

## ACTINOMICETOS MINERALIZADORES DE FOSFATO INVOLUCRADOS EN LA INTERACCIÓN RADICAL DE *Glomus* sp.-TRÉBOL BLANCO<sup>1</sup>

Ruth Milena Gómez-Vargas<sup>2</sup>, Diana Carolina Bello-Bello<sup>2</sup>, Luis Daniel Prada-Salcedo<sup>2</sup>, María Ximena Rodríguez-Bocanegra<sup>2</sup>, Luis David Gómez-Méndez<sup>2</sup>, Marcela Franco-Correa<sup>2</sup>

### RESUMEN

**Actinomicetos mineralizadores de fosfato involucrados en la interacción radical de *Glomus* sp. - trébol blanco.** El objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad de los actinomicetos para mineralizar fósforo orgánico y su interacción rizosférica con micorrizas en *Trifolium repens* L. (trébol blanco). En enero de 2009, en el laboratorio de la Unidad de Investigaciones Agropecuarias (UNIDIA) de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia, se cuantificó la actividad fosfatasa de *Streptomyces* sp. (cepa MCR9), *Streptomyces* sp. (cepa MCR26) y *Thermobifida* sp. (cepa MCR24) con la técnica del p-nitrofenil fosfato. *Thermobifida* sp. (cepa MCR24) presentó la menor actividad. La inoculación de solo actinomicetos presentó valores mayores de fósforo inorgánico en suelo, mientras que la concentración de fósforo a nivel foliar fue mayor cuando había co-inoculación actinomiceto-*Glomus* sp., a excepción de la cepa *Thermobifida* sp. (cepa MCR24). La co-inoculación con los actinomicetos y *Glomus* sp. estimuló la producción de biomasa y el porcentaje de colonización. Se determinó la capacidad para mineralizar fósforo orgánico por los actinomicetos al asociarse con *Glomus* sp. de forma sinérgica y benéfica tanto para la planta como para la micorriza. Se realizó el análisis de la varianza y prueba de “t” ALS (P<0,05) para comparar los promedios entre los tratamientos. Se determinó el grado de relación entre el porcentaje de micorrización y el peso seco de las plantas mediante “r” Coeficiente de Correlación, donde las plantas con los microorganismos presentaron una micorrización mayor del 70%.

**Palabras clave:** *Streptomyces* sp., fosfatasas, solubilización, micorriza arbuscular.

### ABSTRACT

**Phosphate-mineralizing Actinomycetes involved in root interaction of *Glomus* sp.- white clover.** The objective of this work was to determine the capacity of actinomycetes for organic phosphorus mineralization and their rhizosphere interaction with mycorrhiza of *Trifolium repens* L. (white clover). In January 2009, at the laboratory of the Unidad de Investigaciones Agropecuarias (UNIDIA) of the Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia, the phosphatase activity of *Streptomyces* sp. (strain MCR9), *Streptomyces* sp. (strain MCR26) and *Thermobifida* sp. (strain MCR24) were determined using the p-nitrophenil phosphate technique. *Thermobifida* sp. (strain MCR24) showed the lowest activity. Inoculation of actinomycetes alone resulted in higher values of inorganic soil P, while leaf P content was higher when co-inoculation of actinomycete-*Glomus* sp. occurred, with the exception of the strain *Thermobifida* sp. (strain MCR24). Co-inoculation with actinomycetes and *Glomus* sp. stimulated biomass production and colonization percent. Actinomycetes are synergistic with *Glomus* sp., resulting in benefits for the plant and the mycorrhiza. Analysis of variance and “t” tests ALS (P<0,05) were conducted to compare the treatments. The relation between the degree of mycorrhization plant dry weight was determined by the “r” correlation coefficient, and plants associated with microorganisms was higher than 70%.

**Key words:** *Streptomyces* sp., phosphatases, solubilization, arbuscular mycorrhiza.

<sup>1</sup> Recibido: 27 de octubre, 2010. Aceptado: 3 de octubre, 2011.

<sup>2</sup> Unidad de Investigaciones Agropecuaria (UNIDIA), Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. Proyecto de Investigación financiado por la Vicerrectoría Académica de la Pontificia Universidad Javeriana. hoja\_verde@hotmail.com; carolina.bello\_@hotmail.com; luisd09@hotmail.com; mxrodriguez@javeriana.edu.co; luis.gomez@javeriana.edu.co Autor de correspondencia: franco@javeriana.edu.co. Cra. 7 No. 43 – 82. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.

## INTRODUCCIÓN

El fósforo (P) constituye cerca del 0,2% del peso seco de las plantas (Huss-Danell 1997). Las formas inorgánicas son complejos minerales insolubles, por la reacción del fósforo con iones calcio, hierro y aluminio. La materia orgánica también es una reserva de fósforo inmovilizado que constituye entre 20-80% del fósforo del suelo (Whitelaw 2000, Gyaneshwar *et al.* 2002). En el suelo el 80% se encuentra inmovilizado y no disponible debido a la adsorción, precipitación o conversión a la forma orgánica (Holford 1997). Es por esto que se considera al fósforo como el segundo nutriente limitante en los cultivos vegetales después del nitrógeno (Arcand y Schneider 2006). Uno de los mecanismos utilizados por los microorganismos para solubilizar el fósforo inorgánico, es la disminución del pH del medio que los rodea por secreción de ácidos orgánicos (Chen *et al.* 2006) y la exudación de sustancias quelantes (como sideróforos) (Welch *et al.* 2002).

La liberación de fósforo a partir de la materia orgánica por medio de las fosfatasas puede llegar a ser una importante fuente de fósforo disponible. La mineralización de este se realiza por medio de fosfatasas, bien sea ácidas o alcalinas (Turner y Haygarth 2005, El-Tarabily *et al.* 2008). Muchos microorganismos dejan disponible el fósforo mediante mineralización y/o solubilización. Hay diversas bacterias, como los actinomicetos, y géneros fúngicos (Rudresh *et al.* 2005, Oliveira *et al.* 2008) como las micorrizas arbusculares que incrementan la captación de fósforo por parte de la planta (Ouahmane *et al.* 2007).

