





Capacidad fosfato solubilizadora de hongos rizosféricos provenientes de cafetales de Jilotepec, Veracruz

Rosa María Arias Mota^{1*} , Alondra Juárez González¹ , Gabriela Heredia Abarca² , Yadeneyro de la Cruz Elizondo³ 

¹Instituto Tecnológico Superior de Xalapa. Reserva Territorial SN, Col. Santa Bárbara, Xalapa, Veracruz, México. ²Instituto de Ecología A.C, Xalapa. km 2.5 antigua carr. a Coatepec 361 Congregación el Haya. ³Facultad de Biología. Universidad Veracruzana. Campus Xalapa, circuito Gonzalo Aguirre Beltrán s/n. CP 91090 Zona Universitaria Xalapa, Ver. México.

*Email autora para correspondencia: rosa.am@xalapa.tecnm.mx

Recibido: 04 agosto 2022. **Aceptado:** 2 septiembre 2022

RESUMEN

Antecedentes: El suelo donde se cultiva el café generalmente tiene un pH ácido y una baja disponibilidad de nutrientes entre ellos el fósforo, por lo que los productores recurren a la aplicación de fertilizantes principalmente fosfatados. Sin embargo, la aplicación excesiva de estos agroquímicos puede conducir a pérdida de la fertilidad del suelo ya que ocasionan perturbación en la diversidad microbiana y en sus actividades metabólicas asociadas. En este contexto, los hongos solubilizadores de fósforo cobran relevancia. Este grupo de hongos mediante procesos de acidificación, quelación, reacciones de intercambio y producción de ácidos orgánicos favorecen la disponibilidad de las fracciones de fósforo en el suelo. **Objetivo:** El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad fosfato solubilizadora de calcio de hongos aislados de la rizosfera de plantas de café *Coffea arabica* var. Costa Rica provenientes de Jilotepec, Veracruz. **Método:** Para ello, se aislaron y seleccionaron cepas con capacidad fosfato solubilizadora, se analizó la eficiencia relativa de solubilización y a las cepas con mayores índices se les cuantificó el contenido de fósforo solubilizado en medio de cultivo líquido. Además, se midió el pH y el porcentaje de acidez de cada uno de los extractos para relacionarlo con la solubilización. **Resultados y discusión:** En total se aislaron 225 cepas de hongos nativos de suelos cafetaleros, entre los que destacan los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium* y *Trichoderma*. Del total de cepas aisladas, el 70% de ellas presentaron actividad fosfato solubilizadora. En la evaluación cualitativa, las cepas de *Penicillium* RA5 y RA7 presentaron los mayores índices de eficiencia de solubilización y en la evaluación cuantitativa la cepa de *Penicillium* RA14 presentó el mayor contenido de fósforo soluble en el medio líquido. Con la realización de este trabajo se pretende promover el uso de los hongos solubilizadores de fósforo nativos de cafetales para la creación de Bionoculantes.

Palabras clave: bioinoculantes; *Coffea arabica* var. Costa Rica; fosfato tricálcico; hongos filamentosos.

ABSTRACT

Background: The soil where coffee is grown generally has an acid pH and a low availability of nutrients, including phosphorus, because of these producers apply phosphate fertilizers mainly. However, the excessive application of these agrochemicals can lead to loss of soil fertility since they cause disturbance in the microbial diversity and in its associated metabolic activities. In this context, phosphorus solubilizing fungi become relevant. This group of fungi stimulate the availability of phosphorus fractions in the soil through processes of acidification, chelation, exchange reactions and production of organic acids. **Objective:** The aim of this work was to evaluate the calcium phosphate solubilizing capacity of fungi isolated from the rhizosphere of coffee plants *Coffea arabica* var. Costa Rica from Jilotepec, Veracruz. **Methods:** To achieve it, strains with phosphate solubilizing capacity were isolated and selected, the relative solubilization efficiency was analyzed and the strains with the highest rates were quantified for the content of solubilized phosphorus in liquid culture medium. In addition, the pH and the percentage of acidity of each one of the extracts were measured to relate it to solubilization. **Results and discussion:** In total, 225 strains of native fungi from coffee soils were isolated, among them genera *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium* and *Trichoderma* were highlighted. The 70% of the total isolated strains presented phosphate solubilizing activity. In the qualitative evaluation, the *Penicillium* RA5 and RA7 strains presented the highest rates of solubilization efficiency and in the quantitative evaluation, the *Penicillium* RA14 strain presented the highest content of soluble phosphorus in the liquid medium. Overall results of this work will be the base to promote the use of native phosphorus-solubilizing fungi from coffee plantations for the creation of bioinoculants.

Keywords: bioinoculants; *Coffea arabica* var. Costa Rica; tricalcium phosphate; filamentous fungi.

INTRODUCCIÓN

El fósforo (P) es considerado el segundo elemento más importante después del nitrógeno para el desarrollo y funcionamiento de las plantas. A pesar de que los suelos contienen altos niveles de P, sólo un 1% de este se encuentra en formas solubles aptas para la incorporación por la biota, i.e. iones ortofosfato PO_4^{3-} , H_2PO_4 , HPO_4^{2-} [1]. Debido a que las formas solubles del P son altamente reactivas a la precipitación insoluble con cationes o a su conversión en complejos orgánicos [2], la disponibilidad del P en el suelo de los cafetales

es limitada [3]. Esto se debe principalmente a que este elemento se transforma a compuestos insolubles por la asociación a elementos iónicos (calcio, hierro y aluminio); los cuales no pueden ser asimilados por las plantas [4]. La baja movilidad del P en el suelo y su precipitación en minerales secundarios afectan su disponibilidad, por lo que el uso de fertilizantes fosfatados para cubrir los requerimientos de diferentes cultivos es una práctica agrícola común. Sin embargo, el uso continuo y desmedido de estos fertilizantes puede ocasionar una acumulación de compuestos

contaminantes en el suelo [5], que pueden contaminar los alimentos producidos, e incluso llegar por lixiviación a afluentes de aguas, alterando así no solo las zonas de producción agrícola, sino también ecosistemas aledaños a través de procesos de eutrofización [6].

En el suelo, la cantidad de P disponible para las plantas depende de la modificación del equilibrio dinámico que mantiene la disolución de los compuestos inorgánicos insolubles y de la descomposición de la materia orgánica [7]. Los microorganismos tienen un papel fundamental en el ciclo biogeoquímico y la biodisponibilidad del fósforo; algunos hongos y bacterias pueden solubilizar P de formas no disponibles en la rizósfera. La transformación de fósforo por los hongos se lleva a cabo principalmente por medio de la mineralización y la solubilización. La primera consiste en la producción de enzimas: fosfatasa y fitasa, para convertir el P orgánico a inorgánico [8]. El mecanismo principal de solubilización del fosfato es a través de la producción de ácidos orgánicos, esta acción puede atribuirse a que disminuyen el pH y, más aún, a la formación de complejos estables con cationes de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} y Al^{3+} , lo cual permite la liberación del fósforo [9]. Diversos estudios han evaluado la capacidad de algunos géneros de hongos para solubilizar compuestos insolubles de fosfato inorgánico, como el fosfato tricálcico, fosfato dicálcico, hidroxapatita y roca fosfórica mediante la producción de ácidos orgánicos [10, 11, 12, 13, 14].

