



**UNIVERSIDAD DE  
ALMERÍA**

Escuela Politécnica Superior

***DEPARTAMENTO DE  
PRODUCCIÓN VEGETAL***



**UNIVERSIDAD DE  
SEVILLA**

Escuela Técnica Superior de  
Ingenieros Agrónomos

***DEPARTAMENTO DE  
CIENCIAS AGROFORESTALES***

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**  
**ESTUDIO DE LA DISPONIBILIDAD DE FÓSFORO PARA**  
**PLANTA EN SUELOS REPRESENTATIVOS DE ÁMBITO**  
**MEDITERRÁNEO**

Alumno:  
D. RAMIRO RECENA GARRIDO

Director/es:  
Dr. D. ANTONIO DELGADO GARCÍA  
Dr. D. AGUSTÍN SÁNCHEZ PRADOS

Titulación:  
MÁSTER EN PRODUCCIÓN VEGETAL  
EN CULTIVOS PROTEGIDOS

SEVILLA, JUNIO 2013

# Estudio de la disponibilidad de fósforo para planta en suelos representativos de ámbito mediterráneo.

Ramiro Recena Garrido

Departamento de Ciencias Agroforestales de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica (ETSIA) de la Universidad de Sevilla.

**Palabras clave:** fósforo, fósforo Olsen, disponibilidad, fósforo orgánico, fosfatasas, fitasas

## RESUMEN

El estudio del fósforo (P) disponible para la planta en el suelo es importante para la producción agrícola y el medio ambiente. Ante la conciencia de que es un recurso no renovable, parece imperioso establecer criterios para su uso eficiente. El objetivo de este trabajo es estudiar las formas de fósforo en suelos representativos de ámbito Mediterráneo y su contribución, entre otros factores, a la nutrición fosfatada de la planta. Para ello, se examinaron 18 suelos; para cada uno se seleccionaron muestras con valores altos y bajos del índice de biodisponibilidad de fósforo (P-Olsen). Se estudiaron sus formas de fósforo mediante esquemas de fraccionamiento secuencial, diferenciando de fósforo inorgánico (Pi), fósforo orgánico (PO) y fracciones que pueden contribuir a la asimilación de P por parte de los cultivos. Las fracciones de PO son de mayor complejidad a la hora de su caracterización, y se realizó un ataque con fitasas para estimar el contenido en monoésteres susceptibles de hidrólisis en el suelo. También se realizó un cultivo con pepino (*Cucumis sativus* L. cv Serena) colocando en macetas el suelo equivalente a 1 mg de P Olsen para constatar su eficiencia como índice de disponibilidad de P. Este ensayo se realizó en cámara de cultivo, fertilizando con una disolución nutritiva sin P.

Los resultados obtenidos mostraron que el hidroxapatito era la fracción de P inorgánico dominante en los suelos de nuestro estudio, relacionado positivamente con el grado de enriquecimiento en P del suelo. Esto revela la importancia de la precipitación de fosfatos de calcio en la dinámica de fósforo del suelo. La suma de fracciones extraíbles con NaOH y citrato-bicarbonato (CB) se correlacionó significativamente con el índice de disponibilidad de P (P-Olsen). La proporción de P orgánico (PO) respecto al total osciló entre el 25% y 70%, relacionándose negativamente con el contenido de P total del suelo ( $R^2 = 0,43$ ,  $P < 0.001$ ). Esto revela que la fertilización con P incrementa el P inorgánico, reduciéndose la proporción de PO respecto al total a medida que el suelo se enriquece en P inorgánico. La proporción del PO hidrolizado por fitasas se incrementó linealmente con el contenido total de PO en suelo ( $R^2 = 0.48$ ,  $P < 0.001$ ).

El P extraído por el cultivo en el ensayo en maceta no fue el mismo, ni en las muestras con P Olsen alto ni en aquellas que lo tenían bajo. Esto revela que el P Olsen no actúa como un buen indicador de la disponibilidad de P para el cultivo. En las muestras con P Olsen bajo, el PO en la maceta y la actividad fosfatasa en rizosfera explicó el 37 % de la variación en el P extraído por las plantas ( $P < 0,037$ ); el P orgánico extraíble por CB hidrolizable por fitasa presente en la maceta explicó el 36 % ( $P < 0,01$ ) de la variación en el P extraído. Esto hace pensar que en muestras con niveles de P disponible bajos, el P orgánico y la actividad hidrolítica en rizosfera juega un papel fundamental en el suministro de P a la planta.

## INTRODUCCIÓN

El P como recurso no renovable y el aumento de la demanda de alimento así como el de la población, nos enfrenta a un futuro donde la producción agrícola debe contemplar la mejora en la aplicación de nutrientes esenciales a los cultivos, ya que las reservas de roca fosfórica se creen que se agotarán en 50-150 años. El punto crítico se cree que se alcanzará con el máximo pico de producción, previsto sobre el 2035, dónde la demanda superará a la oferta (Cordell *et al.*, 2009; Schröder *et al.*, 2011). Las prácticas de aplicación de fertilizantes de P generalmente ignoran el fenómeno de la acumulación en suelos (Ryan *et al.*, 2012).

En este escenario, lo importante es conocer la capacidad de liberación de P del suelo, hasta que se vuelve deficiente en P disponible para la planta, normalmente evaluado mediante “índices de disponibilidad de fósforo”. Sin embargo, la eficacia de los diferentes métodos como índices de disponibilidad en un amplio rango de suelos, puede ser limitado (Delgado y Torrent, 1996).

El fósforo es absorbido por las plantas como iones ortofosfato, los cuales están presentes en la solución del suelo. La fuente principal de fósforo inorgánico se origina durante la desintegración y descomposición de las rocas que contienen el mineral apatita, formando fluorapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ ), cloroapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$ ), e hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ ). También, el fósforo se encuentra combinado con hierro y aluminio, formando fosfatos de hierro y aluminio  $\text{PO}_4\text{Al}_2\text{H}_2\text{O}$  (variscita),  $\text{PO}_4\text{Fe}_2\text{H}_2\text{O}$  (estrengita). El contenido de fósforo total en el suelo es alto en comparación con la acumulación en la planta, limitando el crecimiento del cultivo la baja disponibilidad de este elemento (Turner *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2012). Las reacciones de fijación del P en el suelo son las responsables de la pérdida de disponibilidad del fertilizante fosfórico aplicado, reacciones químicas como la adsorción física, quimisorción, intercambio aniónico, precipitación superficial y precipitación de fase sólida, procesos complejos, difíciles de distinguir e identificar. La capacidad de adsorción depende de la superficie específica, la cual es mayor a menor cristalinidad de los óxidos de hierro; los minerales de la arcilla, de menor capacidad adsorbente que los óxidos de hierro, pueden adsorber P mediante cambio de ligando; los carbonatos constituyen un elemento secundario en la adsorción de P. La adsorción en la superficie de la calcita se produce por sustitución de moléculas de agua, o de iones  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{OH}^-$  (Hamand *et al.*, 1992; Afif, 2005), la materia orgánica sólo adsorbe P cuando está asociada a cationes metálicos, compitiendo por los lugares de adsorción cuando no está asociada a ellos (Ryden *et al.*, 1987). La precipitación del fosfato resulta en la práctica difícil de diferenciar de la adsorción. Cuando se producen concentraciones altas en disolución en suelo, la precipitación es un mecanismo que puede tener lugar, mientras que a concentraciones bajas tiene lugar la adsorción (Afif, 2005). En suelos mediterráneos, los principales adsorbentes de P son los óxidos de hierro, arcilla y  $\text{CaCO}_3$ , aunque la predicción de adsorción de P en suelos calcáreos ha tenido menos éxito que en otro tipo de suelos de esta zona (Peña y Torrent, 1990).

