

Evaluación de factores que afectan la bioacidulación de roca fosfórica bajo condiciones *in vitro*

Evaluation of factors that affect bioacidulation rock phosphate under *in vitro* conditions

Laura Osorno Bedoya*, Nelson Walter Osorio Vega**

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.65968

Resumen

El fósforo (P) es un nutriente esencial para el desarrollo de las plantas, desafortunadamente, su disponibilidad en muchos suelos es baja. Consecuentemente, los agricultores aplican altas cantidades de fertilizantes fosfóricos solubles, pero esto es ineficiente y costoso. El uso directo de roca fosfórica (RP) es muy atractivo por su bajo costo; sin embargo, es poco soluble y de baja eficiencia agronómica. Para superar esta limitación, hay un creciente interés en el uso de microorganismos del suelo capaces de disolverla y mejorar su valor como fertilizante. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto que tienen algunos factores sobre la capacidad del hongo *Mortierella* sp. para disolver RP bajo condiciones *in vitro*. Estos factores son: (i) tiempo de incubación, (ii) tipo de RP, (iii) concentración inicial de P soluble y (iv) adición de vitaminas y micronutrientes. Después del periodo de incubación se midió P en solución y pH. Los resultados indican que producto de la biodisolución de RP la más alta concentración de P en solución se alcanzó al día 5. Por otro lado, la biodisolución de RP fue reducida por la adición de vitaminas y micronutrientes y por el incremento en la concentración inicial de P soluble en el medio. Aunque la disolución microbiana fue más efectiva con la RP de Carolina del Norte, las RP del Huila y Santander presentaron un buen nivel de disolución en un periodo de tiempo corto. La bioacidulación mejorara la efectividad agronómica de la RP para su uso directo o a través de un proceso biotecnológico previo.

Palabras clave: solubilización, fósforo, microorganismos solubilizadores de fósforo.

Abstract

Phosphorus (P) is an essential nutrient for plant development, unfortunately, its availability in many soils is low. Consequently, farmers apply high quantities of soluble P fertilizers, but this is an inefficient and costly practice. The direct use of rock phosphate (RP) is a highly attractive option because its low cost, but this material has low solubility and low agronomic efficiency. In order to overcome this limitation, there is a growing interest in the use of soil microorganisms capable of dissolving RP and improving its value as a P fertilizer. The objective of this study was to evaluate the effect of some factors on the effectiveness of the fungus *Mortierella* sp. to dissolve RP under *in vitro* conditions. These factors included: (i) incubation time, (ii) type of RP, (iii) initial concentration of soluble P, and (iv) addition of vitamins and micronutrients. After the incubation period, P and pH were measured in solution. The results indicated that as a consequence of the biodissolution of RP, the highest concentration of soluble P in the medium was reached on the day 5th. The biodissolution of RP was reduced by the addition of vitamins and micronutrients and by the increase in the initial concentration of soluble P. Although microbial dissolution was more effective with North Carolina RP, RPs from Huila and Santander showed a good level of dissolution in a short period of time. Bioacidulation will improve the agronomic effectiveness of RP for its direct use or through a previous biotechnological process.

Key words: solubilization, phosphorus, phosphate solubilizing microorganism.

Recibido: diciembre 15 de 2016

Aprobado: mayo 24 de 2017

* Ingeniera biológica, M.Sc. en Ciencias del suelo, Candidata a Doctor en Biotecnología. losorno@unal.edu.co, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

** Ingeniero Agrónomo, M.Sc., Ph.D Agronomy and Soil Science. nwsorio@unal.edu.co. Universidad Nacional de Colombia, Calle 59A No. 63-20, 050034, Medellín.

Introducción

La roca fosfórica (RP) es la principal fuente natural inorgánica de fósforo (P) en el mundo, es usada para sintetizar fertilizantes fosfóricos solubles (90%) y P elemental (10%) para la industria química, de alimentos y de detergentes (Hammond & Day, 1992; Goenadi *et al.*, 2000; Reyes *et al.*, 2001; Bhatti & Yawar, 2010). Ésta consiste en un fosfato de calcio insoluble conocido genéricamente como apatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH,F}$) (Hammond & Day, 1992).

Desafortunadamente, la RP es poco soluble ($<0.001 \text{ g L}^{-1}$), lo cual limita su efectividad como fertilizante y, por ende, su uso masivo es restringido (Rajan *et al.*, 1996; Reddy *et al.*, 2002; Msolla *et al.*, 2007; Shrivastava *et al.*, 2007; Pramanik *et al.*, 2009). Una alternativa para mejorar la solubilidad de este material es la acidulación con ácidos fuertes (e.g., ácido sulfúrico, ácido fosfórico), pero este procedimiento es costoso y tiene riesgos de afectar operarios y contaminar el ambiente (Smith & Moore, 2005). Una alternativa atractiva es el uso de microorganismos solubilizadores de fósforo (MSP) productores de ácidos orgánicos que disuelven la RP, esta aproximación ha sido evaluada por varios autores (Narsian & Patel, 2000; Whitelaw 2000; Osorio & Pérez 2000, Vassilev & Vassileva, 2003; Ramírez, 2005; Jayasinghearachchi & Seneviratne, 2006; Relwani *et al.*, 2008; Singh & Reddy, 2011; Restrepo Franco *et al.*, 2015). A pesar de que se conoce la reacción de disolución de la RP (Yusdar *et al.*, 2007; Osorio, 2012), falta precisar cuáles son las condiciones que optimizan el proceso de bioacidulación para cada microorganismo o cepa específica (Cunningham & Kuyack, 1992). Entre estos factores están el tipo de RP (Sharan *et al.*, 2008; Scervino *et al.*, 2010; Tallapragada & Seshachala, 2012), los requerimientos nutricionales y algunas condiciones de la reacción como el tiempo, la velocidad de agitación, temperatura, entre otros (Vassileva *et al.*, 1998; Sahu & Jana, 2000; Vassileva *et al.*, 2000; Ivanova *et al.*, 2006; Bojinova *et al.*, 2008).

