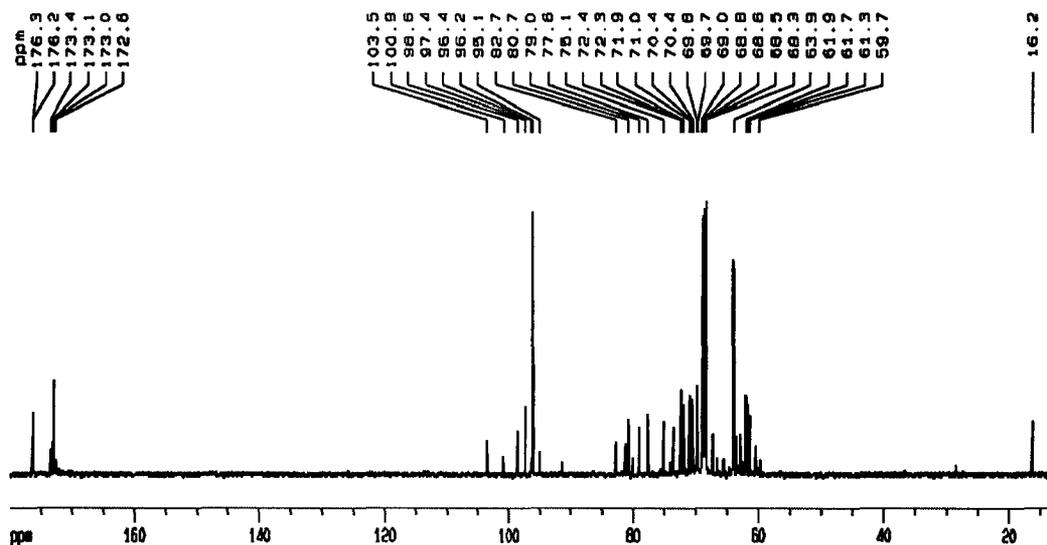


Figura 14: Espectro de RMNC¹³ del sobrenadante de cultivo de la cepa MMB051.

En el caso del ácido glucónico, el carbono del carbonilo ácido debe presentar una señal en 173.1 ppm sobre el espectro de RMNC¹³ (Figura 15). Esta señal fue observada claramente sobre el espectro de RMNC¹³ del sobrenadante de la cepa MMB051 (Figura 14).

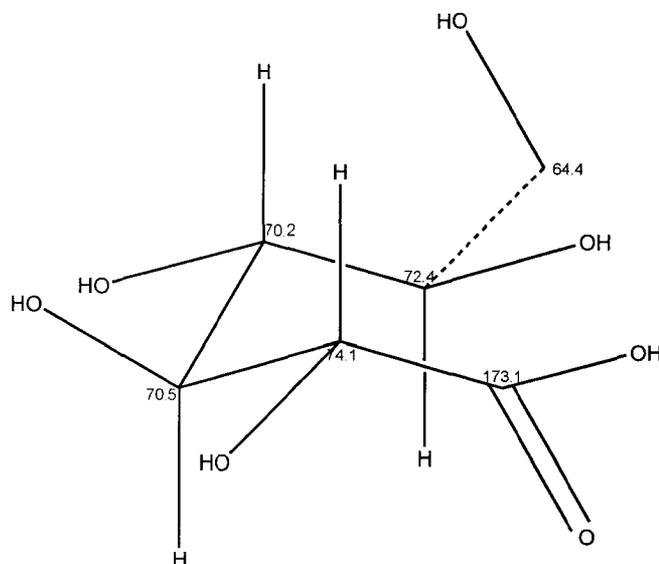


Figura 15: Estructura del ácido glucónico indicando los valores teóricos de aparición de cada una de la señales de los átomos de carbono sobre el espectro RMNC¹³.

El experimento bidimensional HMBC (Figura 16) nos permitió correlacionar las señales del espectro de RMNC^{13} con la señales del espectro RMNH^1 observando el acoplamiento de los átomos de carbono a 1, 2 y hasta 3 enlaces con los átomos de hidrógeno. Esta técnica diferencia entre acoplamientos fuertes (1 enlace), acoplamientos intermedios (2 enlaces) y acoplamientos débiles (3 enlaces) (Silverstein *et al.*, 1991).

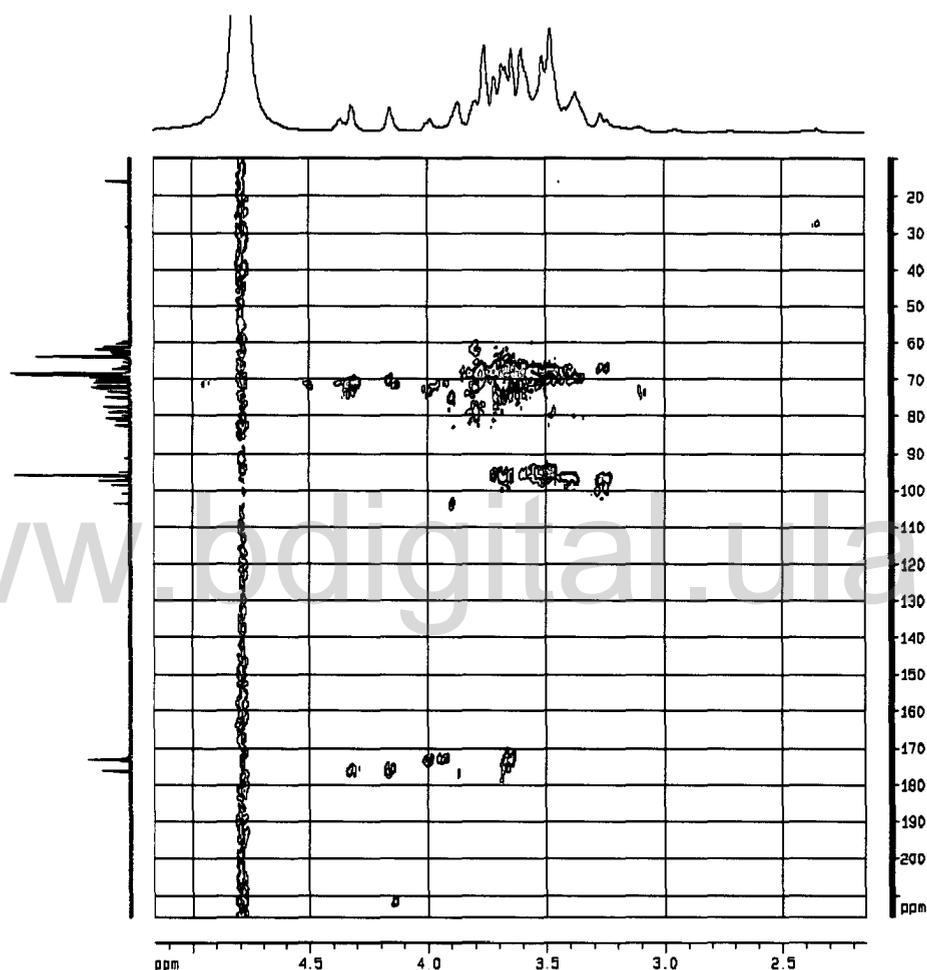


Figura 16: Espectro experimento bidimensional HMBC del sobrenadante de la cepa MMB051.

Por medio de esta técnica bidimensional, se asignaron las señales de los carbonilos ácidos restantes presentes en el espectro de RMNC^{13} . Dos de las señales fueron asignadas a dos lactonas que se encuentran en equilibrio con el ácido glucónico en solución (ver Figura 17):

una lactona de 5 miembros (176,2 ppm) y una de 6 miembros (173,0). Esta última es el primer producto generado por la reacción catalítica de la GDHm sobre la glucosa que posteriormente, por medio de su hidrólisis, genera ácido glucónico (Elias *et al.*, 2000). Las demás señales fueron asignadas a ácidos provenientes de la oxidación directa de la glucosa pero que no pudieron ser identificados debido a su similitud en esta mezcla compleja.

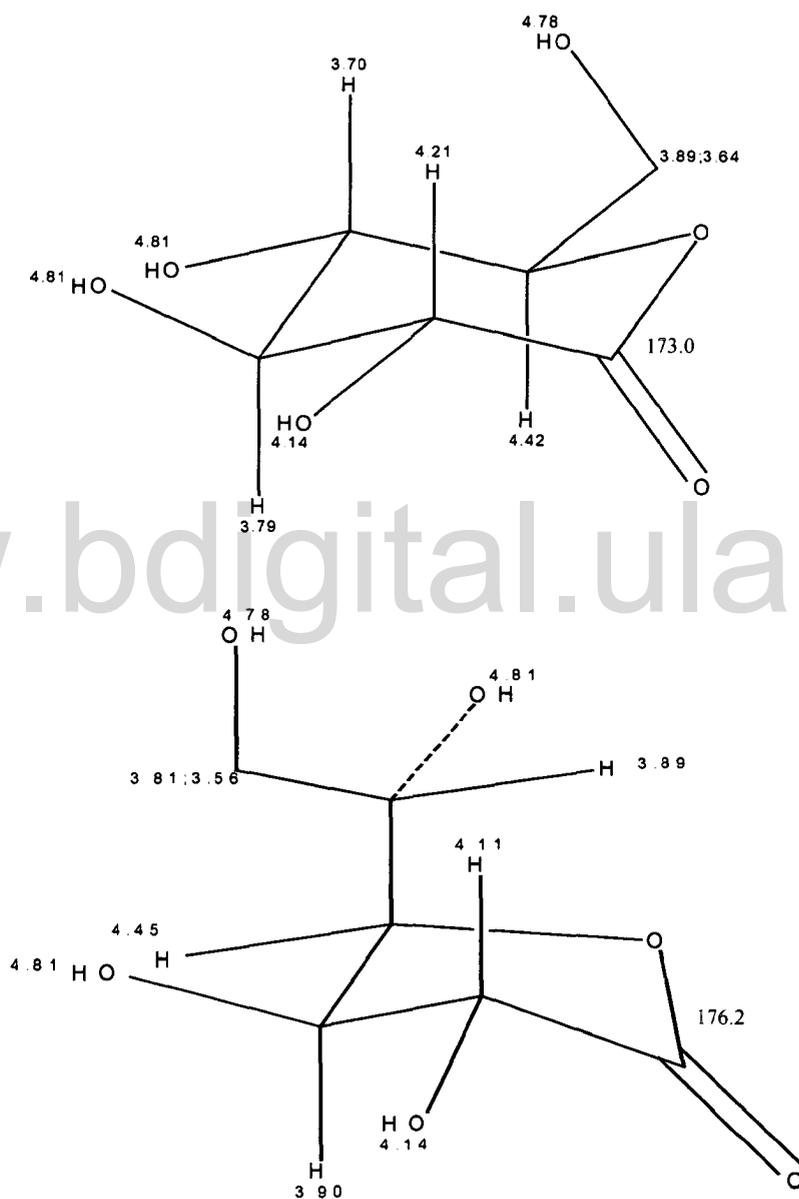


Figura 17: Estructura de las lactonas de 5 y 6 miembros indicando valores teóricos de aparición de cada una de las señales de los átomos de hidrógeno sobre el espectro RMN¹H (azul) y las señales de los átomos de carbono carbonilo sobre el espectro de RMN¹³C (rojo).

Con respecto a estos ácidos no identificados, como se observa en la Figura 16 y en la Figura 14, existe una región sobre el espectro de RMNC¹³ entre 90 ppm y 105 ppm que pertenece a la zona de aparición de los carbonos anoméricos (carbonos unidos a dos oxígenos) (Pretsch T., *at al.*, 1980). El carbono número 1 de la glucosa es un carbono anomérico y es el carbono sobre el cual ocurre la oxidación para formar el ácido glucónico. Al realizar una ampliación de las señales de esta región y de la región de aparición de los carbonilos (entre 170 y 180 ppm) sobre el espectro del HMBC, se logró determinar que existían hidrógenos acoplados a los carbonos anoméricos que estaban igualmente acoplados a los carbonilos ácidos de los ácidos carboxílicos. Esto indicó que habían ácidos en el sobrenadante de cultivo que tenían un carbono anomérico dentro de su estructura. Este resultado permitió sugerir que la oxidación de la glucosa en algunos casos, no ocurría en el carbono anomérico para formar ácido glucónico, sino que podía ocurrir en otro carbono de la glucosa, dando como resultado un ácido distinto al ácido glucónico con la presencia de un carbono anomérico en su estructura.

Según los resultados obtenidos por medio de esta técnica, podemos afirmar que los ácidos orgánicos presentes en el sobrenadante de cultivo, derivan directamente de la oxidación de la glucosa, siendo el ácido glucónico el principal ácido identificado. Esta técnica no permitió descartar la presencia del ácido 2-cetoglucónico, solo sugerir que probablemente no está presente en el sobrenadante de cultivo de esta cepa, esto debido a la complejidad de la mezcla. En base a este resultado se pudo indicar que la vía de oxidación directa de la glucosa es la vía principalmente utilizada por la cepa MMB051 para la solubilización de fosfato tricálcico.

5. Cinética de crecimiento, acidificación, consumo de glucosa, y solubilización de fosfato de las cepas MMB047 y MMB051 en medio NBRIP.

La glucosa es el sustrato principal utilizado por la vía de oxidación directa de la glucosa para la producción de ácido glucónico y la posterior acidificación del medio extracelular, dando como resultado la solubilización de fosfato tricálcico (Liu *et al.*, 1992; Goldstein *et*

al., 1993). Con el propósito de entender y evaluar el comportamiento de las cepas en estudio con respecto a la solubilización de fosfatos tricálcico, se realizaron estudios cinéticos de crecimiento, acidificación, consumo de glucosa y solubilización de fosfatos en medio NBRIP de las cepas MMB047 y MMB051 (Sección 3.5, Materiales y Métodos).

En la Figura 18 se presentan los resultados de las cinéticas de crecimiento y acidificación de la cepa MMB051.

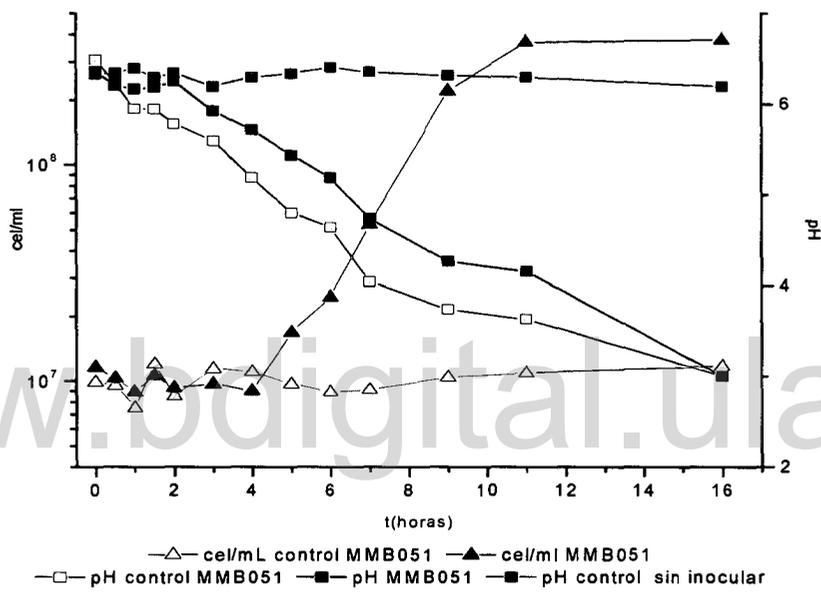


Figura 18: Crecimiento y acidificación en cultivos de la cepa MMB051 en medio NBRIP (cada valor representa la media de dos experiencias)

Los resultados muestran que esta cepa presentó una alta capacidad acidificadora del medio, observándose una disminución de más de tres unidades de pH en 16 horas de cultivo. Este resultado se observa tanto en el experimento control (sin fuente de fósforo), como en el cultivo de la cepa MMB051 en presencia de fósforo, alcanzándose un valor final de pH igual a tres unidades. Un aspecto importante de resaltar es la evidencia, nuevamente, de que la acidificación puede ocurrir en ausencia de crecimiento. Este comportamiento fue

observado tanto en el control inoculado (que no contiene fuente de fósforo) como en los cultivos en presencia de fósforo en las primeras cuatro horas de la experiencia.

Comparando los resultados de la acidificación obtenidos en esta experiencia con respecto a los obtenidos en las pruebas preliminares de acidificación, se observó que la acidificación ocurrió más rápidamente en las pruebas preliminares; esto se debió a diferencias en la concentración del inóculo: 5% en las pruebas preliminares y 0,2% en esta experiencia.

En cuanto a la acidificación del medio de cultivo causada por la cepa MMB051, este resultado es importante ya que como se sabe, la habilidad para solubilizar complejos de fosfatos de calcio ha sido atribuida a la capacidad de las bacterias con actividad MPS para reducir el pH del medio, por medio de la producción de ácidos orgánicos o protones. Los ácidos orgánicos excretados pueden disolver directamente el fosfato mineral como resultado del intercambio aniónico del fosfato por el anión del ácido, quelando los iones de Ca^{+2} , e incluso iones de Fe^{+3} , Fe^{+2} y Al^{+3} asociados con los fosfatos (Gyaneshwar, *et al.*, 2002).

En un trabajo reciente realizado por Ta-Fa *et al.*, (2006) en el cual compararon la capacidad solubilizadora de una solución de ácido glucónico (16,3 mM pH 3), con una solución de agua desionizada a pH 3, relacionando las concentraciones teóricas de los protones (en ambas soluciones) con la capacidad para solubilizar fosfato tricálcico, se determinó que la concentración de protones en la solución es un factor importante para la solubilización de fósforo a partir de fosfatos de calcio poco solubles.

De igual forma, experimentos realizados por Maliha, *et al.*, (2004), en los cuales analizaron la capacidad acidificadora de distintas cepas bacterianas con actividad MPS aisladas de la rizósfera de plantas de arroz, permitieron concluir que la mejor cepa solubilizadora de fosfato fue la que causó la mayor disminución del pH del medio de cultivo (hasta valores de tres y produjo una disminución de más de 3 unidades de pH en 24 horas de incubación). Todos estos resultados resaltan la importancia de la acidificación como uno de los principales mecanismos implicados en la solubilización de fosfatos de calcio poco solubles.

En la Figura 19 se presentan las cinéticas de consumo de glucosa y de aparición de fósforo soluble en cultivos de la cepa MMB051. Como se puede observar, el consumo de glucosa comienza inmediatamente después de inoculado el medio, tanto en los cultivos en presencia de fósforo como en el control inoculado sin fuente de fósforo. Además, se puede observar que el mayor consumo de glucosa ocurre en las primeras cinco horas de cultivo; a partir de las siete horas, se detiene el consumo de glucosa y comienza a registrarse la aparición de fósforo soluble en los sobrenadantes. Este fósforo soluble alcanza un valor final de 80 ppm al cabo de 16 horas.

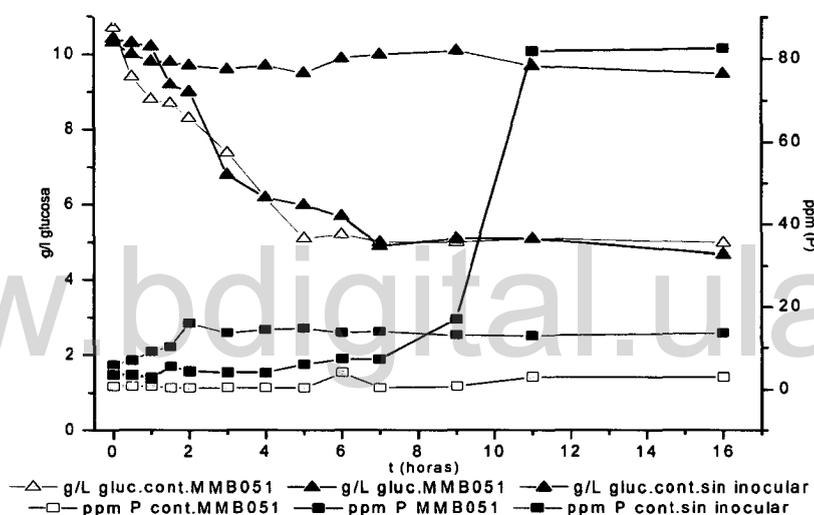


Figura 19: Consumo de glucosa y solubilización de fósforo en cultivos de la cepa MMB051 en medio NBRIP.
(Cada valor representa la media de dos experiencias)

Como se puede observar en esta figura, aproximadamente a las 7 horas de cultivo, se detiene el consumo de glucosa, quedando una concentración de glucosa residual de 4 g/L. Comparando este resultado con los resultados obtenidos en cuanto a la disminución de pH (Figura 18), es posible indicar que el consumo de glucosa se detiene a valores de pH cercanos a 4 unidades. Este resultado sugiere que a este pH la glucosa deshidrogenasa

probablemente se inactiva, resultado que ya ha sido reportado para enzimas que catalizan esta reacción (Mischak *et al.*, 1985).

Con respecto al control sin inocular, se observa una pequeña solubilización de fosfato (15 ppm) en las dos primeras horas de incubación, la cual se mantiene estable hasta el final del experimento. La misma pudo deberse a la presencia de sales extractantes en el medio de cultivo, como el cloruro de potasio (KCl); estas sales en solución se disocian formando iones que sirven como agentes acomplejantes, los cuales representan uno de los tres mecanismos básicos implicados en la solubilización de fósforo mineral (Coyne, 2000). El efecto solubilizador de algunas de estas sales, sobre el fosfato tricálcico a 30°C, ya ha sido reportado (Johri *et al.*, 1999).

Comparando los resultados obtenidos en cultivos de la cepa MMB051 en presencia de fósforo, con el control inoculado con esta cepa en ausencia de fósforo, tanto para la acidificación del medio como para el crecimiento y consumo de glucosa, podemos indicar que la mayor parte de la glucosa en el medio de cultivo es metabolizada en las primeras 7 horas, probablemente por la vía de oxidación directa de la glucosa, para producir ácido glucónico principalmente, provocando así la acidificación del medio. Esto permite sugerir que muy poca glucosa es metabolizada para ser utilizada en el crecimiento bacteriano.

A las 9 horas, cuando el crecimiento bacteriano entra en su fase estacionaria temprana (Figura 18), se observa un aumento significativo en la concentración de fósforo soluble en el medio. Este resultado era de esperarse, ya que en esta etapa el consumo de fósforo por las células bacterianas disminuye, lo cual deriva en la acumulación del mismo en el sobrenadante de cultivo.

Con respecto al rendimiento porcentual calculado en base a la concentración final de fósforo soluble presente en el sobrenadante de cultivo, podemos decir que al final del crecimiento se obtuvo un 40% de rendimiento. Esto se calculó relacionando la cantidad de fósforo soluble obtenido (80 ppm) entre la cantidad de fósforo agregado en forma de fosfato tricálcico (200 ppm) por 100. Este resultado indicó que un alto porcentaje de

fósforo (aproximadamente 60%) fue inmovilizado o absorbido por esta cepa, ya que se observó en los sobrenadantes de cultivo la solubilización total del fosfato tricálcico insoluble (desaparición del precipitado).

Al comparar los resultados obtenidos en relación a la cantidad de fósforo solubilizado por la cepa MMB051, con los resultados obtenidos por Nautiyal (1999), se puede afirmar que esta cepa presenta una alta capacidad solubilizadora de fosfato (80 ppm de fósforo en 11 horas de cultivo) con respecto a la capacidad solubilizadora de fosfato de una especie de *Pseudomonas sp.*, la cual solubilizó 90 ppm de fósforo en 3 días de incubación en medio NBRIP en condiciones similares. Vale la pena destacar que el medio NBRIP utilizado por nosotros fue modificado de 5 g/L a 1 g/L de fosfato tricálcico, lo que indica que la cepa MMB051 presenta un mayor rendimiento porcentual en este medio que la cepa de *Pseudomonas sp.*, estudiada por Nautiyal (op. cit). Esto sugiere que, en presencia de una mayor cantidad de fosfato tricálcico, es posible obtener una mayor cantidad de fósforo soluble en el sobrenadante de cultivo de esta cepa bajo las condiciones estudiadas.

