



**ACTIVIDAD SOLUBILIZADORA DE FOSFATO DE AISLADOS  
FÚNGICOS PROVENIENTES DE SUELO RIZOSFÉRICO DE CULTIVOS  
DE ARROZ**

**Estudiante:**

ÁNGELA MARÍA BARRERA DÍAZ

**Directora:**

María Ximena Rodríguez Bocanegra, Microbióloga, Ph.D.  
Unidad de Investigaciones Agropecuarias (UNIDIA)  
Pontificia Universidad Javeriana  
Bogotá – Colombia

**Co-directora:**

Ivonne Del Socorro Gutiérrez Rojas, Microbióloga, Ph.D.  
Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI)  
Pontificia Universidad Javeriana  
Bogotá - Colombia

**Proyecto de grado**

Pontificia Universidad Javeriana  
Facultad de Ciencias, Departamento de Microbiología Industrial  
Bogotá D.C., Colombia  
2022



**ACTIVIDAD SOLUBILIZADORA DE FOSFATO DE AISLADOS  
FÚNGICOS PROVENIENTES DE SUELO RIZOSFÉRICO DE CULTIVOS  
DE ARROZ**

**Estudiante:**

ÁNGELA MARÍA BARRERA DÍAZ

---

Maria Ximena Rodríguez Bocanegra

Directora

---

Ivonne Gutiérrez Rojas

Co-directora

---

Aura Marina Pedroza Rodríguez

Jurado

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque la tesis no contenga ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ella el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Artículo 23 de la Resolución No 13 de Julio de 1996.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, le doy gracias a Dios por permitirme realizar este trabajo y a mis padres que son el motor de mi vida por acompañarme, apoyarme a lo largo de mi proceso universitario y por todo su esfuerzo en cada uno de mis semestres académicos. A mis directoras Maria Ximena e Ivonne por orientarme, apoyarme y brindarme sus conocimientos para realizar este proyecto de forma satisfactoria y a todas las personas que me acompañaron a lo largo de mi carrera las cuales me brindaron su amistad y me ayudaron en este proceso tan importante de mi vida.

Gracias totales.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	6
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	7
<b>2.1 IMPORTANCIA DEL FÓSFORO EN LA NUTRICIÓN VEGETAL</b> .....	7
<b>2.2 PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO VEGETAL</b> .....	8
<b>2.3 SOLUBILIZACIÓN DE FÓSFORO</b> .....	9
<b>2.4 MICROORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FÓSFORO</b> .....	11
<b>3. METODOLOGÍA</b> .....	12
<b>3.1 REACTIVACIÓN DE LOS AISLADOS FÚNGICOS</b> .....	12
<b>3.2 EVALUACIÓN SEMICUANTITATIVA DE LA SOLUBILIZACIÓN DE FÓSFORO</b> .....	13
3.2.1 Evaluación de parámetros de selección de los aislamientos fúngicos .....	13
<b>3.3 CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA</b> .....	14
3.3.1 Evaluación cuantitativa de la actividad enzimática.....	14
3.3.2 Cuantificación del crecimiento de los aislamientos fúngicos .....	15
<b>3.4 ANÁLISIS DE RESULTADOS</b> .....	15
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	15
<b>4.1 EVALUACIÓN SEMICUANTITATIVA DE LA SOLUBILIZACIÓN DE FÓSFORO</b> .....	15
<b>4.2 CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA</b> .....	24
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	29
<b>6. RECOMENDACIONES</b> .....	29
<b>7. REFERENCIAS</b> .....	30
<b>8. ANEXOS</b> .....	35

## 1. INTRODUCCIÓN

El fósforo es uno de los macronutrientes más importantes que necesitan las plantas y es considerado como un factor limitante debido a su baja disponibilidad en formas solubles en los suelos de diversos sistemas de producción de cultivos (Elias et al. 2016). La forma soluble de fósforo (P) disponible para la absorción por parte de las plantas es sólo el 0.1% del P total, debido a que se encuentra en el suelo como forma no disponible para el uso vegetal (Kaur et al. 2020).

En general, la movilidad y la concentración del fósforo en los suelos es muy baja con respecto a otros nutrientes; los coeficientes de difusión del fosfato en el suelo son de 0.3 a  $3.3 \times 10^{-13}$  m<sup>2</sup>/s y su concentración en el suelo es de 0.02 ppm. Es por esto que se hace necesaria la aplicación excesiva de fertilizantes fosforados a los suelos con el objetivo de suplir la alta demanda de este nutriente por parte de las plantas; sin embargo, el exceso de aplicación de fosfatos puede generar graves efectos en la calidad del suelo y a su vez incrementar la pérdida potencial por escorrentía superficial, lo cual puede acelerar los procesos de eutrofización en cuerpos de agua (Vinci et al. 2018).

Teniendo en cuenta el uso excesivo de estos fertilizantes, se ha registrado para el año 2018 en Colombia un consumo de alrededor de 182.4 Kg de fertilizantes fosfatados por hectárea de tierra cultivable (FAO 2019). Además, se conoce que cerca del 90% de esos insumos se precipitan como formas insolubles de fosfato tricálcico (Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) en suelos alcalinos, y fosfato de hierro (FePO<sub>4</sub>) o fosfato de aluminio (AlPO<sub>4</sub>) en suelos ácidos. Por otro lado, la demanda de fertilizantes fosfatados a nivel de Latinoamérica según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) fue de 7 822 toneladas para el año 2020 y se estima que crezca anualmente entre 1.5 y 2.4%. De igual forma, en los próximos años, se espera que aumente la capacidad de producción de fertilizantes, productos intermedios y materias primas (FAO 2019) y, en consecuencia, se prevé que las reservas de roca fosfórica (RP), que proporcionan la materia prima para producir fertilizantes inorgánicos, se agoten drásticamente. Con base a lo anterior, el inevitable aumento del uso de estos fertilizantes exige el desarrollo de prácticas innovadoras de nutrición de cultivos de bajo costo y ecosostenibles (Vinci et al. 2018).

Por este motivo, con el fin de preservar la calidad de dichos recursos es necesario implementar prácticas agrícolas sostenibles que son la principal estrategia para contrarrestar el rápido declive de la calidad ambiental por medio del mantenimiento del equilibrio de los ecosistemas (Vinci et al. 2018). En este sentido, el uso de enmiendas microbianas a partir de microorganismos promotores de crecimiento vegetal (MPCV), los cuales usan un amplio rango de mecanismos como la solubilización de fosfato inorgánico, representa una opción viable como alternativa a la aplicación de fertilizantes minerales solubles (Batool et al. 2019).

Por lo anterior, es necesario realizar más estudios de microorganismos solubilizadores de fosfato que a su vez sean potenciales MPCV. Actualmente se desconoce la actividad solubilizadora de fosfato de doce aislados fúngicos clasificados en los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* provenientes de suelo rizosférico de cultivos de arroz. En este sentido, se pretende comparar dicha actividad para evaluar la capacidad solubilizadora de cada aislado fúngico y determinar cuál de ellos presenta niveles más altos de solubilización de este macroelemento. Para ello, se planteó la siguiente pregunta de investigación, ¿cuál de los doce aislamientos fúngicos provenientes de suelo rizosférico de cultivos de arroz presenta mayor actividad solubilizadora de fosfato?

En consecuencia, los resultados de este trabajo podrán aportar mayor evidencia de la capacidad solubilizadora de fosfato de nuevos aislados fúngicos y a su vez generar una alternativa al uso de insumos químicos por medio de la inoculación con este tipo de microorganismos, lo que puede favorecer el equilibrio dentro del ecosistema al actuar como una enmienda microbiana y ser una opción viable desde el punto de vista de costos ambientales y económicos, facilitando a su vez el crecimiento vegetal al actuar como MPCV.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 IMPORTANCIA DEL FÓSFORO EN LA NUTRICIÓN VEGETAL**

El fósforo (P) es un nutriente esencial para los animales, plantas y microorganismos en forma de iones fosfato  $(\text{PO}_4)^{3-}$  y  $(\text{HPO}_4)^{2-}$ , desempeña un papel fundamental en el desarrollo celular y es un componente clave de las moléculas que almacenan energía, como el ATP (trifosfato de adenosina), el ADN y los lípidos (grasas y aceites). Por tanto, aunque el P es considerado como un nutriente que puede limitar la productividad en cultivos, el ortofosfato inorgánico ( $\text{P}_i$ ) es la única forma de P que se puede transportar a través de la membrana plasmática de plantas, bacterias y hongos. Adicionalmente, el P representa un nutriente que limita el crecimiento vegetal, ya que solo el 0.1 % del P total del suelo está disponible para las plantas (Nazareno et al. 2011). Teniendo en cuenta que la concentración de P en la forma disponible para asimilación por parte de la planta es baja y que una cantidad insuficiente de este elemento en el suelo puede provocar una reducción en el rendimiento de los cultivos, se requiere de mayor disponibilidad para el uso vegetal (Reta et al. 2018).

Comúnmente en las prácticas agrícolas se adiciona el fósforo mediante el uso de fertilizantes fosfatados para estimular el crecimiento de las plantas, el cual se obtiene mediante la extracción de depósitos de roca fosfórica (Reta et al. 2018). La apatita es el mineral dominante en los minerales de fosfato y puede aparecer como carbonato-fluorapatita

[Ca<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>,CO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(OH,F)] en las rocas sedimentarias y como hidroxilo-fluorapatita [Ca<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>(OH)] en las rocas ígneas. La apatita suele ser altamente insoluble en su estado original, tal y como se extrae del suelo, y prácticamente no está disponible como fuente de fósforo para las plantas. Por esta razón, es necesario un procesamiento químico con ácidos fuertes como ácido sulfúrico, ácido fosfórico o ácido nítrico para generar productos de fosfato solubles. Por su comportamiento químico, la apatita se asocia generalmente con el flúor, lo que supone un riesgo potencial para la salud humana. Por tanto, la mayoría de los impactos se reflejan en forma de cambios en la hidrología local, la contaminación del agua, el consumo de agua y la contaminación del aire (Singh et al. 2017).

Así pues, el fósforo es esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas por lo que algunos factores de crecimiento específicos que se han asociado al fósforo son: estimulación en el desarrollo de las raíces, incremento en la fuerza del tallo, mejora de la formación de flores y producción de semillas, maduración más uniforme y temprana de los cultivos, mejora de la calidad de los cultivos, mayor resistencia a las enfermedades de las plantas y contribución al desarrollo durante todo el ciclo vital (Mosaic Company 2022). Por consiguiente, la actividad de dichos factores puede ser estimulada por medio del uso de microorganismos no patógenos que proporcionan una variedad de beneficios a las plantas asociados al crecimiento y desarrollo vegetal, y además desempeñan un papel clave para una agricultura más sostenible (Hossain et al. 2020).

## **2.2 PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO VEGETAL**

La promoción de crecimiento vegetal hace referencia a actividades de los organismos en el suelo que son indispensables para la fertilidad y producción del cultivo. La mayoría de sus actividades son beneficiosas debido a que contribuyen en la descomposición de la materia orgánica, y también estimulan la germinación y el enraizamiento, mediante la producción de fitoestimuladores como hormonas y vitaminas que brindan protección a la planta mediante el incremento de la tolerancia a condiciones de salinidad o sequía. Además, se ha encontrado que microorganismos como bacterias, hongos filamentosos y levaduras, tienen la capacidad de ejercer un efecto de control biológico sobre diferentes patógenos debido a que suprimen el desarrollo de la enfermedad en los cultivos (Kalayu 2019).

La diversidad de las formas microbianas rizosféricas incluye bacterias, hongos, nemátodos, virus, artrópodos, oomicetos, protozoos, algas y arqueas. El efecto beneficioso de un número de hongos de la rizósfera con respecto a la promoción del crecimiento de las plantas es conocido desde hace varios años (Kalayu 2019). Estos hongos promotores del crecimiento vegetal (HPCV) incluyen especies de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Piriformospora*, *Phoma* y *Rhizoctonia*, entre otros, los cuales tienen una significativa influencia en el desarrollo de las plantas debido a que facilitan la captación de

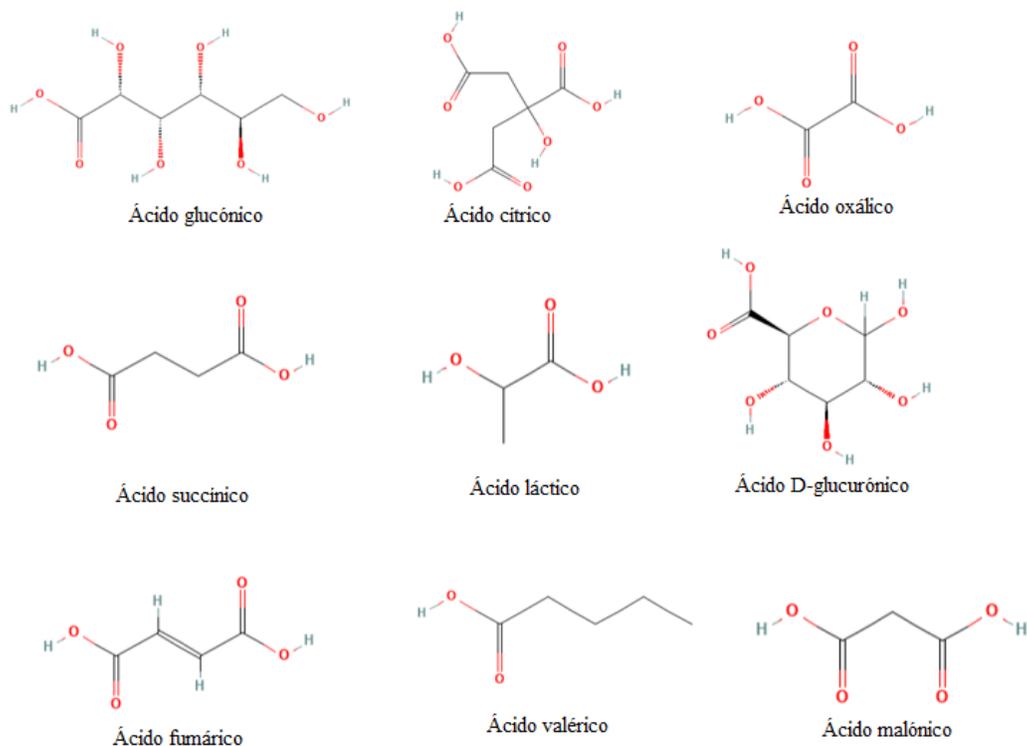
nutrientes y de algunos microelementos como el hierro. Especies de *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* y algunos endófitos han sido aprovechados como HPCV en la agricultura debido a que suprimen los patógenos de las plantas en la rizósfera mediante la producción de enzimas y metabolitos secundarios que desempeñan un papel fundamental en procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, como la solubilización de minerales (P), quelación y traslocación de Fe y la fijación biológica de N (Kalayu 2019).

