

BIOQUIMICA DE SUELOS DERIVADOS DE CENIZAS VOLCANICAS.

IV. SOLUBILIZACION DE FOSFATOS POR HONGOS DEL SUELO¹

Biochemistry of soils derived from volcanic ashes. IV. Solubilization of phosphates by soil fungi

Fernando Borie B.², Josué Quinteros Q.³ y María Aguilera S.⁴

SUMMARY

The number of phosphate solubilizing bacteria and fungi in seven volcanic soils was investigated. The results led to conclude that the fungi population is more active, specially in solubilizing organic phosphates.

The amounts of P released by the action of four active fungi strains (*Penicillium* sp., *Aspergillus niger*, *Mucor* sp. and a possible *Botrytis* sp.), from five inorganic and organic phosphates and two types of phosphate rocks, were evaluated. The results show that *Aspergillus niger* and *Botrytis* sp. are active in releasing phosphorus, particularly from aluminium phytate.

The possible mechanisms involved in the P-solubilization and their occurrence in volcanic ash derived soils are discussed.

INTRODUCCION

Los factores que afectan la concentración del fósforo en la solución del suelo son de gran trascendencia en el crecimiento de las plantas siendo, en este sentido, de fundamental importancia la actividad de los microorganismos, ya que éstos desarrollan una serie de acciones mediante las cuales es posible movilizar P en el ecosistema suelo-planta. Dichas acciones se condensan fundamentalmente en reacciones de solubilización, mineralización e inmovilización de P en el suelo y han sido analizadas, en un artículo de reciente revisión, conjuntamente con la acción beneficiosa de transporte de P que realizan los hongos de las micorrizas (Borie y Barea, 1982).

Aunque la solubilización *in vitro* de fosfatos por bacterias del suelo se ha estudiado extensamente (Tardieux-Roche, 1966; Ramos, Barea y Callao, 1966; Ba-

rea, Ramos y Callao, 1970), estimándose que sobre el 50% de la población bacteriana de la rizosfera posee dicha habilidad (Hayman, 1975), mucho menos atención se ha dedicado al efecto de los hongos en tal sentido. En efecto, se ha descrito la acción de diversas especies de hongos sobre fosfato tricálcico (Chhonkar y Subba-Rao, 1967; Ramos, Callao y Carvalho, 1968; Agnihotri, 1970), hidróxido y fluorapatita (Agnihotri, 1970) y se ha informado que las cepas más activas pertenecen a *Aspergillus* y *Penicillium*, pero prácticamente no existen antecedentes de la acción fúngica sobre fosfatos orgánicos del tipo de los que habitualmente se encuentran en los suelos.

Es un hecho conocido que los suelos volcánicos del Sur de Chile, a pesar de poseer una serie de características que los hace aparecer como agrónomicamente aceptables, ven su fertilidad seriamente limitada por problemas derivados de la elevada capacidad de fijación de fosfato que poseen, lo que se traduce en bajas tasas de P disponible; no obstante, la cantidad de P total que poseen estos suelos es elevada (Borie y Barea, 1982a). Por otra parte, se ha postulado últimamente que los factores bióticos parecieran ser altamente decisivos en lo referente a la acumulación de fosfatos en estos suelos, en especial en el largo plazo (Borie y Zunino, 1983). Así, el hecho de encontrar que la pesada fertilización fosfata, aplicada a estos suelos durante 20 o más años,

¹ Recepción de originales: 23 de diciembre de 1982.

² Fac. Ciencias Químicas, U. de Chile. Actualmente: Depto. Ciencias Químicas, Fac. Ingeniería, U. La Frontera, Casilla 54-D, Temuco, Chile.

³ Químico. Profesor visitante, Fac. Ciencias Químicas, U. de Chile (1981), U. Nacional de Colombia.

⁴ Fac. Ciencias Químicas, U. de Chile, Casilla 233, Santiago, Chile.

haya permitido una gran acumulación de P asociado íntimamente a la materia orgánica (Borie y Barea, 1982a), conjuntamente con la gran capacidad de síntesis de materiales húmicos que posee la microflora presente (Zunino y otros, 1982), apunta a una fuerte interrelación entre los ciclos del C y del P, en estos ambientes edáficos.