La bioacidulación de RP es muy atractiva en países como Colombia, ya que: (i) la mayoría de los suelos son deficientes en P, (ii) existen fuentes naturales de este mineral que son poco utilizadas, (iii) existe una alta demanda de productos naturales como la RP compatibles con agriculturas sostenibles, y (iv) la volatilidad de los precios de los fertilizantes fosfóricos solubles (en su totalidad importados para Colombia) pone en riesgo la seguridad y soberanía alimentaria de los países consumidores. Por lo anterior, las políticas estatales de Colombia recomiendan el uso de minerales locales, como la RP, y el uso de microorganismos que puedan usarse como biofertilizantes (CONPES, 2009).

Nuestra hipótesis es que la eficiencia del proceso de bioacidulación de la RP puede ser mejorada a través de factores asociados al tipo de material y a condiciones propias de la reacción. El objetivo de este trabajo fue evaluar bajo condiciones *in vitro* el efecto que tienen el tipo de RP, el tiempo de incubación, la concentración de P soluble inicial y la adición de suplementos nutritivos (vitaminas y micronutrientes) sobre la capacidad del hongo *Mortierella* sp. para disolver RP.

Materiales y métodos

Estos estudios se realizaron en el Laboratorio de Ecología y Conservación Ambiental de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

El hongo *Mortierella* sp. fue originalmente aislado en la Universidad de Hawái a partir de un Andisol (Osorio & Habte, 2001). Para su uso en los experimentos, el hongo se cultivó en el medio papa-dextrosa-agar (PDA) durante 5 días y luego se suspendió en agua destilada estéril sin micelio y se conservó en refrigeración a 4 °C. Antes de su uso se realizaron conteos en el medio PDA, los cuales arrojaron valores de densidad de 10^7 esporas/mL.

Se utilizaron tres tipos de RP: Huila, Santander y Carolina del Norte; las dos primeras son de origen Colombiano, la tercera de Estados Unidos, se empleó como referencia ya que es ampliamente estudiada (tabla 1). Las RPs se caracterizan por ser fluoroapatitas, presentan sustituciones variables de fosfato por carbonato y fluoruro y de calcio por sodio y magnesio (Chien & Hammond, 1978). Para todos los experimentos las RPs se pasaron a través de un tamiz de 500 μm (malla 30) y retenidas en un tamiz de 250 μm (malla 60).

La composición del medio de cultivo fue (g L^{-1}): glucosa 10, NH_4Cl 0.5, KCl 1.87, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 y RP 3.5 (Osorio, 2008). La única fuente de P en el medio fue la RP. A Erlenmeyers de 250 mL de capacidad se adicionaron 75 mL del medio y luego se esterilizaron en autoclave (120 °C, 0.1 MPa) por 20 min. Luego, los Erlenmeyers se inocularon con 1 mL de *Mortierella* sp. (1×10^7 UFC mL^{-1}). Los Erlenmeyers se agitaron continuamente a 100 rpm durante 7 días, la temperatura fue de alrededor de 28 °C.

Las condiciones del medio se alteraron en cada experimento en función de los objetivos, tal como se describe a continuación. Los factores que no se mencionan permanecieron como se describió anteriormente.

Tabla 1. Composición química de las RPs.

Roca Fosfórica	Composición	Mina
Huila	(Ca _{9,69} Na _{0,22} Mg _{0,09} (PO ₄) _{3,14} (CO ₃) _{0,86} F _{2,34})	Colombia
Santander	(Ca _{9,76} Na _{0,16} Mg _{0,07} (PO ₄) _{3,26} (CO ₃) _{0,72} F _{2,29})	Colombia
Carolina del Norte	(Ca _{9,33} Na _{0,34} Mg _{0,13} (PO ₄) _{4,77} (CO ₃) _{1,23} F _{2,49})	USA

Experimento No. 1. Concentración de P inicial. Se determinó el efecto de la concentración de P inicial sobre la disolución microbiana de la RP del Huila. Para esto, al medio de cultivo se adicionaron niveles crecientes de K₂HPO₄ para obtener concentraciones de P de 0, 1, 5, 10, 50 y 100 mg L⁻¹.

Experimento No. 2. Adición de vitaminas y micronutrientes. Se determinó el efecto de la adición de vitaminas y micronutrientes sobre la disolución de la RP del Huila. Se adicionaron por separado niveles crecientes de estos complementos nutricionales a razón de 0.0, 0.5, 1.0 y 2.0 mg L⁻¹. Como fuente de vitaminas se usó el complejo vitamínico Centrum^R (vitamina A: 2000 unidades internacionales (U.I.), beta caroteno equivalente a 2000 U.I. de vitamina A, vitamina D 200 U.I., vitamina E 15 U.I., vitamina K1 30 µg, vitamina C 60 mg, ácido fólico 200 µg, vitamina B1 1.4 mg, vitamina B2 1.6 mg, niacinamida 18 mg, vitamina B6 2 mg, vitamina B12 1 µg, ácido pantoténico 6 mg, biotina 150 µg, luteína 250 µg y elementos tales como Ca 162 mg, P 125 mg, I 150 µg, Fe 14 mg, Mg 100 mg, Cu 0.7 mg, Mn 2.5 mg, K 40 mg, Cl 36.3 mg, Cr 25 µg, Mo 25 µg, Se 25 µg, Zn 7.5 mg). Para el tratamiento con adición de micronutrientes se utilizó una mezcla de quelatos EDTA-Mn, -Fe, -Cu y -Zn razón de 24, 24, 24 y 12 mg L⁻¹, respectivamente. Las otras condiciones del cultivo permanecieron constantes. Las vitaminas y los micronutrientes se esterizaron en autoclave junto con el medio de cultivo a 121 °C por 15 min a 0,1Mpa.

Experimento No. 3. Tiempo de incubación. Con el fin de conocer el tiempo al cual se puede presentar la mayor disolución de RP del Huila, se monitoreó el pH y la concentración de P en solución a diferentes tiempos de incubación (0, 1, 3, 5, 7, 10 y 14 días). Las otras condiciones del cultivo permanecieron constantes.

Experimento No. 4. Tipo de RP. Se evaluó la disolución de las tres RPs: Huila (H), Santander (S) y Carolina del

Norte (CN) en función de la inoculación con *Mortierella* sp. Las otras condiciones del cultivo permanecieron constantes.