En el ciclo global de P, la parte menos conocida es aquella relacionada con el P orgánico (PO) (Delgado y Scalenghe, 2008), englobando las diversas formas orgánicas de P tales como: ácidos nucleicos, fosfolípidos, inositol fosfato, fosfoamidas, fosfoproteínas, pesticidas organofosfatados, ácidos húmicos asociados a compuestos fosforados, fosfatos orgánicos condensados, coloides y formas asociadas (Turner *et al.*, 2003). La forma predominante del fósforo orgánico es el fitato (Turner *et al.*, 2002; George *et al.*, 2004), el cual se acumula en los suelos debido a sus interacciones con los componentes del suelo por mecanismos de adsorción o precipitación (sorción)

(Anderson y Malcom, 1974; George *et al.*, 2004). Las fitasas son una clase especial de fosfatasa, enzimas que catalizan la hidrólisis secuencial del fitato (Kim *et al.*, 1998). Poco se conoce de cómo el PO se puede hidrolizar y utilizar en la rizosfera (George *et al.*, 2006).

Las aproximaciones prácticas al estudio de las formas de P en suelo requieren la separación e identificación de diferentes formas de P en suelo y sedimentos. Una de las aproximaciones más comunes son los esquemas de fraccionamientos secuenciales con una serie de reactivos diseñados para disolver selectivamente varias formas de P, basados principalmente en la naturaleza y fuerza de las interacciones entre las fracciones de P y otros componentes minerales y orgánicos. Existen esquemas específicos de P inorgánico, PO, combinaciones de PO e inorgánico y combinaciones de inorgánico, orgánico y P microbiano. La utilización de estos esquemas de fraccionamiento no permite la identificación de formas específicas de P en el suelo, pero permite una distinción “operativa” de fracciones de P con distinto potencial de liberar el P a la disolución del suelo, aspecto crítico que define la disponibilidad para las plantas en el suelo o el potencial de ser liberado a las aguas a partir de partículas de suelo erosionadas.

Es por ello que el objetivo principal de este trabajo es examinar la naturaleza de las formas de fósforo en suelos mediterráneos representativos usando esquemas de fraccionamiento secuencial y establecer cómo afectan la capacidad de absorción de P por parte del cultivo y a la validez del índice habitual de disponibilidad de P (P Olsen).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Toma y procesamiento de muestras**

Para este estudio se seleccionaron 18 suelos de ámbito mediterráneo de la cuenca del Guadalquivir. Para cada suelo se tomaron muestras con distintos niveles de disponibilidad de P, seleccionándose en sus niveles más alto (tratamiento H) y el más bajo (tratamiento L) de P (medido como P Olsen). Las distintas muestras de suelo fueron secadas al aire a temperatura ambiente, molidas y posteriormente homogeneizadas. Se hicieron pasar por un tamiz de 6 mm de luz inicialmente (siendo esta granulometría la utilizada para los ensayos de cultivo en cámara), y posteriormente por una luz de 2 mm para los análisis de laboratorio. El factor de humedad higroscópica se calculó por pérdida de peso (método gravimétrico) después de mantener una muestra de 30 gramos de cada uno de los suelos en la estufa a 105°C durante 24 horas.

### **Experimento de extracción de P por las plantas**

El experimento se llevó a cabo en cámara de cultivo. Para el ensayo se utilizaron plantas de pepino del cultivar Serena (pepino corto tipo español) (*Cucumis sativus*, var. Serena) obtención de Nunhems (híbrido, F1). Se germinaron en bandejas con alvéolos y turba como sustrato, con una única planta por alveolo. Tras 16 días en el semillero, fueron trasplantadas previa limpieza de las raíces, a las macetas diseñadas para este experimento. Las condiciones controladas de la cámara de cultivo fueron: 14 horas de luz y 10 de oscuridad, con una humedad relativa del 45% (periodo de luz) y del 60% (periodo oscuro), con una radiación fotosintética activa de 22 W/m<sup>2</sup>. Se utilizó un diseño experimental en bloques completos al azar, con 2 tratamientos y dos repeticiones por suelo. Cada repetición consistió en una maceta con una cantidad de medio de cultivo de 300 g; este medio fue suma de la cantidad de suelo (tamizado por tamiz de 6

mm) necesaria para la aplicación de 1 mg de P Olsen y el resto de arena silíceo ( $0.4 \leq \phi(\text{mm}) \leq 0.8$ ). El riego se hizo con solución nutritiva tipo Hoagland sin fósforo a pH 6 - 6,5 , intercalando cada tres riegos uno con 20 ml de agua desionizada.

El levantamiento del cultivo se realizó a los 50 días. La planta recolectada se secó en estufa de ventilación forzada a 60°C hasta peso constante. Se obtuvo el peso seco de parte aérea y de la parte radicular por separado. Luego, molida en molinillo para la posterior mineralización de la materia orgánica mediante calcinación en horno mufla. Para ello se pesó 0.25 g de muestra, en crisol de porcelana previamente tarado y se llevó a un horno mufla a 550°C durante 8 horas. La ceniza, se disolvió con 10 ml 1N HCl y se llevó a ebullición durante 15 minutos. Cumplido este tiempo se retiró de la placa caliente, y para ajustar de nuevo la concentración en 1N HCl, se volvió a llevar hasta un volumen de 10ml con agua desionizada. Se analizaron alícuotas de 0.1ml de los extractos obtenidos, determinando la concentración de fósforo molibdato reactivo (MRP) según el método de Murphy y Riley (1962) a 882 nm (Standard Methods, 1985). Para determinar el P acumulado exclusivamente por las plantas, se determinó de igual manera el P inicial en las semillas y se sustrajo del acumulado en parte aérea + raíces. Para la verificación del método de análisis del tejido vegetal, se determinó el P de un material vegetal certificado en cada tanda de mineralización (hojas de melocotón molidas, Sugelabor S.A.), constatándose que la recuperación de P en esta muestra siempre fuese del 90-110%.

