

DETERMINACION DE FOSFATASAS EN HONGOS DE PRADERAS

(Phosphatases determination in prairie fungi)

Eduardo Valenzuela F¹., Viviana Toro Z¹.,
Oscar Martínez V¹. & Dante Pinochet T².

¹Instituto de Microbiología. Facultad de Ciencias,
Universidad Austral de Chile. Casilla 167, Valdivia, Chile.

²Instituto de Ingeniería Agraria y Suelos.. Facultad de Agronomía,
Universidad Austral de Chile. Casilla 567, Valdivia, Chile.

Palabras clave: Fosfatasa, hongos, praderas, rizósfera.
Key words: Phosphatase, fungi, prairies, rhizosphere.

RESUMEN

Se realizó un estudio para determinar la actividad de la fosfatasa ácida y alcalina en 180 cepas fúngicas aisladas desde suelo rizósferico y la rizósfera de tres plantas forrajeras (*Dactylis glomerata*, *Lolium perenne* y *Trifolium repens*) cultivadas en una pradera en rotación y una pradera permanente. Las fosfatases fueron determinadas por el método desarrollado por Tabatabai & Bremner (1969) y se leyeron en un espectrofotómetro a 400 nm. Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANDEVA). En las cepas fúngicas ensayadas se determinó actividad para fosfatasa ácida y alcalina. Los mayores valores tanto para fosfatasa ácida (139.68 mg/mL *g micelio) y alcalina (127.12 mg/mL *g micelio) los registró la cepa 14-2R de *Penicillium chrysogenum* aislada de la rizósfera de *L. perenne* cultivado en pradera permanente. Entre las mejores cepas evaluadas de la pradera permanente existió una mejor concordancia entre los valores determinados para fosfatasa ácida y alcalina.

INTRODUCCION

El fósforo (P), es un elemento primordial para el metabolismo de los seres vivos, forma parte del ADN, ARN y ATP. El P, a menudo es un nutriente limitante en los suelos agrícolas, independiente del manejo dado al suelo. Su ciclo natural involucra largos periodos, lo que en términos de manejo agrícola equivale a decir que no se puede depender del ciclo del P, sino de la posibilidad de generar determinados flujos y subciclos de él al interior de los sistemas suelo-agua-organismos vivos. Las plantas absorben P en estado soluble, pero cuando este se

ABSTRACT

A study to determine the activity of acid and alkaline phosphatase on 180 fungal strains isolated from rhizospheric soil and the rhizosphere of three forage plants (*Dactylis glomerata*, *Lolium perenne* and *Trifolium repens*) cultivated in both a rotation prairie and a permanent one was carried out. Phosphatases were determined as for the method developed by Tabatabai & Brenner (1969) and were read in a spectrophotometer at 400 nm. Results were submitted to an analysis of variance (ANOVA). All fungal strains tested revealed acid and alkaline activity. Highest values both for acid phosphatase (139.68 mg/mL *g mycelium) and alkaline one (127.12mg/mL *g mycelium) were found in the 14-2R strain of *Penicillium chrysogenum* isolated from the rhizosphere of *L. perenne* cultivated in a permanent prairie. There was a better agreement among the best evaluated strains of the permanent prairie as to determined values for both acid and alkaline phosphatase.

introduce al suelo, más del 90% pasa rápidamente a formas insolubles, no disponibles. Un manejo de fertilidad de suelos racional y sustentable, hace indispensable aumentar la eficiencia de utilización, que no depende de mayores tasas de aplicación de fertilizantes, sino de fomentar procesos de reciclaje y de solubilización del P en el suelo. (Montecinos, 1997).

El ciclo del P se ve negativamente afectado por la falta de vegetación del suelo (García *et al.*, 1997). La mineralización del P orgánico, es catalizado por enzimas extracelulares (fosfatases) de bacterias, hongos, protozoos