Este interés de utilizar tanto micorrizas como rizobacterias para incrementar la cantidad de fósforo disponible para las plantas (Ayyadurai *et al.* 2006, Son *et al.* 2006), asociado a los estudios de Franco-Correa *et al.* (2010), que demostraron la interacción benéfica entre actinomicetos y micorrizas; así como los pocos estudios sobre los mecanismos involucrados en la mineralización del fósforo por los actinomicetos (El-Tarabily *et al.* 2008).

La presente investigación tuvo como objetivo determinar la capacidad de los actinomicetos para mineralizar fósforo orgánico y su interacción rizosférica con micorrizas en *Trifolium repens* L. (trébol blanco).

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se realizó en el año 2009-2010, en el laboratorio UNIDIA del Departamento de Microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

### Cepas microbianas utilizadas

Las tres cepas de actinomicetos evaluadas (*Streptomyces* sp. (cepa MCR9), *Thermobifida* sp. (cepa MCR24) y *Streptomyces* sp. (cepa MCR26) fueron obtenidas de los aislamientos realizados por Franco-Correa (2008), a partir de muestras de suelo rizosférico de trébol blanco. Las cepas se sembraron en agar avena (avena 60 g/l, agar 15 g/l) e incubaron a 22°C durante ocho días. *Azotobacter* sp. fue el control positivo para la mineralización de fosfatos (cepa suministrada por la Corporación Colombiana de investigación Científica - Corpoica).

### Cuantificación de la mineralización de fosfatos

Se utilizó la técnica de *p*-nitrofenil fosfato en cultivos crecidos en caldo Pikovskaya (Pikovskaya 1948), 45 ml de medio para las cepas de actinomicetos y 120 ml del medio para *Azotobacter* sp. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Para los actinomicetos, se realizó una suspensión de conidios (10<sup>6</sup> conidios/ml) en solución salina (0,85% p/v), a partir de la cual se inocularon 4,5 ml correspondientes al 10% VET (volumen efectivo de trabajo) por erlenmeyer. Para *Azotobacter* sp. se realizó una suspensión de células en solución salina (0,85% p/v) con una concentración de 10<sup>6</sup> células/ml; a partir de la cual se inocularon 12 ml correspondientes al 10% del VET por erlenmeyer. Los erlenmeyer de los actinomicetos fueron incubados a temperatura ambiente (15°C-18°C) a 100 rpm durante ocho días. Cada 24 horas se realizó un muestreo de 250 ml del cultivo, al cual se le adicionó 321,5 µl de *p*-nitrofenil fosfato (0,08% p/v) (Merck) como sustrato cromógeno, preparado en tampón fosfato a pH 7 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 57,7 1M; NaHPO<sub>4</sub> 42,3 1M en 100 ml de agua destilada estéril); la reacción se incubó a 35°C, una hora.

Se detuvo adicionando 562,5  $\mu$ l de NaOH, y se centrifugó a 6225 g, durante diez minutos. Se tomó el sobrenadante y se midió la absorbancia a 450 nm. Para *Azotobacter* sp. la metodología utilizada fue la misma, a excepción del tiempo de incubación de tres días y el muestreo realizado cada cuatro horas (Tabatabai y Bremner 1969).

## Bioensayos

**Elaboración del semillero y diseño experimental.** Las semillas de trébol carretón blanco gigante - Agropaz (*T. repens* L.) fueron desinfectadas en hipoclorito de sodio (0,5%), durante quince minutos, a 50 rpm. Se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, y se hidrataron en agua destilada estéril durante una hora a 50 rpm. A continuación, las semillas fueron sembradas en un semillero con suelo-abono-plantitierra no estéril (tamizado por 4 y 12 mm) y arena (3:1). Las plantas crecieron en invernadero (18°C) durante dos meses. Se trasplantaron a materos, ubicando cuatro plántulas equidistantemente por matero (11 cm x 11 cm) en suelo no estéril. Hubieron ocho tratamientos: *Streptomyces* sp. (cepa MCR9), *Thermobifida* sp. (cepa MCR24), *Streptomyces* sp. (cepa MCR26), *Streptomyces* sp. (cepa MCR9) + *Glomus* sp., *Streptomyces* sp. (cepa MCR26) + *Glomus* sp., *Thermobifida* sp. (cepa MCR24) + *Glomus* sp., Testigo (Agua) y *Glomus* sp. que fueron replicados ocho veces para un total de 48 materos, distribuidos aleatoriamente en el invernadero, entre ocho mesones, separando cada tratamiento con un plástico para evitar contaminación cruzada. El riego fue controlado para mantener la humedad cercana a la capacidad de campo, utilizando un termohidrómetro. No se aplicó ningún tipo de fertilización química.

**Preparación de inóculos e inoculación de plántulas con cepas de actinomicetos y *Glomus* sp.** Las cepas MCR9 sp, MCR24 sp. y MCR26 sp., fueron cultivadas en erlenmeyer con 120 ml de caldo ISP2 (Hamdali *et al.* 2008a). Evaluaciones previas, determinaron que los tratamientos con actinomiceto únicamente, fueron inoculados con 2 ml del cultivo en caldo ISP2, mientras que los tratamientos con actinomiceto + *Glomus* sp., fueron inoculados con 1 ml del cultivo en caldo ISP2; en ambos casos se adicionó una concentración de  $10^8$  células/ml al suelo rizosférico del tratamiento respectivo (Franco-Correa

2008). El inóculo de micorriza (*Glomus* sp.) se obtuvo de Corpoica-Tibaitatá, compuesto por una mezcla de suelo, raíces colonizadas, hifas y esporas; 10 g de este inóculo (25 esporas/g) fueron mezclados con el suelo de las plántulas de los tratamientos con micorriza (Vivas *et al.* 2003).

