

BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO INORGÁNICO AISLADAS DE SUELOS DE LA REGIÓN SOJERA

LETICIA ANDREA FERNÁNDEZ; PABLO ZALBA; MARISA ANAHÍ GÓMEZ
y MARCELO ANTONIO SAGARDOY

Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur, 8000 Bahía Blanca. E-mail: lafernan@uns.edu.ar

Recibido: 13/11/04

Aceptado: 22/06/05

RESUMEN

En el presente trabajo se estudia la habilidad fisiológica para solubilizar fosfato inorgánico de diferentes grupos bacterianos así como de cepas de *Bradyrhizobium* sp. aislados de suelos sojeros. Se recolectaron muestras de suelo y se determinó el número de la microflora total así como el total de bacterias, hongos y de solubilizadores. La capacidad de solubilizar fosfato tricálcico de los grupos de bacterias predominantes en el suelo, de 250 cepas de *Bradyrhizobium* sp. y de 10 cepas de colección se probó en placa de Petri conteniendo el medio NBRIP con 5 g L^{-1} de fosfato tricálcico. Se midió el tamaño de los halos de solubilización y se aislaron aquellas colonias que mostraban halos mayores a los 4 mm. El fósforo solubilizado se estimó cuantitativamente en medio líquido con y sin agregado de solución tampón y se comparó con una cepa comercial. El valor medio de bacterias totales fue $5,1 \cdot 10^6$ (0,06% solubilizadoras) mientras que el valor medio de hongos totales alcanzó a $3,3 \cdot 10^4$ (9,70% solubilizadores). No se encontraron diferencias significativas en el número de bacterias solubilizadoras de fosfato en los distintos suelos. Se obtuvieron 14 aislamientos solubilizadores: 10 de la microflora y 4 de *Bradyrhizobium* sp. y sus halos oscilaron entre 4 y 15 mm. Todas las cepas de colección excepto MSDJ G 49 solubilizaron fosfato en placa de Petri. Las cantidades de fosfato solubilizadas por las bacterias de la microflora variaron entre 3% y 24,1% en un medio líquido sin solución tamponada mientras que en un medio tamponado variaron entre 0,07% y 4,82%. En un medio líquido sin solución reguladora, los aislamientos de *Bradyrhizobium* sp. solubilizaron en porcentajes que variaron entre 7,1% y 8,5% mientras que en un medio tamponado oscilaron entre 0,1% y 0,16%. No se observaron diferencias significativas en las cantidades de fosfato solubilizadas por los aislamientos de *Bradyrhizobium* sp. en un medio tamponado con respecto a la mayoría de los aislamientos de la microflora. No se destacó la capacidad de solubilización de fosfatos de la cepa comercial con respecto a lo observado en los aislamientos de este trabajo. Nuestros resultados permiten concluir que existen aislamientos de bacterias del suelo con diferente capacidad solubilizadora de fósforo inorgánico y que las cepas de *Bradyrhizobium* sp. muestran capacidades de solubilización comparables a las de otros géneros bacterianos.

Palabras clave. Solubilización de fosfato, *Bradyrhizobium*, bacterias del suelo.

PHOSPHATE INORGANIC SOLUBILIZING BACTERIA ISOLATED FROM SOYBEAN REGION SOILS

ABSTRACT

The present research focuses on the study of the ability to solubilize inorganic phosphate of different bacterial groups as well as of *Bradyrhizobium* sp. strains isolated from soybean soils. Soil samples were collected and the microflora as well as the total number of bacteria, fungi, and solubilizers was assessed. The phosphate solubilization ability of the predominant bacterial groups, of 250 *Bradyrhizobium* sp. strains, and of 10 collection strains was tested in Petri dishes containing NBRIP supplemented with 5 g L^{-1} of tricalcium phosphate. The size of solubilizing halos was measured and those colonies showing halos larger than 4 mm were isolated. Solubilized phosphate was quantitatively estimated in broth with and without buffer in these strains and it was compared with a commercial strain. The total bacteria mean values reached $5.1 \cdot 10^6$ (0.06% solubilizers) while the total fungi reached $3.3 \cdot 10^4$ (9.70% solubilizers). No significant differences in the number of solubilizing bacteria were observed in the different soils. Fourteen solubilizing strains were obtained: 10 from microflora and 4 *Bradyrhizobium* sp. strains whose halos ranged from 4 to 15 mm. All collection strains except MSDJ G49 solubilized phosphate in the plate assay. The amounts of solubilized phosphate by the strains of microflora varied from 3% to 24.1% in a liquid medium without buffer while with buffer varied from 0.07% to 4.82%. In a liquid medium without buffer, the strains of *Bradyrhizobium* sp. solubilized in percentages ranging from 7.1% to 8.5% while with buffer, the percentages ranged from 0.1% to 0.16%. No significant differences were observed in the amounts of solubilized phosphate in a liquid medium with buffer between strains of *Bradyrhizobium* sp. and the majority of the microflora strains. The phosphate solubilization ability of the commercial strain studied was not as relevant as that of the other strains. Our results lead to conclude that there are bacterial strains with different abilities to solubilize inorganic phosphate and that the strains of *Bradyrhizobium* sp. show relevant solubilization ability with respect to other bacterial genera.