o exudados radiculares (Nannipieri *et al.*, 1990) y las alteraciones en los materiales orgánicos induce a cambios en la estabilidad de las enzimas (García *et al.*, 1997). Las fosfatasas producidas son más abundantes en el área de la rizósfera y constituyen un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de ésteres y anhídridos del ácido fosfórico, han sido clasificadas de acuerdo al pH óptimo para su actividad, en fosfatasa ácida o fosfomonoesterasa (su máxima actividad ocurre a rango de pH 6.5) y fosfatasa alcalina (su máxima actividad ocurre a rango de pH 11) (Schmidt & Laskowski, 1961; Tarafdar *et al.*, 2001). La fosfatasa ácida es producida por microorganismos y plantas superiores, pero la fosfatasa alcalina es producida sólo por microorganismos (Geh, 2002). Si bien la relativa contribución de fosfatasa ácida para la hidrólisis del fosfato orgánico desde las plantas y hongos, ha sido demostrada, los resultados sugieren que la fosfatasa ácida de los hongos es más eficiente que las secretadas por las plantas (Tarafdar *et al.*, 2001), donde, el efecto de la rizósfera sobre la incidencia cuantitativa de la micota se ha determinado por la variación cualitativa durante el crecimiento del vegetal, donde la edad de la planta tiene un efecto determinante en el número de microorganismos y la actividad de la fosfatasa ácida y alcalina. El efecto más pronunciado es durante el florecimiento del vegetal. Los análisis de regresión demuestran correlaciones positivas entre la incidencia de microorganismos y la actividad de la fosfatasa ácida y alcalina, indicando que la micota asociada a la rizósfera desempeña un importante papel en las transformaciones del fósforo (Gomez de Guinan & Nageswara, 1996). Por otra parte, la acción de esta enzima se ve afectada por factores físicos, como el incremento de la temperatura. Por ejemplo si se aumenta de 36,8 °C a 43,9 °C, decrece la actividad de la fosfatasa ácida y la alcalina, y así mismo, la población de hongos del suelo. La solarización del suelo sobre la población y actividad de los microorganismos ha mostrado que éste puede aumentar su temperatura hasta unos 9 °C, decreciendo significativamente la población de hongos y con ello la actividad de la fosfatasa ácida y alcalina (Shukla *et al.*, 2000). Además, es inhibido por el producto final de su reacción enzimática, el fósforo inorgánico, ya que presenta una retroinhibición (Nannipieri *et al.*, 1979).

Las fosfatasas producidas por los hongos rizosféricos, tienen un efecto significativo en el crecimiento y la adquisición de los nutrientes de las plantas, demostrando la importancia de estos hongos en el suelo para la producción agrícola (Tarafdar *et al.*, 1995). Se han aislado desde la rizósfera hongos solubilizadores de fósforo de hasta 27 especies de *Aspergillus* 7 especies de *Penicillium* y una especie de *Rhizopus*. De estas especies, 8 mostraron una alta actividad de solubilización de fósforo (7 de *Aspergillus* y una de *Penicillium*) (Varsha-Narsian

et al., 1994). Se comprobó que *A. niger* y posiblemente *Botrytis* sp. producen una solubilización importante de fosfatos (Borie *et al.*, 1983).

Estos parámetros bioquímicos (las fosfatasas) que son capaces de diagnosticar la calidad del suelo, son sumamente sensibles, útiles para monitorear los cambios que puedan darse en los suelos sometidos a procesos de contaminación o recuperación, permitiendo evaluar la incidencia de acciones diversas sobre el suelo y su influencia en la calidad biológica y bioquímica. En este contexto en el presente trabajo se planteó determinar la actividad fosfatásica (ácida y alcalina) de 180 cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera de las plantas *Dactylis glomerata* L., *Lolium perenne* L., y *Trifolium repens* L., recolectadas desde un suelo trumao de una pradera en rotación y una pradera permanente.

MATERIALES Y METODOS

Antecedentes generales. Se utilizaron en total 180 cepas fúngicas (Tabla 1) mantenidas en el cepario del Instituto de Microbiología de la Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, las cepas fueron aisladas desde el suelo rizosférico (SR) y la rizósfera (R) de tres especies de plantas forrajeras: *Dactylis glomerata* (pasto ovillo), *Lolium perenne* (ballica inglesa) y *Trifolium repens* (trébol blanco), cultivadas en pradera permanente y en pradera en rotación. El lugar desde donde se recolectaron las especies forrajeras (con su respectivo suelo rizosférico) está ubicado en la localidad de Pelchuquín, comuna de Mariquina (562.5 N 673.4 E. Sistema UTM), X región Valdivia, Chile.

La pradera permanente desde la cual se recolectaron las plantas forrajeras data de 1955 y está compuesta por 26 especies vegetales de origen europeo, pertenecientes a la Asociación Hypero-Agrostideum capillariae, con una alta proporción de leguminosas y se encuentra sometida a pastoreo con bovino. Por su parte, la pradera en rotación data de 1872 y está compuesta por 21 especies vegetales de origen europeo, pertenecientes a la Asociación Hypero-Agrostideum capillariae, priman las especies de gramíneas y una moderada proporción de leguminosas.