Variables evaluadas: luego del periodo de incubación, se determinó pH con un potenciómetro (WTW electrodo Sentix 81) y la concentración de P (mg L⁻¹) con el método del azul-molibdato (Murphy & Riley 1962) (espectrofotómetro Genesys 20, Thermo Spectronic, 890 nm), previa centrifugación (centrifuga Jouan MR 1812, 1520xg (4000 rpm), 10 minutos) y filtración con papel filtro (Whatman No. 42).

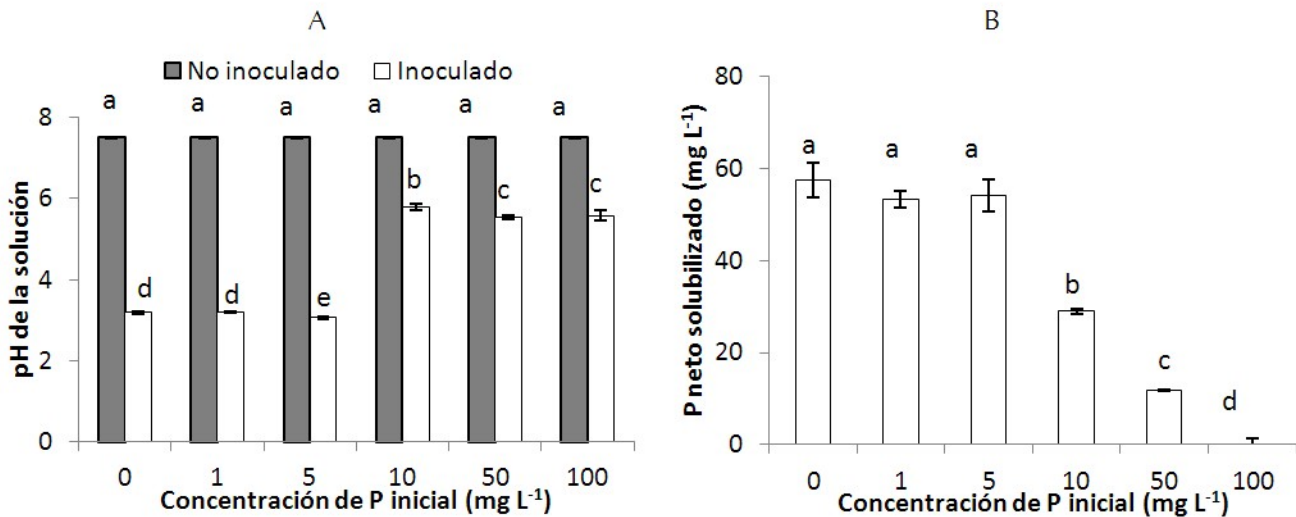
Para el experimento No. 1, se calculó la concentración de P solubilizado a partir de la RP, sustrayendo del valor final la cantidad de P adicionado (P neto solubilizado).

En los experimentos se empleó un diseño experimental completamente al azar. Cada tratamiento tuvo 4 repeticiones, incluyendo el control no inoculado. El efecto de los tratamientos se evaluó mediante análisis de varianza (prueba F) y cuando estos fueron significativos se utilizó la prueba de rangos múltiples de Duncan para la separación de medias (prueba t). En ambas pruebas se empleó un nivel de significancia (*P*) ≤ 0.05 y se hicieron en el software STATGRAPHICS versión Centurión XVI.

Resultados

Los Erlenmeyers no-inoculados presentaron un pH de 7.8, que no fue afectado por la presencia inicial de P soluble. Al inocular con el hongo el pH disminuyó significativamente, pero en este caso la concentración inicial de P soluble afectó (*P* ≤ 0.05) la disolución de la RP (figura 1.). Así, cuando el P soluble inicial estuvo entre 0 y 1 mg P L⁻¹ el pH del medio fue de 3.2, a 5 mg P L⁻¹ el pH fue significativamente más bajo (3.05). En contraste, con los niveles de P más altos (10, 50 y 100 mg P L⁻¹) el pH fue significativamente mayor (5.8, 5.5 y 5.6, respectivamente) (figura 1.(A)).

Figura 1. (A) pH de la solución en función de la concentración de P inicial en el medio y (B) P neto en la solución (mg L^{-1}), inoculados con *Mortierella* sp. (P neto: P solubilizado de la RP-P adicionado como KH_2PO_4). Cada columna representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas de los tratamientos según la prueba de Duncan ($P \leq 0.05$).



En los controles, si bien hubo P inicial soluble, no hubo P neto solubilizado ($:0 \text{ mg L}^{-1}$). La concentración de P soluble inicial afectó significativamente la concentración de P neto solubilizado (figura 1.). Por ejemplo, cuando no se adicionó KH_2PO_4 o se adicionó en bajas concentraciones (P soluble inicial: 0 a 5 mg P L^{-1}), la concentración de P neto solubilizado por *Mortierella* sp. fue en promedio de 54.9 mg P L^{-1} (no hubo diferencias significativas). Con concentraciones de P

inicial de 10 , 50 y 100 mg P L^{-1} el nivel de P neto solubilizado al final de la incubación fue de 29.0 , 1.1 y 0.0 mg P L^{-1} , respectivamente, entre ellos se presentaron diferencias significativas (figura 1.).

La adición de vitaminas y micronutrientes no presentó un efecto significativo en el pH (3.1) del medio (figura 2.(A)); sin embargo, el aumento de estos disminuyó la cantidad de P en solución (figura 2.(B)) el cual fue significativo estadísticamente para micronutrientes y

Figura 2. (A) pH de la solución en función de la adición de vitaminas y micronutrientes y (B) Concentración de P en la solución (mg L^{-1}), en las muestras inoculadas con *Mortierella* sp. cada columna representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas de los tratamientos según la prueba de Duncan ($P \leq 0.05$). NS: no hay diferencia significativa.