Yong-Hak *et al.*, (2005) cultivaron una cepa de *Burkholderia glathei* previamente seleccionada a partir de seis cepas aisladas de la rizósfera de cultivos de frijoles, la cual presentó un mejor rendimiento en cuanto a la solubilización de fosfato. Esta cepa fue cultivada en medio NBRIP en condiciones similares a las utilizadas por nosotros. La misma solubilizó aproximadamente 50 ppm de fósforo en 24 horas de cultivo disminuyendo en un poco más de dos unidades el pH del medio. Estos resultados indican que nuestra cepa presenta una mayor capacidad acidificadora del medio de cultivo, así como una mayor capacidad solubilizadora de fósforo tricálcico en medio NBRIP en menos tiempo.

Los resultados de la cinética de crecimiento, pH, consumo de glucosa y solubilización de fosfato de la cepa MMB047, se presentan en las Figuras 20 y 21. Estos resultados sugieren un comportamiento similar de esta cepa en comparación con la cepa MMB051.

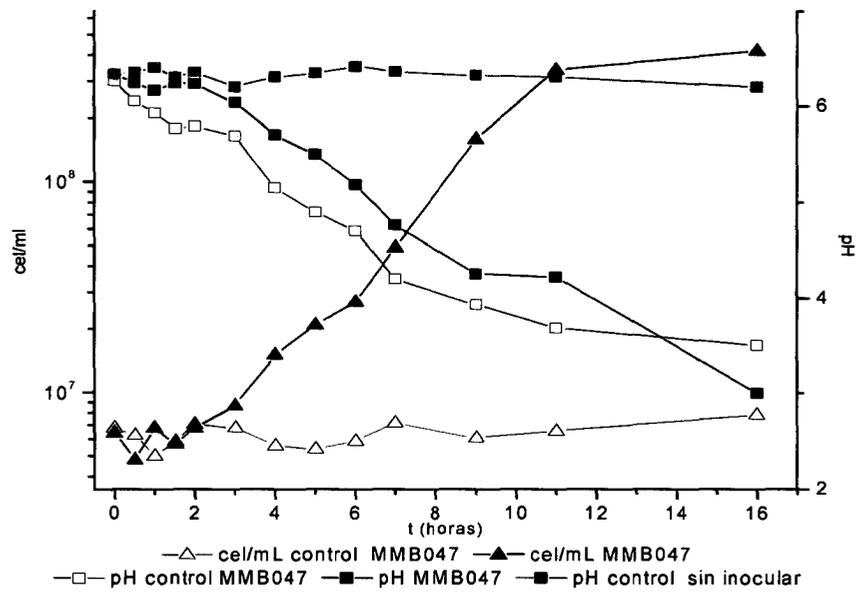


Figura 20: Crecimiento y acidificación en cultivos de la cepa MMB047 en medio NBRIP (Cada valor representa la media de dos experiencias)

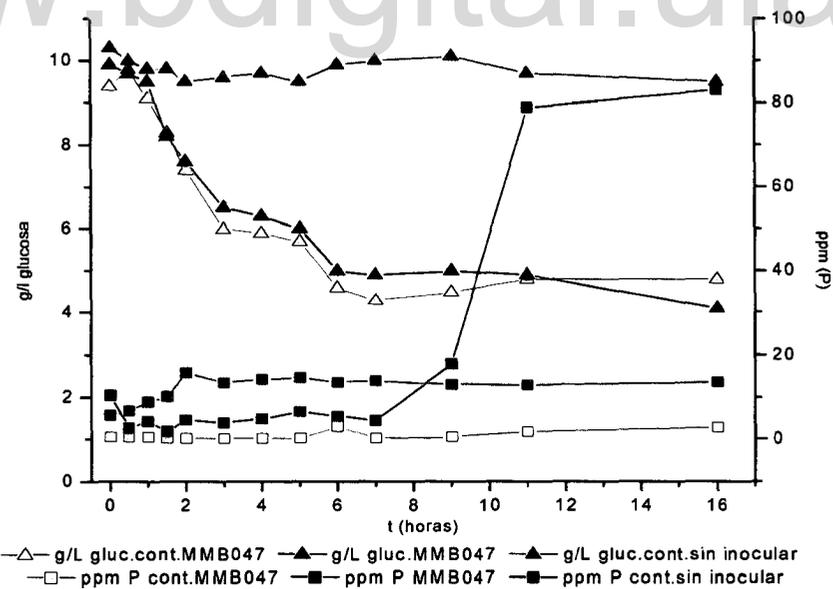


Figura 21: Consumo de glucosa y solubilización de fósforo en cultivos de la cepa MMB047 en medio NBRIP (Cada valor representa la media de dos experiencias)

El rendimiento porcentual calculado en base a la concentración final de fósforo soluble presente en el sobrenadante de cultivo fue de aproximadamente 40 %, similar al presentado por la cepa MMB051. De la misma manera, se observó igualmente una variación lineal de pH similar a la observada para la cepa MMB051.

A diferencia de la cepa MMB051, la cepa MMB047 presenta una fase lag mucho mas corta (2 horas) en comparación con la fase lag presentada por la cepa MMB051 (la cual es de 4 horas) y una fase de crecimiento mucho más lenta que la cepa MMB051. Estas diferencias indican que aunque estas cepas han sido identificadas como pertenecientes a un mismo género bacteriano y ambas han sido relacionadas con una misma especie, las mismas presentan características fenotípicas y fisiológicas distintas en cuanto al caracter MPS⁺ se refiere.

Es importante resaltar que a pesar de que las tasas de crecimiento de estas dos cepas MMB051 y MMB047 son diferentes, las tasas de acidificación y de solubilización son muy parecidas: esto puede deberse a que como ya se había determinado para ambas cepas, la acidificación es independiente o puede ocurrir en ausencia de crecimiento.

Del análisis de todos estos datos, es posible inferir nuevamente que estas cepas presentan la vía de oxidación directa de la glucosa: en efecto, el consumo inicial y la oxidación directa de glucosa derivan en la rápida acidificación del medio por la producción de ácido glucónico principalmente y la posterior solubilización de fosfato. Estos resultados ya han sido reportados para algunas especies del género *Pantoea* (Liu *et al.*, 1992; Pujol y Kado, 2000).

Adicionalmente, en un trabajo realizado por Hong-Joo *et al.*, (2006) en el cual utilizaron con una cepa de *Pantoea agglomerans* (previamente aislada de la rizósfera de cultivos de soya y con una alta capacidad solubilizadora de fosfato tricálcico) se pudo determinar que la capacidad solubilizadora pudo ser mejorada 4,6 veces variando las condiciones del cultivo en cuanto a la concentración de glucosa (de 1 g/L a 3 g/L), la fuente de nitrógeno (NH₄NO₃ por (NH₄)₂SO₄, concentración de fosfato tricálcico inicial (5g/L a 20g/L),

concentración de sales de $MgSO_4$ y $CaCl_2$ y el pH de 7,5. Este resultado es importante porque permite disponer de un medio químicamente simple para optimizar la solubilización de fosfato tricálcico de cepas de *Pantoea agglomerans*. Por otra parte, en base a los resultados obtenidos a lo largo del trabajo, los autores determinaron que esta cepa era ácido-alkalina tolerante.

En este sentido, nuestras cepas MMB051 y MMB047 crecieron y solubilizaron fosfato en un rango de pH que varió de 6,5 hasta 3,0. Estos resultados indicaron no solo que nuestras cepas son ácido resistentes, sino que la actividad solubilizadora de fosfato se mantiene en un amplio rango de pH. En consecuencia, las cepas de *Pantoea agglomerans* aisladas de la rizósfera de cultivos y de regiones del suelo (como es nuestro caso) pueden ser utilizadas como fuertes solubilizadoras de fosfatos bajo diferentes condiciones medioambientales.

6. Aplicación biotecnológica de las cepas MMB047 y MMB051.

Con el fin de aprovechar el gran potencial de las cepas en estudio en procesos biotecnológicos, relacionados con su capacidad de acidificación y producción de ácidos orgánicos, se procedió a evaluar el efecto de estas cepas sobre dos sustratos minerales distintos de importancia para la industria nacional en cuanto a su composición química y mineralógica (mineral de hierro y roca fosfórica).

6.1. Bioprocesamiento del mineral de hierro.

La explotación del mineral de hierro que se concentra en el área de Ciudad Piar (Estado Bolívar) se ha paralizado en los últimos años debido a la presencia de altos niveles de fósforo en el mineral ($\geq 0,16\%$). Estos tenores de fósforo están muy por encima del tenor exigido por el mercado ($\leq 0,06\%$). Estos altos niveles de fósforo son los causantes del fenómeno llamado “fragilidad del acero” el cual hace que este mineral no sea apto para su negociación en el mercado y para su uso en procesos de siderurgia. Las técnicas tradicionales de tratamiento para reducir los niveles de fósforo, hasta el momento, se han mostrado poco eficientes, además de que son altamente costosas y generan un gran impacto

ambiental. Por tal razón, con la finalidad de determinar si las cepas en estudio solubilizan el fósforo presente en este mineral, de tal forma de poder disminuir este tenor hasta obtener valores aptos para la industria, se procedió a realizar cultivos de las cepas en estudio en medio NBRIP en presencia de 5 gramos de mineral de hierro como única fuente de fósforo; en algunos se agregó 100 ppm de fósforo soluble (KH_2PO_4) para estimular el crecimiento (Sección 4.1, Materiales y Métodos).

Para este estudio utilizamos mineral de hierro proveniente del yacimiento Los Barrancos ubicado en el área de Ciudad Piar (Estado Bolívar). Este mineral (según informe del CETEC, realizado en Brasil 2003 sobre la caracterización de las costras limoníticas del yacimiento de Los Barrancos) está constituido esencialmente por goetita/limonita y hematita. También está presente magnetita en proporciones menores. A nivel de trazas se encuentra también cuarzo, carbonato, gibbsita y mica. No están presentes minerales fosfatados como la apatita.

La goetita/limonita se presenta principalmente como producto de alteraciones de la hematita, siendo la goetita caracterizada mineralógicamente por granos negros y macizos. La limonita se caracteriza mineralógicamente por agregados terrosos y amarillos, ambas de origen sedimentario. La goetita es un hidróxido de hierro cuya composición química es $[\text{FeO}(\text{OH})]$ y la limonita es un hidróxido de hierro resultante de la frecuente asociación hidratada de la goetita cuya composición química es $[\text{FeO}(\text{OH})n\text{H}_2\text{O}]$. La hematita es un óxido de hierro (óxido férrico) y se encuentra en los tres tipos de rocas: ígneas, metamórficas y sedimentarias; su composición química es (Fe_2O_3) .

En cuanto al porcentaje de ocurrencia para algunos elementos en el mineral de hierro del yacimiento de Los Barrancos, se conoce que los tenores de Hierro (Fe) varían entre 61 y 67 % lo que permite clasificar a este mineral como de alto tenor, los óxidos de aluminio (Al_2O_3) se encuentran entre 0,4 y 1,5% y los óxidos de silicio (SiO_2) entre 0,2 y 0,9 %. También es posible encontrar manganeso en menor proporción.

En la Tabla 10 se muestran los resultados de los análisis químicos obtenidos por medio de la técnica de espectrofotometría de Absorción Atómica para las muestras de mineral de hierro, luego de ser tratadas con las cepas MMB047 y MMB051 en cultivo.

Tabla 10: Análisis químico realizados a las muestras de mineral de hierro.

Promedio % Muestra tratada	Fe total	SiO ₂	Al ₂ O ₃	Mn	P
MMB051 – P	64,67	0,31	0,69	0,011	0,157
MMB047 – P	64,74	0,32	0,68	0,012	0,156
Control – P	64,74	0,32	0,71	0,012	0,156
MMB051 + P	64,80	0,33	0,69	0,012	0,181
MMB047 + P	64,73	0,33	0,69	0,012	0,183
Control + P	64,66	0,37	0,72	0,012	0,182
Control en agua	64,84	0,33	0,70	0,013	0,154

Las experiencias se realizaron en medio NBRIP sin fosfato tricálcico con 5 gr de mineral,
 - P: sin fuente de fósforo soluble; + P: con 100ppm de fósforo soluble KH₂PO₄
 Estos resultados representan la media de tres medidas

Como se puede observar, las muestras de mineral hierro, incorporadas al medio de cultivo como única fuente de fósforo para el crecimiento de las cepas MMB047 y MMB051, no sufrieron ningún cambio significativo en cuanto a su composición química. Es importante resaltar la ausencia de crecimiento bacteriano a lo largo del período de incubación, así como la ausencia de acidificación del medio de cultivo.

Al añadir 100 ppm de fósforo al medio de cultivo con mineral de hierro, en las mismas condiciones anteriores, no se observó crecimiento, ni acidificación del medio; por el contrario, se detectó un incremento en cuanto al porcentaje de fósforo presente en la muestra de mineral de hierro al final de la experiencia (Tabla 10). Esto indicaría que los aniones fosfato agregados al medio, en las condiciones iniciales del cultivo, fueron adsorbidos sobre la superficie de este mineral.

En los resultados presentados en un informe preliminar en 1987 sobre la “Mineralogía del Cerro Bolívar y Los Barrancos”, donde se resumen los principios generales que gobiernan los procesos de adsorción de distintos elementos sobre el mineral, se indicó lo siguiente:

“La capacidad de adsorción de una sustancia aumenta en la medida que su tamaño disminuye y su área superficial aumenta. Las limonitas de los yacimientos de hierro de Los Barrancos presentan una granulometría muy fina lo que aumenta la superficie de contacto”.

“Los iones de gran carga son adsorbidos más rápidamente que los de baja carga (el ion PO_4^{3-} tiene una carga de mediana a alta)”.

“Los fenómenos de adsorción se favorecen si el adsorbato forma un compuesto de baja solubilidad con el adsorbente, un ejemplo clásico es la adsorción del ion fosfato (PO_4^{3-}) por el hidróxido férrico”.

Todos estos principios generales que gobiernan los procesos de adsorción, así como los datos obtenidos del primer informe técnico del CETEC sobre la caracterización de costras limoníticas del yacimiento de Los Barrancos, donde se indica que el mineral de hierro está constituido principalmente por goetita/limonita los cuales son hidroxidos de hierro permiten:

- Justificar la presencia de altos contenidos de fósforo en las muestras de mineral de hierro de este yacimiento de Los Barrancos.
- Justificar la adsorción del fósforo soluble añadido en forma de KH_2PO_4 (sobre el mineral de hierro) el cual fue utilizado como suplemento para soportar el crecimiento bacteriano en presencia de este mineral.
- Justificar la ausencia de crecimiento de las cepas MMB047 y MMB051 en medio NBRIP en presencia de este mineral, ya que otros iones como sulfatos (SO_4^{2-}) presentes en el medio salino, pudieron haber sido adsorbidos por el mineral y no estar disponibles para el crecimiento bacteriano.

En la Tabla 11, se presentan los resultados obtenidos e relación con el efecto de los sobrenadantes condicionados de las cepas MMB051 y MMB047 sobre el contenido de fósforo presente en el mineral de hierro del yacimiento de los Barrancos (método 4.3).

Tabla 11: Efecto de los sobrenadantes condicionados sobre el porcentaje de fósforo presente en el mineral de hierro.

Muestra \ Promedio %	Fe total	SiO ₂	Al ₂ O ₃	Mn	P
Sobrenadante MMB051	64,90	0,32	0,68	0,012	0,154
Sobrenadante MMB047	65,00	0,37	0,67	0,012	0,149
Control (agua)	64,74	0,30	0,69	0,012	0,158

Estos resultados representan la media de tres valores

Como se puede observar no existe una variación significativa de los porcentajes de los elementos de las muestras de hierro tratadas con respecto al control. Estos resultados indican que los sobrenadantes condicionados producidos en estas condiciones no permiten la solubilización del fósforo presente en el mineral de hierro.

El tratamiento del mineral de hierro con ácidos orgánicos puros a pH 3 (Sección 4.4, Materiales y Métodos) con el fin de observar el efecto de estos ácidos sobre el fósforo presente en el mineral, tampoco ocasionó una variación significativa en los porcentajes de cada elemento con respecto al control (ver Tabla 12). Hay que tomar en cuenta que para esta experiencia se utilizó una concentración de 100 mM de cada uno de los ácidos, la cual está por encima de la concentración reportada en cuanto a la capacidad de producción de ácidos de muchos microorganismos en cultivos batch (Maliha *et al.*, 2004, Deubel *et al.*, 2000).

Tabla 12: Efecto de las soluciones de los ácidos orgánicos e inorgánicos puros sobre el contenido de fósforo en el mineral de hierro.

Muestra \ Promedio %	Fe total	SiO ₂	Al ₂ O ₃	Mn	P
Ácido glucónico	64,70	0,30	0,70	0,012	0,156
Ácido acético	65,04	0,30	0,64	0,012	0,150
Ácido cítrico	64,38	0,34	0,68	0,018	0,152
Mezcla de ácidos	64,80	0,28	0,66	0,013	0,154
Ácido Clorhídrico	65,00	0,28	0,64	0,012	0,150
Control en agua	64,74	0,30	0,69	0,012	0,158

Estos resultados representan la media de tres valores

Hong-Joo *et al.*, (2006) estudiaron la capacidad solubilizadora de una cepa de *Pantoea agglomerans* sobre diferentes sustratos de fósforo insoluble. En este trabajo demostraron que la solubilización de fósforo fue significativamente más alta en presencia de fosfato tricálcico (898 g/L), fosfato monocálcico (826 g/L) e hidroxiapatita (894 g/L) comparada con la obtenida en fosfato de hierro (28 g/L) y fosfato de aluminio (19 g/L). Estos investigadores no encontraron diferencias significativas en el pH final de los 5 sobrenadantes de cultivo obteniendo valores entre 2,6-2,8. Ahora bien, en este experimento se observó una correlación entre la disminución de pH del medio y la solubilización de fosfato a partir de los sustratos de fosfato de calcio, pero no se encontró correlación alguna entre la disminución del pH del medio y la solubilización de fosfato a partir de fosfato de hierro y de aluminio. Este resultado y el obtenido por nosotros al utilizar el mineral de hierro, sugiere que este mecanismo de solubilización de fosfatos mediado por la producción de ácidos orgánicos y la liberación al medio de protones y agentes quelantes o acomplexantes (Coyne, 2000), no es la estrategia más idónea para solubilizar el fósforo presente en este mineral con miras al biomejoramiento del mismo, al menos en las condiciones a las cuales fueron realizados los experimentos.

Sin embargo, en un experimento realizado por Esther *et al.*, (2005) en el cual compararon la capacidad solubilizadora de fosfato de dos organismos distintos, un actinomiceto identificado como *Gordonia sp.*, y una bacteria del suelo identificada como *Pseudomonas fluorescens*, reconocida como una bacteria con actividad MPS, se encontró que estos microorganismos utilizaban dos estrategias distintas para la solubilización de fósforo a partir de un mineral de hierro (goetita) sintetizado en condiciones de laboratorio.

Los resultados obtenidos indicaron que *Gordonia sp.*, solubilizó el fósforo presente en la goetita por medio del incremento del pH (de 5,53 a 7,02). Esto provocó la disolución parcial de la goetita y el desprendimiento del fósforo adsorbido. Adicional a esto, la disolución de la goetita pudo ser incrementada por pequeñas cantidades de malato liberadas por *Gordonia sp.* El malato es un ácido orgánico que actuó, en este caso, como un agente reductor ya que a este pH estos ácidos orgánicos estaban completamente disociados, siendo

deficientes para extraer el fosfato por intercambio aniónico con la goetita (como agente quelante) (Jáuregui y Reisenauer, 1982).

En el caso de *Pseudomonas fluorescens*, la misma solubilizó el fósforo presente en la goetita disminuyendo el pH del medio (5,53 a 4,48) por la excreción de grandes cantidades de citrato. A este pH el citrato actuó como un efectivo agente quelante de hierro, disminuyendo así el número de sitios de adsorción de fósforo sobre el mineral de hierro. Es importante resaltar que el ácido cítrico es un ácido orgánico que tiene tres grupos carboxílicos y a este pH (4,48), la mitad de sus grupos carboxílicos aproximadamente se encuentran protonados y la estabilidad de los complejos de hierro o aluminio con el anión orgánico es más alta que la de los complejos de hierro o aluminio con el fósforo. Esto permite que los grupos carboxílicos protonados actúen como agentes quelantes de los iones de hierro y aluminio, permitiendo la liberación de fósforo en el cultivo.

Al comparar los resultados obtenidos con *Pseudomonas fluorescens* (la cual presenta un mecanismo similar de solubilización al de las cepas en estudio) con los resultados obtenidos por nosotros, tanto con los sobrenadantes condicionados como con las soluciones de ácidos orgánicos puros, podemos decir que el tratamiento del mineral de hierro solo con los ácidos orgánicos y principalmente los derivados de la oxidación directa de la glucosa (ácido glucónico) no es eficaz para lograr la solubilización del fósforo presente en el mineral de hierro de Los Barrancos.

Es importante mencionar que en el caso de este mineral de hierro, el fósforo está incorporado en la matriz cristalina del mismo (comunicación personal Ing. Fernando Barrios. CVG Ferrominera del Orinoco) sumado a esto la alta capacidad de adsorción de este mineral, hacen que el mismo sea altamente refractario. Debido a esto es necesario proponer nuevas alternativas que permitan solubilizar el fósforo presente como contaminante en este mineral de hierro.

Una alternativa podría ser la utilización de ácidos orgánicos y agentes reductores. Estos agentes pueden reducir el hierro férrico (Fe^{+3}) presente en los hidróxidos de hierro a hierro ferroso (Fe^{+2}), el cual es una forma de hierro más soluble. Esto permitiría la

desestabilización de la matriz cristalina del mineral y por medio de las propiedades quelantes del ácido glucónico a pH ácidos se daría la posterior solubilización del fósforo presente en el mineral.

Otra alternativa para la solubilización del fósforo del mineral de hierro, por medio de los ácidos orgánicos producidos por los microorganismos puede ser planteada, basada en los diagramas de solubilización de los minerales de fósforo en el suelo y su correlación con los pKa de los diferentes ácidos orgánicos producidos por los microorganismos (Lindsay, 1977) tomando en cuenta los pH de disociación de estos compuestos de hierro fosforados. Estas alternativas por separado o ambas alternativas unidas podrían solubilizar el fósforo presente en el mineral de hierro de la región de Guayana.

6.2. Bioprocesamiento de la roca fosfórica.

Los suelos venezolanos más evolucionados, con características de baja fertilidad natural, ácidos, generalmente asociados al término de suelos marginales, representan aproximadamente el 64% de la superficie del territorio nacional, de la cual el 14,6% tiene vocación agrícola y, en consecuencia, podrían ser incorporados a los procesos de producción una vez que las limitaciones de fertilidad, entre otras (pendiente, drenaje), se hayan solucionado con el uso de fertilizantes y enmiendas.

Uno de los nutrientes deficientes en esos suelos es el fósforo, y los insumos para la fabricación de fertilizantes fosfatados han sido siempre importados, a pesar de las grandes reservas de rocas fosfóricas conocidas en el país desde hace más de 20 años. No es sino en los últimos años que en Venezuela comienza la explotación de sus recursos fosfáticos en el Táchira, para uso agrícola directo, con el fin de ir sustituyendo progresivamente las importaciones. Esto representará un ahorro de divisas y un aumento potencial en la producción de alimentos debido al uso de fertilizantes de fácil disponibilidad.