Masificación de la cepas fúngicas. Se realizó extrayendo desde los tubos de cepario respectivos un inóculo de la cepa que fue sembrado independientemente y por duplicado en placas Petri que contenían 15 mL de agar extracto malta al 2% (AEM). Las placas se incubaron a 23 ± 2 °C por 7 días. Luego del período de incubación, desde cada placa y mediante un sacabocados de 1.4 cm de diám., se cortaron 3 círculos de agar con micelio que fueron depositadas asépticamente en matraces de 200 mL, que

Tabla 1. Taxa fúngicos y número de cepas ensayadas en la determinación de fosfatasas.

Taxa	Práctica de manejo											
	Pradera permanente						Pradera en rotación					
	A		B		C		A		B		C	
	SR	R	SR	R	SR	R	SR	R	SR	R	SR	R
<i>Absidia cylindrospora</i> Hagem	0	2	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1
<i>Absidia glauca</i> Hagem	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
<i>Absidia spinosa</i> Lendn.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Acremonium breve</i> (Sukapure & Thirum.) W. Gams	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Acremonium strictum</i> W. Gams	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.	0	2	0	1	1	0	2	1	0	1	0	0
<i>Aspergillus subessilis</i> Raper & Fennell	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Aspergillus terreus</i> Thom	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Beauveria bassiana</i> (Bals.-Criv.) Vuill.	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) de Vries	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Epicoccum purpurascens</i> Ehrenb.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Eurotium amstelodami</i> L. Mangin	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fusarium oxysporum</i> Schltdl.	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
<i>Geotrichum candidum</i> Link	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Clonostachys rosea</i> (Link:Fres.)Schroers et al.	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Humicola grisea</i> Traaen	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Microsporium gypseum</i> (E. Bodin) Guiart & Grigoraki	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Mortierella vinacea</i> Dixon-Stew.	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0
<i>Paecilomyces marquandii</i> (Masse) S. Hughes	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	2	3	5	1	1	1	0	1	1	1	1	0
<i>Penicillium commune</i> Thom	3	2	0	2	1	0	1	0	1	0	1	0
<i>Penicillium expansum</i> Link	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Penicillium frequentans</i> Westling	3	0	2	0	4	5	0	1	3	1	0	3
<i>Penicillium purpurascens</i> (Sopp) Biourge	0	0	0	2	1	1	5	0	3	0	0	0
<i>Penicillium restrictum</i> Gilman & Abbott	1	4	4	1	0	6	3	5	7	1	10	5
<i>Penicillium</i> serie <i>Raistrickii</i>	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0	1	0
<i>Phialophora mutabilis</i> (Beyma) Schol-Schwarz	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pythium debaryanum</i> R. Hesse	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Trichoderma koningii</i> Oudem.	0	0	1	0	1	2	0	1	0	0	0	1
<i>Zygorhynchus moelleri</i> Vuill	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
Micelio estéril "A"	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Micelio estéril "B"	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Micelio estéril dematiaceo "E"	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total de cepas	30		30		30		30		30		30	

A = *Dactylis glomerata* (pasto ovillo). B = *Lolium perenne* (balleca inglesa). C = *Trifolium repens* (trébol blanco).

SR = suelo rizósferico. R = rizósfera

contenían 100 mL de caldo malta al 1% (CM); luego los matraces se dispusieron en un agitador orbital a 1500 r.p.m. 18 °C por 10 días. Tras el período de incubación, el contenido de cada matraz fue filtrado independientemente

en forma aséptica, usando portafiltros (que contenían filtros de papel Whatman N° 3 estéril) ensamblados a jeringas estériles. El filtrado obtenido fue depositado en tubos de ensayos estériles, que se sellaron con parafilms

Tabla 2. Actividad fosfatasa de las mejores cepas fúngicas aisladas desde suelo rizósferico o rizósfera de *Dactylis glomerata*, *Lolium perenne* y *Trifolium repens*.