Se analizó la actividad fosfatasa alcalina en el suelo rizosférico de cada maceta ensayada 4 días después del levantamiento por el método de Tabatabai, (1994), ligeramente modificado. Se colocó 1 g de suelo rizosférico en tubos falcón y se les agregaron 4 ml de solución tampón llevada a pH 9.5 con HCl y 1 ml de solución de *p*-nitrofenilfosfato 0.05 M, mezclándose el contenido durante unos segundos. Luego se incubaron los tubos falcon tapados durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente, se agregaron 4 mL de 0.5 M NaOH y 1 mL de 0.5 M CaCl<sub>2</sub> para detener la reacción. Finalmente, la suspensión de suelo se filtró con papel Whatman n°2 de 90 mm de diámetro y se midió la concentración de *p*-nitrofenilfosfato en espectrofotómetro a 410nm, utilizando como blanco 5 mL de agua, 1 mL de 0,5 M de CaCl<sub>2</sub> y 4 mL de 0,5 M NaOH. Se realizaron 3 réplicas y un control para cada suelo.

### **Extracción secuencial**

La extracción secuencial utilizada fue la descrita por Ruiz *et al.*,(1997), el cual integra 8 etapas, según describen Saavedra *et al.* (2007)(Tabla 1). Para ello, se pesó 1g de suelo en tubos falcon de polietileno de 50 ml, añadiendo 40 ml del extractante, a 25°C (Ruiz *et al.*,1997). Se agitaron los tubos en agitador de vaivén a 3 Hz durante el tiempo establecido en cada etapa y después se centrifugaron a 1000 g durante 15 min, determinando la concentración de fósforo inorgánico (Pi) como el molibdato reactivo (MRP) en el sobrenadante según Murphy y Riley (1962) a 882 nm (Standard Methods, 1985). Las extracciones se realizaron por triplicado. Para comprobar la reproducibilidad del método se realizaron cada una de las repeticiones por separado, dos en un primer bloque y la tercera en el siguiente.

En las etapas (II), (IIIa), (IIIb), (IV) y (V) se utilizó reactivo mixto enriquecido con molibdato amónico (Tabla 3), ya que la presencia de complejantes (citrato) interferiría en la determinación de P por colorimetría en dichas muestras. Para evitar interferencias por el ditionito, en la etapa (V) se oxidó el extracto borboteando aire durante 6 horas. Para la determinación del fósforo total (PT) de todos los extractos, se oxidó en autoclave a 121°C durante 1 hora con persulfato de potasio, midiendo luego

la concentración de ortofosfato por el método Murphy y Riley, (1962) a 882 nm (Standard Methods, 1985). También se modificó la concentración de molibdato amónico en extractos con citrato para evitar interferencias en la determinación colorimétrica del P (Tabla 3). En las nueve primeras etapas de la extracción secuencial se comprobó la susceptibilidad a la hidrólisis por fitasa (*Aspergillus*) no comercial, la cual hidroliza el myo-inositol hexakisfosfato (InsP6), además algunas otras formas monoéster o diéster de fósforo orgánico (Hayes *et al.*, 2000; George *et al.*, 2006). Se llevó a cabo mediante el método descrito por George *et al.*, (2006) modificado. Para las distintas extracciones se midió el pH (utilizamos alícuotas de 0.1 ml), neutralizando las alcalinas con 0.5 M HCl, y las ácidas añadiendo 1M NaOH. Posteriormente se añadió la disolución tampón (0.4 M C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>, 10 mM EDTA sal disódica, concentración final a pH 5) y la disolución con fitasa con una actividad final de 10 nKat ml<sup>-1</sup>. La mezcla resultante se incubó a 37°C durante 6 horas. Tras la incubación desnaturalizamos la enzima con un volumen igual de ácido tricloracético al 15%, analizando la concentración de fósforo molibdato reactivo (MRP) del sobrenadante, según Murphy y Riley,(1962) a 882 nm (Standard Methods, 1985), llevándolo a un volumen final de 3.125ml. La actividad específica de la fitasa se realizó según el método de Kim *et al.* (1998).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Fracciones de P inorgánico en el suelo

El P inorgánico (Pi) respecto al P total en las muestras con valores altos de P-Olsen es mayor (60%) que en aquellos con índices bajos de P-Olsen (40%). La fracción dominante de Pi en los suelos ensayados es la extraída por citrato (C1+C2), que básicamente debe corresponder con hidroxapatito pedogénico, y que representa el 28% del Pi total. Saavedra y Delgado (2005) también encontraron que esta fracción era la dominante en 17 suelos representativos de ámbito mediterráneo representando el 30% de la suma de fracciones de Pi. Igualmente en suelos calcáreos estudiados por Domínguez *et al.* (2001) en suelos de Valle del Guadalquivir, el hidroxapatito es la fracción dominante, lo que es consistente con el resultado de estudios previos realizados por Ruíz *et al.* (1997). En algunos suelos calcáreos del sur de España, estudios mediante resonancia magnética nuclear (<sup>31</sup>P RMN) también nos proporcionan evidencias directas del hidroxapatito como fracción dominante (Delgado *et al.*, 2000; Delgado *et al.*, 2002). La relevancia de la fracción de Pi extraíble con citrato refleja la trascendencia que tiene la precipitación de fosfatos de calcio en estos suelos. La fracción está relacionada con el grado de enriquecimiento de P (dosis acumuladas de P) en los suelos ya que se observó una relación significativa y positiva entre la relación C1+C2/P total y el P total ( $R^2 = 0.28$ ,  $P < 0.001$ ) (Figura 1a). Esto indica que una parte considerable del P aplicado como fertilizante precipita como fosfato de calcio de baja solubilidad, lo que limita la recuperación de P por las plantas del P aplicado con la fertilización (Castro y Torrent, 1998; Domínguez *et al.*, 2001). Las fracciones de Pi extraíbles por CA y CBD, que corresponden con P ocluido en óxidos, no se relaciona con el P total ni con la suma de fracciones de Pi, lo que indica que la importancia relativa de estas fracciones inorgánicas de P están más determinadas por la geoquímica de cada suelo que por las dosis de P aplicadas (Domínguez *et al.*, 2001; Saavedra *et al.*, 2005).

