

Efecto del hongo *Beauveria bassiana* sobre solubilización de fosfatos y la disponibilidad de fósforo en el suelo

FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, Rosalba, HERNÁNDEZ-LEAL, Tania I. y CARRIÓN, Gloria

R. Fernández´, T. Hernández´´ y G. Carrión´´

´ Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Veracruzana, Circuito Gonzalo Aguirre Beltrán s/n Xalapa, Veracruz

´´ Instituto de Ecología A. C., Xalapa, Veracruz, Km 2.5 carretera antigua a Coatepec No.351

rosalba_10174@hotmail.com

E. Figueroa, L. Godínez, F. Pérez (eds.) Ciencias de la Biología y Agronomía. Handbook T-I. -©ECORFAN, Texcoco de Mora-México, 2015.

Abstract

The *in vitro* *B. bassiana* ability was tested in order to solubilize calcium phosphate (hidroxiapatite) and iron phosphate, as well as its effect over the availability of phosphorus (P) in the soil by using, separately, different fertilizers: chemical (simple calcium superphosphate) and organic material. In the *in vitro* experiment, the solubilized phosphate (P mg/L) and pH were measured every two days during a period of 20 days, while the solubilized calcium and iron (mg/L) were quantified at the beginning and at the end of the experiment. *B. bassiana* solubilized 70.68% of phosphorus and 6.69% of calcium introduced as calcium phosphate in a period of 20 days. However, the highest solubilization percentage (93%) was shown in the 12 days after fungus inoculation. In the case of iron phosphate, the initial amount of solubilized phosphorus (47.43% of P introduced as iron phosphate), was higher than following measurements. After conducting the experiment (20 days) a 38.60% of solubilized phosphorus and 4.38% of iron were registered. In both phosphate compounds, the growth medium showed a tendency towards acidification during the experiment.

In the soil experiment, six treatments were tested: soil + *B. bassiana*(S + *Bb*), soil + chemical fertilizer (S + F), soil + chemical fertilizer + *B. bassiana*(S + F + *Bb*), soil + organic matter (S + OM), soil + OM + *B. bassiana*(S + OM + *Bb*) and absolute blank soil as an absolute sample (S, only soil). Before starting the experiment and 20 days after it, a soil sample (10 g) was taken from every treatment to determine available phosphorus (P mg/ kg). Although the highest and lowest amount of available P were recorded by S+F (0.95 ± 0.18 mg/kg) and S + OM + B.b (0.083 ± 0.16 mg/kg), respectively, no significant differences between treatments were found.

15 Introducción

Beauveria bassiana (Bals.-Criv.) Vuill. es uno de los hongos entomopatógenos de mayor importancia en el control biológico y en el manejo integrado de plagas agrícolas. Las esporas de este microorganismo pueden ser ingeridas por el hospedero o germinar sobre su cutícula, penetrar al interior del cuerpo, desarrollar micelio y, finalmente provocar la muerte del insecto. *B. bassiana* se ha utilizado de forma comercial especialmente contra insectos fitoparásitos como langostas, chapulines (Orthoptera), escarabajos (Coleóptera), áfidos y mosquita blanca (Hemíptera) (Pucheta-Díaz *et al.*, 2006). Sin embargo, otras funciones biológicas que este hongo puede desempeñar en el suelo, como la solubilización de fosfatos, han sido menos estudiadas.

En relación al punto anterior, Khan y Anwer (2011) mencionan que algunos hongos empleados en el control biológico de enfermedades, como *Trichoderma* spp., al mismo tiempo actúan como organismos solubilizadores de fosfatos; lo cual, favorece la adquisición de fósforo por las plantas. Los hongos *Purpureocillium lilacinum*. (Thom) Luangsa-ard Houbraken, Hywel, Jones & Samson y *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* Kamyschko ex G.L. Barron & Onions, ambos empleados en el control de nematodos fitoparásitos, también han demostrado tener la capacidad de disolver minerales fosfatados, como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Gudiño *et al.*, 2015; Hernández *et al.*, 2011). Respecto a *B. bassiana*, se ha registrado que puede solubilizar *in vitro* hidróxido y oxiclورو de cobre a través de la producción de ácidos orgánicos (Martins *et al.*, 2012).

