

# **Evaluación de la solubilización de fósforo de una roca fosfórica colombiana por *Aspergillus tubingensis***

Valentina Laborde González

## **Director**

Balkys Esmeralda Quevedo Hidalgo

## **Co-director**

Lucía Ana Díaz Ariza

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS, DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA  
CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL  
BOGOTA D.C, COLOMBIA  
2021

# **Evaluación de la solubilización de fósforo de una roca fosfórica colombiana por *Aspergillus tubingensis***

Valentina Laborde González

---

**Director**

Balkys Esmeralda Quevedo Hidalgo

---

**Co-director**

Lucía Ana Díaz Ariza

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA  
CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL  
BOGOTA D.C  
2021

## **Nota de advertencia**

### **Artículo 23 de la Resolución No 13 de julio de 1946:**

"La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por qué no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por qué las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia"

## **Agradecimientos**

Mi mayor agradecimiento a la profesora Balkys Quevedo por presentarme y orientarme en este proyecto así como también a Lucía Ana Díaz por sus consejos y enseñanzas.

A Valentina Gandur por su tiempo, paciencia y dedicación en enseñarme y acompañarme en cada etapa de este proyecto.

Pero sobre todo, a mi mamá por su amor, esfuerzo y compañía a lo largo de esta carrera.

## Tabla de contenido

### Resumen

1. Introducción
2. Planteamiento del problema y justificación
3. Marco teórico
  - 3.1 Ciclo del fósforo
  - 3.2 Mecanismos de solubilización de fósforo.
  - 3.3 Rocas fosfóricas
  - 3.4 Microorganismos solubilizadores de fósforo
4. Antecedentes
5. Metodología
  - 5.1 Cinética de crecimiento de *Aspergillus tubingensis* en medio NBRIP modificado.
    - 5.1.1 Producción de inóculo.
    - 5.1.2 Curva de crecimiento de *Aspergillus tubingensis* en medio NBRIP.
  - 5.2 Técnicas analíticas
    - 5.2.1 Determinación de biomasa
    - 5.2.2 Determinación de pH y acidez titulable
    - 5.2.3 Glucosa residual
    - 5.2.4 Cuantificación de ácidos orgánicos
    - 5.2.5 Determinación de fósforo soluble
6. Resultados y discusión
  - 6.1 Curva de crecimiento de *Aspergillus tubingensis* en medio NBRIP modificado suplementado con roca fosfórica de Boyacá – Colombia.
  - 6.2 Curva de crecimiento de *Aspergillus tubingensis* en medio NBRIP modificado suplementado con fosfato tricálcico.
  - 6.3 Comparación de las curvas de crecimiento de *Aspergillus tubingensis* de roca fosfórica de Boyacá y fosfato tricálcico.
  - 6.4 Producción de ácidos orgánicos.
7. Recomendaciones
8. Conclusiones
9. Bibliografía

## Resumen

La solubilización de rocas fosfóricas-RP es una estrategia que acompaña su aplicación para suplir la demanda de fósforo en diferentes cultivos a nivel mundial. Este proceso puede ser llevado a cabo por diferentes microorganismos, dentro de los cuales está *Aspergillus tubingensis* que es un hongo filamentoso caracterizado por producir ácidos orgánicos como oxálico, cítrico y glucónico, involucrados en el proceso de liberación de fósforo a partir de RP y de fosfato tricálcico. En este trabajo se evaluó la capacidad de *A. tubingensis* de solubilizar una roca fosfórica de Boyacá Colombia, se determinaron pH, acidez titulable, producción de ácidos orgánicos y concentración de fósforo soluble en cultivos discontinuos del hongo en medio NBRIP suplementado con RP o con fosfato tricálcico. El hongo solubiliza el 87 % de fósforo a partir de RP de Boyacá y el 97,7 % a partir de fosfato tricálcico y produce ácido cítrico, glucónico y oxálico en presencia de las dos fuentes de P, lo que determina su potencial como solubilizador de P.

## 1. Introducción

El fósforo (P) es uno de los macronutrientes esenciales para el desarrollo de los organismos, hace parte de la estructura de los nucleótidos, y participa en diferentes vías metabólicas y en el almacenamiento de energía, constituye el 0,2% del peso seco de las plantas lo que lo hace uno de los nutrientes fundamentales en el crecimiento vegetal [1][2]. Las actividades antropogénicas, el mal manejo del suelo ha causado deficiencias en las formas disponibles del elemento, limitando su asimilación por las plantas [3].

Este elemento es altamente reactivo, más del 80% se encuentra en forma insoluble en el suelo, tiende a reaccionar con las partículas minerales de aquel y a precipitarse con iones ( $Al^{+3}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Ca^{+2}$ ), formando fosfatos no disponibles para las plantas. Además de esto, en los diferentes procesos involucrados en el ciclo del fósforo se pueden generar pérdidas hacia cuerpos de agua causando eutrofización, principal impacto ambiental de las prácticas de fertilización indiscriminada con productos de síntesis química [4].

Los fertilizantes minerales han sido utilizados por décadas, su uso ha aumentado por el rápido crecimiento en la población y por el aumento en la demanda de alimentos. La necesidad de aumentar la productividad de los cultivos agrícolas determina la aplicación de productos que contengan fósforo, nitrógeno, calcio, potasio, magnesio y otros nutrientes requeridos en el crecimiento y desarrollo vegetal [5] [6]. El mal manejo de los suelos y el uso excesivo de estos fertilizantes minerales fosfatados han provocado daños ambientales, algunos irreversibles, como infertilidad de suelos y

acumulación de P no disponible para las plantas en el suelo por lo que es común seguir adicionándolo para mantener la productividad de los cultivos. Las grandes cantidades de este elemento retenido en el suelo, se podrían movilizar con estrategias biológicas como la aplicación de microorganismos solubilizadores, reduciendo el uso excesivo de productos de síntesis química y de fuentes naturales de P, como las RP [7].

Alrededor del mundo existen depósitos de RP, fuente natural finita de P inorgánico muy insoluble compuesta de apatita, utilizada en la producción de fertilizantes minerales. Su aplicación directa y en conjunto con microorganismos está en constante estudio para lograr un uso eficiente del recurso que pueda ayudar a suplir la alta demanda de nutrientes en la agricultura, impactando positivamente además la industria de alimentos y diversas industrias que dependen del sector agrícola [8][6].

Para lograr la solubilización de P y su disponibilidad en el suelo, los microorganismos solubilizadores juegan un papel importante por sus capacidades de transformación del elemento. Dentro de este grupo de microorganismos se encuentran bacterias de géneros como *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. y hongos filamentosos como *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. Éstos han sido de interés en el sector agrícola por su capacidad de solubilizar y mineralizar el fósforo no disponible del suelo utilizando diferentes mecanismos como la producción de ácidos orgánicos, disminución del pH, secreción de enzimas, entre otros, que permiten liberar el P de las formas en las que se encuentra en el suelo como apatitas y fosfatos de Al, Ca y Fe para transformar esas moléculas en ortofosfatos ( $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$  y  $\text{HPO}_4^{-2}$ ) los cuales son las moléculas asimilable por las plantas [9].