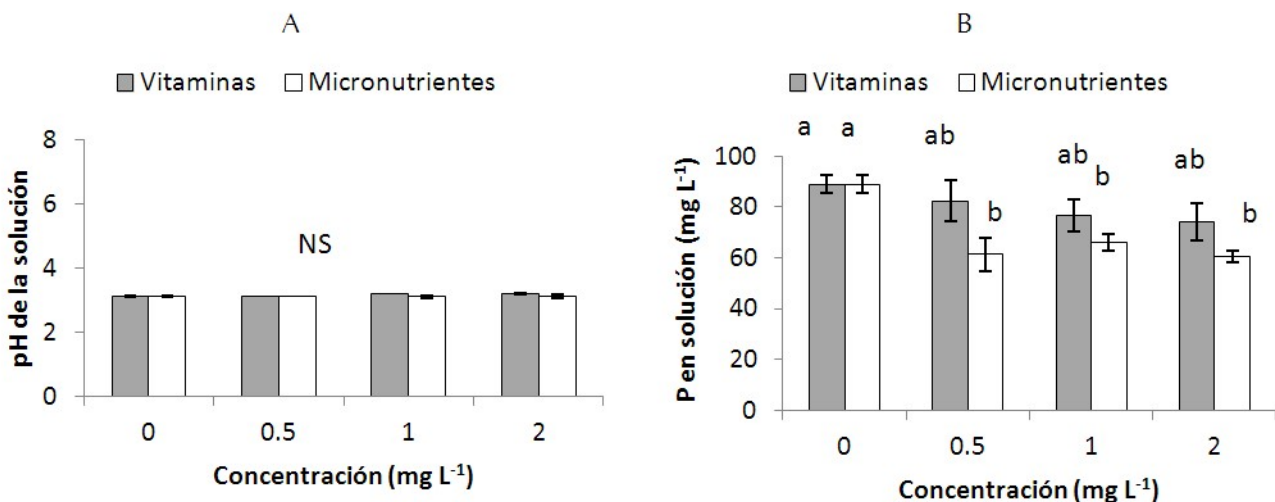
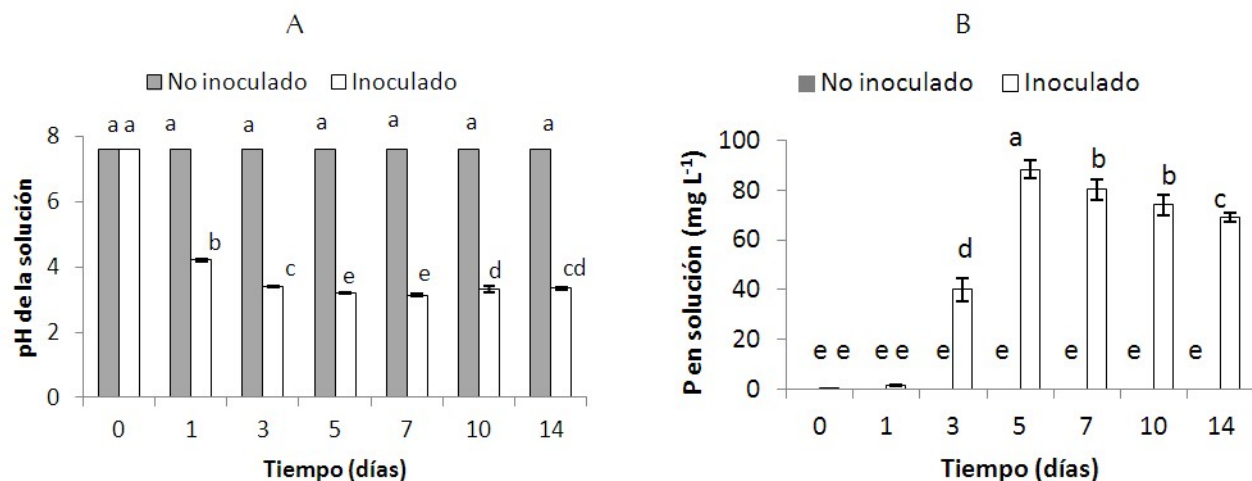


Figura 3. (A) pH de la solución en función del tiempo y (B) Concentración de Fósforo (P) en la solución (mg L^{-1}) en las muestras inoculadas con *Mortierella* sp. Cada columna representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas de los tratamientos según la prueba de Duncan ($P \leq 0.05$).



no lo fue para la adición de vitaminas. Se puede observar una disminución en la concentración de P en solución de 88.3 mg L^{-1} sin vitaminas ni micronutrientes a 74.1 mg L^{-1} con la adición de vitaminas y 69.5 mg L^{-1} con la adición de micronutrientes.

El tiempo tuvo un efecto significativo en el pH para *Mortierella* sp. (figura 3.(A)) el pH cambió a partir del primer día (4.2) con respecto al control (7.6) y presentó una disminución hasta los días 5 y 7 (3.1), posteriormente presentó un aumento para los días 10 y 14 (3.3). De acuerdo a estos resultados, la cantidad de P en la solución presenta un comportamiento parabólico (figura 3.(B)), en las muestras inoculadas, aumentando desde el día 3 (40.1 mg L^{-1}), presentando un máximo el día 5 (88.3 mg L^{-1}) y a partir de este día disminuyó la cantidad de P llegando a valores de 68.8 mg L^{-1} para el día 14.

La inoculación con *Mortierella* sp. disminuyó significativamente ($P \leq 0.05$) el pH del medio con respecto a los controles no inoculados para los tres tipos de RP (figura. 4), el pH alcanzó valores de 3.4, 2.9 y 2.9 para las RP de CN, H y S respectivamente (figura 4.(A)). Por otro lado, al inocular con *Mortierella* sp. en los tres tipos de RP aumentó la concentración de P en solución con respecto al control no inoculado (figura 4.(B)). La magnitud de este efecto fue mayor cuando el medio contenía RP de Carolina del Norte (157.1 mg L^{-1}), seguido de la RP del Huila (86.6 mg L^{-1}) y por último la RP de Santander (58.9 mg L^{-1}).

