

ESTUDIO "in vitro" SOBRE LA FERTILIZACIÓN NATURAL DE PASTIZALES. SUELOS DE LA SIERRA DE GUADARRAMA

Ana I. Casado Bujalance y Mercedes Fernández Herrera.

Departamento de Química Agrícola, Geología y Geoquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid.

INTRODUCCIÓN

Los pastos naturales son un recurso excelente para la alimentación del ganado. La aplicación de fertilizantes fosfóricos se hace necesaria para incrementar la producción y la calidad de los pastos naturales. De esa manera, se produce un aumento en la producción, en proporción a la cantidad de fósforo aplicado en praderas sembradas. En estos pastos, se produce un aumento en el rendimiento por la adición de este elemento y también una notable mejora en la calidad nutricional de la composición vegetal (Infante et al, 1984)

En estudios ya realizados por nuestro equipo, para la mejora natural de pastos pensamos que es necesario aislar bacterias autóctonas del suelo capaces de transformar el fósforo no asimilable en fósforo lábil directamente asimilable por las plantas, y por medio de una fertilización biológica por microorganismos fosfolubilizadores (bacterias), tanto en experimentos "in vitro" (Fernández, M; Casado, A.I. 1996) como en "in vivo". Estos microorganismos, en experimentos "in vivo" la tasa de solubilización es más destacable en ensayos sin planta, debido a la no-exportación que de fósforo hace el cultivo (Fernández et al, 1984)

MATERIALES Y MÉTODOS

Zona de muestreo

Zona ganadera situada en la rampa de la Sierra de Madrid. Es una superficie de erosión (Gallardo et al., 1981), labrada en rocas duras, granitos y gneis. Presenta una topografía suave con lomas en la que es frecuente encontrar afloramientos rocosos, y valles de fondo amplio y plano que se denominan "navas". La vegetación es el encinar silicícola en las zonas de "colina" y fresnos con robles y sauces en las "navas" según Rivas (1982).

Este suelo es un Graysol dístico según la FAO-UNESCO (1989), se trata de un suelo profundo con capa freática cercana a la superficie. Las muestras, pertenecían a la finca "El Pradazo" sito en la localidad de Manzanares el Real, en una zona de pastizal con árboles. La [Fig. 1](#) muestra la descripción del perfil muestreado. El horizonte A11 es arenoso, de 0-10 cm de espesor, afieltrado, con raíces frecuentes, poroso y permeable. El horizonte A12 arenoso, 10-25 cm, con grumosisidad acentuada y raíces frecuentes, muy permeable, favorable a la actividad biológica. Respecto del horizonte Cg1 de espesor 25-50 cm sigue siendo arenoso, con bloques muy poco desarrollados, subangulares, permeable, penetrable y con raíces frecuentes y límite muy difuso. El horizonte posterior, el Cg2 de espesor 50-90 cm es igual que el anterior. Y por último el horizonte IICg el espesor es de más de 90 cm.

Desarrollo Experimental

El experimento comenzó con el aislamiento de las cepas autóctonas del suelo de estudio ([Fig. 2](#)). Las cepas aisladas se incubaron en una estufa Gallenkamp (IH-150), a 28°C y diferentes medios de aislamiento ([Tabla 1](#)). Posteriormente fue elegida la cepa perteneciente al género *Bacillus* sp, por presentar mejor crecimiento en los medios ensayados.

Previamente al experimento de solubilización se estudió la influencia que el proceso de esterilización podría tener sobre el pH y la tasa de solubilización de fósforo, en los medios de cultivo. Se observó que el pH descendía de 7,5 a 5,8.

A continuación se efectuaron experimentos de solubilización con la cepa bacteriana, en los medios descritos en la [Tabla 1](#), simulando las condiciones reales del suelo. Estas condiciones reales, se plasman en la composición del medio de solubilización ([Tabla 1](#)), donde el tratamiento testigo consiste en la incubación evaluando la solubilización de fósforo. Mientras que en los

experimentos con inóculo, se determina la solubilización del testigo más la acción de la cepa bacteriana.