El presente trabajo forma parte de un proceso para el desarrollo de un bioinoculante para

plantas de café a base de hongos solubilizadores de fósforo, ya que el uso y aplicación de inoculantes biológicos o biofertilizantes en los sistemas productivos, permite una producción a bajo costo, y conserva el suelo desde el punto de vista de la fertilidad y la biodiversidad. El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad fosfato solubilizadora de cepas procedentes de rizosfera de cafetales y obtener más información sobre los mecanismos involucrados en la solubilización.

METODOLOGÍA

Muestreo del suelo rizosférico

Se seleccionaron tres fincas cafetaleras con manejo de policultivo tradicional en Jilotepec, Veracruz y se tomaron muestras de suelo rizosférico de plantas de *Coffea arabica* var. Costa Rica.

En cada finca, se establecieron cinco puntos de muestreo cada uno separado por una distancia de 50 m, con el fin de asegurar que fuesen puntos independientes. En cada punto se seleccionó una planta y se tomó una muestra de suelo rizosférico de 250 g a una profundidad de 15 cm. El suelo se secó a temperatura ambiente y se guardó en bolsas de papel hasta su procesamiento [15].

Aislamiento de los hongos del suelo rizosférico

Para aislar los hongos se empleó la técnica de filtración de partículas o lavado de suelo a través de un juego de tres microtamices con aperturas de 1 mm (tamiz superior), 210 μm y

105 μm (tamices medio e inferior) [16]. Para cada muestra procesada se sembraron 300 μl en placas Petri con medio de cultivo de papa dextrosa agar con antibiótico. Las placas se incubaron a 25°C y se revisaron a los tres días para iniciar con la detección de las colonias emergentes. Las colonias se resembraron en placas Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) para su preservación en agua destilada a 5°C.

Selección de cepas con capacidad fosfato solubilizadora

Para la selección de las cepas fosfato solubilizadora se utilizó un medio de cultivo revelador con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ [17]. El medio de cultivo se preparó con una mezcla compuesta por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.5g), KCl (0.2 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.3 g), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.004 g), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.002 g), NaCl (0.2 g), D-Glucosa (10 g), extracto de levadura (0.5 g), cloranfenicol (0.1 g), agar (20 g) y agua (1000 mL). Aparte se preparó una solución de fosfato compuesta por: goma arábiga (0.5 g), $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (0.5 g) y agua 100 mL. Ambas soluciones se esterilizaron por separado en una autoclave (modelo YX-2980D24). La selección se basó en la detección de un halo claro alrededor de la colonia al tercer día de incubación a 28°C

Evaluación cualitativa de la capacidad solubilizadora de fósforo

Las cepas con respuesta positiva a la solubilización de fosfato de calcio, se inocularon nuevamente en un medio revelador

de Sundara [17] por triplicado y se tomaron diariamente mediciones del diámetro del halo.

Para categorizar el nivel de solubilización de las cepas se emplearon tres escalas establecidas por Silva Filho y Vidor [18]. Las escalas fueron: escala I colonias con halos de 1-4 mm, escala II colonias con halos de 5-8 mm y escala III colonias con halos de 9-12 mm.

Posteriormente, se calcularon índices de eficiencias de solubilización (ERS) del tercer día en las cepas ubicadas en la escala III. El ERS se calculó mediante la sumatoria del diámetro de la colonia más el diámetro de halo sobre el diámetro de la colonia [18].

Evaluación cuantitativa de la capacidad fosfato solubilizadora de las cepas de hongos con valores altos del índice ERS

Las cepas ubicadas en la escala III de ERS se inocularon en medio revelador líquido de Sundara [17], adicionado con 0.5 g L^{-1} de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ como fuente de fósforo insoluble. Cada cepa se inoculó por triplicado en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 4 discos de micelio activo de 5 mm de diámetro y se mantuvieron en la incubadora (Termo Scientific 150) sin movimiento a 26°C durante 10 días. Como testigo, se utilizó un matraz con medio revelador sin cepa de hongo. Para la obtención del extracto fúngico, se filtró el contenido de los matraces de cada una de las cepas en papel filtro Whatman® 42. Al finalizar los 10 días de midió el pH, el porcentaje de acidez y el contenido de fósforo soluble

Medición de fósforo soluble

El fósforo soluble se evaluó por el método del ácido ascórbico [20]. Para esto, a cada extracto de hongo se le agregaron 2 mL de reactivo combinado y se midió en un espectrofotómetro (JENWAY 6305) a 880 nm. Los datos obtenidos se compararon con una curva estándar de fósforo y se expresaron en mg L⁻¹.

Determinación del porcentaje de acidez titulable

Para determinar el porcentaje de acidez titulable de los extractos de las 29 cepas de hongos se pesaron 5 mL de cada uno de los extractos de hongos y se colocaron en un matraz Erlenmeyer (10 mL), posteriormente a cada extracto se le agregaron 5 gotas de fenolftaleína (0.05 N) y se homogenizó la muestra. Posteriormente se le añadieron poco a poco gotas de hidróxido de sodio (0.05 N) hasta un viraje de color rosa. La acidez titulable se expresó por volumen de NaOH 0,01 N consumido por cada 5 mL de extracto de la cepa de hongo.

Análisis estadísticos

Se llevaron a cabo análisis de varianza de una vía, después de comprobar el supuesto de distribución normal y homogeneidad de varianza de los datos mediante pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Bartlett, respectivamente. En los casos donde se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

entre las variables se realizaron pruebas de comparación de medias (Tukey HSD) ($p \leq 0.05$). Para conocer la relación entre el fósforo soluble con el porcentaje de acidez, se realizó un análisis de regresión simple con nivel de significancia $p \leq 0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa STATISTICA 7.0 [21].

RESULTADOS

Cepas de hongos fosfato solubilizadoras seleccionadas

En total se aislaron 225 cepas del suelo. Entre las cepas de hongos destacan los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Trichoderma* (Figura 1a). Del total de cepas aisladas, el 71.5% (160 cepas) exhibió resultado positivo a la solubilización de fosfato de calcio en medio de cultivo sólido de Sundara manifestándose éste a través de un halo transparente (Figura 1b y c).

De acuerdo con las escalas establecidas por Silva Filho y Vidor [19], de las 160 cepas con respuesta positiva a la solubilización de fosfato de calcio, 54 cepas se ubicaron en la escala I, esto representa el 23.66% (figura 2a), mientras que 77 cepas se ubicaron en la escala II representando un 33.92% (Figura 2b) y en la escala III se reconocieron 29 cepas, que representa el 13.83% (Figura 2c). El mayor porcentaje de cepas se ubicó en la escala II de solubilización.