Ahora bien, el proceso tradicional para la producción de fertilizantes de fósforo a partir de la roca fosfórica se basa en el procesamiento químico de este mineral, el cual incluye un

tratamiento intensivo con ácido sulfúrico a altas temperaturas. Estos procesos no son convenientes para el medio ambiente, especialmente porque liberan contaminantes no deseables; a su vez, el tratamiento para eliminar estos contaminantes causa la contaminación potencial del aire y de las aguas (Hong-Joo *et al.*, 2006). Como alternativa se ha planteado el uso de cepas MPS⁺ en estrategias de bioprocesamiento. Por tal razón, con la finalidad de determinar si las cepas MPS⁺ en estudio solubilizan el fósforo presente en este mineral, se procedió a realizar cultivos de las cepas en medio NBRIP suplementado con 0,1 g de roca fosfórica como única fuente de fósforo (Sección 4.2, Materiales y Métodos).

Para este ensayo utilizamos mineral de roca fosfórica proveniente de los yacimientos del Estado Táchira, los cuales representan el 80% del total de las reservas probadas de roca fosfórica en todo el país. En cuanto a la composición química, este mineral está constituido principalmente por: óxidos de calcio (CaO), óxidos de fósforo (P₂O₅) y óxidos de silicio (SiO₂) en mayor proporción. Además contiene óxidos de aluminio (Al₂O₃), óxidos de hierro (Fe₂O₃), óxido de potasio (K₂O), óxido de magnesio (MgO), flúor (F) en menor proporción. Es posible encontrar también elementos como cobre (Cu), cobalto (Co), manganeso (Mn), níquel (Ni), litio (Li), cromo (Cr), cinc (Zn), vanadio (V), uranio (U), berilio (Be), boro (B), titanio (Ti) y plomo (Pb).

En la Figura 22 se observa la cinética de crecimiento y acidificación de la cepa MMB051, en medio NBRIP modificado con roca fosfórica como única fuente de fósforo. Esta cepa es capaz de crecer en presencia de este mineral como única fuente de fósforo, presentando una alta capacidad acidificadora, que determina un valor final de pH de tres unidades, en aproximadamente 24 horas. Se observa nuevamente que ocurre acidificación en ausencia de crecimiento. La acidificación en el medio de cultivo inoculado con roca fosfórica comienza luego de las primeras 6 horas de incubación.

Al comparar estos resultados de acidificación, con los obtenidos en la experiencia anterior en medio NBRIP y con el medio inoculado sin fuente de fósforo (Figura 18), es posible observar que la acidificación del medio ocurrió en mayor tiempo, debido a la alta capacidad

de tamponamiento que tiene el mineral de roca fosfórica en el medio de crecimiento. Este efecto de la roca fosfórica sobre el pH del medio ya ha sido reportado (Nikolay *et al.*, 2001). La capacidad de tamponamiento puede atribuirse a la presencia de iones hidroxilos (OH⁻), iones fluoruros (F⁻) y iones carbonatos (CO₃⁻²) presentes en este mineral, así como también a la presencia de los iones fosfatos. Todos estos iones actúan como agentes secuestradores de protones en el medio, disminuyendo la capacidad acidificadora de los ácidos producidos por esta cepa.

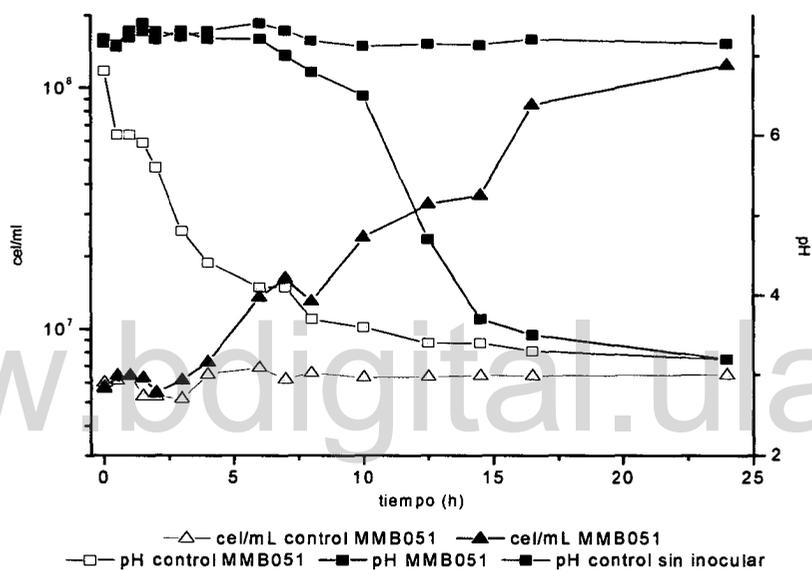


Figura 22: Crecimiento y acidificación en cultivos de la cepa MMB051 en medio NBRIP con roca fosfórica

En la Figura 23 se muestran las cinéticas de consumo de glucosa en función del fósforo soluble en el sobrenadante de cultivo de la cepa MMB051. Como se puede observar, el consumo de glucosa comienza en las primeras horas del crecimiento, resultados que se aprecian también en la cinética de crecimiento de esta cepa en medio NBRIP (Figura 19). Además de esto, se observa que el mayor consumo de glucosa ocurre en las primeras horas de la experiencia (8 horas de cultivo); a partir de las 10 horas, se detiene el consumo de glucosa. Resultados similares fueron obtenidos por esta cepa en la experiencia con medio NBRIP (Figura 19).

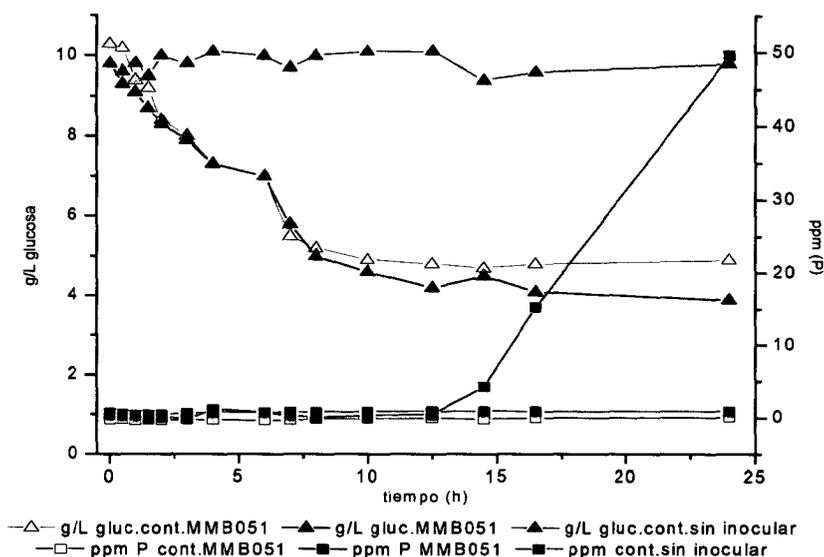


Figura 23: Consumo de glucosa y solubilización de fósforo en cultivos de la cepa MMB051, en medio NBRIP con roca fosfórica.

Es importante resaltar que la aparición de fósforo soluble, comienza a observarse a las 12,5 horas de cultivo, cuando el valor de pH está alrededor de 4,5 (Figura 22). Cuando la cepa es cultivada en medio NBRIP, la aparición de fósforo soluble comienza a observarse a las 7 horas, cuando el valor del pH del medio de cultivo está alrededor de 4,5 (Figuras 18 y 19). En ambos casos las cepas se encuentran en fase exponencial de crecimiento (esta es una evidencia indirecta de que el pH está relacionado con la solubilización de fósforo a partir de distintos compuestos de fosfato de calcio por intermedio esta cepa). En esta experiencia se obtuvo un rendimiento práctico de 50 ppm de fósforo soluble en 24 horas.

En relación al consumo de glucosa y al crecimiento de la cepa MMB051 en el medio de cultivo, con respecto al control inoculado sin fuente de fósforo, los resultados obtenidos sugieren nuevamente que la mayor cantidad de glucosa está siendo utilizada para la acidificación del medio, principalmente por la vía de oxidación directa de la glucosa y muy poca esta siendo metabolizada para el crecimiento bacteriano.

En un estudio realizado por Vassilev *et al.*, (1996) se demostró que la producción de ácido glucónico por *Penicillium variable* aumentó a medida que aumentaban las concentraciones de roca fosfórica en el medio. Este resultado podría explicar la similitud de los valores de

pH obtenidos en este medio NBRIP con roca fosfórica como única fuente de fósforo, y los obtenidos en el medio NBRIP; ya que para romper la capacidad de tamponamiento de este mineral en el medio y alcanzar un pH de tres al final de la experiencia, necesariamente debe producirse una mayor cantidad de ácido o un ácido más fuerte. En este caso nosotros no pudimos correlacionar estos valores de pH con el consumo de glucosa ya que en ambas experiencias la glucosa disminuyó hasta una concentración aproximada de 4 g/L, lo que estaría sugiriendo que posiblemente, en presencia de roca fosfórica, se pudiese estar produciendo un ácido más fuerte que el glucónico.

En las Figuras 24 y 25, se muestran los resultados de las cinéticas de crecimiento, acidificación, solubilización de fosfatos y consumo de glucosa de la cepa MMB047 en presencia de roca fosfórica. En estas gráficas se observa que esta cepa presenta el mismo comportamiento o la misma tendencia que la cepa MMB051, como ocurrió en las experiencias realizadas en medio NBRIP.

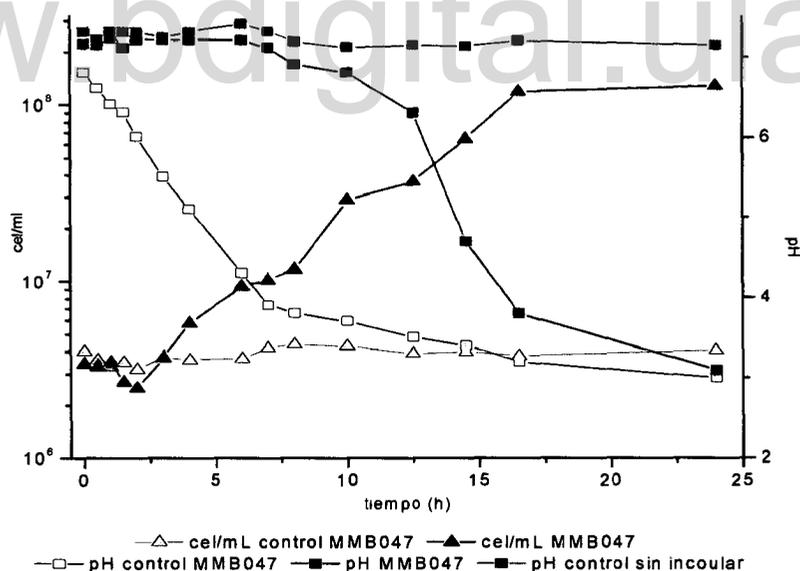


Figura 24: Crecimiento y acidificación de la cepa MMB047 en medio NBRIP con roca fosfórica.

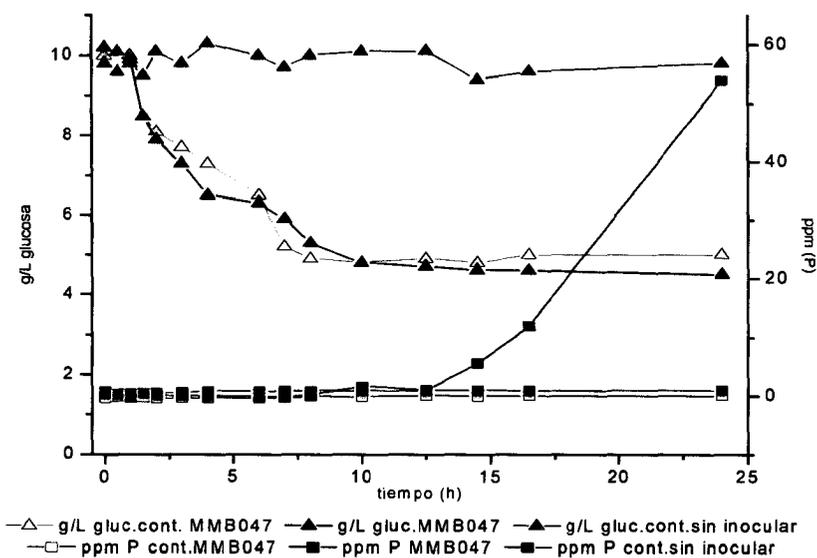


Figura 25: Consumo de glucosa y solubilización de fosfato en cultivos de la cepa MMB047 en medio NBRIP con roca fosfórica

Al comparar los resultados obtenidos por otros investigadores en cuanto a la solubilización de fósforo a partir de roca fosfórica (Rodríguez y Fraga, 1999) con los resultados obtenidos por nosotros, observamos que nuestras cepas solubilizan una mayor cantidad de fósforo a partir de este mineral. Este resultado indica una vez más la alta capacidad solubilizadora de fosfato que poseen estas cepas a partir de compuestos de fosfato de calcio.

6.3. Estudio de la capacidad solubilizadora de los sobrenadantes condicionados sobre fosfato tricálcico y roca fosfórica.

Con la finalidad de determinar la capacidad solubilizadora de los metabolitos bacterianos producidos y excretados hacia el medio de cultivo, con miras a su potencial aplicación en una estrategia de tratamiento en 2 etapas que permitan sustituir los procesos convencionales actualmente en uso, se procedió a analizar el efecto de los sobrenadantes de cultivo, sobre fosfato tricálcico y roca fosfórica (Sección 4.3, Materiales y Métodos).

En la Figura 26 se presentan los resultados de la capacidad solubilizadora de fosfato tricálcico de los sobrenadantes de cultivo (condicionados) producidos por las cepas MMB047 y MMB051 (pH 3). Los resultados reflejan una tendencia clara de saturación de estos sobrenadantes con respecto a la capacidad solubilizadora de fósforo a partir de fosfato tricálcico.

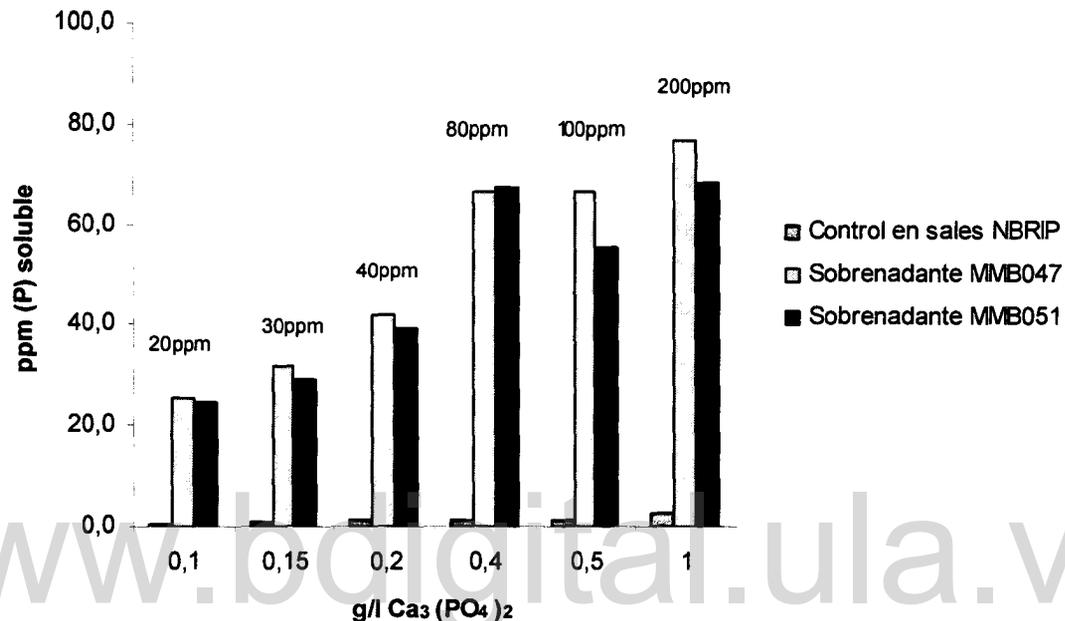


Figura 26: Capacidad solubilizadora de los sobrenadantes condicionados de las cepas MMB047 y MMB051 en fosfato tricálcico.

Los valores sobre el eje x indican la cantidad de fosfato tricálcicoañadido, expresado en g/L
 Los valores sobre las barras indican la cantidad de fósforo añadido en forma de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ expresado en ppm.

Las curvas de saturación son similares para los sobrenadantes de ambas cepas. Vale la pena resaltar que en las tres primeras experiencias (0,1 – 0,15 – 0,2 g/L) de fosfato tricálcico, se observó la total solubilización del fosfato agregado (desaparición del precipitado de fosfato tricálcico). En base a estos resultados se logró determinar que la máxima capacidad solubilizadora de fosfato tricálcico, por medio de estos sobrenadantes condicionados, es de aproximadamente 76,8 ppm para el sobrenadante de la cepa MMB047 y 68,3 ppm para el

sobrenadante de la cepa MMB051. Comparando estos resultados con los resultados obtenidos en experimentos anteriores (cinéticas de crecimiento y solubilización de fosfatos en medio NBRIP) (Figuras 19 y 21), se observa que estos sobrenadantes solubilizaron una cantidad de fósforo casi equivalente a la cantidad solubilizada por las células en cultivo (80 ppm).

Es importante indicar que en las cinéticas de crecimiento y solubilización de fosfato en medio NBRIP, se observó la total solubilización de fosfato tricálcico para una concentración inicial de 1 g/L. Esto no se observó para la misma concentración de fosfato tricálcico (1g/L) utilizando los sobrenadantes condicionados, ya que se observó la permanencia de un precipitado de fosfato tricálcico en presencia de los sobrenadantes de cultivo (condicionados) de ambas cepas. Este resultado permitió indicar que ocurría una mayor solubilización en presencia de las células que con los sobrenadantes condicionados solos en las condiciones a las cuales fueron sometidos. Estos resultados podrían explicarse en base a que en presencia de las células en un medio de cultivo óptimo debe producirse mayor cantidad de ácidos, por consiguiente de agentes quelantes; lo que deriva en una mayor capacidad solubilizadora de fosfato tricalcico.

En cuanto al rendimiento porcentual obtenido para cada experiencia, se obtuvo un 100% de rendimiento para las tres primeras experiencias (0,1; 0,15; 0,2 g/L) y un rendimiento aproximado de 80, 60 y 30 % para las últimas tres experiencias (0,4; 0,5; 1 g/L).

Con respecto a los controles, es posible observar una pequeña fracción de fósforo soluble presente en los mismos; esto es debido a que en este caso se utilizaron las sales del medio NBRIP incluyendo la glucosa para trabajar en las mismas condiciones, y como ya se ha evidenciado, estas sales tienen un efecto solubilizador sobre el fosfato tricálcico a una temperatura de 30°C (Johri J. K. *et al.*, 1999).

En la Figura 27 se presentan los resultados de la solubilización de fósforo a partir de mineral de roca fosfórica de los sobrenadantes de cultivo condicionados. Como se puede observar, a medida que aumenta la cantidad de mineral de roca fosfórica, disminuye aparentemente la capacidad solubilizadora de fosfato de estos sobrenadantes.

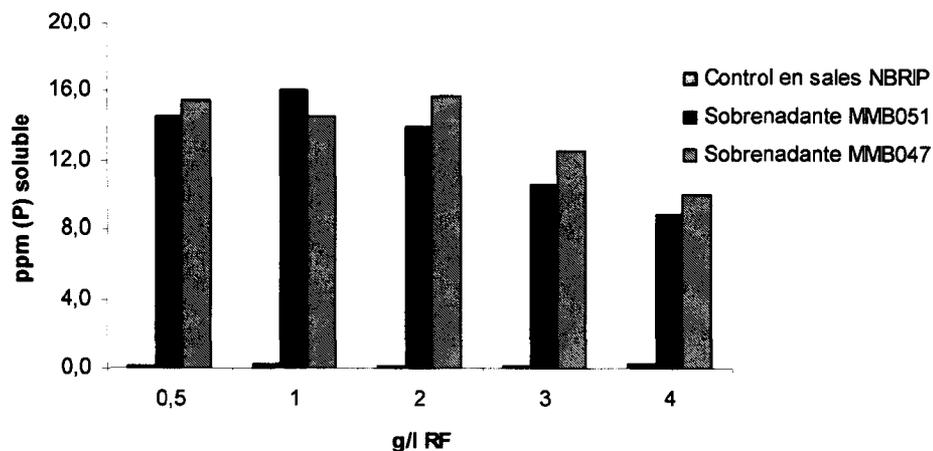


Figura 27: Capacidad solubilizadora de los sobrenadantes condicionados de las cepas MMB051 y MMB047 en roca fosfórica.

Este resultado podría explicarse por la capacidad de tamponamiento presentada por este mineral, la cual causa un aumento en el valor de pH de los sobrenadantes condicionados; este valor va desde un pH de 4 en 0,5 g/L de roca fosfórica hasta un pH de 6 en 4 g/L de roca fosfórica. Esto indica que al ir aumentando los gramos de roca fosfórica sobre un volumen fijo de sobrenadante, aumenta el pH de los sobrenadantes condicionados por medido del aumento en solubilización de roca fosfórica, lo que resulta en la disminución de la cantidad de fósforo soluble presente en el medio.

Asea *et al.*, (1988) reportaron que al agregar 0,1% de roca fosfórica al medio, el pH incrementó en 0,5 unidades en el sobrenadante de cultivo. Estos resultados respaldan los resultados obtenidos por nosotros en esta experiencia. Este resultado puede explicarse debido a la presencia en este mineral de iones hidroxilo (OH^-), carbonato (CO_3^{-2}), Fluoruro (F^-), así como también los iones fosfato; que al entrar en contacto con la solución ácida se solubilizan secuestrando los protones del medio aumentando de esta manera el pH del mismo.

Vale la pena resaltar que en las tres primeras experiencias 0,5, 1 y 2 g/L se observa una capacidad solubilizadora similar de estos sobrenadantes condicionados. Este resultado indica que probablemente la capacidad solubilizadora de estos sobrenadantes condicionados en 0.5 g/L ya se encuentra saturada.

Tanto los sobrenadantes utilizados en esta experiencia, como los utilizados en la experiencia con fosfato tricálcico, se obtuvieron de un mismo cultivo. Comparando ambos resultados incluyendo los resultados de los controles, se evidencia que la tasa de solubilización de estos compuestos varía, siendo menor para el mineral de roca fosfórica y mayor para el fosfato tricálcico (Goldstein 1995; Rodríguez y Fraga, 1999).

Por otra parte, Halder y Chakrabarty (1993) al neutralizar con NaOH los sobrenadantes de cultivo filtrados producidos por cepas de *Rhizobium*, eliminaron la actividad solubilizadora de fosfato de calcio. Según Nikolay *et al.*, (2001) la producción de metabolitos como los ácidos orgánicos y la disminución del pH del medio es el mecanismo más efectivo para la solubilización de roca fosfórica. Estos resultados y el obtenido por nosotros en roca fosfórica y fosfato tricálcico indican, una vez más, que la solubilización de fósforo a partir de fosfato tricálcico y roca fosfórica por medio de estas cepas, así como de otros microorganismos depende en gran medida de la acidificación del medio.

Comparando la capacidad solubilizadora de estos sobrenadantes condicionados sobre roca fosfórica con respecto a la solubilización causada sobre este mismo sustrato por las células en cultivo, se observó nuevamente que ocurre una mayor solubilización en presencia de las células que con los sobrenadantes condicionados solos.

Debido a que en el medio de cultivo, el ácido glucónico fue el principal ácido producido por las cepas MMB051 y MMB047, se decidió evaluar la capacidad solubilizadora de soluciones de ácido glucónico puro a diferentes concentraciones sobre una cantidad fija de fosfato tricálcico (10 mg) y roca fosfórica (40 mg), en un volumen fijo de 10 mL (Sección 4.4, Materiales y Métodos).