Teniendo en cuenta los mecanismos de los microorganismos para solubilizar el P, el uso de estos para liberar el elemento a partir de la roca fosfórica está siendo ampliamente estudiado ya que convencionalmente para su extracción se requiere el uso de ácidos fuertes como el ácido sulfúrico. Se ha demostrado que los ácidos orgánicos producidos por microorganismos son eficientes en la solubilización de las RP, pudiendo alcanzar valores hasta del 100% en hongos del género *Aspergillus* lo que lo hace muy promisorio en la industria de biofertilizantes a nivel mundial [10] Así, el objetivo de este estudio es evaluar la capacidad solubilizadora de fósforo de *Aspergillus tubingensis* en una roca fosfórica colombiana.

## **2. Planteamiento del problema y justificación**

El uso excesivo de fertilizantes fosfatados para cumplir con la demanda de alimentos a nivel mundial está generando daños irreversibles en los suelos sobre todo en Asia, África y América Latina, en donde éstos tienen un alto grado de acidez con bajos niveles de P generando limitaciones y bajas productividades en los cultivos. Además, por las diferentes prácticas de deforestación y pastoreo se

está incrementando el área de tierras infértiles teniendo una disminución de P disponible [6]. La limitación de P en el suelo se ha tratado de resolver con la adición de fertilizantes minerales, pero su uso excesivo ha causado mayor retención del elemento lo que ocasiona mayores afectaciones en la productividad de los cultivos [6]. Como alternativa, se ha usado la aplicación directa de RP ya que tiene un alto contenido de fósforo inorgánico, aunque es altamente insoluble, por lo que se ha considerado el uso de microorganismos que aumenten la cantidad de fósforo que puede liberarse a partir de la RP en los cultivos. Se estima que, si no se implementan estrategias para la optimización de los contenidos de P disponible a partir de este recurso no renovable, los depósitos de RP a nivel mundial pueden agotarse en 50 o 100 años [7][6]. Los suelos muy ácidos, incluyendo los sulfatados ácidos y oxisoles con pH entre 3,3 y 4,5 respectivamente, tienen alto grado de infertilidad y alta toxicidad por reacciones del aluminio con otros compuestos por lo que se utilizan altas dosis de productos minerales cuyo exceso y mal manejo están causando la reducción de la producción y productividad agrícola. El alto grado de acidez además, provoca baja absorción de nutrientes esenciales por parte de las plantas sobre todo del fósforo lo que ha causado graves afectaciones nutricionales en las plantas al establecer allí diferentes cultivos para responder a la demanda del país [11].

Es indispensable a nivel mundial buscar fuentes alternativas de fósforo y sistemas sostenibles para la biodisponibilidad de éste en los suelos utilizados en la agricultura. El uso de roca fosfórica en conjunto con microorganismos promotores de crecimiento vegetal capaces de solubilizar fósforo, es una solución viable para transformar el P inorgánico no disponible en ortofosfatos para las plantas y así disminuir el daño en los suelos, el agotamiento de las fuentes naturales de P y poder aumentar la productividad de los cultivos.

### **3. Marco teórico**

#### **3.1 Ciclo del fósforo**

El fósforo (P) es un elemento esencial en microorganismos, plantas, animales y humanos; en las plantas es importante que se encuentre en el suelo en su forma inorgánica, soluble y disponible como ortofosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$  y  $\text{HPO}_4^{-2}$ ) para poder ser absorbido y utilizado para promover el crecimiento y desarrollo vegetal [12]. Éste, participa en diferentes funciones celulares en cuanto a procesos bioquímicos relacionados con la estructura de las macromoléculas como los ácidos nucleicos, y la transferencia de ATP en procesos de degradación y en vías metabólicas [13]. El P se encuentra en el suelo de forma orgánica e inorgánica no disponible, la forma más abundante se encuentra en fosfatos que reaccionan y forman complejos con iones de aluminio, calcio y hierro lo que genera un limitante

del crecimiento vegetal al estar en su forma no disponible, estos fosfatos se encuentran en una cantidad de 0,05% en el suelo y lo que se encuentra en la planta es solo un 0,2% en peso seco demostrando así la poca facilidad de captación de este elemento [14].

Procesos como la meteorización, la descomposición de materia orgánica y el uso de fertilizantes minerales fosfatos provocan la acumulación y dispersión de P inorgánico y orgánico no disponible, mientras que la desorción genera pérdida del nutriente a cuerpos de agua causando mayor dificultad en la obtención de éste por los organismos [15-16-17]. Esta forma no disponible, se forma por la reacción de las fuentes de P con iones presentes en el suelo, por lo que los microorganismos presentes en el suelo juegan un papel importante en el crecimiento y desarrollo vegetal por llevar a cabo mecanismos de solubilización de P incrementando la concentración de su forma disponible y asimilable para las plantas [18].

### **3.2 Mecanismos de solubilización de fósforo**

Para hacer disponible el fósforo, los microorganismos capaces de liberarlo del suelo a través de diferentes mecanismos de solubilización y mineralización, denominados solubilizadores de fósforo incluyen hongos y bacterias de diferentes especies [19-2]. Para solubilizar el P inorgánico producen y liberan al medio sideróforos, iones hidroxilo y ácidos orgánicos como ácido acético, glucónico, oxálico, succínico, málico, entre otros. Estos ácidos, de bajo peso molecular, además de disminuir el pH del medio, actúan como quelantes fundamentales para la solubilización de P inorgánico conformado por complejos con calcio, aluminio y hierro [9-20]. Para mineralizar el P orgánico, varios grupos microbianos producen enzimas como fosfatasas, C-P liasas y fitasas que hidrolizan los enlaces fosfodiéster de las diferentes formas del P orgánico provocando su liberación [20].

### **3.3 Rocas fosfóricas**

Hay una recurrente preocupación por la disminución de reservas de fósforo, pues con el paso del tiempo y con el mal manejo se han ido agotando, siendo ejemplo las rocas fosfóricas que son la mayor fuente natural inorgánica del elemento. Las RP son base dentro del proceso de producción de fertilizantes y de productos industriales, convirtiéndolas en elementos de estudio de importancia económica [21]. Estas rocas están compuestas por fosfato de calcio el cual hace parte del grupo mineral apatita en donde se encuentra unido a iones de Cl, F y OH, esta forma es liberada naturalmente por meteorización o por extracción minera con ácidos fuertes y diferentes procesos físicos para la producción de fertilizantes [22]. La extracción de la roca no es económicamente sostenible y la disponibilidad de P logrado es bajo, por lo que se ha venido aplicando en altas dosis generando efectos adversos en los suelos y en la disminución de los depósitos del recurso natural, lo que generará escasez

dentro de unos 50 – 100 años provocando problemas a nivel mundial de escasez de alimentos y de suelos productivos [22]. Sin embargo, con el pasar de los años, nuevos yacimientos han sido encontrados y explotados alrededor del mundo como en Estados Unidos, que ocupa el primer lugar en explotación masiva, seguido de China y otros países en América Latina como Perú, México, Brasil y Colombia, los cuales han tenido un alto interés en el uso de este recurso para mejorar la agricultura [21].