El fósforo (P) es un nutrimento esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, interviene en la fotosíntesis, en la maduración de frutos, promueve la formación de raíces y flores, forma parte de los ácidos nucleicos (ADN y ARN), del ATP y de los fosfolípidos que integran y dan flexibilidad a las membranas celulares. Además, incrementa la resistencia de la planta a bajas temperaturas y a las enfermedades (Navarro-Blaya y Navarro-García, 2003).

Las plantas absorben este nutriente como aniones solubles, H_2PO_4^- en los suelos con un pH inferior a 7.0, y como HPO_4^{2-} en suelos básicos (Fernández y Rodríguez, 2005).

En el suelo, el fósforo se encuentra en formas orgánicas e inorgánicas, la mayoría insoluble y no disponible para las plantas. El contenido de P orgánico puede variar entre un 20% y 70%; el cual está en combinación con ácidos húmicos o forma moléculas orgánicas como cefalina y ácidos nucleicos. El resto del total de fósforo está constituido por la fracción inorgánica, en su mayoría representada por minerales y sales poco solubles, en donde el P está unido a elementos como aluminio y hierro en suelos ácidos, o con magnesio y calcio en suelos alcalinos (Brady y Weil, 2004). Debido a lo anterior, la cantidad de fósforo asimilable para las plantas es limitada y depende del equilibrio dinámico de un sistema tripartita: la planta, la solución del suelo y las reservas orgánicas e inorgánicas.

En un agroecosistema, la práctica más común para proveer P a los cultivos, es el uso de fertilizantes fosfatados. Sin embargo, estos productos al entrar en contacto con el suelo, reaccionan rápidamente y forman compuestos no solubles. Otra parte del fósforo aplicado se pierde por lixiviación o arrastre de lluvia, siendo un factor importante de contaminación ambiental. Al final, la cantidad de fósforo que realmente queda disponible para las plantas es mínima (Zapata y Roy, 2007).

Los hongos y bacterias del suelo, conocidos como solubilizadores de fosfatos, son importantes en los procesos que afectan la transformación del fósforo en el suelo y su disponibilidad para las plantas. En particular, dichos organismos pueden mineralizar y solubilizar formas de fósforo orgánicas e inorgánicas a través de mecanismos como la liberación de ácidos orgánicos y enzimas hidrolíticas que incrementan la movilización y disponibilidad de este elemento para la nutrición de las plantas. La aplicación de microorganismos al suelo que movilicen fuentes de fósforo no disponibles, constituye una alternativa para mejorar la productividad de los cultivos (Fernández y Rodríguez, 2005).

La mayoría de los organismos hasta ahora registrados como solubilizadores de fosfatos son bacterias como *Pseudomonas* y *Xanthomonas*, y hongos como *Penicillium* y *Aspergillus* (Useche *et al.*, 2004; Gudiño *et al.*, 2015). Sin embargo existen hongos que se aplican en los campos agrícolas para el control biológico de plagas como *Beauveria bassiana*, cuyo potencial como solubilizador de fosfatos es necesario estudiar. Los objetivos de este trabajo fueron: 1) Evaluar *in vitro* la capacidad del hongo *Beauveria bassiana* para solubilizar fosfatos de calcio y hierro; 2) Determinar su efecto sobre la disponibilidad de fósforo en suelo fertilizado con un producto químico y otro orgánico. Los resultados de este trabajo pueden aportar conocimientos acerca de la disolución de minerales fosfatados y la movilización del fósforo en el suelo.

15.1 Materiales y métodos

Solubilización de fósforo *in vitro*

Se preparó por duplicado un medio de cultivo líquido con las siguientes sustancias: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.5g), KCl (0.2g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.3 g), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.004 g), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.002 g), NaCl (0.2 g), D-Glucosa (10 g), extracto de levadura (0.5 g), cloranfenicol (0.1 g) y agua (900 mL). Por separado se prepararon dos soluciones de fosfatos: goma arábiga (0.5 g), fosfato de calcio tribásico (Hidroxiapatita, $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$, 1.0 g) o fosfato de hierro (Fosfato férrico, $\text{FePO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.0 g) y agua (100 mL). La concentración de P elemental en el caso de $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$ fue de 199.86 mg/L y de Ca, 387.5 mg/L.

