

## Estudio *in vitro* sobre hongos solubilizadores de fósforo bajo diferentes fuentes de carbono y nitrógeno

Rosa María Arias Mota<sup>1\*</sup> , Norberto Daniel Hernández Merel<sup>2</sup>, Yamel del Carmen Perea Rojas<sup>3</sup>, Yadeneyro de la Cruz Elizondo<sup>2</sup> .

<sup>1</sup> Instituto Tecnológico Superior de Xalapa, Reserva Territorial SN, Col. Santa Bárbara, Xalapa, Veracruz, México.

<sup>2</sup> Facultad de Biología, Universidad Veracruzana, Campus Xalapa, Circuito Gonzalo Aguirre Beltrán s/n, CP. 91090, Zona Universitaria Xalapa, Veracruz, México.

<sup>3</sup> Instituto de Ecología, A.C., Carretera Antigua a Coatepec, No. 351., Col. El Haya, CP. 91070, Xalapa Veracruz, México.

\*Email autor corresponsal: [rosa.am@xalapa.tecnm.mx](mailto:rosa.am@xalapa.tecnm.mx)

**Recibido:** 23 mayo 2021. **Aceptado:** 15 julio2021

### RESUMEN

**Antecedentes:** Los hongos solubilizadores de fósforo juegan un papel muy importante en el ciclo del fósforo porque pueden transformarlo de insoluble a soluble; estos organismos dependen de los nutrientes del medio para su desarrollo y su actividad en los procesos biogeoquímicos. **Objetivo:** Evaluar a nivel *in vitro* la capacidad de tres cepas de hongos para solubilizar fosfato con diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno y relacionar la solubilización con el pH del medio de cultivo y biomasa fúngica. **Métodos:** Las cepas utilizadas fueron *Aspergillus niger*, *Penicillium brevicompactum* y *P. waksmanii*, estas se inocularon con diferentes fuentes de carbono (arabinosa, fructosa y glucosa) y de nitrógeno (asparagina, sulfato de amonio y urea); como testigo se utilizó el medio sin carbono/nitrógeno. Cada tercer día se midió el fósforo soluble, el pH del medio de cultivo y la biomasa fúngica. **Resultados y discusión:** En los datos con las fuentes de carbono, la cepa de *A. niger* mostró una mayor solubilización en presencia de glucosa, mientras que para *P. waksmanii* y *P. brevicompactum* la mayor solubilización se presentó con fructosa. Respecto a las fuentes de nitrógeno, para *A. niger*, el sulfato de amonio favoreció una mayor solubilización, mientras que en *P. brevicompactum* y *P. waksmanii* fue el tratamiento con control (nitrógeno limitado). Mediante regresiones se detectó que en *A. niger* y *P. brevicompactum* con diferentes fuentes de carbono, que la

capacidad de solubilizar fosfato tricálcico aumentó significativamente con la acidificación del medio de cultivo y con la biomasa fúngica. Sin embargo, para las tres cepas evaluadas en diferentes fuentes de nitrógeno, la actividad fosfato solubilizadora no se relacionó significativamente con el pH del medio de cultivo ni con la biomasa fúngica.

**Palabras clave:** Hongos filamentosos; fosfato tricálcico; fósforo soluble.

## ABSTRACT

**Background:** Phosphorus solubilizing fungi are very important in the phosphorus cycle because they can transform it from insoluble to soluble. These organisms depend on the nutrients of the environment for their development and are active in biogeochemical processes. **Objective:** Evaluate *in vitro* the capacity of three strains of fungi to solubilize phosphate with different carbon and nitrogen sources and to relate the solubility with the pH of the culture medium and fungal biomass. **Methods:** The strains used were *Aspergillus niger*, *Penicillium brevicompactum*, and *P. waksmanii*, they were inoculated with carbon sources (arabinose, fructose, and glucose), and nitrogen sources (asparagine, ammonium sulfate, and urea); as a control, we used the medium without carbon/nitrogen. During a month, every third day, the soluble phosphorus, the pH in the culture medium, and the fungal biomass was measured. **Results and discussion:** Among the data with carbon sources, when the strain of *A. niger* grew with glucose, it presented the highest solubilization, while for *P. waksmanii* and *P. brevicompactum*, it was detected the highest solubilization when grown with fructose. Regarding the nitrogen sources, for *A. niger*, the growth with ammonium sulfate favored higher solubilization, while in *P. brevicompactum* and *P. waksmanii*, it was with the control treatment (limited nitrogen). By regression we detected that in *A. niger* and *P. brevicompactum* with different carbon sources, that the capacity to solubilize tricalcium phosphate significantly increased with the acidification of the culture medium and with the fungal biomass. However, for the three strains evaluated in different nitrogen sources, the solubilizing phosphate activity was not significantly related to the pH of the culture medium or to the fungal biomass.

**Keywords:** Filamentous fungi; tricalcic phosphate; soluble phosphorus.

## INTRODUCCIÓN

El fósforo (P) es considerado como uno de los elementos más importantes para el crecimiento y desarrollo de las plantas, sin embargo, este compuesto se encuentra en muy bajas concentraciones en el suelo ya que forma enlaces iónicos con elementos químicos ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Al}^{+3}$  y  $\text{Fe}^{+3}$ ). Este se puede agrupar en dos fracciones: fósforo inorgánico (Pi) y fósforo orgánico (Po), el primero se refiere al P de naturaleza mineral y el segundo al que se encuentra unido con la materia orgánica [1]. En el sistema edáfico mediante el proceso de meteorización se degrada la roca ígnea y son liberados fosfatos inorgánicos; mientras que en el proceso de mineralización, los microorganismos del suelo realizan la conversión del P orgánico a P inorgánico, entre ellos los hongos. La mayoría de los hongos del suelo son saprobios, organismos que obtienen sus nutrientes a partir de materiales orgánicos inertes como restos vegetales y animales. Junto con las bacterias y la macrofauna, los hongos saprobios participan en la descomposición de la materia orgánica; mediante este proceso se promueve el reciclaje de elementos esenciales que serán absorbidos por las raíces e incorporadas al metabolismo vegetal [2]. Aproximadamente, el 10% de la población microbiana del suelo transforma activamente el fósforo, en su mayoría se tratan de organismos habitantes de la rizósfera [3].