### **3.4 Microorganismos solubilizadores de fósforo**

Los microorganismos solubilizadores de fósforo aumentan la disponibilidad del nutriente para las plantas favoreciendo su desarrollo y aumentando su productividad [23]. Este grupo incluye bacterias de géneros como *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhizobium* sp. y actinobacterias y hongos filamentosos como *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y algunos hongos formadores de micorrizas productores de ácidos orgánicos [24]. El uso de hongos filamentosos ha generado un gran interés en la producción de biofertilizantes por su capacidad de solubilizar P por medio de la producción de ácidos orgánicos especialmente el ácido oxálico que ha demostrado alta efectividad solubilizando rocas y fosfatos en el suelo, este ácido ha logrado solubilizar en un 100% el P de diferentes tipos de RP por lo que se ha podido comparar con el ácido sulfúrico, utilizado normalmente en la industria para la extracción de la roca, y ha demostrado que puede ser una alternativa funcional para dejar a un lado los químicos fuertes y disminuir los costos [10]. Es por esto que se ha tenido un gran interés en *Aspergillus tubingensis*, este hongo es capaz de producir varios ácidos orgánicos como ácido oxálico, cítrico y glucónico con los cuales se destaca por tener un alto porcentaje de solubilización del 95% en comparación con otras especies de *Aspergillus* en presencia de roca fosfórica, demostrando que los hongos tienen el potencial para solubilizar P y hacerlo disponible para las plantas mejorando la problemática de exceso del elemento inorgánico no disponible y de la limitación de este elemento en el suelo [25-26].

## **4. Antecedentes**

El estudio de la solubilización de RP a partir de la producción de ácidos orgánicos por diversos microorganismos ha tenido auge en las últimas dos décadas donde diversos autores alrededor del mundo se han dedicado a evaluar las capacidades y los diferentes mecanismos de solubilización que sean eficientes para luego escalarlo al uso en los cultivos. Los estudios de Reddy et al. [26] muestran las evaluaciones de diferentes tipos de rocas fosfóricas con *Asperillus tubingensis* y *Aspergillus niger* donde obtuvieron porcentajes de solubilización de 97, 89 y 75 % [26]. Por otro lado, autores de Brasil como Gilberto de Oliveira Mendes et al. [27] y de España como Nikolay Vassilev et al. [28] han

dedicado en las últimas dos décadas a la evaluación de la producción de ácidos orgánicos por diferentes hongos filamentosos, obteniendo como resultado en sus estudios producción de ácidos como oxálico, cítrico y glucónico con porcentajes de solubilización diferentes al utilizar RP ígneas y sedimentarias. Han encontrado que el ácido oxálico es capaz de solubilizar en una hora el 75 % de una RP y han realizado estudios de optimización de los procesos biotecnológicos para lograr la solubilización y producción eficiente de los ácidos [27-28].

Por otro lado, el enfoque de estos estudios se basa en llegar a poder utilizar de manera más eficiente las rocas fosfóricas en conjunto con los microorganismos para formular biofertilizantes en diferentes tipos de cultivos como maíz, así lo muestran los estudios de Yin et al. donde se evalúa *Aspergillus aculeatus* y su potencial solubilizador de RP Fanshan por medio de la producción de ácido cítrico, láctico, tartárico y oxálico para posteriormente inocular plantas de maíz teniendo como resultado un efecto positivo en el crecimiento de las plantas [29].

En la Pontificia Universidad Javeriana se han desarrollado diferentes proyectos relacionados con la solubilización de RP y los mecanismos involucrados. Parada, evaluó el crecimiento y potencial de solubilización de *Penicillium janthinellum* y *Neosartorya glabra* en presencia de diferentes rocas fosfóricas ígneas y sedimentarias y de fosfato tricálcico. Se determinó la producción de ácido oxálico y cítrico, en presencia de fosfato tricálcico fue mayor la concentración de ácido oxálico con un valor de 36.6 mM y en presencia de RP de Argelia se tuvo un valor de 30.93 mM con *Penicillium janthinellum* [30].

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Evaluar el efecto de la roca fosfórica de Boyacá y el fosfato tricálcico sobre la solubilización de fósforo y la producción de ácidos orgánicos.

### **Objetivos específicos**

1. Evaluar la cinética de crecimiento de *Aspergillus tubingensis* usando roca fosfórica y fosfato tricálcico.
2. Comparar el efecto de solubilización de una fuente inorgánica natural y una sintética por *Aspergillus tubingensis*.

## **5. Metodología**

## **5.1 Cinética de crecimiento de *Aspergillus tubingensis* en medio NBRIP modificado**

### **5.1.1 Producción de inóculo**

El hongo, identificado como *Aspergillus tubingensis*, que se utilizó para el inóculo fue aislado de la raíz modificada de *Pinus caribaea* colonizado por el hongo ectomicorrizico *Pisolithus tinctorius* en Villanueva-Casanare. Para reactivar el cultivo se tomó del banco de papel filtro del Laboratorio de Asociaciones Suelo Planta-Microorganismo (LAMIC) y se activó en agar PDA, incubándolo por 3 días a 25°C, posteriormente se realizaron repiques en agar PDA incubando por 4 días a 25°C. Para desprender los conidios se agregó Tween 80 al 0,1% a cada caja utilizando un rastrillo, seguido esto se pasó a través de una jeringa con algodón previamente esterilizada, después se realizaron dos lavados con solución salina (8000 rpm, 10 min centrifuga MEGAFUGE 16R THERMO), para obtener una concentración final de  $7 \times 10^7$  conidios/mL.

### **5.1.2 Curva de crecimiento de *Aspergillus tubingensis* en medio NBRIP**

La curva de crecimiento se realizó en Erlenmeyer de 100 mL, cada 18 mL de medio NBRIP modificado (Glucosa 10 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$  13.9 g/L, KCl 1 g/L,  $\text{MgCl}_2 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$  1.25g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5 g/L), roca fosfórica Fosforita 26® procedente del departamento de Boyacá (3g/L) y 2 mL de inóculo. Se incubó a 25°C y 180 rpm durante 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 h). El ensayo se realizó por triplicado en cada tiempo de muestreo y se incluyeron tres controles abióticos que fueron evaluados a la hora 120, siguiendo la metodología de Della-Mónica [31]. Para procesar las muestras, se utilizó un sistema de filtración Millipore con filtros conectado a una bomba de vacío para separar la biomasa que se cuantificó por peso seco y el filtrado se centrifugó a 8000 rpm por 10 min en una centrifuga MEGAFUGE 16R THERMO, el sobrenadante obtenido se almacenó en alícuotas de 7,5,3 y 2 ml a -20°C hasta el día de uso, a estas muestras se le midió glucosa residual, pH, acidez titulable, fósforo soluble y producción de ácidos orgánicos. Se realizó otra curva siguiendo el mismo procedimiento, pero con fosfato tricálcico (3 g/L) como fuente de fósforo.