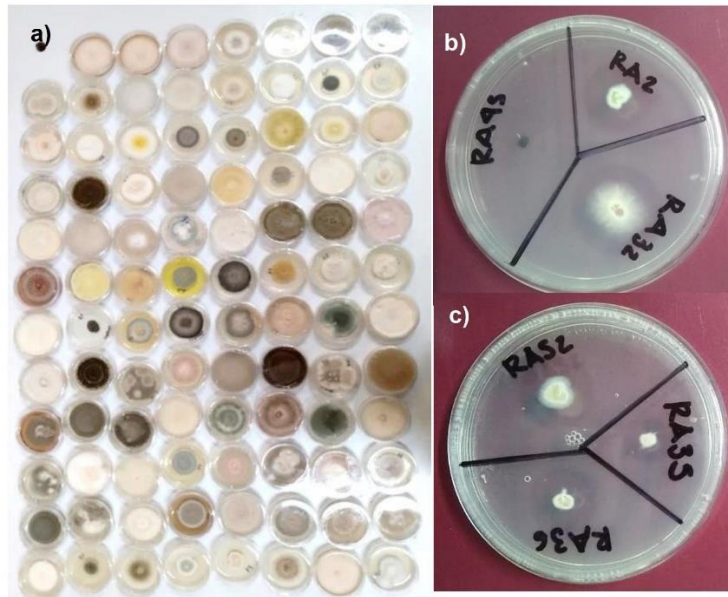


Figura 1. a) Cepas de hongos aislados de rizosfera de café, b y c) Selección de cepas positivas a la solubilización de fosfato (halos de solubilización indica una respuesta positiva).

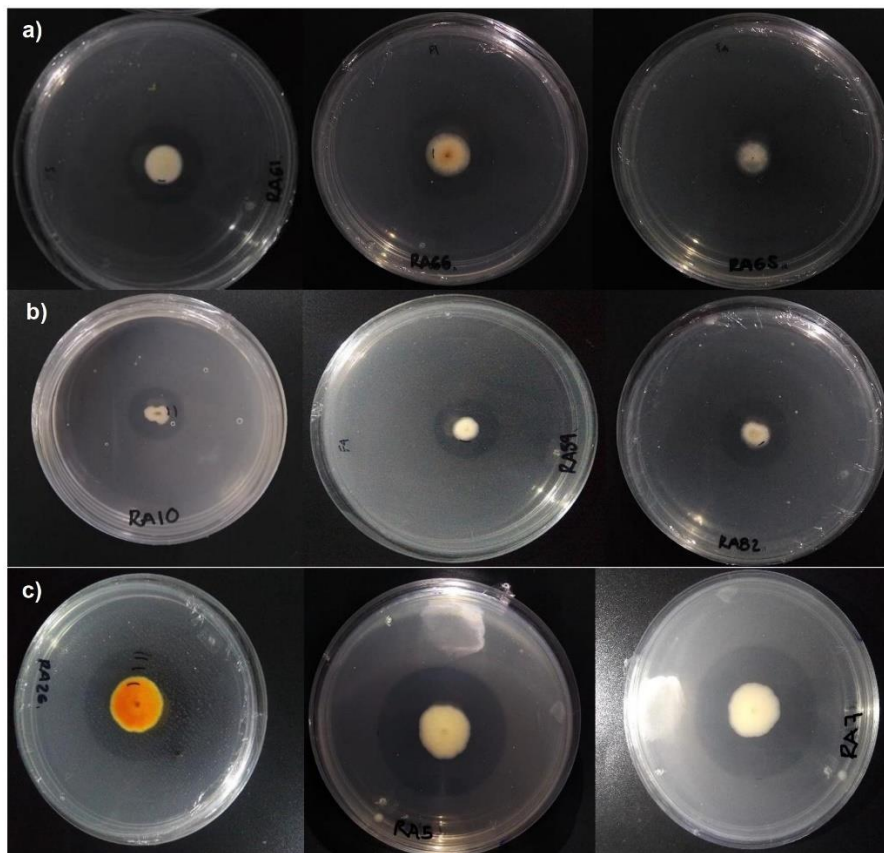


Figura 2. Cepas de hongos ubicadas en la escala I (a) II (b) y III (c) de solubilización en el día de su máxima solubilización.

Índice de eficiencia de solubilización de las cepas de hongos fosfato solubilizadoras seleccionadas

En el ANOVA se observan diferencias significativas entre los índices (ERS) registrados ($F=30.21$, $p<0.05$). El índice de solubilización (ERS) de las cepas RA5 (6.50) y RA7 (6.30) fue significativamente mayor al resto de las cepas evaluadas ($tukeys<0.05$). Un segundo grupo quedó representado por cinco cepas RA99, RA50, RA-AD2, RA25 y RA8, con valores de ERS cercanos, pero con índices significativamente diferentes a los presentados por las cepas RA87, RA77, RA38, RA36,

RA26. El resto de las cepas presentaron valores muy similares a excepción de RA30 y RA185 cuyo ERS fue significativamente menor al resto ($tukeys<0.05$) (Figura 3).

Evaluación cuantitativa de la capacidad fosfato solubilizadora de las cepas seleccionadas en la escala III

En la evaluación de eficiencia de solubilización, después de diez días de incubación en medio líquido, se observaron diferencias significativas entre los valores de fósforo soluble de las 29 cepas ubicadas en la escala III ($F=76.60$; $p<0.05$).

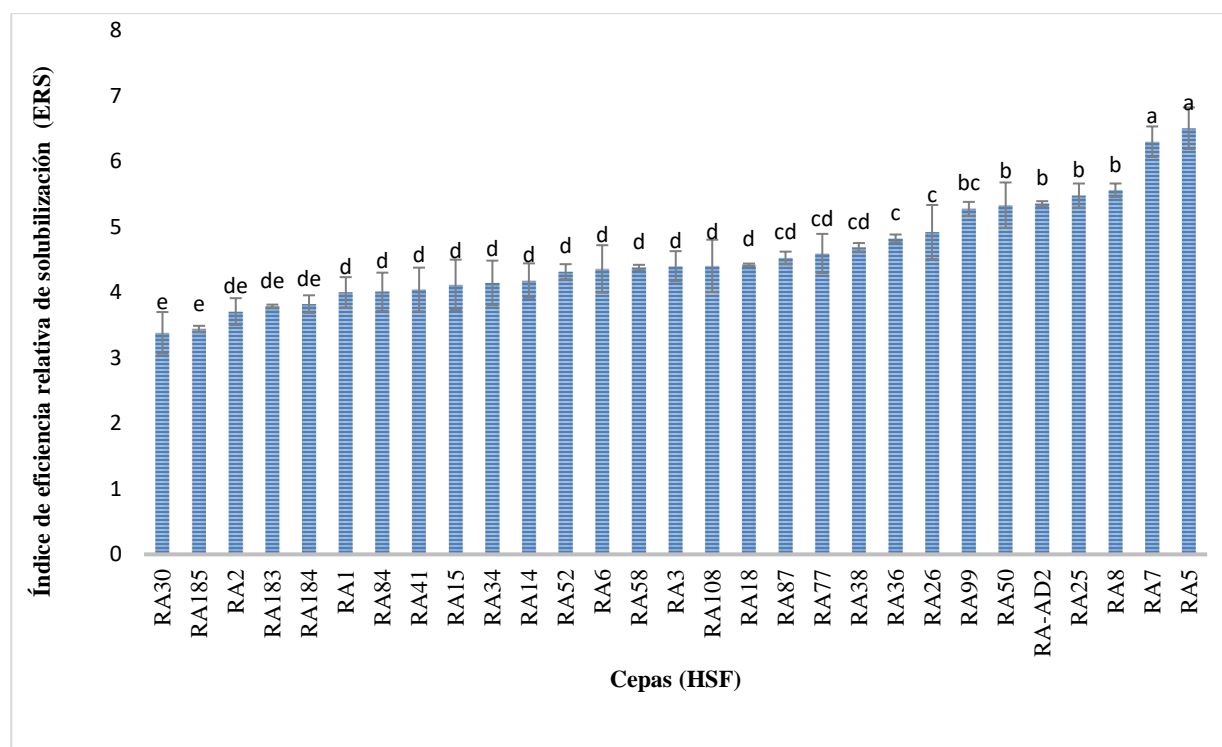


Figura 3. Valores máximos del índice de eficiencia relativa de solubilización (ERS) en medio sólido de las cepas de hongos fosfato solubilizadoras (HSF). Los datos son los promedios de 3 repeticiones \pm desviación estándar. Las letras idénticas entre las columnas indican que no existen diferencias significativas entre las cepas ($p>0.05$).