Los objetivos del presente trabajo consistieron en realizar, primeramente, una prospección de bacterias y hongos con capacidad de solubilizar fosfatos orgánicos e inorgánicos para, posteriormente, cuantificar el poder de disolución de siete fosfatos insolubles por parte de cuatro hongos extraídos de suelos alofánicos.

MATERIALES Y METODOS

Los suelos volcánicos utilizados fueron extraídos desde la rizosfera de la vegetación natural del lugar y se recolectaron en la primavera de 1980. Se guardaron en bolsas de plástico adecuadamente cerradas, para conservar la humedad natural que tenían en el campo. Los suelos húmedos se tamizaron a 2 mm y en ellos se realizaron las determinaciones químicas y microbiológicas.

Se determinó pH sobre pasta de saturación; C orgánico por combustión seca; P disponible por Bray-Kurtz II; P total según Dick y Tabatabai (1977); P orgánico según el método de Steward y Oades (1972), modificado por Borie y Barea (1982) (Cuadro 1).

dores de fosfatos se utilizaron los mismos medios nutritivos anteriormente mencionados, reemplazando la fuente de P por un fosfato insoluble, agregado al 0,2%/o. La siembra se realizó en superficie, con la suspensión-dilución de suelo adecuado y se estableció como criterio de solubilización la formación de halo de solubilización alrededor de la colonia. El recuento se llevó a cabo al quinto día de incubación a 28°C. Como fuente de fosfato insoluble se utilizó fosfato tricálcico y fitato (inositol-fosfato) de calcio, como típicos exponentes de un fosfato inorgánico y orgánico del suelo, respectivamente.

Para cuantificar la capacidad de solubilización de fosfatos por parte de los hongos extraídos de los suelos, se procedió a seleccionar, desde las placas, cuatro especies fúngicas efectivas y diferentes: *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., *Mucor* sp. y un hongo de género desconocido, posiblemente un *Botrytis* sp. Cada una de estas especies se inoculó por duplicado, en matraces que contenían 50 ml de medio nutritivo. Para ello, se prepararon dos medios, con P soluble (1 g/lit como KH_2PO_4 ; Agnihotri, 1970) y sin P soluble, ambos conteniendo 15 g de glucosa, 5 g de $NaNO_3$, 0,5 g de $MgSO_4$ y 1.000 ml de agua. Previo a la inoculación, los matraces se dividieron en siete grupos y se agregó a cada uno la cantidad de fosfato insoluble equivalente a 20 mg de P, es decir, 108 mg de $Ca_3(PO_4)_2$, 100 mg de $FePO_4$, 208 mg de roca fosfórica R1 (Cuadro 2), 216 mg de roca fosfórica R2 (Cuadro 2), 184 mg de fitato de calcio, 192 mg de fitato de Fe y 258 mg de fitato de aluminio, respectivamente. Todos los matraces se esterilizaron a 114°C durante 30 minutos, previo ajuste del pH del medio a 6,5 con solución de NaOH. Cada matraz se inoculó con las cepas extraídas desde las placas. Después de incu-

CUADRO 1. Algunas características químicas de suelos volcánicos estudiados

TABLE 1. Some chemical characteristics of the volcanic soils under study

| Suelo | pH | C org. % | P total ppm | P org. ppm | P disp. ppm |
|--------------|-----|----------|-------------|------------|-------------|
| Osorno | 5,3 | 5,8 | 3.000 | 2.159 | 20 |
| Corte alto | 5,3 | 5,7 | 1.513 | 835 | 3 |
| Frutillar | 4,9 | 10,4 | — | — | — |
| Lastarria | 4,9 | 6,9 | 1.538 | 1.215 | 12 |
| Metrenco | 5,0 | 4,9 | 2.135 | 1.145 | 9 |
| Arrayán | 6,4 | 4,6 | 1.562 | 1.150 | 4 |
| Puerto Octay | 6,1 | 6,5 | 1.126 | 876 | 3 |

La estimación de la flora microbiana se realizó a partir de extractos acuosos de suelo, de acuerdo al método de dilución en placa y con medios de cultivos selectivos. Para hongos, se utilizó el medio de Martin (1950), agar-rosa de bengala-streptomocina, y para bacterias, el medio corriente agar-glucosado, según Pochon y Tardieux (1962). Para la determinación de la población de microorganismos solubili-