## **5.2 Técnicas analíticas**

### **5.2.1 Determinación de biomasa**

En cada muestreo se tomó el peso seco, para lo cual se filtró la muestra y posteriormente se secó a 80°C por 72 h, finalmente se calcinó en una mufla a 500°C por 8 horas Silvia [32], tomando el peso una vez estuvo fría la caja en una balanza analítica después de cada paso.

### **5.2.2 Determinación de pH y acidez titulable**

Se midió el pH con un pHmetro y la acidez titulando 5 mL de sobrenadante con 0.1 N de NaOH usando fenolftaleína como indicador [32].

### **5.2.3 Glucosa residual**

Con el sobrenadante obtenido de cada hora de muestreo se realizó la técnica de DNS de Miller [33]. Se mezcló 0,25 ml de muestra con 0,25 ml de reactivo DNS, se puso en ebullición durante 5 min y posteriormente se detuvo la reacción sumergiendo los tubos en hielo durante 5 min siempre protegiendo de la luz, luego se adicionó 2,5 ml de agua destilada para finalmente leer la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm. Para determinar la concentración se hizo una curva patrón con glucosa 0,5 a 2 g/L ver anexo 1 [33].

### **5.2.4 Cuantificación de ácidos orgánicos**

Los ácidos orgánicos se cuantificaron por HPLC con una columna Aminex HPX87H, la fase móvil fue ácido sulfúrico 0.05 N a un flujo de 0.6 mL. min<sup>-1</sup> y la temperatura de la columna fue 50°C. La elución fue analizada con un detector UV a 210 nm. Para realizar la cuantificación se realizaron curvas patrón con los ácidos orgánicos incluidos cítrico, oxálico, glucónico y fórmico (a una concentración de 10, 6, 4, 2, 1.5, 1, 0.5 mM) [34-35].

### **5.2.5 Determinación de fósforo soluble**

Se determinó el P soluble con el método de molibdato de vanadato usando el kit de fósforo Spectroquant® 0.5-25.0 mg/L (PO<sub>4</sub>-P), se tomó 1 ml de muestra y se adicionaron 0,244 mL de reactivo. Se leyó a una longitud de onda de 450 nm en el espectrofotómetro HACH DR6000 UV-VIS. Para la determinación se hizo una curva patrón de fósforo (a una concentración de 0,5 a 30 ppm) ver anexo 2. [36].

## **6. Resultados y discusión**

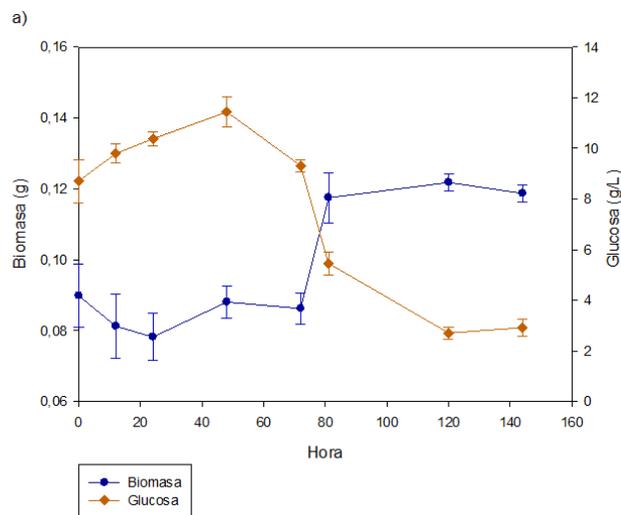
### **6.1 Curva de crecimiento de *Aspergillus tubingensis* en medio NBRIP modificado suplementado con Fosforita 26 ® de Boyacá - Colombia**

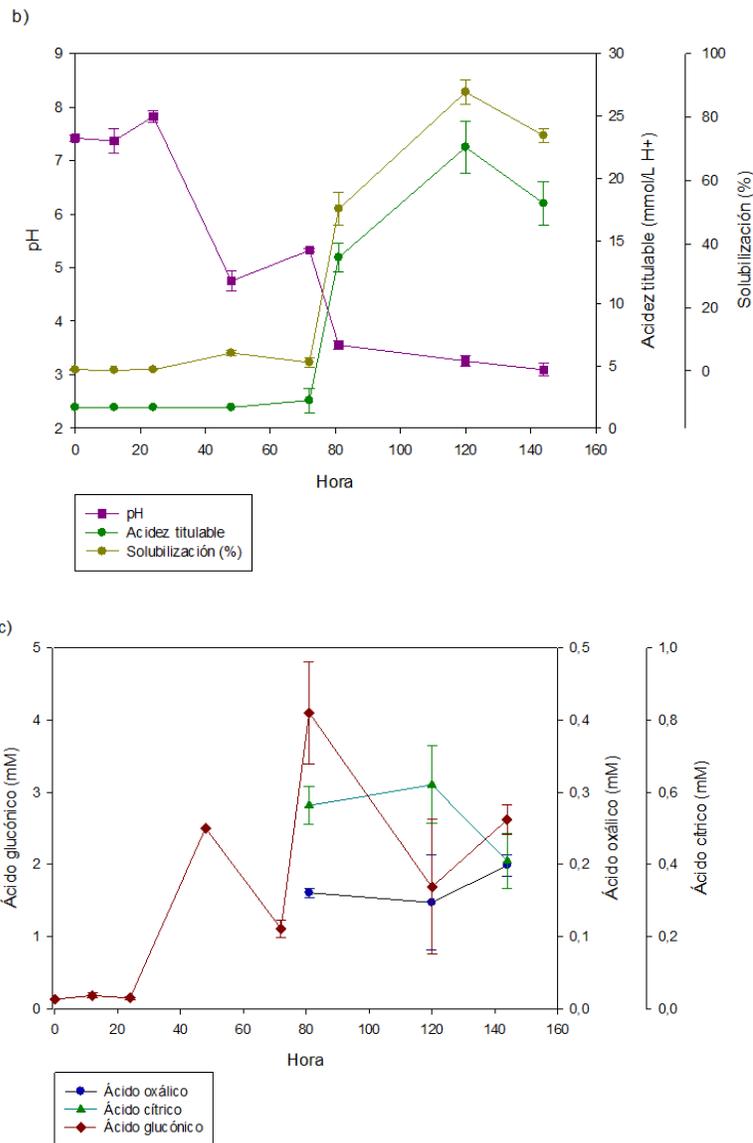
Se demostró que *Aspergillus tubingensis* fue capaz de solubilizar Fosforita 26 ®; en la **Figura 1a** se muestra el crecimiento del hongo el cual tuvo una fase exponencial que inició en la hora 72 lo que es coherente con el consumo de glucosa que indujo la producción de ácidos orgánicos y por ende la disminución del pH por acción del metabolismo del hongo. Teniendo en cuenta el porcentaje de solubilización máximo de 87% en la hora 120 (**Figura 1b**), se observa que está directamente relacionado con la disminución del pH de 7,42 a 3,26 y el incremento en la acidez titulable relacionado

con la liberación de hidrogeniones que está involucrado en la disminución del pH. La solubilización es comparable con los estudios realizados por de Oliveira et al. [37] quienes obtuvieron 76% de solubilización de la RP Patos – Brasil utilizando *Aspergillus niger* [37].

La producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular como oxálico, cítrico y glucónico (**Figura 1c**), se sugiere como uno de los mecanismos de *A. tubingensis* para la solubilización del fósforo del medio [20]. Se puede determinar que el ácido glucónico se empieza a producir rápidamente desde la hora 24 logrando su mayor concentración en la hora 81 con un valor de 4,09 mM, este valor es mayor que el valor reportado con *Aspergillus niger* de 2,94 mM por Mendes et al. [27].

También se muestra que se obtuvo una concentración de 0,20 mM de ácido oxálico lo cual es un valor cercano al compararlo con los estudios realizados por Xiao et al. [38] donde se obtuvo una concentración de 0,4 mM de ácido oxálico utilizando *Aspergillus niger* WHAK1 para solubilizar una roca fosfórica de Hubei, China [38].





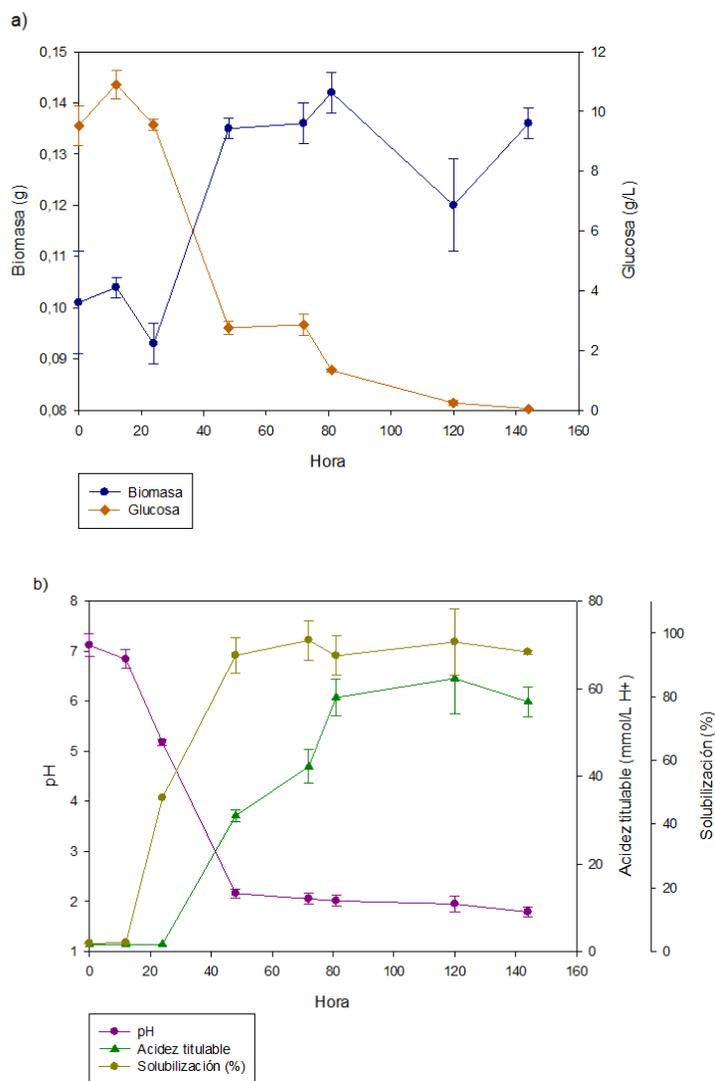
**Figura 1.** Cinética de crecimiento de *Aspergillus tubingensis* en caldo NBRIP modificado suplementado con Fosforita 26® – Colombia.

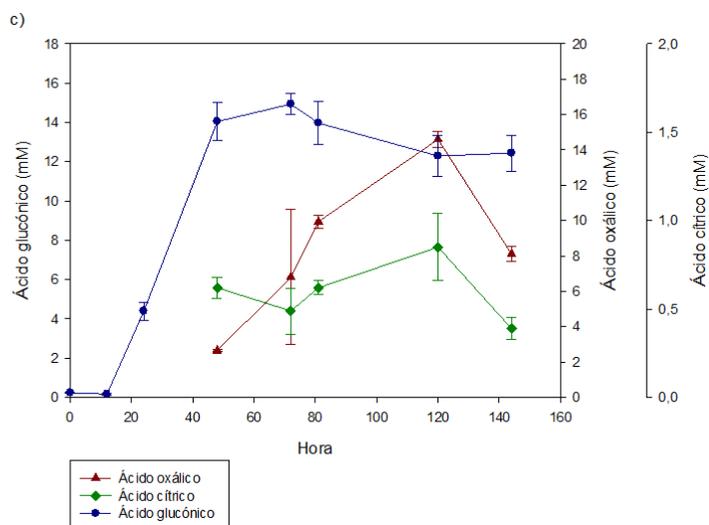
### 6.2 Curva de crecimiento de *Aspergillus tubingensis* en medio NBRIP modificado suplementado con fosfato tricálcico.

Teniendo en cuenta que se realizó el mismo procedimiento que con Fosforita 26®, el comportamiento de *Aspergillus tubingensis* en presencia de fosfato tricálcico es totalmente diferente como se puede ver en la **Figura 2a** y **2b**, donde la biomasa aumenta exponencialmente desde la hora 24, el pH disminuye simultáneamente de 7,12 a 1,79 seguido del incremento en la acidez titulable y en el porcentaje de solubilización, teniendo como valor máximo 97,7 % a la hora 72, lo que indica que

solubilizó casi totalmente la fuente de P así como lo muestra Mendes et al. [27] en sus estudios con *Aspergillus niger* y fosfato tricálcico logrando una solubilización del 100 %.

En la **Figura 2c** pueden observarse los ácidos orgánicos producidos (oxálico, cítrico y glucónico) siendo el ácido glucónico el de mayor concentración (14,96 mM) en la hora 72 lo que tiene relación con el punto máximo de solubilización, asimismo en los otros dos ácidos su valor máximo se obtuvo en la hora 120 siendo para ácido oxálico 14,6 mM y para ácido cítrico 0,85 mM.