El rango de solubilización obtenido de las cepas evaluadas al décimo día de incubación fue de 22.52-96.50 mg/L. El mayor contenido de fósforo soluble se detectó en la cepa RA14 (tukey<0.05) y el menor en la cepa RA185 (tukey<0.05). El fósforo soluble cuantificado en el tratamiento testigo fue de 13.17 mg/L, significativamente menor al resto de las cepas evaluadas (tukey<0.05) (Figura 4).

pH

Los valores del pH de las cepas fueron significativamente diferentes entre las cepas (F=68.49; p<0.05), los valores oscilaron en un rango de 3,13 a 6,32. El valor de pH del tratamiento control o testigo fue de 6.3

significativamente mayor al pH de la mayoría de las cepas; excepto de la cepa RA185 que presentó un pH de 6.32 (Figura 5).

Porcentaje de acidez

Respecto al porcentaje de acidez de los extractos donde se crecieron las cepas de HSF; se detectaron diferencias significativas entre los valores de porcentajes obtenidos (F=95.81; p<0.05). La cepa RA14 presentó el porcentaje de acidez más alto, significativamente mayor al resto de las cepas (p<0.05), seguido de la cepa RA-AD2. El porcentaje de acidez de las cepas RA185, RA2, RA1, RA52, RA3 fue similar al obtenido para el tratamiento testigo (tukeys<0.05) (Figura 6).

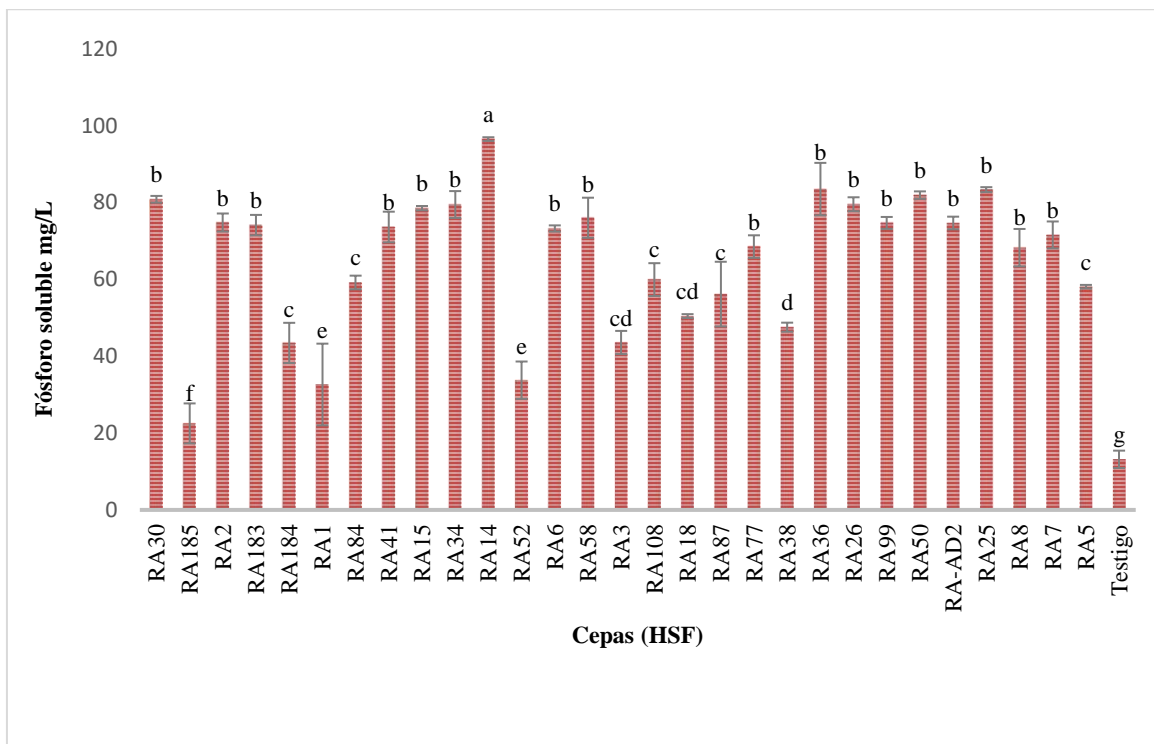


Figura 4. Contenido del fósforo soluble de las cepas de hongos solubilizadoras de fósforo después de diez días de incubación en medio líquido. Los datos son los promedios de 3 repeticiones \pm desviación estándar. Las letras idénticas entre las columnas indican que no existen diferencias significativas entre el fósforo soluble (p>0.05).

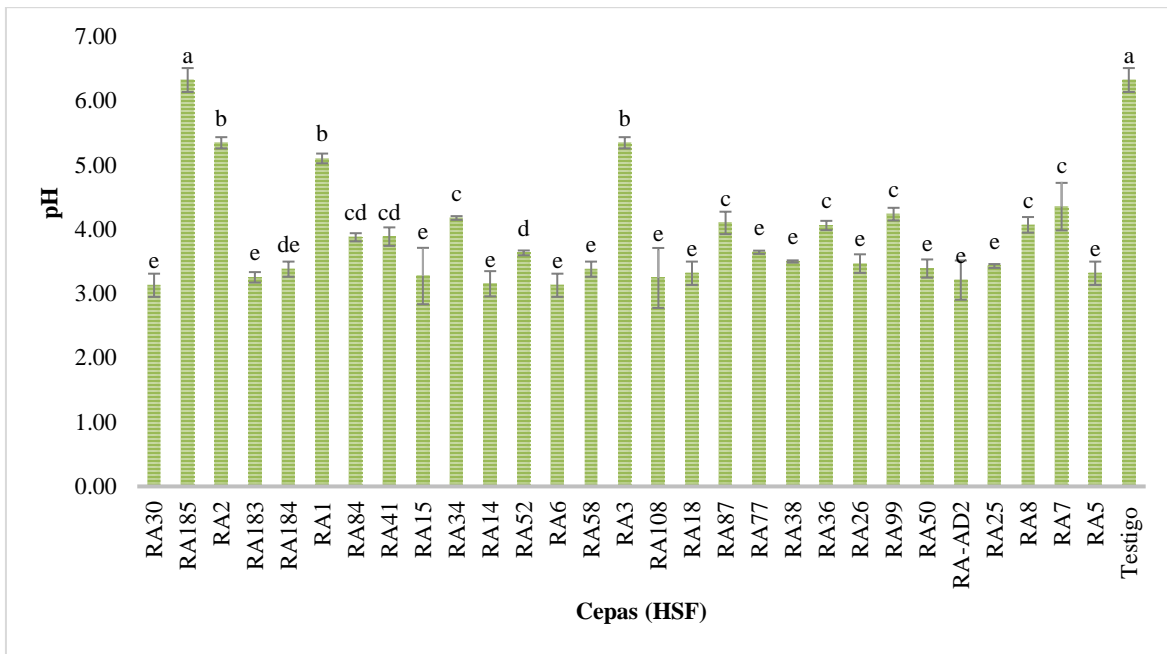


Figura 5. Variación del pH de los extractos de cepas de hongos del medio líquido con fosfato tricálcico. Los datos son los promedios de 3 repeticiones \pm desviación estándar. Las letras idénticas entre las columnas indican que no existen diferencias significativas entre la concentración de pH ($p > 0.05$).