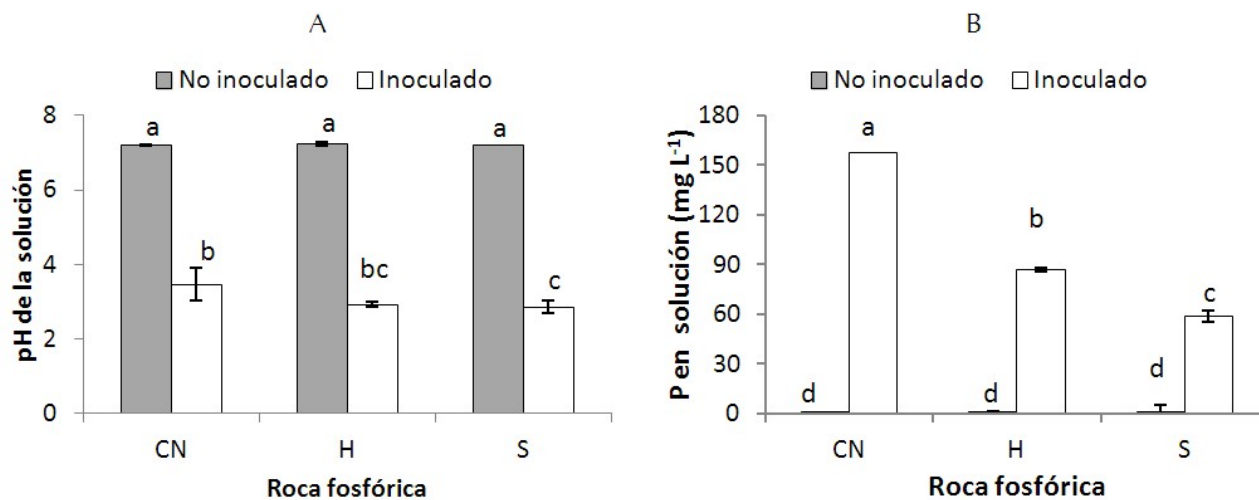
Discusión

La eficiencia del proceso de bioacidulación de la RP por el hongo *Mortierella* sp. se mejoró evaluando factores asociados al tipo de material y a condiciones propias de la reacción.

La disolución de RP por *Mortierella* sp. se vio favorecida cuando en el medio la concentración de P inicial soluble fue muy baja. Al incrementar la concentración de P inicial (con aplicaciones de KH_2PO_4), la capacidad de este hongo para producir ácidos disminuyó y, por ende, disminuyó su capacidad para disolver RP. Cálculos hechos para estimar la eficiencia del hongo para disolver RP [EDRP (%) = $100 \times (\text{P soluble} \div \text{P total en RP})$] indican que el EDRP de *Mortierella* sp. fue de 13% sin la adición o con la adición de niveles bajos de KH_2PO_4 (0.5 mg L^{-1}), a niveles medios (10 mg L^{-1}) el valor de EDRP fue de 0.6% y los niveles más altos de P soluble adicionado (50 y 100 mg L^{-1}) la eficiencia fue muy baja (0.02%) o nula.

El metabolismo asociado a la producción de ácidos por los hongos depende de un sistema de enzimas que pueden ser constitutivas o inducidas (Madigan *et al.*, 2004). Para este hongo varios factores del medio de cultivo inducen la producción de ácidos, como la fuente y cantidad de carbono (C) y nitrógeno (N) (Osorno & Osorio, 2014). En este caso, los resultados indican que la falta de P soluble inicial induce la producción de ácidos por el hongo. Esto puede

Figura 4. (A) pH de la solución y (B) Concentración de P en la solución (mg L^{-1}) en función del tipo de RP inoculados con *Mortierella* sp. Cada columna representa el promedio de cuatro repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. Columnas con las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas de los tratamientos según la prueba de Duncan ($P \leq 0.05$). CN: Carolina del Norte, H: Huila y S: Santander.



deberse a que, con la escasez de P soluble, el hongo se ve obligado a producir ácidos para liberar el P de la RP requerido para sus actividades metabólicas. Cuando en el medio de cultivo el P soluble está presente en concentraciones suficientes para el metabolismo del hongo, la producción de ácido disminuye.

Es claro que la adición de vitaminas y micronutrientes al medio de cultivo disminuyó la producción de ácido (no se presentaron pH bajos) y, por ende, no hubo una efectiva disolución de RP. Los valores de EDRP para *Mortierella* sp. sin la adición suplementos nutricionales fue de 21%, con la adición de micronutrientes disminuyó a un promedio de 14.6% y con vitaminas a 18.5%.

Aunque los micronutrientes Fe, Mn, Cu y Zn son requeridos por los hongos, en altas cantidades pueden limitar el desempeño de estos (Max *et al.*, 2010). Por ejemplo, Shu & Johnson (1948) encontraron valores óptimos de Zn y Fe para solubilización de RP de 0.3 y 1.3 mg L^{-1} , respectivamente. Por su parte, Grewal & Kalra (1995) encontraron un efecto negativo en la producción de ácido cítrico en *A. niger* con la adición de Fe y Mn. Así mismo, Netik *et al.* (1997), encontraron que la presencia de Zn, Cu y Fe inhibieron la producción de ácido cítrico en *A. niger*, mientras que dosis moderadas de Mn pudieron regular su producción. En *A. niger* la ausencia de Mn inhibe tanto la producción

de ácido cítrico como su paso a través de la membrana celular (Max *et al.*, 2010; Netik *et al.*, 1997), pero altas concentraciones de Mn ($\sim 10 \text{ mg L}^{-1}$) también pueden ser inhibitorias (Gyaneshwar *et al.*, 1966; Matthey & Bowes, 1978).

En general, se considera que en el proceso de disolución de RP no es necesario aplicar micronutrientes ya que la RP puede aportar cantidades significativas de estos (Zapata & Roy, 2007). En el presente estudio las dosis aplicadas de Fe, Mn y Cu fueron de 2.2 mg L^{-1} , mientras que la de Zn fue de 1.1 mg L^{-1} , las cuales además de los aportes de la RP parecen exceder los requerimientos de micronutrientes y así alcanzar concentraciones inhibitorias para el proceso de disolución de RP.

Desafortunadamente, no se encontró información relevante entre la concentración de vitaminas y su impacto en la producción de ácidos orgánicos por microorganismos, particularmente hongos, ni tampoco sobre la disolución de la RP.

Los resultados indican que el tiempo de incubación fue un factor significativamente importante en la disolución de la RP por el hongo. La máxima disolución de RP se alcanzó al día 5 (tabla 2), tal como lo ilustran los valores de EDRP. Resultados comparables han sido reportados por Bojinova *et al.* (2008).