Por otra parte, los caracteres directos de promoción de crecimiento vegetal son aquellos en los que los metabolitos producidos por el microorganismo son capaces de estimular el desarrollo de las plantas (Ochoa et al. 2010). Dentro de estos metabolitos se encuentran la producción de reguladores de crecimiento (auxinas, citoquinas y giberelinas), los cuales influyen directamente en la fisiología de la planta modulando la actividad hormonal regulando la organogénesis y los estadios fenológicos de desarrollo, también pueden influir en la solubilidad de nutrientes y la protección frente a patógenos (Mendoza et al. 2017).

Adicionalmente, los mecanismos directos incluyen el incremento de la absorción de nutrientes, como la solubilización de fosfatos a través de la producción de ácidos orgánicos, el secuestro de hierro (sideróforos) y producción de compuestos volátiles o no volátiles (Mendoza et al. 2017). Por tanto, la disponibilidad y movilización de nutrientes es fundamental para el desarrollo vegetal debido a que elementos como el fósforo y hierro son esenciales para la generación de energía, por lo que un bajo nivel de fosfato soluble puede limitar el crecimiento de las plantas.

### **2.3 SOLUBILIZACIÓN DE FÓSFORO**

El principal mecanismo de solubilización del P del suelo es la reducción del pH debido a que, en suelos alcalinos, el fosfato se puede precipitar para formar fosfatos de calcio, que son insolubles. Por tanto, su solubilidad aumenta con la reducción del pH mediante la producción microbiana de ácidos orgánicos como el ácido glucónico. Otros ácidos involucrados en la acidificación del medio y, a su vez, de la solubilización del fosfato son el ácido cítrico, ácido oxálico, ácido succínico, ácido láctico, ácido glucurónico, ácido fumárico, ácido valérico y ácido malónico, entre otros (figura 1) (Oliveira et al. 2013). Adicionalmente, se ha reportado una correlación positiva entre el índice de solubilización y los ácidos orgánicos producidos (Tian et al. 2021; Padmavathi 2015).



**Figura 1.** Estructura química de ácidos orgánicos relacionados con la solubilización de fósforo (P) (National Center for Biotechnology Information, PubChem DataBase 2022)

Los ácidos orgánicos anteriormente mencionados pueden liberar P en el suelo sustituyendo el P de la superficie de los (hidro-) óxidos metálicos a través de reacciones de intercambio de ligandos, disolviendo los (hidro-) óxidos que adsorben el P, y formando complejos con los metales en solución, impidiendo así la precipitación del P con estos metales. Por otro lado, la eficacia de un determinado ácido orgánico depende de las características químicas del ácido producido, como la cantidad y la posición de los grupos carboxilo e hidroxilo, la constante de estabilidad del complejo metal-ácido orgánico, la concentración de ácido, el tipo de metales en solución y el pH de la solución (Padmavathi 2015). Por tanto, este mecanismo de solubilización de fósforo es llevado a cabo por algunos microorganismos del suelo los cuales convierten las formas insolubles a formas solubles de este nutriente mediante acidificación, quelatación, reacciones de intercambio y producción de ácidos orgánicos (Cisneros et al. 2016). Así mismo, varias enzimas como fosfatasa no específicas, fitasas y C-P liasas, liberan fósforo soluble a partir de compuestos orgánicos en el suelo por medio de la ruptura de los enlaces C-P en organofosfatos (Ochoa et al. 2010).

## 2.4 MICROORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FÓSFORO

Los microorganismos realizan una gran parte de los ciclos biogeoquímicos, por lo cual, son fundamentales para mantener el equilibrio en los agroecosistemas (Beltrán 2015). Según estudios previos se ha reportado que algunos microorganismos de la rizósfera pueden facilitar la absorción del P por parte de la planta, debido a que son capaces de solubilizar este elemento que se encuentra fijado o inmovilizado en el suelo por medio de procesos metabólicos y transformarlo en formas químicas que están disponibles para ser absorbidas por las plantas. A estos microorganismos se les ha denominado microorganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) (Núñez y Acevedo 2005). Entre estos microorganismos, podemos encontrar especies de *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* y *Rhizopus*, los cuales hacen parte de la microbiota de hongos solubilizadores de fosfato (MSF) más comúnmente aislada en el suelo. Algunos estudios han encontrado que varios hongos micorrízicos arbusculares, pertenecientes a géneros de *Rhizophagus* y *Glomus*, también pueden solubilizar P inorgánico, ya sea directamente a través de la exudación, o indirectamente a través de la modificación de las comunidades de MSF del suelo (Beltrán 2015).

Por otro lado, se ha evidenciado la capacidad solubilizadora de fosfato de bacterias como *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Klebsiella*, *Burkholderia* y *Serratia*, entre otras, las cuales solubilizan tanto el fósforo orgánico (Po), como el fósforo inorgánico (Pi). También debido a su prevalencia en el suelo y fuerte potencial antimicrobiano, las actinobacterias han sido ampliamente utilizadas para colonizar tejidos vegetales y producir compuestos antimicrobianos y productos similares a las fitohormonas que pueden ser beneficiosos para el crecimiento de las plantas. Además, las actinobacterias, especialmente *Streptomyces* y *Micromonospora*, son de creciente interés ya que estas bacterias esporulantes son capaces de solubilizar minerales insolubles de P en el proceso de meteorización de Pi y el ciclo de P del suelo (Doilom et al. 2020). En contraste, se ha estudiado que algunas especies de hongos presentan una mayor proporción sobre las bacterias en los suelos debido al desarrollo de micorrizas las cuales están en contacto con el suelo interactuando más eficientemente con el entorno mineral y orgánico (Margalef et al. 2017). No obstante, se requieren estudios que profundicen en los microorganismos que tienen mayor potencial de empleo para realizar procesos de solubilización y en sus mecanismos de acción (Patiño et al. 2014; Restrepo et al. 2015).

## 2.5 AISLAMIENTO DE HONGOS DEL SUELO Y ESTUDIOS PREVIOS

Según estudios llevados a cabo por Romero et al. 2018, aislados de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* presentan capacidad fosfato solubilizadora con potencial para ser utilizados como biofertilizantes debido a que promueven un alto contenido de fósforo soluble en condiciones *in-vitro*. Teniendo presente esto, los aislamientos a evaluar en este proyecto se encuentran clasificados en los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, los cuales son provenientes

de muestreos realizados en suelos de fincas arroceras del departamento del Tolima y Meta. A estos aislamientos se les realizó una caracterización biológica para el diagnóstico de calidad de suelos en cultivos de arroz y de esta forma reducir costos ambientales y económicos (Uribe 2009).

A partir del estudio anterior, Rodríguez y Rodríguez 2017 llevaron a cabo una evaluación a nivel *in-vitro* de actividades directas de promoción de crecimiento vegetal de *Talaromyces sayulitensis* HC1 proveniente de los muestreos realizados en los suelos de fincas arroceras de los departamentos del Tolima y Meta, en la que se concluyó que esta cepa presenta ciertas características que la podrían catalogar como un microorganismo promotor de crecimiento vegetal (MPCV), por ende, podría contribuir en el desarrollo y el crecimiento de las plantas de arroz al ser inoculada en el suelo. Por tal razón, se pretende comparar la capacidad solubilizadora con otros aislamientos fúngicos provenientes del estudio realizado por Uribe (2009).

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 REACTIVACIÓN DE LOS AISLADOS FÚNGICOS

Durante el proyecto se trabajaron 12 aislamientos fúngicos de suelo rizosférico de cultivos de arroz, los cuales se encuentran depositados en la colección de microorganismos de la Pontificia Universidad Javeriana (CMPUJ). Los aislados evaluados se enumeran en la tabla 1. Se estableció un banco de trabajo en criopreservación (-20°C) de 10 viales por aislamiento preparados a partir de una suspensión de conidios producidos en Agar Papa Dextrosa (PDA), con una concentración final de glicerol del 20% (v/v) (Rodríguez y Rodríguez 2017).

**Tabla 1.** Aislamientos fúngicos seleccionados para el estudio

<b>Microorganismos</b>	<b>Código CMPUJ</b>
<i>Aspergillus</i> sp.	CMPUJH132
<i>Aspergillus</i> sp.	CMPUJH154
<i>Penicillium</i> sp.	CMPUJH143
<i>Penicillium</i> sp.	CMPUJH144
<i>Penicillium griseofulvum</i>	CMPUJH145
<i>Penicillium</i> sp.	CMPUJH146
<i>Penicillium palitans</i>	CMPUJH148
<i>Penicillium</i> sp.	CMPUJH147
<i>Penicillium</i> sp.	CMPUJH149
<i>Penicillium</i> sp.	CMPUJH150
<i>Penicillium</i> sp.	CMPUJH151
<i>Penicillium</i> sp.	CMPUJH152

## 3.2 EVALUACIÓN SEMICUANTITATIVA DE LA SOLUBILIZACIÓN DE FÓSFORO

La evaluación semicuantitativa de la solubilización de fósforo se realizó en los medios SMRS1 (glucosa, 10 g/L; extracto de levadura, 0.5 g/L; NaCl, 0.2 g/L; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1 g/L; MnSO<sub>4</sub>, 0.004 g/L; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.002 g/L; fuente de fósforo, 5 g/L; púrpura de bromocresol, 0.1 g/L; agar, 20 g/L) a pH 7.2 y Pikovskaya (glucosa, 10 g/L; extracto de levadura, 0.5 g/L; NaCl, 0.2 g/L; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1 g/L; MnSO<sub>4</sub>, 0.004 g/L; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.002 g/L; fuente de fósforo, 5 g/L; agar, 20 g/L) a pH 7.2 (Hernández et al. 2011; Dipak 2017), la cual se evidenció por medio de la formación de halos de acidificación para SMRS1 y halos de solubilización para ambos medios alrededor de las colonias (Hernández et al. 2011; Dipak 2017; Rodríguez y Rodríguez 2017). Adicionalmente, el ensayo se realizó modificando las fuentes de fósforo insoluble para ambos medios con fosfato tricálcico, fosfato dicálcico y roca fosfórica, para comparar la capacidad solubilizadora de los aislados fúngicos en cada una de estas fuentes.

Para la determinación de la solubilización de fósforo, se inocularon 50 µL de suspensión conidial con una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios/mL con agar agua (10 g/L) en un pozo en el centro de la placa del agar. Posteriormente, las placas se llevaron a incubar durante 6 días a 25°C realizando mediciones cada 24 horas del área de la colonia y los halos respectivos. La prueba se llevó a cabo con cinco réplicas. Finalmente, se llevó a cabo un control positivo con *Talaromyces sayulitensis* HC1 en medio Pikovskaya y SMRS1 y con *Penicillium janthinellum* en medio SMRS1 con las tres fuentes de fósforo.

### 3.2.1 Evaluación de parámetros de selección de los aislamientos fúngicos

Para la selección del aislamiento fúngico con mayor capacidad solubilizadora de fósforo, se determinaron parámetros específicos como el área máxima del halo de solubilización y acidificación en medio pikovskaya y SMRS1 respectivamente (cm<sup>2</sup>), área de crecimiento máxima de la colonia en ambos medios (cm<sup>2</sup>), velocidad de crecimiento (d<sup>-1</sup>) y productividad de la solubilización y acidificación de los medios durante los siete días de cultivo con las tres fuentes de fósforo a partir de la medición del área máxima de los halos de solubilización y acidificación con respecto al tiempo. Adicionalmente, las mediciones del área máxima se realizaron usando el Software ImageJ. Los porcentajes de ponderación fueron mayores para el área máxima de solubilización y productividad en el medio Pikovskaya (50%) seguido del área máxima de acidificación y productividad en el medio SMRS1 (30%) y por último área máxima y velocidad de crecimiento en cada medio (20%) (Tablas 2, 3 y 4).