En los suelos ácidos, el fósforo soluble es fácilmente convertido en complejos insolubles, como fosfatos de aluminio o hierro, mientras que, en los suelos alcalinos, este se precipita en forma de fosfatos de calcio o magnesio [4]. El mecanismo principal de solubilización del fósforo es a través de la producción de ácidos orgánicos, esta acción puede atribuirse a que disminuyen el pH y a la formación de complejos estables con cationes de  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$  y  $\text{Al}^{+3}$ , lo cual permite la liberación del fosfato [5]. Varios estudios han evaluado la capacidad de algunos géneros de hongos para solubilizar compuestos insolubles de fosfato inorgánico, como el fosfato tricálcico, fosfato dicálcico, hidroxiapatita y roca fosfórica mediante la producción de ácidos orgánicos [6, 7, 8, 9, 10]. Los géneros de hongos aislados con mejor capacidad solubilizadora de fosfato tricálcico son *Aspergillus* y *Penicillium* [11]. Debido a que los hongos son organismos heterótrofos, dependen de los nutrientes del medio para su desarrollo, se ha sugerido que, de acuerdo con la cepa y a las fuentes nutricionales disponibles en el medio, los hongos utilizan rutas metabólicas alternas para producir diferentes ácidos orgánicos [12]. La composición fundamental de la materia seca microbiana tiene aproximadamente un 50% de carbono, 20% de oxígeno, 14% de nitrógeno, 8% de hidrógeno, 3% de fósforo, 1% de azufre,

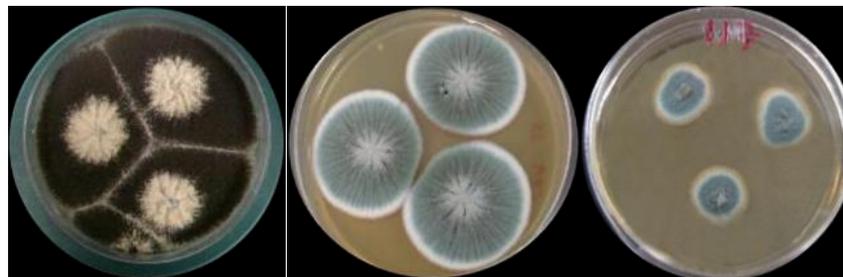
1% de potasio, 0.5% de calcio, 0.5% de magnesio, y 0.2% de hierro [13]. Estos elementos son los nutrientes que los microorganismos necesitan para su crecimiento, no obstante, los microorganismos varían considerablemente respecto a los nutrientes que pueden necesitar según sean las condiciones en que se desarrollen. En condiciones *in vitro*, un medio de cultivo debe contener todos los elementos necesarios para favorecer las reacciones metabólicas que les permitan la producción de biomasa [3]. Las fuentes de carbono representan la fuente principal de energía en las células, siendo la glucosa la más ampliamente utilizada por los hongos; la fructosa y manosa son los siguientes azúcares más comúnmente utilizados seguidos por la galactosa, pero a menudo se requiere un periodo de adaptación para que las enzimas las degraden [14]. El nitrógeno por otro lado es un elemento vital para la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos y polímeros de la pared celular y la mayoría de los hongos pueden utilizar una gran variedad de fuentes de nitrógeno [15]; como son las sales de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^{-2}$ ), aminoácidos y otros compuestos orgánicos, entre ellos, quitina, urea y purinas. Las fuentes de nitrógeno como glutamato, glutamina, aspartato y asparagina son ejemplos de aminoácidos útiles para los hongos [2], sin embargo, aún es escasa la información que se

tiene al respecto. El objetivo del presente estudio *in vitro* versa sobre los requerimientos nutricionales de cepas de hongos con alta capacidad fosfato solubilizadora nativas del estado de Veracruz con la finalidad de establecer la fuente de carbono y nitrógeno que promueva un aumento en la solubilización del fósforo.

## METODOLOGÍA

Se utilizaron tres cepas de hongos filamentosos, *Aspergillus niger*, *Penicillium brevicompactum* y *P. waksmanii* (Figura 1), las cuales fueron proporcionadas por el laboratorio de micromicetos del Instituto de Ecología A. C., y seleccionadas por su alta capacidad para solubilizar fosfato tricálcico con base en pruebas cualitativas y cuantitativas. Estas cepas son nativas de agroecosistemas cafetaleros y del bosque mesófilo de montaña del centro del estado de Veracruz. Para su reactivación, los hongos se inocularon en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA: BD BIOXON®) y se incubaron en oscuridad a 25 °C durante 14 días.

Para la evaluación del efecto de diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno sobre la solubilización de fosfato tricálcico por las cepas de hongos filamentosos, se utilizó medio de cultivo líquido de Sundara [16] adicionado con 0.5 g L<sup>-1</sup> de fosfato tricálcico como fuente de fósforo insoluble y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.



**Figura 1.** Cepas de hongos fosfato solubilizadoras de izquierda a derecha *A. niger*, *P. brevicompactum* y *P. waksmanii*.

El medio de Sundara se preparó con sulfato de amonio  $0.5 \text{ g L}^{-1}$ , cloruro de potasio  $0.2 \text{ g L}^{-1}$ , sulfato de magnesio  $0.3 \text{ g L}^{-1}$ , sulfato de manganeso  $0.004 \text{ g L}^{-1}$ , sulfato de hierro  $0.002 \text{ g L}^{-1}$ , cloruro de sodio  $0.2 \text{ g L}^{-1}$  y extracto de levadura  $0.5 \text{ g L}^{-1}$ . Se le adicionaron por separado glucosa, arabinosa y fructosa ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ) como diferentes fuentes de carbono y sulfato de amonio, asparagina y urea ( $0.5 \text{ g L}^{-1}$ ) por separado como fuentes de nitrógeno. Para cada evaluación se utilizó un control (sin carbono/sin nitrógeno) y se realizaron tres repeticiones de cada tratamiento. En cada matraz de cada tratamiento, se inocularon cuatro discos de 2 cm de micelio activo, estos se incubaron en la oscuridad a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 21 días. A partir del día nueve y cada tres días (9, 12, 15, 18 y 21 días) se efectuaron las mediciones de fósforo soluble.

Para cada ensayo, los cultivos de cada tratamiento fueron filtrados inicialmente con papel filtro Fisherbrand® G6 para extraer la

biomasa fúngica y posteriormente con papel filtro Whatman® 42 para obtener el extracto y proceder a cuantificar el fósforo soluble. El fósforo soluble se cuantificó por el método del ácido ascórbico [17]; para ello se tomó una alícuota de  $200 \text{ } \mu\text{L}$  del extracto fúngico y se diluyó con agua destilada hasta obtener un volumen final de  $10 \text{ mL}$ . Posteriormente se le agregaron  $2 \text{ mL}$  de reactivo combinado y se agitaron en un vórtex durante 10 segundos; enseguida se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente. Para preparar  $300 \text{ mL}$  de reactivo combinado, se utilizaron  $150 \text{ mL}$  de ácido sulfúrico  $5\text{N}$ ,  $15 \text{ mL}$  de tartrato antimonílico potásico,  $45 \text{ mL}$  de molibdato de amonio y  $90 \text{ mL}$  de ácido ascórbico. Las absorbancias se midieron en un espectrofotómetro (GENESYS 10S UV-VIS) a  $880 \text{ nm}$ , se utilizó agua con el reactivo combinado como blanco y agua para calibrar a cero el espectrofotómetro. Los datos se compararon con una curva estándar de fósforo

y se expresan en mg de fosfato (PO<sub>4</sub>) L<sup>-1</sup>.