Para el día 5 se alcanzaron los valores máximos de solubilización (EDRP fue de 21 % para *Mortierella* sp.), al aumentar el tiempo, la concentración de P disminuye, lo que puede ser debido a que aumenta la población microbiana y se da mayor inmovilización de P del medio.

Varios autores han reportado la disolución microbiana de RP a diferentes tiempos: 3 días (Chen *et al.*, 2006; Tao *et al.*, 2008), 4 días (Relwani *et al.*, 2008), 6 días (Jain *et al.*, 2012), 7 días (Alam *et al.*, 2002; Barroso *et al.*, 2006; Osorio, 2012), 8 días (Kucey, 1983, Xiao *et al.*, 2008; Schneider *et al.*, 2010), 10 días (Collavino *et al.*, 2010), 30 días (Sahu & Jana, 2000). Sin embargo, en pocos estudios se ha evaluado el efecto del tiempo. Por ejemplo, Bojinova *et al.* (2008), evaluaron la disolución de RP con *A. niger* a diferentes días (1, 4, 7 y 10) y encontraron que entre el día 4 y 7 la cantidad de fósforo inorgánico (P) soluble aumentó. Igualmente, Vassileva *et al.* (1998), evaluaron los días 3, 6, 9, 12 y 17 con *A. niger* y encontraron que en el día 9 se dio la mayor producción de P soluble. Por su parte, Ivanova *et al.* (2006), evaluaron la disolución de RP con *Erwinia* y *Azotobacter* en los días 3, 6, 9, 12 y 15 y encontraron que para *Erwinia* se necesitan 6 días para encontrar el valor máximo de P soluble, mientras que *Azotobacter* necesitó 12 días. Sahu & Jana (2000) evaluaron 30 días del proceso y encontraron que para *Bacillus* la máxima concentración de P ocurrió a los 12 días.

Los resultados del presente estudio nos permiten afirmar que el hongo fue más efectivo en un tiempo relativamente corto, de 5 días. La reducción del tiempo requerido para alcanzar una mayor eficiencia de un proceso biotecnológico es un factor clave en la implementación industrial del proceso (Doran, 1995). Esto ayuda a reducir los costos de producción.

En general, *Mortierella* sp. exhibió un comportamiento similar en cuanto a la disolución de los tres tipos de RP. Sin embargo, la cantidad de P disuelta varió entre RP. Se obtuvieron mejores resultados con la RP de Carolina del Norte (EDRP para *Mortierella* sp.: 37%), seguido de la RP del Huila (EDRP para *Mortierella* sp. 21 %) y de Santander (EDRP para *Mortierella* sp. 14 %). Tales diferencias muy probablemente se deben a diferencias en la composición mineralógica de estas. La RP de Carolina del Norte es una roca sedimentaria (fluoroapatita carbonatada) más reactiva (Chien & Menon 1995; Schneider *et al.*, 2010) que las RPs sedimentaras del Huila y de Santander y, por ende, tiene mayor efectividad agronómica (Chien & Hammond, 1978). La RP de Carolina del Norte tiene un mayor contenido de P (13%), mientras que la del Huila y Santander contienen 9.1 y 8.0%,

respectivamente (Chien & Hammond, 1978). Por otro lado, la RP de Carolina del Norte tiene un mayor contenido de carbonato ($1.23 \times \text{CO}_3$) en la fórmula que las RPs de Santander y Huila ($0.72\text{-}0.86 \times \text{CO}_3$) y esto le confiere un mayor índice de disolución con ácido cítrico (Van Kauwenbergh, 2006). Schneider *et al.* (2010), evaluaron la disolución de tres RP (Carolina del Norte, una de Brasil y de Canadá), encontraron que *A. niger* fue más efectivo disolviendo la RP de Carolina del Norte que con otras RP. Según los autores, la razón para tales diferencias es que la primera es de origen sedimentario, mientras que las otras son de origen ígneo.

Por otro lado, las RP pueden presentar diferentes concentraciones de elementos traza tales como F, Fe, Al, Mn, As, Cd, Cu, Pb, Ni, Zn, Hg y U (Zapata & Roy, 2007; Grewal & Kalra, 1995), los cuales pueden afectar el crecimiento microbiano, la capacidad del microorganismo para biosíntesis y liberación de ácidos orgánicos (Schneider *et al.*, 2010). Algunos de estos elementos pueden ser tóxicos para los microorganismos (Madigan *et al.*, 2004) y las plantas que reciben su aplicación (Dietz *et al.*, 1999). Así, Schneider *et al.* (2010), hallaron que las RP que presentaron mayores concentraciones de Fe y Mn, disminuyeron la producción de ácido cítrico por *A. niger*.

A pesar de las diferencias detectadas entre las RP, este estudio sugiere que las RPs del Huila y Santander

Tabla 2. Eficiencia del hongo para disolver roca fosfórica (EDRP) para *Mortierella* sp. en función del tiempo.

Tiempo (días)	EDRP (%)
1	0.4
3	9.5
5	21
7	19.1
10	17.6
14	16.4

son buenas candidatas para la disolución microbiana, ya que se mejora su efectividad agronómica para su aplicación directa (Osorio, 2008) o para la producción de fertilizantes más solubles (Nahas, 1996). Así, promover el uso de las RPs colombianas tiene grandes ventajas: están localmente disponibles (Huila, Boyacá, Santander del Norte), son económicas (Reyes *et al.*, 2001; Osorio & Habte, 2009) y, por ende, se puede disminuir la dependencia de fertilizantes importados, lo cual ayuda a la soberanía y seguridad alimentaria y podría disminuir los costos de producción.

Conclusiones

La baja concentración inicial de P soluble en el medio de cultivo para el hongo *Mortierella* sp. promovió una mayor eficiencia en la disolución de RP, se podría inferir que la escasez de este nutriente es un factor inductivo para la producción de ácidos orgánicos.

La adición de micronutrientes y vitaminas desfavoreció la disolución de RP por parte del hongo. Al parecer, los micronutrientes requeridos por el hongo son suministrados por la RP.