Los resultados de esta experiencia son mostrados en la Figura 28. El ácido glucónico puro pudo solubilizar fósforo a partir de fosfato tricálcico y roca fosfórica y a medida que aumenta la concentración de ácido glucónico aumenta la solubilización de fosfato en estos dos sustratos. Es importante resaltar que el pH de todas estas soluciones fue de 2 excepto la solución de 15,6 mM la cual presentó un pH de 3 para ambos sustratos.

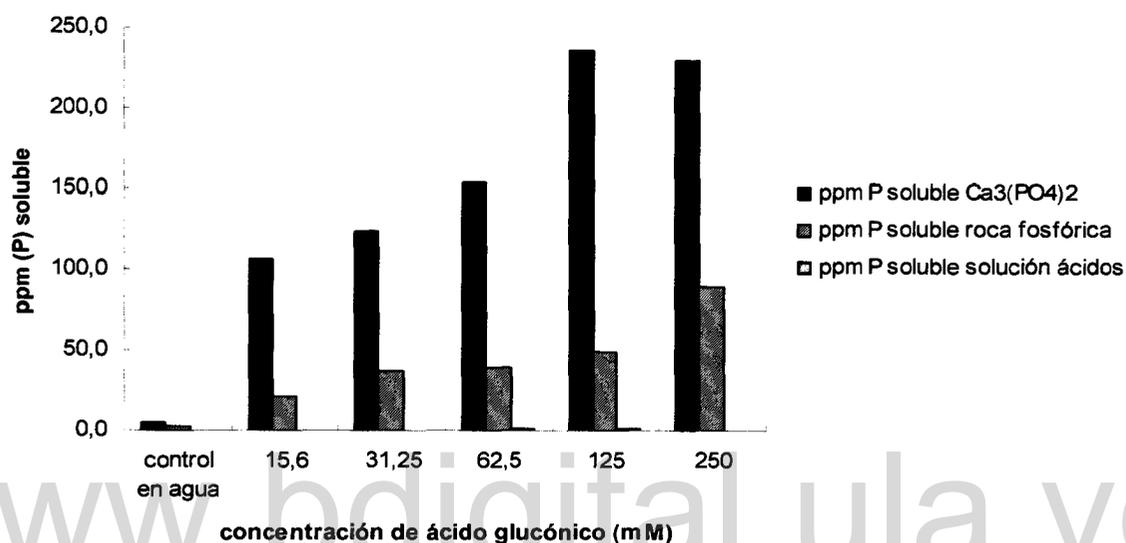


Figura 28: Capacidad solubilizadora del ácido glucónico puro a distintas concentraciones en 10 mg de fosfato tricálcico y 40 mg de roca fosfórica.

Como se puede observar, en los controles con agua y cada uno de estos sustratos así como en los controles de cada una de las soluciones de ácido glucónico puro no se observa medida de fósforo soluble.

En experimentos realizados por Ta-Fa *et al.*, (2006) en los cuales compararon la capacidad solubilizadora de cultivos filtrados producidos por una cepa de *Burkholderia cepacia* que contenían ácido glucónico y ácido 2-cetoglucónico, con los ácidos orgánicos puros a la misma concentración del cultivo, determinaron que: los ácidos orgánicos puros en agua solubilizaban el doble de la cantidad de fósforo que solubilizaban los cultivos filtrados. Los autores atribuyeron este resultado a la presencia de metales en el medio líquido con fosfato tricálcico tales como, Fe, Ca, Mn, Mg y K, los cuales reaccionan con el fósforo disuelto

convirtiendo el fosfato solubilizado por los filtrados en formas insolubles, lo cual podría también explicar los resultados obtenidos para la roca fosfórica en cuanto a la solubilización de fósforo.

En base a estos resultados no se pueden realizar comparaciones entre estas soluciones y los sobrenadantes condicionados para determinar la posible concentración de ácido en los mismos; pero si se puede concluir que el ácido glucónico es un buen agente solubilizador de fosfato a partir de compuestos de fosfato de calcio.

Del análisis de estos resultados es posible concluir que el mecanismo de solubilización de fosfato a partir de fosfatos de calcio utilizado por estas cepas MMB047 y MMB051, es idóneo para ser utilizado en la solubilización de roca fosfórica, ya sea con la utilización directa de las cepas en cultivo con roca fosfórica como única fuente de fósforo o con la utilización de los sobrenadantes condicionados, con miras a sustituir los procesos convencionales realizados a partir de ácidos inorgánicos concentrados (ácido sulfúrico) a altas temperaturas. Este resultado es importante ya que permitiría en un futuro reducir los costos y la contaminación generada por los procesos convencionales utilizados actualmente.

VI. CONCLUSIONES

Los estudios micromorfológicos, macromorfológicos y bioquímicos de las cepas aisladas de regiones adyacentes a los yacimientos de hierro de la región de Guayana, se correlacionan coincidieron con la identificación molecular, confirmando que de las diez, nueve pertenecen a dos grandes familias de bacterias: La familia de las *Enterobacteriaceae* y la familia de las *Pseudomonadaceae*.

Las cepas MMB047 y MMB051 identificadas como *Pantoea agglomerans* presentaron la mayor actividad MPS.

Ambas cepas solubilizan fósforo, a partir de fósforo de calcio, en presencia de glucosa. Esta solubilización se correlacionó con la acidificación del medio, que puede alcanzar valores de pH cercanos a 3.

Distintos experimentos, bajo condiciones controladas, indicaron que el principal ácido producido por las cepas MMB047 y MMB051 (*Pantoea agglomerans*) es el ácido glucónico. Además confirmaron que la cepa MMB051 produce otros ácidos, todos relacionados con la oxidación directa de la glucosa.

Gran parte de la glucosa se oxida por la vía directa, produciéndose cantidades importantes de ácido. Muy poca es utilizada para el crecimiento.

La vía de oxidación directa de la glucosa es la principal vía implicada en la solubilización de fósforo por estas cepas.

En ausencia de crecimiento, ocurre una acidificación importante del medio (la acidificación es independiente del crecimiento).

No se observó solubilización de fósforo a partir del mineral de hierro en las condiciones en las cuales se realizaron nuestros experimentos.

Se demostró que ambas cepas solubilizan fosfato, a partir de roca fosfórica, en presencia de glucosa. Esta solubilización se correlacionó con la acidificación del medio, la cual alcanzó valores de pH cercanos a 3.

Los sobrenadantes condicionados producidos por las cepas MPS⁺ poseen la capacidad de solubilizar fosfato de calcio a partir de distintos sustratos de fosfato de calcio.

La solubilización de fósforo a partir de roca fosfórica, ya sea por la utilización de estas cepas en cultivo o por la utilización de los sobrenadantes producidos por las mismas, representa una alternativa potencial para el tratamiento de este mineral con miras a ser utilizado en procesos de fertilización de suelos.

www.bdigital.ula.ve

VII. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

Optimizar las condiciones del medio de cultivo, con la finalidad de obtener un mejor rendimiento en la capacidad solubilizadora de fosfatos de calcio por parte de las cepas MPS⁺.

Identificar los ácidos orgánicos presentes en el sobrenadante de cultivo que derivan de la oxidación directa de la glucosa, que no pudieron ser identificados.

Realizar estudios, a nivel molecular, que permitan corroborar la presencia de los genes implicados en la vía de oxidación directa de la glucosa y de sus productos en estas bacterias MPS⁺.

Realizar estudios que permitan conocer los procesos de regulación que gobiernan el mecanismo de oxidación directa de la glucosa utilizado por estas cepas MPS⁺.

Explorar alternativas que involucren la utilización de estas cepas MPS⁺ y permitan utilizar su alta capacidad solubilizadora de fósforo en procesos de solubilización de fosfatos a partir de mineral de hierro.

Realizar estudios a escala piloto, **ya sea por medio de la acidulación o de la solubilización de fosfato** a partir de roca fosfórica, que permitan explorar el potencial biotecnológico de estas cepas en procesos de fertilización de cultivos.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Medios de caracterización bioquímica.

1. Caldo glucosa rojo fenol (CGRF).

Peptona tripticasa	10 g
NaCl	5 g
Rojo fenol	0,018 g
Glucosa	10 g
H ₂ O (c.s.p.)	1 L

- Prueba la fermentación de carbohidratos sustituyendo la glucosa por el sustrato respectivo.
- Cambio de rojo a amarillo indica una prueba positiva.
- Interpretación: el organismo es capaz de fermentar la glucosa o existe acumulación de metabolitos durante la respiración aeróbica de la glucosa en cantidades suficientes para tornar el indicador de pH.
- El cambio de color debe verse en 2 días.

2. Caldo lactosa rojo fenol (CLRF).

Peptona tripticasa	10 g
NaCl	5 g
Rojo fenol	0,018 g
Lactosa	10 g
H ₂ O (c.s.p.)	1 L

- Un cambio de color del indicador de rojo a amarillo indica una fermentación de la lactosa.
- El cambio de color debe verse en 2 días.

3. Agar triple azúcar hierro (ATAH).

Polipeptona	20 g
NaCl	5 g
Lactosa	10 g
Sacarosa	10 g
D-glucosa	1 g
Sulfato de hierro y amonio	0,2 g
Tiosulfato de sodio	0,2 g
Rojo fenol	0,025 g
Agar	15 g

H₂O (c.s.p.) 1 L

- Producción de sulfuro de hidrógeno; fermentación de lactosa, glucosa o sacarosa; producción de gas a partir del metabolismo de la glucosa; tubos con taco (aeróbico) y tubos con cuña (anaeróbico).
- Un cambio de color de rojo a amarillo en la cuña indica fermentación de lactosa o sacarosa.
- Un cambio de color de rojo a amarillo en el taco indica fermentación de la dextrosa.
- La presencia de burbujas en el taco es indicativo de la formación de gas a partir de la dextrosa.
- La presencia de un precipitado negro indica la producción de sulfuro de hidrógeno.
- Debe verse en 2 días.

4. Caldo rojo de metilo Voges-Proskauer (CRMVP).

Peptona tripticasa 7 g
Dextrosa 5 g
KH₂PO₄ 5 g
H₂O (c.s.p.) 1 L

- a. Prueba de rojo de metilo: presencia de una fermentación ácido mixta que conduce a un pH final del medio de 4,5 o menos. Después de incubar los cultivos por 5 días a 30°C se añaden unas gotas de rojo de metilo. El desarrollo inmediato de un color rojo indica una reacción positiva, un color naranja indica una reacción dudosa y un color amarillo indica una reacción negativa.

Solución de rojo de metilo: 0,1 g de rojo de metilo en 300 mL de etanol y se completa hasta 500 mL con agua.

- b. Reacción de Voges-Proskauer: formación de acetil-metil-carbonil (acetoína) a partir de la glucosa. Después de incubar los cultivos por 5 días se añaden 3 mL de una solución alcohólica de α -naftol al 5% y 1 mL de KOH al 40%. El desarrollo de un color rojo en la parte superior del tubo en 10 o 20 min indica una reacción positiva.

5. Caldo Nitrato (CN).

Peptona 5 g
Extracto de levadura 3 g
Nitrato de potasio 1 g
H₂O (c.s.p.) 1 L

- Se incuban los cultivos durante 2 a 5 días. A una cantidad de 2,5 mL de reactivo de nitrito se le añaden 100 µL del cultivo. La presencia de un color rojo indica que el nitrato fue reducido por los microorganismos. Una reacción negativa indica que el nitrato no fue reducido o la transformación del nitrito a formas gaseosas de nitrógeno. El hidrógeno nascente reduce los nitratos (si los hay en el medio) a nitrito y se produce una reacción positiva frente al reactivo.

6. Oxidasa.

Se siembra el microorganismo en placas de agar nutritivo durante 24-48 horas. Se impregna un trozo de papel de filtro en una solución acuosa de tetrametil-alfa-fenilendiamina. Se toma parte de la biomasa del cultivo fresco y se frota sobre el papel de filtro. El desarrollo de un color azul dentro de 10 seg indica una reacción positiva. Manipular todo con palillos o vidrio.

7. Catalasa.

Se siembra cada microorganismo en placas de agar nutritivo. Después de incubarse durante 24-48 horas, se agregan sobre las colonias unas gotas de H₂O₂ al 20%. La efervescencia del oxígeno indica la presencia de catalasa.

8. Medio Hugh y Leifson.

Peptona	2 g
NaCL	5 g
KH ₂ PO ₄	0,3 g
Dextrosa	10 g
Agar	3 g
H ₂ O (c.s.p.)	1 L

- 2 tubos por microorganismo.
- Se cubre uno de los tubos con 1 ml de parafina estéril (ambiente anaeróbico) y se incuban a 30°C por 24-48 horas. Los tubos que presentan cambio de color verde-amarillo indican un metabolismo aerobio (tubos sin parafina), y solo en el tubo con parafina, un metabolismo anaerobio.

9. Citrato de Simmons.

Citrato de Sodio	2 g
NaCL	5 g
NH ₂ PO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄	0,2 g
Azul de bromotimol	0,08 g

Agar	15 g
H ₂ O (c.s.p.)	1 L

- Se siembran en cuñas de este medio. Se basa en la utilización de citrato como única fuente de carbono y energía. Después de incubar 24-48 horas, los tubos que cambian de color verde a azul son positivos. Se puede considerar positivo si el crecimiento es abundante aunque no vire de color muy evidentemente.

10. Gelatina Nutritiva.

Peptona Gelysate	5 g
Extracto de levadura	3 g
Gelatina	120 g
H ₂ O (c.s.p.)	1 L

Se siembra en tacos. Después de incubar durante 7 días a 30°C, se colocan los tubos a temperatura ambiente o refrigeración (si el control no solidifica). Los tubos inoculados donde la gelatina no solidifique se consideran positivos.

www.bdigital.ula.ve

**Anexo 2. Medio NBRIP (Nautiyal, 1999) modificado (de 5g/L de fosfato tricálcico a 1 g/L).
medio de cultivo utilizado para el crecimiento de las cepas.**

	g/L
Glucosa.....	10
Ca ₃ (PO ₄) ₂	1
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	5
MgSO ₄	0,25
KCl.....	0,2
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1

www.bdigital.ula.ve

Anexo 3. Procedimiento para la determinación de la glucosa residual en los medios de cultivo de las cepas *Pantoea sp.* MMB047 y MMB051 por medio del kit comercial Qualitest.

El principio de este kit se basa en el método de Trinder (1969), en el cual la glucosa es oxidada enzimáticamente por la Glucosa Oxidasa, produciendo Ácido Glucónico y agua Oxigenada (H₂O₂). Esta última oxida al cromógeno en presencia de Peroxidasa produciendo un compuesto de color rosado cuya intensidad es proporcional a la concentración de glucosa en la muestra analizada.

A partir de los viales contenidos en el kit, se realizó la mezcla para reconstituir el reactivo, el cual fue usado para la medición. Por cada 0,1 mL de solución de enzima, se agregó 0,1 mL de la solución del sustrato y 10 mL de la solución tampón.

La mezcla de reacción se hizo utilizando 10 µL (microlitros) de muestra (sobrenadantes de los medios de cultivos de las cepas *Pantoea sp.* MMB047 y MMB051 tomados a distintos intervalos de tiempo) con 1 mL de reactivo reconstituido. La mezcla se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y la absorbancia fue medida a 510 nm.

Para el cálculo de la concentración de glucosa residual se utilizó la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{ABSORBANCIA DE LA MUESTRA}}{\text{ABSORBANCIA DEL PATRON}} \times \text{Concentración del patrón} = \text{Glucosa (mg/dL)}$$

Esta reacción colorimétrica es lineal hasta una concentración de 400 mg/dL de glucosa.

Anexo 4. Procedimiento para la determinación de fósforo soluble en los medios de cultivo de las cepas *Pantoea sp.* MMB047 y MMB051.

Este método cuantitativo para determinar fósforo soluble, es conocido también como el método de “azul de Molibdeno”; el mismo se basa en la formación del complejo fosfomolibdico entre los iones ortofosfatos de la solución y el molibdato ácido que se adiciona. El complejo fosfomolibdico, por acción de agentes reductores, como el cloruro estanoso, produce el colorante azul de molibdeno. La intensidad del color azul es directamente proporcional a la concentración de fósforo soluble presente en la solución.

Para la determinación cuantitativa del fósforo soluble presente en los sobrenadantes de cultivos de las cepas *Pantoea sp.* MMB047 y MMB051, se procedió de la siguiente manera.

Preparación de la solución de ácido cloromolibdico al 1,5%: Se disolvieron 7,5 gr de molibdato de Amonio $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en 150 mL de agua tibia.

Se enfrió y se le adicionó lentamente y con agitación 175 mL de HCl 10N.

Se dejó enfriar y se enrasó hasta un volumen final de 500mL.

Por último se mezcló cuidadosamente y se guardó en un envase ámbar hasta su uso.

Preparación de la solución de cloruro estanoso: Se disolvieron 0,1g de $\text{SnCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 250 μL de HCl concentrado, en un frasco ámbar.

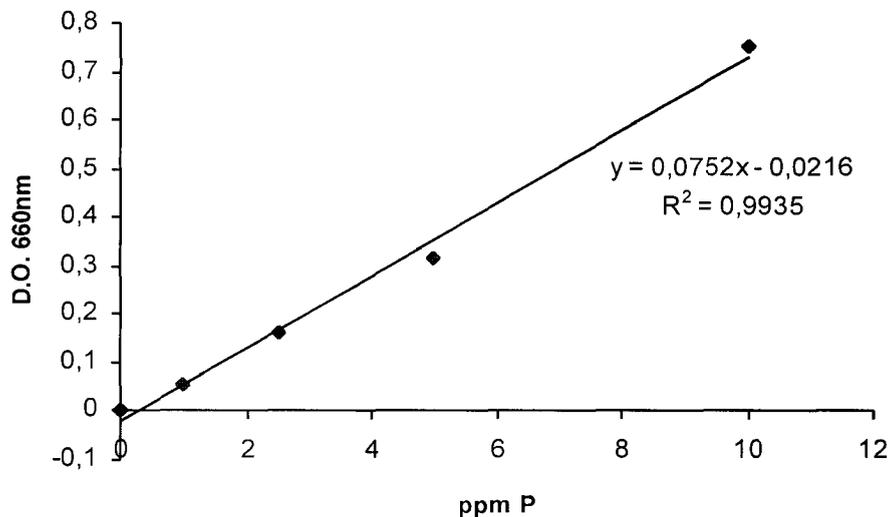
Posteriormente esta solución fue diluida con 82,5 mL de agua destilada fría y estéril.

Este reactivo fue preparado inmediatamente para su uso.

Preparación de la solución patrón de fósforo: Se preparó una solución patrón de 500 ppm de fósforo con fosfato monopotásico (KH_2PO_4).

A partir de esta solución se realizaron diluciones seriadas hasta obtener soluciones de 10ppm, 5ppm, 2,5ppm y 1ppm de fósforo, los cuales representarían la curva de calibración para la realización de esta experiencia.

Curva de calibración de fósforo



Procedimiento:

Los sobrenadantes de cultivo de las cepas *Pantoea sp* .MMB047 y MMB051 así como sus controles previamente congelados, fueron descongelados para evaluar la cantidad de fósforo soluble de la siguiente manera.

Mezcla de reacción

Sobrenadantes de cultivo	400 μ L
Agua destilada	1000 μ L
Ácido cloromolíbico	400 μ L
Solución diluida de cloruro estanoso	200 μ L

La medida fue realizada luego de 10 minutos de desarrollado el color, a una longitud de onda de 660 nm.

Esto se hizo con cada una de las muestras incluyendo los controles.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Agatzini S, Tzeferis P. (1997). Bioremediation of nickel-cobalt oxide ores. *Aus IMM Proc* 1:9-15.
- Anand P, Modak J. M., Natarajan K. A. (1996) Bioremediation of bauxite using *Bacillus polymyxa*: calcium and iron removal. *Int J. Miner Process* 48: 51-60.
- Anderson G., E. G. Williams, and J. O. Moir. (1974). A comparison of the sorption of inorganic orthophosphate and inositol hexaphosphate by six acid soils. *J. Soil Sci.* 25: 51-62.
- Anderson S., Marks, C. B., Lazarus, R., Miller, J., Stafford, K., Seymour, J., Light, D., Rastetter, W. Estell, D. (1985) Production of 2-keto-L-gluconate, an intermediate in L-ascorbate synthesis, by a genetically modified *Erwinia herbicola*. *Science*, 230: 144-149.
- Anne-Marie Clenton-Jansen, Nora Goosen, Thibaut J. Wenzel y Pieter Van de Putte. (1988) Cloning of the Gene Encoding Quinoprotein Glucose Dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*: Evidence for the Presence of a Second Enzyme. *J. Bacteriol.* 170 (5): 2121-2125.
- Asea P.E.P., Kucey R.M.N., Stewart J.N.B. (1988). Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. *Soil Biol. Biochem.* 20: 459-464.
- Christopher A. (2004). The quinoprotein dehydrogenases for methanol and glucose. *Arch. of Biochem. Biophys.* 428: 2-9.
- Christopher A. (1988). Quinoproteins and energy transduction. In *Bacterial Energy Transduction* (C. Anthony, ed), 293-315. Academic Press; New York.
- Arora D., Gaur C. (1979) Microbial solubilization of different inorganic phosphate. *Indian J Exp Biol.* 17: 1258-1261.
- Babenko Y. S., Tyryning, Grigoryev E. F., Dolgikh L. M., Borisova T. I. (1984) Biological activity and physiologo-biochemical properties of bacteria dissolving phosphates. *Microbiologiya* 53: 533-539.
- Babu-Khan S., Yeo T. C., Martin W. L. Duron M. R. Rogers R. D. and Goldstein A. H. (1995) Cloning of a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. *Appl Environ Microbio.* 61: 972-978.
- Baere T, Verhelst R, Labit C, Verschraegen G, Wauters G, Claeys G, Vanechoutte M. (2004). Bacteremic infection with *Pantoea ananatis*. *Journal of Clinical Microbiology* 42(9); 4393-4395.
- Banik S, Dev B. K. (1982) Available Phosphate content of an alluvial soil is influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilization microorganisms. *Plant Soil* 69: 353-364.
- Bashan Y, Levanony H. (1991) Alterations in membrane potential and in proton efflux in plant roots induced by *Azospirillum brasilense*. *Plant Soil* 137: 99-103.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984). Volumen I.
- Bolin B., Rosswell T., Freney J. R., Ivanov M. V., y Richey J. E. (1983). C, N, P. and S Cycles. Major reservoirs and fluxes. In "The Major Biogeochemical Cycles and Their Interactions" (B. Bolin and R. B. Cook, eds.). Wiley, and sons, New York.
- Boris F., and Zuniono H. (1983). Organic matter P association as a sink in P fixation processes in allophonic soils of Chile. *Soil Biol. Biochem.* 15, 599-603.