El Pi correspondiente a la fracción CA es el segundo que se encuentra en mayor proporción (16%) (Tabla 2) con respecto al Pi total, perteneciente a P ocluido en óxidos de hierro de baja cristalinidad (Reyes and Torrent, 1997; Domínguez *et al.*, 2001). Al

formarse estos óxidos, los iones fosfato pueden quedar ocluidos, proceso que se da en escalas temporales reducidas, ya que su formación se puede asociar a procesos de oxidación-reducción (saturación de agua-aireación), los cuales determinan cambios en las formas de hierro y en la disponibilidad de P para las plantas. Durante el período de reducción del suelo, aumenta la solubilidad de los fosfatos de hierro, mientras que durante la oxidación disminuye la disponibilidad de P por retención en óxidos de hierro (Patrick and Khalid, 1974; Holford and Patrick, 1981; Willet, 1989; Vadas and Sims, 1998; Phillips, 1998.; Hutchison and Hesterberg, 2009). Al igual que los datos obtenidos por Saavedra *et al.* (2005), la relación P/Fe es mayor en los extractos CA (32%) que en los CBD (2%); la relación en CA es mayor en muestras con P Olsen alto que en las muestras con Olsen bajo (Tabla 2), mientras que en los extractos CBD no hay diferencias entre muestras con Olsen alto y bajo. La influencia de la fertilización parece que se pone de manifiesto en el P ocluido en óxidos de baja cristalinidad, como evidencia la relación entre la proporción del P total en el extracto CA y el P total en el suelo (Figura 1b). Por el contrario, la oclusión en óxidos cristalinos puede estar asociada a un proceso edafogénico a muy largo plazo donde la fertilización tiene menos influencia.

La fracción CB corresponde al P adsorbido, P liberado por la extracción anterior que precipita o es reabsorbido o P asociado a los fosfatos de calcio, especialmente más en los suelos calcáreos (Delgado *et al.*, 2000.; Delgado *et al.*, 2002). En estos suelos, se puede suponer una precipitación sustancial de los fosfatos de calcio, y las fases más solubles que el hidroxiapatito pueden ser liberadas por este extractante (Saavedra y Delgado, 2005). En los suelos de nuestro estudio, esta fracción se relaciona de manera significativa con el P-Olsen ( $R^2 = 0,55$ ,  $P < 0.001$ ) (Figura 2). Además el Pi extraíble con CB en los suelos con índices altos de P-Olsen representa una fracción mayor del Pi (10%) que en los suelos con índices bajos de P-Olsen (4%). Todo ello nos da a entender que es una fracción que puede incluir parte del P biodisponible para el cultivo, como suponen Domínguez *et al.* (2001).

La fracción NaOH inicial muestra valores muy similares para las muestras de los suelos de los dos niveles de P-Olsen (2% del Pi). A esta fracción se asignan los fosfatos de hierro y aluminio más insolubles y los más fuertemente adsorbidos a óxidos e hidróxidos de hierro y aluminio. En suelos de ámbito mediterráneo, con escasa relevancia de los contenidos en fosfatos de hierro y aluminio, se entiende que en gran medida puede ser fácilmente liberable (Saavedra *et al.*, 2005).

La suma del Pi extraíble por NaOH y citrato-bicarbonato (CB), representa el 14% en las muestras de suelo altas en valores de P-Olsen. En las muestras con bajo contenido en P-Olsen sólo representa el 8%. Esto indica que la proporción más alta de Pi asociado a las formas más lábiles (fácilmente liberables) se observa en las muestras de suelo altas en P-Olsen. El P-Olsen en los suelos estudiados se relacionó con la suma de estas dos fracciones ( $R^2 = 0.72$ ,  $P < 0.001$ ) (Figura 3) en consonancia con estudios previos relacionados en suelos representativos de ámbito Mediterráneo (Delgado y Saavedra, 2005;  $R^2 = 0.75$ ,  $P < 0.001$ ). La suma de fracciones NaOH+CB, se considera que abarca complejos Fe-P, Al-P, hidrolizados por NaOH (Pierzynski *et al.*, 1990; Barberis, 1996), fosfato absorbido por superficies hidroxiladas y liberado por intercambio de ligandos con los iones  $\text{OH}^-$  e iones citrato, fosfato adsorbido en  $\text{CaCO}_3$ , que se desorbe por citrato, y fosfatos cálcicos disueltos por la acción complejante de Ca del citrato, y el efecto de precipitación del Ca por parte del bicarbonato, aproximándose al potencial de liberación de P en los suelos (Barberis, 1996) y relacionándose con el P-Olsen de manera significativa (Shaheen, 2007).

El HCl extraería esencialmente fluorapatito, que es litogénico, por lo que no está afectado por el grado de enriquecimiento en P del suelo, siendo los valores en las muestras con valores altos y bajos de P-Olsen muy similares (3% del Pi). El P extraíble con HCl consistiría en la forma más estable de Pi debido a la baja solubilidad que presentan los apatitos asociados a minerales primarios (Schoenau *et al.*, 1989).

### **Fósforo orgánico en el suelo**

El P orgánico (PO) total, que generalmente engloba del 30 al 65% del fósforo total en suelos de otros ámbitos geográficos (Harrison, 1987), representó en los suelos estudiados entre el 25 y el 70% del P total. Este porcentaje fue mayor en las muestras de suelo con P-Olsen bajo (54%) que en aquellas con Olsen alto (47%), y decreció al incrementarse el P total en los suelos ( $R^2 = 0.43$ ,  $P < 0.001$ ) (Figura 4). En general, gran parte del PO en suelos de ámbito mediterráneo está asociado a formas muy estables (Saavedra y Delgado, 2005), por lo que la disminución de la relación PO/P total puede deberse a un enriquecimiento en Pi con la fertilización (Ahlgren *et al.* 2013). Por otra parte, la fertilización puede contribuir a reducir el PO por un aumento en las tasas de mineralización de la fracción orgánica (Zhang y MacKenzie, 1997; Kuo *et al.*, 2005; Romanyà y Rovira, 2007). En periodos largos de fertilización, una proporción apreciable del P aplicado se acumula en el suelo como residuos vegetales que se incorporan al suelo o restos de la biomasa microbiana del suelo que es susceptible a la mineralización (Hayes, 2000). La proporción del PO hidrolizado por fitasas se incrementa con el contenido total de PO en suelo ( $R^2 = 0.48$ ,  $P < 0.001$ ) (Figura 5). Como el porcentaje de PO con respecto a fósforo total disminuye al incrementarse el fósforo total, también disminuye la proporción de PO hidrolizable por fitasa, lo que está en consonancia con los resultados de Ahlgren, *et al.*(2013) que observaron que, cuanto más se fertiliza un suelo, menos asociado a monoésteres está el P del suelo.