Key words. Phosphate solubilization, *Bradyrhizobium*, soil bacteria.

INTRODUCCIÓN

El fósforo después del nitrógeno, es el nutriente inorgánico más requerido por plantas y microorganismos y además, en el suelo es el factor limitante del desarrollo vegetal a pesar de ser abundante tanto en formas inorgáni-

cas como orgánicas (Alexander, 1980). Las plantas deben absorberlo del suelo, donde se encuentra en muy baja concentración, normalmente en niveles que varían entre 5 y 30 mg kg^{-1} . Estos índices bajos del nutriente se deben a que el fósforo soluble reacciona con iones como el

calcio, el hierro o el aluminio que provocan su precipitación o fijación, disminuyendo su disponibilidad para los vegetales (Rodríguez y Fraga, 1999). Los fosfatos inorgánicos aplicados como fertilizantes químicos también son inmovilizados en el suelo y como consecuencia no son solubles para ser aprovechados por los cultivos (Peix *et al.*, 2001). Por lo tanto se considera, que la solubilización de distintas rocas fosfatadas y de otras fuentes de fósforo inorgánico por los microorganismos del suelo es una alternativa fundamental para incrementar la cantidad de nutriente disponible para las plantas (Illmer y Schinner, 1992).

Se han aislado de distintos suelos bacterias solubilizadoras de fosfato pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium* y *Erwinia* (Nahas, 1996; Kumar *et al.*, 2001). Estos microorganismos crecen en medios con fosfato tricálcico, apatita o materiales insolubles similares como única fuente de fosfato y no solo asimilan el elemento sino que solubilizan una gran proporción del mismo, liberándolo en cantidades superiores a sus demandas nutricionales. El principal mecanismo microbiológico por el cual los compuestos fosfatados son movilizados es la disminución del pH del medio por la liberación de ácidos orgánicos (Alexander, 1980). Se han descrito otros posibles mecanismos que incluyen la eliminación de protones afuera de la célula y su intercambio con cationes unidos al fósforo o la producción de ácidos inorgánicos como el ácido sulfhídrico, el ácido nítrico o el ácido carbónico (Rodríguez y Fraga, 1999).

Si bien muchos géneros bacterianos presentan esta capacidad para solubilizar fósforo inorgánico, es de particular interés detectar esta habilidad en grupos que tengan otras propiedades de promoción de crecimiento vegetal, como por ejemplo, capacidad para fijar nitrógeno atmosférico. Se han aislado microorganismos como *Azospirillum lipoferum* o *Azotobacter chroococcum* que además de ser fijadores libres de nitrógeno, son capaces de promover el crecimiento vegetal mediante la solubilización de fosfatos inorgánicos (Murty y Ladha, 1988; Kundu y Gaur, 1980). Además, distintas especies de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, bacterias del suelo que fijan nitrógeno en asociación simbiótica con distintas leguminosas, poseen capacidad de solubilización de fósforo inorgánico (Halder y Chakrabarty, 1993; Surange y Kumar, 1993).

Existen diferentes métodos para seleccionar microorganismos solubilizadores de compuestos de fósforo inorgánico aislados del suelo. Los distintos criterios presentan sus ventajas y desventajas. Si bien se ha demostrado que la selección a partir de la formación del halo

de solubilización no es una técnica infalible (Nautiyal, 1999), tampoco la concentración de fósforo detectada en cultivo líquido lo es (Rodríguez y Fraga, 1999). Gyaneshwar y col. (1998) demostraron que algunos microorganismos que solubilizan fósforo en condiciones de laboratorio no son capaces de hacerlo en vertisoles alcalinos. Esta incapacidad se debe posiblemente al alto poder de resistencia a los cambios de pH de los suelos alcalinos junto con la baja secreción de ácidos orgánicos que producen los microorganismos en esos ambientes. Gyaneshwar y col. (2002) determinaron que es mejor adoptar técnicas de selección de cepas a partir de ensayos que reflejen la capacidad amortiguadora de pH del suelo y por lo tanto serían válidos sólo aquellos métodos que incorporen soluciones tamponadas a los medios de cultivo. De todas maneras, sólo los ensayos de campo, establecerán si la capacidad solubilizadora de fósforo inorgánico de los organismos seleccionados *in vitro* realmente tiene efecto sobre plantas de interés comercial.