Los períodos de incubación fueron de una, dos y cuatro semanas y se realizaron tres repeticiones por período. En cada período de incubación evaluamos 6 matraces, tres como testigo (sin inóculo) y otros tres inoculados con la cepa. Al término de cada período de incubación, primero se centrifuga cada matraz, durante 15 minutos a 2000 r.p.m. y se mide el efecto solubilizador procediendo de la siguiente manera, el fósforo sobrenadante (P soluble) se determina directamente en el Autoanalizador Technicon, y el residuo es sometido a una extracción por medio de la Electroultrafiltración, (E.U.F., Nemeth, 1971) donde las dos fracciones obtenidas, también se evalúan por el Technicon. El fósforo soluble total será la suma del P sobrenadante y el P de la fracción I. El P insoluble correspondiente a la fracción II es donde la acción de la cepa bacteriana debe ser más patente.

Para este experimento se utilizó un incubador orbital Gallenkamp (INR-200) con un ventilador deflector que proporciona flujo de aire transversal para garantizar una temperatura uniforme (28-30°C) y una velocidad de agitación de 180 rev/minuto. Con ello se consigue que el inóculo y el medio de cultivo presenten una mayor homogeneidad.

Determinaciones analíticas en suelo y experimentos "in vitro"

Las determinaciones analíticas realizadas tanto en el suelo problema, como en las diferentes fracciones obtenidas de los experimentos, quedan reflejadas en la [Tabla 2](#) y [Tabla 3](#) respectivamente.

Todo el proceso de extracción se ha realizado automáticamente. Cationes y aniones son recogidos por separado, utilizando únicamente la fracción aniónica, por ser donde se encuentra el fosfato. El tiempo total de extracción es de 35 minutos. Con una primera fracción, E.U.F. de 30' a 220 voltios, donde evaluamos el P soluble que se encuentra a disposición de la planta y un fósforo de cambio y de baja solubilidad. La segunda fracción, E.U.F. II, es de 5' siguientes a 400 voltios, que corresponde al fósforo fuertemente retenido.

Diseño estadístico

El diseño experimental ha sido sometido a un tratamiento estadístico Factorial Doble (Zornoza, 1981). Para comparar las medias de los distintos tratamientos (períodos de incubación) y razas (Testigo y Cepa aislada) se han seguido el Método del Test de Duncan. Para efectuar los cálculos necesarios en el

desarrollo estadístico se utilizó un paquete estadístico denominado DATOS, en un ordenador personal

RESULTADOS

Perfil del suelo estudiado

En la [Tabla 2](#) se recogen algunas de las propiedades físicas y químicas del suelo estudiado, referentes a las muestras de los diferentes horizontes analizados.

En este suelo hay dos partes claramente diferenciadas: la superior constituida por los horizontes A (óxicos) y enriquecidos en materia orgánica y los inferiores constituidos por horizontes Cg afectados por un hidromorfismo temporal y con una escasa evolución debido a la textura arenosa-franca (Gallardo, J. (1981).

El material originario está constituido por arenas de origen granítico, ricas en cuarzo y feldespatos potásicos, siendo los procesos de alteración muy poco intensos y, por tanto, no han dado lugar a horizontes estructurales (Gallardo, J. 1981).

Puede comprobarse que se trata de áreas de pH ácido tendiendo a la neutralidad, en un intervalo de valores de 5,47 y 6,28 a lo largo del perfil. El pH moderadamente ácido impide, por otra parte, que la hidrólisis pueda manifestarse con intensidad.

En lo que se refiere al equilibrio catiónico, se presentan valores dentro de la normalidad, excepto para el potasio, en el horizonte superficial, debido al carácter ácido de éste, no tendiendo a acumularse en profundidad.

El horizonte A11 (horizonte de diagnóstico) presenta contenidos altos en materia orgánica debido a que el suelo estudiado está dedicado a pastos. La relación C/N, que indica la actividad biológica, descomposición de la materia orgánica y naturaleza de ésta, es de 9,3 aproximadamente, valor que se considera dentro de un intervalo normal, si tenemos en cuenta que los valores medios adecuados se encuentran alrededor de 11. Este valor indica más cantidad de nitrógeno que de carbono, debido a los productos de desecho del ganado que contienen gran cantidad de nitrógeno. También presenta una gran cantidad de fósforo, tanto en forma orgánica como inorgánica, debido a su utilización como pasto. Debemos pensar que el pH, ligeramente ácido,

favorece y acelera el metabolismo microbiano dando lugar a una mineralización más rápida, por tanto la presencia de complejos fosfocálcicos debe ser baja. Estas cantidades de fósforo orgánico no son inconvenientes para la actuación de la cepa aislada por nosotros, que corresponde al gen: *Bacillus* sp

Experimentos "in vitro"

En la [Tabla 3](#), se expresan los valores medios obtenidos de la solubilización (Medio I) en los diferentes tiempos de incubación, así como las diferentes fracciones estudiadas, sobrenadante, Fracción I y II de E.U.F., P directamente soluble (suma del sobrenadante y la fracción I de E.U.F.) y el fósforo total solubilizado. La mineralización del fósforo por parte de la cepa bacteriana elegida, (Medio II) no fue efectiva.