Cepa fúngica / Forrajera	Actividad fosfatasa de las mejores cepas fúngicas.			
	Pradera en rotación		Pradera permanente	
	A	B	A	B
2-1SR <i>Acremonium breve</i> / D	-----	-----	69.33 ± 3.5	44.32 ± 1.3
4-1R <i>Chaetomium globosum</i> / D	19.38 ± 1.3	19.88 ± 0.2	-----	-----
6-1R <i>Fusarium oxysporum</i> / D	30.43 ± 3.0	6.09 ± 5.9	-----	-----
9-1SR <i>Clonostachys rosea</i> / L	18.70 ± 0.6	1.57 ± 1.1	-----	-----
14-2R <i>Penicillium chrysogenum</i> / L	-----	-----	139.68 ± 5.4	127.12 ± 4.5
26-6SR <i>Penicillium restrictum</i> / L	3.7 ± 2.2	14.48 ± 1.0	-----	-----
30-1R <i>Trichoderma koningii</i> / T	18.73 ± 9.6	4.37 ± 0.7	-----	-----
26-5R <i>Penicillium restrictum</i> / T	-----	-----	25.16 ± 22.6	22.81 ± 34.9
5-1R <i>Cladosporium cladosporioides</i> / T	5.11 ± 2.0	7.34 ± 12.2	-----	-----

A = Fosfatasa ácida. B = Fosfatasa alcalina. D = *D. glomerata*. L = *L. perenne*. T = *T. repens*.

y se conservaron en cámara fría a 4°C. La fracción retenida en cada filtro (micelios del hongo) fue depositada separada y asepticamente en placas de Petri previamente taradas, las que se depositaron en una cámara de secado hasta peso constante (48 h aprox.), tras lo cual se pesó cada placa que contenía el micelio, calculando la diferencia con el peso conocido de la placa Petri, determinándose así el peso seco (PS) del micelio.

Determinación de la actividad enzimática fosfatasas ácida y alcalina extracelular. De los filtrados obtenidos se determinó cuantitativamente las enzimas fosfatasas ácida y alcalina por el método modificado desarrollado por Tabatabai & Bremner (1969). Antes de determinar las fosfatasas de los filtrados, se realizó una curva de calibración. Como patrón se utilizó una solución de p-nitrofenol (25mM), 1 mL de solución patrón que se diluyó en 100 mL de buffer universal modificado (BUM) para pH 6.5 y 11 (respectivamente). De esta solución se extrajeron 0, 1, 2, 3, 4 y 5 mL que fueron depositados independientemente en tubos de ensayo y se ajustaron a un volumen de 5 mL con agua destilada. A cada tubo se agregó 1 mL de CaCl₂ y 4 mL de NaOH. Los tubos se agitaron y su contenido se filtró independientemente a través de papel filtro común. En los filtrados obtenidos se les leyó la Absorbancia (A°) en un espectrofotómetro a 400 nm. Los datos obtenidos se graficaron, A° versus concentración y la pendiente formada correspondió al factor de calibración.

Para determinar las fosfatasas ácidas y alcalinas de los filtrados en ensayo, en dos de cuatro tubos de ensayo se depositó 1 mL del filtrado respectivo, dos de los tubos se utilizaron para determinar fosfatasa alcalina (pH 11, un tubo muestra y un tubo control), y dos tubos para determinar fosfatasa ácida (pH 6.5). Luego a cada tubo se le agregaron 4 mL de BUM (pH 11 ó pH 6.5) y se agitó. A

continuación, a cada tubo se le agregó 1 mL de sustrato p-nitrofenil (previamente preparado con BUM pH 11 ó pH 6.5 en una concentración 8.4 µg/mL) y se agitó por algunos minutos. Los tubos se taparon e incubaron a 37 °C por 1 hora en un baño termoregulado. Pasado este período, a cada tubo se agregó 1 mL de CaCl₂ 0.5 M y 4 mL de NaOH 0.5 M, y se agitó. Por último el contenido de cada tubo se filtró independientemente a través de papel filtro común, y el filtrado obtenido se traspasó a un tubo de ensayo, tras lo cual se leyó la A° (intensidad del color amarillo) a 400 nm. Paralelamente, los tubos controles (pH 6.5 y pH 11), siguieron el mismo tratamiento, pero no se les agregaron filtrados fúngicos, estos también se leyeron a 400 nm correspondiendo al blanco de la muestra. Para la obtención de los datos de concentración de fosfatasa ácida y alcalina de cada muestra, se calculó la diferencia entre el tubo control y el tubo de muestra, el resultado obtenido se interpoló en la curva de calibración utilizando la siguiente relación: Absorbancia (A°) = Factor de Calibración * Concentración. El valor final correspondió a la concentración de la enzima y se expresó en las unidades de mg de p-nitrofenol/mL. La concentración final está dada en función del peso seco del micelio de la cepa fúngica (mg p-nitrofenol/mL * g micelio), que en el texto se indica como mg/mL * gr micelio.