Sobre la base de los antecedentes enunciados se plantea la siguiente hipótesis de trabajo: numerosos géneros bacterianos del suelo, entre ellos el género *Bradyrhizobium* ampliamente estudiado en función de su capacidad para fijar nitrógeno, solubilizan compuestos de fósforo inorgánico. Por lo tanto, se establecen los siguientes objetivos: 1) estudiar la capacidad fisiológica de solubilización de fosfato inorgánico en diferentes aislamientos bacterianos de suelos cultivados con soja y 2) detectar esa habilidad en bacterias del género *Bradyrhizobium* procedentes de los mismos suelos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Determinación de las características de los suelos, del número de la microflora total (bacterias y hongos), de bacterias y de hongos

Se tomaron muestras de suelos de establecimientos agrícolas de la región sojera argentina: 3 pertenecen a Pergamino (Buenos Aires) y 2 a Manfredi (Córdoba). Las mismas se extrajeron a una profundidad de 10 cm, se secaron al aire y se tamizaron con malla de 2 mm para la realización de los distintos ensayos. En cada una de las muestras se determinó: pH (H₂O; 1:2,5) potenciométricamente con un electrodo de vidrio; C orgánico total por combustión seca utilizando un analizador de carbono LECO (LECO Corporation, St. Joseph, MI); N total por el método de Kjeldahl (Bremner, 1996) y P extractable por el método de Bray-Kurtz (1945). Estas características se presentan en la Tabla 1.

Para determinar el número de la microflora de los suelos, se practicó la técnica de las diluciones decimales y siembra en placa de Petri, utilizando el medio agar nutritivo (Laboratorios Britania S.A.) y 4 placas por dilución sembrada. Se cuantificó a las bacterias con la misma técnica y siembra en medio agar nutritivo con cicloheximida (100 mg L⁻¹) y para hongos se utilizó el medio

Tabla 1. Características físicas y químicas de los suelos estudiados.
Table 1. Physicals and chemicals characteristics of the studied soils.

Suelos	Textura	CO (g C kg ⁻¹)	Nt (g N kg ⁻¹)	Pe (mg P kg ⁻¹)	pH
Per 1	Franco arcilloso a arcillo limoso	19,4	1,71	14,61	6,14
Per 2	Franco arcillo limoso	20,5	1,66	23,13	6,04
Per 3	Franco limoso	22,5	1,72	14,09	6,15
Man 1	Franco limoso	9,8	1,01	40,76	6,85
Man 2	Franco limoso	16,6	1,38	52,86	7,40

Per 1, 2 y 3: suelos de Pergamino (Buenos Aires); Man 1 y 2: suelos de Manfredi (Córdoba); CO: carbono orgánico; Nt: nitrógeno total; Pe: fósforo extractable; pH (suelo/agua= 1:2,5 p/v). CO (g C kg⁻¹), Nt (g N kg⁻¹), Pe (mg P kg⁻¹) determinaciones efectuadas por el LANAIS N-15, CONICET-UNS (Agronomía).

Martin (1950) (pH 5) con la incorporación de rifampicina (40 mg L⁻¹). En ambos casos se incubó a 30 °C durante 2-3 días.

Aislamientos y cepas de *Bradyrhizobium*

Se obtuvieron 250 aislamientos del género *Bradyrhizobium* por purificación a partir de nódulos de plantas de soja (Gómez, 2001) sembradas en los suelos estudiados. Las plantas desarrollaron en cámara de crecimiento durante 30 días a 24 °C (16h) y a 20 °C (8h). Además, se obtuvieron 10 cepas de la colección del Laboratorio de Microbiología de Suelos del INRA Dijón (Francia) que provienen de suelos argentinos cultivados con soja y corresponden a distintos genotipos (Gómez, 2001).

Determinación de la solubilización de fósforo

Se determinó el número de bacterias y de hongos solubilizadores por gramo de suelo de manera similar a la descripta para número de la microflora pero utilizando el medio NBRIP. Este medio contiene (L⁻¹): glucosa 10 g; Ca₃(PO₄)₂ 5 g; MgCl₂·6H₂O 5 g; MgSO₄·7H₂O 0,25 g; KCl 0,2 g y (NH₄)₂SO₄ 0,1 g (Nautiyal, 1999). Las cajas se incubaron a 28 °C durante 7 días hasta la aparición de halos claros alrededor de las UFC solubilizadoras de fosfato.