Respecto al fósforo sobrenadante, se observa que para cada período de incubación existen diferencias significativas entre el testigo y la cepa, siendo las cantidades de P solubilizado mayores en la cepa para los tiempos de incubación de 7 y 14 días, mientras que a los 30 días de incubación (final del experimento), el tratamiento bacteriano no presenta tasa solubilizadora, debido a la falta de elementos nutritivos, que no se adicionaron al medio de cultivo para estudiar los recursos de la bacteria en el medio, durante largos períodos de incubación.

Comparando el efecto de los dos ensayos (Testigo e inóculo), con respecto a los distintos tiempos de incubación, se observa que el testigo sólo muestra diferencias significativas a los 30 días de incubación, es decir, conforme más tiempo se mantiene el fosfato bicálcico (CaHPO_4) en el medio más solubilización se va produciendo. Por el contrario, no ocurre en el caso del ensayo con inóculo, ya que se observa que para los tres tiempos de incubación se producen diferencias significativas, aunque al final del experimento la cepa deja de actuar por falta de elementos nutritivos.

Al determinar el P soluble en la fracción I de la E.U.F., se pueden observar que, para el tiempo de incubación de 14 días la solubilización es significativamente menor, al quedar retenido el P en el sobrenadante, para el caso del tratamiento con inóculo; sin embargo, hay gran incremento en el testigo, coincidiendo con un aumento significativamente mayor en el sobrenadante del tratamiento inoculado. A los 30 días de iniciarse el experimento se observan diferencias significativas en los valores de fósforo solubilizado, siendo mayores en el ensayo con inóculo, al reflejarse en el sobrenadante la solubilización bacteriana desde el comienzo del experimento, no acusando la falta de nutrientes en el medio

En cuanto al P solubilizado en la fracción II de E.U.F., se observa un aumento en la solubilización y diferencias significativas del ensayo con inóculo respecto al testigo, para los períodos de incubación de 14 y 30 días. Sabiendo que esta fracción corresponde al P de menor solubilidad, pone de manifiesto la acción positiva de la bacteria inoculada.

Para el P directamente soluble, se pueden apreciar diferencias significativas en la tasa de solubilización, siendo para los períodos de 7 y 14 días donde la cepa ha experimentado un efecto solubilizador significativamente mayor. Sin embargo, se observa también una notable disminución del P directamente soluble al cabo de los 30 días en los ensayos con inóculo, debido a la ya comentada falta de elementos nutritivos.

Por último para el fósforo total ([Fig. 3](#)) se observa que en el tratamiento con inóculo, al iniciarse la incubación hay una menor solubilización que a los 14 días, posiblemente debido a que la bacteria utiliza parte del fósforo del medio para su metabolismo.

CONCLUSIONES

La cepa del Género *Bacillus* sp, es capaz de actuar sobre un medio de cultivo que contenga fósforo bajo formas inorgánicas, transformando fósforo no asimilable en asimilable, sin embargo cuando en el medio existen solamente las formas orgánicas no es capaz de alcanzar los efectos positivos que se dan para el caso del fosfato bicálcico.

La acción directa sobre fósforo orgánico no es recomendable aunque tampoco es de mayor importancia debido a que la composición del suelo estudiado, como ha quedado reflejado en la [Tabla 2](#), está formada por P orgánico e inorgánico (Casado, 1994)

Los pastos producidos en los suelos estudiados, Gleisol Dístico, pueden mejorar en calidad y en cantidad mediante la adición de la cepa aislada.

Para este tipo de estudios en zonas colindantes o en zonas muy diferentes, pensamos que es necesario siempre aislar microorganismos autóctonos capaces de transformar el fósforo a formas asimilables por las plantas.