### 3.3 CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA

A partir de los resultados anteriores, se seleccionó el aislado que presentó mayor actividad solubilizadora de fosfato y se llevó a cabo un control positivo con *Talaromyces sayulitensis* HC1, de acuerdo a esto, los aislamientos fúngicos se cultivaron en caldo NBRIP (glucosa, 10 g/L; fuente de fósforo, 1 g/L; MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 5 g/L; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.25 g/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1 g/L; NaCl, 0.2 g/L; KCl, 0.2 g/L) a pH 7.2 (Prieto 2012) para inducir la solubilización del fósforo con tres fuentes inorgánicas (fosfato tricálcico, fosfato dicálcico y roca fosfórica) (Prieto 2012). Los cultivos se realizaron en erlenmeyers de 100 mL con 30 mL de caldo NBRIP y 0.3 mL de una suspensión conidial de 1x10<sup>6</sup> conidios/mL. Estos erlenmeyers se incubaron por 8 días en agitación constante (100 rpm a 25°C) y se realizó un seguimiento cada 48 h tomando muestras los días (2, 4, 6 y 8) para determinar fosfatasas por medio de la reacción con *p*-nitrofenilfosfato sal disódica hexahidratada, determinando la absorbancia en 405 nm (Sepulveda 2019).

#### 3.3.1 Evaluación cuantitativa de la actividad enzimática

La curva de calibración para determinar la actividad fosfatasa se llevó a cabo con el reactivo *p*-nitrofenol (Anexo 1) en buffer acetato (pH 5.0) para la cuantificación de fosfatasas ácidas y buffer glicina-NaOH (pH 9.0) para la cuantificación de fosfatasas alcalinas por medio de una solución patrón de concentración 25 µmol/mL (Rodríguez y Rodríguez 2017) (Anexo 1).

Se realizó la curva de calibración a partir de concentraciones conocidas de *p*-nitrofenol en buffer acetato (0.1-0.5-1-2-3-4-5-6-7-8-9-10 µmol/mL) y en buffer glicina-NaOH con una dilución 1/100 de la solución patrón (0.001-0.0025-0.005-0.0075-0.01-0.025-0.04-0.045-0.05-0.06-0.065-0.075 µmol/mL) (Anexo 2).

La reacción se llevó a cabo con 100 µL de *p*-nitrofenilfosfato (150 mM), 400 µL de buffer acetato y buffer glicina-NaOH para la cuantificación de fosfatasas ácidas y alcalinas respectivamente, 500 µL de extracto fúngico y 500 µL de NaOH (0.5 M) para detener la reacción (Wang et al. 2017). Posteriormente, se realizó la lectura de absorbancia en espectrofotómetro a 405 nm. Los blancos de lectura se realizaron con 100 µL de *p*-nitrofenilfosfato, 900 µL de buffer y 500 µL de NaOH para el blanco sustrato, para el blanco muestra se tomaron 500 µL de extracto fúngico, 500 µL de buffer y 500 µL de NaOH y para el blanco medio (control abiótico) se tomaron 500 µL de medio estéril, 400 µL de buffer y 500 µL de NaOH. Para esta reacción, la actividad enzimática es expresada en términos de unidad fosfatasa (UF) que es la cantidad de enzima capaz de liberar 1 µmol de *p*-nitrofenol fosfato por minuto por litro. Adicionalmente, se realizaron tres réplicas para todos los experimentos teniendo en cuenta ensayos biológicos y técnicos (Bobadilla y Rincón 2008).

### 3.3.2 Cuantificación del crecimiento de los aislamientos fúngicos

La cuantificación del crecimiento se determinó por medio del peso seco realizando seguimiento cada 48 h los días (0, 2, 4, 6 y 8) del cultivo en caldo NBRIP con las tres fuentes de fósforo. Para esto, las muestras se filtraron por medio de una bomba de vacío y el micelio se llevó a 60°C a un horno de convección Thermo Scientific 6522 realizando un seguimiento diario; posteriormente, se pesó en una balanza analítica Ohaus Pioneer™ y se determinó el peso del micelio empleando la ecuación 1.

$$(Masa\ del\ papel\ filtro\ con\ micelio - Masa\ del\ papel\ filtro\ sin\ micelio) = Masa\ del\ micelio$$

(Ecuación 1)

### 3.4 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para establecer si la fuente de fósforo influyó en el crecimiento y la capacidad de los aislados fúngicos para solubilizar las tres fuentes de fósforo se realizó una prueba de comparación de medias ANOVA con un nivel de significancia del 0.05 y adicionalmente una prueba de comparaciones múltiples (Tukey) por medio del programa IBM SPSS Statistics.

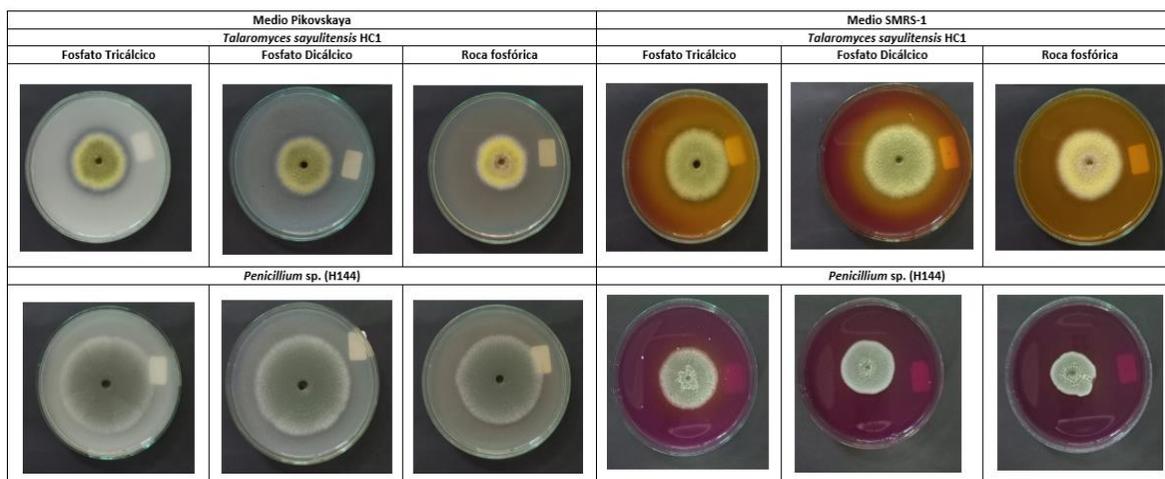
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 EVALUACIÓN SEMICUANTITATIVA DE LA SOLUBILIZACIÓN DE FÓSFORO

La evaluación semicuantitativa de la solubilización de fósforo se llevó a cabo en los medios Pikovskaya y SMRS1 usando tres fuentes de fósforo (fosfato tricálcico, fosfato dicálcico y roca fosfórica) para determinar la influencia del tipo de fuente en el crecimiento y solubilización de fósforo de cada aislamiento fúngico (Figura 2, Tabla S1).

Según los parámetros específicos evaluados por fuente de fósforo (Tablas 2, 3 y 4), el aislamiento correspondiente a H144 (*Penicillium* sp.) presentó mayor área de crecimiento de la colonia (31.65; 31.03 y 27.78 cm<sup>2</sup>), así como mayor halo de solubilización en las tres fuentes de fósforo en el medio Pikovskaya (PKV) (34.09; 31.03 y 29.01 cm<sup>2</sup>) respectivamente. Por tanto, teniendo en cuenta el porcentaje de ponderación establecido para

cada parámetro, este aislamiento fue seleccionado para realizar la cuantificación de la actividad enzimática.



**Figura 2.** Evaluación de solubilización de fósforo de aislamientos fúngicos en medio Pikovskaya y SMRS1. *Talaromyces sayulitensis* HC1 (control positivo) y *Penicillium* sp. H144.

**Tabla 2.** Parámetros de selección de aislamientos fúngicos en medio PKV y SMRS1 con fosfato tricálcico

Cepa	Crecimiento				Solubilización		Acidificación		Ponderación
	PKV		SMRS1		Área máxima (cm <sup>2</sup> ) 25%	Productividad (cm <sup>2</sup> d <sup>-1</sup> ) 25%	Área máxima (cm <sup>2</sup> ) 15%	Productividad (cm <sup>2</sup> d <sup>-1</sup> ) 15%	
	Área máxima (cm <sup>2</sup> ) 5%	Velocidad de crecimiento (d <sup>-1</sup> ) 5%	Área máxima (cm <sup>2</sup> ) 5%	Velocidad de crecimiento (d <sup>-1</sup> ) 5%					
H144	31.6478	4.4315	12.3126	2.1852	34.097	4.871	15.2982	4.871	15.2962
H151	15.9466	2.6012	19.974	3.2003	16.4512	2.3502	23.3594	3.3371	10.7909
H143	21.7592	3.4521	10.3496	1.6327	22.3694	3.1956	13.3518	1.9074	10.5398
H152	13.934	2.3631	15.1466	2.5446	15.1278	2.1611	19.825	3.3042	9.4910
H149	11.9678	2.0819	13.870	2.4579	13.9858	1.9980	17.9362	2.9894	8.6537
H146	10.7466	1.9685	10.6824	1.9226	11.1252	1.5893	13.0776	1.8682	6.6865
H147	10.8348	1.8302	9.9924	1.7929	11.2288	1.6041	12.0044	1.7149	6.4886
H148	9.9782	1.7847	9.794	2.1252	10.3824	1.4832	12.8292	1.8327	6.3498
H150	10.1136	1.7884	10.0554	1.8476	10.5882	1.5126	12.1832	1.7405	6.3040
H145	9.9434	1.7578	9.403	1.9895	10.3736	1.4819	12.2552	1.7507	6.2194
H132	17.7478	3.1352	15.3878	2.6850	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.9478
H154	14.2018	2.7043	15.6124	2.6079	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.7563
<i>T.s</i> HC1	15.9944	2.7107	20.873	2.9771	21.0766	3.0109	65.452	9.3503	19.3700
<i>P.j</i>	9.955	1.7591	9.3838	1.7181	0.0000	0.0000	29.8196	4.9699	6.3592

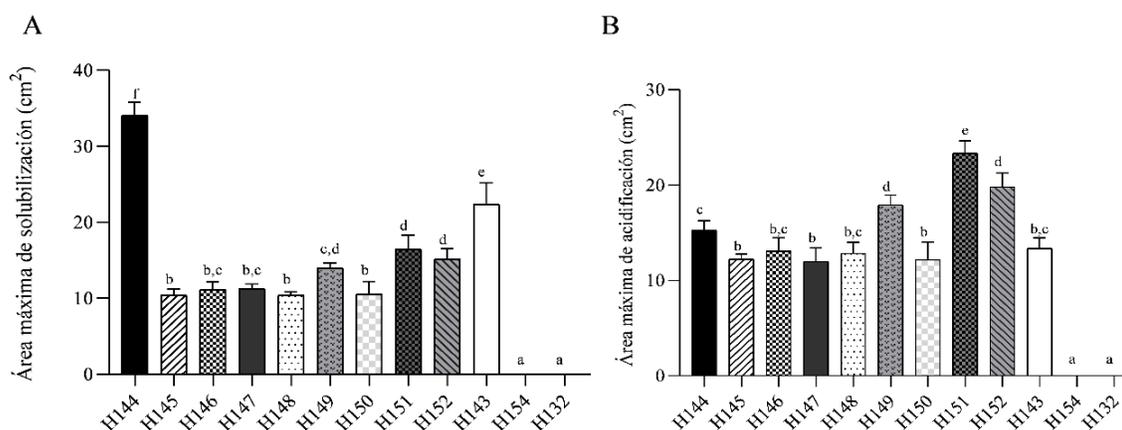
**Tabla 3.** Parámetros de selección de aislamientos fúngicos en medio PKV y SMRS1 con fosfato dicálcico

Cepa	Crecimiento				Solubilización		Acidificación		Ponderación
	PKV		SMRS1		Área máxima (cm <sup>2</sup> ) 25%	Productividad (cm <sup>2</sup> d <sup>-1</sup> ) 25%	Área máxima (cm <sup>2</sup> ) 15%	Productividad (cm <sup>2</sup> d <sup>-1</sup> ) 15%	
	Área máxima (cm <sup>2</sup> ) 5%	Velocidad de crecimiento (d <sup>-1</sup> ) 5%	Área máxima (cm <sup>2</sup> ) 5%	Velocidad de crecimiento (d <sup>-1</sup> ) 5%					
H144	31.032	4.3888	10.6818	1.9359	31.032	4.8171	0.0000	0.0000	12.1305
H151	22.859	3.6140	11.830	2.1947	23.62	3.3743	14.559	2.0798	11.2693
H143	17.101	2.8749	19.888	3.2191	17.649	2.5213	0.0000	0.0000	7.1967
H152	11.6594	2.1107	13.5732	2.2880	13.740	1.9629	0.0000	0.0000	5.4073
H149	11.612	1.9824	15.642	2.6519	13.138	1.8768	0.0000	0.0000	5.3481
H146	12.4396	2.2847	10.287	1.9447	12.8182	1.8312	0.0000	0.0000	5.0102
H147	11.0102	1.9791	10.1324	2.2484	11.4698	1.6385	0.0000	0.0000	4.5456
H148	10.4994	2.0070	10.6434	1.9700	10.9508	1.5644	0.0000	0.0000	4.3848
H150	10.3666	1.9096	11.168	1.9113	10.5772	1.5110	0.0000	0.0000	4.2898
H145	10.2494	1.8684	11.3238	2.0127	10.501	1.5002	0.0000	0.0000	4.2730
H132	14.193	2.7403	18.516	2.9512	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.9200
H154	5.976	1.5291	19.825	3.3627	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.5346
<i>T.s</i> HC1	17.792	3.0638	15.396	2.5586	18.926	2.7037	34.972	4.9959	13.3431
<i>P.j</i>	10.551	1.8649	10.6788	2.0563	0.0000	0.0000	19.9046	3.3174	4.7409