CUADRO 2. Composición de rocas fosfóricas de Colombia, utilizadas en estos estudios (León, 1980)

TABLE 2. Composition of phosphoric rocks from Colombia, used in this study

| Elemento (o/o) | R1 Huila | R2 Boyacá |
|------------------------------|----------|-----------|
| P_2O_5 total | 21,0 | 20,0 |
| P_2O_5 soluble ác. cítrico | 5,2 | 7,0 |
| CaO | 39,4 | 28,0 |
| MgO | 0,5 | 0,1 |
| CO ₂ | 8,0 | 1,3 |
| F | 2,4 | 2,2 |
| Na ₂ O | 0,28 | 0,16 |

bar los matraces durante 20 días a 25°C, se esterilizaron nuevamente y el contenido se filtró a través de papel Whatman Nº 1. En el filtrado se determinó, por una parte, el pH de la solución y por otra, el conteni-

do de P soluble, mediante el método sulfomolibdico-ácido ascórbico, previa destrucción de la materia orgánica por oxidación con solución de NaBrO. Se mantuvo controles sin inóculo para determinar el posible efecto de la temperatura de esterilización sobre la solubilización de los fosfatos.

RESULTADOS Y DISCUSION

El número de hongos y bacterias totales y con capacidad de solubilizar fosfatos orgánicos e inorgánicos aparecen tabulados en el Cuadro 3. Se puede apreciar que la población fúngica, además de ser elevada posee, porcentualmente, mayor habilidad que las bacterias para solubilizar fosfatos, especialmente de tipo orgánico.

Estos resultados indicarían una cierta adaptación ecológica natural por parte de los hongos a las condiciones ambientales propias de los suelos volcánicos, toda vez que se ha demostrado recientemente que la mayor parte del P en ellos se encuentra bajo formas orgánicas, o de alguna manera asociado a la materia orgánica (Borie y Barea, 1982a).

En los suelos estudiados existe una amplia variedad de hongos y bacterias fosfato-solubilizadores; sin embargo, debido a la mayor biomasa que poseen los hongos en los suelos alofánicos (Zunino y otros, 1982; Martínez y Ramírez, 1978) y por ende, a la mayor actividad biológica que cabe esperar de ellos, la atención de los autores se ha centrado específicamente en la población fúngica. Se encontró una variada gama de especies activas, pero, a modo de

CUADRO 3. Hongos y bacterias totales y solubilizadores de fosfatos orgánicos e inorgánicos presentes en los suelos estudiados

TABLE 3. Total and phosphate solubilizing fungi and bacteria present in the soils under study

| SUELO | BACTERIAS | | | HONGOS | | |
|--------------|----------------------------------|-----------------|--------------|---------------------------------|-----------------|--------------|
| | Nº/g suelo (x 10 ⁵)* | Solubilizadores | | Nº/g suelo (x 10 ⁵) | Solubilizadores | |
| | | P org. o/o | P inorg. o/o | | P org. o/o | P inorg. o/o |
| Osorno | 58,0 | 80 | 80 | 34,6 | 30 | 60 |
| Corte Alto | 12,2 | 20 | < 5 | 25,2 | 35 | < 5 |
| Frutillar | 4,0 | — | — | 2,0 | 40 | < 5 |
| Lastarria | 6,5 | 10 | 55 | 5,5 | 66 | < 5 |
| Metrengo | 3,0 | < 5 | < 5 | 1,8 | 80 | 60 |
| Arrayán | 1,1 | 20 | < 5 | 1,7 | 50 | 50 |
| Puerto Octay | 3,0 | < 5 | < 5 | 3,5 | < 5 | < 5 |

* Promedio de cinco repeticiones por dilución.

generalización, se puede establecer un franco predominio de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, lo que concuerda con los resultados descritos por otros autores (Ramos y otros, 1968; Agnihotri, 1970). Concretamente, se encontró que los hongos de mayor frecuencia fueron *Aspergillus niger* (de micelio amarillo), *Penicillium clavatum*, colonias diferentes de *Penicillium* series bi y polyverticillata, *Chaetoniium* sp. y otras dos especies que corresponden posiblemente a *Botrytis* sp. y *Cephalosporium* sp.