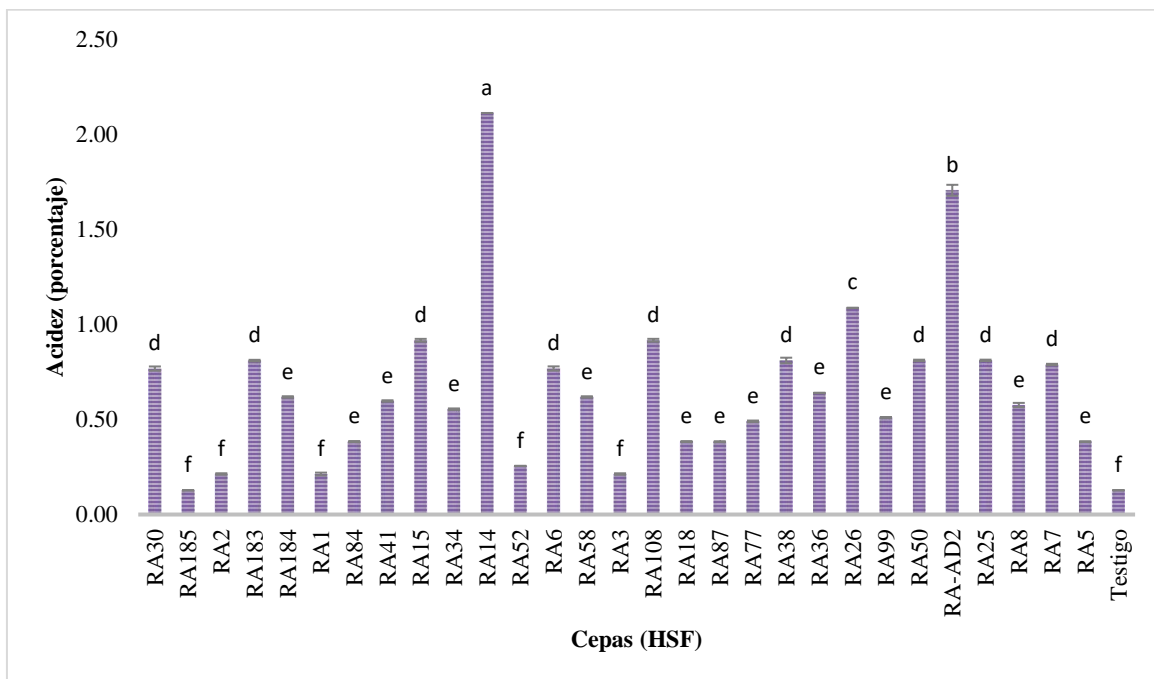


Figura 6. Porcentaje de acidez de los extractos de cepas de hongos del medio líquido. Los datos son los promedios de 3 repeticiones \pm desviación estándar. Las letras idénticas entre las columnas indican que no existen diferencias significativas entre el porcentaje de acidez ($p > 0.05$).

Relación entre el pH, la acidez (porcentaje) con el fósforo soluble de los extractos de las cepas

En los análisis de regresión simple, no se detectaron relaciones significativas entre las variables, sin embargo, en la relación del contenido de fósforo soluble y el porcentaje de acidez se observa una tendencia del 78.48%. A mayor porcentaje de acidez fue mayor el contenido de fósforo soluble (Figura 7).

DISCUSIÓN

Existen muy pocas investigaciones sobre aislamiento de hongos solubilizadores de fósforo nativos de cafetales; en este estudio, se aislaron 225 cepas de hongos de la rizósfera de plantas de café y un alto porcentaje de estas (71.5%) presentaron resultado positivo a la

solubilización de fósforo (160 cepas). Este dato es superior a los detectados por Posada *et al.*, [22] quienes a pesar de haber aislado 438 cepas de hongos de fincas cafetaleras en Colombia y 411 en México reportan solo 8.2% y 9.73% de las cepas solubilizadoras de fósforo respectivamente, es decir, para México solo 16 cepas dieron positivo a la prueba de solubilización de fósforo. Por otra parte, González *et al.*, [23] en tres fincas cafetaleras con variedad *Coffea arabica* L. en Colombia aislaron 55 cepas solubilizadoras de fósforo.

La mayoría de las cepas que expresaron respuesta positiva en este estudio, pertenecen a los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*. Diferentes estudios señalan que los géneros de *Aspergillus* y *Penicillium* tienen una alta capacidad de solubilización de fosfatos de Ca,

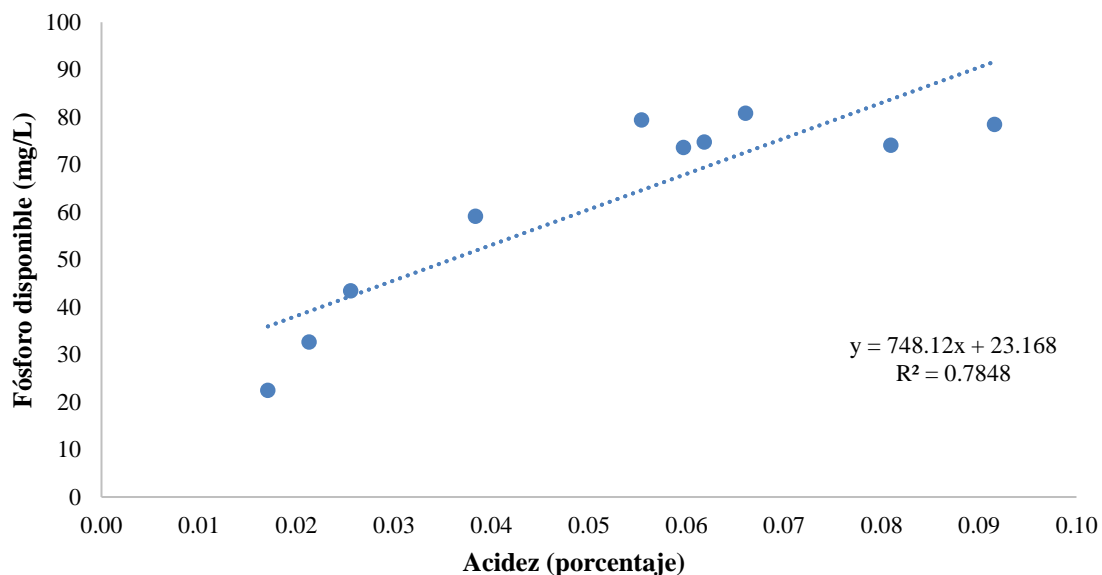


Figura 7. Relación entre el fósforo soluble y el porcentaje de acidez obtenido de las cepas de hongos fosfato solubilizadoras de la escala III de solubilización después de 10 días de incubación.