Se seleccionaron las colonias solubilizadoras cuyos tipos morfológicos eran predominantes y se realizaron cultivos líquidos en caldo nutritivo. Se sembraron 10 µL de cada cultivo (Densidad Óptica=0,6) en medio NBRIP a razón de 4 aislamientos por caja de Petri. Se incubaron las placas durante 11 días a 28 °C hasta observar la aparición de un halo claro alrededor de las colonias. El tamaño de los halos se calculó restando el diámetro de la colonia del diámetro total y se aislaron las que mostraban halos mayores a los 4 mm. De la misma manera, se evaluó la capacidad para solubilizar fósforo inorgánico de los 250 aislamientos de *Bradyrhizobium* sp. y de las 10 cepas de colección.

Los aislamientos bacterianos de la microflora y los de *Bradyrhizobium* que se seleccionaron por el tamaño del halo, se utilizaron para cuantificar el fósforo solubilizado en medio líquido (de Freitas *et al.*, 1997). Se incorporó en este análisis cuantitativo una cepa comercial del mercado argentino (*Pseudomonas fluorescens*). Se transfirió 1 mL de cada cultivo bacteriano (10⁹ UFC) a erlenmeyers con 50 mL de medio NBRIP, con y sin agregado de solución tampón (100 mM de Tris-HCl). El pH final del medio tamponado era igual a 9 (Gyaneshwar *et al.*,

1998). Se realizaron dos repeticiones por cepa y se dejaron dos testigos sin inocular. Luego de 9 días de incubación se tomó aseptícamente una alícuota de 2 mL de cada erlenmeyer, se centrifugó a 10.000 rpm durante 12 minutos para sedimentar las bacterias y el fósforo inorgánico. Se midió en el sobrenadante el pH y el fósforo soluble con espectrofotómetro a 620 nm (Murphy y Riley, 1962).

Análisis estadístico de los datos

Se realizó el análisis DMS o LSD para comparar número de la microflora, de bacterias, de hongos y para establecer si existen diferencias entre la capacidad de las cepas para solubilizar fósforo en medio líquido (Steel y Torrie, 1997).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Propiedades y datos microbiológicos de los suelos

Los resultados de la determinación del número total de la microflora (bacteria y hongos), bacterias, hongos del suelo y de los organismos solubilizadores se muestran en la Tabla 2.

En este trabajo, los valores medios observados por gramo de suelo seco fueron de 5,1 10⁶ UFC bacterianas, siendo 3,0 10³ solubilizadoras de fosfato (0,06% del total) mientras que el valor medio de hongos totales fue 3,3 10⁴, siendo 3,2 10³ solubilizadores (9,70% del total). No se encontraron diferencias significativas entre el número de bacterias solubilizadoras de los diferentes suelos (p<0,05). En cambio se diferenció estadísticamente (p<0,05) el suelo Per 2 debido al mayor número de hongos solubilizadores. Las características físicas y químicas de los distintos suelos fueron similares. La excepción fue el alto tenor de fósforo extractable determinado en los suelos Man 1 y Man 2 pero que sin embargo no influyó en la cantidad de microorganismos solubilizadores.

Tabla 2. Número de microflora total, bacterias, hongos y porcentaje de solubilizadores de fosfato en cinco suelos de la región sojera argentina.**Table 2.** Number of total microflora, bacteria, fungi and percentage of phosphate solubilizers in five soils from the soybean region of Argentine.

Suelos	Microflora total (10 ⁷ UFC g ⁻¹ de suelo)	Bacterias		Hongos	
		Totales (10 ⁶ g ⁻¹)	Solubilizadoras (10 ³ g ⁻¹)	Totales (10 ⁴ g ⁻¹)	Solubilizadores (10 ³ g ⁻¹)
Per 1	3,4a ^{1, 2}	4,1ab	3,7(0,09) ³ a	2,0a	1,5(7,31)a
Per 2	4,7ab	4,6abc	3,2(0,09)a	3,8b	8,5(22,00)b
Per 3	4,6ab	3,2a	3,2(0,10)a	3,3b	1,0(3,00)a
Man 1	5,9b	7,2c	2,0(0,03)a	3,5b	4,0(11,36)a
Man 2	3,5a	6,5bc	3,0(0,05)a	3,9b	1,2(11,36)a
Promedio	4,4	5,1	3,0(0,06)	3,3	3,2(9,70)

¹Cada valor en la Tabla es la media de 4 repeticiones. ²Valores medios con letras iguales no son estadísticamente diferentes (p=0,05). ³Los valores entre paréntesis indican el porcentaje del total de bacterias y hongos que solubilizaron el fosfato tricálcico.