**Evaluación de la colonización de las cepas de actinomicetos.** Aleatoriamente, se tomaron muestras de rizosfera de las plántulas de los materos de un tratamiento específico, obteniendo una submuestra. Se pesó 1 g y se realizaron diluciones seriadas en base 10 hasta  $10^{-4}$ , en solución salina (0,1%). De las diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  se tomó 0,1 ml y se sembró (por triplicado) en superficie, en agar avena con nistatina al 0,1%. Se incubó a 25°C durante ocho días y se realizó el recuento de las UFC/ml (Unidades Formadoras de Colonia). Todo el procedimiento descrito anteriormente se llevó a cabo para cada uno de los tratamientos, excepto con *Glomus* sp. y el testigo, donde se determinó que no tenían presencia de actinomicetos. La evaluación de la colonización se realizó en dos muestreos, el primero fue realizado a los cuatro meses de edad del cultivo y el segundo a los seis meses.

**Evaluación de la colonización con *Glomus* sp.** Se realizó el aislamiento de esporas de *Glomus* sp. por tamizado y decantación según Genderman y Nicolson (1963) modificada por Sieverding (1991), donde se pesaron 25 g de sustrato, los cuales fueron mezclados vigorosamente con el agua y centrifugados a 2500 rpm durante 2 min. El sobrenadante conteniendo restos orgánicos fue descartado y a continuación se adicionó una solución de sacarosa al 50% (p/v), centrifugándolo a 2500 rpm durante 2 min. A continuación el sobrenadante fue vertido sobre tamices Tyler de 500, 250 y 50  $\mu$ m, el cual fue lavado con abundante agua. Este líquido fue arrastrado a una placa Doncaster para su observación microscópica bajo lupa estereoscópica a 50-75 aumentos. Mediante los caracteres morfológicos citados por Morton y Redecker (2001) se confirmó que las esporas pertenecían al género de *Glomus*. Las esporas aisladas de *Glomus* sp. fueron observadas microscópicamente, encontrando que su caracterización morfológica sí correspondía a este género micorrízico. Adicionalmente, se determinó el porcentaje de colonización por tinción con Azul de Tripán según Phillips y Hayman (1970)), donde las raíces fueron separadas del sustrato utilizando tamices de la serie Tyler de 2 y 1 mm de luz. Posteriormente fueron lavadas con agua

corriente, secadas y pesadas. Se tomaron muestras de aproximadamente 0,2 g de raíz, se cortaron en segmentos de 1 cm y se surmegieron en una solución de KOH al 10% p/v, dejándolas incubando a temperatura ambiente durante doce horas. Se eliminó la solución de KOH y las raíces fueron lavadas con abundante agua, se adicionó HCl al 1% (p/v) durante tres horas, se eliminó esta solución y se añadió la solución de azul de Tripán al 0,05% p/v en ácido láctico, dejándolas durante seis horas en incubación a temperatura ambiente. Finalmente se eliminó la solución de azul de tripán, se lavaron con agua y se conservaron en ácido láctico hasta su observación. Las raíces coloreadas fueron observadas en el microscopio. En una submuestra se estimó el grado de micorrización y de arbusculos por el método de la cuadrícula de Giovanetti y Mosse (1980), la cual consiste en una cuadrícula de 1 x 1 cm. Se registró la presencia de estructuras de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) en las intersecciones horizontales y verticales entre raíces y líneas mediante observación microscópica (45x). El número de intersecciones cuantificadas en cada muestra se mantuvo dentro del rango 112-395, con un promedio de 193 raíces/muestra. Se realizó la cuantificación de la micorrización por la técnica de Trouvelot *et al.* (1986), se cortaron treinta segmentos de 1 cm de las raíces teñidas, se montaron paralelamente en portaobjetos y se realizó la observación microscópica (45 x). Cada segmento fue categorizado entre las clases 0 (0% infección) hasta 5 (>95% infección).

**Evaluaciones adicionales.** Finalizados seis meses del bioensayo, se recolectó un total de doce plantas por tratamiento. El análisis parcial de elementos disponibles en suelo y el análisis del contenido de elementos a nivel foliar, se llevaron a cabo a partir de una submuestra correspondiente al contenido de tres materos, pertenecientes a un mismo tratamiento. Los materos fueron elegidos de forma aleatoria. El suelo rizosférico recolectado a partir de los materos fue homogenizado, y una muestra respectiva de los mismos fue llevada al Centro de Investigaciones y Asesorías Agroindustriales (CIAA) de la Universidad Jorge Tadeo Lozano (Bogotá-Colombia), donde se determinó la concentración de fósforo empleando el método de Colorimetría y lectura del pH del suelo. El suelo control también fue evaluado bajo este análisis. Para el análisis foliar se cuantificó la concentración y contenido de fósforo por el método de Carolina del Norte,

metodología realizada en el Instituto Agustín Codazzi. Además, se determinó la biomasa foliar y radicular (peso seco) medida en los meses dos, cuatro y seis y se determinó la longitud de raíz micorrizada (porcentaje), como variables relacionadas con el crecimiento de la planta (Franco-Correa 2008).