Al y Fe [24, 25, 26, 27, 28, 29]. Algunas cepas de *Trichoderma* [30] y *Rhizoctonia solani* [31] también han sido reportados como solubilizadores. Duponnois *et al.* [32] reportaron al hongo nematófago *Arthrobotrys oligospora* como solubilizador en condiciones *in vitro* e *in vivo*. Kaur *et al.*, [33] a través de una revisión exhaustiva menciona los siguientes géneros solubilizadores de fósforo: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Talaromyces*, *Meyerozyma*, *Candida*, *Pseudozyma*, *Arthroderma*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Eupenicillium*, *Paecilomyces*, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* y *Sporidiobolus*.

La actividad solubilizadora de los hongos se detectan por la formación de zonas claras o halos alrededor las colonias [34, 35]. El uso de pruebas reveladoras mediante halos en medio de cultivo sólido es una buena herramienta para detectar de manera rápida y sencilla la capacidad fosfato solubilizadora, no obstante, la formación de halos en un medio sólido no debe considerarse la única prueba para evaluar las capacidades de solubilización.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo por la prueba cualitativa las cepas de *Penicillium* RA5 y RA7 (diámetro de halo) exhibieron los mayores índices de eficiencia de solubilización (6.50 y 6.30 respectivamente); sin embargo, en la evaluación cuantitativa no se detectó el mayor contenido de fósforo soluble (58.09 y 71.56 mg/L, respectivamente). Por su parte, la cepa de *Penicillium* RA14 en la prueba cuantitativa exhibió un alto contenido de fósforo soluble (96.50 mg/L) mientras que en el

análisis cualitativo su índice de solubilización no fue el mayor (4.1), de manera que es recomendable realizar pruebas adicionales en medios líquidos. Además, es importante realizar un ajuste de la fórmula de cálculo del índice de eficiencia de solubilización, ya que no resulta muy útil al momento de seleccionar las mejores cepas pues no existe una coincidencia entre el ERS y el contenido de fósforo solubilizado; este dato se corroboró en la regresión lineal simple ($R^2=5\%$).

En otros estudios se han registrado valores de índice de solubilización de fosfato de hasta 5.3 ERS para *Trichosporon beigeli* [36], de 3.0 ERS para *Paecilomyces lilacinus* [37]; de 3.6 para *Penicillium brevicompactum*, 3.8 para *P. waksmanii* [38]; valores de 2.87 para *Aspergillus* sp. [39] y de 2.25 para *Penicillium purpureogenum* [34]; Romero-Fernández *et al.*, [40] menciona rangos de 2.06-6.85, siendo este último valor para una cepa de *Penicillium*. En este trabajo, los valores de ERS estuvieron en un rango de 1.13-6.5 superiores a reportados para las cepas de cafetales por Perea [38], quien expresa un rango de 1.5-3.8.

En los datos que aquí se presentan, la cepa local de la rizosfera de *Coffea arabica* var. Costa Rica *Penicillium* sp. RA14 solubilizó un alto contenido de fósforo (96.50 mg/L); este valor resultó mayor que los citados en la mayoría de los estudios publicados [37, 27, 41, 28, 42, 43, 44]. Sin embargo, el contenido de fósforo solubilizado de la cepa *Penicillium* sp. RA14 fue menor que los valores presentados para la cepa de *Aspergillus* sp. (167.7 mg/L) [28] y *Aspergillus niger* (93.5 mg/L) [42]. Numerosos

estudios demuestran la alta capacidad de cepas del género *Aspergillus* para solubilizar fósforo [45, 46, 47]. Sin embargo, integrantes de este género están relacionados con algunas enfermedades respiratorias graves, por lo que es recomendable tener precauciones de su uso [48, 49, 50].

Es primordial señalar que en este estudio se incluyó la cepa de *P. brevicompactum* obtenida anteriormente de suelo de cafetales de la zona de Coatepec, Veracruz reportada por Perea [38] como una cepa de alta capacidad fosfato solubilizadora (70.74 mg/L). En los resultados obtenidos de esta investigación, esa misma cepa de *P. brevicompactum* (RA30) mostró valores de 80.83 mg/L. No obstante, en este estudio algunas cepas aisladas de la rizosfera de las plantas de *Coffea arabica* var. Costa Rica mostraron valores superiores a los reportados por Perea [38]. Por lo que se demuestra que las cepas de la zona de Jilotepec muestran mejores desempeños para solubilizar fósforo del suelo.

La eficiencia de solubilización de fósforo depende del tipo de fuente de fósforo utilizada, el tipo de microorganismo empleado, de la calidad y la cantidad de ácidos orgánicos producidos en el medio de cultivo [51]. Uno de los mecanismos más conocidos de solubilización del fosfato del suelo es la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular por parte de los microorganismos; estos emplean tres estrategias para movilizar el fósforo del suelo tales como la acidificación, la liberación de aniones orgánicos ácidos (citrate, oxalato, gluconato entre otros) y la liberación de enzimas (fosfatasas y fitasas). La capacidad

de los ácidos orgánicos para aumentar la disponibilidad de fósforo se debe a la acidificación en la rizósfera, a su capacidad de formar complejos estables con el aluminio y el hierro, y a otros mecanismos aún no muy bien entendidos [52, 53, 54].

Los mecanismos de solubilización que utilizan los hongos son un tema interesante, puesto que diferentes autores han asociado la disminución del pH por la producción de ácidos orgánicos con la efectividad de solubilización [55, 56, 37]. En la investigación que aquí se presenta, se detectó una mayor relación entre el fósforo soluble con el porcentaje de acidez que con los valores de pH. La relación inversa observada entre el porcentaje de acidez y la concentración de P soluble indica que la producción de ácidos orgánicos por estas cepas juega un papel importante en la acidificación del medio facilitando la solubilización del fósforo. Por lo tanto, la variable que mayor incidencia tiene sobre la solubilización, o que explicaría de mejor forma la solubilización del fosfato tricálcico es la acidez titulable y en menor medida el pH.

Las propiedades quelantes de la liberación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular por parte de los hongos ayudan a la formación de complejos insolubles con metales, con la consecuente liberación de fósforo [57]. La solubilización por la producción de ácidos orgánicos depende de la naturaleza y fuerza de los ácidos que los hongos produzcan, ya que existen ácidos como los tri o di-carboxílicos que son más eficientes solubilizadores que los ácidos monobásicos y aromáticos [58, 59]. Los

hongos solubilizadores de fósforo que promueven el crecimiento de las plantas pueden utilizarse como biofertilizantes, no solo para promover el crecimiento de las plantas o aumentar la disponibilidad de fósforo, sino también para restaurar la fertilidad del suelo y reducir el uso de fertilizantes químicos, que son la clave para una agricultura sostenible.

Los resultados de este trabajo servirán para futuras investigaciones sobre cepas de hongos fosfato solubilizadores nativos de fincas cafetaleras del estado de Veracruz, evaluar su efectividad, seleccionar cepas prometedoras y evaluarlos *in vivo* con la intención de formular un bioinoculante fúngico solubilizador de fósforo que reduzca el uso de fertilizantes de síntesis química.