La medición del pH de los tratamientos se realizó con un pHmetro (Science MED® mod. SM-3BW). El micelio extraído de cada uno de los tratamientos se secó en una estufa a 37 °C durante 48-60 horas y posteriormente se determinó el peso seco en una balanza analítica (RADWAG® mod. AS 220/C/2).

### Análisis estadísticos

Para determinar las diferencias del fosfato solubilizado entre los días de evaluación y entre los tratamientos con las fuentes de carbono y de nitrógeno, se realizaron análisis de varianza (ANOVA: Analysis of variance) de una vía en el software “Statistica 10” [18]. Con el fin de detectar la posible relación entre la solubilización de fosfato tricálcico con la producción de biomasa fúngica y el pH del medio de los tratamientos con las fuentes de carbono y de nitrógeno, se realizaron análisis de regresión lineal simple.

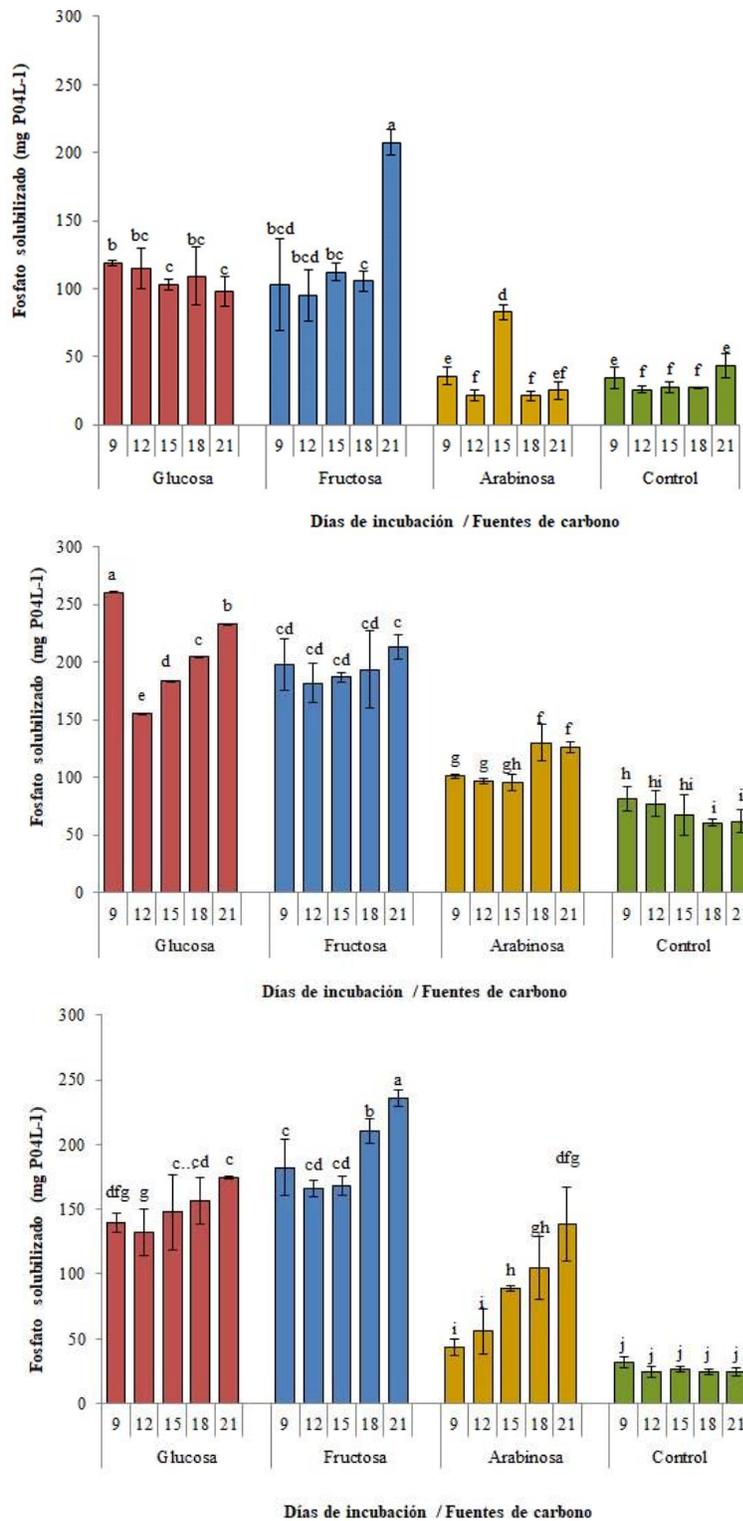
## RESULTADOS

### Solubilización de fosfato tricálcico con diferentes fuentes de carbono

*Aspergillus niger*: La mayor cantidad de fosfato en el medio de cultivo de esta cepa fue a los 9 días con glucosa (260.17 mg PO<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>), seguida del tratamiento con fructosa en el día 21

(212.86 mg PO<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>). Los valores más bajos de fosfato soluble se obtuvieron en el tratamiento con arabinosa (129.98 mg PO<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>) y en el control. El contenido de fosfato a lo largo del tiempo de incubación presentó diferencias significativas solamente en los tratamientos con glucosa y arabinosa (F= 21201.58, p= 0.0000005, F= 13.10, p= 0.000549, respectivamente) (Figura 2a).

*Penicillium brevicompactum*: La solubilización de fosfato tricálcico en esta cepa, fue significativamente mayor cuando se creció en fructosa y glucosa que en arabinosa y el control (p> 0.05) y la máxima solubilización en cada tratamiento se obtuvo a diferentes días de incubación (F= 558.78, p= 0.0000005). La mayor capacidad solubilizadora se detectó en el medio con fructosa (207.57 mg PO<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>) y se registró al día 21 de incubación. En glucosa fue al día 9 (119.04 mg PO<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>). De igual forma que para *A. niger*, los valores más bajos de solubilización de *P. brevicompactum* se obtuvieron en el tratamiento con arabinosa (35.85 mg PO<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>) y el control. En cuanto a la capacidad solubilizadora de la cepa, sólo en los medios con fructosa y arabinosa se detectaron diferencias entre los días de incubación (F=19.78, p=0.000097, F=6.06, p=0.009638, respectivamente) (Figura 2b).