### Análisis estadístico

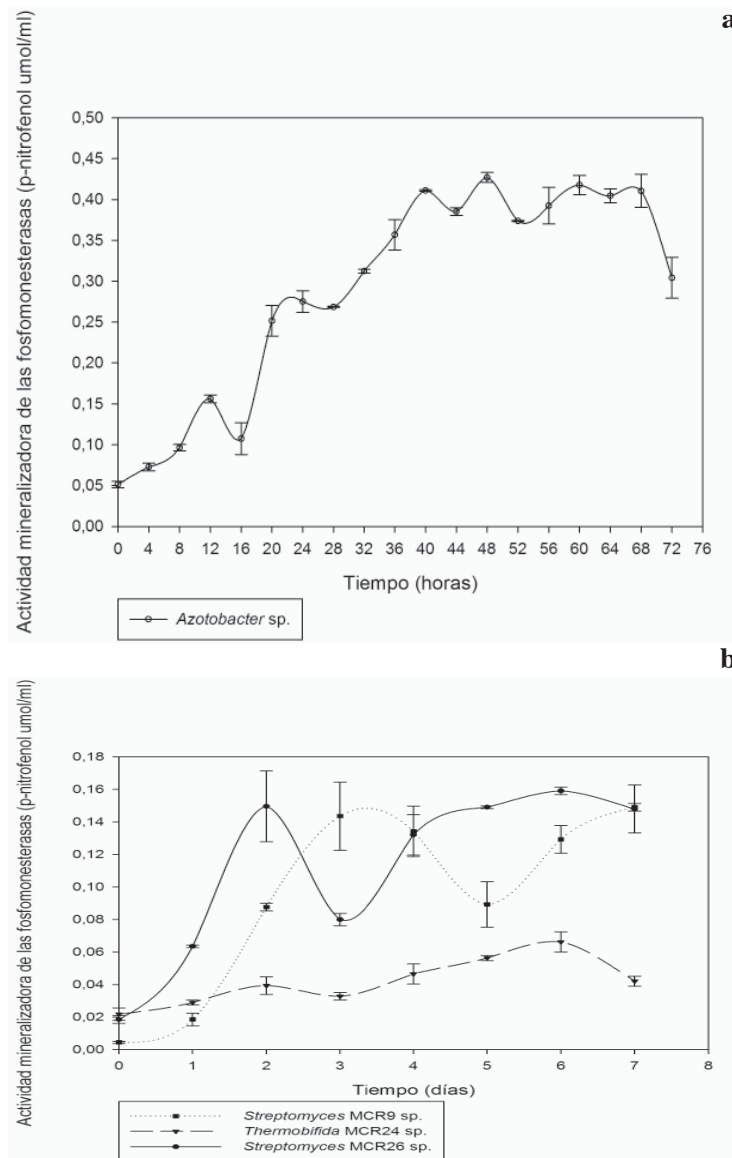
Se utilizó el programa estadístico SAS (2009) y la verificación de resultados en SPSS-v.15.0. Se realizó una prueba de ANOVA y rango múltiple de Duncan para analizar los resultados de mineralización de fósforo, peso seco, longitud de raíz micorrizada y muestreos. Se realizó un análisis de correlación entre las variables evaluadas. Los resultados de evaluación físico-química (P) de porción foliar y análisis parcial de elementos disponibles (P) en suelo, se analizaron de manera descriptiva realizando gráficas de barras.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Mineralización de fosfatos mediante la detección de fosfomonoesterasas

Mediante la prueba de ANOVA empleada para analizar la actividad mineralizadora de fosfato *in vitro*, no se encontraron diferencias significativas entre réplicas ( $p > 0,05$ ) infiriendo que no se presentó una variabilidad entre ellas, por lo tanto le dan validez a los resultados expuestos en los tratamientos. Al comparar la actividad mineralizadora de fosfato de las tres cepas de actinomicetos con *Azotobacter* sp. (Figura 1), se observó una solubilización inferior, con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Este es un resultado esperado porque las cepas no pertenecen al mismo grupo bacteriano, es así que se pueden presentar comportamientos diferentes. Los actinomicetos sí presentaron la capacidad solubilizadora de fosfato orgánico.

Adicionalmente, no observaron diferencias significativas entre las actividades de las cepas *Streptomyces* sp. MCR9 y MCR26 según Duncan, lo cual demuestra que tienen una actividad mineralizadora de fosfato similar, mientras que la cepa *Thermobifida* sp. (cepa MCR24) presenta una actividad significativamente inferior a la de éstas (Figura 1b). Se observaron diferencias significativas en la actividad



**Figura 1.** Medición de la actividad mineralizadora de fosfato con p-nitrofenol para detectar la actividad enzimática de las fosfomonoesterasas. (a) *Azotobacter* sp. (b) Cepas de actinomicetos. Laboratorio de la Unidad de Investigaciones Agropecuarias (UNIDIA), Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá – Colombia. Marzo de 2009.

mineralizadora entre los tiempos de muestreo ( $p < 0,05$ ). *Streptomyces* sp. (cepa MCR26) y *Thermobifida* sp. (cepa MCR24) presentaron una velocidad mayor en la actividad enzimática mineralizadora al ser comparada

con la de *Streptomyces* sp (cepa MCR9), cepa que presentó el mayor nivel de actividad enzimática días después (Figura 1b). El género *Thermobifida* no ha sido estudiado previamente como mineralizador de

fósforo, siendo un aporte significativo de este trabajo. Según Barreto *et al.* (2008) los actinomicetos son un grupo de procariotes conocidos por intervenir en el ciclaje de nutrientes del suelo, de ahí que presenten la actividad de solubilización del fósforo inorgánico.

### Bioensayos

**Evaluación de la colonización de las cepas de actinomicetos.** Se encontró que las tres cepas de actinomicetos, en cada uno de los dos muestreos analizados, lograron colonizar el suelo no estéril, sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, se observó un incremento con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en el Log UFC/ml, a medida que transcurría el tiempo del ensayo, ya que los valores de las medias en el primer muestreo (cuatro meses) fueron menores que los obtenidos en el segundo muestreo (seis meses) (Cuadro 1). Los resultados de este último, permitieron evidenciar que en el caso de *Thermobifida* sp. (cepa MCR24) se obtuvo un leve incremento en el valor de la media de Log UFC/ml cuando fue inoculada con *Glomus* sp, en comparación con solo la cepa de actinomiceto, mientras que en el caso de las cepas de *Streptomyces* sp. no se observó este efecto, demostrando que el nivel de colonización en MCR26 y MCR9 no se vio influido al estar o no en compañía del inóculo micorrízico (Cuadro 1).

Se encontró que las cepas MCR9, MCR24 y MCR26 fueron capaces de colonizar el suelo rizosférico de las plántulas de trébol blanco. Esta colonización rizosférica se ve influenciada por el efecto rizosférico que la planta le brinda al ambiente donde se están desarrollando, permitiendo que crezcan y se desarrollen (Harvey *et al.* 2002).