El número de microorganismos solubilizadores de compuestos de fosfato inorgánico varía ampliamente de un suelo a otro. Kucey (1983) encontró que las bacterias y los hongos solubilizadores de suelos vírgenes y cultivados del sur de Alberta (Canadá) constituyeron menos del 1% de la población microbiana. Peix y col (2001) estudiaron esta característica en poblaciones bacterianas de los suelos del norte de España y obtuvieron menos de 100 UFC solubilizadoras por gramo de suelo. Sin embargo, Nahas y col. (1994) obtuvieron mayores porcentajes en 13 suelos con textura arcillosa de la región de Jaboticabal (Brasil): de 2,68 10⁶ bacterias totales, 4,40 10⁵ fueron solubilizadoras, lo que implica un 16,4% del total de la microflora bacteriana, mientras que de un total de 1,62 10⁴ hongos, 4,90 10³ poseyeron la capacidad solubilizante que representa un 30% de la microflora fúngica. Chabot y col. (1993) trabajaron con suelos de Canadá y observaron que en un suelo franco arcillo-limoso la microflora solubilizadora representó un 26% del total de los microorganismos presentes en el suelo mientras que para un suelo arcillo-limoso alcanzó el 46%.

La variabilidad en el número de microorganismos solubilizadores de fósforo descrita previamente, puede responder a múltiples causas. Kucey y col (1989) señalaron que esta variación se debe al clima y a la historia de cultivo del suelo. Kobus (1962) estableció que la diferencia en el número de microorganismos solubilizadores está influenciada por el tipo de suelo y los cultivos, más que por las características físicas y químicas del mismo. Sin embargo, es importante remarcar que el método de enumeración utilizado por cada investiga-

dor también podría ser causa de variabilidad. Kucey (1983) afirma que un medio de cultivo con fuentes carbonadas excluye a aquellos organismos solubilizadores de fosfato que no utilicen eficientemente los carbohidratos. Por lo tanto, se deduce que en los suelos estudiados en este trabajo no se hallaron diferencias en el número de microorganismos solubilizadores probablemente porque en todos los suelos se realiza una rotación de cultivo soja-maíz y en la determinación del número de organismos solubilizadores se utilizó un medio con glucosa como fuente carbonada.

Es para destacar que se observó mayor habilidad para solubilizar fosfato tricálcico en los hongos con respecto a las bacterias. En general, los aislamientos de micelios exhiben mayor poder solubilizador que las células procariotas tanto en medio líquido como sólido. Incluso esta capacidad en las bacterias se puede perder cuando se realizan sucesivas transferencias de cultivos bacterianos, pero esto no ocurre en el caso de los hongos (Kucey, 1983).

Medición del halo y solubilización de fosfato en medio líquido

Se obtuvieron 10 aislamientos bacterianos solubilizadores de fosfato: tres de Pergamino 3, cuatro de Manfredi 1 y uno de la región de Pergamino 1, 2 y Manfredi 2. Los halos formados por estas bacterias variaron entre 4 mm y 15 mm (Tabla 3) y fueron mayores a los encontrados por Nautiyal (1999). Este autor midió 2 mm de halo en *Bacillus polymyxa*, 6 mm en *Pseudomonas aeruginosa* y 7 mm en *P. fluorescens* procedentes de suelos neutros

Tabla 3. Solubilización de fosfato tricálcico (5 g L^{-1}) (contenido en fósforo: 1 g L^{-1}) en medio sólido y líquido, con y sin agregado de solución tampón (Tris-HCl 100 mM), por bacterias de la microflora y por aislamientos de *Bradyrhizobium* sp. obtenidos de nódulos de soja.

Tabla 3. Solubilization of tricalcium phosphate (5 g L^{-1}) (phosphate content 1 g L^{-1}) in solid and liquid medium, with and without buffer (Tris-HCl 100 mM), by bacteria of the microflora and by *Bradyrhizobium* sp. strains isolated from soybean nodules.