**Figura 2.** Cinética de crecimiento de *Aspergillus tubingensis* en caldo NBRIP modificado suplementado con fosfato tricálcico – Colombia

### 6.3 Comparación de las curvas de crecimiento de *Aspergillus tubingensis* de roca fosfórica de Boyacá y fosfato tricálcico

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la curva de crecimiento con roca fosfórica, es notorio que el hongo en presencia de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  tiene un crecimiento más rápido, una mayor acidificación del medio llegando a un pH final de 1,79 al final del proceso y por ende un porcentaje de solubilización mayor de 97,7 %, mientras que con RP Boyacá se obtuvo 24 horas después de la hora máxima de solubilización de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  un 87 % de solubilización como se puede ver en la **Tabla 1** lo que demuestra que el hongo es más eficiente con esta fuente de P. Esto se debe al cambio de fuente de fósforo ya que el fosfato tricálcico es una fuente de P inorgánica pura que con una disminución de pH de 7 a 4 ya logra su solubilización mientras que la roca fosfórica es altamente insoluble y tiene una composición más compleja lo que requiere de condiciones más fuertes para su solubilización, como lo muestra en sus estudios Klačic [39] al comparar la solubilización de fosfato tricálcico y RP Boyavar con *Aspergillus niger* donde se obtuvo una disminución de pH hasta 3, una solubilización de 40% de RP siendo menor a la que obtuvieron con fosfato tricálcico [39]. Además de esto, la producción de ácidos orgánicos en presencia de RP disminuye (**Tabla 1**) y esto puede deberse a la composición compleja de la roca que durante el proceso se pueden liberar diferentes elementos como Zn, Mg, Mn y Cu que pueden tener un efecto inhibitorio en la producción de estos ácidos por formación de fosfatos de manganeso por ejemplo los cuales son insolubles. [40].

Otra posible razón por la cual en presencia de RP Boyacá se tiene un porcentaje de solubilización alto pero bajas concentraciones de ácidos orgánicos a comparación de los valores obtenidos con fosfato tricálcico (**Tabla 1**), se puede deber la presencia de otro tipo de mecanismos de solubilización como liberación de protones que acidifican el medio solubilizando el P retenido en la roca. Chuang et al. [41], plantean que la cantidad de P soluble obtenido con *Aspergillus niger* en sus experimentos puede deberse a la liberación de H<sup>+</sup> producto del proceso de asimilación del amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) presente en el medio de cultivo. El medio de cultivo del presente estudio contenía (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como fuente de nitrógeno [42].

**Tabla 1.** Comparación de las curvas de crecimiento de roca fosfórica y Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.

Parámetros	RP Fosforita 26 ® Boyacá	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>
Hora de mayor solubilización	120	72
Ácido oxálico (mM)	0,20	14,60
Ácido cítrico (mM)	0,620	0,85
Ácido glucónico (mM)	4,10	14,93
% Solubilización	87	97,70%
Y <sub>x/s</sub> max (g/g)	0,27	0,26
Q <sub>x/s</sub> (mg/L/h)	0,3	2
Q <sub>p</sub> max oxálico (mM/h)	0,0014	0,122
Q <sub>p</sub> max cítrico (mM/h)	0,0052	0,007
Q <sub>p</sub> max glucónico (mM/h)	0,0182	0,207
YFósforo/x (g/g)	0,023	0,036

Y<sub>x/s</sub> rendimiento biomasa/sustrato. Q<sub>x</sub> productividad máxima de biomasa. Q<sub>p</sub> productividad máxima de producto.

Por otro lado, la Fosforita 26 ®, mostró tener ligeramente un mayor rendimiento biomasa/sustrato (Y<sub>x/s</sub>), aunque evaluando las productividades máximas de biomasa y productos (Q<sub>x</sub>, Q<sub>p</sub>), el fosfato tricálcico sigue teniendo valores mayores lo que indica que esta fuente es favorable para la producción de estos ácidos y la solubilización de este tipo de compuestos, lo que lleva a concluir que el uso de *Aspergillus tubingensis* en presencia de roca fosfórica es una alternativa que promueve la

solubilización de fósforo. También es importante recordar que este proceso puede ser realizado por diferentes especies de microorganismos que pueden llegar a tener mejores rendimientos y resultados que los presentados en este estudio, comparando el rendimiento fósforo/biomasa se pudo evidenciar que con *Aspergillus tubingensis* fue mayor en presencia de fosfato tricálcico lo que puede ser comparado con los estudios de Parada [30] donde evaluó la solubilización de diferentes fuentes de fósforo incluyendo  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  y RP Argelia por *Penicillium janthinellum* y *Neosartorya glabra* obteniendo en un Yfósforo/biomasa de 0,0113 g/g mientras que en este estudio se obtuvo 0,036 g/g y en cuanto a las rocas fosfóricas RP Argelia tuvo un valor mayor de 0,054 g/g mientras que la Fosforita 26® RP Boyacá un rendimiento de 0,0225 g/g, esta diferencia en las rocas se puede deber a que RP Argelia tiene 29% de  $\text{P}_2\text{O}_5$  y RP Boyacá 26% aunque ambas rocas son sedimentarias – hidroxiapatitas [30].

Se hace la comparación de los resultados de los estudios realizados por Gandur [43] con *Aspergillus tubingensis* y roca fosfórica de Aipe, Huila que demuestran el cambio de comportamiento del hongo en presencia de fuentes diferentes de fósforo; en este trabajo el hongo con RP Aipe empezó su fase exponencial desde la hora 24 teniendo un crecimiento más rápido en comparación con RP Boyacá pero ambas rocas obtuvieron el máximo valor de solubilización a la hora 120 siendo para RP Aipe 95% asimismo la producción de ácidos orgánicos (oxálico, cítrico y glucónico) empezó primero, en ambas rocas el ácido glucónico fue el de mayor concentración entre los tres producidos pero en la Fosforita 26® RP Boyacá se obtuvo una mayor concentración de 2,617 mM en comparación con 1,34 mM de RP Aipe [43].

#### **6.4 Producción de ácidos orgánicos**

Los ácidos orgánicos producidos por *Aspergillus tubingensis* han demostrado tener potencial de solubilización de diferentes tipos de fuentes de P, el conjunto de los tres ácidos (oxálico, cítrico y glucónico) potencializa la solubilización pero se ha demostrado que el ácido oxálico es el que mayor porcentaje libera de diferentes rocas fosfóricas como lo plantean los estudios realizados por Oliveira et al. [10] al experimentar con 8 tipos de rocas fosfóricas y ácidos orgánicos producidos por microorganismos diferentes. Los autores comparan el potencial de solubilización que tiene el ácido sulfúrico utilizado en la extracción industrial de la roca y el de diferentes ácidos orgánicos, concluyen que el ácido oxálico solubiliza el 100 % del P de la RP siendo más eficiente que el ácido sulfúrico ya que puede liberar más P por mol de ácido aplicado, además el ácido oxálico reporta ser más estable en presencia de calcio al formar complejos de oxalato y permitir la solubilización de las rocas [10-44]. La eficiencia de los ácidos orgánicos en la solubilización se debe a la cantidad de grupos carboxilo y su posición en la estructura de la molécula lo cual determina la capacidad para liberar P