La cuantía de la solubilización de fosfatos inorgánicos y orgánicos por los hongos utilizados aparecen en los cuadros 4 y 5, respectivamente. En los controles aparece una mínima cantidad de P soluble, proveniente de la solubilización térmica de los fosfatos insolubles, como producto de la doble esterilización. La excepción la presentan los fitatos de calcio y de hierro, por lo que en los cálculos de la solubilización microbiana neta se consideró este factor.

Al examinar los resultados se puede constatar que, en general, en el medio con P soluble prácticamente no se observó liberación de P a la solución, a excepción hecha a la producida por *Penicillium*, desde el fitato y fosfato de calcio. La eventual solubilización de P en este medio, conjuntamente con parte del P soluble, entró a formar parte del protoplasma del hongo (inmovilizándose) y en estas circunstancias no fue cuantificado. No obstante, en la actualidad, mediante microtécnicas es posible cuantificar el P componente de la biomasa microbiana (Brookes, Powlson y Jenkinson, 1982; Hedley y Stewart, 1982). Por otra parte, cuando el medio no contiene P soluble, el hongo necesariamente debe solubilizar P desde sus formas insolubles y, en la mayor parte de los casos, la realizó más allá de sus propios requerimientos nutricionales. Que las vías metabólicas utilizadas por los hongos fueron diferentes, en el medio con P y sin P, lo demuestran, por una parte, que la biomasa fúngica fue visiblemente superior en el medio con P y, por otra, que el pH

CUADRO 4. Solubilización de fosfatos inorgánicos por cuatro hongos, aislados de suelos volcánicos

TABLE 4. Solubilization of inorganic phosphates by four fungi, isolated from the volcanic soils

| HONGO | pH | | mg P en 50 ml de medio | | %/o P insoluble solubilizado | |
|--|----------------|-----------------|------------------------|-----------------|------------------------------|-----------------|
| | P _s | -P _s | P _s | -P _s | P _s | -P _s |
| Solubilización de fosfato tricálcico | | | | | | |
| <i>Penicillium</i> | 4,8 | 4,3 | 18,3 | 13,8 | 38,5 | 68,5 |
| <i>Aspergillus</i> | 4,7 | 4,6 | 9,2 | 5,2 | | 25,6 |
| <i>Mucor</i> | 5,8 | 6,4 | 7,4 | 0,2 | | 0,5 |
| <i>Botrytis</i> (?) | 8,8 | 9,0 | 9,2 | 3,7 | | 18,1 |
| Control* | 5,6 | 6,5 | 10,6 | 0,09 | | |
| Solubilización de fosfato férrico | | | | | | |
| <i>Penicillium</i> | 5,5 | 4,3 | 10,4 | 0,4 | 2,0 | 1,8 |
| <i>Aspergillus</i> | 4,8 | 4,6 | 5,0 | 2,3 | | 11,3 |
| <i>Mucor</i> | 6,0 | 6,4 | 7,5 | 0,1 | | 0,3 |
| <i>Botrytis</i> (?) | 9,0 | 9,0 | 9,0 | 3,4 | | 16,8 |
| Control* | 4,4 | 4,5 | 10,0 | 0,04 | | |
| Solubilización de fosfato de roca R ₁ | | | | | | |
| <i>Penicillium</i> | 5,6 | 7,2 | 7,1 | 0 | | |
| <i>Aspergillus</i> | 4,5 | 4,5 | 2,7 | 0,30 | | 1,5 |
| <i>Mucor</i> | 6,6 | 7,5 | 5,6 | 0 | | |
| <i>Botrytis</i> (?) | 9,1 | 9,4 | 6,9 | 1,1 | | 5,5 |
| Control* | 7,1 | 7,2 | 10,8 | 0 | | |
| Solubilización de fosfato de roca R ₂ | | | | | | |
| <i>Penicillium</i> | 8,0 | 4,1 | 9,2 | 2,8 | | 14,0 |
| <i>Aspergillus</i> | 5,7 | 5,1 | 8,6 | 5,2 | | 26,0 |
| <i>Mucor</i> | 6,1 | 5,5 | 7,2 | 0,35 | | 1,7 |
| <i>Botrytis</i> (?) | 9,1 | 9,5 | 8,1 | 3,0 | | 15,0 |
| Control* | 4,8 | 5,8 | 9,7 | 0 | | |

P_s: Medio con P soluble (KH₂PO₄); -P_s: Medio sin P soluble.