Aislamientos	Halo (mm)	Medio líquido con agregado de solución tampón			Medio líquido sin agregado de solución tampón		
		pH	P solubilizado ($\mu\text{g/mL}$)	% de P solubilizado	pH	P solubilizado ($\mu\text{g/mL}$)	% de P solubilizado
Testigo	—	9	1,5	0,1 a ²	7	4	0,4 a
Comercial	10	5,5	40,0	4,0 b	4	235	23,5 f
Per 3 A ¹	7	8	1,6	0,2 a	6	108	10,8 c
Per 1 B	14	7	1,2	0,1 a	7	30	3,0 b
Per 3 C	12	7,5	0,7	0,1 a	6	122	12,2 cd
Man 1 D	8	7,4	1,8	0,2 a	5,5	158	15,8 e
Per 2 F	10	5	48,2	4,8 c	5	112	11,2 c
Per 3 G	15	5	46,6	4,7 c	4,5	206	20,6 f
Man 1 K	5	7,2	2,0	0,1 a	4	235	23,5 f
Man 1 L	9	7,6	2,1	0,2 a	4	221	22,1 f
Man 1 LL	4	8	2,3	0,2 a	4,9	154	15,4 e
Man 2 M	4	8	2,4	0,2 a	4	241	24,1 f
Per 2 E	4	8	1,2	0,1 a	6	71	7,1 bc
Per 2 H	5	8	1,6	0,2 a	5	85	8,5 cd
Per 2 I	5	8	1,3	0,1 a	5	82	8,2 cd
Per 2 J	4	8	1,0	0,1 a	5	83	8,3 cd

Per 1, 2 y 3: suelos de Pergamino (Buenos Aires); Man 1 y 2: suelos de Manfredi (Córdoba). ¹A, B, C, D, F, G, K, L, LL y M: aislamientos bacterianos de la microflora de distintos suelos. Per 2 E, H, I y J: aislamientos de *Bradyrhizobium* sp. de nódulos de plantas de soja sembradas en el suelo Pergamino 2. ²Valores medios con letras iguales no son estadísticamente diferentes ($p=0,05$).

y alcalinos de Lucknow (India), en el mismo medio de cultivo luego de incubar 14 días a 28°C . El halo de solubilización producido por la cepa comercial en el medio sólido fue de 10 mm, mientras que los observados en los aislamientos Per 1 B, Per 3 C y G fueron de 14, 12 y 15 mm de diámetro, respectivamente.

De los 250 aislamientos de *Bradyrhizobium* sp., solo cuatro de Per 2 mostraron capacidad de solubilización de fosfato y en medio sólido los halos no superaron los 5 mm. Nueve de las 10 cepas de la colección del INRA Dijón, pertenecientes al género *Bradyrhizobium*, produjeron halos entre 5 y 12 mm; la excepción fue la cepa MSDJG49 que no solubilizó. Peix y col. (2001) estudiaron la solubilización en otros géneros del orden Rhizobiales y observaron que *Mesorhizobium mediterraneum* puede producir un halo de hasta 15 mm. No es sorprendente que solo 4 de los 250 *Bradyrhizobium* sp. aislados del suelo

tenían capacidad de solubilización ya que hay cepas en los suelos estudiados que no se encuentran en la colección donde todas mostraron esa capacidad fisiológica.

Los resultados del fósforo solubilizado y del pH obtenido en los cultivos líquidos de los aislamientos bacterianos seleccionados de la microflora y de los de *Bradyrhizobium* luego de incubar 9 días, con Tris-HCl y sin él, se muestran en la Tabla 3. En un medio sin solución tamponada las cantidades de fosfato solubilizadas por las bacterias aisladas de los suelos estudiados oscilaron entre 30 (3%) y $241 \mu\text{g mL}^{-1}$ (24,1%). El pH disminuyó de 7 a 4 para los aislamientos Man 1 K y L y Man 2 M. Nahas (1996) estudió la solubilización de roca fosfatada de Araxá y de Patos de Minas (Brasil) en bacterias y hongos aislados de suelos del Estado de San Pablo (Brasil). Este autor obtuvo porcentajes de solubilización semejantes a los de este estudio, que variaron entre 133 y $331 \mu\text{g mL}^{-1}$