Análisis de datos. Para fosfatasa (ácida y alcalina) la A° fue medida con tres repeticiones por cepa, obteniéndose la media y desviación estándar para cada una. Para seleccionar las mejores cepas fúngicas (máxima actividad enzimática), se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) con el programa estadístico Statgraphics plus 2, aplicándose test de Tukey HSD (p<0.05). De las 30 cepas fúngicas aisladas desde cada una de las 3 rizósferas (SR y R) y ambas prácticas de manejo (pradera permanente y en rotación), fueron analizadas en forma independiente,

seleccionando la cepa fúngica con mayor actividad enzimática de acuerdo al género fúngico que pertenece, al tipo de muestra (SR o R) y práctica de manejo.

RESULTADOS

En lo que respecta a la actividad de la fosfatasa ácida determinada en las cepas fúngicas de suelo rizósferico (SR) y de la rizófera (R) de *Dactylis glomerata* (pasto ovillo) de pradera en rotación y permanente, los máximos valores se determinaron para la cepa 6-1R de *Fusarium oxysporum* (30.43 mg/mL*g micelio) aislada desde la R de *D. glomerata* cultivada en pradera en rotación (Tabla. 2) y para la cepa 2-1SR de *Acremonium breve* (69.33 mg/mL*g micelio) aislada de SR de *D. glomerata* cultivada en pradera permanente (Tabla. 2). Los valores mínimos se determinaron para la cepa 8-1SR de *Mortierella vinacea* (1.72 mg/mL*g micelio) y en la cepa 30-1SR de *Trichoderma koningii* (Tabla. 2) (1.83 mg/mL*g micelio), ambas aisladas de SR de *D. glomerata* cultivada en pradera en rotación y permanente respectivamente.

En lo que respecta a la fosfatasa alcalina los valores máximos se determinaron para la cepa 4-1R de *Chaetomium globosum* (19.88 mg/mL*g micelio) aislado desde la R de *D. glomerata* cultivada en pradera en rotación (Tabla. 2) y para la cepa 2-1SR de *A. breve* (44.32 mg/mL*g micelio), cuyo origen fue antes señalado (Tabla. 2). Los valores mínimos se determinaron en la cepa 30-1SR de *Zygorrhynchus moelleri* (0.58 mg/mL*g micelio) y en la cepa 7-1SR de *Mucor hiemalis* (0.78 mg/mL*g micelio) ambas aisladas de SR de *D. glomerata* cultivado en pradera en rotación y permanente respectivamente.

Referente a la actividad de la fosfatasa ácida determinada en las cepas fúngicas de SR y de la R de *Lolium perenne* (ballica inglesa), cultivado en pradera en rotación y permanente, los máximos valores de actividad se determinaron para la cepa 9-1SR de *Clonostachys rosea* (18.70 mg/mL*g micelio) aislada desde SR de *L. perenne* cultivado en pradera en rotación (Tabla. 2) y para la cepa 14-2R de *Penicillium chrysogenum* (139.68 mg/mL*g micelio) aislada desde la R de *L. perenne* cultivado en pradera permanente (Tabla. 2). Los valores mínimos se determinaron para la cepa 30-1SR de *Z. moelleri* (0.06 mg/mL*g micelio) y en la cepa 7-1R de *Cladosporium cladosporioides* (2.79 mg/mL*g micelio) (Tabla. 2), la primera cepa aisladas desde SR y la otra cepa de la R de *L. perenne* cultivado en pradera en rotación y permanente respectivamente. En lo que respecta a la fosfatasa alcalina los valores máximos se determinaron para la cepa 26-6SR de *Penicillium restrictum* (14.48 mg/mL*g micelio) aislada de SR de *L. perenne* cultivado en pradera en rotación (Tabla. 2) y para la cepa 14-2R de *P. chrysogenum* (127.12

mg/mL*g micelio), cuyo origen fue antes señalado en el texto (Tabla. 2). Los valores mínimos se determinaron en la cepa 30-1SR de *Z. moelleri* (0.07 mg/mL*g micelio) y en la cepa 7-1R de *C. cladosporioides* (1.31+ mg/mL*g micelio) (Tabla. 2) el origen de ambas cepa fue antes indicado en el texto.