Para todos los experimentos de ésta naturaleza, creemos que es imprescindible añadir al medio de cultivo solución trazas como nutrientes, para largos periodos de incubación, Aunque en experimentos "in vivo" no sea necesario

BIBLIOGRAFÍA

BAREA, J.M. et al. (1975). "Possible synergistic interactions between Endogene and phosphates-solubilizing bacteria in low phosphate soil". In *Endomycorrhiza*. (Ed) B. Mosee, F.E. Sanders y P.B. Tinker. London. Academic Press. 409-417

BAREA, J.M., AZCÓN, G, DE AGUILAR, C., AZCÓN, R. (1980). "Papel de los microorganismos del suelo en las transformaciones de los nutrientes de las plantas. III". Congreso Nacional de Química de Sevilla.

CADAHÍA, C. (1973). "Determinación simultánea de Nitrógeno y Fósforo en suelos y plantas con un sistema Autoanalizador". *Anal. Edaf. Y Agob.* XXXII, (5-6). 479-500

CADAHÍA, C. (1973). "Determinaciones analíticas en suelos. Normalización de métodos. I: pH, materia orgánica y nitrógeno". *Anal. Edaf. Y Agob.* XXXII, (5-6). 1153-1172

CARPENA, O., CADAHÍA, C., GÁRATE, A., SÁNCHEZ, J. (1981). "Estudios básicos de fertilidad por un sistema de Electroultrafiltración (E.U.F.)". *Anal. Edaf. Y Agob.* XL (11-12) 2385-2391.

CASADO, A.I. (1994). "Estudios in vitro sobre la fertilización natural de pastizales". Tesis de Licenciatura. U.A.M. 1-87

DALAL, R.C. (1977). "Soil Organic Phosphorus". *Advances in Agronomy.* 29, 83-117.

DÍEZ, J.A. (1982). "Aplicación de la E.U.F. a la dinámica de los elementos nutritivos en el suelo". IA. Ed. C.S.I.C. Madrid

F.A.O-UNESCO (1989). "Mapa mundial de suelos. Leyenda revisada". Informes sobre recursos mundiales de suelos 60.

FERNÁNDEZ, M (1983). "Solubilización bacteriana de fósforo mineral en suelos calizos". Tesis Doctoral. U.A.M. 13-236

FERNÁNDEZ, M (1984). "Fertilización biológica en suelos calizos. Solubilización de fósforo mineral con cepas *Bacillus cereus*". M.A.P.A. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias.

FERNÁNDEZ, M, TEJÓN, F., CASADO, A.I. (1996). "Fertilización fosfobacteriana de cultivos pratenses en suelos hidromorfos de la sierra de Guadarrama". *Agrochimica.* XL, nº 1, 9-18

GALET, M.P (1951). "Le dosage du calcaire actif et l'apreciation du puvair clorosant des sols". *Progress Agricole et Viticole.* 136, 277-282.

GALLARDO, J., ALEIXANDRE, T., GUERRA, A. (1981). "Horizontes argílicos en suelos sobre rocas intrusivas y metamórficas de la Sierra de Guadarrama". Anal. Edaf. Y Agrobiol. XL, 7-8, 1089-1100.

GEAVES, M.P et al., (1965). "A study of the Breakdown of organic phosphates by the root of certain pasture grass". J.A. ppl. Bact. 28 (3) 454-465.

ISLAM, A., ASHMED, B. (1973). "Distribution of inositol phosphates, phospholipids, and nucleic acids and mineralization of inositol phosphates in some Bangladesh soils". J. Soil. Sci. 24, 193-198.

JIMÉNEZ, R. et al., (1978). "Consideraciones sobre las necesidades nutritivas en praderas sembradas y pastos naturales en Extremadura". An. INIA. Ser. Prod. Vegetal. 8, 17-36.

MATTINGLY, GE.G, TALIBUDEN, O. (1967). "Progress in the chemistry of fertilizer and soil phosphorus". Topic in phosphorus chemistry. 4, Interscience pub. N.Y. 157-279

MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN (M.A.P.A.) (1986). "Métodos oficiales de análisis". Servicio de Publicaciones Agrarias. España. 97-170

RIVAS MARTÍNEZ, (1982). "Mapa de las series de vegetación de Madrid". Diputación de Madrid.

TARDIEUX-ROCHE, A. (1966). "Contribution a l'etude des interactions entre phosphates naturels et microflore du sol". Ann. Agon. 17, 403-471

WALKLEY, A. (1974). "A critical examination of rapid method for determining organic carbon in soils effect of variations in digestion conditions and of inorganic soil constituents". Soil Science 63, 251-254

ZORNOZA, P (1981). "Influencia del fósforo, manganeso y boro en la biosíntesis de flavonoides". Tesis Doctoral. U.A.M. 2-238

Figuras y Tablas.