* Control sin Inocular hongo.

final en ambos medios fuera sensiblemente diferente. La extrapolación de estos resultados a lo que estaría sucediendo realmente en el suelo es riesgosa y necesita mayor estudio, pero no se debe descartar la posibilidad que ello podría estar ocurriendo con cierta intensidad en algunos microhabitats.

De las especies fúngicas estudiadas, *Penicillium* sp. demostró un efecto notorio sobre el fitato y el fosfato de calcio, y en menor proporción sobre la roca fosfórica R₂. Por otra parte, *Aspergillus niger*, conjuntamente con el posible *Botrytis* sp., fueron los más universales, ya que solubilizaron todos los fosfatos estudiados. Estos resultados, conjuntamente con la disminución del pH, estarían indicando una solubilización producto de la liberación al medio de ácidos orgánicos con capacidad quelante. Mientras *Aspergillus niger* bajó el pH del medio por la producción de ácidos oxálico y cítrico principalmente (Müller, 1960; Agnihotri, 1970), el posible *Botrytis* sp. en cambio, provocó una apreciable solubilización de fosfatos orgánicos tan insolubles como son los fitatos de Fe y Al. Por otra parte, *Mucor* sp. fue un solubilizador eficiente tan sólo para el fitato de calcio.

Dentro de los mecanismos bioquímicos involucrados en la solubilización microbiana de fosfatos inorgánicos insolubles, recientemente analizados por Borie y Barea (1982), los que merecen especial atención en los suelos volcánicos son los relacionados con la quelación y disminución de pH, mecanismos que, por las características propias de los exudados microbianos, concurren simultáneamente, como parece ser el caso de *Penicillium* sp. y *Aspergillus niger*. No sucede así con el posible *Botrytis* sp. En efecto, al observar los cuadros 4 y 5, se aprecia que el hongo mencionado produce un aumento notorio del pH, con valores que oscilan entre 9 y 9,5. Ello indicaría que, como producto del metabolismo microbiano, el N del medio, que inicialmente se encontraba como NaNO₃, sea excretado como N-amoniacoal o amínico, imprimiendo un carácter básico a la solución. De hecho, es corriente observar el incremento de pH del medio de hongos, cuando la fuente de N es nitrato (Morton y MacMillan, 1954). En estas condiciones de pH, la quelación, si se produce, tendría su máxima expresión al estar totalmente disociados los ácidos quelantes, que habitualmente son excretados por los hongos.

CUADRO 5. Solubilización de fosfatos orgánicos por cuatro hongos, aislados de suelos volcánicos

TABLE 5. Solubilization of organic phosphates by four fungi, isolated from the volcanic soils

| HONGO | pH | | mg P en 50 ml de medio | | O/o P insoluble solubilizado | |
|--------------------------------------|----------------|-----------------|------------------------|-----------------|------------------------------|-----------------|
| | P _s | -P _s | P _s | -P _s | P _s | -P _s |
| Solubilización de fitato de calcio | | | | | | |
| <i>Penicillium</i> | 5,9 | 4,9 | 17,4 | 16,6 | 24,5 | 80,0 |
| <i>Aspergillus</i> | 5,4 | 5,0 | 12,0 | 7,3 | | 33,5 |
| <i>Mucor</i> | 7,9 | 5,0 | 9,5 | 15,2 | | 73,0 |
| <i>Botrytis</i> (?) | 9,1 | 9,5 | 11,1 | 3,7 | | 16,0 |
| Control* | 6,0 | 6,4 | 12,5 | 0,6 | | |
| Solubilización de fitato de hierro | | | | | | |
| <i>Penicillium</i> | 6,1 | 3,6 | 8,7 | 1,3 | | |
| <i>Aspergillus</i> | 4,0 | 5,0 | 6,7 | 2,6 | | 6,5 |
| <i>Mucor</i> | 7,4 | 4,4 | 7,8 | 1,3 | | |
| <i>Botrytis</i> (?) | 8,8 | 9,0 | 10,0 | 5,3 | | 20,0 |
| Control* | 3,4 | 3,4 | 10,4 | 1,3 | | |
| Solubilización de fitato de aluminio | | | | | | |
| <i>Penicillium</i> | 5,1 | 4,5 | 10,3 | 0,3 | 2,5 | 2,0 |
| <i>Aspergillus</i> | 4,6 | 4,6 | 6,7 | 2,0 | | 10,0 |
| <i>Mucor</i> | 3,6 | 3,7 | 9,8 | 0,1 | | 0,5 |
| <i>Botrytis</i> (?) | 8,2 | 9,0 | 10,7 | 5,4 | 5,0 | 27,0 |
| Control* | 3,2 | 3,1 | 9,8 | 0 | | |