**Evaluación de la colonización con *Glomus* sp.** A los seis meses del ensayo se observaron las raíces con zonas de colonización micorrízica, logrando demostrar que *Glomus* sp. se establece en el suelo y lleva a cabo su asociación con las raíces de trébol. Lo anterior indica que la germinación de las esporas y el crecimiento de las micorizas arbusculares no se afecta por la presencia de los actinomicetos. Estos datos confirman lo publicado por Franco-Correa *et al.* (2010), quien determinaron que algunas cepas de actinomicetos pueden retrasar la germinación de la espora del hongo micorrízico, pero que no afectan el proceso de colonización ni la fisiología de la planta.

**Evaluaciones adicionales. pH.** Se observó que el suelo inoculado con la cepa MCR24 presentó el valor de pH más ácido, seguido por los otros tratamientos inoculados que presentaron valores similares a excepción de la cepa MCR9 (Cuadro 2). Los cambios en el pH son producto de la actividad microbiana en el suelo, pues el valor del testigo no presentó disminución. Se observó que el pH del suelo con los tratamientos fue óptimo para el desarrollo de los actinomicetos al

**Cuadro 1.** Recuentos microbianos de los diferentes tratamientos que incluían los actinomicetos, bajo dos muestreos. Laboratorio de la Unidad de Investigaciones Agropecuarias (UNIDIA), Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá – Colombia. Septiembre de 2009.

Tratamiento	Primer establecimiento (cuatro meses)	Segundo establecimiento (seis meses)
	Recuento (Log UFC/ml)	Recuento (Log UFC/ml)
<i>Thermobifida</i> sp. (cepa MCR24)	3,5 ± 0,10 a	4,9 ± 0,30 ab
<i>Streptomyces</i> sp. (cepa MCR26)	3,8 ± 0,03 a	4,9 ± 0,10 ab
<i>Streptomyces</i> sp. (cepa MCR9)	2,1 ± 1,90 a	5,1 ± 0,30 ab
<i>Thermobifida</i> sp. (cepa MCR24) + <i>Glomus</i> sp.	2,7 ± 0,60 a	5,3 ± 0,02 a
<i>Streptomyces</i> sp. (cepa MCR26) + <i>Glomus</i> sp.	3,3 ± 0,02 a	4,7 ± 0 b
<i>Streptomyces</i> sp. (cepa MCR9) + <i>Glomus</i> sp.	2,05 ± 1,80 a	5,1 ± 0,40 a b

Medias con igual letra, no presentan diferencias significativas, según Prueba de Duncan para cada variable.



**Cuadro 2.** pH del suelo inoculado con tres cepas de actinomicetos evaluadas (*Streptomyces* sp. (cepa MCR9), *Thermobifida* sp. (cepa MCR24) y *Streptomyces* sp. (cepa MCR26) de trébol blanco (*Trifolium repens*. L). Laboratorio de la Unidad de Investigaciones Agropecuarias (UNIDIA), Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá – Colombia. Septiembre de 2009.

Tratamiento	pH en suelo (lectura directa)
<i>Thermobifida</i> sp. (cepa MCR24)	5,7
<i>Streptomyces</i> sp. (cepa MCR26)	5,8
<i>Streptomyces</i> sp. (cepa MCR9)	6,1
<i>Thermobifida</i> sp. (cepa MCR24) + <i>Glomus</i> sp.	5,8
<i>Streptomyces</i> sp. (cepa MCR26) + <i>Glomus</i> sp.	5,9
<i>Streptomyces</i> sp. (cepa MCR9) + <i>Glomus</i> sp.	5,8
<i>Glomus</i> sp.	5,8
Agua*	6,0

\*Suelo previo a la realización del bioensayo y que no fue sometido a ningún tipo de tratamiento.

permitir su establecimiento, debido a que crecen en un rango de pH entre 5-9 (Shrivastava *et al.* 2008).

**Fósforo disponible en suelo.** Para todos los tratamientos las concentraciones de fósforo fueron bajas (Figura 2). Por otra parte, es evidente que el suelo control tiene un valor muy bajo de anión fosfato, con respecto a los otros tratamientos, incluso cuando se compara con el testigo, donde se encontró un valor más alto en el contenido de fósforo en suelo (Cuadro 3), lo cual puede ser resultado del metabolismo de la microflora nativa de este suelo (Kortemaa *et al.* 1994). Los otros tratamientos registraron valores con diferencias bajas, sin embargo es importante destacar que tratamientos con actinomicetos solos, permitieron la obtención de un nivel más alto de fósforo en el suelo, pero disminuido con la inoculación en conjunto con la micorriza. Pese a esto, al comparar los tratamientos, el efecto menos marcado se presenta en el caso de la cepa MCR9, donde la disminución de fósforo disponible no es tan excesiva cuando se encuentra acompañada de la micorriza. Es así que los datos de la estadística descriptiva (Figura 2) muestran que el valor más alto corresponde al tratamiento con la cepa MCR9.