En los suelos estudiados, el P hidrolizable por fitasas, que en gran medida debe corresponder con fitatos, representa por lo general menos del 20 % del PO del suelo. Estos datos están en consonancia con datos recopilados por Turner (2006), aunque contrastan con la idea generalizada de que los fitatos deben ser una forma dominante de PO. Estudios recientes han revelado que los monoésteres fosfato (incluyendo fitatos) puede representar el 20 % del P total en suelos fuertemente fertilizados, con relaciones monoésteres P:Pi entre 0.2 y 0.4, que no se alejan mucho de nuestros resultados, sobre todo en las muestras con niveles bajos de P (Ahlgren *et al.* 2013). Por otra parte, puede que en gran parte de la bibliografía se haya sobreestimado la relevancia de los monoésteres, en particular del fitato, como componente del PO del suelo. En la determinación del In6P a través de  $^{31}\text{P}$  RMN, existe una posible sobreestimación, dependiendo de la utilización y discriminación de los espectros debidos a los ácidos húmicos. Las señales que se creen sobreestimadas aluden a un 50% de In6P con respecto al fósforo orgánico total, siendo la identificación de fitato con respecto al T-OP del 20% en el método que incluye la discriminación de los ácidos húmicos según Doolette (2011), coincidiendo con los porcentajes de las muestras de valores más altos en los suelos ensayados. En nuestro estudio, la cantidad total de fitato hidrolizable por fitasa en el esquema de fraccionamiento no muestra dependencia del tipo de suelo o de la disponibilidad de P (valores de P Olsen), dependiendo, probablemente, de las características físico-químicas del suelo (pH, Ca, etc).

## Absorción de P por el cultivo

El método Olsen es ampliamente utilizado en suelos representativos de áreas mediterráneas como índice de disponibilidad de P. El rango de P Olsen en las muestras altas en P fue de 9-49 (media = 24) mg kg<sup>-1</sup>, y las muestras bajas en P oscilaron entre 4 y 16 (media= 9) mg kg<sup>-1</sup>. En el ensayo con plantas se colocó en maceta la cantidad de suelo equivalente a 1 mg de P Olsen. Sin embargo, las cantidades de P absorbidas por las plantas no fueron las mismas. Así, el contenido de P en la planta de las muestras con P Olsen alto osciló desde 0,07 a 2,3 (media = 0,67) mg maceta<sup>-1</sup> y en las muestras con P Olsen bajo desde 0,03 a 1,2 (media = 0,5) mg maceta<sup>-1</sup>. Por tanto, el índice de disponibilidad (P-Olsen) no explica las diferencias entre suelos, ya que entonces las extracciones por las plantas deberían haber sido las mismas.

En las muestras con índices de P-Olsen bajos, el contenido total en fósforo en la planta se correlacionó con el P hidrolizable por fitasa en los extractos de CB ( $R^2 = 0.36$ ,  $P < 0.05$ ) (Figura 6). Esta relación se explica por la capacidad de los cultivos para obtener P de diferentes fracciones orgánicas e inorgánicas en condiciones de deficiencia de este elemento. Otani y Ae (1999), demostraron que el P hidrolizable por fitasas no específicas era extraído por ácido cítrico (Hayes *et al.*, 2000; Ahlgren *et al.*, 2013). El citrato exudado por la raíz de la planta en condiciones de deficiencia de P contribuye a movilizar PO del suelo, siendo mayor la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática de estos compuestos cuando se han desorbido de superficies adsorbentes o se han disuelto sus precipitados por complejación de los metales por el citrato (Helmke *et al.*, 2000). La acción del extractante CB simula en cierta medida este efecto de las raíces, liberando In6P adsorbido o precipitado y haciéndolo que sea más susceptible a la hidrólisis enzimática. Es la primera etapa en la que el citrato actuaría, siendo éste efectivo extrayendo fitato y cantidades apreciables de fósforo orgánico hidrolizable del suelo por encima de lo que lo pueden hacer extractantes básicos (Hayes *et al.*, 2000; Saavedra *et al.*, 2007).

En estas mismas muestras con P-Olsen bajo, el contenido total de P en las plantas se relacionó positivamente con el fósforo orgánico en la maceta y con la actividad fosfatasa en la rizosfera ( $R^2 = 0.37$ ,  $P < 0,037$ ) (Figura 7). Esto pone de manifiesto que la cantidad de P orgánico presente y la capacidad de hidrolizar P orgánico en rizosfera pueden ser factores determinantes contribuyendo al suministro de P a las plantas en suelos pobres en dicho nutriente. Está constatado que la mineralización del PO ocurre en la rizosfera y puede contribuir de manera significativa a los requerimientos de ortofosfato por parte de los cultivos (George and Richardson, 2008). Esta contribución del P orgánico al suministro de P de las plantas en muestras pobres en P condiciona la validez del P-Olsen como índice de disponibilidad en dichos suelos.

En los suelos con índices bajos de P-Olsen, la absorción de P por parte del cultivo se correlaciona con la cantidad de Pi de la suma de fracciones NaOH+CB ( $R^2 = 0.69$ ,  $P < 0.001$ ) (Figura 8). Esto pone de manifiesto que formas de P que quizás no sean fácilmente movilizables, pero que son más solubles que el hidroxapatito, pueden contribuir también al suministro de P en suelos pobres en este nutriente.

Se encontró correlación significativa entre el P asimilado por los cultivos y el contenido de Fe asociado a óxidos de hierro en las muestras con P-Olsen altos ( $R^2 = 0.56$ ,  $P < 0.001$ ) (Figura 9). Estos resultados muestran que propiedades relacionadas con el contenido en óxidos de hierro pueden afectar a la precisión del P-Olsen como índice de biodisponibilidad en muestras con niveles altos de dicho índice. Entre estas propiedades se pueden considerar el poder tampón para el P, la afinidad por el P, o el

grado de saturación para un mismo grado de enriquecimiento en P. Estas propiedades afectan el equilibrio entre el P inorgánico en disolución y el P inorgánico en la fase sólida y, como pusieron de manifiesto Delgado *et al* (2010), pueden afectar la precisión del P-Olsen como índice de disponibilidad (Delgado *et al.*, 2010).

## CONCLUSIONES

La fracción dominante de  $P_i$  es el hidroxiapatito litogénico (C1+C2), lo que revela la trascendencia de la precipitación de los fosfatos de Ca, en nuestros suelos, como limitante a la hora de la recuperación del fertilizante fosfatado por parte de los cultivos. El porcentaje de P total correspondiente a PO osciló entre el 25 y el 70% y fue mayor en las muestras con Olsen bajo que en aquellas con Olsen alto. Al aumentar el contenido en P orgánico, aumenta el PO susceptible a hidrólisis por fitasa.