P_s: Medio con P soluble (KH₂PO₄); -P_s: Medio sin P soluble.

*Control sin inocular hongo.

En forma similar, los fosfatos orgánicos se solubilizan por quelación del metal respectivo. Sin embargo, para liberar el fosfato se debe producir necesariamente una hidrólisis enzimática, mediante la acción de fosfatasas que son segregadas al medio por los microorganismos (Alexander, 1977). Los resultados del Cuadro 5 indican que el posible *Botrytis* sp. es capaz de realizar ambos mecanismos simultáneamente, ya que es sabido que para que actúe la enzima, el sustrato debe estar indefectiblemente a la forma soluble.

Los resultados de este estudio de solubilización de fosfatos *in vitro* indicarían que, en condiciones óptimas para el desarrollo microbiano, su efecto *in situ* podría ser beneficiosos para el crecimiento vegetal. No obstante, esto no ocurre en la generalidad de los suelos, ya que una de las condiciones básicas que requieren los microorganismos para su desarrollo es dis-

poner de una adecuada fuente de carbono fácilmente asimilable (Tinker y Sanders, 1975; Barea, Ocampo y Montoya, 1977), hecho que no se produce en suelos volcánicos, al estar la materia orgánica altamente humificada. Si a este problema se suma la poca movilidad del fosfato en estos suelos, se concluye que el aporte de P al vegetal por parte de los hongos de vida libre sería mínimo en los casos en que las raíces de ese vegetal no estén asociadas con microorganismos simbióticos. En efecto, el micelio externo de los hongos de las micorrizas, a través de su extensa red de hifas, es capaz de captar eficientemente el fosfato que se va produciendo en los microhabitats, canalizándolo al interior de la raíz y evitando las interacciones con las superficies activas del suelo. La cooperación de los hongos solubilizadores, asociados con hongos simbiotes (micorrizas), en suelos volcánicos es materia de gran interés, que se está estudiando actualmente en este laboratorio.

RESUMEN

En siete suelos derivados de cenizas volcánicas se determinó la población de bacterias y hongos con capacidad de solubilizar, *in vitro*, tanto fosfatos inorgánicos como orgánicos. Se encontró que los hongos eran más activos que las bacterias, especialmente sobre fosfatos orgánicos.

Con cuatro hongos provenientes de los suelos (*Penicillium* sp., *Aspergillus niger*, *Mucor* sp. y un posible *Botrytis* sp.), se cuantificó la solubilización de cinco

fosfatos inorgánicos y orgánicos y dos rocas fosfóricas. Se comprobó que *Aspergillus niger* y el posible *Botrytis* sp. producen una solubilización importante de los fosfatos, en general, y del fitato del aluminio, en particular.

Se discute el mecanismo de solubilización de los fosfatos y la posibilidad que ello ocurra ampliamente en los suelos volcánicos.