de fósforo. Kim y col. (1997) trabajaron con *Rahnella aquatilis* ISL 19, aislada de rizosfera de soja. Esta cepa solubilizó en cultivo líquido con hidroxapatita 230 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de fósforo y disminuyó el pH del medio de cultivo de 6,9 a 4,5 en 3 días de incubación. Sin embargo, los resultados son diferentes cuando la solubilización de fósforo inorgánico se estudia en medios de cultivo que incluyen una solución tamponada. En este trabajo en un medio con esas características, las cantidades de fósforo solubilizadas fueron más bajas variando desde 0,07% a 4,82%. La mayoría de los aislamientos de la microflora no se diferenciaron estadísticamente ($p=0,05$) del testigo, a excepción de Per 2 F y Per 3 G. Los aislamientos mencionados solubilizaron casi el 5% del fosfato tricálcico que había sido incorporado al inicio del ensayo y disminuyeron el pH del medio a 5. Es importante destacar en estos aislamientos, que se observó una disminución del pH similar en el medio sin solución tamponada con respecto al medio tamponado y sin embargo los porcentajes de fósforo solubilizados fueron mayores en el medio sin solución reguladora y comparativamente menores en el medio de cultivo con Tris-HCl. Esta falta de relación observada entre el pH y el porcentaje de fósforo solubilizado sugiere que podrían existir otros mecanismos involucrados en la solubilización de los compuestos de fósforo, como observaron otros autores (Illmer y Schinner, 1992; Thomas, 1985). También podría ocurrir que bajo condiciones tamponadas se manifieste otro metabolismo bacteriano que implique la producción de otro/s ácido/s diferente/s a el/los liberado/s cuando el medio de cultivo no tiene tampón. Es sabido que en el proceso de solubilización, el tipo de ácido secretado por el microorganismo es más importante que la cantidad (Gyaneshwar *et al.*, 1998; Halder *et al.*, 1990).

Los aislamientos de *Bradyrhizobium* solubilizaron en medio líquido sin solución reguladora, cantidades que variaron entre 71 (7,1%) y 85 (8,5%) mientras que en un medio tamponado oscilaron entre 1 (0,1%) y 1,60 (0,2%) $\mu\text{g mL}^{-1}$ de fósforo (Tabla 3). Es importante destacar que no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,05$) en las cantidades de fosfato tricálcico solubilizadas por los aislamientos de *Bradyrhizobium* en un medio tamponado con respecto a la mayoría de los pertenecientes a la microflora y al testigo. Se puede afirmar entonces, que la solubilización de compuestos de fósforo inorgánico *in vitro* por *Bradyrhizobium* sp. infectivos, es comparable a la de otros grupos bacterianos como *Pseudomonas* y *Bacillus* en los cuales ha sido demostrada la solubilización (Nahas *et al.*, 1994; Nahas, 1996; Nautiyal, 1999). Halder y col. (1990) estudiaron la solubilización en 23 cepas de *Bradyrhizobium* y *Rhizobium* obtenidas de distintas colecciones. Esos autores incubaron durante 3 días cepas de *B. japo-*

nicum y de *Bradyrhizobium* sp. (*Cicer arietinum*) en un medio con glucosa-extracto de levadura-sulfato de amonio con distintos tipos de roca fosfatada (2 g L^{-1}) y un pH neutro. Bajo esas condiciones el fósforo solubilizado varió entre el 0,66% y el 7% mientras que registraron una disminución del pH en algunos casos hasta 3,97. Antoun y col. (1998) trabajaron con 18 cepas de colección de *Bradyrhizobium*; estudiaron distintas características *in vitro* y observaron que el 5% de las especies son solubilizadoras de fosfato en placa de Petri. Además, realizaron dos pruebas en cámara de crecimiento para determinar los efectos de la inoculación de las cepas en el cultivo de rabanito (*Raphanus sativus* L.) y encontraron que la cepa *B. japonicum* Tal 629 incrementa significativamente (un 15%) la materia seca en ese cultivo. Estos resultados demuestran que bacterias de los géneros *Bradyrhizobium* y *Rhizobium* podrían ser efectivas para aumentar la producción en plantas no-leguminosas.

La cepa comercial (*P. fluorescens*) también mostró comportamientos distintos en el cultivo líquido según si el medio tenía solución tamponada o no (Tabla 3). En el medio sin solución reguladora, esta bacteria solubilizó 235 (23,5%) $\mu\text{g mL}^{-1}$ de fósforo. Sin embargo, en el medio tamponado, los resultados del análisis estadístico demostraron que la cepa comercial solubilizó significativamente ($p=0,05$) menor cantidad de fósforo que dos aislamientos de la microflora de los suelos de Pergamino (Per 2 F y Per 3 G).

Finalmente, los resultados de este trabajo demostraron la existencia de aislamientos de bacterias del suelo y de *Bradyrhizobium* sp., con diferente capacidad solubilizadora de fósforo inorgánico. Mediante la utilización de tres técnicas distintas de selección de microorganismos solubilizadores se encontraron seis aislamientos de los suelos de Pergamino, dos de la microflora del suelo (Per 2 F y Per 3 G) y cuatro del género *Bradyrhizobium* (Per 2 E, H, I y J), que mostraron resultados comparables a los obtenidos por otros autores. La identificación de estas bacterias seleccionadas y su aplicación en ensayos directamente en el suelo, permitirá avanzar en el estudio de las mismas como potenciales herramientas de inoculación en los suelos con deficiencias de fósforo.