El P orgánico (total o el hidrolizable por fitasa en la fracción CB) y la actividad fosfatasa en la rizosfera contribuían a explicar la absorción de P por las plantas cultivadas en muestras con niveles bajos de P Olsen, justificando que este método falle como índice de disponibilidad en esos suelos. Por el contrario, en muestras con niveles altos de P Olsen parece que son las propiedades que afectan al equilibrio de P inorgánico entre la disolución y la fase sólida las que contribuyen a explicar las limitaciones del P Olsen como índice de disponibilidad de P.

## TABLAS

**Tabla 1** Secuencia del fraccionamiento de P según Ruiz *et al.*(1997) modificado según Saavedra *et al.*(2007).

(I)	0,1 M NaOH + 1M NaCL	NaOH	16 horas	Fosfatos de Fe y Al P adsorbido
(II)	0,27 M Na Citrato+ 0,11 M NaHCO <sub>3</sub>	CB	16 horas	P reabsorbido tras la extracción anterior. Fosfato de Ca relativamente solubles, generalmente más solubles que el hidroxiapatito
(IIIa)	0,25 M Na Citrato a pH 6	C1	16 horas	Fosfatos de calcio pedogénicos no disueltos con CB, en gran medida hidroxiapatito
(IIIb)	0,2 M Na Citrato a pH 6-7	C2	8 horas	
(IV)	0,2 M Na Citrato a pH 6 + 0,05 M Ac. Ascórbico	CA	16 horas	P ocluido en óxidos de Fe de baja cristalinidad
(V)	0,27 M Na Citrato + 0,11 M NaHCO <sub>3</sub> + 0,12 M Na Ditionito	CBD	16 horas	P ocluido en óxidos de Fe cristalino
(VI)	Tampón 1 M NaOAc a pH 4	OAc	6 horas	Fosfatos de Ca pedogénicos residuales no disueltos por citrato
(VII)	1 M HCl	HCl	1 hora	Apatito litogénico
(VIII)	2 M NaOH 90°C	NaOH caliente	2 horas	P orgánico
(IX)	0,5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 4g K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + pers	1 hora	P orgánico
Tras la extracción con citrato (C1 + C2) se realizó un lavado con 20 ml de 0,5 M MgCl <sub>2</sub> durante 1 hora				

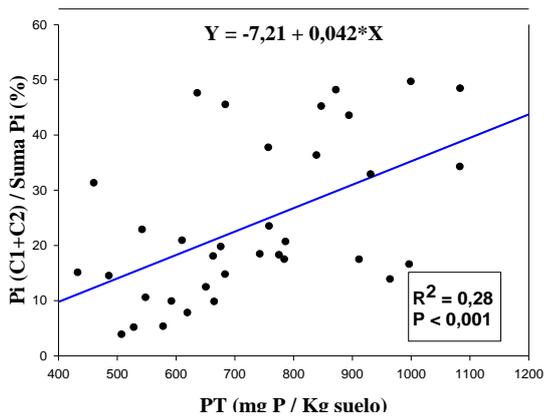
**Tabla 2** Fracciones de fósforo inorgánico (MRP) según el método Ruiz *et al.*(1997) modificado para índices altos y bajos de P-Olsen (Trat. H y L).

Suelo	MRP (mg P / kg suelo)									
	NaOH	CB	C1	C2	CA	CBD	OAc	HCl	NaOH caliente	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + pers
<b>Trat.(H)</b>	357,52	1747,2	1742,57	1109,76	1923,75	1013,75	955,13	545,54	413,68	453,81
<b>% Pi</b>	2,09	10,24	10,21	6,50	11,27	5,94	5,60	3,20	2,42	2,66
<b>Trat.(L)</b>	381,09	740,71	984,25	847,37	1005,01	844,8	668,47	447,9	405,15	479,87
<b>% Pi</b>	2,23	4,34	5,77	4,96	5,89	4,95	3,92	2,62	2,37	2,81

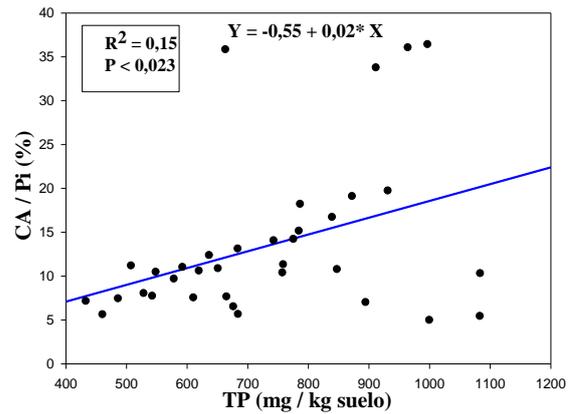
**Tabla 3** Modificaciones al método de Murphy y Riley, (1962) para la determinación del fósforo total (PT) y MRP en los extractos obtenidos por Ruiz *et al.*(1997) modificado.

Suplemento de molibdato amónico (g) por cada 100ml de Reactivo Mixto										
	NaOH	CB	C1	C2	CA	CBD	OAc	HCl	NaOH caliente	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + pers
<b>MRP</b>	0	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	0	0	0	0
<b>PT</b>	0	0,75	1,25	1,25	0,75	0,75	0	0	0	0

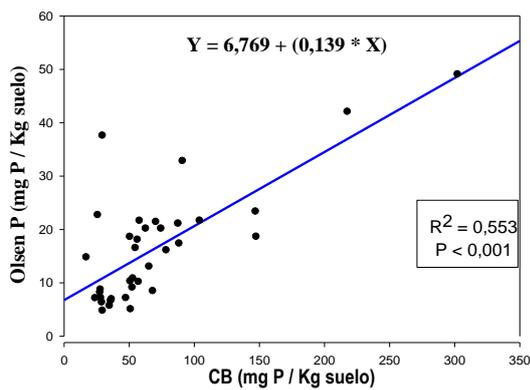
## FIGURAS



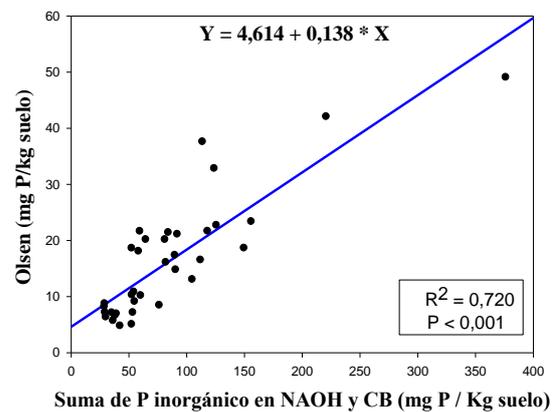
**Figura 1a.** Relación entre la proporción en porcentaje del P inorgánico extraíble en las dos extracciones con citrato respecto al P inorgánico total y el P total en el suelo