**Tabla 4.** Parámetros de selección de aislamientos fúngicos en medio PKV y SMRS1 con roca fosfórica

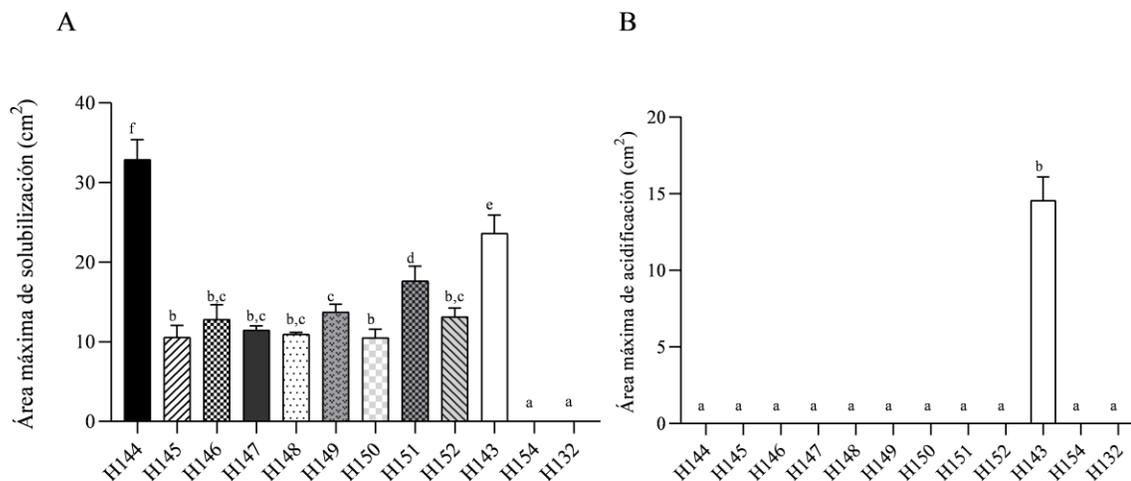
Cepa	Crecimiento				Solubilización		Acidificación		Ponderación
	PKV		SMRS1		Área máxima (cm <sup>2</sup> ) 25%	Productividad (cm <sup>2</sup> d <sup>-1</sup> ) 25%	Área máxima (cm <sup>2</sup> ) 15%	Productividad (cm <sup>2</sup> d <sup>-1</sup> ) 15%	
	Área máxima (cm <sup>2</sup> ) 5%	Velocidad de crecimiento (d <sup>-1</sup> ) 5%	Área máxima (cm <sup>2</sup> ) 5%	Velocidad de crecimiento (d <sup>-1</sup> ) 5%					
H144	27.7788	3.8817	7.6616	1.3777	29.0138	4.1448	0.0000	0.0000	10.3246
H151	14.7628	2.4677	14.141	2.4492	16.5464	2.3638	21.0064	3.5011	10.0947
H143	18.9314	3.1007	11.294	1.9129	19.8678	2.8383	13.7752	1.9679	9.8000
H152	10.3632	1.9515	10.5584	1.8718	11.677	1.6681	16.6684	2.6009	7.4639
H149	10.6738	1.8848	10.2442	1.7752	10.963	1.5661	15.0056	2.1437	6.9336
H146	9.7128	1.7181	11.0808	1.8788	10.0096	1.4299	15.7428	2.2490	6.7782
H147	10.5106	1.8389	10.4778	1.7426	10.8556	1.5508	13.9464	1.9923	6.7209
H148	10.899	1.9562	10.6062	1.9969	11.2116	1.6017	12.8166	1.8309	6.6734
H150	15.6206	2.6700	17.217	2.8595	16.2714	2.3245	0.0000	0.0000	6.5673
H145	9.7524	1.9206	10.2796	1.8146	10.3742	1.4820	12.1268	1.7324	6.2313
H132	8.715	1.5605	14.0728	2.5236	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.3436
H154	10.2548	1.9593	11.4328	1.9469	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.2797
<i>T.s</i> HC1	19.4648	2.9522	18.0526	3.4816	0.0000	0.0000	69.84	11.64	14.4196
<i>P.j</i>	10.7862	2.0145	9.3974	1.6965	0.0000	0.0000	36.9802	6.1634	7.6663

Teniendo en cuenta estos resultados el aislamiento que presentó mayor halo de solubilización en el medio PKV con fosfato tricálcico fue H144 (figura 3), como se mencionó anteriormente, seguido de H143 con 22.37 cm<sup>2</sup>. Por otro lado, los aislamientos correspondientes a H145 (p=0.997), H146 (p=0.059), H147 (p=0.059), H148 (p=0.997), H149 (p=0.173) y H150 (p=0.997) no presentaron diferencias significativas y los aislamientos H154 y H132 correspondientes a *Aspergillus* sp. no presentaron halos de solubilización.



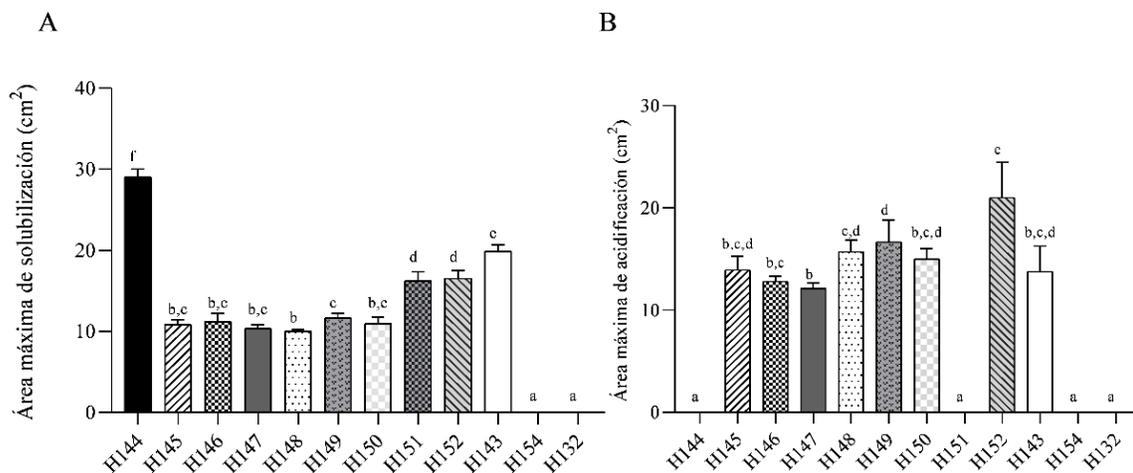
**Figura 3.** Área máxima del halo de solubilización y acidificación de los doce aislamientos fúngicos en los medios PKV y SMRS1 con fosfato tricálcico. **A:** área máxima de solubilización en PKV. **B:** Área máxima de acidificación en SMRS1.

Por otra parte, el aislamiento que presentó mayor acidificación con halo en el medio SMRS1 con fosfato tricálcico fue H151 seguido de H152 con un área máxima de 23.34 y 19.82 cm<sup>2</sup> respectivamente. Adicionalmente, no se evidenció halo de acidificación para los aislamientos H154 y H132 (*Aspergillus* sp.). Con respecto al fosfato dicálcico (Figura 4) en el medio PKV, no se presentaron diferencias significativas entre los aislamientos H145 (p=0.790), H146 (0.059), H147 (p=0.790), H148 (p=0.059), H150 (p=0.790) y H152 (p=0.322) y solo el aislamiento H143 presentó acidificación en el medio SMRS1 con un valor de área máxima de 14.56 cm<sup>2</sup>.



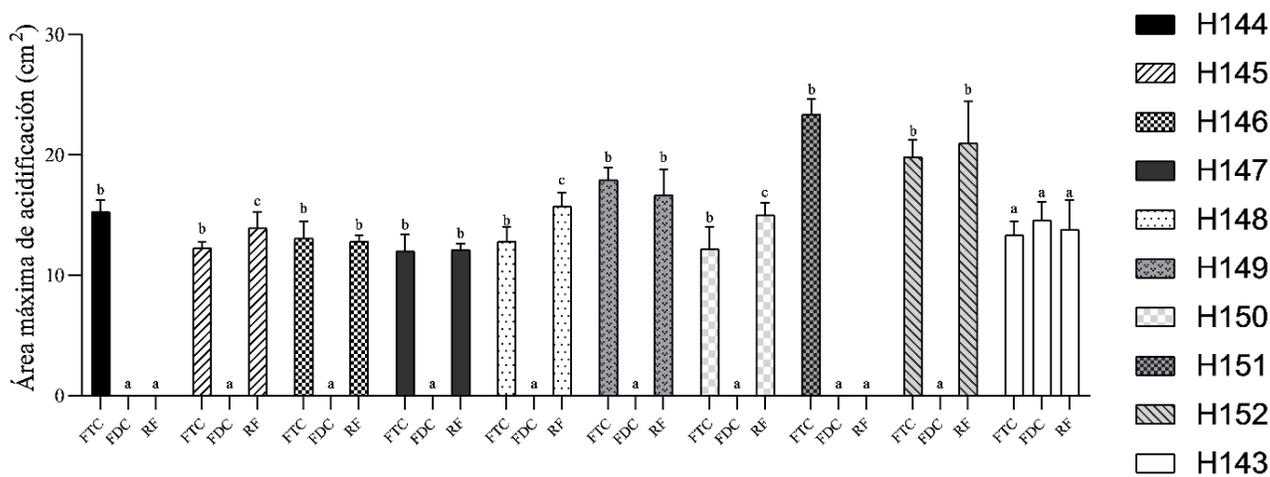
**Figura 4.** Área máxima del halo de solubilización y acidificación de los doce aislamientos fúngicos en los medios PKV y SMRS1 con fosfato dicálcico. **A:** área máxima de solubilización en PKV. **B:** Área máxima de acidificación en SMRS1.

Con respecto al halo de solubilización en PKV con roca fosfórica (Figura 5) no se observaron diferencias significativas entre los aislamientos H145 ( $p=0.298$ ), H146 ( $p=0.197$ ), H147 ( $p=0.197$ ), H148 ( $p=0.298$ ), H149 ( $p=0.197$ ) y H150 ( $p=0.197$ ); siendo los aislamientos H144 y H143 los que obtuvieron el valor más alto de área máxima de solubilización en esta fuente de fósforo. Adicionalmente, en el medio SMRS1 el aislamiento H152 registró el valor más alto del halo de acidificación con  $21.0 \text{ cm}^2$ . Los demás aislados no presentaron diferencias significativas y los aislamientos H144, H151, H154 y H132 no presentaron halo de acidificación.



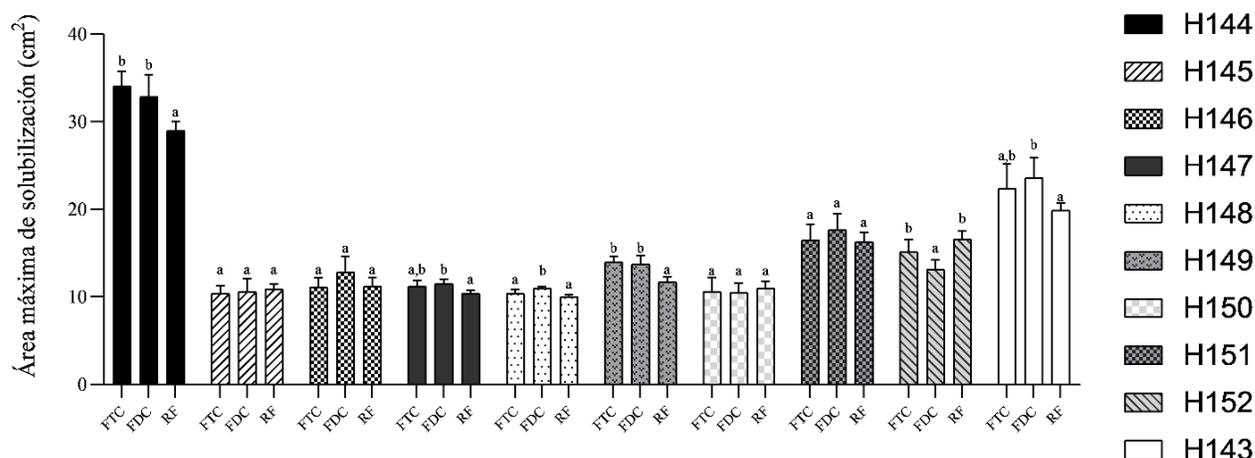
**Figura 5.** Área máxima del halo de solubilización y acidificación de los doce aislamientos fúngicos en los medios PKV y SMRS1 con roca fosfórica. **A:** área máxima de solubilización en PKV. **B:** Área máxima de acidificación en SMRS1.