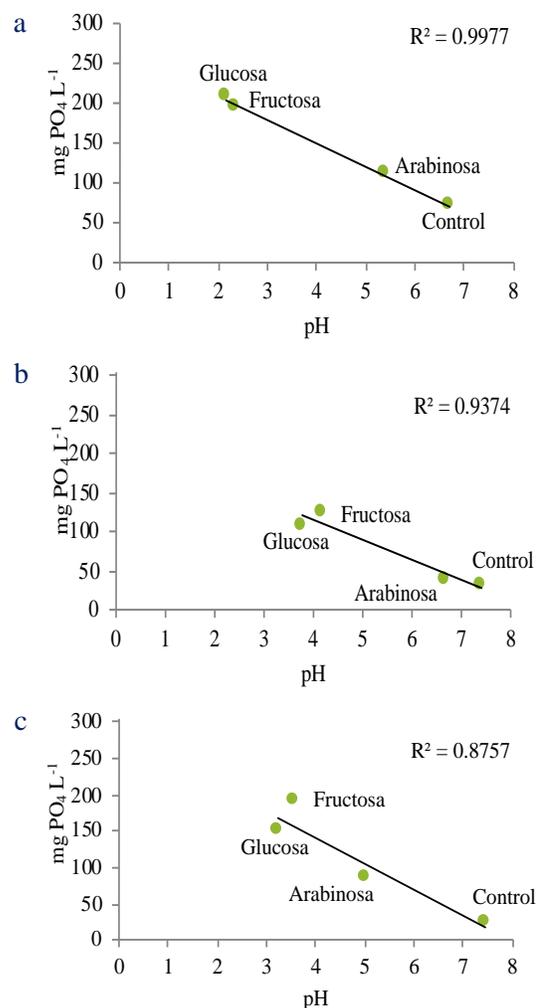


**Figura 2.** Fosfato solubilizado por la cepa de *A. niger* (a), *P. brevicompactum* (b) y *P. waksmanii* (c) crecidas en diferentes fuentes de carbono durante 21 días de incubación. Los datos son el promedio de tres repeticiones ± desviación estándar.

*Penicillium waksmanii*: La máxima solubilización de esta cepa se observó al día 21 de incubación en el medio con fructosa (235.77 mg PO<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>), seguida del tratamiento con glucosa en el día 21 (174.58 mg PO<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>), aunque en este medio no se encontraron diferencias significativas entre los días de incubación. De manera similar que en las cepas de *A. niger* y *P. brevicompactum*, los valores más bajos de solubilización se obtuvieron en el tratamiento con arabinosa (138.58 mg PO<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>). Solamente en los medios con fructosa y arabinosa los valores de fosfato solubilizado presentaron diferencias significativas entre los días de incubación (F=19.34, p=0.000107, F=17.95, p=0.000147 respectivamente) (Figura 2c).

### Solubilización de fosfato tricálcico y su relación con el pH del medio

Para las cepas de *A. niger* y *P. brevicompactum* crecidas en los tratamientos con diferentes fuentes de carbono, se encontraron relaciones significativas entre la solubilización del fosfato tricálcico y los valores de pH del medio (Figura 3a y 3b). En el caso de *P. waksmanii*, a pesar de que la relación no fue significativa, claramente se visualiza una tendencia. En todos los casos, la solubilización de fosfato tricálcico aumentó a medida que el pH del medio bajó (Figura 3c, tabla 1).



**Figura 3.** Regresión lineal entre el fosfato solubilizado y el pH del medio con diferentes fuentes de carbono para las cepas de *A. niger* (a), *P. brevicompactum* (b) y *P. waksmanii* (c). Los datos son el promedio de 15 repeticiones.

### Solubilización de fosfato tricálcico y su relación con la biomasa fúngica

Para las cepas de *A. niger* y *P. brevicompactum* inoculadas en medios con diferentes fuentes de carbono, se detectaron relaciones significativas entre la solubilización de fosfato tricálcico y la producción de biomasa en las diferentes fuentes de carbono (Figura 4a y 4b, tabla 1); en la cepa

de *P. waksmanii* aunque la relación no fue estadísticamente significativa, se visualiza una tendencia. En todos los casos se observa una mayor solubilización a mayor biomasa fúngica (Figura 4c, Tabla 1).

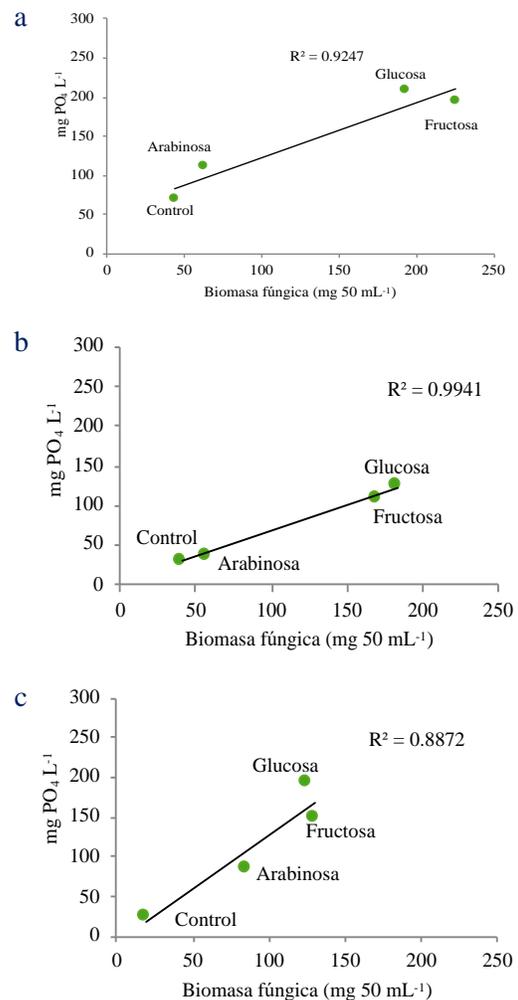
### Solubilización de fosfato tricálcico con diferentes fuentes de nitrógeno

#### *Aspergillus niger*

Cuando la cepa de *A. niger* se cultivó en las diferentes fuentes de nitrógeno, se detectaron diferencias significativas entre los días de máxima solubilización ( $F= 162.34$ ,  $p= 0.0000005$ ). El valor más alto del fosfato solubilizado se detectó con sulfato de amonio en el día 9 de incubación ( $260.17 \text{ mg PO}_4\text{L}^{-1}$ ); en orden descendente le siguieron los tratamientos control en el día 21 ( $242.38 \text{ mg PO}_4 \text{ L}^{-1}$ ), asparagina en el día 18 ( $208.87 \text{ mg PO}_4 \text{ L}^{-1}$ ) y por último urea en el día 12 ( $164.31 \text{ mg PO}_4 \text{ L}^{-1}$ ). En todos los casos los valores de fosfato solubilizado variaron significativamente entre los días de incubación (sulfato de amonio  $F=21201.58$ ,  $p= 0.0000005$ ; asparagina  $F= 11.06$ ,  $p= 0.001080$ ; urea  $F= 20.59$ ,  $p= 0.000081$ ; testigo  $F= 4.29$ ,  $p= 0.028$ ) (Figura 5a).