En el compuesto $\text{FePO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, la cantidad de P fue de 183.43 mg/L y de Fe, 331.36 mg/L. Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave (121°C por 15 minutos) y posteriormente se mezcló el medio base con cada sustancia fosfatada.

Para cada medio fosfatado se emplearon tres matraces de 250 mL de capacidad con 150 mL de los medios líquidos. Cada matraz se inoculó con tres discos (5 mm de diámetro) extraídos de cultivos puros en agar-avena de *B. bassiana* con cinco días de crecimiento. Se utilizó el mismo número de matraces sin inocular como testigos de cada compuesto de fósforo. Todos los matraces se mantuvieron a temperatura ambiente (25 °C), en constante agitación sobre un agitador mecánico a 130 r.p.m. Asépticamente, se tomaron alícuotas de 10 mL de cada matraz, antes de inocularlos y cada dos días después de agregar el hongo, hasta 20 días. Los extractos se pasaron a través de papel filtro Whatman No. 42 para eliminar el micelio sobrenadante. El líquido obtenido se empleó para medir el pH, mediante un potenciómetro digital (Conductronic pc 45), y el fósforo soluble, por colorimetría de complejos molibdo-fosfóricos reducidos con ácido ascórbico. Las lecturas de absorbancia se llevaron a cabo en un espectrofotómetro portátil (DR/2000 HACH). La capacidad solubilizadora del hongo se confirma al aumentar la concentración de P soluble (mg/L) a través del tiempo en los matraces inoculados. También se cuantificó la cantidad de Ca y Fe solubles, al inicio y al final (mg/L) del experimento. Adicionalmente se obtuvo el peso seco del micelio (mg) cada cuatro días y se determinó el contenido final de P en el micelio (mg/kg).

Efecto de *Beauveria bassiana* en la disponibilidad de P en el suelo

Descripción del experimento

El suelo empleado en este trabajo fue proporcionado por productores de papa de la región del Cofre de Perote, Veracruz. El sustrato se desinfectó por tres horas a 70 °C en un pasteurizador eléctrico. Después de este proceso, la humedad del suelo fue de 20.74 ± 0.23 % ($\bar{x} \pm$ desviación estándar). El diseño experimental fue bifactorial completamente al azar, los factores correspondieron al tipo de fertilizante y la presencia del agente de control biológico. Los niveles del tipo de fertilización fueron: orgánico (composta), químico (superfosfato de calcio simple $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{CaSO}_4$) y control (sin fertilizante). Los niveles del controlador biológico fueron: aplicación de *B. bassiana* y ausencia del hongo. En total se formularon seis tratamientos, cada uno con cinco repeticiones (N=30) que constaron de muestras de 1.5 kg de suelo, contenidas en charolas de plástico rectangulares. Los tratamientos que incluyeron la aplicación del hongo, se asperjaron uniformemente con 20 mL de un producto fermentado de *Beauveria bassiana* a una concentración mínima de 2×10^7 UFC mL⁻¹ (unidades formadoras de colonias). Por lo tanto, cada muestra de suelo recibió 548,333,000 UFC's. Las repeticiones que no incluyeron al hongo se asperjaron con la misma cantidad de agua corriente. Las charolas se mantuvieron tapadas y a una temperatura constante (25±1°C).

Determinación de P disponible del suelo

Antes de iniciar el experimento y 20 días después, se tomó una muestra compuesta de suelo (10 – 15 g) de cada charola, la cual se conformó con cinco submuestras correspondientes a las esquinas y la parte central del recipiente. Las muestras de suelo se secaron bajo sombra a temperatura ambiente. La cantidad de P disponible se determinó con la técnica de la resina de intercambio aniónico y se expresó en mg/kg de suelo (Kuo, 1996).