LITERATURA CITADA

- AGNIHOTRI, H.P. 1970. Solubilization of insoluble phosphate by some soil fungi isolated from nursery seedbeds. *Can. J. Microbiol.* 16: 877-880.
- ALEXANDER, M. 1977. Introduction to soil microbiology. Wiley & Sons. New York, 467 p.
- BAREA, J.M., RAMOS, A. y CALLAO, V. 1970. Contribución al estudio *in vitro* de la mineralización bacteriana de fosfatos. *Microbiol. Españ.* 23: 253-270.
- BAREA, J.M., OCAMPO, J.A. y MONTROYA, E. 1977. Estudio crítico sobre la utilización de azobacter y fosfobacterias como fertilizantes microbianos. *An. Edaf. y Agrobiol.* 36(11-12): 1197-1208.
- BORIE, F. y BAREA, J.M. 1982. Ciclo del fósforo. II. Papel de los microorganismos y su repercusión en nutrición vegetal. *An. Edaf. y Agrobiol.* (En prensa).
- BORIE, F. y BAREA, J.M. 1982a. Fósforo orgánico en suelos volcánicos de Chile. *Agricultura Técnica (Chile)* 43(3): 239-248.
- BORIE, F. and ZUNINO, H. 1983. Organic matter-phosphorus associations as a sink in P-fixation processes in allophanic soils of Chile. *Soil Biol. & Biochem.* (En prensa).
- BROOKES, P.C.; POWLSON, D.S.; and JENKINSON, D.S. 1982. Measurement of microbial biomass phosphorus in soil. *Soil Biol. & Biochem.* 14: 319-329.
- CHHONKAR, P.K. and SUBBA-RAO, N.S. 1967. Phosphate solubilization by fungi associated with legume root nodules. *Can. J. Microbiol.* 13: 749.
- DICK, W.A. and TABATABAI, M.A. 1977. An alkaline oxidation method for determination of total phosphorus in soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 41(3): 511-514.
- HAYMAN, D.S. 1975. Phosphorus cycling by soil-microorganisms on seed and in the root zone of plants. *Can. J. Bot.* 40: 1181-1186.
- HEDLEY, M.J. and STEWART, J.W.H. 1982. Method to measure microbial phosphate in soils. *Soil Biol. & Biochem.* 14: 377-385.
- LEON, L.A. 1980. El uso de rocas fosfóricas en suelos ácidos del trópico americano. En: Fertilidad de suelos. Diagnóstico y control. F. Silva M. (Editor). Publicación de la Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo. Cap. XIV.
- MARTIN, J.P. 1950. Use of acid, rose bengal, and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Sci.* 69: 215-232.
- MARTINEZ, A.T. and RAMIREZ, C. 1978. Microfungal biomass and number of propagules in an andosol. *Soil Biol. & Biochem.* 10: 529-531.
- MORTON, A.G. and MacMILLAN, A. 1954. The assimilation of nitrogen from ammonium salts and nitrate by fungi. *J. Exp. Botany* 5: 232-252.
- MULLER, H.M. 1960. Influence of high temperature on the accumulation of oxalic acid in *Aspergillus niger*. *Arch. Microbiol.* 36: 350-359.
- POCHON, J. et TARDIEUX, P. 1962. Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Editions de la Tourelle (Seine).
- RAMOS, A.; BAREA, J.M. y CALLAO, V. 1966. Liberación de fósforo a partir de la fosforita por bacterias que actúan sobre los fosfatos. *Ars. Pharm.* VII(5-6): 251.
- RAMOS, A.; CALLAO, V. y CARVALHO, P.C.T. 1968. La solubilización de fosfatos por hongos del suelo. *Microbiol. Españ.* 21: 1-15.
- STEWART, J.H. and OADES, J.M. 1972. The determination of organic phosphorus in soils. *J. Soil Sci.* 23(1): 38-49.
- TARDIEUX-ROCHE, A. 1966. Contribution a l'étude des interactions entre phosphates naturels et microflore du sol. *Annales Agronomiques* 17: 403-479.
- TINKER, P.B. and SANDERS, F.E. 1975. Rhizosphere microorganisms and plant nutrition. *Soil Sci.* 119(6): 363-368.
- ZUNINO, H.; BORIE, F.; AGUILERA, M.; PEIRANO, P.; CAIOZZI, M. y MARTIN, J.P. 1982. Bioquímica de suelos derivados de cenizas volcánicas. I. Ecología microbiana y su relación con algunas propiedades físico-químicas de ellos. *Agricultura Técnica (Chile)* 42(1): 55-60.