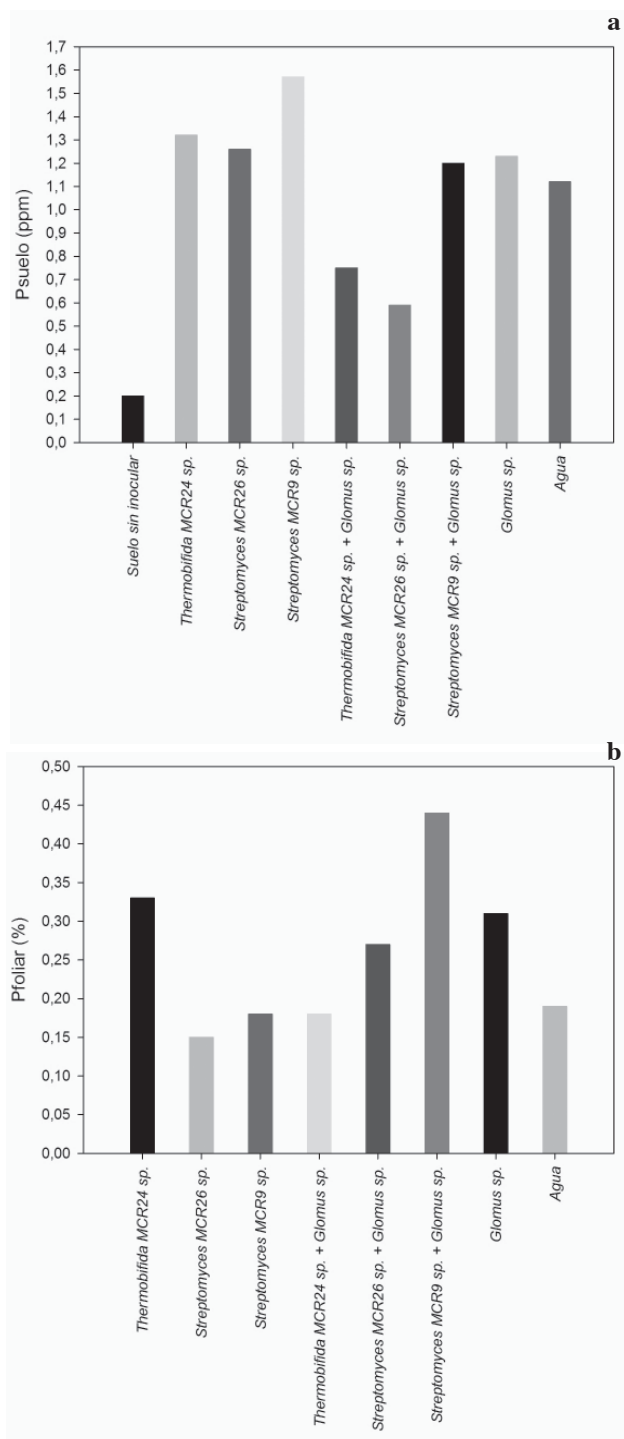
Al correlacionar la actividad enzimática *in vitro* con los resultados en suelo y la materia orgánica del

**Cuadro 3.** Biomasa foliar y radicular de trébol blanco y longitud de la raíz micorrizada. Laboratorio de la Unidad de Investigaciones Agropecuarias (UNIDIA), Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá – Colombia. Enero de 2010.

Tratamiento	Producción de biomasa foliar (mg/peso seco)*			Producción de biomasa radicular (mg/peso seco)*			Longitud de raíz micorrizada ** (%)		
	mes			mes			mes		
	2	4	6	2	4	6	2	4	6
<i>Thermobifida</i> sp. (cepa MCR24)	65 b	132 c	252 c	6 a	17 b	35 b	0 a	7 a	4 a
<i>Streptomyces</i> sp. (cepa MCR26)	32 a	85 b	210 b	8 a	22 b	41 b	3 a	5 a	3 a
<i>Streptomyces</i> sp. (cepa MCR9)	45 b	90 b	189 b	7 a	21 b	46 b	3 a	5 a	0 a
<i>Thermobifida</i> sp. (cepa MCR24) + <i>Glomus</i> sp.	135 c	283 d	584 d	10 a	27 b	54 c	37 b	52 b	73 c
<i>Streptomyces</i> sp. (cepa MCR26) + <i>Glomus</i> sp.	106 c	238 d	506 d	12 a	35 c	68 c	40 b	74 c	68 c
<i>Streptomyces</i> sp. (cepa MCR9) + <i>Glomus</i> sp.	123 c	257 d	605 d	7 a	26 b	47 b	47 b	68 b	65 c
<i>Glomus</i> sp.	98 c	146 c	185 b	8 a	24 b	36 b	35 b	46 b	58 c
Agua	22 a	45 a	96 a	5 a	10 a	22 a	5 a	8 a	15 b

\* p< 0,05, \*\* p<0,001.

Medias con igual letra no presentan diferencias significativas, según Prueba de Duncan para cada variable.



**Figura 2.** Concentración de fósforo en suelo (a) y foliar (b) de trébol blanco (*Trifolium repens* L.) con los diferentes tratamientos evaluados en matero. Laboratorio de la Unidad de Investigaciones Agropecuarias (UNIDIA), Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá – Colombia. Enero de 2010.



mismo (4,5%), se puede pensar que la cepa MCR9 presenta una actividad fosfomonoesterasa más alta que la encontrada para *Thermobifida* sp. (cepa MCR24). Se conoce que *Streptomyces* sp. (cepa MCR9) no tiene la capacidad para solubilizar fósforo inorgánico *in vitro* según resultados de Franco-Correa (2008), por lo que se infiere que la capacidad de solubilizar fósforo en el suelo puede radicar en la mineralización.

La segunda concentración de fósforo en suelo más alta fue la correspondiente a la cepa MCR24. Este actinomiceto presentó la menor actividad fosfomonoesterasas *in vitro*, en relación con las cepas de *Streptomyces*; lo cual permite deducir que el microorganismo pudo mineralizar el fósforo del suelo al sentirse estimulado con la presencia de materia orgánica. Otra explicación puede basarse en los reportes de Franco-Correa (2008) quien demostró que la cepa MCR24 solubiliza fósforo inorgánico mediante la producción de ácidos orgánicos y produce sideróforos de tipo hidroxamato *in vitro*; todo esto pudo contribuir a que mejorara su actividad solubilizadora en el suelo (Gyaneshwar *et al.* 2002). Por último, con la cepa MCR26 se encontró la menor concentración de fósforo en suelo, demostrando que no expresa una actividad promisoriosa en suelo.

La actividad no puede ser atribuida exclusivamente a las cepas, pues en aquellos tratamientos inoculados con *Glomus* sp. la concentración de fósforo obtenida en el suelo no solo se debe a la actividad metabólica de los actinomicetos (en caso de estar presentes) sino también de la misma micorriza, los cuales con la producción de ácidos orgánicos solubilizan fósforo inorgánico (Harrison 1999) y fosfatasa que mineralizan fósforo orgánico (Sabannavar y Lakshman 2009). Paralelo a esto, el suelo empleado para el bioensayo no fue esterilizado, por lo cual la flora nativa del mismo pudo haber influido en la disponibilidad del fósforo en suelo (Katznelson *et al.* 1962, Reyes *et al.* 2006), siendo importante esta evaluación por mostrar un papel más real en el momento de usar un inoculante biológico.