Aunque la disolución microbiana fue más efectiva con la RP de Carolina del Norte, las RP del Huila y Santander presentaron un buen nivel de disolución en un periodo de tiempo relativamente corto. Este tratamiento puede mejorar la efectividad agronómica de estas RP para su uso directo o a través de un proceso biotecnológico previo.

Agradecimientos

Al Programa de doctorados nacionales de Colciencias convocatoria 617-2 y a la Universidad Nacional de Colombia.

Referencias bibliográficas

Alam, S., Khalil, S., Ayub, N., & Rashid, M. (2002). In vitro solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) from maize rhizosphere. *Int J Agric Biol*, 4(4), 454-458.

Barroso, C. B., Pereira, G. T., & Nahas, E. (2006). Solubilization of CaHPO₄ and AlPO₄ by *Aspergillus niger* in culture media with different carbon and nitrogen sources. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(4), 434-438.

Bhatti, T. M., & Yawar, W. (2010). Bacterial solubilization of phosphorus from phosphate rock containing sulfur-mud. *Hydrometallurgy*, 103(1), 54-59.

Bojinova, D., Velkova, R., & Ivanova, R. (2008). Solubilization of Morocco phosphorite by *Aspergillus niger*. *Bioresource technology*, 99(15), 7348-7353.

Chen, Y. P., Rekha, P. D., Arun, A. B., Shen, F. T., Lai, W. A., & Young, C. C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied soil ecology*, 34(1), 33-41.

Chien, S. H., & Hammond, L. L. (1978). A comparison of various laboratory methods for predicting the agronomic potential of phosphate rocks for direct application. *Soil Science Society of America Journal*, 42(6), 935-939.

Chien, S. H., & Menon, R. G. (1995). Factors affecting the agronomic effectiveness of phosphate rock for direct application. *Nutrient cycling in Agroecosystems*, 41(3), 227-234.

Clark, D. S., Ito, K., & Horitsu, H. (1966). Effect of manganese and other heavy metals on submerged citric acid fermentation of molasses. *Biotechnology and Bioengineering*, 8(4), 465-471.

Collavino, M. M., Sansberro, P. A., Mroginski, L. A., & Aguilar, O. M. (2010). Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. *Biology and fertility of soils*, 46(7), 727-738.

Conpes 3577. (2009). Política nacional para la racionalización del componente de costos de producción asociado a los fertilizantes en el sector agropecuario. Consejo Nacional de Política Económica y Social República de Colombia Departamento Nacional de Planeación.

Cunningham, J. E., & Kuiack, C. (1992). Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(5), 1451-1458.

Dietz, K. J., Baier, M., & Krämer, U. (1999). Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. In *Heavy metal stress in plants* (pp. 73-97). Springer Berlin Heidelberg.

Doran, P. M. (1995). *Bioprocess engineering principles*. Academic press.

Goenadi, D. H., & Sugiarto, Y. (2000). Bioactivation of poorly soluble phosphate rocks with a phosphorus-solubilizing fungus. *Soil Science Society of America Journal*, 64(3), 927-932.

Grewal, H. S., & Kalra, K. L. (1995). Fungal production of citric acid. *Biotechnology advances*, 13(2), 209-234.

Gyaneshwar, P., Kumar, G. N., Parekh, L. J., & Poole, P. S. (2002). Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. In *Food Security in Nutrient-Stressed Environments: Exploiting Plants' Genetic Capabilities* (pp. 133-143). Springer Netherlands.

Hammond, L. L., & Day, D. P. (1992). Phosphate rock standardization and product quality. In *Workshop on Phosphate Sources for Acid Soils in the Humid Tropics of Asia, Kuala Lumpur (Malaysia)*, 6-7 Nov 1990. Malaysian Society of Soil Science.

Ivanova, R., Bojinova, D., & Nedialkova, K. (2006). Rock phosphate solubilization by soil bacteria. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 41(3), 297-302.