Por tanto, según los resultados obtenidos de los doce aislamientos fúngicos, el que presentó mayor área de acidificación en el medio SMRS1 fue la cepa H151 (*Penicillium* sp.) con fosfato tricálcico como se mencionó anteriormente. Por otro lado, con fosfato dicálcico 11 de los 12 aislamientos no presentaron acidificación del medio y por último con roca fosfórica se observaron diferencias significativas con respecto al fosfato tricálcico con la mitad de las cepas evaluadas (Figura 6).



**Figura 6.** Comparación del área máxima de acidificación en el medio SMRS1 con los doce aislamientos fúngicos. FTC (fosfato tricálcico), FDC (fosfato dicálcico), RF (roca fosfórica).

Por otra parte, el ensayo en el medio Pikovskaya (PKV) permitió evidenciar la capacidad de los microorganismos para asimilar las fuentes de fósforo ya que fue posible observar el crecimiento y solubilización en este medio. Sin embargo, para los parámetros evaluados en este estudio no se presentaron diferencias significativas en el área máxima del halo de solubilización para la mayoría de los aislamientos fúngicos (Figura 7).



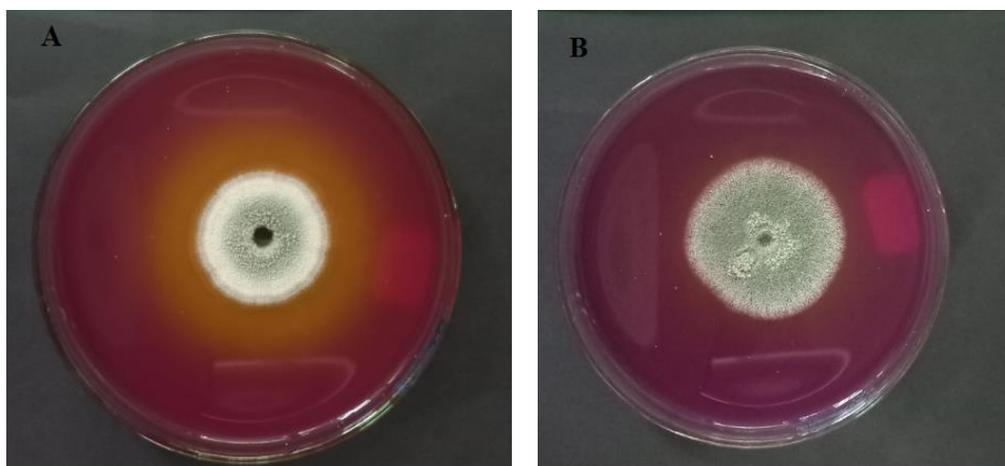
**Figura 7.** Comparación del área máxima de solubilización en medio PKV con los doce aislamientos fúngicos. FTC (fosfato tricálcico), FDC (fosfato dicálcico), RF (roca fosfórica).

Adicionalmente, en el medio SMRS1 se observaron diferencias en el área de crecimiento en comparación con PKV lo cual se puede atribuir a características específicas de crecimiento de cada aislado en ambos medios o a que existe susceptibilidad por parte del microorganismo debido a la presencia del indicador púrpura de bromocresol en el medio SMRS1 ya que este compuesto puede ser considerado tóxico por poseer fenoles los cuales presentan capacidad para inhibir el crecimiento fúngico (Leyva et al. 2013).

Según los resultados obtenidos durante los siete días de evaluación, los aislamientos correspondientes al género de *Penicillium* presentaron mayor capacidad solubilizadora de fósforo en comparación con los del género *Aspergillus* (Figuras 3, 4 y 5). Estos resultados son similares a los estudios realizados por Yin et al. (2015) en el que se evaluó una cepa de *Penicillium oxalicum* y una de *Aspergillus niger*. En ese estudio cabe destacar que la cepa de *Penicillium oxalicum* fue particularmente eficaz en la solubilización de fósforo en comparación con *Aspergillus*. Actualmente se sabe que hongos de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* son los hongos filamentosos solubilizadores de fósforo dominantes en la rizósfera y tienen gran importancia en la solubilización de roca fosfórica; por tanto, son ampliamente utilizados como productores de ácidos orgánicos (Elias et al. 2016). La solubilización de fosfatos es una de las funciones más conocidas en el género *Penicillium*.

Uno de los hongos más conocidos por su capacidad solubilizadora de este género es *Penicillium bilaiae* que es vendido comercialmente por NovoZymes como inoculante del suelo, al igual que *Penicillium janthinellum* y hongos del género *Talaromyces* (Qiao et al. 2019). Sin embargo, en contraste con otros estudios, se ha reportado que *Aspergillus* presenta una mayor capacidad solubilizadora debido a que tiene mayor secreción de ácidos orgánicos (Li et al. 2016); por tanto, se puede inferir que la capacidad solubilizadora de fósforo depende de las características específicas de cada aislamiento fúngico.

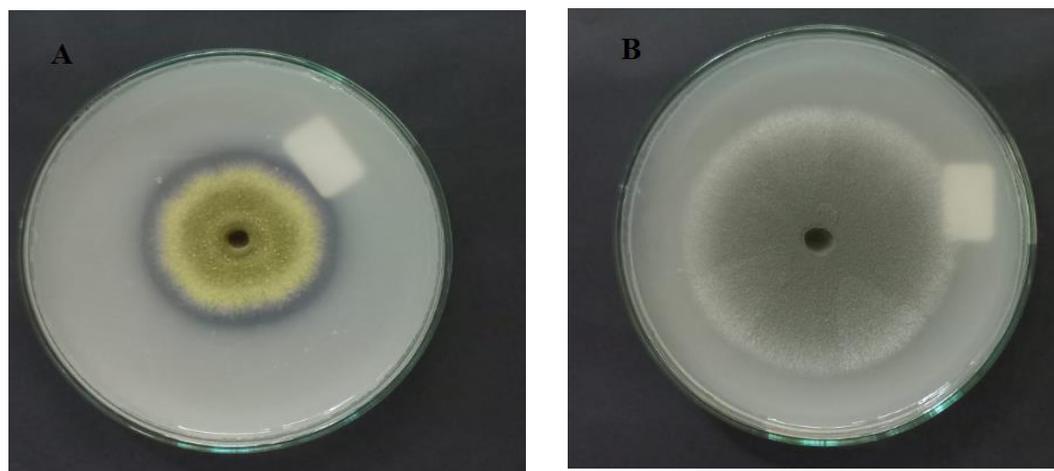
Según los resultados del presente estudio, se puede afirmar que los hongos usan la producción extracelular de ácidos orgánicos como mecanismo para solubilizar el fósforo del medio. Estos ácidos actúan sobre compuestos insolubles de fosfato inorgánico como el fosfato dicálcico, fosfato tricálcico y roca fosfórica. Por tanto, este mecanismo se da por reacciones de quelación de los iones metálicos en este caso el  $\text{Ca}^{2+}$ , el cual se encuentra asociado al fósforo insoluble y se transforma en fósforo soluble para la planta (Corrales et al. 2014). Estos ácidos orgánicos se producen a partir de la fermentación de la glucosa por la ruta glucolítica, generando la acidificación del entorno como se evidenció en el medio SMRS1 (Figura 8) por una reducción del pH el cual generó un cambio de color de púrpura a amarillo, que de acuerdo a (Hernández et al. 2011), se presenta debido a que el hongo a partir de la producción de ácidos es capaz de disolver compuestos fosfatados como los usados en este estudio.



**Figura 8.** Reducción de pH del medio SMRS1 por la producción de ácidos orgánicos. **A.** *Penicillium janthinellum* (control positivo para SMRS1). **B.** *Penicillium* sp. (H144)

Estos ácidos orgánicos convierten fosfato tricálcico en fosfatos di y monobásicos con el resultado de una mayor disponibilidad del elemento para la planta. El tipo de ácido orgánico producido y sus cantidades difieren con los distintos organismos. Entre ellos, el ácido

glucónico y el ácido 2-cetoglucónico son el agente más frecuente de solubilización del fosfato mineral (Charana et al. 2012).



**Figura 9.** Solubilización del medio Pikovskaya. **A.** *Talaromyces sayulitensis* HC1 (control positivo). **B.** *Penicillium* sp. (H144)

Adicionalmente, algunas de las rutas empleadas por este tipo de microorganismos para la síntesis de ácidos orgánicos, como la glicólisis, son fundamentales para realizar la fermentación láctica primaria para la obtención de ácidos orgánicos como el láctico y, además también usan otras rutas como la oxidación anaerobia del piruvato produciendo ácido butírico (Carbonero 2002). Adicionalmente, se ha encontrado que otros microorganismos solubilizadores disponen de rutas como la de ácidos tricarbónicos sintetizando el ácido málico, y rutas como la oxidación directa de la glucosa para formar ácido 2-Cetoglucónico (Corrales et al. 2014).

Por otra parte, según Hernández et al. (2011), la capacidad de solubilización de un microorganismo también está relacionada con el grado de solubilidad de los compuestos químicos, debido a que, el fosfato tricálcico tiene una solubilidad de 7.7 g/L mientras que el fosfato dicálcico tiene una solubilidad de 0.316 g/L y la roca fosfórica se caracteriza por presentar baja solubilidad en agua debido a que está compuesta por minerales de fosfato que son solubles en ácidos débiles o fuertes (National Center for Biotechnology Information 2022; Sierra 2010), lo cual permite que el fosfato tricálcico sea solubilizado con mayor facilidad por parte de los microorganismos. Adicionalmente, según Hernández et al. (2011) la fuente de carbono y nitrógeno influye notablemente sobre la solubilización y crecimiento de los hongos debido a que la producción de las sustancias implicadas en la solubilización requiere de la absorción de nutrientes, sobre todo de carbono. Por tanto, se ha evidenciado que la glucosa y las sales de amonio como las usadas en este estudio son las mejores fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente para inducir la solubilización de fósforo en los microorganismos (Seshadri et al. 2004). Por tanto, estos microorganismos del suelo están

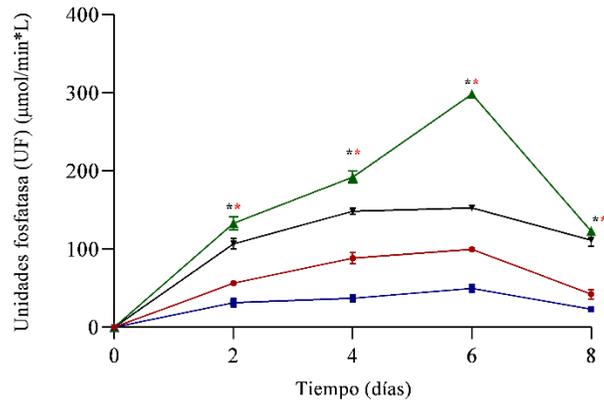
implicados en la liberación de P desde fuentes inorgánicas por medio de la solubilización a partir de la acidificación del medio (Beltrán 2015). Según Barroso y Nahas (2005), el halo de acidificación en el medio SMRS1 y la solubilización de fosfatos que se observó en el medio Pikovskaya (Figura 9) depende de varios factores como, la capacidad solubilizadora del microorganismo, los ácidos orgánicos producidos, el tipo de compuesto fosfatado y las fuentes de carbono y nitrógeno utilizadas en el medio. Por lo cual, a partir de estos resultados y de los parámetros de selección evaluados se puede afirmar que el aislamiento seleccionado H144 (*Penicillium* sp.), puede tener un papel importante en el suelo y en el desarrollo de las plantas debido a que podría ser considerado como solubilizador de fósforo de fuentes inorgánicas y su a vez, su biomasa podría contener una cantidad significativa de fósforo inmovilizado debido que al ser un material orgánico con capacidad adsorbente, puede captar y retener nutrientes que eventualmente estarían disponibles para las plantas y para sus procesos vitales (Beltrán 2015).

## 4.2 CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

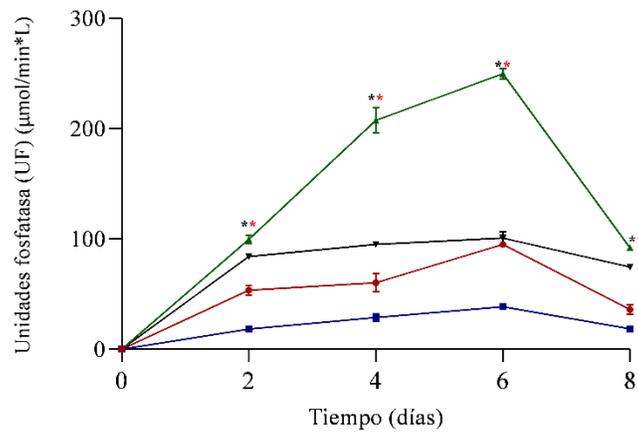
A partir de los resultados de evaluación semicuantitativa de solubilización de fosfato se seleccionó el aislamiento H144, el cual presentó la mayor actividad acuerdo a los parámetros evaluados. El aislamiento se inoculó en el medio NBRIP, utilizando tres fuentes de fósforo insoluble (fosfato tricálcico, fosfato dicálcico y roca fosfórica) para determinar la influencia de la fuente de fósforo y realizar una comparación con respecto a la evaluación semicuantitativa en placa. Adicionalmente, en este ensayo se empleó *Talaromyces sayulitensis* HC1 como control positivo para evaluar la actividad enzimática como mecanismo de solubilización del fósforo, utilizando como sustrato *p*-nitrofenilfosfato, y midiéndose la concentración de *p*-nitrofenol liberado para cuantificar la actividad enzimática en términos de unidades fosfatasa (UF).