de las rocas; el ácido oxálico tiene dos grupos carboxilo en su estructura lo que lo convierte en ácido fuerte y por esto es eficiente en el proceso [45]. Teniendo en cuenta la cantidad de grupos carboxilo, el ácido cítrico también involucrado en el proceso de solubilización, tiene 3 grupos carboxilos pero se ha demostrado en los estudios realizados por de Oliveira et al. [44] que no tiene la misma capacidad para solubilizar RP comparado con el ácido oxálico; esto se debe a que la constante de disociación de los ácidos determina la cantidad de  $H^+$  que se pueden liberar al medio. En este contexto, la liberación de hidrogeniones permite la solubilización de las rocas fosfóricas al formar complejos con el calcio y otros elementos presentes en la composición de la roca. Así, cuando un ácido tiene un pKa bajo indica que es un ácido fuerte como lo muestra en sus estudios de Oliveira et al. [10], donde el ácido oxálico tiene un pKa de 1,25, el ácido cítrico de 3,13 y el ácido sulfúrico de 1; comparando entonces los valores entre los ácidos, se entiende por qué el ácido oxálico es igual de eficiente al ácido sulfúrico al tener valores de pKa cercanos y el ácido cítrico al tener más cantidad de grupos carboxilo que el ácido oxálico no es igual de eficiente al tener un pKa mayor [10- 46].

En la **Tabla 1** se muestran las concentraciones de los ácidos producidos, el ácido glucónico es el que se obtuvo en mayor concentración en presencia de las dos fuentes de P, la glucosa adicionada en el medio es oxidada a ácido glucónico por la enzima glucosa oxidasa en las condiciones del pH inicial. Pero los estudios de do Nascimento et al. [45] indican que el ácido glucónico es un ácido débil al ser monocarboxílico tiene baja capacidad para quelar cationes divalentes lo que lo lleva a tener porcentajes bajos de solubilización reportando solo 10 % en diferentes rocas fosfóricas, entonces se asume que su potencial se da al estar en contacto con otros ácidos fuertes como oxálico y cítrico [39-45].

## 7. Conclusiones

*Aspergillus tubingensis* demostró tener una alta capacidad para solubilizar dos tipos de fuentes de P diferentes como lo son el fosfato tricálcico y la roca fosfórica Fosforita 26® de Boyacá por medio de la producción de ácidos orgánicos como ácido oxálico y la liberación de protones, mecanismos de gran interés industrial y agrícola por su eficiencia en la solubilización de diferentes RP.

Por otro lado, se encontró que el hongo tiene un comportamiento diferente en presencia de fosfato tricálcico al tener porcentaje de solubilización y concentraciones de ácidos mayores que con RP.

## 8. Recomendaciones

Se recomienda aumentar tiempos de muestreo para poder evidenciar mejor el crecimiento exponencial entre las horas 72 y 81. Evaluar la solubilización de diferentes tipos de rocas fosfóricas y utilizar otra fuente de carbono como glicerol o sacarosa para comparar el comportamiento cuando

se utiliza glucosa. Por otro lado, se recomienda abordar estudios de metabolómica del hongo para determinar las rutas de síntesis de distintas enzimas relacionadas con la producción de ácido orgánicos.

Los resultados obtenidos demuestran la capacidad de *Aspergillus tubingensis* para solubilizar diferentes fuentes de P lo que abre un siguiente campo de investigación para evaluar su actividad en cultivos utilizando roca fosfórica de Boyacá para aumentar la concentración de fósforo en el suelo.

## 9. Bibliografía

1. Istvánovics V. The Role of Biota in Shaping the Phosphorus Cycle in Lakes. *Freshw Rev.* 2008;1(2):143–74.
2. Alori ET, Glick BR, Babalola OO. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Front Microbiol.* 2017; 8(6):1–8.
3. Franco C, Gerhardt H. Rooting for more phosphorus The rate of human mutation. *Nature.* 2012;6–7.
4. Tian J, Ge F, Zhang D, Deng S y Liu X. Roles of Phosphate Solubilizing Microorganisms from Managing Soil Phosphorus Deficiency to Mediating biogeochemical P cycle. *Biology.* 2021; 10, 158.
5. World Fertilizer use Manual, 1992, IFA, París, 632p.
6. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Utilización de las rocas fosfóricas para una agricultura sostenible. Vol. 13, Boletín FAO Fertilizantes y Nutrición Vegetal. 2007. 177 p5.
7. Cordell D, Drangert J, White S. The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Gloenvcha.* 2009;19:292–305.
8. Fayiga AO, Nwoke OC. Phosphate rock: origin, importance, environmental impacts, and future roles *Environ. Rev.* 2016;415:403–15.
9. Behera BC, Singdevsachan SK, Mishra RR, Dutta SK, Thatoi HN. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilizing microorganism in mangrove-A review. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2014;3(2):97–110.
10. Oliveira G De, Mansur H, Vasconcelos R, Batista W, Ribeiro I, Dutra M, et al. Oxalic acid is more efficient than sulfuric acid for rock phosphate solubilization. *Miner Eng.* 2020;155:106458.
11. Castro H, Munevar Ó. Mejoramiento químico de suelos ácidos mediante el uso combinado de materiales enalantes. *Rev UDCA Actual Divulg Científica.* 2013;16(2):409–16.
12. Richardson AE, Simpson RJ. Soil microorganisms mediating phosphorus availability. *Plant Physiol.* 2011; 156(3):989–96.
13. Eckert W, Nishri A. The phosphorus cycle. *Lake Kinneret: Ecology and Management;* 2014, 347-350.
14. Hasanuzzaman M, Fujita M, Oku H, Nahar K, Hawrylak-Nowak B. Plant nutrients and abiotic stress tolerance. 2018;1–590.