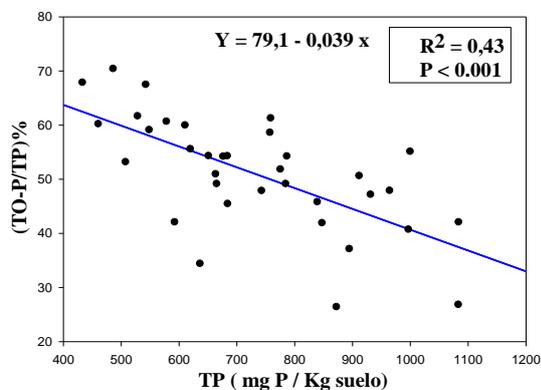
**Figura 1b.** Relación entre la proporción en porcentaje del P inorgánico extraíble en la fracción CA respecto al P inorgánico total y el P total en el suelo



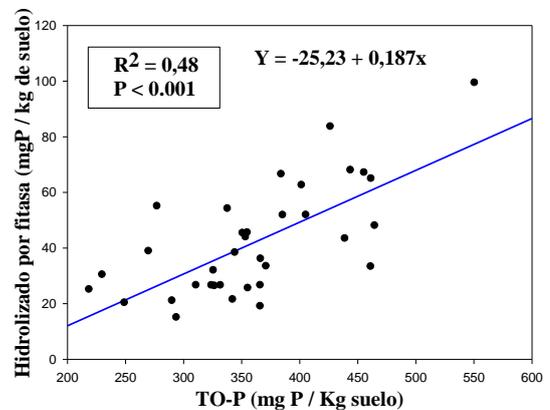
**Figura 2.** Relación entre el P-Olsen como índice de P biodisponible y el P inorgánico de la fracción CB (citrato-bicarbonato).



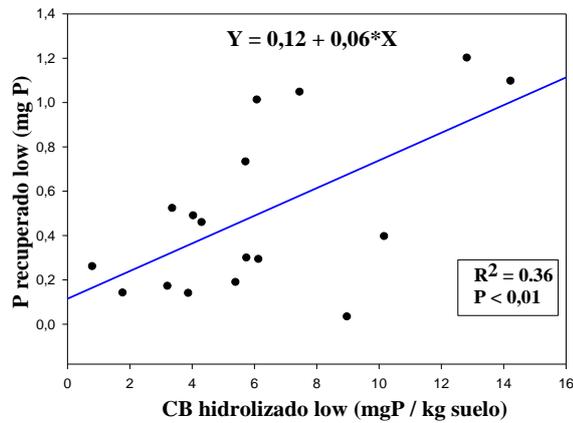
**Figura 3.** Relación entre el P-Olsen como índice de P biodisponible y la suma de P inorgánico en las fracciones NaOH y CB



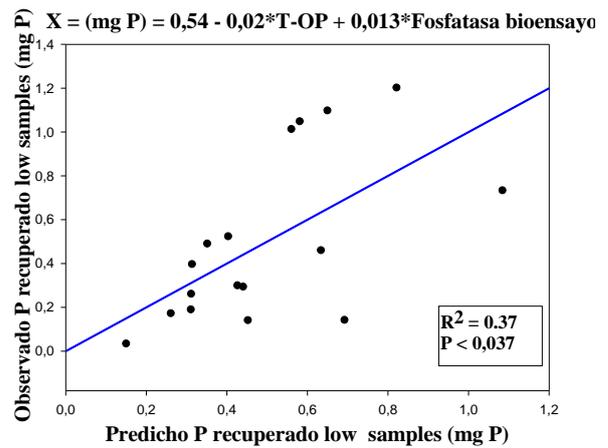
**Figura 4.** Valores de contenido total de P orgánico, su porcentaje con respecto al P total, en función del P total (mg P / kg suelo).



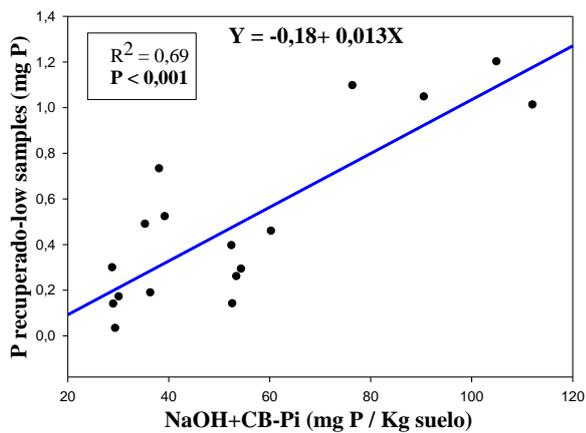
**Figura 5.** Relación entre P orgánico hidrolizado por fitasa (mg P / Kg suelo), en función del P orgánico total (T-OP) (mg P / kg suelo)



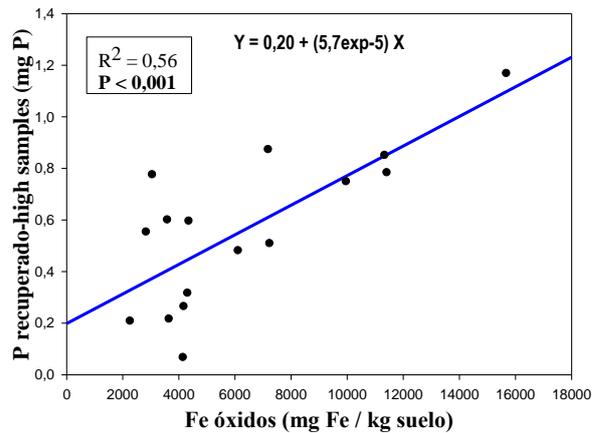
**Figura 6.** Contenido total de P en cultivo, perteneciente a los suelos con índices bajos en P-Olsen, o (mg P), en función del P hidrolizado por fitasa en la fracción CB ( mg P / Kg suelo)



**Figura 7.** Contenido total de P en cultivo, perteneciente a los suelos con índices bajos en P-Olsen, observados (mg P), enfrentados a los esperados (mg P), según la recta que depende de la actividad fosfatasa para estos suelos (mg p-nitrofenol  $g^{-1}_{suelo} h^{-1}$ ) y P orgánico (mg P)



**Figura 8.** Valores de contenido total de P en el cultivo (mg P) para los suelos bajos en P-Olsen, en función de la suma de fracciones NaOH + CB (mg P / kg suelo)



**Figura 9.** Valores de contenido total de P en el cultivo (mg P) para los suelos altos en P-Olsen, en función del contenido en óxidos de Fe (mg Fe / kg suelo), suma de fracciones CA + CBD