En la Figura 10 se observa el incremento en la actividad enzimática del aislamiento H144 y el control positivo (*Talaromyces sayulitensis* HC1) desde el día 2 alcanzando el máximo rendimiento en el día 6 para fosfatasas ácidas y alcalinas en las tres fuentes de fósforo. Sin embargo, se obtuvo la máxima producción de UF con fosfato tricálcico para ambos tipos de fosfatasas, alcanzando 100 y 50 UF de fosfatasas ácidas y alcalinas, respectivamente, en el aislamiento H144, y 298 y 153 UF de fosfatasas ácidas y alcalinas para la cepa control *Talaromyces sayulitensis* HC1. Adicionalmente, en el día 8 se observa una reducción de la actividad enzimática para fosfatasas ácidas y alcalinas en las tres fuentes de fósforo, además, se presentaron diferencias significativas entre los tipos de fosfatasas con los dos hongos en los días de evaluación con todas las fuentes de fósforo.

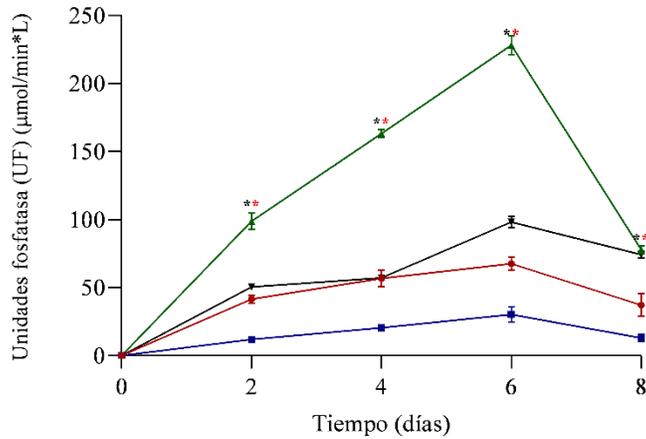
A



B

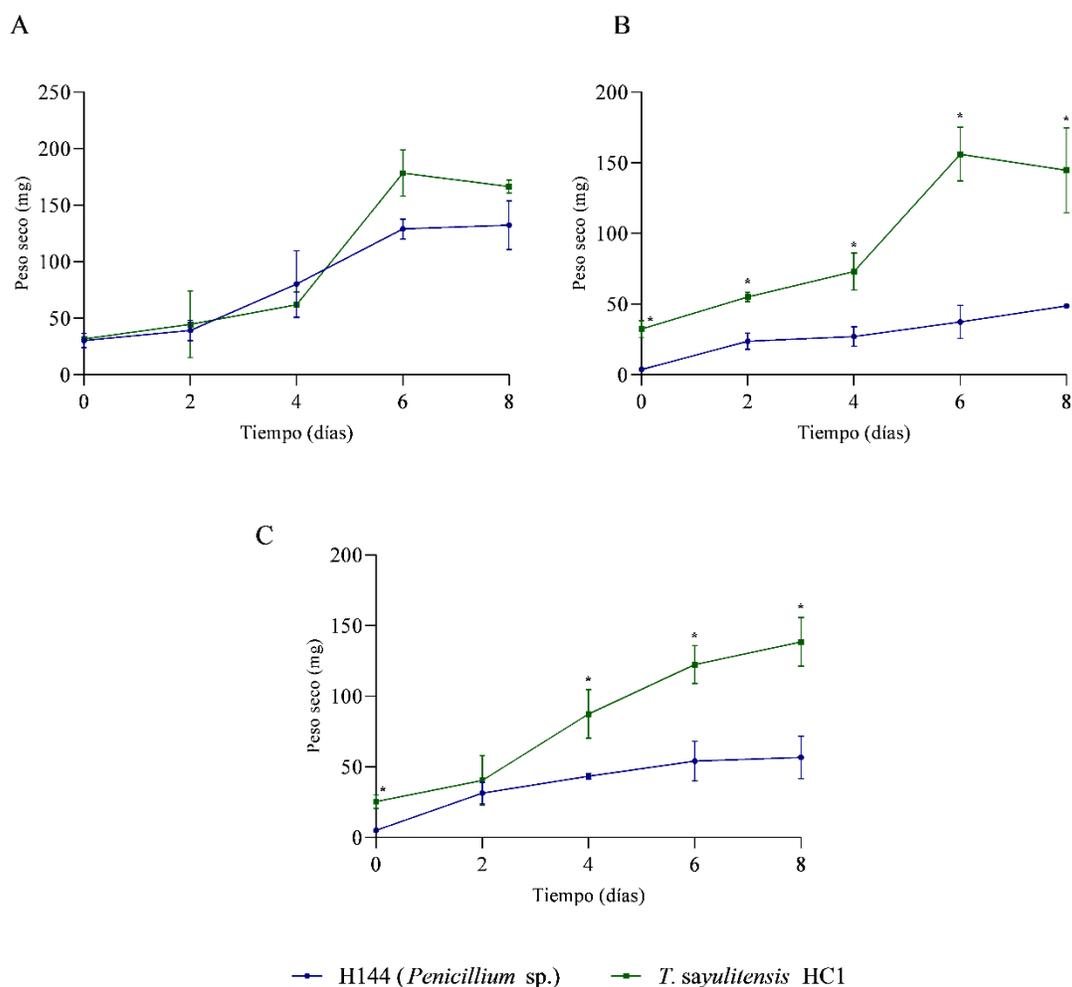


C



**Figura 10.** Cuantificación de unidades fosfatasa ácidas y alcalinas del aislamiento H144 (*Penicillium* sp.) y *Talaromyces sayulitensis* HC1. **A.** Fosfato tricálcico. **B.** Fosfato dicálcico. **C.** Roca fosfórica. El asterisco (\*) representa diferencias significativas de fosfatasa ácidas entre los dos hongos. El asterisco (\*) representa diferencias significativas de fosfatasa alcalinas entre los dos hongos.

Finalmente, la cuantificación del crecimiento de los aislamientos fúngicos se realizó por el método de peso seco. En la Figura 11 se observa el aumento significativo de la biomasa a partir del día 2 hasta el día 6 con las tres fuentes de fósforo. Adicionalmente, *Talaromyces sayulitensis* HC1 presentó mayor crecimiento en las tres fuentes con respecto al aislamiento H144, y se presentaron diferencias significativas con fosfato dicálcico en todos los días evaluados al igual que con roca fosfórica a excepción del día 2 y con fosfato tricálcico no se presentaron diferencias significativas.

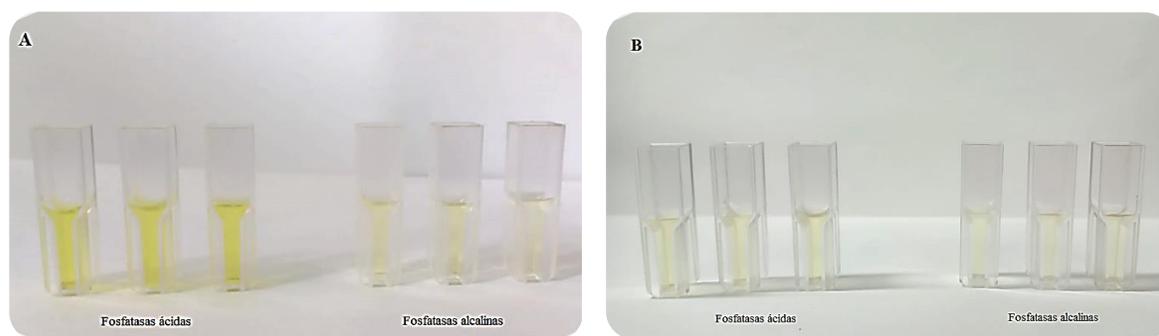


**Figura 11.** Cuantificación del crecimiento de los aislamientos fúngicos. **A.** Fosfato tricálcico. **B.** Fosfato dicálcico. **C.** Roca fosfórica. El asterisco (\*) representa diferencias significativas de peso seco entre los dos hongos.

Según los resultados obtenidos se presentaron valores más altos para las fosfatasa ácidas con respecto a las alcalinas con el control positivo y el aislamiento H144, de manera que la mayor actividad de las fosfatasa ácidas producidas por los hongos ensayados (figura 10), se corrobora con los informes de Arias et al. (2020), quién afirma que las fosfatasa ácidas (EC 3.1.3.2), en comparación con las fosfatasa alcalinas (EC 3.1.3.1), son más comunes entre los hongos del suelo. Adicionalmente, según Corrales et al. (2014) se ha informado que tanto el género *Penicillium* como *Aspergillus*, participan activamente en la mineralización del P orgánico del suelo, y se ha demostrado que son más eficientes para la síntesis de fosfatasa ácidas y alcalinas extracelulares.

Por otro lado, comparando los valores de UF obtenidos en el presente estudio con los de Naik et al. (2013), en donde se alcanzó un valor máximo para fosfatasa ácidas (EC 3.1.3.2) con fosfato tricálcico de aproximadamente 80 UF, se puede afirmar que los resultados obtenidos en el presente estudio muestran valores similares de UF. Por otra parte, se observó que la actividad enzimática aumenta en función del tiempo, sin embargo, al llegar al punto máximo que para este caso fue el día 6 el microorganismo posiblemente pudo entrar en fase estacionaria y por tanto hay una reducción de actividad fosfatasa, por lo que, se deben evaluar más días para determinar el comportamiento de crecimiento de estos microorganismos. Adicionalmente, en algunos casos es posible que se cuantifiquen fosfatasa extracelulares e intracelulares debido a la lisis de las células fúngicas lo que lleva a que los valores de UF se incrementen (Otálora et al. 2003).

Las fosfatasa catalizan la hidrólisis de enlaces ésteres y anhídridos, por lo que son responsables de la mineralización del fósforo orgánico del suelo y de la liberación del fósforo inorgánico necesario para los microorganismos y las plantas (Fernández et al. 2008; Pinochet et al. 2014). Esto se evidenció por medio de la reacción con *p*-nitrofenil fosfato sal disódica hexahidratada, en donde se produjo una ruptura del enlace que une al radical fosforado por la acción de la fosfatasa liberando *p*-nitrofenol de color amarillo (Figura 12) y liberando fósforo inorgánico (Bobadilla y Rincón 2008).



**Figura 12.** Cuantificación de actividad enzimática con *p*-nitrofenil fosfato sal disódica hexahidratada. **A.** *Talaromyces sayulitensis* HC1 (control positivo). **B.** *Penicillium* sp. (H144).

Estas enzimas se dividen en monoéster fosfato hidrolasa, di-éster fosfato hidrolasa y tri-éster fosfato hidrolasa. En el grupo de las monoéster fosfato hidrolasa se encuentran las fosfatasas ácidas (EC 3.1.3.2) y fosfatasas alcalinas (EC 3.1.3.1) que actúan respectivamente según el pH en el que se encuentre el suelo (pH 5-9) (Corrales et al. 2014). Adicionalmente, las actividades de estas enzimas están intrínsecamente ligadas a la homeóstasis del fósforo inorgánico (Pi), es decir, que las fuentes de Pi, como las usadas en el presente estudio (fosfato tricálcico, fosfato dicálcico y roca fosfórica), regulan la expresión de genes en la célula fúngica encargados de facilitar el almacenamiento e integración metabólica de Pi a través de este tipo de enzimas, que están sujetas a la regulación por una vía de transducción de señales de Pi en respuesta a la variación de concentración de fósforo en el medio (Dick et al. 2011).

Así mismo, las enzimas fosfatasas son metabolitos asociados al crecimiento de los microorganismos, ya que se pueden formar como productos finales o subproductos del metabolismo energético, por tanto, teniendo en cuenta lo descrito anteriormente habrá formación de la enzima siempre y cuando exista crecimiento por parte del microorganismo (Bobadilla y Rincón 2008). Por tal razón se observa un incremento en la actividad enzimática en la fase exponencial de crecimiento de los microorganismos, la cual inicia a partir del día 2 hasta el día 6 (Figura 11).

Por otro lado, se debe considerar que, aunque los medios evaluados en el ensayo de semicuantificación (Pikovskaya y SMRS1) contienen fuentes de fósforo inorgánico, cuyo mecanismo de solubilización se da por medio de la producción de ácidos orgánicos, también contienen extracto de levadura que presenta compuestos fosforados hasta 2.5% en forma de nucleótidos (moléculas compuestas por un grupo fosfato, un azúcar de cinco carbonos y una base nitrogenada) (National Human Genome Research Institute 2022), por tanto, la presencia de los posibles enlaces fosfoéster y la afinidad de la enzima por este tipo de enlace pudo causar la mineralización de este componente (Bobadilla y Rincón 2008).