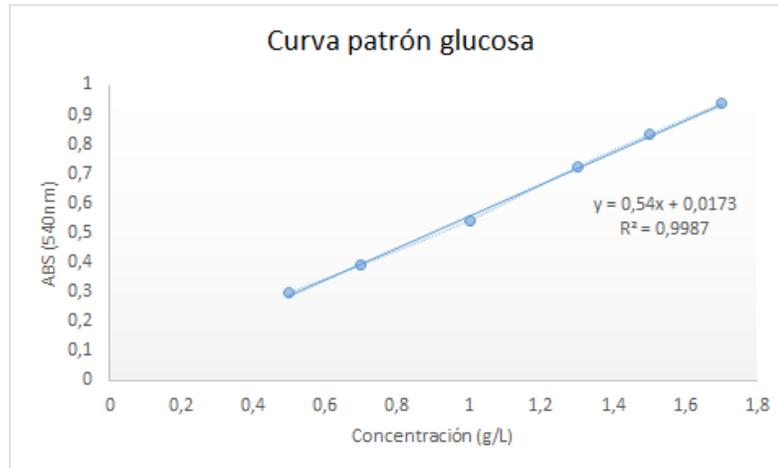
15. Aristizábal Gutiérrez FA, Cerón Rincón LE. Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos, *Rev Colomb Biotecnol.* 2012; 14(1):285–95.
16. Hyland C, Ketterings Q, Dewing D, Stockin K, Czymbek K, Albrecht G, et al. The Phosphorus Cycle - Agronomy Factsheet. Cornell Univ Coop Ext - Dep Crop Soil Sci 2005;48(C):419–40
17. Sun T, Deng L, Fei K, Zhang L, Fan X. Characteristics of phosphorus adsorption and desorption in erosive weathered granite area and effects of soil properties. *Environ Sci Pollut Res.* 2020;28780–93.
18. Bhattacharyya PN, Jha DK. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture, *World J Microbiol Biotechnol.* 2012; 28(4):1327–50.
19. Beltrán Pineda ME. La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corpoica Cienc y Tecnol Agropecu.* 2015; 15(1):101.
20. Prabhu N, Borkar S, Garg S. Phosphate solubilization by microorganisms: Overview, mechanisms, applications and advances. *Advances in Biological Science Research: A Practical Approach.* Elsevier Inc. 2019; 161–176.
21. Chernoff BCB, Orris GJ. Data Set of World Phosphate Mines, Deposits, and Occurrences — Part A. Geologic Data. *Usgs.* 2002;1–352.
22. Samreen S, Kausar S. Phosphorus Fertilizer: The Original and Commercial Sources, Tao Zhang, *IntechOpen,* 2019; 2490-2500.
23. Abhilash PC, Dubey RK, Tripathi V, Gupta VK, Singh HB. Plant Growth-Promoting Microorganisms for Environmental Sustainability. *Trends Biotechnol.* 2016;34(11):847–50.
24. Kalayu G. Phosphate solubilizing microorganisms: Promising approach as biofertilizers. *Int J Agron,* 2019(7):1-7.
25. López JE, Gallego JL, Vargas-Ruiz A, Peña-Mosquera AL, Zapata-Zapata AD, López-Sánchez IJ. *Aspergillus tubingensis* and *Talaromyces islandicus* Solubilize Rock Phosphate Under Saline and Fungicide Stress and Improve Zea mays Growth and Phosphorus Nutrition. *J Soil Sci Plant Nutr.* 2020; 20(4):2490–501.
26. Reddy MS, Kumar S, Babita K, Reddy MS. Biosolubilization of poorly soluble rock phosphates by *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger*. *Bioresour Technol.* 2020;84(2):187–9.
27. Mendes GDO, Luiz A, Freitas M De. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. *Ann Microbiol.* 2014;239–49.
28. Vassilev N, Mendes G, Costa M, Vassileva M. Biotechnological Tools for Enhancing Microbial Solubilization of Insoluble Inorganic Phosphates. *Geomicrobiology journal.* 2014;0451.
29. Yin Z, Fan B, Roberts DP, Chen S, Shi F, Buyer JS, et al. Enhancement of maize growth and alteration of the rhizosphere microbial community by phosphate-solubilizing fungus *Aspergillus aculeatus* P93. *J. Agr. Biotechnol.* 2017; 02:1-10.
30. Parada Giraldo S. Evaluación de actividades biológicas relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal de dos hongos aislados de la ectomicorrizósfera de *Pinus caribaea* morelet. [Maestría en ciencias biológicas] Pontificia Universidad Javeriana. 2017,1-145.
31. Della-Mónica, I., Godoy, M., Godeas, M., et al. Fungal extracellular phosphatases: their role in P cycling under different pH and P sources availability. *Journal of applied microbiology,* 2018: 124(1), 155-165.

32. Silva, C, Mendes, O, Silva, M, et al. Fluoride-Tolerant Mutants of *Aspergillus niger* Show Enhanced Phosphate Solubilization Capacity. PloS one, 2014; 9(10).
33. Miller, G. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Anly Chem. 1959; 31(3): 426-428.
34. Behera BC, Yadav H, Singh SK, et al. Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* sp. isolated from mangrove soil of Mahanadi river delta, Odisha, India. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 2017;15(1):169-178.
35. Salvachúa, D, Smith, H, St. John, P. Succinic acid production from lignocellulosic hydrolysate by *Basfia succiniciproducens*. Bioresource Technology. 2016; 214: 558-566.
36. Murphy J, Riley J. A modified single solution method for determination of phosphate in natural waters. Anal Chem Acta, 1962; 27:31–36.
37. Oliveira SC De, Mendes GDO et al. Decreased mineral availability enhances rock phosphate solubilization efficiency in *Aspergillus niger*. 2014; 1-7.
38. Xiao C, Zhang H, Fang Y. Evaluation for Rock Phosphate Solubilization in Fermentation and Soil – Plant System Using A Stress-Tolerant Phosphate-Solubilizing *Aspergillus niger* WHAK1. Appl Biochem Biotechnol. 2013;123–33.
39. Klaic R, Plotegher F, Ribeiro C, Zangirolami TC, Farinas CS. A novel combined mechanical-biological approach to improve rock phosphate solubilization. Int J Miner Process. 2017; 161:50–8.
40. Mendes GDO, Vassilev B, Araújo H, Ribeiro I. Inhibition of *Aspergillus niger* Phosphate Solubilization by Fluoride Released from Rock Phosphate. Aem. 2013;79(16):4906–13.
41. Chuang C, Kuo Y, Chao C. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. Biol Fertil Soils. 2007;575–84.
42. Rawat P, Das S, Shankhdhar D, Shankhdhar SC. Phosphate-Solubilizing Microorganisms: Mechanism and Their Role in Phosphate Solubilization and Uptake. J Soil Sci Plant Nutr. 2020;1-21.
43. Gandur Zapata V. Mecanismos de solubilización de fósforo en hongos filamentosos. [Pregrado], Pontificia Universidad Javeriana. 2020,1-24.
44. De oliveira G, Bahri J, Csetenyi L, Hillier S, George TS, Gadd GM, et al. Chemical and Physical Mechanisms of Fungal Bioweathering of Rock Phosphate. Geomicrobiol J. 2020;0(0):1–11. 45.
45. Do Nascimento J, Vieira J, Valadares RV, Oliveira G, Ribeiro I, Vergütz L, et al. *Aspergillus niger* as a key to unlock fixed phosphorus in highly weathered soils. SBB. 2021;156.
46. Marra LM, Oliveira-longatti SM De, Soares CRFS, Lima JM De, Olivares FL, Moreira FMS. Initial pH of medium affects organic acids production but do not affect phosphate solubilization. Braz J Microbiol. 2015;375:367–75.

## Anexos

### 1. Curva patrón de glucosa

Se realizó una curva patrón con unas concentraciones de 0,5 a 2 g/L como se evidencia en **la figura 3**.



**Figura 3. Curva patrón de glucosa**

### 2. Curva patrón de fósforo

Se realizó una curva patrón de fósforo con unas concentraciones de 0,5 a 30 ppm como se evidencia en **la figura 4**.



**Figura 4. Curva patrón de fósforo**