Con respecto a la actividad de la fosfatasa ácida determinada en las cepas fúngicas de SR y de la R de *Trifolium repens* (trébol blanco) de pradera en rotación y permanente, los máximos valores de actividad se determinaron para la cepa 30-1R de *Trichoderma koningii* (18.73 mg/mL*g micelio) y para la cepa 26-5R de *Penicillium restrictum* (25.16 mg/mL*g micelio) ambas aisladas desde la R de *T. repens* cultivado en pradera en rotación y pradera permanente respectivamente (Tabla. 2). Los valores mínimos se determinaron en la cepa 7-1SR de *Mucor hiemalis* (0.24 mg/mL*g micelio) y en la cepa 4-1SR de *Eurotium amstelodami* (5.05 mg/mL*g micelio) ambas aisladas de SR de *T. repens* cultivado en pradera en rotación y permanente respectivamente. En lo que respecta a la fosfatasa alcalina los valores máximos se determinaron para la cepa 5-1R de *Cladosporium cladosporioides* (7.34 mg/mL*g micelio) y para la cepa 26-5R de *P. restrictum* (22.81 mg/mL*g micelio), ambas aisladas desde la R de *T. repens* cultivado en pradera en rotación y permanente respectivamente (Tabla. 2). Los valores mínimos se determinaron en la cepa 7-1SR de *M. hiemalis* (0.03 mg/mL*g micelio) y en la cepa 4-1SR de *E. amstelodami* (5.09 mg/mL*g micelio) el origen de ambas fue antes indicado en el texto.

Como se observa en la Tabla 2, estadísticamente ($p < 0.05$) de entre las mejores cepas, la mejor de todas que registró los mayores valores tanto para fosfatasa ácida y alcalina, fue la cepa 14-2R de *Penicillium chrysogenum* aislada de la rizósfera de *L. perenne* cultivado en pradera permanente. De acuerdo al origen (suelo rizósferico y rizósfera) de las mejores cepas evaluadas no se registró una diferencia estadísticamente significativa. De acuerdo al manejo dado a la pradera, como se observa en la Tabla 2, entre las mejores cepas evaluadas de la pradera permanente existió una concordancia más estrecha en los valores determinados para fosfatasa ácida y alcalina, aspecto que no ocurre para las mejores cepas evaluadas de la pradera en rotación, pues la mayoría presenta valores disímiles para ambos tipos de fosfatasa, a veces alto para fosfatasa ácida y bajo para fosfatasa alcalina o a la inversa.

DISCUSION

De acuerdo a los resultados señalados, independiente del origen de las cepas aisladas, todas presentaron actividad para fosfatasa ácida y alcalina, cuyo máximo del

total de cepas ensayadas (180) lo presentó la cepa 14-2R de *Penicillium chrysogenum* aislada de la rizósfera de *L. perenne* cultivado en pradera permanente. En el presente estudio se determinó que primordialmente las cepas del género *Penicillium* presentaron aceptable actividad fosfatásica ácida y alcalina. Guimaraes et al. (2003), aisló 30 especies de hongos filamentosos desde suelos de Brazilian, obteniendo una cepa de *Aspergillus caespitosus*, que produce y secreta altos niveles de fosfatasa alcalina en medios de cultivo suplementados con xilano, estos resultados difieren de los determinados en el presente estudio para las cepas de *Aspergillus*, las cuales presentaron actividad fosfatásica ácida y alcalina, pero en una cantidad muy baja. Por su parte, Tarafdar et al. (1995), ensayaron la eficiencia de cepas de *Aspergillus* en el suelo, evaluando los efectos de este hongo en las actividades enzimáticas rizosféricas de *Triticum aestivum* L. y *Cicer arietinum* Linn., concluyendo que *A. rugulosus* registró la mejor producción de fosfatasa, mientras que *A. niger* registró la menor producción. En general el experimento mostró que las cepas de *Aspergillus* aumentan significativamente el P disponible y la producción de biomasa de *T. aestivum* y *C. arietinum*. Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre la disponibilidad de P en los suelos para la absorción por parte de las plantas y los hongos filamentosos capaces de solubilizar P, están enfocados a cepas fúngicas capaces de excretar ácidos orgánicos e inorgánicos (Varsha-Narsian et al 1994; Valenzuela et al. 2002), destacando en todos los casos cepas del género *Aspergillus*. Por su parte, Borie et al. (1983), determinó *in vitro*, desde 7 suelos derivados de cenizas volcánicas la población de bacterias y hongos capaces de solubilizar tanto fosfatos inorgánicos como orgánicos, encontrando que los hongos eran mas activos que las bacterias y en cuatro de ellos: *Penicillium* sp., *A. niger*, *Mucor* sp. y posiblemente *Botrytis* sp., determinó una solubilización importante de fosfatos y del fitato del aluminio por *A. niger* y posiblemente *Botrytis* sp. Estudios realizados por Weber & Pitt (1997), en la excreción de fosfatasa ácida por *Botrytis cinerea*, mostraron una secreción activa de fosfatasa ácida en medios líquidos enriquecidos con fosfatos, hidrolizando completamente los fosfatos orgánicos entre 24 y 48 horas de incubación, además determinaron que la secreción de la enzima es reprimida por la presencia de fósforo inorgánico, no siendo inducida por el sustrato. Por su parte Mamatha et. al. (2004), reportaron que la actividad de fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, y deshidrogenasa, fueron más altas en la rizósfera de un bosque de sándalos que la rizósfera de hierbas, donde el tipo de vegetación influencia en gran parte la presencia de fosfatasa ácida. Por su parte la fosfatasa alcalina es derivada de las poblaciones microbianas del suelo y encontraron una correlación entre la actividad

fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y el número de microorganismos del suelo. Esto sugiere que la micota asociada a la rizósfera juega un importante rol en las transformaciones del P.

Por otra parte, en un experimento de campo en las sabanas ácidas del estado de Guaricó, se determinó la actividad de la enzimas del suelo deshidrogenasa y fosfatasa ácida, evaluando diferentes tipos de residuos (gramíneas, leguminosas y nativos) los resultados mostraron una clara diferencia, en la actividad de la deshidrogenasa, entre los residuos de gramíneas y leguminosas, con respecto a los suelos bajo residuos nativos y sin residuos. Por su parte la actividad de fosfatasa ácida fue mayor en los tratamientos con menor disponibilidad de P. Esto demostró la importancia del uso de prácticas de manejo conservacionistas (España, 2003). En otro estudio realizado por Saucedo et al. (1998), en actividad enzimática de estereasas, fosfatasas, y galactosidasas, en suelos de tres fincas ganaderas con pastos permanentes y manejo tradicional, situadas a diferente altitud, comprobaron que al aumentar la altitud disminuye el pH y aumenta el agua útil, la materia orgánica, la relación C/N, el nitrógeno total y la actividad de las tres enzimas estudiadas. Concluyendo que la actividad enzimática, en especial fosfatasas y estereasas en suelos del mismo tipo y meteorología podrían ser consideradas un parámetro indicador de la fertilidad del suelo.

Las cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera de *Trifolium repens* cultivado en pradera permanente, mostraron un alto número de cepas con actividad enzimática fosfatásica, y en general, la mayoría de las cepas fúngicas con alta actividad enzimática, fueron aisladas desde las rizósfera de *T. repens* cultivadas en pradera permanente, es posible que esta especie ejerza una influencia importante por los exudados de las raíces, pues de acuerdo a la especie, varían los exudados vertidos en la rizósfera. Sin embargo, la cepa fúngica que presentó la mayor actividad enzimática para las fosfatasas estudiadas, fue aislada desde la rizósfera de *L. perenne* cultivado en pradera permanente, ésta cepa pertenece a *P. chrysogenum*, siendo aislada desde todas las rizósferas en estudio.

El presente estudio permitió conocer la diversidad fúngica y determinar uno de los parámetros bioquímicos cuantificables capaces de evidenciar el estado de la fertilidad de los suelos, específicamente una porción que afecta directamente a las plantas, la rizósfera, y su interacción directa con los microorganismos y los procesos bioquímicos esenciales para el total desarrollo del ecosistema. El perfil enzimático sirve como indicador de cambios en la estructura de los suelos, niveles de materia orgánica, captabilidad de los ciclos biogeoquímicos, indicador de los efectos negativos de contaminación, y

por consiguiente indicador de la calidad del suelo. Por otra parte, el estudio indica desde el punto de vista microbiológico y bioquímico una buena calidad de los suelos, debido a la diversidad de taxa fúngicos registrados y a la actividad enzimática presentada por ellos. Sin embargo se presentaron diferencias en sus actividades enzimáticas, dependiendo de la rizósfera desde donde fueron aisladas las cepas fúngicas y el tipo de manejo.

CONCLUSIONES

En todas las cepas fúngicas ensayadas se determinó actividad para fosfatasa ácida y alcalina.

Mayoritariamente las cepas del género *Penicillium* presentaron los valores mayores para ambos tipos de fosfatasa, independiente del origen (SR o R), pastos forrajeros y tipo de pradera.

La mejor de todas las cepas que registró los mayores valores tanto para fosfatasa ácida (139.68 ± 5.4) y alcalina (127.12 ± 4.5) fue la 14-2R de *P. chrysogenum* aislada de la rizósfera de *L. perenne* cultivado en pradera permanente.