Con respecto al control positivo, Rodríguez y Rodríguez (2017) demostraron que *Talaromyces sayulitensis* HC1 es solubilizador de fósforo, obteniendo los mejores resultados para el fosfato tricálcico, dado que es un compuesto de más fácil solubilización en comparación con la roca fosfórica y el fosfato dicálcico. Estos resultados son similares a los del presente estudio, debido a que se obtuvo un valor más alto de unidades fosfatasa con fosfato tricálcico con respecto a las otras fuentes.

Por tanto, los resultados obtenidos de las actividades de las fosfatasas evaluadas *in vitro*, indican que estas enzimas pueden participar en la hidrólisis de los compuestos orgánicos de P en la rizósfera y facilitarle así la disponibilidad del P a las plantas, al contribuir a la actividad total de las fosfatasas en el suelo.

## 5. CONCLUSIONES

Se puede concluir que el aislamiento H144 (*Penicillium* sp.) fue el mejor solubilizador de fósforo en las fuentes de fosfato tricálcico, dicálcico y roca fosfórica y adicionalmente los mecanismos de solubilización de los aislamientos fúngicos evaluados se dieron probablemente por la producción de ácidos orgánicos, los cuales llevan a cabo reacciones de quelación y permiten liberar fósforo disponible para las plantas.

Por otra parte, se determinó la presencia de fosfatasas ácidas y alcalinas para el aislamiento seleccionado H144 (*Penicillium* sp.) y *Talaromyces sayulitensis* HC1. Por tanto, se puede concluir que el aislamiento (H144) puede ser un posible microorganismo promotor de crecimiento vegetal (MPCV) al presentar solubilización de formas inorgánicas de fósforo y actividad fosfatasa para llevar a cabo la mineralización de fuentes orgánicas de este elemento.

## 6. RECOMENDACIONES

Como ensayo adicional se puede llevar a cabo la cuantificación de fósforo en forma de ortofosfato por medio de métodos como el de vanadomolibdato, azul de Molibdeno y verde de Malaquita.

Adicionalmente dentro de los ensayos de semicuantificación y medición de la producción de ácidos orgánicos en el medio SMRS1, se pueden identificar los tipos de ácidos producidos por medio de técnicas cromatográficas (HPLC). De igual forma, se pueden realizar más ensayos con otros factores implicados en la solubilización de fósforo por parte de los microorganismos como la producción de sideróforos.

Finalmente, también se pueden realizar ensayos con diferentes concentraciones de fósforo inorgánico para evaluar su influencia en sobre la producción y actividad enzimática de fosfatasas y estudiar a profundidad el mecanismo de solubilización de fósforo del aislamiento seleccionado.

## 7. REFERENCIAS

- Arias M, R., Mota, A., Reyes, M. L., Antonio García Pérez, J., De La, Y., & Elizondo C. (2020). Interacción entre cepas de hongos solubilizadores de fósforo y diferentes fuentes de nitrógeno sobre la solubilización y mineralización de fósforo. doi:10.11235/BUAP.05.19.01
- Barroso, C. B., & Nahas, E. (2005). The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. *Applied Soil Ecology : A Section of Agriculture, Ecosystems & Environment*, 29(1), 73-83. doi:10.1016/j.apsoil.2004.09.005
- Batool, S., & Iqbal, A. (2019). Phosphate solubilizing rhizobacteria as alternative of chemical fertilizer for growth and yield of triticum aestivum (var. galaxy 2013). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1400-1410. doi:10.1016/j.sjbs.2018.05.024
- Beltrán Pineda, M. (2015). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corpoica ciencia tecnología agropecuaria*, 15(1):101–13.
- Bobadilla C, Rincón S. (2008). Aislamiento y producción de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza.
- Carbonero zalduegui P, (2002). *Universidad politécnica de Madrid*, Complementos de Bioquímica Industrias agrícolas bioquímica de las fermentaciones.
- Charana Walpola, B. (2012). Prospectus of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus availability in agricultural soils: A review. *African Journal of Microbiology Research*, 6(37), 6600. doi:10.5897/AJMR12.889
- Cisneros, C. A., Franco, J. M., Realpe Fernández, M., & Fuenmayor, J. C. (2015). Influencia de microorganismos en la disponibilidad de fósforo en plántulas de café (coffea arabica) *Universidad del Cauca*. doi:10.18684/bsaa (15)19-26
- Corrales Ramírez, MSc, Lucía Constanza, Arévalo Galvez, Z. Y., & Moreno Burbano, V. E. (2014). Solubilización de fosfatos: Una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *Nova: Publicación Científica En Ciencias Biomédicas*, 12(21), 67. doi:10.22490/24629448.997
- Dick, C. F., Dos-Santos, A. L. A., & Meyer-Fernandes, J. R. (2011). Inorganic phosphate as an important regulator of phosphatases. *Enzyme Research*, 2011, 103980-7. doi:10.4061/2011/103980
- Dipak D., & Sinha, S. N. (2017). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacterium pseudomonas aeruginosa KUPSB12 with antibacterial potential from river ganga, india. *Annals of Agrarian Science*, 15(1), 130-136. doi:10.1016/j.aasci.2016.10.001

Doilom, M., Guo, J., Phookamsak, R., Mortimer, P. E., Karunarathna, S. C., Dong, W., & Liao, C. (2020). Screening of phosphate-solubilizing fungi from air and soil in yunnan, china: Four novel species in *Aspergillus*, *Gongronella*, *Penicillium*, and *Talaromyces*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 585215. doi:10.3389/fmicb.2020.585215

Elias, F., Woyessa, D., & Muleta, D. (2016). Phosphate solubilization potential of rhizosphere fungi isolated from plants in jimma zone, southwest ethiopia. *International Journal of Microbiology*, 2016, 5472601-11. doi:10.1155/2016/5472601

Elias, F., Woyessa, D., & Muleta, D. (2016). Phosphate solubilization potential of rhizosphere fungi isolated from plants in jimma zone, southwest ethiopia. *International Journal of Microbiology*, 2016, 5472601-11. doi:10.1155/2016/5472601

Gomori G, (2004). Preparation of buffers for use in enzyme studies.

Hernández Leal T., Carrion G., Heredia G. (2011). *In vitro* phosphate solubilization by a strain of *Paecilomyces lilacinus* (thom) samson. *Instituto de Ecología*, 8(45).

Hernández T, Carrión G, Heredia G. (2011). *In vitro* phosphate solubilization by a strain of *Paecilomycetes lilacinus* (Thom) Samson, *Agrociencia*, 45:881-892.

Hossain, S. (2020). Application and mechanisms of plant growth promoting fungi

Institut national de santé publique du Québec. (2022). *Penicillium* spp.

Kalayu, G. (2019). Phosphate solubilizing microorganisms: Promising approach as biofertilizers. *International Journal of Agronomy*, 2019, 1-7. doi:10.1155/2019/4917256

Kaur, & Sudhakara. (2020). *Developments in fungal biology and applied mycology* Springer Nature Singapore.

Leyva, J. M., Jesumar Pérez-Carlón, J., Adolfo González-Aguilar, G., Esqueda, M., Fernando, J., Autor, A., & Fernando Ayala-Zavala, J. (2013). Funcionalidad antibacteriana y antioxidante de extractos hidroalcohólicos de *Phellinus merrillii*. *Revista Mexicana de micología*. 1(37), 11-17.

Li, Z., Bai, T., Dai, L., Wang, F., Tao, J., Meng, S., . . . Hu, S. (2016). A study of organic acid production in contrasts between two phosphate solubilizing fungi: *Penicillium oxalicum* and *Aspergillus niger*. *Springer Science and Business Media LLC*. doi:10.1038/srep25313

Margalef, O., Sardans, J., Fernández-Martínez, M., Molowny-Horas, R., Janssens, I. A., Ciais, P., . . . Peñuelas, J. (2017). Global patterns of phosphatase activity in natural soils. *Springer Science and Business Media LLC*. doi:10.1038/s41598-017-01418-8

Mendoza-Mendoza, A., Nogueira-López, G., Arizmendi, F. P., Cripps-Guazzone, N., Nieto-Jacobo, M. F., Lawry, R., Hill, R. (2017). Mechanisms of growth promotion by members of the rhizosphere fungal genus *Trichoderma*. *Advances in PGPR research* (pp. 1-15). Wallingford, UK: CABI. doi:10.1079/9781786390325.0001

Mosaic Company. (2022). Crop nutrition.

Naik, S. K., Maurya, S., Kumar, R., Sadhna, K., Gagrai, S., Das, B., . . . Bhatt, B. P. (2013). *African journal of microbiology research*. Inorganic phosphate solubilization by phosphate solubilizing fungi isolated from acidic soils. doi:10.5897/AJMR2013.5947.

National Center for Biotechnology Information (2022), PubChem DataBase.

National Center for Biotechnology Information (Pubchem), (2022). Calcium hydrogen phosphate (compound).

National Human Genome Research Institute. (2022). Nucleotide.

Nazareno, Ruscitti, & Arango. (2011). *Micorrizas arbusculares biología y aplicaciones en el sector agroforestal*. (pp. 52-62) Editorial de la UNLP.

Noman, E. A., Al-Gheethi, A. A., Nik Ab. Rahman, N. N., Hideyuki, N., A Talip, B. B. H., Mohamed, R. M. S. R., & Ab. Kadir, M. O. (2018). Phenotypic identification of *Penicillium* spp. isolated from clinical wastes based on microstructure characteristics. *Malaysian Journal of Microbiology*, doi:10.21161/mjm.27918

Noman, E. A., Al-Gheethi, A., Rahman, Nik Norulaini Nik Ab, Nagao, H., & Ab. Kadir, M. (2016). Assessment of relevant fungal species in clinical solid wastes. *Environmental Science and Pollution Research International*, 23(19), 19806-19824. doi:10.1007/s11356-016-7161-8

Ñústez, C. E., & Acevedo, J. C. (2005). Evaluación del uso de *Penicillium janthinellum* Biourge sobre la eficiencia de la fertilización fosfórica en el cultivo de la papa (*solanum tuberosum* L. var. diacol capiro). *Agronomía Colombiana*, 23(2):290-298

Ochoa, M. S., Madrigal Pedraza, R., Trujillo, M. M., & Abud, Y. C. (2010). 65 -71 *revista de la DES ciencias biológico agropecuarias, universidad michoacana de San Nicolás de Hidalgo*

Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 33(11), 1-16. doi:10.1007/s11274-017-2364-9

- Oliveira Mendes, G., Moreira de Freitas, André Luiz, Liparini Pereira, O., Ribeiro da Silva, I., Bojkov Vassilev, N., & Dutra Costa, M. (2013). Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. *Annals of Microbiology*, 64(1), 239-249. doi:10.1007/s13213-013-0656-3
- Otálora J, Patiño L, Martínez M, Pedroza A. (2003). Estandarización de una técnica cualitativa de producción de fosfatasas producidas a través de microorganismos solubilizadores de fosfato.
- Padmavathi, T. (2015). Optimization of phosphate solubilization by *Aspergillus niger* using plackett-burman and response surface methodology. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 15(ahead), 781-793. doi:10.4067/S0718-95162015005000053
- Pande, A., Pandey, P., Mehra, S., Singh, M., & Kaushik, S. (2017). Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. *Journal of Genetic Engineering & Biotechnology*, 15(2), 379-391. doi:10.1016/j.jgeb.2017.06.005
- Patiño-Torres, C. O., & Sanclemente-Reyes, O. E. (2014). Phosphate-solubilizing microorganisms (PSM): A biotechnological alternative solution for a sustainable agriculture. *Entramado*, 10(2), 288-297.
- Pinochet T, D., Valenzuela F, E., Solís B, J., & Clunes M, J. (2014). Mineralización y/o solubilización del fósforo contenido en lodos provenientes de residuos salmonícolas marinos bioaumentados con cepas de *Aspergillus niger* y *Trichoederma pseudokoningi*. *Boletín Micológico*, 29(2) doi:10.22370/bolmicol.2014.29.2.866
- Prieto G. (2012). Aislamiento y selección de Actinobacterias solubilizadoras de fósforo a partir de suelos del Departamento de Boyacá.
- Qiao, H., Sun, X., Wu, X., Li, N. E., Wang, Z., & Li, D. (2019). The phosphate-solubilising ability of *Penicillium guanacastense* and its effects on the growth of pinus massoniana in phosphate limiting conditions *The Company of Biologists*. doi:10.1242/bio.046797
- Restrepo-Franco, G. M., Marulanda-Moreno, S., de la Fe-Pérez, Y., Díaz-de la Osa, A., Lucia-Baldani, V., & Hernández-Rodríguez, A. (2015). Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 46(1), 63-76
- Reta, G., Dong, X., Li, Z., Su, B., Hu, X., Bo, H., . . . Xu, S. (2018). Environmental impact of phosphate mining and beneficiation: Review. *International Journal of Hydrology*, 2(4) doi:10.15406/ijh.2018.02.00106
- Rodriguez Indrid, R. M. (2017). Evaluación *in vitro* de actividades directas de promoción de crecimiento vegetal de *Penicillium* sp. HC1