#### *Penicillium brevicompactum*

Cuando la cepa de *P. brevicompactum* se cultivó en las diferentes fuentes de nitrógeno, se detectaron diferencias significativas entre los



**Figura 4.** Regresión lineal entre el fosfato solubilizado y la biomasa fúngica con diferentes fuentes de carbono para las cepas de *A. niger* (a), *P. brevicompactum* (b) y *P. waksmanii* (c). Los datos son el promedio de 15 repeticiones.

días de máxima solubilización ( $F= 162.34$ ,  $p= 0.0000005$ ). El valor más alto del fosfato solubilizado se observó en el tratamiento control en el día 21 de incubación ( $174.77 \text{ mg PO}_4 \text{ L}^{-1}$ ); en orden descendente le siguieron los tratamientos con sulfato de amonio en el día 9 ( $119.04 \text{ mg PO}_4 \text{ L}^{-1}$ ), asparagina en el día 18 ( $94.51 \text{ mg PO}_4 \text{ L}^{-1}$ ) y por último urea en el día 9

(43.36 mg PO<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>). Sólo en el medio con asparagina y en el tratamiento control los valores de fosfato solubilizado variaron significativamente entre los días de incubación (F= 22.58, p= 0.000054, F= 28.02, p= 0.000021 respectivamente) (Figura 5b).

#### *Penicillium waksmanii*

Cuando la cepa de *P. waksmanii* se cultivó en las diferentes fuentes de nitrógeno, se detectaron diferencias significativas entre los días de máxima solubilización (F=38.14, p=0.00004). La mayor solubilización se detectó cuando la cepa creció en el tratamiento control en el día 21 de incubación (217.81 mg PO<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>); en orden descendente le siguieron los tratamientos con sulfato de amonio en el día 21 (174.58 mg PO<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>), asparagina en el día 21 (168.34mg PO<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>) y urea en el día 12 (108.75mg PO<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>). En los tratamientos con asparagina, urea y en el control los valores de fosfato solubilizado variaron significativamente entre los días de incubación

(asparagina F=10.03, p=0.0015; urea F=10.95, p=0.001124; control F=32.88, p=0.000010) (Figura 5c).

#### Solubilización de fosfato tricálcico y su relación con el pH del medio

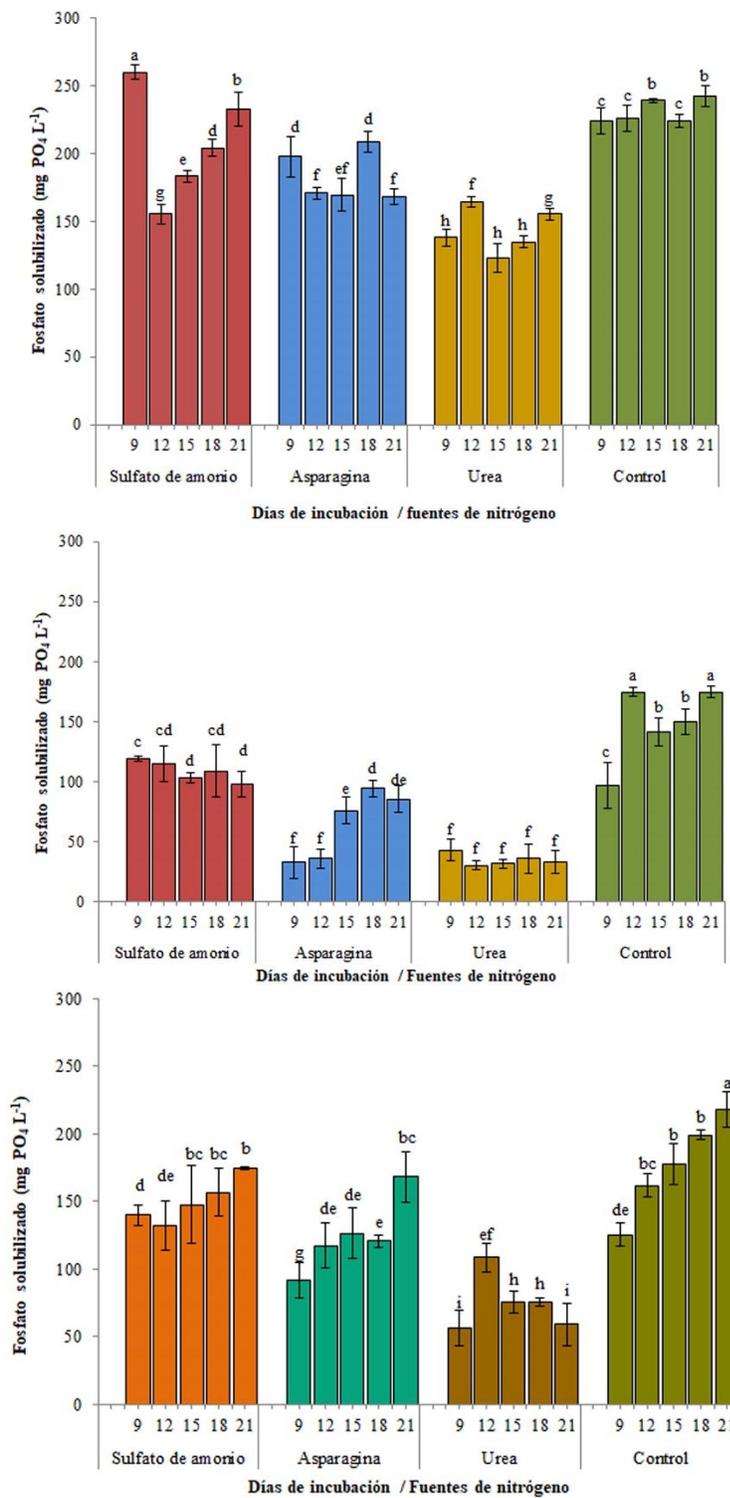
En ningún caso se detectaron relaciones significativas entre la solubilización del fosfato tricálcico con el pH de los tratamientos de fuentes de nitrógeno (*A. niger* R<sup>2</sup>= 0.78, p= 0.11; *P. brevicompactum* R<sup>2</sup>= 0.61, p=0.21; *P. waksmanii* R<sup>2</sup>= 0.55, p= 0.25) (Tabla 1).