- Bosecker K. (2001). Microbial leaching in environmental clean-up programme. *Hydrometallurgy* 59(2-3): 245-248.
- Brookes P. C., D. S. Powlson, and D. S. Jenkinson, (1982). Measurement of microbial biomass phosphorus in soil. *Soil Biol. Biochem.* 14: 319-330.
- Brown M. J. and J. N. Lester. (1979). Metal removal in activated sludge-the role of bacterial extracellular polymers. *Water res.* 13: 817-837.
- 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. *Can J Microbiol* 39: 941-947.
- Chabot R, Antoun H, Kloepper J. W. Beauchamp C. J. (1996) Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar. *Phaseoli*. *Appl Environ Microbiol* 39: 941-947.
- Christiansen-Weneger C. (1992) N₂-fixation by ammonium-excreting *Azospirillum brasilense* in auxin-induced tumours of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biol Ferti Soils* 12:85-100.
- Cleton-Jansen, A. M. (1991). A molecular genetic analysis of the substrate specificity of quinoprotein glucose dehydrogenase. Dissertation, Laboratory of Molecular Genetics, University of Leiden. 78-80; The Netherlands.
- Cleton-Jansen, A. M., Goosen, N., Fayet, O. and van de Putte, P. (1990). Cloning, mapping, and sequencing of the gene encoding *Escherichia coli* quinoprotein glucose dehydrogenase. *Journal of Bacteriology*, 172: 6308-6315.
- Coenye T, Bañadme P, Govan JR, Lipuma JJ. (2001). Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *Journal of Clinical Microbiology* 39(10); 3427-3436.
- Cole C. V., and R. D. Heli. (1981). Phosphorus effects on terrestrial nitrogen cycling. In *Terrestrial Nitrogen Cycle. Processes, Ecosystem and Management Impact*. F. E. Clark and T. Rosswall, eds., *Ecol. Bull.* (Stockholm) 33: 363-374.
- Coyne, M (2000). Microbiología del Suelo: Un Enfoque Exploratorio. España: Paraninfo.
- Cozier, G. E., and C. Anthony. (1995) Structure of the quinoprotein glucose dehydrogenase of *Escherichia coli* modelled on that of methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens*. *Biochem. J.* 312: 679-685.
- Cozier, G. E., R. A. Salleh and C. Anthony. (1999) Characterization of the membrane quinoprotein glucose dehydrogenase from *Escherichia coli* and characterization of a site-directed mutant in which histidine-262 has been changed to tyrosine. *Biochem. J.* 340: 639-647.
- Dalal R. C. Soil organic phosphorus. *Adv Agrom* (1977), 29: 83-117.
- Datta M., Banish S., Gupta R. K. (1982) Studies on the efficacy of a phytohormone producing phosphate solubilizing *Bacillus firmus* in augmenting paddy yield in acid soils of Nagaland. *Plant Soil* 69: 365-373.
- Deppenmeier U. Hoffmeister M. Prust C. (2002) Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter strains* *Appl Microbiol Biotechnol.* 60:233-242.
- Deubel A., Gransee A., and Merbach W., (2000). Transformation of organic rhizodepositions by rhizosphere bacteria and its influence on the availability of tertiary calcium phosphate. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 163: 387-392.
- Didiek H. Siswanto, and Yudho Sugiarto. (2000) Bioactivation of Poorly Soluble Phosphate Rocks with a Phosphorus-Solubilizing Fungus. *Soil Sci. Am. J.* 64:927-932.

- Duine, J. A. (1991). Quinoproteins: enzymes containing the quinoid cofactor pyrroloquinoline quinine, topaquinone or tryptophan-tryptophan quinine. *European Journal of Biochemistry*. 200: 271-284.
- Duine, J. A. Frank, J. and Van Zeeland, J. K. (1979). Glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*; a "quinoprotein". *FEBS Letters*, 108: 443-446.
- Elias M. D., Makoto T., Hanae I., Kazunobu M., Osao A., and Mamoru Y. (2000) Functions of Amino Acid Residues in the Active Site of *Escherichia coli* Pyrroloquinoline Quinone-Containing Quinoprotein Glucose Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 275 (10): 7321-7326.
- Esther Hoberg, Petra Marschner, Reinhard Lieberei. (2005) Organic acid exudation and pH changes by *Gordonia sp.* and *Pseudomonas fluorescens* grown with P adsorbed to goethite. 160: 177-187.
- Flores-Encarnación M., Sánchez M., Ortiz F. (2004). Las PQQ-deshidrogenasas. Un novedoso ejemplo de quinoproteínas bacterianas. *Rev. Latinoam Microbiol* 46 (1-2): 47-59.
- Foster R. C., (1981). Polysaccharides in soil fabrics. *Science* 214: 665-667.
- Gadd G. M. (1999). Fungal production of citric and oxalic acid: importance in metal speciation, physiology and biogeochemical processes. *Adv Microb Physiol* 41: 47-92.
- Gaur A. C. Ostwal K. P. (1972). Influence of phosphate dissolving Bacilli on yield and phosphate uptake of wheat crop. *Indian J Exp Biol* 10: 393-394.
- Glick B. R. (1995) The enhancement of plant grown by free-living bacteria. *Can J Microbiol* 41: 109-117.
- Glick B. R., Penrose D. M., Li J. (1998) A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *J Theor. Biol* 190: 63-68.
- Goldstein A. H. (2000) Bioprocessing Of Rock Phosphate Ore: Essential Technical Considerations For The Development Of A Successful Commercial Technology. Alfred University, New York, USA., pag 1-21.
- Goldstein A. H. (1994) Involment of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by gram-negative bacteria. In: Torriani-Gorini A, Yagil E, Silver S., editors. *Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular Biology*. Washington. DC: ASM Press, 197-203.
- Goldstein A. H. (1995) Recent Progress in Understanding the Molecular Genetics and Biochemistry of Calcium Phosphate Solubilization by Gram Negative Bacteria., *Biological Agriculture and Horticulture*, 12, 185-193.
- Goldstein A. H., Liu S. T. (1987) Molecular cloning and regulation of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola*. *Bio/Technology* 5: 72-74.
- Goldstein, A. H., Rogers, R.D. & Mead, G. (1993). Mining by microbe *Biotechnology*, 11, 1250-1254.
- Goldstein, A. H., (1986). Bacterial mineral phosphate solubilization: historical perspectives and future prospects. *American Journal of Alternative Agriculture*, 1, 57-65.
- Gottschalk, G. (1986). *Bacterial Metabolism*, 2nd. End. Springer-Verlag; Berlin.
- Groudev S. N. (1987). Use of heterotrophic microorganisms in mineral biotechnology. *Acta Biotechnol* 7: 299-306.
- Groudev S. N., Groudeva V. I. (1986) Biological leaching of aluminium from clays. *Biotechnol Bioeng Symp No.* 16: 257-263.

- Gyaneshwar P., Naresh Kumar G., Parekh L. J., Poole P. S. (2002) Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plant. *Plant and Soil*. 245: 83-93.
- Halder A. K. and Chakrabarty P. K. (1993) Solubilization of inorganic phosphate by *Rhizobium*. *Folia Microbiol* 38:325-330.
- Halder A. K. Mishra A. K. Bhattacharyya P. Chakrabarty P. K. (1990) Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *J Gen Appl Microbiol*. 36: 81-92.
- Harley J. L. Smith S. E. Mycorrhizal symbiosis. London, New York: Academic Press, (1983).
- Hedley M. J. and J. W. B. Stewart. (1982). A method to measure microbial phosphorus in soils. *Soil Biol. Biochem*. 14: 377-385.
- Hong-Joo Son., Geun-Tae Park., Mi-sun Cha., Moon-Soo Heo., (2006). Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt-and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresource Technology*. 97: 204-210.
- Hwangbo H., Ro Dong P., Yong W. K., Yo Sup R., Keun H. P., Tae H. K., Jang S. S., Kil Y. K. (2003). 2-Ketogluconic Acid Production and Phosphate Solubilization by *Enterobacter intermedium*. *Current Microbiology* 47: 87-92.
- Illmer P. and Schinner F. (1992). Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. *Soil Biol. Biochem*, 24: 389-395.
- Illmer P. and Schinner F. (1995). Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms. *Soil Biol. Biochem*, 27: 257-263.
- Jain J., D. K. Sharma (2004) Biohydrometallurgy for Nonsulfidic Minerals-A Review. *Geomicrobiology Journal* 21: 135-144.
- Jaureguri, M., Reisenauer, H.M. (1982). Dissolution of oxides of manganese and iron by root exudates components. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 46: 314-317.
- Johri J. K., Surange S., Nautiyal C. S. (1999) Occurrence of salt, pH and temperature-tolerant, phosphate-solubilizing bacteria in alkaline soils. *Curr Microbiol* 39:89-93.
- Joveva, S., R. Nozinie, and V. Delie. (1991) Determination of intermediates in bioconversion of 2,5-diketo-D-gluconic acid by genus *Corynebacterium* by thin-layer chromatography. *Prehrambeno-tehnol. Biotehnol. Rev.* 29: 87-90.
- Klopper J. W. Lifshitz K, Schroth M. N. *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. *ISI Atlas Sci Anim Plant Sci* 1988. 60-64.
- Klopper J. W. Lifshitz K, Zablotowicz R. M. (1989) Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* 7: 39-43.
- Koide T. R. and Schreiner P. R. (1992) Regulation of Vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 557-581.
- Koneman E., Allen S., Janda W., Schreckenberger P., Winn W., (1999) "Diagnostico Microbiológico. Texto y Atlas a color. Quinta Edición-Editorial Panamericana.
- Krasilnikov M. (1961) On the role of soil bacteria in plant nutrition. *J Gen Appl Microbiol* 7: 128-144.
- Leong J. (1986) Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Annu Rev. Phytopathol* 24: 187-208.
- Lessie, T. G., Berka, T. and Zamanigian, S. (1979). *Pseudomonas cepacia* mutants blocked in the direct oxidative pathway of glucose degradation. *Journal of Bacteriology*. 139: 323-325.
- Lifshitz R, Klopper J. W. Kozlowski M. Simonson C, Carlson J. Tipping E. M., Zalesca I. (1987). Growth promotion of canola (rapeseed) seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. *Can J. Microbiol* 33: 390-395.

- Lindsay, W. L., and P. L. G. Vlek. (1977) Phosphate minerals, in *Minerals in Soil Environments*. J. B. Dixon and S. D. Weed, eds., Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin. Pp. 639-672.
- Liu, S.-T., Lee, L. - Y., Tai, C.-Y., Horng, C.-H., Chang, Y.-S., Wolfram, J.H., Rogers, R. D. & Goldstein, A. H. (1992). Cloning of an *Erwinia herbicola* gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli* HB101: Nucleotide sequence and probable involvement in biosynthesis of the coenzyme pyrroloquinoline quinone. *Journal of Bacteriology*, 174, 5814-5819.
- Lucas J., R. Flicoteaux, Y. Nathan, L. Prevot and Y. Shahar, 1980 Different aspects of phosphorite weathering, in *Symp. 10 Int. Congr. Sediment.* Society for Economic Paleontology and Mineralogy, Special Publication. Vol. 20, pp. 4-51.
- Maliha R., Samina K., Najma A., Sadia A., and Farooq L. (2004). Organic Acid Production and Phosphate Solubilization by Phosphate Solubilizing Microorganisms (MPS) Under *in vitro* Conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 7 (2): 187-196.
- Matsushita, K. E. Shinagawa, O. Adachi and M. Ameyama. (1990). Cytochrome *a₁* of *Acetobacter aceti* is a cytochrome *ba* functioning as ubiquinol oxidase. *Proc. Natl. Sci. USA*. 87:9863-9867.
- Matsushita, K., E. Shinagawa, O. Adachi and M. Ameyama. (1989). Reactivity with ubiquinone of quinoprotein D-glucose dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *J. Biochem*. 105: 633-637.
- Matsushita, K., H. Toyama and O. Adachi. (1994). Respiratory chains and bioenergetics of acetic bacteria. *Adv. Microbial. Physiol*. 36: 247-301.
- McConnell D. (1979) Biogeochemistry of phosphate minerals, in *Biochemical Cycling of Mineral-Forming Elements (Studies in Environmental Science 3)*. P. A. Trudinger and D. J. Swaine. eds., Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, 163-304.
- Mikanova O, Kubat J., Simon T, Vorisek K, Randova D. (1997) Influence of soluble phosphate on P-solubilizing activity of bacteria. *Rostlinna-Vyroba-UZPI*. 43: 421-424.
- Motsara, M. R., P. B. Bhattacharyya and B. Srivastava. (1995). *Biofertilizers their Description and Characteristics In: Biofertilizer Technology, Marketing and Usage, A sourcebook – cum - Glossary*. Fertilizer development and consultation organization 204-204 A Bhanot Corner, 1-2 Pamposh Enclave, New Delhi, 110048, India, pp: 9-18.
- Murty M. G., Ladha J. K. (1988) Influence of Azospirillum inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydroponic conditions. *Plan Soil* 108: 281-285.
- Nautiyal S. C. (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170: 265-270.
- Nikolay V., Vassileva M., Fenice M., Federici F. (2001). Immobilized cell technology applied in solubilization of insoluble inorganic (rock) phosphates and P plant acquisition. *Biores. Technol*. 79: 263-273.
- Oubrie, A. B. W. Dijkstra, (2000). Structural requirements of pyrroloquinoline quinone dependent enzymes. *Protein Sci*. 9:1265-1273.
- Oubrie, A. H. H. J. Rozeboom and B. W. Dijkstra. (1999) Active-site structure of the soluble quinoprotein glucose dehydrogenase complexed with methylhydrazine: A covalent cofactor-inhibitor complex. *Proc. Natl. Sci. USA*. 96: 11787-11791.
- Paul E. A, Clark F. E. *Soil Microbiology and Biochemistry*, San Diego, CA: Academic Press, (1988). 1157-1168.

- Pedro G., and J. Sieffermann, (1979) Weathering of rocks and formation of soils, in *Review of Research on Modern Problems in Geochemistry*, Vol. 16. F. R. Siegel ed., Earth Sciences (UNESCO), Paris, 39-55.
- Pretsch E., Clerc T., Seibl J., and Simon W. (1980) “Tablas para la Elucidación de estructuras de Compuestos Orgánicos por Métodos Espectroscópicos”. Alambra, Madrid, 1980.
- Pujol C. J. and Kado C. I. (1999) *gdhB*, a gene encoding a second quinoprotein glucose dehydrogenase in *Pantoea citrea*, is required for pink disease of pineapple. *Microbiology*. 145: 1217-1226.
- Pujol C. J. and Kado C. I. (2000) Genetic and Biochemical Characterization of the Pathway in *Pantoea citrea* Leading to Pink Disease of Pineapple. *Journal of Bacteriology*, 182 (8): 2230-2237.
- Raju, R.A. and M.N. Reddy. (1999). Effecto of rock phosphate amended with phosphate solubilizing bacteria and farmyard manure in wetland rice (*Ortyza sativa*). *Indian J. Agril. Sci.*, 69: of 451-453.
- Rengel Z. and P. Marschner. (2005). Nutrient availability and management in the rhizosphere: exploiting genotypic differences. *New Phytologist*. 168: 305-312.
- Rodríguez H, Fraga R. (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. 17, 319-339.
- Rodríguez H., Gonzalez T., Goire I., Bashan Y. (2004) Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum spp.* *Naturwissenschaften* 91: 552-555.
- Rodríguez H., Gonzalez T., Guillermo S. (2000) Expresión of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. *J. Biotechnol* 84:155-161.
- Ronald A. (2002). The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *Am J Med*. 8; 14-19.
- Sangeeta M., and Chandra Shekhar Nautiyal. (2001) An Efficient Method for Qualitative Screening of Phosphate-Solubilizing Bacteria. *Curr Microbiol* 43: 51-56.
- Scheffer F. and Schachtschabel P. (1992) *Lehrbuch der Bodenkunde*. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
- Silverstein R. M., Bassler and T. C. Morrill (1991) *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 5th Ed., Wiley, p 506-508.
- Sivan A, Chet I. (1992) Microbial control of plant diseases. In: Mitchell R, editor. *Environmental Microbiology* New York: Wiley-Liss, 335-354.
- Steven A. Wakelin, Rosemary A. Warren, Paul R. Harvey, Maarten H. Ryder. (2004) Phosphate solubilization by *Penicillium spp.* Closely associated with wheat roots. *Biol Fertil Soils*. 40: 36-43.
- Stewart J. W. B., and McKercher R. B. (1982). Phosphorus cycle. In “Experimental Microbial Ecology” (R. G. Burns and J. H. Slater, eds.). 221-238. Blackwell, Oxford.
- Styriakova I., Styriak I., Nandakumar M. P. and Mattiasson B. (2003) Bacterial destruction of mica during bioleaching of kaolin and quartz sands by *Bacillus cereus*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 19: 583-590.
- Su LH, Ou JT, Leu HS, Chiang PC, Chiu YP, Chia JH, Kuo AJ, Chiu CH, Chu C, Wu TL, Sun CF, Riley TV, Chang BJ. (2003). Extended epidemic of nosocomial urinary infections caused by *Serratia marcescens*. *Journal of Clinical Microbiology* 41(10); 4726-4732.

Diaz (1991), comparando un bosque natural intervenido, una plantación de pino y una de teca, reporta pérdidas de nitrógeno en la hojarasca de esta última y argumenta que la causa puede ser dada, por el efecto del lavado de lluvia. No obstante, sus valores de nitrógeno en la hojarasca (58.36 kg/ha) se aproximan a los obtenidos en este estudio (65.45 kg/ha). A su vez Nwoboshi (1980), en una plantación de teca de 25 años, reporta una cantidad similar aunque ligeramente inferior (49.4 kg/ha).

Según Puig y Delobelle (1988), un valor promedio del aporte de nitrógeno por la hojarasca de los bosques tropicales, se ubica alrededor de los 115 kg/ha. Vitousek (1984), evalúa 62 bosques tropicales (de edades y biomasa variables) con un rango de valores que van desde 7 kg/ha hasta 224 kg/ha.

En el caso particular de la teca los valores se sitúan por debajo de los 100 kg/ha. Esto se corresponde con lo observado por Egunjobi (1974), en la que los bosques y plantaciones de teca contienen mucho menos nitrógeno que los bosques mixtos siempre verdes y deciduos del Africa.

5.2.2.2.Fósforo

Bajo sistemas de pastos con una alta densidad de raíces en la superficie del suelo, el fósforo es continuamente revertido en forma orgánica (Blair et al 1976, en Kuo y Jellum, 1987). Esto induce a pensar que la comunidad de gramíneas minimiza las pérdidas transfiriendo parte de los nutrientes acumulados hacia los órganos subterráneos, que en estas especies son los únicos órganos perennes (Sarmiento, 1984). Lo anterior se puede

aplicar a la cantidad de fósforo correspondiente a la plantación dominada por el pastizal.

La proporción de este elemento contenida en los residuos de la plantación intermedia, es la más baja en comparación con los otros dos rodales.

Una de las consecuencias de las divergencias entre las especies, es su variación en la capacidad relativa para competir por la reserva de fósforo (Black, 1975). Por lo tanto, variará tanto la demanda, como el almacenamiento y retorno del elemento en función de cada especie en particular. Las diferencias significativas entre la hojarasca de hojas mixtas y las de tecas refuerzan estas afirmaciones.

Babbar y Ewel (1989), detectaron la presencia de compuestos fosfatados muy poco solubles en suelos de parcelas de sucesión, en tanto, observaron un patrón de mayor solubilidad en un monocultivo arbóreo (*Cordia alliodora*).

Proporcionalmente al elevado aporte de hojas de teca de la plantación pura, la cantidad de fósforo se limita mayormente a esa fracción. Es decir, el análisis de nutrientes en el final de la época seca daría como resultado que la hojas de teca aportarían una mayor cantidad de este elemento debido al aumento de masa en el suelo.

El valor es semejante al encontrado por Diaz (1991) con 4.80 kg/ha en las hojas y 5.41 kg/ha en la hojarasca total de la plantaciones de Ticoporo. Así mismo, Maheut y Dommergues (1960) ubican en 0.10 % de fósforo (correspondiente al peso seco), en plantaciones de teca de Senegal, relativamente similar a nuestro caso (0.09 %).

5.2.3.Potasio

La plantación del año 88, presentó la mayor cantidad por parte de este nutriente.

Esto puede relacionarse con la característica de las gramíneas, las cuales tienen la tendencia de acumular una mayor cantidad de potasio en sus tejidos (Szott y Palm, 1984; Singh, 1989). Comparando el contenido de nutrientes entre comunidades arbóreas y gramíneas, Bernhard Reversat (1986) clasifica el potasio como el elemento más abundante de la biomasa aérea perteneciente a las gramíneas.

La plantación del año 78, mostró un valor bajo, en comparación con otros estudios similares. En Ticoporo, Diaz (1991), obtiene una diferencia de más de 24 kg/ha en hojarasca de teca. No obstante esta diferencia pudo originarse dado que su muestreo se efectuó en la época seca y en el presente caso la fácil lixiviación del potasio luego de la temporada de lluvias, se traduce en una baja de este elemento. En Nigeria, Egunjobi (1974) reporta una media de tres mediciones consecutivas de 71 kg/ha {ds:9.31 }, en tecas establecidas hace 15 años.

Hase y Foelster (1983), en la región vecina de Caparo, encontraron un 70 % de potasio almacenado en la vegetación de 9 años de edad.

Puede afirmarse, que a pesar de la amplia movilidad de este elemento su permanencia en la biomasa viva puede tener un sensible efecto atenuante sobre su ciclaje en el sistema. En plantaciones forestales, el ciclo del potasio adquiere un carácter cerrado, ya que al desarrollarse el rodal, se acumula potasio en las plantas y a través de la producción de hojarasca y su

descomposición, se establece una relación suelo-bosque, muchas veces estable (Fassbender y Bornemisza, 1987). Por lo general, la pequeña cantidad que permanece en la hojarasca, es lo retenido por los organismos heterótrofos (Babbar y Ewell, 1989).

5.2.4. Calcio

La teca se destaca por contener en su sistema una elevada proporción de calcio. Esta especie, por su condición de planta cálcicola, extrae abundante calcio del suelo y repone altas cantidades a través de la hojarasca, en comparación con otras especies deciduas. Esta aseveración es reportada a nivel mundial por la mayoría de los trabajos relacionados con plantaciones de teca (Maheut y Dommergues, 1960; Seth y Kaul, 1980; Singh y Ambasht, 1980; Hase y Foelster, 1983, Adejuwon y Ekanade, 1980; Nath et al, 1988).

Independientemente de esta particular concentración de calcio en esta especie, este es un patrón general, comúnmente observado en otras plantas. La proporción de calcio de las hojas tiende a incrementarse durante la senescencia en contraste con la baja de otros nutrientes (Brown, 1974, en Swift et al, 1979; Golley, 1983; Cornforth, 1970). Esto se puede asociar nuevamente, a su ubicación y funcionalidad como componente estructural de la lámina media, en la cual es retenido con mayor intensidad hasta que se inicie la desintegración de las paredes celulares (Attiwill, 1968, en Babbar y Ewell, 1989). Por otra parte, a partir de una revisión sobre los bosques húmedos tropicales, Jordan y Kline (1972) califican como lenta la tasa de ciclaje del calcio.

5.2.5.Magnesio

Al igual que su comportamiento a través del perfil del suelo, en la hojarasca su movilidad no esta bien definida. González-Iturbe (1988), menciona tres autores que lo llevan a calificar el magnesio como un elemento semimóvil dentro de la planta: puede acumularse en las hojas (Golley, 1983), puede ser retranslocado en el interior de la planta (Larcher, 1977) o ser fácilmente lavable por la lluvia (Parker, 1983).

Los resultados mostraron una mayor cantidad de magnesio por parte de la plantación recién establecida.

Allí, la presencia de este elemento puede tener tanto relación con los restos orgánicos depositados por la vegetación anterior como por el tipo de planta dominante de esa comunidad. Sánchez et al (1985), afirman la presencia de este elemento en ambientes deforestados, por la lenta descomposición de troncos producto del bosque original. Szott y Palm (1984), afirman que posterior a una intervención o al inicio de una sucesión, el magnesio puede aumentar en la capa superficial del suelo ya que este elemento es liberado por descomposición de ramas, troncos y raíces y es retenido fuertemente en ese nivel. Las herbáceas, del mismo modo concentran su actividad en ese estrato. Por otro lado, si consideramos que el magnesio, es responsable de la alta pigmentación verde de los pastizales, es de esperar que este elemento circule y sea retenido con mayor fuerza por esa comunidad.

Un aspecto que debe considerarse, en relación a los otros nutrientes, es que por lo general, cuando aumenta la absorción de potasio, disminuye la del magnesio (Malavolta, 1980). Tal como se expuso anteriormente, esta

comunidad se caracterizo por un elevado valor de potasio, pudiendo por lo tanto repercutir sobre la absorción y ciclaje del magnesio.