Análisis estadísticos

Para caracterizar el comportamiento de *B. bassiana* en la solubilización de fosfatos *in vitro*, se obtuvo el promedio y la desviación estándar del fósforo soluble y el pH por cada día de evaluación. Con los datos anteriores se construyeron graficas de líneas para observar la tendencia de las variables a través del tiempo. En el caso del calcio y el fierro soluble, así como el peso del micelio, se calcularon los mismos estimadores, pero solo para inicio y final del experimento. No fue necesario efectuar análisis estadísticos para determinar si el hongo tenía la capacidad de solubilizar los compuestos fosfatados, ya que las diferencias de los estimadores entre tratamientos fueron contundentes.

En relación al experimento con suelo, se calculó la diferencia entre la cantidad de P disponible inicial y final de cada repetición y esta nueva variable se empleó en el análisis estadístico. Dicha variable se elevó al cuadrado y se efectuó un análisis de varianza factorial, a través de un modelo lineal general para probar el efecto principal de los factores (tipo de fertilizante y presencia de hongo) y su interacción sobre la cantidad de P disponible. Los parámetros del modelo se calcularon con el método de máxima verosimilitud restringida y se aplicó la función VarIdent del software R para corregir heterocedasticidad entre tratamientos. Las comparaciones entre los niveles de los factores se realizaron con la prueba de la diferencia mínima significativa de Fisher ($\alpha=0.05$). Los análisis se efectuaron en el software InfoStat (versión 2013), y su plataforma en conexión con R (versión 3.0.3), cuando fue necesario.

15.2 Resultados

Solubilización de fosfatos *in-vitro*

En el tratamiento con fosfato de calcio, la concentración inicial promedio (\pm desviación estándar) de P soluble, en los matraces inoculados con el hongo fue de 43.04 ± 9.4 mg/L y en el testigo fue de 37.30 ± 4.99 mg/L, las cuales representan 23.26% y 20.15% de la cantidad de fósforo introducida como fosfato de calcio, respectivamente. A partir del cuarto día, el medio inoculado con *B. bassiana* presentó un incremento notable de P (133.59 ± 5.67 mg/L), mientras que el testigo se mantuvo constante. La mayor cantidad de P soluble obtenida en el tratamiento con el hongo ocurrió en el día 12, con un promedio de 172.06 ± 16.59 mg/L, que representó el 93% del fósforo contenido en $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$. Sin embargo, después del día 12, la cantidad de P empezó a descender hasta terminar con un promedio de 130.76 ± 7.41 mg/L, cuando finalizó el experimento.

En el tratamiento con fosfato de fierro la concentración inicial de P soluble fue de 85.5 ± 2.20 mg/L (46.74% del fósforo en $\text{FePO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) en presencia de *B. bassiana*, mientras que en el testigo fue de 88.8 ± 1.90 mg/L (48.52% de fósforo en $\text{FePO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). A partir del cuarto día la cantidad de P descendió y esta tendencia se observó hasta el término del experimento, con un promedio de 70.65 ± 1.20 mg/L (38.60% del P original). El contenido de este elemento en el tratamiento testigo se mantuvo constante.

En los resultados anteriores se observó un descenso en la cantidad de P soluble en los tratamientos inoculados con el hongo, durante los últimos días de evaluación. Se sugiere que esta tendencia fue debida al consumo de fósforo por parte de *B. bassiana*, ya que los hongos emplean este elemento como sustancia de reserva y el crecimiento de micelio inmoviliza parte del fósforo disponible en el medio (Reyes *et al.*, 1999; Hernández-Leal *et al.*, 2011).

Con respecto al pH, *Beauveria bassiana* acidificó las soluciones con fosfato de calcio y de hierro conforme transcurrió el tiempo. En el caso del fosfato de calcio, el pH de los matraces con el hongo inició en 5.78 ± 0.05 y descendió hasta 5.24 ± 0.41 en el día 12. Pero, después de este momento el pH aumentó ligeramente, lo cual coincidió con la disminución de P soluble, y terminó con 6.08 ± 0.01 . En contraste, en el medio-testigo, el pH mostró una ligera variación, con un promedio general de 6.34 ± 0.02 . En los tratamientos con fosfato de hierro, el medio de cultivo con la presencia del hongo inició con un pH de 3.47 ± 0.01 y terminó con 2.22 ± 0.01 . En el medio-testigo, esta variable fue estable con un promedio general de 3.41 ± 0.01 .