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahlgren, J., Djodjic, F., Börjesson, G., Mattsson, L., (2013). Identification and quantification of organic phosphorus forms in soils from fertility experiments. *Soil Use Manage.* 29, 24-35.
- Afif Khouri, E., (2005). *Dinámica Del Fósforo En Suelos Cálcicos De Áreas Experimentales.* Universidad de Oviedo, Servicio de Publicaciones, Oviedo : (esp).
- Barberis, E., Marsan, F. A., Scalenghe, R., Lammers, A., Schwertmann, U., Edwards, A. C., Maguire, R., Wilson, M.J., Delgado, A., Torrent, J., (1995). European soils overfertilized with phosphorus: Part 1. Basic properties. *Fertilizer research.* 45(3), 199-207.
- Delgado, A., Torrent, J., (1997). Phosphate-rich soils in the European Union: estimating total plant-available phosphorus. *European journal of agronomy.* 6(3), 205-214.
- Delgado, A. y Saavedra, C., (2006). Sequential fractionation as an operational tool to study P forms and P release potential in soils and sediments. *The 18th World Congress of Soil Science (July 9-15)*
- Delgado, A., Scalenghe, R., (2008). Aspects of phosphorus transfer from soils in Europe. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science.* 171(4), 552-575.
- Domínguez, R., Campillo, C. D., Peña, F., Delgado, A., (2001). Effect of soil properties and reclamation practices on phosphorus dynamics in reclaimed calcareous marsh soils from the Guadalquivir Valley, SW Spain. *Arid Land Research and Management.* 15(3), 203-221.
- Doolette, A. L., Smernik, R. J., Dougherty, W. J., (2010). Rapid decomposition of phytate applied to a calcareous soil demonstrated by a solution <sup>31</sup>P NMR study. *European Journal of Soil Science.* 61(4), 563-575.
- George, T. S., Richardson, A. E., Simpson, R. J. (2004). Behaviour of plant-derived extracellular phytase upon addition to soil. *Soil Biology and Biochemistry,* 37(5), 977-988.
- George, T. S., Turner, B. L., Gregory, P. J., Cade-Menun, B. J., Richardson, A. E., (2006). Depletion of organic phosphorus from Oxisols in relation to phosphatase activities in the rhizosphere. *European Journal of Soil Science.* 57(1), 47-57.
- George, T. S., Richardson, A. E., (2008). Potential and limitations to improving crops for enhanced phosphorus utilization. In *The ecophysiology of plant-phosphorus interactions* (pp. 247-270). Springer Netherlands.
- Díaz-Espejo, A., Serrano, L., Toja, J., (1999). Changes in sediment phosphate composition of seasonal ponds during filling. *Hydrobiologia.* 392(1), 21-28
- Hayes, J. E., Richardson, A. E., Simpson, R. J., (2000). Components of organic phosphorus in soil extracts that are hydrolysed by phytase and acid phosphatase. *Biology and Fertility of Soils.* 32(4), 279-286.
- Helmke, P. A., Boerth, T. J., He, X., (2000). Bioavailability of organically-bound soil phosphorus. In *Proceedings of the... Wisconsin Fertilizer, Aglime and Pest Management Conference (Vol. 39, p. 16).* Cooperative Extension, University of Wisconsin--Extension; College of Agricultural and Life Sciences, University of Wisconsin--Madison.
- Holford, I. C. R., (1980). Effects of phosphate buffer capacity on critical levels and relationships between soil tests and labile phosphate in wheat growing soils. *Soil Research.* 18(4), 405-414.

- Hutchison, K.J., Hesterberg, D., (2009). Dissolution of Phosphate in a Phosphorus-Enriched Ultisol as Affected by Microbial Reduction. *Journal of Environmental Quality*, 1793
- Ryan, J., Ibricci, H., Delgado, A., Torrent, J., Sommer, R., Rashid, A., (2012). 3 Significance of Phosphorus for Agriculture and the Environment in the West Asia and North Africa Region. *Advances in Agronomy*. 114, 91.
- Kim, Y. O., Lee, J. K., Kim, H. K., Yu, J. H., Oh, T. K., (1998). Cloning of the thermostable phytase gene (phy) from *Bacillus* sp. DS11 and its overexpression in *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters*. 162(1), 185-191.
- Murphy, J., Riley, J. P., (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica chimica acta*. 27, 31-36.
- Peña, F., Torrent, J., (1990). Predicting phosphate sorption in soils of Mediterranean regions. *Fertilizer Research*. 23(3), 173-179.
- Ryden, J. C., Syers, J. K., Tillman, R. W., (1987). Inorganic anion sorption and interactions with phosphate sorption by hydrous ferric oxide gel. *Journal of Soil Science*. 38(2), 211-217.
- Ruiz, J. M., Delgado, A., Torrent, J., (1997). Iron-related phosphorus in overfertilized European soils. *Journal of environmental quality*. 26(6), 1548-1554.
- Saavedra, C., Delgado, A. (2005). Iron-related phosphorus in eroded sediments from agricultural soils of Mediterranean areas. *Geoderma*. 125(1), 1-9.
- Saavedra, C., Velasco, J., Pajuelo, P., Perea, F., Delgado, A., (2007). Effects of tillage on phosphorus release potential in a Spanish Vertisol. *Soil Science Society of America Journal*. 71(1), 56-63.
- Shaheen, S. M., Tsadilas, C. D., Stamatiadis, S., (2007). Inorganic phosphorus forms in some entisols and aridisols of Egypt. *Geoderma*. 142(1), 217-225.
- Schröder, J. J., Smit, A. L., Cordell, D., Rosemarin, A., (2011). Improved phosphorus use efficiency in agriculture: A key requirement for its sustainable use. *Chemosphere*. 84(6), 822-831.
- Tabatabai, M. A., Bremner, J. M., (1969). Use of P-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil biology and biochemistry*. 1(4), 301-307.
- Turner, B. L., Mahieu, N., Condon, L. M., (2003). Quantification of myo-inositol hexakisphosphate in alkaline soil extracts by solution <sup>31</sup>P NMR spectroscopy and spectral deconvolution. *Soil Science*. 168(7), 469-478.
- Turner BL. 2006. Plant Utilization of Inositol Phosphates. En: Turner BL, Richardson AE, Mullaney EJ. (eds) *Inositol phosphates: linking agriculture and the environment*. CABI, Wallingford, UK
- Phosphates: Linking Agriculture and the Environment. CABI, Wallingford, pp 186–206
- Wang, J., Liu, W. Z., Mu, H. F., Dang, T. H., (2010). Inorganic phosphorus fractions and phosphorus availability in a calcareous soil receiving 21-year superphosphate application. *Pedosphere*. 20(3), 304-310.