Asimismo, tanto el rodal de edad intermedia como la plantación adulta presentaron una cantidad relativamente baja (en comparación con la anterior), y esta, puede relacionarse con el antagonismo que se presenta entre el magnesio y el calcio.

El valor obtenido de la plantación del año 78 (20.85 kg/ha), corresponde al rango de valores detectados en otros trabajos. En Nigeria: 21.56 kg/ha (Egunjobi, 1974) y 22.00 Kg/ha (Kaul et al, 1979), en Ticoporo: 29.20 kg/ha (Diaz, 1991). En términos generales, y en comparación con otros bosques tropicales este nutriente es el que presenta uno de los rangos de menor variación entre los diferentes ecosistemas boscosos.

www.bdigital.ula.ve

5.2.3. Integración de los bioelementos en la hojarasca

Es necesario recordar que estos resultados no constituyen un "aporte" representativo de cada plantación, dado que los valores son producto de un muestreo realizado y producido únicamente durante una estación del año. Por ello, se procuro hablar de "cantidades" como un valor parcial contenido en la hojarasca de cada comunidad.

La suma global de los nutrientes estudiados en cada plantación (figura 13), demuestra que existe una diferencia bien marcada entre la cantidad del rodal recién establecido (88: 308 kg/ha) y la de los dos rodales subsiguientes (83: 225 kg/ha y 78: 212 kg/ha). Debe acotarse, nuevamente, que estos valores

dependen por una parte, de su concentración química y por otra, de la cantidad de biomasa muerta que, indirectamente se reflejan sobre el valor resultante. No obstante, en términos reales, esto es la cantidad que para el momento del muestreo, se encontraba en la hojarasca en el suelo de cada plantación.

El comportamiento de los bioelementos nutritivos actúan por igual, en las diferentes comunidades vegetales. Sin embargo, cada una de ellas, debido al tipo de plantas dominantes que posean, hacen un uso diferencial de cada uno de estos bioelementos. Es decir, utilizan, devuelven y reciclan cada nutriente según sus requerimientos fisiológicos particulares. Esto es reafirmado por Pritchett (1986), al comentar que la hojarasca consta de un gran número de compuestos orgánicos complejos, cuyos porcentajes relativos varían con las diferentes especies y en las distintas partes de la planta. Por otro lado, su estructura física y ritmo fenológico condicionan aún más el uso de estos bioelementos. Así por ejemplo, Proctor (1987) en base a los trabajos de Grubb y Edwards (1982) menciona que existen amplias diferencias interespecificas en la composición química de los bosques lluviosos tropicales. Así mismo, la composición química de las hojas puede (Tanner, 1985) ó no (Grubb y Edwards, 1982) estar correlacionada con los nutrientes contenidos en la biomasa maderable. Sánchez (1987), sugiere que algunos árboles o hierbas pueden selectivamente acumular ciertos nutrientes y cita algunos ejemplos: las palmas son ricas en potasio (Folster et al, 1976), los helechos arborescentes acumulan nitrógeno (Mueller Dombois et al, 1984) y los yagrumos acumulan calcio y fósforo en los suelos ácidos (Odum y Pigeon, 1970).

Con relación a nuestros datos, los elementos dominantes fueron el nitrógeno y el potasio (66%), para la plantación recién establecida y el calcio y el nitrógeno para las dos ultimas (83: 78% y 78: 81%); respecto al

fósforo, la plantación del 78 tiene similar cantidad que la del 88, indicando el aumento en la concentración de fósforo en la hojarasca del rodal adulto de teca en relación al pastizal

Según los estudios realizados por Singh (1989) en la que compara las sabanas y los bosques deciduos de teca, encuentra cantidades similares de nitrógeno y fósforo en la hojarasca de ambas, pero las cantidades de potasio son superiores en más del doble en las comunidades de sabanas.

En una revisión sobre el rango de los nutrientes contenidos en la capa de hojarasca de varios bosques tropicales, Sánchez (1973) reporta los siguientes valores (kg/ha/año): N:74-199 P:1-7 K:8-81 Ca:45-220 Mg:10-94. Los valores obtenidos en el presente trabajo se ubican dentro de estos rangos.

5.2.4. Contribución de los residuos

a la fertilidad del suelo

Dado que la edafología se basa en el estudio del binomio planta-suelo, una de sus principales ramas de investigación se orienta hacia el examen cuantitativo y cualitativo de los aportes orgánicos que se incorporan al suelo (Toutain, 1987). La caída de hojarasca y la restitución al suelo de los elementos que la constituyen, representa uno de los flujos más importantes del ciclo biogeoquímico en los ambientes forestales y la cuantificación de ese flujo tiene una importancia capital, tanto en lo que concierne a la materia orgánica como a los elementos biogénicos que la componen (Santa Regina et al, 1989).

La materia macroorgánica estrechamente unida a la superficie del suelo es definida como la hojarasca (Stevenson y Elliot, 1989) y constituye el mayor patrón de transferencia de las partes aéreas vegetales (Lonsdale, 1988) al suelo. Este último, empieza a validar su potencial de momento que entran en juego los mecanismos de circulación de nutrientes, de los cuales él es el mayor emisor y receptor. El papel desempeñado por la hojarasca es sin duda fundamental, dado que representa una fuente de "energía" que se incorpora al suelo y transita por entre sus horizontes (Toutain, 1987). Esa energía se concentra en el mantillo orgánico y en los elementos biogénicos que lo componen.

Por otra parte, la resolución del problema del mantenimiento y del incremento del potencial productivo de los suelos forestales, implica un conocimiento profundo de los procesos de evolución biológica que están estrechamente ligados a la naturaleza de la hojarasca producida por cada plantación en particular (Maheut y Dommergues, 1960). En las zonas tropicales la circulación de nutrientes a través de la caída del follaje y su rápida recirculación, compensa la escasa productividad y fertilidad del suelo (Salas, 1984). Cuando los nutrientes están continuamente extraídos del suelo, bien sea por la lluvia o la planta, la velocidad con que se reponga esa pérdida, es un factor clave en la productividad de los sistemas forestales (Babbar y Ewel, 1989). En relación a las sabanas, el nivel de fertilidad es generalmente evaluado mediante el análisis de las capas superficiales del suelo, pero este puede tener poca relación con el desarrollo de la vegetación natural que soporta (Medina y Silva, 1990).

La información obtenida a partir del análisis químico de la hojarasca permite establecer su mayor o menor contribución a la fertilidad del suelo.

En nuestro estudio, la comparación secuencial de tres plantaciones de diferentes edades, demuestra en primer lugar que la calidad o tipo de residuos difiere según la cobertura dominante de cada comunidad. A su vez, la composición del mantillo orgánico representativo de cada comunidad, incidirá sobre el tipo de humus que tenderá a formarse. El humus formado, presentará igualmente, una calidad, estabilidad y capacidad para interactuar con la dinámica fisicoquímica del suelo. En resumen, las adiciones orgánicas representadas por la hojarasca y su posterior tasa de descomposición reflejarán el balance nutricional del suelo.

Si se compara la biomasa viva acumulada por las tres plantaciones podría explicarse parcialmente la razón de la disminución de la tasa de retorno de los nutrientes a la superficie del suelo. La plantación más joven, compuesta casi exclusivamente por gramíneas, se limita a explotar sólo las capas superficiales del suelo (Medina y Silva, 1990). La eficiencia del uso de los nutrientes es en esos sistemas (en comparación con los bosques deciduos) es relativamente baja (Singh, 1989). La constitución fisiológica no se basa en la construcción de un tejido fuertemente lignificado, sino en promocionar una estructura que requiere de la formación de células en permanente renovación.

En oposición, año tras año, el rodal puro fue edificando una biomasa que a la par de ir almacenando ciertos nutrientes, se producía una devolución de un porcentaje de ellos, a fin de establecer un ciclaje de mayor dimensión. Los mecanismos que operan en ese ecosistema son mucho más estables y el ciclo de nutrientes se hace más eficiente, aunque a un ritmo mucho más lento que los

sistemas de sabanas (Singh, 1989). Se requirió de un tiempo mucho más prolongado para la constitución física de la biomasa viva, la cual paralelamente fue almacenando cierta cantidad de nutrientes. Salas (1987), demuestra que se han reportado cantidades apreciables de nutrientes inmovilizados en plantaciones de especies forestales tropicales, especialmente de calcio y magnesio y en menor medida de potasio (Lundgren, 1978, Cornforth, 1970; Hase y Foelster, 1980). La densidad y edad del bosque determinarán la cantidad de hojarasca producida y por ende la cantidad de nutrientes devueltos al suelo (Chatuverdi y Singh, 1987).

Todos esos atributos, permiten evidenciar como la evolución de cualquier ecosistema esta dirigida a maximizar un estado de equilibrio a partir de un balance adecuado entre sus componentes bióticos y abióticos que lo conforman. Particularmente, en los ecosistemas vegetales, ese nivel de autosustento, depende de la capacidad para acumular y recircular los elementos que se liberan a través de la hojarasca.

El proceso de descomposición de la hojarasca conlleva a dos mayores funciones: la mineralización de los elementos esenciales y la formación de materia orgánica (Swift et al, 1979). El nivel de materia orgánica del suelo estará indudablemente relacionado con el tipo de vegetación, y en el trópico esta tendrá un carácter más relevante bajo vegetación boscosa que bajo vegetación de cualquier otro tipo (Morris, 1983). Más aún, bajo vegetación forestal, los suelos sufren alteraciones genéticas por acumulación y degradación paulatina de grandes volúmenes de materia vegetal en la superficie de los mismos. Este es el caso detectado por Nath et al (1988) en la que un suelo bajo plantaciones de teca (28 años), originalmente calificado como Inceptisol se convirtió en un Molisol. Los suelos denominados Molisoles ocupan inmensas áreas en las regiones templadas así como áreas mas pequeñas en los

trópicos; comúnmente tienen un horizonte A grueso, que con frecuencia es particularmente rico en materia orgánica (Alexander, 1980). La producción y descomposición de hojarasca, aunado a una fuerte actividad del sistema radicular de los árboles, genera un enriquecimiento progresivo de materia orgánica, que se traduce en un efecto positivo sobre la fertilidad del suelo. En suma, las poblaciones forestales se destacan por su doble actividad: mientras más consumen, más enriquecen los horizontes superficiales (Maheut y Dommergues, 1960).

www.bdigital.ula.ve

5.3.BIOENSAYO DE FERTILIZACION

5.3.1.Consideraciones previas al bioensayo y su relación con la hipótesis planteada

5.3.1.1. La metodología

Uno de los procedimientos para diagnosticar la deficiencia de nutrientes, se basa en la aplicación de bioensayos. Por lo general estos métodos se desarrollan en ambientes artificiales que intentan reproducir lo más fielmente posible las condiciones naturales. El uso y la validez de estos, pueden ser apropiados para ciertas disciplinas en especial. Por ejemplo, en el medio silvicultural estos bioensayos se llevan a cabo en viveros, con plántulas colocadas en macetas. Las técnicas permiten detectar síntomas visuales y analizar los tejidos de reciente formación; en plántulas de teca, pueden mencionarse los trabajos de Kaul et al (1972).

Sin embargo, los requerimientos nutricionales de las plántulas no reflejan necesariamente el de los árboles adultos. Por otro lado, la variabilidad característica del crecimiento arbóreo y la influencia de las condiciones edafoclimáticas dificultan la selección del procedimiento más idóneo con fines de diagnóstico.

A tal efecto, la distribución de la biomasa radical como indicadora de los sitios de mayor captación de nutrientes por parte de la planta, ha servido como fundamento en numerosas investigaciones (Cornforth, 1970; Berish, 1982; Srivastava et al, 1986; Cuevas y Medina, 1988). Eventualmente, los análisis foliares sirven como indicadores (p.e. Tanner et al, 1990), aunque con una

respuesta no tan inmediata. De hecho, los nutrientes son absorbidos en primer instancia por las raíces y la respuesta es más evidente que en otro tejido con capacidad de transferencia (Bowen, 1984). Por lo demás, la biomasa de raíces y su producción generalmente presenta un patrón espacial paralelo a la superficie del suelo (Anderson y Flanagan, 1989), lo que permite su fácil ubicación y obtención. Por lo general, en la teca, la mayor cantidad de raíces está distribuida entre los primeros 30 cm superficiales (Maheut y Dommergues, 1960; Bell, 1973; Balbuena, 1980; Hase 1981 en Raet, 1987; Srivastava et al. 1986).

En ambientes tropicales de escasa fertilidad, la proporción de raíces finas tiende a ser mayor (Klinge y Herrera, 1978; Berish, 1982; Vitousek y Sanford, 1986) por lo que la fertilidad del suelo puede ser inversamente proporcional a la masa de raíces (Berish y Ewel, 1988). Tomando en cuenta esta afirmación, se puede extrapolar que la producción de la biomasa radicular será menor si hay abundancia de nutrientes. No obstante, la aplicación de un nutriente limitante produce un verdadero estímulo sobre el crecimiento inicial radical (Cuevas y Medina, 1983).

Considerando la variación en los rangos reportados en la literatura sobre la biomasa radical, los resultados obtenidos en el presente estudio, se ajustan al promedio reportado en otros trabajos. Por ejemplo, Raich (1982 en Gower, 1987) reporta 289 g/m² en la estación La Selva de Costa Rica; Cuevas y Medina (1988) en San Carlos de Rio Negro reportan 95 y 214 g/m²; Srivastava et al (1986) en plantaciones de teca de la India reportan 69.8 y 208.5 g/m²; Diaz (1991) en plantaciones mixtas de teca y pino en Ticoporo reporta (de un muestreo a principios de la época de lluvia) 45 g/m².

5.3.1.2. Fósforo y fertilización

La escogencia del fósforo como nutriente seleccionado, se debe a una serie de argumentos que lo ubican como un elemento limitante en un amplia variedad de ecosistemas terrestres tropicales. Su alta estabilidad, es decir su baja movilidad en el suelo es la razón inmediata de su deficiencia para las plantas, además es un hecho bien conocido que muchos suelos tropicales tienen una capacidad extrema para inmovilizar el fósforo (Sánchez, 1976). La escasa producción de algunos agroecosistemas tropicales se debe con más frecuencia a una falta de fósforo que a la deficiencia de cualquier otro elemento, a excepción quizás del nitrógeno (Tamhane et al, 1978; Anderson et al, 1989).

Estudios previos (Franco, 1989; Díaz y Franco, 1988; Cuevas et al, 1989), han señalado ciertas limitaciones por fósforo (ver anexo 2) en las plantaciones de teca de Ticoporo.

Una alternativa inmediata de acción en el establecimiento y manejo de plantaciones forestales, es la intervención directa a través de la fertilización, con base a las deficiencias naturales del suelo y de las exigencias de las especies.

Debido a su particular comportamiento y a sus interrelaciones con los demás componentes y variables del medio edafológico, el fósforo puede constituir un elemento clave en la obtención de los máximos niveles de producción tan deseados en los actuales agroecosistemas de amplios y forzados rendimientos.

A pesar de que el uso de fertilizantes para incrementar la productividad de los sistemas forestales no constituye un concepto nuevo (Ballard, 1986; Pritchett, 1986; Salas, 1987), se requiere de considerables esfuerzos para investigar sus respuestas cuantitativas (Ballard, 1986) y más aún en el medio tropical (Bowen y Nambiar, 1984). Para el caso específico de las plantaciones de teca, la fertilización ha sido ampliamente recomendada (Bhatnar et al, 1969; Bell, 1973; Sakartiko, 1981 en Bruijnzeel y Wiersum, 1985; Hase y Foelster, 1983; Kishore, 1987; Franco, 1991)

Aunque en los últimos años se han obtenido excelentes resultados con la aplicación de abonos fosfatados, existen severas críticas negativas (Karlovsky, 1981; Bolin et al, 1983) por la imposición del excesivo uso del fósforo en una gran mayoría de agroecosistemas, alterando su repartición proporcional en los diferentes ciclos en los que interviene. Sin embargo las implicaciones ecológicas no deben descartarse sino ser objeto de investigaciones paralelas a las de su real efectividad y necesidad.

El efecto más evidente de la adición de fósforo se manifiesta sobre el sistema de raíces de la planta, dado que fomenta la formación de raíces laterales y fibrosas (Tamhane et al, 1978). Según Gower (1987), el fósforo (junto con el calcio) ejerce una mayor influencia sobre la distribución de raíces finas en los bosques tropicales de tierras bajas, del mismo modo que el nitrógeno de los bosques templados. Similar conclusión es dada por Cuevas y Medina (1983) en los suelos oligotróficos de la Cuenca Amazónica.

Debido a que los fertilizantes fosfatados obviamente contribuyen al desarrollo de las raíces de las plántulas y con frecuencia quedan disponibles en el suelo durante muchos años después de la fertilización, se ha hecho costumbre aplicarlos en las primeras etapas de la vida de las plantaciones (Pritchett, 1986).

La dosis utilizada (423 kg/ha), se ajusta a los efectos de un bioensayo, considerando que su objetivo es determinar si hay o no respuesta frente a la adición del fósforo.

Tomando en cuenta la dinámica del fósforo en relación al régimen hídrico imperante en la zona, la puesta en marcha del bioensayo coincidió con el inicio de las lluvias. El aprovechamiento y difusión del fósforo por las plantas se origina en las regiones tropicales estacionales durante la estación lluviosa (Solarzano, 1989). El clima y particularmente la precipitación, es una variable que ayuda y desencadena los procesos de liberación de nutrientes (Swift y Lavelle, 1987).

5.3.2. Cuantificación de la biomasa radical

Es importante aclarar que cada edad se caracteriza por poseer un tipo de vegetación, bien sea dominante o mixta.

En la del año 78, el substrato esta poblado exclusivamente de raíces y raicillas de teca. En tanto que la plantación del 83 esta constituida por una mezcla de teca, vegetación secundaria y gramíneas y la del 88 esta dominada por un pastizal denso.

Esto implica que las diferentes especies de plantas tengan requerimientos nutricionales y hábitos de crecimiento específicos por lo que varían sus necesidades de fósforo, así como su habilidad para utilizar las diversas formas de ese elemento en el suelo (Solarzano, 1989). La configuración del sistema radical, la asociación micorrizica y la tasa de crecimiento son los caracteres que influyen sobre la tasa de extracción de fósforo por las plantas (Bolan, 1991; Tiessen, 1991). Independientemente del tipo de vegetación, la disponibilidad de fósforo para las plantas es dinámica y sus niveles pueden variar estacionalmente en respuesta a las reacciones biológicas y químicas del suelo (Kuo y Jellum, 1987).

En el primer rodal, donde hay predominancia de gramíneas, hay una producción baja y sostenida de raíces, tanto en el control como en los tratamientos. Esto sugiere que esta comunidad tiene bajos requerimientos de este elemento y podría estar utilizando el fósforo lábil de origen orgánico de la vegetación anterior.

En plantas herbáceas de las sabanas de Centro América, Kellman (1989) detecta una mayor acumulación de potasio, calcio y magnesio en los tejidos vivos de las plantas, no así de fósforo. Del mismo modo comparando la cantidad de elementos minerales del estrato herbáceo de una plantación de *Eucalyptus camaldulensis* con un bosque natural, Bernhard-Reversat (1986), halla los valores más bajos para el caso del fósforo y los valores más altos para el resto de los elementos.

En el rodal de edad intermedia, se destaca un fuerte ascenso en la biomasa radicular a medida que progresa el tiempo.

Cabe destacar que la presencia de numerosas y diferentes especies contribuye en gran parte a ese incremento radical (Berish y Ewel, 1988).

Cuando se tienen poblaciones mixtas estas poseen una elevada población radicular, explotando al máximo el área de suministro nutricional en comparación con poblaciones monoespecíficas (Pritchett, 1986). En general en parcelas sucesionales la aparición de un gran número de especies (Vitousek y Reiners, 1975) refleja la ocupación del suelo por el elevado volumen de raíces.

Los amplios rangos de producción radical observados, pueden tener relación con las diferencias de absorción y requerimientos del fósforo, así como a la densidad y penetración radical de la variedad de especies presentes en ese rodal. Algunas especies son mucho más sensibles que otras al suministro de fósforo por el suelo. Black (1975), afirma que las especies vegetales difieren mucho más en su carácter individual de reacción frente al suministro de fósforo que al de nitrógeno y potasio. Su planteamiento se basa en el requerimiento, uso del fósforo y características del sistema radical de cada planta en particular. Ballard (1986), establece el patrón de acumulación del fósforo y la biomasa de los árboles forestales, e indica que el mismo varía con la edad y el período de desarrollo.

A su vez, esta plantación puede también estar utilizando el fósforo lábil proveniente de la vegetación anterior, por lo tanto no tendría una respuesta a la adición del elemento.

Hase (1981 en Raet, 1987) encontró reservas más altas de fósforo bajo bosque secundario que bajo el bosque natural maduro, y establecía la relación debido a las quemas anteriores a las que fueron sometidos estos suelos. Sin embargo, Cornforth (1970), detectó que con la eliminación de un bosque siempre verde y su sustitución por una reforestación de Pinus caribbea, luego de la quema hubo un leve incremento del fósforo disponible, pero en los siete años sucesivos las reservas de fósforo disminuyeron y nunca lograron alcanzar sus

valores originales. Egunjobi (1963) y Onotoso (1971) citados por Adejuwon y Ekanade (1988) han notado que en las áreas de los bosques del sur-oeste de Nigeria las reservas de fósforo fueron agotadas desde que los árboles fueron removidos.

Cuando la plantación alcanza un desarrollo dominante, es decir cuando el dosel se cierra por completo y la integran sólo los individuos de teca, la biomasa de raíces es exclusiva de esa especie.

En respuesta a la aplicación del elemento, esta se hace significativa entre los tratamientos a los 180 días. Se podría afirmar que existe un secuestro del nutriente en la biomasa y recircula sólo lo que se reincorpora como residuo. Si se toma en cuenta que el sistema llega a una etapa en la que se inicia un ciclo interno de nutrientes, es muy probable que no retorne al suelo lo consumido durante sus etapas de desarrollo. La masa de raíces finas producidas por el fósforo es similar a la cantidad de raíces del rodal intermedio, el cual no refleja limitación nutricional de este elemento.

Este es el caso expuesto por Geigel (1977), en el que estudiando la restitución de nutrientes devueltos al suelo mediante la hojarasca de diversas especies, entre ellas la teca, obtuvo los mayores niveles para el N, Ca y Mg y los más bajos para el P y el K.

En una serie de estudios sobre el efecto de fertilizantes fosfatados en plantaciones de teca (Kishore, 1987), los análisis concluyeron que la aplicación del fosfato incrementó notablemente el crecimiento en altura de las plantas de teca, en los dos primeros años iniciales al tratamiento. Bhatnagar et al (1969) indican que para un buen crecimiento en las etapas primarias de desarrollo, la teca requiere de cierta dosis de fertilizante fosforado. La absorción en las primeras plantaciones reduce los nutrientes del suelo hasta niveles que limitan el crecimiento y se necesita un uso liberal de roca

fosfatada para estimular un crecimiento inicial vigoroso de manera que los arboles jóvenes puedan predominar sobre las herbáceas competidoras (Pritchett, 1986).

Las deficiencias en fósforo tienen mayores probabilidades de desarrollarse en los bosques manejados de manera intensiva (Pritchett, 1986). Adejuwon y Ekanade (1988) destacan que la cantidad de fósforo en el subsuelo es significativamente más alta en la selva nublada que bajo plantaciones de *Gmelina arborea*, *Tectona grandis* y *Terminalia superba*.

Se puede concluir que la limitación nutricional se manifiesta en los rodales de mayor edad, donde la disponibilidad proviene principalmente del ciclaje interno de nutrientes. El fósforo ha sido utilizado durante las sucesivas etapas de crecimiento, lo que a la larga incidirá sobre la producción y el aspecto fitosanitario del sistema forestal.

www.bdigital.ula.ve

VI CONCLUSIONES

El manejo y el tiempo previo al establecimiento de las plantaciones de teca de 2, 7 y 12 años presentan una relación directa con los resultados obtenidos.