El descenso de pH en los dos tratamientos inoculados con *Beauveria bassiana*, sugiere que el hongo empleó alguno de los mecanismos característicos de los organismos solubilizadores para disolver los compuestos fosfatados, como son la excreción de iones H^+ o la producción de ácidos orgánicos (Fernández y Rodríguez, 2005; Arcand y Schneider, 2006).

La cantidad de calcio (Ca) disuelto en el medio de cultivo con *B. bassiana* se incrementó al final del experimento de 3.5 mg/L a 22.14 mg/L, mientras que en el testigo la concentración de este elemento fue muy similar tanto al inicio (3.56 mg/L) como al final (6.54 mg/L) con un promedio de 4.54 ± 1.39 . En el tratamiento con fosfato de hierro, la cantidad de hierro (Fe) soluble en el medio de cultivo con *B. bassiana* también aumentó al término del estudio (7.1 mg/L), mientras que en el testigo la concentración de este elemento fue muy similar tanto al inicio, 0.14 mg/L, como al final, 0.82 mg/L, obteniendo un promedio de 0.45 ± 0.31 .

El mayor contenido de Fe y Ca solubles encontrados en los matraces con el hongo *versus* la concentración registrada en los testigos, es una evidencia indirecta de la disolución del fosfato férrico y de calcio, así como de la capacidad de *B. bassiana* para solubilizar ambos compuestos.

El crecimiento de *Beauveria bassiana* fue constante a lo largo del estudio. El peso del micelio al cuarto día fue de 91.5 ± 1.4 mg, mientras que al término del experimento fue de 411.5 ± 2.11 mg. El contenido final de P en el micelio fue de 5,381.67 mg/kg, que de acuerdo con el peso final de micelio, corresponden al 1.19 % de P que se introdujo como fosfato de calcio. En relación al fosfato de hierro, *B. bassiana* pesó 92.2 ± 1.84 mg al cuarto día de crecimiento y su desarrollo también fue constante. El peso final del micelio fue de 593.6 ± 45.36 mg, con un contenido de P de 6,174.25 mg/kg, el cual representó, el 2.0 % de P que se introdujo como fosfato de hierro.

Efecto de *Beauveria bassiana* en la disponibilidad de fósforo en el suelo

Los tratamientos con *B. bassiana* presentaron menor cantidad promedio de P disponible (0.30 ± 0.09 mg/kg), en comparación con los tratamientos sin el hongo (0.78 ± 0.17 mg/kg, $F_{1,29}=39.72$, $p < 0.001$). Al parecer *B. bassiana* empleó alguna fracción del fósforo disponible en el suelo para satisfacer su demanda en las primeras etapas de crecimiento.

En cuanto al tipo de fertilizante, los tratamientos con superfosfato de calcio simple tuvieron una cantidad significativamente mayor de fósforo disponible (0.78 ± 0.15 mg/kg) que aquellos con materia orgánica (0.26 ± 0.10 mg/kg), independientemente de la presencia o ausencia del hongo ($F_{2,29}=5.72$, $p=0.009$). Esto era de esperarse ya que que la mayoría de los fertilizantes sintéticos fosfatados tienen buena solubilidad en agua, lo cual genera fósforo disponible para las plantas (Lugo *et al.* (2009; Zapata y Roy, 2007).

Por otro lado, la materia orgánica puede aportar algunos nutrientes para los cultivos, pero no es condición que contenga las cantidades suficientes y disponibles para un nivel nutricional óptimo, ya que otros factores, como el contenido de nutrientes original del suelo, influyen sobre este hecho (FAO e IFA, 2002).