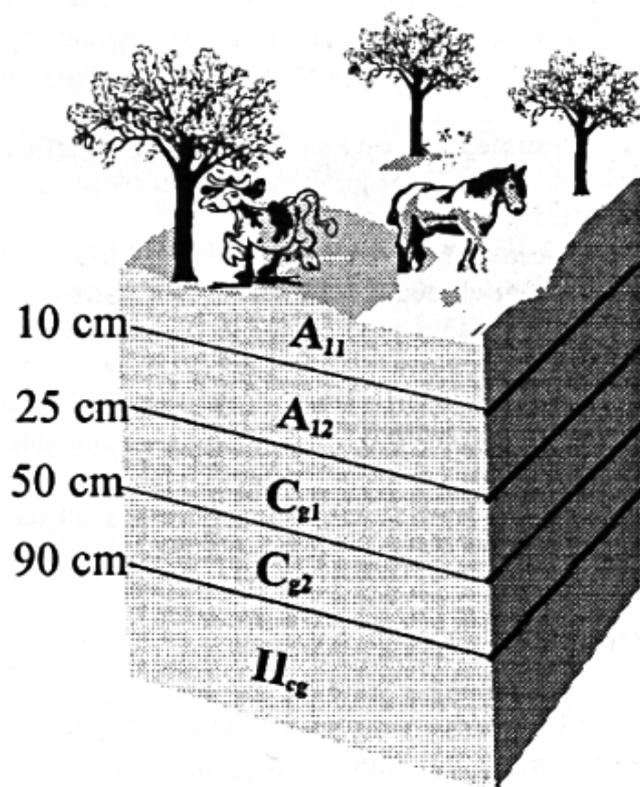


Figura 1. Descripción del perfil del suelo estudio.

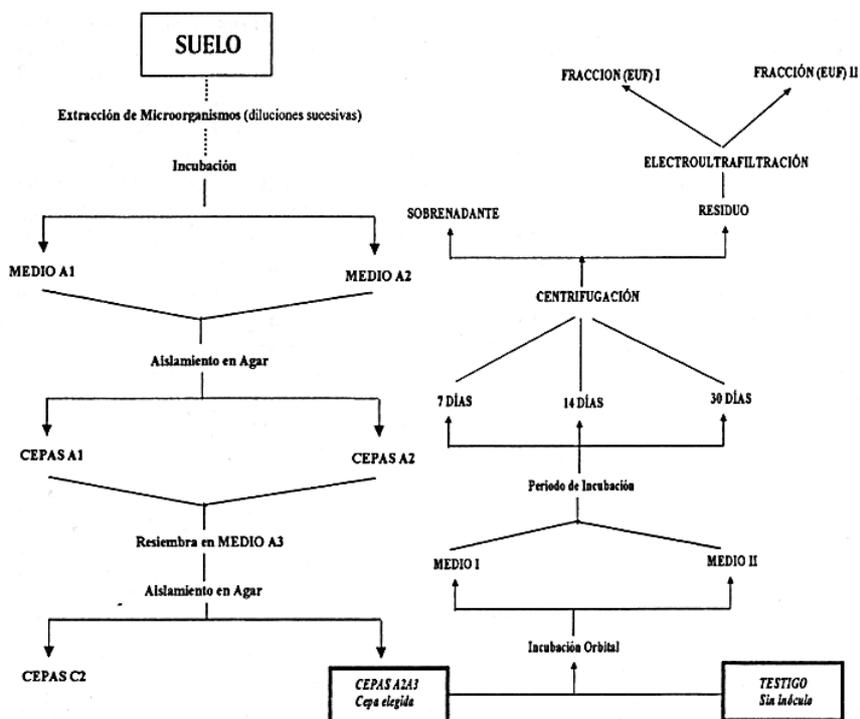


Figura 2. Desarrollo experimental: aislamiento y experiencias "in vitro".

Tabla 1. Medios de Aislamiento y Solubilización.