- Jain, R., Saxena, J., & Sharma, V. (2012). Effect of phosphate-solubilizing fungi *Aspergillus awamori* S29 on mungbean (*Vigna radiata* cv. RMG 492) growth. *Folia microbiologica*, 57(6), 533-541.
- Jayasinghearachchi, H. S., & Seneviratne, G. (2006). Fungal solubilization of rock phosphate is enhanced by forming fungal-rhizobial biofilms. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(2), 405-408.
- Kucey, R. M. N. (1983). Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. *Canadian Journal of Soil Science*, 63(4), 671-678.
- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2004). Brock Biología de los microorganismos. Décima edición. Pearson education S.A. Madrid.
- Mattey, M., & Bowes, I. (1978). Citrate regulation of NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenase of *Aspergillus niger*.
- Max, B., Salgado, J. M., Rodríguez, N., Cortés, S., Converti, A., & Domínguez, J. M. (2010). Biotechnological production of citric acid. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4), 862-875.
- Msolla, M. M., Semoka, J. M. R., Szilas, C., & Borggaard, O. K. (2007). Crop (Maize) response to direct application of local phosphate rock on selected acid soils of Tanzania. *Communications in soil science and plant analysis*, 38(1-2), 93-106.
- Murphy, J. A. M. E. S., & Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica chimica acta*, 27, 31-36.
- Narsian, V., & Patel, H. H. (2000). *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(4), 559-565.
- Nahas, E. (1996). Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12(6), 567-572.
- Netik, A., Torres, N. V., Riol, J. M., & Kubicek, C. P. (1997). Uptake and export of citric acid by *Aspergillus niger* is reciprocally regulated by manganese ions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1326(2), 287-294.
- Osorio, N.W. (2008). Effectiveness of microbial solubilization of phosphate in enhancing plant phosphate uptake in tropical soils and assessment of the mechanisms of solubilization. Thesis (Ph.D.) University of Hawaii at Manoa.
- Osorio, N.W., & Pérez, J.C. (2000). Microbial solubilization of phosphates in soils. A review. En: *Uso de microorganismos en la agricultura, materia orgánica mito o realidad memorias del X Congreso de la Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo*. 103-116.
- Osorio, N. W., & Habte, M. (2001). Synergistic influence of an arbuscular mycorrhizal fungus and a P solubilizing fungus on growth and P uptake of *Leucaena leucocephala* in an Oxisol. *Arid Land Research and Management*, 15(3), 263-274.
- Osorio, N. W., & Habte, M. (2012). Phosphate desorption from the surface of soil mineral particles by a phosphate-solubilizing fungus. *Biology and fertility of soils*, 49(4), 481-486.
- Osorio, N. W., & Habte, M. (2009). Strategies for utilizing arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing microorganisms for enhanced phosphate uptake and growth of plants in the soils of the tropics. In *Microbial Strategies for Crop Improvement* (pp. 325-351). Springer Berlin Heidelberg.
- Osorno, L., & Osorio, N. W. (2014). Effect of carbon and nitrogen source and concentration on rock phosphate dissolution induced by fungi. *Journal of Applied Biotechnology*, 2(2), 32.
- Pramanik, P., Bhattacharya, S., Bhattacharyya, P., & Banik, P. (2009). Phosphorous solubilization from rock phosphate in presence of vermicomposts in Aqualfs. *Geoderma*, 152(1), 16-22.
- Rajan, S. S. S., Watkinson, J. H., & Sinclair, A. G. (1996). Phosphate rocks for direct application to soils. *Advances in agronomy*, 57, 77-159.
- Ramírez, C. A. (2005). *Aislamiento y evaluación de rizobacterias con potencial biocontrolador y promotor de crecimiento en plantas en banano* (Doctoral dissertation, Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Medellín. 169p).
- Reddy, M. S., Kumar, S., Babita, K., & Reddy, M. S. (2002). Biosolubilization of poorly soluble rock phosphates by *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 84(2), 187-189.
- Relwani, L., Krishna, P., & Reddy, M. S. (2008). Effect of carbon and nitrogen sources on phosphate solubilization by a wild-type strain and UV-induced mutants of *Aspergillus tubingensis*. *Current microbiology*, 57(5), 401-406.
- Restrepo-Franco, G. M., Marulanda-Moreno, S., de la Fe-Pérez, Y., Díaz-de la Osa, A., Lucia-Baldani, V., & Hernández-Rodríguez, A. (2015). Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista Cenic Ciencias Biológicas*, 46(1), 63-76.
- Reyes, I., Baziramakenga, R., Bernier, L., & Antoun, H. (2001). Solubilization of phosphate rocks and minerals by a wild-type strain and two UV-induced mutants of *Penicillium rugulosum*. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(12), 1741-1747.
- Sahu, S. N., & Jana, B. B. (2000). Enhancement of the fertilizer value of rock phosphate engineered through phosphate-solubilizing bacteria. *Ecological Engineering*, 15(1), 27-39.
- Schneider, K. D., Van Straaten, P., Orduña, D., Mira, R., Glasauer, S., Trevors, J., ... & Smith, P. S. (2010). Comparing phosphorus mobilization strategies using *Aspergillus niger* for the mineral dissolution of three phosphate rocks. *Journal of applied microbiology*, 108(1), 366-374.
- Scervino, J. M., Mesa, M. P., Della Mónica, I., Recchi, M., Moreno, N. S., & Godeas, A. (2010). Soil fungal isolates produce different organic acid patterns involved

- in phosphate salts solubilization. *Biology and fertility of soils*, 46(7), 755-763.
- Sharan, A., & Darmwal, N. S. (2008). Efficient phosphorus solubilization by mutant strain of *Xanthomonas campestris* using different carbon, nitrogen and phosphorus sources. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(12), 3087-3090.
- Shrivastava, M., Bhujbal, B. M., & D'Souza, S. F. (2007). Agronomic efficiency of indian rock phosphates in acidic soils employing radiotracer a-value technique. *Communications in soil science and plant analysis*, 38(3-4), 461-471.
- Shu, P., & Johnson, M.J. (1948). Citric acid production by submerged fermentation with *Aspergillus niger*. *Ind. Eng. Chem.* 40, 1202-1205.
- Singh, H., & Reddy, M. S. (2011). Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. *European Journal of Soil Biology*, 47(1), 30-34.
- Smith, D. R., Moore Jr, P. A., & Miles, D. M. (2005). Soil extractable phosphorus changes with time after application of fertilizer: I. Litter from poultry-fed modified diets. *Soil science*, 170(7), 530-542.
- Tallapragada, P., & Seshachala, U. (2012). Phosphate-solubilizing microbes and their occurrence in the rhizospheres of Piper betel in Karnataka, India. *Turkish Journal of Biology*, 36(1), 25-35.
- Tao, G. C., Tian, S. J., Cai, M. Y., & Xie G. H. (2008). Phosphate-solubilizing and -mineralizing abilities of bacteria isolated from soils. *Pedosphere*. 18(4), 515-523.
- Van Kauwenbergh, S. J. (2006). Fertilizer Mineral Resources of Africa, IFDC Publication R-16, IFDC - An International Center for Soil Fertility and Agricultural Development, Muscle Shoals, Alabama, 435 p.
- Va Vassileva, M., Azcon, R., Barea, J. M., & Vassilev, N. (1998). Application of an encapsulated filamentous fungus in solubilization of inorganic phosphate. *Journal of Biotechnology*, 63(1), 67-72.
- Vassileva, M., Azcon, R., Barea, J. M., & Vassilev, N. (2000). Rock phosphate solubilization by free and encapsulated cells of *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry*, 35(7), 693-697.
- Vas Vassilev, N., & Vassileva, M. (2003). Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(5-6), 435-440.
- Vassilev, N., & Vassileva, M. (2003). Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(5-6), 435-440.
- Whitelaw, M. A. (1999). Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Advances in Agronomy*, 69, 99-151.
- Xiao, C. Q., Chi, R. A., Huang, X. H., Zhang, W. X., Qiu, G. Z., & Wang, D. Z. (2008). Optimization for rock phosphate solubilization by phosphate-solubilizing fungi isolated from phosphate mines. *Ecological Engineering*, 33(2), 187-193.
- Yusdar, H., Anuar, A. R., Hanafi, M. M., & Azizah, H. (2007). Analysis of phosphate rock dissolution determining factors using principal component analysis in some acid Indonesian soils. *Communications in soil science and plant analysis*, 38(1-2), 273-282.
- Zapata, F., & Roy, R. N. (Eds.). (2007). *Utilización de las rocas fosfóricas para una agricultura sostenible*. FAO.