CONCLUSIÓN

En la rizósfera de las plantas de café *Coffea arabica* var. Costa Rica en Jilotepec, Veracruz existe una gran cantidad de cepas con una alta capacidad fosfato solubilizadora. Entre estas cepas, destaca *Penicillium* sp. RA14 ya que promueve una mayor solubilización de fosfato de calcio en condiciones *in vitro*.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen intereses en competencia.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al COVEICYDET por el financiamiento del proyecto 13 1627:

“Desarrollo de un bioinoculante fúngico solubilizador de fósforo del suelo y promotor del crecimiento y productividad de plantas de café (*Coffea arabica* var. Costa Rica) en Jilotepec, Veracruz” y a los propietarios de las fincas por permitir el acceso para tomar muestras de suelo.

REFERENCIAS

- [1]. Kishore N, Pindi P, Reddy R. Phosphate-Solubilizing Microorganisms: A Critical Review. In: Bahadur B., Venkat Rajam M., Sahijram L., Krishnamurthy K. Eds. Plant Biol and Biotech. Springer, New Delhi 2015. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2286-6_12
- [2]. Guschina I, Dobson G, Harwood J. Lipid metabolism in cultured lichen photobionts with different phosphorus status. *Phytochemistry* 2003; 64(1): 209–217. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00279-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00279-6).
- [3]. Geissert D, Ibañez A. Calidad y ambiente fisicoquímico de los suelos. In Manson RH, Hernández V, Gallina S, Mehltreter K. Eds. Agroecosistemas cafetaleros del estado de Veracruz: Biodiversidad, manejo y conservación. Instituto de Ecología AC, Xalapa, México 2008.
- [4]. Rincón E, Gutiérrez A. Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Rev Colomb de Biotecnol* 2012; 14(1): 285-295.
- [5]. Molina M, Escudey M, Antilén M, Arancibia-Miranda N, Manquián K. Distribution of contaminant trace metals

- inadvertently provided by phosphorus fertilisers: movement, chemical fractions and mass balances in contrasting acidic soils. *Environ Geochem Health* 2018; 40, 2491–2509. <https://doi.org/10.1007/s10653-018-0115-y>
- [6]. Hegedűs M, Tóth-Bodrogi E, Németh S, Somlai J, Kovács T, Hegedűs M, Tóth-Bodrogi E, Németh S, Somlai J, Kovács T. Radiological investigation of phosphate fertilizers: Leaching studies. *J Environ Radioact* 2017; 173, 34-43. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2016.10.006>
- [7]. Navarro G. Química agrícola: el suelo y los elementos químicos esenciales para la vida. Ediciones Mundi Prensa. Madrid, España 2003.
- [8]. Nannipieri P, Giagnoni L, Landi L, Renella G. Role of Phosphatase Enzymes in Soil. In: Bünemann E, Oberson A, Frossard E. Eds. Phosphorus in Action. Soil Biology. Springer, Berlin, Heidelberg 2011. https://doi.org/10.1007/978-3-642-15271-9_9
- [9]. Sharma SB, Sayyed RZ, Trivedi MH, Gobi TA. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. Springerplus. 2013.
- [10]. Illmer P, Barbato A, Schinner F. Solubilization of hardly-soluble $AlPO_4$ with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biol Biochem* 1995; 27: 265–270. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)00205-F](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)00205-F)
- [11]. Kang S, Pandey P, Khillon R, Maheshwari D. Process of rock phosphate solubilization by *Aspergillus* sp. PS 104 in soil amended medium. *J Environ Biol* 2008; 29(5): 743-746.
- [12]. Scervino J, Papinutti V, Godoy M, Rodríguez M, Della I, Recchi M, Pettinari M, Godeas A. Medium pH, carbon and nitrogen concentrations modulate the phosphate solubilization efficiency of *Penicillium purpurogenum* through organic acid production. *J Applied Microbiol* 2011; 10: 1215-1223. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04972.x>
- [13]. Sharma S, Kumar V, Tripathi R, Sharma S, Kumar V, Tripathi RB. Isolation of phosphate solubilizing microorganism (PSMs) from soil. *J Microbiol Biotechnol* 2011; 1(2): 90-95.
- [14]. Yasser M, Mousa A, Massoud O, Nasr S. Solubilization of inorganic phosphate solubilizing fungi isolated from Egyptian soils. *J Biol Earth Sci* 2014; 4(1): B83-B90.
- [15]. Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). Manual de Toma, Manejo y Envío de Muestras 2018; Tecámac, México.
- [16]. Bills G, Christensen M, Powell M, Thorn G. Saprobic soil fungi. In Foster MS, Bills GF, Mueller GM Eds. Biodiversity of fungi: Inventory and monitoring methods, San Diego (CA): Elsevier Academic Press 2004.
- [17]. Sundara W, Sinha M. Phosphate dissolving organisms in the soil and rhizosphere. *Indian J Sci* 1963;33: 272-278.
- [18]. Vitorino L, Silva F, Soares M, Souchie E, Costa A, Lima W. Solubilization of calcium and iron phosphate and *in vitro* production of Indoleacetic acid by Endophytic isolates of *Hyptis marrubioides* Epling (Lamiaceae). *Int J*

Biotechnol 2012; 3(4): 47-54.

[19]. Silva G, Vidor C. Solubilização de fostatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. Rev Bras Cienc Solo 2000; 24(2): 311-319.

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

[21]. StatSoft Inc. Statistica para Windows v.7.0. 2007. Data analysis software system. Tulsa.

[22]. Posada R, Heredia G, Sieverding E, Sánchez de Prager M. Solubilization of iron and calcium phosphates by soil fungi isolated from coffee plantations. Arch Agron Soil Sci 2013; 59(2): 185-196.
<https://doi.org/10.1080/03650340.2011.610030>

[23]. González-Osorio H, Botero E, Rivera D, Vega W. Screening for phosphate-solubilizing fungi from colombian andisols cultivated with coffee (*Coffea arabica* L.). Coffee Science 2020; <https://doi.org/10.25186/v15i.1666>

[24]. Fenice M, Selbman L, Federici F, Vassilev N. Application of encapsulated *Penicillium* variable P16 in solubilization of rock phosphate. Bioresour Technol 2000; 73(2): 157-162.

[25]. Khan MR., Khan SM. Effects of root-dip treatment with certain phosphate solubilizing microorganisms on the fusarial wilt of tomato. Bioresour Technol 2002; 85(2): 213-215.

[26]. Pandey A, Das N, Kumar B, Rinu K, Trivedi P. Phosphate solubilization by

Penicillium spp. isolated from soil samples of Indian Himalayan region. World J Microbiol Biotechnol 2008; 24(1): 97-102.
<https://doi.org/10.1007/s11274-007-9444-1>

[27]. Morales A, Alvear M, Valenzuela E, Castillo C, Borie F. Screening, evaluation and selection of phosphate-solubilising fungi as potential biofertiliser. J Soil Sci Plant Nutr 2011; 11(4): 89-103.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162011000400007>

[28]. Rathore P, Phanse N, Patel B. Screening for microorganisms possessing phosphate solubilizing potential. Indian J Sci Res 2014; 3(1): 172-174.