Con los resultados obtenidos, no se pudo determinar si *B. bassiana* contribuye a la disponibilidad de P en el suelo en presencia de un fertilizante, debido a que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (interacción entre factores $F_{2,29} = 0.24$, $p = 0.786$). El tratamiento con mayor cantidad de P disponible fue el que solo incluyó la aplicación de fertilizante químico (S+F, 0.95 ± 0.18 mg/kg), mientras que la mezcla de materia orgánica y *B. bassiana* presentó la de menor cantidad de P (0.084 ± 0.15 mg/kg.).

15.3 Conclusión

El hongo *B. bassiana* solubilizó *in vitro* el fosfato de calcio y de hierro, por lo cual, además de ser usado con fines de control biológico, tiene el potencial para favorecer la disponibilidad de fósforo. Sin embargo, bajo las condiciones en las que se efectuó el experimento con suelo, la interacción de *B. bassiana* con un fertilizante químico u orgánico no tuvo efecto sobre la disponibilidad de fósforo. Se sugieren estudios a mediano y largo plazo que involucren la influencia de características físicas y químicas del suelo sobre el microorganismo y la disponibilidad de fósforo.

15.4 Referencias

Arcand, M. M. y Schneider K. D., Plant and microbial – based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review, *Annais da Academia Brasileira de Ciências*, 78(4), (2006). Pp. 791 – 807.

Brady, N.C. y Weil, R.R., *Elements of the Nature and Properties of Soils*. United States of America, Pearson Prentice Hall, (2004), 606 pp.

Fernández, M. T. y Rodríguez, H., El papel de la solubilización de fósforo en los biofertilizantes microbianos. *ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar*, 39(3), (2005). pp. 27-34.

Gudiño, G. M. E., de Abreu, L. M., Marra, L. M., Pfenning, L. H. y de S. Moreira, F. M., Phosphate solubilization by several genera of saprophytic fungi and its influence on corn and cowpea growth, *Journal of Plant Nutrition*, 35(5), (2015). pp. 675 - 686

Hernández-Leal, T.I., Carrión, G. y Heredia, G., Solubilización *in vitro* de fosfatos por una cepa de *Paecilomyces lilacinus*, *Agrociencia*, 45, (2011). pp. 881-892 .

Khan, M. R. y Anwer, M. A., Fungal bioinoculants for plant disease management, In *Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications*, Springer New York, (2011). pp. 447-488.

Kuo, S. Phosphorus. In *Methods of Soil Analysis*, United States of America, Soil science of America Book, (1996). 869 pp.

Lugo Soto, M., Ramirez, R. y Entrena, I., Roca fosfórica y superfosfato triple como fuentes de fósforo para *Centrosema* en un suelo ácido. *Zootecnia Tropical*, 27(4), (2009). pp. 443-456.

Martins, F., Soares, M.E., Oliveira, I. y Pereira, J.A., Tolerance and bioaccumulation of copper by the entomopathogen *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. exposed to various copper-based fungicides. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 89(1), (2012). pp. 53–60.

Navarro-Blaya, S. y Navarro-García, G., *Química Agrícola, España, Mundi-prensa* (2003). 487 pp.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y Asociación Internacional de la Industria de los Fertilizantes (IFA), *Los fertilizantes y su uso*, Roma, FAO – IFA, (2002). 77 pp.

Pucheta-Díaz, M., Flores Masías, A., Rodríguez Navarro, S. y de la Torre, M., Mecanismos de acción de los hongos entomopatogenos. *Interciencia*, 31(12), (2006). pp. 556 -560.

Reyes, I., Bernier, L., Simard, R. R. y Antoun, H., Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillim rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microbiology Ecology*, 28, (1999). pp. 281-290.

Useche, Y. M., Valencia, H. y Pérez, H. Caracterización de bacterias y hongos solubilizadores de fosfato bajo tres usos de suelo en el sur del trapecio amazónico. *Acta Biológica Colombiana*, 9(2), (2004). 129-130 pp.

Zapata, F. y Roy, R. N. (Eds.), *Utilización de las rocas fosfóricas para una agricultura sostenible*, Roma, FAO, (2007). 155 pp.