El efecto de la reforestación a partir de una plantación monoespecífica de teca, se reflejó parcialmente en el incremento del contenido de materia orgánica y bases cambiables en el suelo de la plantación de mayor edad.

La plantación recién establecida concentra mayormente sus efectos en los primeros diez centímetros del perfil.

El rodal de mayor edad distribuye sus efectos a lo largo del perfil muestreado (40 cm). Esto es producto de la influencia de su sistema radical.

La plantación de edad intermedia se caracterizó por mostrar un descenso en la mayoría de las variables químicas estudiadas. Este comportamiento puede atribuirse a su carácter de comunidad transitoria de crecimiento exponencial, que se traduce en un mayor requerimiento de nutrientes siendo esto último reflejado en el perfil del suelo.

La teca tiene un efecto directo sobre la acumulación de calcio, tanto en el perfil del suelo como en la hojarasca que produce.

El aumento en la cantidad de calcio de la plantación adulta, podría provocar la precipitación de fósforo (como fosfato de calcio), disminuyendo la disponibilidad de este elemento.

La relación carbono/nitrógeno del suelo resultó elevada para las tres edades, indicando una lenta descomposición de los residuos producidos por cada comunidad. Esto se corresponde con lo observado por Alceste (1991), en la cual los procesos de descomposición de la hojarasca de teca ocurren a un ritmo relativamente lento.

La evaluación de la producción de hojarasca a finales de dos épocas climáticas, evidencia la fenología contrastante de cada una de las comunidades dominantes en cada plantación.

La concentración del aporte mayoritario de los elementos que circulan en cada comunidad a través de los residuos, es en algunos casos del mismo orden de magnitud, no obstante, el tipo y calidad de estos residuos es sustancialmente diferente, lo cual tiene un efecto directo en la calidad de la materia orgánica del suelo. Los requerimientos nutricionales y el ritmo de crecimiento varían de acuerdo a las especies dominantes en cada una de ellas.

El fósforo orgánico puede considerarse limitante en el rodal de 12 años basado no sólo de acuerdo a los resultados del bioensayo de fertilización, sino también al lento enriquecimiento relativo de este elemento con respecto a los otros, en la cronosecuencia estudiada.

Por una parte, durante las sucesivas etapas de crecimiento, este elemento ha sido previamente utilizado y/o almacenado en la biomasa viva de esta plantación. Por otro lado, esta limitación puede atribuirse a la circulación del nutriente a través del ciclaje externo por descomposición y mineralización de los residuos orgánicos. Esto refleja la importancia de la fracción orgánica en el mantenimiento del ecosistema.

VII. BIBLIOGRAFIA

ABER J. & J. MELILLO. 1980. Litter decomposition: measuring relative contributions of organic matter and nitrogen to forest soils. *Can. Jou. Bot.* 58:416-421.

ABBADIE L. 1984. Evolution saisonnière du stock d'azote dans la strate herbacée d'une savane soumise au feu en cote d'Ivoire. *Acta Oecologica* 5(19):321-334.

ABORISADE K. & A. AWETO. 1990. Effects of exotic tree plantations of teak (*Tectona grandis*) and gmelina (*Gmelina arborea*) on a forest soil in south western Nigeria. *Soil Use and Management* Vol 6, num.1;43-45.

ADEJUWON J. & O. EKANADE. 1988. Soil changes consequent upon the replacement of tropical rain forest by plantations of *Gmelina arborea*, *Tectona grandis* and *Terminalia superba*. *Jour. of World Forest Resource Management* 3: 47-59.

AGUILAR L. 1985 Establecimiento de parcelas permanentes de aclareo y rendimiento para teca en la Reserva Forestal de Ticoporo. Tesis de grado. Escuela de Ingenieria Forestal. Mérida.

ALCESTE C. 1991. Dinámica de la descomposición de la hojarasca de teca (*Tectona grandis*) en la Reserva Forestal de Ticoporo Estado Barinas. Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias. U.C.V.

ALEXANDER M. 1980. Introducción a la microbiología del suelo. AGT Editor. México. pp 491.

ALPIZAR L., H. FASSBENDER, J. HEUVELDOP, G. ENRIQUEZ & H FOLSTER. 1985. Sistemas agroforestales de café (*Coffea arabica*) con laurel (*Cordia alliodora*) y con poro (*Erythrina poeppigiana*) en Turrialba, Costa Rica. I. Biomasa y reservas nutritivas. *Turrialba* 35 (3): 233-242.

ANDERSON JM. & JS INGRAM (edt). 1989. *Tropical soil biology and fertility: a handbook of methods* CAB International. pp171.

ANDERSON J. & P. FLANAGAN. 1989. Biological processes regulating organic matter dynamics in tropical soils. En: *Dynamics of Soil Organic matter in Tropical Ecosystems*. Eds. D. Coleman, J. Oades and G. Uehara. Univ. Hawaii Press. Hawaii. pp.97-123.

ANDERSON J, P. FLANAGAN, E. CASWELL, D. COLEMAN, E. CUEVAS, D. FREKMAN J. ALLEN, P. LAVELLE & P. VITOUSEK. 1989. Biological processes in tropical soils. Chap.4. En: *Tropical soil organic matter*. Coleman D. & G. Urham Eds. Univ. of Hawaii Press.

ANDERSON J. & M. SWIFT. 1983. Decomposition in tropical forest. En: Sutton et al. (Eds). *Tropical Rain forest, Ecology and Management* 287-309. Blackwell Scien. Pub. Oxford.

ARAQUE Y & V. VERGARA. 1986. Caracterización cualitativa y cuantitativa de plantaciones en la Unidad Experimental (Ticoporo) y proposición de un rodal semillero para teca (*Tectona grandis*). Cuadernos del Comodato U.L.A. M.A.R.N.R . Facultad de Ciencias Forestales. pp.43.

AUBERT,G & J.BOULAIN.1980. La pédologie. Presses Universitaires de France. Paris. pp 126.

BABBAR L. & J.EWEL. 1989. Descomposición del follaje en diversos ecosistemas sucesionales tropicales. *Biotropica* 21(1):20-29.

BALBUENA O. 1980. Evaluación de plantaciones de la unidad II de la Reserva Forestal de Ticoporo en los Llanos Occidentales de Venezuela. Tesis de Maestría, Centro de Estudios Forestales de Postgrado. F.C.F., U.L.A, Mérida. pp 133.

BALLARD R. 1986. Phosphorus nutrition and fertilization of forest tree. En: The role of phosphorus in agriculture. Madinson. American Society of Agronomy. pp. 763-804.

BELL T. 1973. Erosion in the Trinidad teak plantations. *Commonwealth Forestry Review*. 52(3). 153:222-233.

BENITEZ M. 1990. Evaluación del suelo en plantaciones de teca de la Reserva Forestal de Ticoporo. Grupo de trabajo Productividad, ecología y suelo en plantaciones forestales. Publicación # 2. Facultad de Ciencias Forestales. Mérida.

BERISH C. 1982. Root biomass and surface area in three successional tropical forest. *Canadian Jour. For. Res* 12(3)699-704

BERISH C. & J.Ewel. 1988. Root development in simple and complex tropical successional ecosystems. *Plant and Soil* 106:73-84.

BERMEJO H. 1981. Los fertilizantes: su fabricación e importancia agrícola en Venezuela. Edición del CONICIT. Caracas. pp. 233.

BERNHARD-REVERSAT F. 1988. Soil nitrogen mineralization under a *Eucalyptus* plantation and *Acacia* forest in Senegal. *Forest Ecology and Management* 23: 233-244.

BERNHARD-REVERSAT F. 1987. Litter incorporation to soil organic matter in natural and planted tree stands in Senegal. *Pedobiología* 30:401-417.

BERNHARD-REVERSAT F. 1986. Le recyclage des éléments minéraux par la strate herbacée dans un peuplement naturel a *Acacia* et dans une plantation d'*Eucalyptus* au Senegal. *Acta Oecologica*, 7(4):353-364.

BERNHARD-REVERSAT F. 1982. Biogeochemical cycle of nitrogen in a semi-arid savanna. *Oikos* 38:321-332.

BERNHARD-REVERSAT F. 1975. Recherches sur l'écosystème de la forêt subéquatoriale de basse Côte d'Ivoire. VI. Les cycles des macroéléments. *La terre et la Vie*. 29:229-254.

BERNHARD-REVERSAT F. 1974. L'azote du sol et sa participation au cycle biogéochimique en forêt ombrophile de Côte d'Ivoire. *Rev. Ecol. Biol.Sol* 11(3):263-282.

- BHATNAR H.,B.GUPTA, B.RAUTHAN & D.JOSHI, 1969. Preliminary studies on the nutritional requirements of teak (*Tectona grandis*) Indian Forest. 95(7):488-495.
- BLACK C.1975. Relaciones suelo_planta. Editorial Hemisferio Sur Argentina. pp 427.
- BOLAN N. 1991. A critical review on the rol of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. Plant and Soil 134: 189-207.
- BOLIN B.,T. ROSSWALL, J. RICHEY & J. FRENEY, 1983. C,N,P and S cycles: Major reservoirs and fluxes. In: The Major Biogeochemical cycles and their Interaction. Edited by B. Bolin and R. Cook.
- BOWEN G. 1984. Tree roots and the use of soil nutrients. En: Bowen G. & E.Nambiar (eds), Nutrition of plantation forests. Academic Press, New York. pp. 147-179.
- BOWEN G. & E.NAMBIAR (eds) 1984. Nutrition of plantation forests. Academic Press, New York. pp 516.
- BROWN S. & LUGO A, 1982. The storage and production of organic matter in tropical forest and their role in the global carbon cycle. Biotropica 14: 161-187.
- BOX,J. 1987. Uso de residuos de cosechas para mejorar el suelo. En: Manual de Fertilizantes. Sexta Edición. Colombia. pp 78
- BOYER J. 1978. Le calcium et le magnesium dans les sols des region tropical humides et sub-humides. Cahier ORSTOM.Paris.pp173
- BROWN S. & A.LUGO. 1990 Effects of forest clearing and succession on the carbon and nitrogen content of soils in Puerto Rico and U.S. Virgin Islands. Plant and Soil 124, 53-64.
- BROIJNZEEL L. & K.WIERSUM. 1985. A nutrient balance sheet for *Agathis dammara* plantation forest under various management conditions in central Java, Indonesia. Forest Ecology and Management 10: 195-208.
- BUKMAN H. & N. BRADY. 1977. Naturaleza y propiedades de los suelos. Editorial Montaner y Simon. Barcelona. pp 590.
- BUSCHBACHER R. 1986. Tropical deforestation and pasture development. BioScience. 36 (1):22-28.
- CASTILLO J.B. 1971. Estudio de los suelos de las áreas II y III de Ticoporo, en los altos llanos occidentales de Barinas. Instituto de Geografía y Conservación de los Recursos Naturales. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Los Andes, Mérida, pp 33.
- CLARKSON D. & J.HANSON 1980. The mineral nutrition of higher plants. A Rev. Plant. Physiol. 31:239-298.
- CANIZALES N. 1990. Caracterización de los suelos en cinco ensayos de fertilización con fosforita en plantaciones de teca (*Tectona grandis*) en la unidad II de la Reserva Forestal de Ticoporo, Edo. Barinas. Venezuela. Grupo de Investigaciones

Productividad, Ecología y suelos en plantaciones forestales industriales. Contribución N 1. pp. 40.

CARLYLE J. 1986. Nitrogen cycling in forested ecosystems. *Forestry Abstracts* 47:307-336.

COLEMAN D., C. COLE & E. ELLIOTT. 1984. Decomposition of organic matter turnover and nutrient dynamics in agroecosystems. En: Lawrence R., B. Stuner & G. House: *Agricultural Ecosystems*, 83-104.

COLEMAN D., C. REID & C. COLE. 1983. Biological strategies of nutrient cycling in the soil systems. *Adv. Ecol. Res.* 13:1-55.

COLLINS J. 1986. Smallholder settlement of tropical south America: the social causes of ecological destruction. *Human Organization*, vol 45, (1), 1-10.

CONTRERAS G. 1986. Actualización de la clasificación de la calidad de sitio para teca, Reserva Forestal de Caparo. Tesis. F.C.F. U.L.A. Mérida. Venezuela. pp 51.

CORNFORTH I. 1970. Reafforestation and nutrient reserves in the humid tropics. *Jour. Apli. Ecol.* 7:609-615.

CUEVAS E., 1983. Crecimiento de raíces finas y su relación con los procesos de descomposición de materia orgánica y liberación de nutrientes en el bosque del Alto Río Negro en el Territorio Federal Amazonas. Tesis de grado Ph. Sc. I.V.I.C. Venezuela.

CUEVAS E. & E. MEDINA. 1991. Phosphorus /Nitrogen interactions in adjacent Amazon forest with contrasting soils and water availability. pp. 84-94. En H. Tiessen, D. Lopez-Hernandez & I. Salcedo. *Phosphorus cycles in terrestrial and aquatic ecosystems. Regional Workshop 3: South and Central America.*

CUEVAS E., S. BROWN & A. LUGO. 1991. Above and belowground organic matter storage and production in a tropical pine plantation and a paired broadleaf secondary forest. *Plant and Soil* 135: 257-268.

CUEVAS E., W. FRANCO & D. LOPEZ-HERNANDEZ. 1989. Uso de plantaciones forestales mono-específicas y su efecto en los procesos biológicos del suelo y la disponibilidad de nutrientes. Plan de Estudio. T.S.B.F, M.A.B/UNESCO-IUBS.

CUEVAS E. & E. MEDINA. 1988. Nutrient dynamics within amazonian forest. II. Fine root growth, nutrient availability and leaf decomposition. *Oecologia* 76:222-235.

CUEVAS E. & E. MEDINA. 1986. Nutrient dynamics in amazonian forest ecosystems. I. Nutrient flux in fine litter fall and efficiency of nutrient utilization. *Oecologia* 68:466-472.

CUEVAS E. & E. MEDINA. 1983. Root production and organic matter decomposition in a Tierra Firme forest of the upper Rio Negro basin. En: *Wurzelökologie und Ihre Nutzenanwendung. Int. Symp. Gumpenstein.* pp 653-666.

CHATUVERDI O. & J. SINGH. 1987. The structure and function of pine forest in Central Himalaya. II Nutrient dynamics. *Annals of Botany* 60:253-267.

- DABIN B. 1981. Les sols tropicaux acides. Cah.ORSTOM, Serie Pédologie, 21(1):7-19.
- DEVLIN R. 1976. Fisiología vegetal. Ediciones Omega S.A. Barcelona. España.
- DIAZ C. 1991. Dinámica de la materia orgánica, nutrientes y regimen del agua en el suelo en tres ecosistemas forestales (bosque natural intervenido, plantación de teca y pino) en la Reserva Forestal de Ticoporo. Edo. Barinas, Venezuela. Tesis M.S. Facultad de Ciencias Forestales. Mérida.
- DIAZ C y W. FRANCO. 1988. Estudio del impacto de la transformación del bosque natural en plantación forestal sobre la materia orgánica del suelo. Informe CDCH. U.L.A. Merida. Venezuela.
- DOMMERGUES Y. 1985. Sols-Microbiologie. Encyclopoedia Universalis Corpus 16. Editeur Paris. France.
- DOMMERGUES Y, 1963. Les cycles biogéochimiques des éléments minéraux dans les formations tropicales. Bois et Forêts des tropiques 87:9-25.
- DUCHAUFOR Ph. 1990. La formation et l'evolution des complexes organo-mineraux dans les sols et leur role dans la pedogenese. Science du sol 28(4): 273-284.
- DUCHAUFOR Ph. 1970. Precis de Pedologie.Masson et Cie.Paris.
- DUXBURY J., M.SMITH & J.DORAN. 1989. Soil organic matter as a source and a sink of plant nutrients. Chap.2. En:Coleman D., J. Oades & G.Uehara. Dynamics of soil organic matter in tropical ecosystems. Univ. of Hawaii Press.
- EDWARDS P & P GRUBB. 1982. Studies of mineral cycling in a montane rain forest in New Guinea. IV.Soil characteristics and the divisions of mineral elements between the vegetation and the soil. Journal of Ecology, 70, 649-666.
- EDWARDS P.1982. Studies of mineral cycling in a montane rain forest in New Guinea. V. Rates of cycling in throughfall and litterfall. Journal of Ecology, 70, 807-827.
- EGUNJOBI, J. 1974. Litter fall and mineralization in a teak stand Oikos 25: 222-226.
- FASSBENDER,H & E. BORNEMISZA. 1987. Química de suelos con énfasis en suelos de América Latina. San José, Costa Rica, IICA. pp 420.
- FASSBENDER H., L. ALPIZAR, J.HEUVELOP, G.ENRIQUEZ & H.FOLSTER.1985 Sistemas agroforestales de café (Coffea arabica) con laurel (Cordia alliodora) y café con poro (Erythrina poeppigiana) en Turrialba, Costa Rica. III. Modelos de la materia orgánica y los elementos nutritivos. Turrialba vol.35, 4, 403-413.
- FASSBENDER H. & U.GRIM. 1981. Ciclos biogeoquímicos en un ecosistema forestal de los Andes Occidentales de Venezuela.II. Producción y descomposición de residuos vegetales. Turrialba 31 (1):39-47.
- FOTH H. 1985. Fundamentos de la ciencia del suelo. Editorial Continental. Mexico. pp 433.

FRANCO W. 1991. Evaluación preliminar del rendimiento de las plantaciones de teca (*Tectona grandis*) en la Unidad II de la Reserva Forestal de Ticoporo, Llanos Occidentales de Venezuela. Publicación del Proyecto de Investigación en Plantaciones Industriales financiado por CDCH-ULA, CONTACA, FOSFASUROESTE y CVG-PROFORCA.

FRANCO W. 1989. Perspectivas de las plantaciones forestales en Venezuela y del uso de la fosforita en la producción forestal. En Primer Seminario de Fósforo en la Agricultura Venezolana. 25 al 27 de enero. Caracas, Venezuela.

FRANCO W. 1988. Incorporación de los estudios de suelo como instrumento de manejo forestal en Venezuela. En: Curso sobre investigación y manejo forestal en Venezuela. C.I.D.I.A.T.M_rida.

FRANCO W. 1982. Estudio y levantamiento de sitios en la Unidad I de la Reserva Forestal de Caparo. Facultad de Ciencias Forestales U.L.A. Mérida.

FRANCO W. 1979. Producción de hojarasca en varios tipos de bosques de Caparo; su ritmicidad durante el año, su composición química, su relación con el mantillo orgánico. Mérida, Facultad de Ciencias Forestales, Instituto de Silvicultura, U.L.A. pp 11

FRANKART R. 1990. Les sols acides des écosystèmes humifères d'altitude du Rwanda et du Burundi. Aspect pedo-agronomiques. Bull.Seanc. Acad. Sci. Outre-mer.35(1989-4):495-531.

GACHON L. 1985. Fertilité des sols. Encyclopaedia Universalis. Corpus 7. Editeur Paris, France.

GALLARDO J., I.SANTA REGINA & C.SAN MIGUEL. 1989. Ciclos biogeoquímicos en bosques de la Sierra de Béjar (Salamanca, España). Rev. Ecol. Biol. sol. 26: 35-46.

GARAY I. 1987. Etude d'un ecosysteme forestier mixte. II.Les sols Rev. Ecol. Biol. Sol 17(4):525-541.

GEIGEL F. 1977. Materia orgánica y nutrientes devueltos al suelo mediante la hojarasca de diversas especies forestales. Revista Forestal Baracoa 7:15-38.

GLADSTONE W. & F. LEDIG. 1990. Reducing pressure on natural forest through high_yield forestry. Forest Ecology and Management 33/34:69-78.

GOLLEY F., J. YANTRO, T. RICHARDSON & H. KLINGE. 1980. Biogeochemistry of tropical forest: 1: The frequency distribution and mean concentration of selected elements in a forest near Manaus, Brazil. Tropical Ecology, Vol 21. 1: 59-70.

GOLLEY F., J. MCGINNIS, R. CLEMENTS, G. CHILD & M. DENVER. 1975. Mineral cycling in a tropical moist forest ecosystems. University of Georgia Press. Athens, Georgia.

GOLLEY F., J. YANTRO, T. & C. JORDAN. 1980. Biogeochemistry of tropical forest: 2: The frequency distribution and concentration of selected elements near San Carlos de Rio Negro, Venezuela. Tropical Ecology, Vol 21. 1: 71-80.

GOLLEY F. 1983. Nutrient cycling and nutrient conservation. En: F. Golley (ed). Tropical Rain Forest Ecosystem. Elsevier Scientific Pub. Co. Amsterdam.

GONZALEZ-ABREU A., A.RENDA, F.GIERGEL, T.QUINTANA & A.PERERA.1985 Algunas características de la materia orgánica en los suelos forestales de la cuenca del río San Diego. Revista Forestal Baracoa. 15(1):7-18.

GONZALEZ ITURBE,J.1988. Contenido de nutrientes en un selva alta perennifolia. Tesis Profesional. Mexico, D.F.

GORHAM E., P.VITOUSEK & W. REINERS. 1979. The regulation of chemical budgets over the course of terrestrial ecosystem sucesion. Ann. Rev. Ecol. Syst. 10:53-84.

GOWER S. 1987. Relations between mineral nutrient availability and fine root biomass in two Costa Rican tropical wet forest: a hypothesis. Biotropica 19:171-175.

GREENLAND D. & P.NYE. 1959. Increases in carbon and nitrogen contents of tropical soil under natural fallows. Journal of Soil Science 10:284-299.

GRIMM U. & H. FASSBENDER. 1981. Ciclos biogeoquímicos en un ecosistema forestal de los Andes Occidentales de Venezuela. I. Inventario de las reservas orgánicas y minerales (N, P, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Al, Na). Turrialba. 31 (1):27-37.

GRUBB P. & P. EDWARDS. 1982. Studies of mineral cycling in a montane rain forest in New Guinea. III.The distribution of mineral elements inthe above ground material. Journal of Ecology, 70, 623-648.

HASE H. & H. FOELSTER. 1982. Estado nutricional de las plantaciones de Teca en la Reserva Forestal de Caparo. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Los Andes.

HASE H. 1981. Estudio de nutrientes en suelos de banco en la Reserva Forestal de Caparo, bajo especial consideracion de su uso para plantaciones de Teca. Tesis Doctoral. Universidad de Gottingen . Alemania Occidental.

HASE H. & H. FOELSTER. 1983. Impact of plantation forestry with Teak (*Tectona grandis*) on the nutrient status of young alluvial soils in West Venezuela. Forest Ecology and Management 6:33-57.

HELLER R. 1985. Abrege de Physiologie Vegetale:nutrition. Masson Paris, France. pp 244.

HERNANDEZ R. 1989. Nutrición mineral. Escuela de Ciencias Forestales. Departamento de Botanica.F.C.F. U.L.A. M_rida. pp.81.

HERRERA R., T.MERIDA & C.JORDAN. 1978. Direct phosphorus transfer from leaf litter to roots. Naturwissenschaften 65.

HILTON G. 1987. Nutrient cycling in tropical rain forest, implications and sustained yield. Forest Ecology and Management, 22:297-300.

HOLT J. & A. SPAIN. 1986. Some biological and chemical changes in a North Quesland soils following replacement of rain forest with *Araucaria cunninghaamii*. Jou. Applied Ecology 23:227-237.

INGESTAD T. 1987. New concepts in soil fertility and plant nutrition as illustrated by research on forest trees and stands. Geoderma 40:237-253.