De acuerdo a las concentraciones de fósforo foliar y a la evaluación estadística descriptiva (Figura 2), se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento *Streptomyces* sp. (cepa MCR9) + *Glomus* sp.; y la concentración obtenida con *Thermobifida* sp. (cepa MCR24), *Streptomyces* sp. (cepa MCR26) + *Glomus* sp. y *Glomus* sp. con respecto al resto de tratamientos.

La co-inoculación de las cepas MCR26 y MCR9, con *Glomus* sp., permitió obtener un incremento en

los valores del contenido de este elemento en los tejidos de la planta, en comparación con la inoculación individual de las cepas de actinomicetos (Figura 2). La co-inoculación de la cepa MCR24 con *Glomus* sp. mostró disminución en la concentración de fósforo foliar en relación con la obtenida por estos dos microorganismos solos. Datos que concuerdan con los obtenidos en suelo.

**Biomasa foliar y radical de las plántulas de trébol.** Se observa un aumento en los valores de peso seco con diferencias significativas en los tratamientos con actinomicetos co-inoculados con *Glomus* sp., dándose un incremento evidente al pasar el tiempo, en la biomasa al sexto mes (Cuadro 3). Este aumento se puede explicar por interacciones sinérgicas que estos microorganismos pueden realizar. En el caso de los actinomicetos se ha encontrado que el peso seco de los guisantes es más alto en los tratamientos en los cuales se inocula *Streptomyces lydicus* (Tokala *et al.* 2002). Hamby y Crawford (2000) encontró que una cepa de *Streptomyces lydicus* fue capaz de promover el crecimiento vegetal en plantas como zanahoria y remolacha. El-Tarabily *et al.* (2008) evaluaron el peso seco y la longitud foliar y radical de plántulas de soya inoculadas con *Micromonospora endolithica*, encontrando que promueve el crecimiento de las plantas de soya. Hamdali *et al.* (2008b) aislaron *Micromonospora aurantiaca* y *Streptomyces griseus*, a partir de rocas fosfóricas y evidenciaron un aumento en la biomasa radicular y foliar en plantas de trigo.

**Longitud de la raíz micorrizada.** Se encontraron diferencias significativas (Cuadro 3) entre los tratamientos con *Glomus* sp. y los que no lo tenían, pues los primeros presentan un porcentaje mayor de colonización que aquellos que no la contienen. Análogamente, en la asociación entre actinomiceto y micorriza, se observa un beneficio en el crecimiento en la raíz micorrizada. A los seis meses, el efecto más evidente se da con *Thermobifida* sp. (cepa MCR24) + *Glomus* sp. En este caso se puede sugerir que el actinomiceto presenta una actividad estimuladora del crecimiento de *Glomus* sp.

Con relación a la capacidad que tienen los actinomicetos y *Glomus* sp. para promover el crecimiento vegetal, al ser inoculados de forma individual, es importante señalar que no se encontraron estudios en los cuales se analizara la co-inoculación de estos dos microorganismos en suelo no estéril, por lo cual resulta relevante evaluar cómo esta interacción puede

o no afectar procesos de establecimiento, colonización y nutrición vegetal (particularmente relacionada con el fósforo, elemento considerado en la presente investigación tanto en el suelo como foliar). De esta forma el presente estudio representa un aporte significativo en este aspecto.

En relación con el valor de fósforo disponible en el suelo, el tratamiento inoculado únicamente con *Glomus* sp. fue el que mayor concentración aportó al ser comparado con los tratamientos de los actinomicetos conjuntamente con *Glomus* sp. Es de resaltar que los actinomicetos por separado proporcionaron valores de solubilización similares al de la micorriza. De las tres cepas de actinomicetos, *Streptomyces* sp. (cepa MCR9) expresó la mayor mineralización de fósforo. Se estableció la capacidad de las tres cepas de actinomicetos para interactuar con *Glomus* sp. de forma sinérgica y benéfica tanto para la planta como para la micorriza, siendo *Thermobifida* sp. (cepa MCR24) la cual presentó una interacción benéfica más representativa con la micorriza. La actividad sinérgica producto entre la inoculación de *Glomus* sp. y los actinomicetos estimuló la producción de biomasa y a la longitud de raíz micorrizada.