COMPONENTES	MEDIOS DE AISLAMIENTO			MEDIO DE SOLUBILIZACIÓN	
	A1	A2	A3	MEDIO I	MEDIO II
Extracto de levadura	2 g	2 g	2 g	2 g	2 g
Fosfato Bicálcico	2 %	-----	4 %	2 %	-----
Glucosa	10 g	10 g	10 g	30 g	15 g
Agar-Agar	15 g	15 g	15 g	-----	-----
Nistatina	0.45 g	0.45 g	0.45 g	-----	-----
Inositol Hexafosfato	-----	2 %	-----	-----	2 %
Agua eñestilada	hasta 1.L	hasta 1.L	hasta 1.L	hasta 1.L	hasta 1.L
pH del medio	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5

Tabla 2. Características químicas del Perfil objeto de estudio.

Horizonte	% m.o.	pH	% C	% Arena	% Arcilla			Color
	WAKLEX, A., 1946	CADAHÍA, C., 1973			M.A.P.A., 1986			
A ₁₁	4.90	5.47	2.80	70.70	17.80	11.50	10YR3/4	
A ₁₂	1.43	5.67	0.83	70.32	13.38	16.30	10YR3/3	
C ₀₁	0.84	6.28	0.49	73.12	13.24	13.64	10YR3/2	
C ₀₂	0.77	6.16	0.45	83.84	2.84	13.82	10YR3/2	
Il ₀₃	0.75	5.76	0.44	79.78	7.48	12.74	10YR3/1	
Horizonte	% Ca	% K	% Mg	% P orga	% P inorg.	% P total	% N	
	M.A.P.A., 1986			MATTINGLY y TALIBUDEEN, 1967			M.A.P.A., 1986	
A ₁₁	7.15	0.95	1.55	105.50	49.50	155.50	0.30	
A ₁₂	7.00	0.18	1.25	% ₁ meq/100 g de suelo seco y tamizado a 2 mm				
C ₀₁	4.05	4.00	1.02	% ₂ mg/kg de suelo				
C ₀₂	3.68	0.85	0.50					
Il ₀₃	2.75	1.75	3.07					

Tabla 3. Contenidos de Fósforo solubilizado con el Medio I. experimentados en mg P/g fosfato bicálcico.

Metodología, Díez, 1981		7 DÍAS	14 DÍAS	30 DÍAS
P. sobrenadante (P _s)	TESTIGO	08.93 ± 0.02	09.04 ± 0.03	16.42 ± 0.35
	CEPA	12.56 ± 0.32	14.91 ± 0.05	04.43 ± 0.07
P. soluble (EUF I)	TESTIGO	01.16 ± 0.24	01.53 ± 0.07	00.99 ± 0.14
	CEPA	01.16 ± 0.23	01.19 ± 0.10	01.37 ± 0.18
P. soluble (EUF II)	TESTIGO	00.94 ± 0.04	00.92 ± 0.02	01.18 ± 0.27
	CEPA	00.85 ± 0.07	01.33 ± 0.21	01.21 ± 0.02
P _t soluble (P _s +EUF I)	TESTIGO	09.72 ± 0.10	10.70 ± 0.11	17.50 ± 0.34
	CEPA	14.68 ± 0.13	16.10 ± 0.12	05.79 ± 0.23
P total extraído	TESTIGO	11.00 ± 0.15	11.70 ± 0.22	18.80 ± 0.18
	CEPA	14.80 ± 0.16	17.5 ± 0.16	07.03 ± 0.24

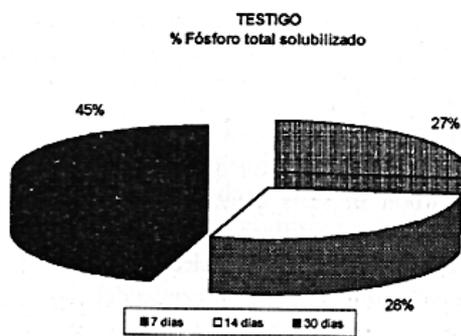
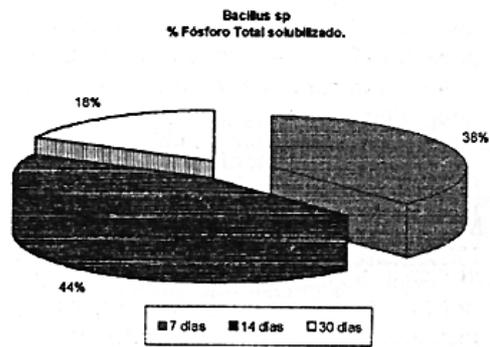


Figura 3. Fósforo total solubilizado en experiencias "in vitro", con fosfato bicálcico.