- JACKSON M. 1968. Análisis químico de suelos. Edt. Omega. Barcelona, España. pp. 662.
- JEFFREY 1987. Soil-plant relationships an ecological approach. Timber-Press, Portland. pp. 295.
- JENNY H. 1950 Causes of the high nitrogen and organic matter contents of certain tropical forest soils. Soil Sciences 69(1):63-69.
- JONES M. & R. WOODMANSEE. 1979. Biogeochemical cycling in annual grassland ecosystems. The Botanical Review 45:111-144.
- JORDAN C. 1983. Productivity of tropical rain forest ecosystems and the implications for their use as future wood and energy sources. pp 117-136. En F. Golley editor. Tropical rain forest ecosystems: structure and function. Volume 14A. Elseviers, Amsterdam, The Netherlands.
- JORDAN C. & R. HERRERA. 1981. Tropical Rain forest: are nutrients really critical. The American Naturalist 117: 167-180.
- JORDAN C. & G. ESCALANTE. 1980. Root productivity in an Amazonian Basin. Ecology 61:14-18.
- JORDAN C. & J. KLINE. 1972. Mineral cycling: some basic concepts and their applications in a tropical rain forest. Ann. Rev. Ecol. Syst. 3:33-50.
- JOSE A. & M. KOSHY. 1972. A Study of the morphological, physical and chemical characteristics of soils as influenced by teak vegetation. Indian Forester 98: 338-348.
- KADEBA O. 1991. Above ground biomass production and nutrient accumulation in age sequence of Pinus caribaea stands. Forest Ecology and Manegement, 41: 237-248.
- KARLOVSKY J. 1981. Cycling of nutrient utilisation by plants in agricultural ecosystems. Agro-Ecosystems 7:127-144.
- KAUL O., A.GUPTA & J.NEGI, 1972. Diagnosis of mineral deficiencies in teak (Tectona grandis) seedlings. Indian Forester 98:173-177.
- KAUL O., D.SHARMA, V. TANDON & P.SRIVASTAVA. 1979. Organic matter and plat nutrients in a teak (Tectona grandis) plantation. Indian Forester. 105:573-582.
- KELLMAN M. 1989. Mineral nutrient dynamics during savanna-forest transformation in Central America. pp. 137-151. En J. Proctor Editor. Mineral nutrient in tropical forest and savanna ecosystems. Special publications series of the British Ecological Society. Number 9.
- KELLMAN M. 1979. Soil enrichment by neotropical savanna trees. Jou. Ecology. 67:565-577.
- KISHORE N. 1987. Preliminary studies on the effect of phosphatic fertilizers on teak plantation. Indian Forester 113(6):391-394.

KLINGE H & R. HERRERA 1978. Biomass studies in Amazon caatinga forest in southern Venezuela. I. Standing crop of composite root mass in selected stands. Trop. Ecol. 9:93-110.

KONONOVA M. 1961. Materia orgánica del suelo; su naturaleza, propiedades y métodos de investigación. Ediciones Oikos-tau, versión castellana 1982; traducción E. Bordas. España. pp 365.

KUO S. & E. JELLUM. 1987. Influence of soil characteristics and environmental conditions on seasonal variations of water soluble phosphate in soils. Soils Science, 143 (4):257-263.

LARCHER W. 1977. Ecofisiología vegetal. Ediciones Omega. Barcelona. España. pp. 305.

LAVELLE P. 1987. Interactions, hiérarchies et régulations dans le sol: _ la recherche d'une nouvelle approche conceptuelle. Revue Ecol. Biol. Sol. 24 (3):219-229.

LEVY G. 1988. Appréciation de la fertilité du sol; diagnostics en forêt. Revue Forestiere Francaise, numéro spéciale.

LOPEZ-HERNANDEZ I. & D. FLORES.1979. La desorción de fosfatos en suelos. Implicaciones fisioecológicas en el proceso. Acta Cien. Venezolana 30:23-35.

LOPEZ-HERNANDEZ I. 1977. La química del fósforo en suelos ácidos. Edic. Biblioteca U.C.V. pp 123.

LONSDALE, W. 1988. Predicting the amount of litterfall in forest of the world. Annals of Botany, 61;319-324.

LOUSIER J & D.PARKINSON. 1978. Chemical element dynamics in decomposing leaf litter. Can. Jou. Bot. 56:2792-2812.

LUGO A., E.CUEVAS & M.J.SANCHEZ. 1990. Nutrients and mass in litter and top soil of ten tropical tree plantations. Plant and Soil 125, 263-280.

LUGO A., M.J.SANCHEZ & S.BROWN. 1986. Land use and organic carbon content of some tropical soils. Plant and soil 96:185-196.

LUNDGREN B. 1978. Soil conditions and nutrient cycling under natural and plantation forest in tanzania higlands. Report in Forest Ecology and Forest soil, 31.Swedish Uni. of Agri. Sciences. Uppsala.

MAHEUT J & Y. DOMMERGUES, 1960. Les Teckeraies de Casamances; capacite de production des peuplements, caracteristiques biologiques et maintien du potentiel productif des sols. Bois et Forets des Tropiques 70: 25-42.

MALAVOLTA E. 1980. La nutrición mineral de algunas cosechas tropicales. Editores: Instituto Internacional de la Potasa.Berna.

MANIL G. 1985. Les Sols. Encyclopaedia Universalis. Corpus 11. Editeur Paris, France.

McGILL W & C.COLE, 1981. Comparative aspects of cycling of organic C,N,S and P through soil organic matter. *Geoderma* 26:267-286.

MEDINA E. 1984. Nutrient balance and physiological processes at the leaf level. En: Medina E., H. Mooney & C. Vasquez Yanes Editores. *Physiological ecology of plants of the wet tropics*. Le Hague. pp. 254.

MEDINA E. 1982. Nitrogen balance in the trachypogon grasslands of Central Venezuela. *Plant and Soil* 67:305-314

MEDINA E. & F. SILVA. 1990. Savannas of northern South America: a steady state regulated by water-fire interactions on a background of low nutrient availability. *Journal of Biogeography* 17:403-413.

MEDINA E. & E.CUEVAS. 1989. Patterns of nutrient accumulation and release in amazonian forest of the upper Rio Negro basin. En: *Mineral nutrients in tropical forest and savanna ecosystems*. Eds Proctor, Special publication (9) of The British Ecological Society, pp 217-240.

MEDINA E. & H. KLINGE. 1983. Productivity of tropical forest and tropical woodlands. In: *Physiological plant ecology IV. Encyclopedia of plant physiology new series*. Vol 120. Ed. Lange, Nobel, Osmond and Ziegler. Springer-Verlag. Germany.

MORRIS, J. 1983. A review of decomposition and reduction of soil organic matter in tropical african biomes. *Jou. S. Afr. Bot.* 49(1):65-78.

NAMBIAR E. 1984. Plantation forest: Their scope and perspective on plantation nutrition. En: Bowen G. & E.Nambiar (eds), *Nutrition of plantation forest*. Academic press. London.

NATH S.M.BANERJEE, G.CHATHORAJ, S.GANGULY, P.DAS& S.BANERJEE.1988 Changes in soil attributes consequent upon differences in forest cover in a plantation area. *J. Indian. Soc Soil. Sci.*36:515-521.

NWOBOSHI L. 1980. Nitrogen cycling in a teak plantation ecosystem in Nigeria. pp.353-361. En T. Rosswall editor. *Nitrogen cycling in West African ecosystems*. SCOPE-UNEP. Stockholm, Sweden.

NYE P. & D.GREELAND. 1960. The soil under shifting cultivation. Technical Communication 51. Commonwealth bureau of soil, England

OADES J.M., G.GILLMAN & G. UEHARA. 1989. Interactions of soils organic matter and variable charge clays. En: *Dynamics of soil organic matter in tropical ecosystems*. Coleman D., J. Oades & G. Uehara. Univ. of Hawaii Press.

ODUM E. 1972. *Ecología*. Editorial Interamericana. México.

PAREDES J. 1988. Evaluación de las plantaciones de teca (*Tectona grandis*) y melina (*Gmelina arborea*) en la unidad experimental de la Reserva Forestal de Ticoporo (Estado Barinas). Cuadernos del Comodato-ULA-MARNR. Facultad de Ciencias Forestales. Mérida.pp.52

PRITCHETT,W.1986. Suelos Forestales, propiedades, conservación y mejoramiento. Editorial Limusa. México. pp 634.

PROCTOR, J. 1987. Nutrient cycling in primary and old secondary rainforest. *Appl. Geography* 7:135-152.

PUIG H. & J.Ph.DELOBELLE. 1988. Production de litiere, necromase, apport minéraux au sol par la litiere en foret guyanaise. *Rev. Ecol. (Terre et Vie)*, vol.43.

RAET G. 1987. Bibliografia seleccionada: teca (*Tectona grandis*). Volumenes I y II. Instituto Forestal Latinoamericano. Mérida. Venezuela.

RICHARDS P. 1952. *The tropical rain forest*. Cambridge. Univer. Press, Cambridge. pp 450.

RIES S. 1988. Le compartiment racines d'un taillis de Chataigniers (*Castanea sativa*) du Sud-Est de la France: biomasse, structure et évolution. These Docteur 3eme cycle. Université Scientifique, Technologique et médicale de Grenoble.

ROJAS J. & I. REYES. 1989. Impacto de las rocas fosfóricas sobre la microbiología del suelo y del efecto de microorganismos en un uso más eficiente del fósforo por las plantas. En: Primer Seminario de Fósforo en la agricultura Venezolana. Caracas,Vzla.

ROSWALL, T. 1982. Microbial regulation of the biogeochemical nitrogen cycle. *Plant and Soil* 67, 15-34.

ROTINI O. 1977. L'importance de la matiere organique pour la productivite des sols dans la region mediterraneene au cours de l'histoire. In: *Soil organic matter studies; Proceedings of a symposium Inter Atomic Energy, Vienna*, p 3-7.

SALAS, G de LAS. 1984. Aspectos sobre la reforestación y el balance nutricional en los tropicos. *IFLA. Rev. For. Lat.* 2, 84.

SALAS, G de LAS. 1987. Suelos y ecosistemas forestales; con énfasis en América Tropical. San Jose, Costa Rica; IICA, 450p.

SALINAS J., A. FERRUFINO & A. ALVARADO. 1991 Phosphorus cycling in tropical pastures. En: *Phosphorus cycles in terrestrial and aquatic ecosystems. Regional Workshop 3: South and Central America*. Edited by: H. Tiessen, D.Lopez-Hernandez and I.Salcedo.

SANCHEZ P. 1987. Soil productivity and sustainability in agroforestry systems. En: *Agroforestry a decade of development* . Eds. Stepler H. & P. Ramachandran. CRAF. Nairobi, Kenya. pp207-223.

SANCHEZ P. 1976. *Properties and management of soils in the tropics*. A Willey-Interscience Publication.

SANCHEZ.P.1973. Un resumen de las investigaciones edafológicas en la América Tropical. North Carolina State University. Technical Bulletin 219.

SANCHEZ P., C. PALM, L. SZOTT, E.CUEVAS & R. LAL. 1989. Organic input management in tropical agroecosystems. Chap. 5. En: Tropical Soil Organic Matter. Eds. D. Coleman & G. Uhara. University Hawaii Press.

SANCHEZ P., C. PALM, C. DAVEY, L. SZOTT & C. RUSSELL. 1985. Free crops as soil improvers in the humid tropics?. En: In attributes of trees as crop plants. Cannell and Jackson eds. Institute of terrestrial Ecology Natural Environment Research Council.

SANTA REGINA I., J. GALLARDO & C. SAN MIGUEL. 1989. Ciclos biogeoquímicos en bosques de la Sierra de Béjar (Salamanca, España). 3. Descomposición de la hojarasca. Rev. Ecol. Biol. Sol, 26 (4): 407-416.

SARMIENTO, G. 1984. Los ecosistemas y la ecosfera. Editorial Blume ecología. Barcelona. pp 268.

SETH S & O. KAUL. 1980. Ecosistemas forestales tropicales de la India: los bosques de teca, estudio de silvicultura y ordenación. En: Ecosistemas de los bosques tropicales. UNESCO-FAO-PNUMA 708-723

SINGH K.P. 1989. Mineral nutrients in tropical dry deciduous forest and savanna ecosystems in India. En: Mineral Nutrients in tropical forest and savanna ecosystems. Eds. J. Proctor. British ecological Society. Number 9.

SINGH K. 1968. Litter production and nutrient turnover in deciduous forest of Varanasi. Proc. Symp. Rec. Adv. Trop. Ecol. 2:655-666.

SINGH S, P. BANARJEE & B. SINGH. 1987. Effect on vegetation covers on the nutrient status of soil. J. India Soil Sci. Vol 35:232-237.

SING K. & K. SRIVASTAVA. 1985. Seasonal variations in the spatial distribution of root tips in teak (*Tectona grandis*) plantations in the Varanasi Forest Division, India. Plant and Soil. 84:93-104

SINGH A. & R. AMBASHT. 1980. Production and decomposition rate of litter in a teak (*Tectona grandis*) plantation at Varanasi (India) Rev. Ecol. Biol. Sol. 17(1): 13-22.

SOIL SCIENCE SOCIETY. 1965. Glossary of soil science terms. Society of America Proceedings. Vol 29. No 3, 330-351.

SOLARZANO P. 1989. Efecto de las prácticas agrícolas sobre el tipo y forma de aplicación de los fertilizantes fosforados. En: Primer seminario de Fósforo en la agricultura Venezolana. Caracas

SRIVASTAVA S., K. SINGH & R. UPADHYAY. 1986. Fine root growth dynamics in teak (*Tectona grandis*). Can. Jou. For. Res. 16:1360-1364.

STEVENSON G. & H. ELLIOT. 1989. Litter in soil organic matter. En D. Coleman, J. Oades & G. Uehara. Edt. Soils Organic Matter in tropical ecosystems. Univ. of Hawaii Press. Hawaii.

SWIFT M. & P. LAVELLE (eds). 1987 Processus biologiques et fertilité des sols tropicaux. Biology International, Special Issue 14.

- SWIFT M. & P. SANCHEZ. 1984. Biological management of tropical soil fertility for sustained productivity. *Nature and Resources*, 20 (4): 2-10.
- SWIFT M., O. HEAL & J. ANDERSON (eds). 1979. 1. Decomposition processes in terrestrial ecosystems. 2. The decomposition subsystem. En: *Decomposition in Terrestrial Ecosystems*. California Press. *Studies in Ecology*. Volume 5.
- SZOTT L. 1991. Phosphorus cycling in humid tropical sucesional forest. En: *Phosphorus cycles in terrestrial and aquatic ecosystems. Regional Workshop 3: South and Central America*. Eds. H Tiessen, D. Lopez-hernandez e I. Salcedo.
- SZOTT L. & Ch. PALM, 1984. Soil and vegetation dynamics in shifting cultivation fallows. En *Primer simposium del tropico húmedo*, Belem, Para.
- TAMHANE, R., D. MOTIRAMANI y P. BALI. 1978. Suelos: su química y fertilidad en zonas tropicales. Editorial Diana Mexico. pp 483.
- TANGLEY L. 1986. Saving tropical forest. *BioScience*. Vol 36. 1:4-8
- TANNER E. 1985. Jamaican montane forest: nutrient capital and cost of growth. *Journal of Ecology* 73:553-568.
- TANNER E. 1981. The decomposition of leaf litter in Jamaican montane rain forest. *Journal of Ecology* 69: 263-275.
- TANNER E. 1980. Studies on the biomass and productivity in a series of montane forest in Jamaica. *Journal of Ecology*, 68, 573-588
- TANNER E., V. KAPOUS, S. FRESKOS, J. HEALEY & A. THEOBALD. 1990. Nitrogen and phosphorus fertilization of Jamaican montane forest trees. *Journal of Tropical Ecology*. 6:231-238.
- TATE K. & I. SALCEDO. 1988. Phosphorus control of soil organic matter accumulation and cycling. *Biogeochemistry* 5:99-107.
- TEJEDOR M., E. FERNANDEZ & P. QUANTIN. 1978. Sequence climatiques des sols recent de la region septentrional de Tenerife (Iles Canarias). I. *Ecologie, morphologie, caracter phisico-chimiques*. Cah. ORSTOM, ser. Pedo. Vol. XVI, n3, 251-264.
- TIESSSEN H, 1991. Characterisation of soil phosphorus and its availability. En *Trends in Soil Science*. Scientific Council for Research Coordination, India.
- TOUTAIN, F. 1987. Les litieres: sieges de systemes interactifs et moteur de ces interactions. *Rev. Ecol. Biol. Sol*. 24(3):231-242.
- UHL C. & C. JORDAN. 1984. Sucesion and nutrient dynamics following forest cutting and burning in Amazonia. *Ecology* 65:1476-1490.
- UMAÑA J.L. 1983. Calidad de sitio en plantaciones de teca en la Reserva Forestal de Ticoporo. Tesis de Maestria. Post-grado de la Escuela de Ingenieria Forestal. F.C.F.; U.L.A. M_rida. pp 52.
- URRUTIA M., E. GARCIA y F. MACIAS. 1989. Determinación del pH en suelos de carga variable de Galicia. *Ann. Edaf. Agrobiologicas*: 48:219-228.

- VEILLON J.P. 1989. Los bosques naturales de Venezuela. Tomo I. Instituto de Silvicultura. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela.
- VEILLON J.P. 1976. Las deforestaciones en los llanos occidentales de Venezuela, desde 1950 hasta 1975. En: Conservación de los bosques húmedos de Venezuela. Sierra Club. Consejo de Bienestar Rural.
- VITOUSEK P. 1982. Nutrient cycling and nutrient use efficiency. *The American Naturalist* 119: 553-572.
- VITOUSEK P. 1984. Litterfall, nutrient cycling, and nutrient limitation in tropical forest. *Ecology* 65:285-298.
- VITOUSEK,P & P. MATSON. 1988. Nitrogen transformations in a range of tropical forest soils. *Soil Biol. Biochem* Vol 20, 3 : 361-367.
- VITOUSEK,P & R.SANFORD. 1986. Nutrient cycling in moist tropical forest. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 17:137-167.
- VITOUSEK P & W REINERS. 1975. Ecosystems succession and nutrient retention: a hypothesis. *Bioscience* 25:276-281.
- VOGT K., C.GRIER & D.VOGT. 1986. Production, turnover and nutrient dynamics of above and belowground detritus of world forests. *Advances in Ecological Research* 15:303-366.
- WEAVER P.,R. BIRDSEY & A. LUGO. 1987. Soil organic matter in secondary forest of Puerto Rico. *Biotropica* 19(1):17-23.
- WHITTAKER R & P MARKS. 1975. Methods of assesing terrestrial productivity. pp . 55-118.En H.Leith & R.Whittaker. *Primary productivity of the biosphere. Ecological studies*, 14.
- WOOMER,P & S,INGRAM. 1990. Report of the tropical soil biology and fertility programme.TSBF. UNESCO-Rosta. Kenya.
- YAMAKURA T.& P. SAHUNALU. 1990. Soil carbon/nitrogen ratio as a site quality index for some South-east Asian forests. *Journal of Tropical Ecology* 6:371-378.
- ZINCK A. 1986. Características y fragilidad de los suelos en ambiente de selva nublada: el ejemplo de Rancho Grande. En: *La Selva Nublada de Rancho Grande*. Editor O. Huber. Caracas.

ALGUNOS CRITERIOS PARA LA INTERPRETACION DE ANALISIS DE SUELOS

pH (1)	pH (2)		
4.0-5.0 muy acido	extremadamente acido		<-4.5
5.0-5.5 acido	fuertemente acido		4.5-5.2
5.5-6.5 lige'acido	moderadamente acido		5.3-5.9
6.5-7.5 casi neutro	ligeramente acido		6.0-6.5
7.5-8.5 lige'alcalino	neutral		6.6-7.0
> 8.5 muy alcalino	ligeramente alcalino		7.1-7.5
	moderadamente alcali'		7.6-8.3
	fuertemente alcalino		8.4-9.0
	extremadamente alcal'		>-9.0
(1)			
C.O.%	N.t.%	C/N	
0 - 1	0 - 0.1	< 7	muy bajo
1 - 1.5	0.1- 0.15	7-9	bajo
1.5 - 2.5	0.15- 0.25	9-12	medio
2.5 - 4.0	0.25- 0.30	12-19	alto
> - 4.0	>- 0.30	> 20	muy alto
(2)			
C.O.%	N.t.%	C/N	
< - 0.5	< - 0.5	< 7	muy bajo
0.5- 1.9	0.05- 0.2	7-9	bajo
1.9- 2.8	0.20- 0.3	10-12	medio
2.8- 4.9	0.30- 0.5	13-19	alto
4.9- 7.9	0.50- 0.8	> 20	muy alto
(1) y (2)			
Bases intercambiables			(meq/100g)
K	Ca	Mg	
< 0.2	< 2	< 0.3	muy bajo
0.2-0.3	2-5	0.3-1.0	bajo
0.3-0.6	5-10	1-3	mediano
0.6-1.2	10-20	3-8	alto
> 1.2	> 20	> 0	muy alto
FUENTES:			
(1): Centro Interamericano de Aguas y Tierras Manual de analisis de suelos y aguas.			
(2): Instituto de Investigaciones Agropecuarias Laboratorio de Quimica Agricola. U.L.A.			

A N E X O 1

ANÁLISIS DE SUELO EN UN RODAL DE 15 AÑOS
 EN LA UNIDAD DE MANEJO II, CONTACA,
 RESERVA FORESTAL DE TICOPORO (Fuente: Díaz y Franco, 1987)

Suelos "distropepts óxicos isohipertémicos arcillosos"

	PROFUNDIDAD		
	0 - 25cm.	25 - 100cm.	100 - 150cm.
% arena	23	13	27
% limo	49	37	43
% arcilla	28	50	30
Dens' apar' g/cm ³	1.29	1.39	1.32
% materia orgánica	2.91	1.04	0.40
pH (agua)	6.19	5.71	5.62
Nitrógeno %	0.108	0.058	0.058
Fósforo ppm.	2.5	2.0	1.0
Potasio meq/100g	0.21	0.16	0.08
Calcio meq/100g	3.63	0.45	0.45
Magnesio meq/100g	3.49	1.74	1.74
C.E.C. meq/100g	7.33	2.35	2.27

A N E X O 2

DESCRIPCION DE LOS SUELOS
EN PLANTACIONES DE TECAS (Fuente: Diaz, 1991)

Profundidad 0 - 9cm.
Horizonte Ah1

Pardo amarillento oscuro (10YR3/4); franco arenoso fino (15% arcilla, 20% limo, 60% arena fina) granular, muy fina, pero material coherente, friable; nódulos de Mn, finos, blandos y abundantes; ligeramante compacto hacia la base; carbón abundante; raicillas nuevas abundantes; pedotúbulos y excrementos de lombrices abundantes.

Profundidad 9 - 25cm.
Horizonte Ah2

Pardo amarillento oscuro (10YR3/4); franco arcilloso granular, muy fina, coherente y en sectores blocosa angular muy fina, fuerte; nodulos muy finos y muy abundantes; raices finas, medias y gruesas abundantes.

Profundidad 25 - 90cm.
Horizonte Bw (B21)

Rojo (2.5YR4/6); arcilloso (50% A, 37% L, 13% arena muy fina) blocosa angular, fina a media, fuerte, porosa; nódulos finos, abundantes de 25-30 cm y frecuentes hacia abajo; hasta 60 cm raices finas y medias frecuentes, luego pocas.

Profundidad 90 - 150cm.
Ah fósil
90 - 100cm.
Horizonte (Bwg)
(B22g)

Amarillo parduzco (10YR6/8), rojo plintita (2.5YR4/8) y amarillo pálido (2.5YR7/4); franco arcilloso (30% A, 43% L, 27% arena fina); blocosa angular media a grande, fuerte, (agregados duros y coherentes); películas de Mn frecuentes; suelo abigarrado con sectores amarillo parduzco, rojo y amarillo pálido; antiguo sedimento afectado por fuerte saturación en épocas de lluvias. Raíces finas y frecuentes en la mitad superior del horizonte.

A partir de 180 cm. muy compactado y aumentan las películas de Mn.

A N E X O 3