## LITERATURA CITADA

- Arcand, MM; Schneider, KD. 2006. Plant and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review. *Ann. Acad. Bras. Scienc.* 78:791- 807.
- Ayyadurai, N; Ravindra, NP; Sreehari, RM; Sunish, KR; Samrat, SK; Manohar, M; Sakthivel, N. 2006. Isolation and characterization of a novel banana rhizosphere bacterium as fungal antagonist and microbial adjuvant in micropropagation of banana. *J. Appl. Microbiol.* 100:926-937.
- Barreto, T; Da-Silva, AC; Soares, AC; De Souza, JT. 2008. Population densities and genetic diversity of actinomycetes associated to the rizosphere of *Theobroma cacao*. *Brazilian J. Microbiol.* 39:464-470.
- Chen, YP; Rekha, PD; Arun, AB; Shen, FT.; Lai, WA; Young, CC. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl. Soil Ecol.* 34:33-41.
- El-Tarably, K; Nassar, A; Sivasithamparam, K. 2008. Promotion of growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a calcareous soil by a phosphate- solubilizing, rhizosphere-competent isolate of *Micromonospora endolithica*. *Appl. Soil Ecol.* 39:161-171.
- Franco-Correa, M. 2008. Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Tesis Doctoral, Doctorado en Biología Agraria, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Granada-España. 260 p.
- Franco-Correa, M; Quintana, A; Duque, C; Suarez, C; Rodriguez, MX; Barea, JM. 2010. Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. *Appl. Soil Ecol.*, doi:10.1016/j.apsoil.2010.04.007
- Giovannetti, M; Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84:489-499.
- Gyaneshwar, P; Kumar, GN; Parekh, LJ; Poole, PS. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil.* 245:83-93.
- Hamby, MK; Crawford, DL. 2000. The enhancement of plant growth by selected *Streptomyces* species. American Society for Microbiology, 100th General Meeting, Los Angeles, CA. Abstracts:567.
- Hamdali, H; Bouizgarne, B; Hafidi, M; Lebrihi, A; Viroille, MJ; Ouhdouch, Y. 2008a. Screening for rock phosphate solubilizing *Actinomycetes* from Moroccan phosphate mines. *Appl. Soil Ecol.* 38:12-19.
- Hamdali, H; Mohamed, H; Joelle, VM; Yedir, O. 2008b. Growth promotion and protection against damping-off of wheat by two rock phosphate solubilizing Actinomycetes in a P-deficient soil under greenhouse conditions. *Appl. Ecol.* 40:510-517.
- Harrison, MJ. 1999. Molecular and cellular aspects of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.* 50:361-89.
- Harvey, PJ; Campanella, BF; Castro, PM; Harms, H; Lichtfouse, E; Schaffner, AR. 2002. Phytoremediation of polyaromatic hydrocarbons, anilines and phenols. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 9:29-47.
- Holford, IC. 1997. Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. *Aust. J. Soil Res.* 35:227-239.
- Huss-Danell, K. 1997. Actinorhizal symbioses and their N<sub>2</sub> fixation. *New Phytol.* 136:375-405.
- Katznelson, H; Peterson, EA; Rouatt, JW. 1962. Phosphate dissolving microorganisms on seed and in the root zone of plants. *Can. J. Bot.* 40:1181-1186.
- Kortemaa, H; Rita, H; Haahtela, K; Smolander, A. 1994. Root-colonization ability of antagonistic *Streptomyces griseoviridis*. *Plant Soil.* 163:77-83.

- Morton, JB; Redecker D. 2001. Two new families of Glomales, *Archaeosporaceae* and *Paraglomaceae*, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia* 93:181-195.
- Oliveria, CA; Alves, VM; Marriel, IE; Gomes, EA; Scotti, MR; Carneiro, NP; Guimaraes, CT; Schaffert, RE; Sa, NM. 2008. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biol. Biochem.* 41:1782-1787.
- Ouahmane, L; Thioulouse, J; Hafidi, M; Prin, Y.; Ducouso, M; Galiana, A; Plenchette, C; Kisa, M; Duponnois, R. 2007. Soil functional diversity and P solubilization from rock phosphate after inoculation with native or allochthonous arbuscular mycorrhizal fungi. *Forest Ecol. Manag.* 241:200-208.
- Pikovskaya, RI. 1948. Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiologiya* 17:362-370.
- Phillips, J; Hayman, D. 1970. Improve procedure of clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 55:159-161.
- Reyes, I; Valery, A; Valduz, Z. 2006. Phosphate-solubilizing microorganisms isolated from rhizospheric and bulk soils of colonizer plants at an abandoned rock phosphate mine. *Plant Soil* 287:69-75.
- Rudresh, DL; Shivaprakash, MK; Prasad, RD. 2005. Tricalcium phosphate solubilizing abilities of *Trichoderma* sp. in relation of P uptake and growth and yield parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Can. J. Microbiol.* 51:217-222.
- Sabannavar, SJ; Lakshman, HC. 2009. Effect of rock phosphate solubilization using mycorrhizal fungi and phosphobacteria on two high yielding varieties of *Sesamum indicum* L. *World J. Agric. Sci.* 5:470-479.
- SAS (Statistical Analysis System)/GIS. 2009. An interactive desktop Geographic Information System for mapping applications.
- SAS/GRAPH. 2009. Although base SAS includes primitive graphing capabilities, SAS/GRAPH is needed for charting on graphical media.
- Shrivastava, S; D'souza, FD; Desai, PD. 2008. Production of indole-3-acetic acid by immobilized actinomycete (*Kitasatospora* sp.) for soil applications. *Curr. Sci.* 94(12):1595-1604.
- Sieverding, E. 1991. Vesicular-Arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems GTZ. Eschborn, Germany. 371 p.
- Son, HJ; Park, GT; Cha, MS; Heo, MS. 2006. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt-and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresour. Technol.* 97:204-210.
- Tabatabai, MA; Bremner, JM. 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.* 1(4):301-307.
- Tokala, RK; Strap, JL; Jung, CM; Crawford, DL; Salove, MH; Deobald, LA; Bailey, JF; Morra, MJ. 2002. Novel Plant-Microbe Rhizosphere Interaction Involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the Pea Plant (*Pisum sativum*). *Appli. Environ. Microbiol.* 68(5): 2161-2171.
- Trouvelot, A; Kough, JL; Gianinazzi-Pearson, V. 1986. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de methods d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In 'Physiological and genetical aspects of mycorrhizae'. Gianinazzi-Pearson V and Gianinazzi S eds., INRA, Paris. 101-109.
- Turner, B; Haygarth, P. 2005. Phosphatase activity in temperate pasture soils: Potential regulation of labile organic phosphorus turnover by phosphodiesterase activity. *Sci. Total Environ.* 344:27-36.
- Vivas, A; Voros, A; Biró, B; Barea, JM; Ruíz-Lozano, JM; Azcón, R. 2003. Beneficial effects of indigenous Cd-tolerant and Cd-sensitive *Glomus mosseae* associated with a Cd-adapted strain of *Brevibacillus* sp. in improving plant tolerance to Cd contamination. *Appl. Soil Ecol.* 14:177-186.
- Welch, SA; Taunton, AE; Banfield, JF. 2002. Effect of microorganisms and microbial metabolites on apatite dissolution. *Geomicrobiol. J.* 19:343-367.
- Whitelaw, M. 2000. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. *Adv. Agron.* 69: 99-144.