[29]. Gizaw B, Tsegay Z, Tefera G, Aynalem E, Wassie M, Abatneh E. Phosphate solubilizing fungi isolated and characterized from Teff rhizosphere soil collected from North Showa zone, Ethiopia. Afr J Microbiol Res 2017; 11(17): 687-696.
<https://doi.org/10.5897/AJMR2017.8525>

[30]. Altomare C, Norvell W, Björkman T, Harman G. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai. Appl Environ Microbiol 1999; 65 (7): 2926-2933.

[31]. Jacobs H, Boswell G, Ritz K, Davidson F, Gadd G. Solubilization of calcium phosphate as a consequence of carbon translocation by *Rhizoctonia solani*. FEMS Microbiol. Ecol. 2002; 40 (1): 65-71.

[32]. Duponnois R, Kisa M, Plenchette C. Phosphate-solubilizing potential of the

nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. J Plant Nutr Soil Sci 2006; 169 (2): 280-282.

<https://doi.org/10.1002/jpln.200520551>

[33]. Kaur T, Devi R, Kour D, Yadav A, Yadav A, Dikilitas M, Saxena A. Plant growth promoting soil microbiomes and their potential implications for agricultural and environmental sustainability. *Biologia* 2021; 76(9): 2687-2709. <https://doi.org/10.1007/s11756-021-00806-w>

[34]. Verma A, Ekka A. Isolation, screening and assessment of phosphate solubilizing efficiency of some fungal isolates of Raipur, Chhattisgarh. *J Environ Sci Toxicol Food Technol* 2015; 1(1): 29-39.

[35]. Yadav J, Verma J, Yadav S, Tiwari K. Effect of salt concentration and pH on soil inhabiting fungus *Penicillium citrunum* Thom. for solubilization of tricalcium phosphate. *Microbiol J* 2011; 1(1): 25-32.

[36]. Hajjam Y, Cherkaoui S. The influence of phosphate solubilizing microorganisms on symbiotic nitrogen fixation: Perspectives for sustainable agriculture. *J Mater* 2017; 8(3): 801-808.

[37]. Hernández-Leal T, Carrión G, Heredia G. Solubilización *in vitro* de fosfatos por una cepa de *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Agrociencia* 2011;45(8): 881-892.

[38]. Perea Y. Estudio preliminar del potencial solubilizador de fosfato tricálcico por micromicetos saprobios de suelos del Estado de Veracruz. Tesis de Licenciatura, Universidad Veracruzana 2013.

<https://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/680407>

[39]. Elías F, Woyessa D, Muleta D. Phosphate solubilization potential of rhizosphere fungi isolated from plants in Jimma Zone, Southwest Ethiopia. *International Journal of Microbiology* 2016; 1-11. <https://doi.org/10.1155/2016/5472601>

[40]. Romero-Fernández A, Arias RM, Mendoza-Villarreal R. Aislamiento y selección de hongos de suelo solubilizadores de fósforo nativos del estado de Coahuila, México. *Acta Botánica Mexicana* 2019; 126:1-16. <https://doi.org/10.21829/abm126.2019.1390>

[41]. Saxena J, Basu P, Jaligam V, Chandra S. Phosphate solubilization by a few fungal strains belonging to the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. *Afr J Microbiol Res* 2013; 7(41): 4862-4869. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.5991>

[42]. Moreno-Quevedo A, Osorio N, González O. Disolución *in vitro* de fosfato de roca acidulado por microorganismos solubilizadores de fosfato. *Acta Biol Colomb* 2015; 20(2): 65-71. DOI: <https://dx.doi.org/10.15446/abc.v20n2.42713>

[43]. Lima-Rivera D, López-Lima D, Desgarennes D, Velázquez-Rodríguez A, Carrión G. Phosphate solubilization by fungi with nematicidal potential. *J Soil Sci Plant Nutr* 2016; 16(2): 507-524. DOI: <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162016005000042>

[44]. Selvi K, Paul J, Vijaya V, Saraswathi K. Analyzing the Efficacy of Phosphate

Solubilizing Microorganisms. Enrichment Culture Techniques. Biochem Mol Biol 2017; 3(1): 7-1.

[45]. Li Z, Bai T, Dai L, Wang F, Tao J, Meng S, Hu S. A study of organic acid production in contrasts between two phosphate solubilizing fungi: *Penicillium oxalicum* and *Aspergillus niger*. Sci Rep 2016; 6(1): 1-8. <https://doi.org/10.1038/srep25313>

[46]. Sánchez-de Prager M, Cisneros-Rojas CA. Organic acids production by rhizosphere microorganisms isolated from a *Typic melanudands* and its effects on the inorganic phosphates solubilization. Acta Agron 2017; 66(2): 241-247. <https://doi.org/10.15446/acag.v66n2.56148>

[47]. Nasr S, Mousa A, Marzouk M, Yasser M. Quantitative and qualitative analysis of organic acids produced by phosphate solubilizing fungi. Egypt J Bot 2021; 61(1): 167-176.

[48]. Sánchez C, Viña A. *Aspergillus* y pulmón. Arch Bronconeumol 2004; 40(3), 114-122.

[49]. Cuan A. El diagnóstico diferencial de *Aspergillus fumigatus* es una necesidad en ambientes carboníferos. Biociencias 2014; 9(2): 87-96.

[50]. Vargas J, Vélez J, Chalela N. *Aspergillus*, un asesino desconocido. Acta Neurol Colomb 2021; 37(1), 112-116. <https://doi.org/10.22379/24224022342>

[51]. Mittal V, Singh O, Nayyar H, Kaur J, Tewari R. Stimulatory effect of phosphate-solubilizing fungal strains (*Aspergillus awamori* and *Penicillium citrinum*) on the yield

of chickpea (*Cicer arietinum* L. cv. GPF2). Soil Biol. Biochem. 2008; 40(3): 718-727.

[52]. Paredes-Mendoza M, Espinosa-Victoria D. Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. Terra Latinoamericana 2010; 28(1): 61-70.

[53]. Jones D, Oburger E. Solubilización del fósforo por microorganismos del suelo. In Phosphorus in action. Springer, Berlín, Heidelberg 2011.

[54]. De Oliveira G, Moreira A, Liparini O, Ribeiro I, Bojkov N, Dutra M. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. Ann Microbiol 2014; 64(1): 239-249. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0656-3>

[55]. Gómez-Guiñán Y, Zabala M. Determinación de la capacidad solubilizadora del P en hongos aislados de la rizósfera del mani (*Arachis hypogaea* L.). Saber 2001; 13(1): 8-13.

[56]. Chuang CC, Kuo YL, Chao CC, ChaoWL. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. Biol Fertil Soils 2007; 43: 575-584. <https://doi.org/10.1007/s00374-006-0140-3>

[57]. Fernández M, Rodríguez H. El papel de la solubilización de fósforo en los biofertilizantes microbianos. ICIDCA. Sobre los Derivados de la caña de azúcar 2005; 39(3): 27-34.

[58]. Barroso C, Pereira G, Nahas E. Solubilización de CaHPO₄ y AlPO₄ por *Aspergillus niger* en medios de cultivo con

diferentes fuentes de carbono y nitrógeno. Braz
J Microbiol 2006; 37: 434-438.

[59]. Walpola B, Yoon M. Isolation and
characterization of phosphate solubilizing

bacteria and their co-inoculation efficiency on
tomato plant growth and phosphorous uptake.
Afr J Microbiol Res; 2012; 6(37): 6600-6605.