#### Solubilización de fosfato tricálcico y su relación con la biomasa fúngica

En ningún caso se detectaron relaciones estadísticamente significativas entre la solubilización de fosfato tricálcico con la producción de biomasa fúngica de los tratamientos de fuentes de nitrógeno (*A. niger* R<sup>2</sup>= 0.55, p= 0.25; *P. brevicompactum* R<sup>2</sup>= 0.51, p= 0.28; *P. waksmanii* R<sup>2</sup>= 0.48, p= 0.30) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Datos de regresión y niveles de significancia de las diferentes fuentes de carbono y nitrógeno con el pH y la biomasa de las cepas de hongos solubilizadores de fósforo.

	Fuente de carbono				Fuente de nitrógeno			
	pH		Biomasa		pH		Biomasa	
	R <sup>2</sup>	p	R <sup>2</sup>	p	R <sup>2</sup>	p	R <sup>2</sup>	p
<i>Aspergillus niger</i>	0.997	0.001	0.92	0.03	0.78	0.11	0.55	0.25
<i>Penicillium brevicompactum</i>	0.93	0.03	0.99	0.002	0.61	0.21	0.51	0.28
<i>Penicillium waksmanii</i>	0.87	0.06	0.88	0.58	0.55	0.28	0.48	0.3



**Figura 5.** Fosfato solubilizado por la cepa de *A. niger* (a), *P. brevicompactum* (b) y *P. waksmanii* (c) crecidas en diferentes fuentes de nitrógeno durante 21 días de incubación. Los datos son el promedio de tres repeticiones ± desviación estándar.

## DISCUSIÓN

Durante el proceso de solubilización en condiciones de laboratorio, es muy importante diseñar condiciones de cultivo, tipo y concentración de nutrientes, pH, temperatura, tiempo de incubación y oxigenación, óptimos para cada especie, puesto que estos factores influyen sobre los mecanismos involucrados en la solubilización de fosfato tales como la producción de ácidos orgánicos y enzimas.

Para la cepa de *Aspergillus niger* abordada en este estudio, el crecimiento con glucosa como fuente de carbono y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno proporcionó una mayor solubilización de fosfato. Estos resultados coinciden con los descritos por Saber *et al.* [19] y Yadav *et al.*, [20]; quienes reportaron para otras cepas de *A. niger* que la mayor solubilización se detectó cuando se cultivaron con glucosa que con otras fuentes de carbono. Es posible que, en este estudio, para la cepa de *A. niger* la solubilización esté ocurriendo por la vía de producción de ácidos orgánicos, ya que existen estudios donde se reporta que el ácido cítrico y oxálico son los agentes más frecuentes para la solubilización de fosfato [21; 22; 23].

Adicionalmente, Xu *et al.* [23] detectaron para *A. niger*, una mayor solubilización de fosfato y mayor concentración de ácido cítrico cuando se cultivó en un medio de cultivo con glucosa. Jinu *et al.*, [24] encontraron que para la cepa

*Aspergillus awamori* la maltosa fue la mejor fuente de carbono, seguida de la glucosa. Por otro lado, Relwani *et al.* [12] no descartan que, además de la acción de los ácidos orgánicos, las enzimas fosfatasa ácida y fitasa juegan un papel importante en la solubilización del fosfato *in vitro*. Asimismo, en este estudio, cuando las cepas de *P. brevicompactum* y *P. waksmanii* crecieron en fructosa se vio favorecida la solubilización del fosfato tricálcico. Existen pocos estudios donde se evalúe el efecto de fuentes de carbono sobre la solubilización de fosfato con cepas de *Penicillium* [25; 19; 8] y sólo en dos de ellos se utiliza fructosa como fuente de carbono. Relwani *et al.* [12] sugieren que los hongos, de acuerdo con la cepa y a la disponibilidad de la fuente de carbono en el medio, utilizan rutas metabólicas alternativas para producir diferentes ácidos orgánicos. De esta forma, es posible que para este estudio, las cepas de *P. brevicompactum* y *P. waksmanii* están solubilizando fosfato en presencia de fructosa mediante la producción de ácidos orgánicos a través del ciclo de los ácidos tricarbóxicos [26]. Para las cepas estudiadas (*A. niger*, *P. brevicompactum* y *P. waksmanii*) se detectó que la solubilización de fosfato tricálcico aumentó al acidificarse el medio de cultivo. Este evento ya se ha reportado en diversos estudios [26; 22; 27] y se menciona que está íntimamente relacionado con el

mecanismo principal por el cual los fosfatos son solubilizados, consistente en la producción de ácidos orgánicos que provocan la acidificación del medio extracelular [27]. Este dato sugiere que para las cepas evaluadas en este estudio cultivadas con glucosa, fructosa y arabinosa la solubilización pudo haber sido principalmente la vía de la producción de ácidos orgánicos, sin embargo, es necesario plantear futuros estudios para identificar y cuantificar los ácidos orgánicos implicados para llegar a una aseveración. Tanto el pH como la producción de biomasa fúngica tiene una fuerte influencia sobre la solubilización de fosfato tricálcico, ya que un aumento de la biomasa y una disminución del pH promovió una mayor solubilización. Algunos estudios muestran similitudes con cepas de hongos filamentosos crecidos con diferentes fuentes de carbono [25; 28].

El tratamiento con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno en la cepa de *A. niger* favoreció una mayor solubilización de fosfato tricálcico. Otras investigaciones con cepas de *A. niger* han demostrado resultados similares [26; 29; 28; 12; 30]. Harinathan *et al.*, [31] señalan que cuando las cepas se cultivan con sales de amonio (nitrógeno inorgánico) se favorece una mayor solubilización de fosfato en comparación con nitrógeno orgánico (urea, peptona y caseína). La asimilación de amonio

en las células fúngicas para la síntesis de aminoácidos puede convertir el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) en amoniaco ( $\text{NH}_3$ ), provocando la liberación de  $\text{H}^+$ , así mismo para mantener un pH citoplasmático óptimo, la célula expulsa el exceso de  $\text{H}^+$  acidificando el medio, lo que favorece la solubilización del fosfato [32]. Jain *et al.*, [24] con una cepa de *Aspergillus awamori* encontraron que, entre las fuentes de nitrógeno, el cloruro de amonio exhibió la máxima solubilización, seguido por el sulfato de amonio, el nitrato de sodio y la urea. Se encontró además que, el amonio en lugar del nitrato es más efectivo como única fuente de nitrógeno para la solubilización del fosfato.