AGRADECIMIENTOS

A la Red Latinoamericana sobre Diversidad, Ecología y uso de los hongos microscópicos (XII. J CYTED - REDIMIC), a la Dirección de Investigación de la Universidad Austral de Chile y al Dr. Miguel Salgado por su ayuda en la traducción al inglés del resumen del presente trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- Borie, F.; Quinteros, J. & Aguilera, M. (1983). Bioquímica de suelos derivados de cenizas volcánicas. 4. Solubilización de fosfatos por hongos del suelo. Agricultura Técnica 43:371-376.
- España, M. (2003). Evaluación de la calidad del suelo a través de indicadores bioquímicos. Biología de Suelo. Seminario CENIAP. <http://www.CENIAP.Gov.ve/Seminarios/Mespaña.htm> (citado el 28 diciembre 2004).
- García, C.; Hernández, T.; Roldán, A. & Albaladejo, J. (1997). Biological and biochemical quality of a semiarid soil after induced vegetation. Soil processes and chemical transport. J. Environ. Qual. 26:1116-1122.
- Geb, K. (2002). Phosphatase activity of soil. Soil Microbial Ecology. http://www.oznel.ksu.edu_agro645/lab/645lab.5htm (citado 25 noviembre 2003).
- Gomez de Guinan, Y. & Nageswara, I. (1996). Effect of the rhizosphere of peanut (Papilionaceae) on the fungal flora and the activity of phosphatases. Caribbean Journal of Science 32:214-220.
- Guimaraes, L.; Terenzi, F.; Jorge, J.; Leone, F.; Polizeli, M. (2003). Extracellular alkaline phosphatase from the filamentous fungus *Aspergillus caespitosus*: purification and biochemical characterization. Folia Microbiológica 48:627-32.
- Mamatha, G.; Jayanthi, S.; Raj, D. & Suresh, C. (2004). Preliminary survey of microbial communities and enzyme activities of sandalwood rhizospheres in different agro climatic zones in karnataka. Journal of Tropical Forest Science. 16:283-293.
- Montecinos, C. (1997). Manejo biológico del fósforo en el suelo. Agroecología y desarrollo. Revista Clades. Web: <http://www.clades.org/r8.art4.htm> (citado 2 Diciembre 2003).
- Nannipieri, P.; Pechozzini, F.; Arcada, P. & Pioranelli, C. (1979). Changes in aminoacids, enzyme activitie and biomass during soil microbial growth. Soil Science, 127:26-34.
- Nannipieri, P.; Grego, S. & Canti, B. (1990). Ecological significance of the biological activity in soil. Soil Biochemistry 6:203-355.
- Sauces, L.; Perez-Sarmentero, J. & Molina, A. (1998). Actividad enzimática de estereasas, fosfatasa y β -galactosidasas en suelos de tres fincas de pastos permanentes con diferente altitud. Actas del III Congreso de la Sociedad de Agricultura Ecológica.
- Schmidt, G. & Laskowski, M. (1961). Phosphate ester cleavage (survey). The enzymes. 2 rd. Academic Press Inc. New York. pp. 3-35.
- Shukla, L.; Sing, D.; Yaduraju, N.; Das, T. & Magu, S. (2000). Effect of soil solarization on soil microflora and soil enzymatic activity. Annals of Plant Protection Sciences 8:218-222.
- Tabatabai, M. & Bremner, J. (1969). Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. Soil Biol. Biochem. 1:301-307.
- Tarafdar, J.; Rao, A.; Praveen-Kumar & Kumar, P. (1995). Role of phosphatase-producing fungi on the growth and nutrition of clusterbean (*Cyamopsis tetragono loba* (L.) Taub.). Journal of Arid Environments 29:331-337.
- Tarafdar, J.; Yadav, R. & Niwas, R. (2001). Relative efficiency of fungal intra-and extracellular phosphatases and phytase. J. Plant Nutr. Soil Sci. 165: 17-19.
- Valenzuela, E.; Barrera, S. & Pinochet, D. (2002). Solubilización de roca fosfórica Carolina del Norte con cepas de *Aspergillus niger* aisladas desde un suelo trumao. Boletín micológico 17:81-88.
- Varsha, N.; Jugnu, T. & Patel, H. (1994). Isolation and screening of phosphate solubilizing fungi. Indian Journal of Microbiology 34:113-118.
- Weber, R. & Pitt, D. (1997). Acid phosphatase secretion by *Botrytis cinerea*. Mycol. Res. 101:349-356.