- Romero Fernández, Abraham de Jesus, Arias Mota, R. M., & Mendoza Villarreal, R. (2018). Aislamiento y selección de hongos de suelo solubilizadores de fósforo nativos del estado de Coahuila, México. *Acta Botánica Mexicana*, (126) doi:10.21829/abm126.2019.1390
- Sepulveda, J. L. (2019). *Challenges in routine clinical chemistry analysis* Elsevier. doi:10.1016/b978-0-12-813776-5.00010-8
- Seshadri, S., Ignacimuthu, S., & Lakshminarasimhan, C. (2004). Effect of nitrogen and carbon sources on the inorganic phosphate solubilization by different *Aspergillus niger* strains. *Chemical Engineering Communications*, 191(8), 1043-1052. doi:10.1080/00986440490276308
- Sierra C, (2010). Rocas fosfóricas: nueva fuente de fosforo para praderas y cultivos. *Instituto de investigaciones agropecuarias*, 17(1) doi:10.22201/facmed.14058871p.2010.1.16377
- Singh, D. P., Singh, H. B., & Prabha, R. (2017). *Plant-microbe interactions in agro-ecological perspectives*. Singapore: Springer.
- Tian, J., Ge, F., Zhang, D., Deng, S., & Liu, X. (2021). Roles of phosphate solubilizing microorganisms from managing soil phosphorus deficiency to mediating biogeochemical P cycle MDPI AG. doi:10.3390/biology10020158
- Uribe. (2009). Determinación de la calidad de suelos de varias fincas arroceras del departamento del Tolima y Meta
- Vinci, G., Cozzolino, V., Mazzei, P., Monda, H., Spaccini, R., & Piccolo, A. (2018). An alternative to mineral phosphorus fertilizers: The combined effects of trichoderma harzianum and compost on zea mays, as revealed by 1H NMR and GC-MS metabolomics. *PloS One*, 13(12), e0209664. doi:10.1371/journal.pone.0209664
- Wang, X., Hoffland, E., Feng, G., & Kuijper, T. (2017). Phosphate uptake from phytate due to hyphae-mediated phytase activity by arbuscular mycorrhizal maize. *Frontiers in Plant Science*, 8, 684. doi:10.3389/fpls.2017.00684
- World fertilizer trends and outlook to 2022. (2019). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Yin, Z., Shi, F., Jiang, H., Roberts, D. P., Chen, S., & Fan, B. (2015). Phosphate solubilization and promotion of maize growth by *Penicillium oxalicum* P4 and *Aspergillus niger* P85 in a calcareous soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 61(12), 913-923. doi:10.1139/cjm-2015-0358

## 8. ANEXOS

### 8.1 ANEXO 1. Reactivos

#### 8.1.1 Buffer acetato (Gomori 2004)

Componentes	mol/L	Volumen (mL)
Ácido acético	0,2	14,8
Acetato de sodio	0,2	35,2
Diluido para un volumen final de 100 mL y un pH de 5,0		

#### 8.1.2 Buffer glicina-NaOH (Gomori 2004)

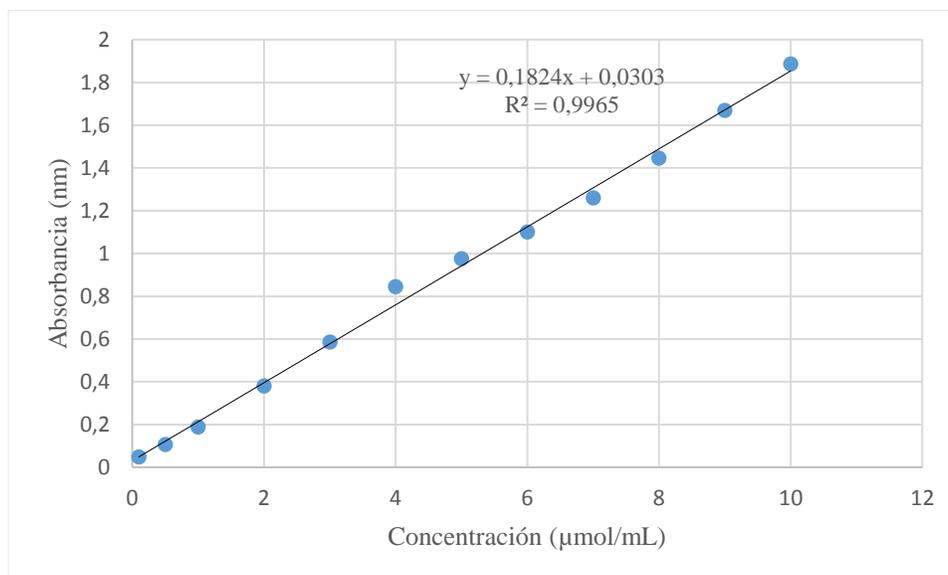
Componentes	mol/L	Volumen (mL)
Glicina	0,2	50
NaOH	0,2	8,8
Diluido para un volumen final de 200 mL y un pH de 9,0		

#### 8.1.3 p-nitrofenol (25 µmol/mL)

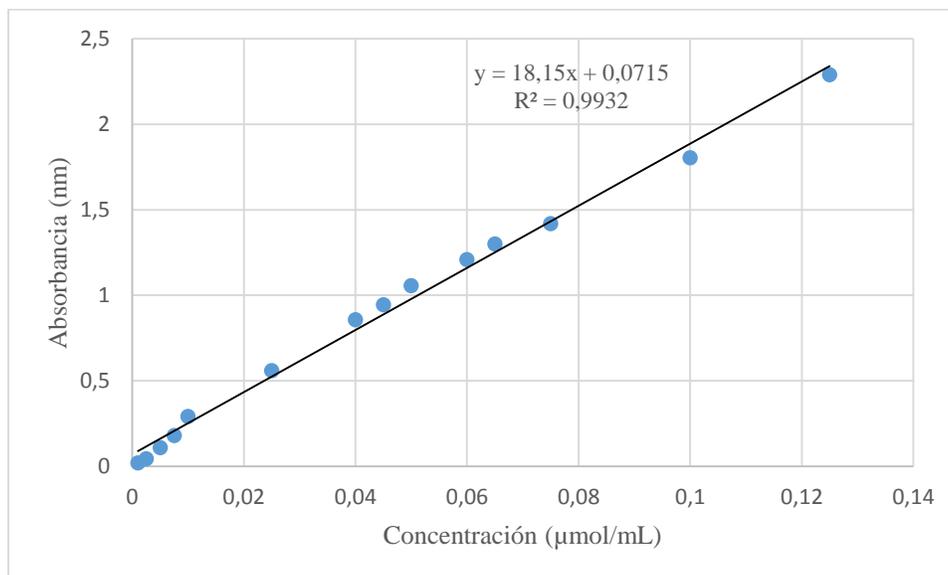
Componentes	g/L
<i>p</i> -nitrofenol	3,6
Se prepara en buffer acetato pH:5,0 y buffer glicina-NaOH pH:9,0	

## 8.2 ANEXO 2. Resultados de la curva patrón

### 8.2.1 Curva de calibración de p-nitrofenol con buffer acetato (Abs 405 nm)



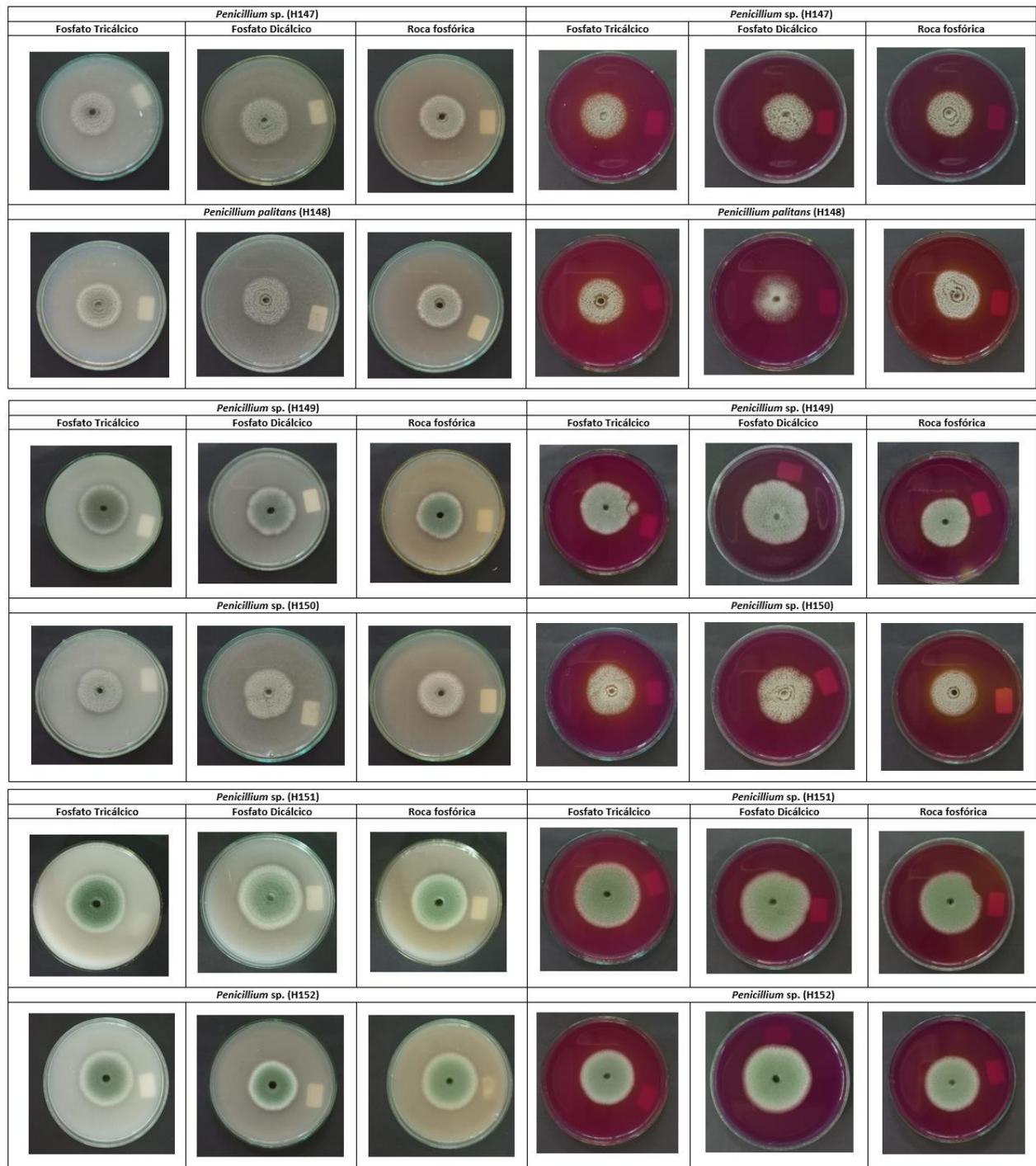
### 8.2.2 Curva de calibración de p-nitrofenol con buffer glicina-NaOH (Abs 405 nm)

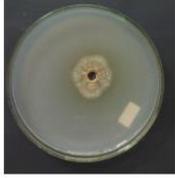
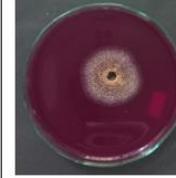


### 8.3 ANEXO 3. Resultados. Tablas complementarias

**Tabla S1.** Resultados de la semicuantificación de fósforo de los doce aislamientos fúngicos en medio Pikovskaya y SMRS1 con fosfato tricálcico, dicálcico y roca fosfórica.

Medio Pikovskaya			Medio SMRS-1		
<i>Talaromyces sayulitensis</i> HC1			<i>Talaromyces sayulitensis</i> HC1		
Fosfato Tricálcico	Fosfato Dicálcico	Roca fosfórica	Fosfato Tricálcico	Fosfato Dicálcico	Roca fosfórica
<i>Penicillium janthinellum</i>			<i>Penicillium janthinellum</i>		
<i>Penicillium</i> sp. (H143)			<i>Penicillium</i> sp. (H143)		
Fosfato Tricálcico	Fosfato Dicálcico	Roca fosfórica	Fosfato Tricálcico	Fosfato Dicálcico	Roca fosfórica
<i>Penicillium</i> sp. (H144)			<i>Penicillium</i> sp. (H144)		
<i>Penicillium griseofulvum</i> (H145)			<i>Penicillium griseofulvum</i> (H145)		
Fosfato Tricálcico	Fosfato Dicálcico	Roca fosfórica	Fosfato Tricálcico	Fosfato Dicálcico	Roca fosfórica
<i>Penicillium</i> sp. (H146)			<i>Penicillium</i> sp. (H146)		



<i>Aspergillus</i> sp. (H132)			<i>Aspergillus</i> sp. (H132)		
Fosfato Tricálcico	Fosfato Dicálcico	Roca fosfórica	Fosfato Tricálcico	Fosfato Dicálcico	Roca fosfórica
					
<i>Aspergillus</i> sp. (H154)			<i>Aspergillus</i> sp. (H154)		
	