En los resultados obtenidos, para las cepas de *P. brevicompactum* y *P. waksmanii* aunque la solubilización de fosfato tricálcico fue mayor en los tratamientos con sulfato de amonio (38 y 56% respectivamente), en comparación a las otras fuentes de nitrógeno (asparagina y urea), se detectó una mayor solubilización en el tratamiento control (57 y 71% respectivamente). Es importante resaltar que, si bien el tratamiento control no se le adicionó nitrógeno, el medio de Sundara utilizado contenía extracto de levadura y este representa un fuente mínima de nitrógeno. Una respuesta similar fue observada en *P. rugulosum* [33] y *P. purpurogenum* [8] y se documenta que se incrementa la solubilización de fosfato cuando

son cultivadas con bajas concentraciones de nitrógeno. De acuerdo con Kristiansen *et al.* [34] y Vrabel *et al.* [35], en algunos hongos la limitante de nitrógeno puede causar una alta conversión de los carbohidratos en ácido cítrico. En este sentido, Cunningham y Kuiak [36] y Gallmetser y Burgstaller [37], con cepas de *P. bilaii* y *P. simplicissium* detectaron una mayor producción de ácido cítrico bajo limitadas concentraciones de nitrógeno. Es posible que los ácidos orgánicos se concentren en altas cantidades, ya que al no participar en la biosíntesis de aminoácidos por la falta de nitrógeno, ocurre una acumulación de ácidos, en este caso el ácido cítrico. Como se ha mencionado anteriormente, el ácido cítrico tiene una alta efectividad para solubilizar fosfato [22].

Al analizar la relación entre la solubilización de fosfato tricálcico con el pH del medio, no se observaron relaciones significativas para ninguna de las tres cepas empleadas, debido a que el tratamiento control interfirió en este resultado. A pesar de que las cepas tuvieron una alta capacidad para solubilizar fosfato tricálcico con el control, no se detectó un fuerte descenso en el pH como con el tratamiento de sulfato de amonio, que podría ser causado por la ausencia de  $H^+$  provenientes de la asimilación del amonio. En todas las cepas, al comparar de manera aislada los medios con fuentes de

nitrógeno (sin el control) se observa una marcada relación entre el aumento de solubilización del fosfato tricálcico y la acidificación, tal como se encuentra documentado en Barroso *et al.* [28] y Rinu *et al.* [30]. Por lo que se puede inferir que las cepas del presente estudio cultivadas con sulfato de amonio, arabinosa y con urea solubilizan el fosfato por la producción de ácidos orgánicos y por la extrusión de  $H^+$  durante la asimilación del amonio.

Respecto a la relación entre la solubilización de fosfato tricálcico y la biomasa fúngica, a pesar de que no se detectaron relaciones significativas, se observó un patrón bien definido para las tres cepas estudiadas. Exceptuando en los medios con urea, se manifestó una mayor solubilización en los tratamientos con menor biomasa fúngica, siendo esta relación más evidente con el tratamiento control, en el cual se produjo una mayor solubilización y poca biomasa; estos resultados demuestran que la eficiencia de solubilización de P y la producción de ácidos orgánicos dependen realmente del pH del medio [8]; estos autores, han llevado a cabo experimentos utilizando varias fuentes de carbono y nitrógeno, y sugieren que los efectos de diferentes composiciones de medios sobre la solubilización de P podrían deberse a cambios en la excreción de ácidos orgánicos.

Las fuentes de carbono y nitrógeno fueron factores selectivos a nivel de género ya que para la cepa de *Aspergillus* los valores más altos de fosfato solubilizado se detectaron con la glucosa y el sulfato de amonio, mientras que para las cepas de *Penicillium*, fue la fructosa y el tratamiento con nitrógeno limitado favoreció una mayor solubilización. Por lo tanto, es factible suponer que la actividad solubilizadora de los hongos filamentosos estudiados varía de acuerdo con la fuente de carbono y nitrógeno disponible en el medio [8].

De acuerdo con los resultados, es importante señalar que la cepa nativa de *A. niger* tiene un gran potencial como solubilizador de fosfato, ya que además de presentar el valor más alto de solubilización (85%), este valor se detectó desde el día 9 de incubación. De manera general, las cepas de *A. niger*, *P. brevicompactum* y *P. waksmanii* muestran un alto potencial de solubilización de fosfato (67-85%), estos valores de solubilización resultan superiores a los detectados para otras cepas, los cuales no rebasan el 70% [38; 39; 26; 11; 29; 25; 28; 12; 19; 8; 20; 30]. De manera que, estas cepas de hongos presentan un alto potencial como bioinoculantes en suelos con baja disponibilidad de fósforo y altos contenidos de fosfatos insolubles.

## CONCLUSIONES

En este estudio *in vitro* con las diferentes fuentes de carbono se detectó que la cepa de *Aspergillus niger* mostró una mayor solubilización de fosfato tricálcico cuando se creció en glucosa en el día nueve de incubación, por su parte las cepas *Penicillium brevicompactum* y *P. waksmanii* mostraron, en el día 21 de incubación, una mayor solubilización de fosfato tricálcico cuando se crecieron en fructosa. Para las cepas de *A. niger* y *P. brevicompactum* la actividad de solubilización de fosfato tricálcico aumentó significativamente con la acidificación del medio de cultivo y con el incremento de la biomasa fúngica.

Bajo las diferentes fuentes de nitrógeno, la cepa de *A. niger* mostró una mayor solubilización de fosfato tricálcico cuando se creció en sulfato de amonio en el día nueve de incubación. *P. brevicompactum* y *P. waksmanii* mostraron una mayor solubilización de fosfato tricálcico cuando se crecieron en el tratamiento control (fuente limitada de nitrógeno) en el día 21 de incubación. Para las tres cepas (*A. niger*, *P. brevicompactum* y *P. waksmanii*), la actividad fosfato solubilizadora no se relacionó significativamente con pH del medio de cultivo, ni con la producción de biomasa fúngica. Esta contribución aporta las bases para futuros estudios encaminados al entendimiento de los

mecanismos o rutas metabólicas implicados en la solubilización de fósforo bajo diferentes condiciones de nutrientes.

### CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

### AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por CONACYT (C01-0194) “Aplicación de las interacciones fúngicas en la restauración y fertilización del suelo” (2011/169124) desarrollado en el Instituto de Ecología, A.C.

### REFERENCIAS

- [1]. Navarro G. Química agrícola: el suelo y los elementos químicos esenciales para la vida. Ediciones Mundi Prensa. Madrid. España 2003.
- [2]. Carlie M. J., Watkinson S. C. The Fungi. New York 1994.
- [3]. Coyne M. Microbiología del suelo: Un enfoque exploratorio. Paraninfo: Madrid. España 2000.
- [4]. Torriani-Gorini A., Yagil E., Silver S. Phosphate in microorganisms. American Society for Microbiology Press: Washington 1994.
- [5]. Sharma S. B., Sayyed R. Z., Trivedi M. H.,

Gobi T. A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. Springer Plus 2013; 2:587.