BIBLIOGRAFÍA

- Alexander, M. 1980. Transformaciones microbianas del fósforo. (p. 355-371). *En: Introducción a la microbiología del suelo.* AGT editor, México, 491 p.
- Antoun, H; CJ Beauchamp; N Goussard; R Chabot & R. Lalonde. 1998. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant Soil.* 204:57-67.
- Bray, RH & LT Kurtz. 1945. Determination of total, organic and available forms of phosphates in soils. *Soil Sci.* 59:39-45.
- Bremner, JM. 1996. Nitrogen-Total. (p. 1085-1128). *En: Methods of Soil Analysis.* DL Sparks (ed.). *Soil Sci. Soc. Amer. Book Series No 5.*
- Chabot, R; H Antoun & MCescas. 1993. Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. *Can. J. Microbiol.* 39:941-947.
- De Freitas, JR; MR Banerjee & JJ Germida. 1997. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biol. Fertil. Soils* 24:358-364.
- Gómez, MA. 2001. Isolement des souches a partir de nodosites de legumineuses (p. 19). *En: Diversité génétique des Bradyrhizobia nodulant le soja et mécanismes potentiellement impliqués.* Tesis Doctor de la Université de Bourgogne. France, 153 p.
- Gyaneshwar, P; KG Naresh & LJ Parekh. 1998. Effect of buffering on the phosphate-solubilizing ability of microorganisms. *World J. Microbiol. Biotech.* 14:669-673.
- Gyaneshwar, P; G Naresh Kumar; LJ Parekh & PS Poole. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil.* 245:83-93.
- Halder, AK; AK Mishra; P Bhattacharyya & PK Chakrabarty. 1990. Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 36:81-92.
- Halder, A K & PK Chakrabarty. 1993. Solubilization of inorganic phosphates by *Rhizobium*. *Folia Microbiol.* 38:325-330.
- Illmer, P & F Schinner. 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 24:389-395.
- Kim, KY; D Jordan & HB Krishnan. 1997. *Rahnella aquatilis*, a bacterium isolated from soybean rhizosphere, can solubilize hydroxyapatite. *FEMS Microbiol Lett.* 153:273-277.
- Kobus, J. 1962. The role of microorganisms in the transformation of phosphoric compounds in the soil. *Acta Microbiol. Pol.* 11:255-262.
- Kucey, RMN. 1983. Phosphate solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. *Can. J. Soil Sci.* 63:671-678.
- Kucey, RMN; HH Janzen & ME Leggett. 1989. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. *Adv. Agron.* 42:199-228.
- Kumar, V; RB Rishi Kumar & N Narula. 2001. Establishment of phosphate-solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under green house conditions. *Microbiol. Res.* 156:87-93.
- Kundu, BS & AC Gaur. 1980. Establishment of nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria in rhizosphere and their effect on yield and nutrient uptake of wheat crop. *Plant Soil.* 57:223-230.
- Martin, JP. (1950). Use of acid, rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Sci.* 69:215-232.
- Murphy, J & JP Riley. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal Chim. Acta* 27:31-36.
- Murty, MG & JK Ladha. 1988. Influence of *Azospirillum* inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydroponic conditions. *Plant Soil.* 108:281-285.
- Nahas, E; JF Centurion & LC Assis. 1994. Microorganismos solubilizadores de fosfato e productores de fosfatases de vários solos. *R. bras. Ci. Solo* 18:43-48.
- Nahas, E. 1996. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. *World J. Microbiol. Biotech.* 12:567-572.
- Nautiyal, CS. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 170:265-270.
- Peix, A; AA Rivas-Boyerero; PF Mateos; C Rodríguez-Barrueco; E Martínez-Molina & E Velazquez. 2001. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil Biol. Biochem.* 33:103-110.
- Rodríguez, H & R Fraga. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotech. Adv.* 17:319-339.
- Steel, R & J Torrie. 1997. Análisis de la Varianza I. (p.: 132-134). *En: Bioestadística: principios y procedimientos.* Segunda edición. Ed. McGraw Hill, México, 622 p.
- Surange, S & N Kumar. 1993. Phosphate solubilization under varying pH by *Rhizobium* from tree legumes. *Indian J. Exp. Biol.* 31:855-857.
- Thomas, GV. 1985. Occurrence and ability of phosphate solubilizing fungi from coconut plant soils. *Plant Soil.* 87:357-364.