[6]. Illmer P., Schinner F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. Soil Biol Biochem 1992; 24:389-395.

[7]. Kang S. C., Pandey P., Khillon R., Maheshwari D. K. Process of rock phosphate solubilization by *Aspergillus* sp. PS 104 in soil amended medium. J Environ Biol 2008; 29(5):743-746.

[8]. Scervino J. M., Papinutti V. L., Godoy M. S., Rodríguez M. A., Della-Monica I., Recchi M., Pettinari M. J., Godeas A. M. Medium pH, carbon and nitrogen concentrations modulate the phosphate solubilization efficiency of *Penicillium purpurogenum* through organic acid production. J Appl Microbiol 2011;110: 1215-1223.

[9]. Sharma K. Inorganic phosphate solubilization by fungi isolated from agriculture soil. J Phyto 2011; 3(4):11-12.

[10]. Yasser M. M., Mousa A. S. M., Massoud O. N., Nasr S. H. Solubilization of inorganic phosphate solubilizing fungi isolated from Egyptian soils. J Biol Earth Sci 2014; 4(1): B83-B90.

[11]. Gómez-Guiñán Y., Zabala M.

Determinación de la capacidad solubilizadora del P en hongos aislados de la rizósfera del mani (*Arachis hypogaea* L.). Saber, Universidad de Oriente 2011; 13(1):8-13.

[12]. Relwani L., Krishna P., Reddy M. S. Effect of carbon and nitrogen sources on phosphate solubilization by a wild-type strain and UV-induced mutants of *Aspergillus tubingensis*. Curr Microbiol 2008; 57:401–406.

[13]. Stolp H. Microbial ecology: Organisms, habitats, activities. Cambridge. Cambridge University Press 1988.

[14]. Griffin D. H. Fungal physiology. Wiley-Liss. New York 1994.

[15]. Cooke R. C., Whipps J. H. Ecophysiology of the fungi. Blackwell 1993.

[16]. Sundara R., Sinha M. Organisms phosphate solubilizers in soil. Soil Sci Plant Nutr 1963; 9(2):45-49.

[17]. Clesceri S. L., Greenberg A. E., Trusell R. R. Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Díaz Santos. España 1992.

[18]. StatSoft, Inc. Statistica para Windows v. 10.0. Data analysis software system. Tulsa. [cd-Rom] 2017.

[19]. Saber W. I. A., Ghanem K. M., El-Hersh M. S. Rock phosphate solubilization by two isolates of *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp. and their promotion to mungbean plants. Res J

Microbiol 2009; 4(7): 235-250.

[20]. Yadav J., Verma J. P., Tiwari K. N. Solubilization of tricalcium phosphate by fungus *Aspergillus niger* at different carbon source and salinity. Trends Appl Sci Res 2011; 6(6):606-613.

[21]. Goldstein A. H. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspectives and future prospects. Am J Altern Agric 1986; 1:51-57.

[22]. Rashid M., Khalil S., Ayub N., Alam S., Latif F. Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganism (PSM) under *in vitro* conditions. Pak J Biol Sci 2004; 7(2):187-196.

[23]. Xu D. B., Madrid C. P., Röhr M., Kubicek C. P. The influence of type and concentration of the carbon source on production of citric acid by *Aspergillus niger*. Appl Microbiol Biotechnol 1983; 30:553–558.

[24]. Jain R., Saxena J., Sharma V. Solubilización de fosfatos inorgánicos por *Aspergillus awamori* S19 aislado de suelo rizosférico de una región semiárida. Ann Microbiol 2012; 62: 725–735.

[25]. Pradhan N., Sukla L. B. Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. Afr J Biotechnol 2005; 5 (10):850-854.

- [26]. Narsian V., Patel H. H. *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. *Soil Biol Biochem* 2000; 32:559-565.
- [27]. Pandey A., Das N., Kumar B., Rinu K., Trivedi P. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. isolated from soil samples of Indian Himalayan region. *World J Microbiol Biotechnol* 2008; 24:97–102.
- [28]. Barroso C. B., Pereira G. T., Nahas E. Solubilization of CaHPO<sub>4</sub> and AlPO<sub>4</sub> by *Aspergillus niger* in culture media with different carbon and nitrogen sources. *Braz J Microbiol* 2006; 37:434-438.
- [29]. Seshadri S., Ignacimuthu S., Lakshminarasimhan C. Effect of nitrogen and carbon sources on the inorganic phosphate solubilization by different *Aspergillus niger* strains. *Chem Eng Commun* 2004; 191:1043-1052.
- [30]. Rinu K., Malviya M. K., Sati P., Tiwari S. C., Pandey A. Response of Cold-tolerant *Aspergillus* spp. to solubilization of Fe and Al phosphate in presence of different nutritional sources. *Soil Sci Annu* 2013; 1-10.
- [31]. Harinathan B., Sankaralingam S., Prabhu D., Shankar T. Screening and characterization of phosphate solubilizing bacterium *Enterobacter cancerogenus* isolated from rhizosphere soil of local weed plants. *Int J Adv Sci Tech Res* 2014; 1:721-735.
- [32]. Habte M., Osorio N. W. Effect of nitrogen form on the effectiveness of a phosphate-solubilizing fungus to dissolve rock phosphate. *J Biofertil Biopestici* 2012; 3(5):100012.
- [33]. Reyes I., Bernier L., Simard R. R., Antoun H. Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *Microb Ecol* 1999; 28:281-290.
- [34]. Kristianses B., Charley R. C., Seviour B., Harvey L., Habeeb S., Smith J. E. Overproduction of metabolites by filamentous fungi. En: Krumphanzl V, Sikyta B, Vanek Z (Eds). *Overproduction of microbial products*. Academic Press: Londres 1982.
- [35]. Vrabl P., Fuchs V., Pichler B., Schinagl C. W., Burgstaller. Organic acid excretion in *Penicillium ochrochloron* increases with ambient pH. *Front Microbiol* 2012; 3 (121)1-10.
- [36]. Cunningham J. E., Kuiuack C. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58(5):1451–1458.
- [37]. Gallmetzer M., Burgstaller W. Citrate efflux in glucose-limited and glucose-sufficient chemostat culture of *Penicillium simplicissium*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2001; 79: 81–87.
- [38]. Borie B. F., Quinteros Q. J., Aguilera S.

M. Bioquímica de suelos derivados de cenizas volcánicas: IV. Solubilización de fosfatos por hongos del suelo. *Agric Tec* 1983; 43(4):371-376.

[39]. Nahas E. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. *World J Microbiol Biotechnol* 1996; 12:567-572.