


EOI: <https://eoi.citefactor.org/10.11235/BUAP.05.19.01>

Interacción entre cepas de hongos solubilizadores de fósforo y diferentes fuentes de nitrógeno sobre la solubilización y mineralización de fósforo

Rosa María Arias Mota^{1*} , Miriam Lagunes Reyes², José Antonio García Pérez², Yadeneyro de la Cruz Elizondo².

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

²Facultad de Biología. Universidad Veracruzana. Campus Xalapa, circuito Gonzalo Aguirre Beltrán s/n. CP 91090 Zona Universitaria Xalapa, Ver. México.

*Email autor corresponsal: rosa.arias@itsx.edu.mx

Recibido: 3 julio 2020. **Aceptado:** 7 agosto 2020

RESUMEN

Antecedentes: Los hongos solubilizadores de fósforo dependen de los nutrientes del medio para su desarrollo y de acuerdo con las fuentes nutricionales disponibles utilizan rutas metabólicas alternativas en los procesos de solubilización y mineralización. **Objetivo:** Evaluar a nivel de invernadero, el efecto de la interacción de dos cepas de hongos solubilizadores de fósforo con diferentes fuentes de nitrógeno sobre la solubilización de fósforo y producción de fosfatasas. **Métodos:** Las cepas utilizadas fueron *Aspergillus niger* y *Penicillium brevicompactum* las cuales se inocularon en plantas de jitomate *Solanum lycopersicum*. A cada planta se le adicionaron diferentes fuentes de nitrógeno (fosfato de amonio, urea y asparagina) y fosfato tricálcico. Cada tercer día y durante un mes, se cuantificó el de fósforo soluble y el pH al sustrato de las plantas; al mes se midió la actividad fosfatasas y se corroboró la presencia de los hongos inoculados. **Resultados y discusión:** Los datos mostraron que la cepa *A. niger* con sulfato de amonio en el día 28 indujo la mayor concentración de fósforo soluble y la mayor actividad de fosfatasas ácidas. Se detectó una relación negativa entre el fósforo soluble y el pH del sustrato; lo cual sugiere que la solubilización de fósforo ocurre principalmente por la producción de ácidos orgánicos. La relación positiva detectada entre el fósforo soluble y la producción de fosfatasas sugiere que la mineralización y la solubilización de fósforo ocurren de manera simultánea. Es importante resaltar que se evidenció la presencia de los hongos inoculados en el sustrato de las plantas. **Palabras clave:** *Aspergillus niger*, *Penicillium brevicompactum*, fosfato tricálcico, urea, asparagina, sulfato de amonio.



ABSTRACT

Background: Phosphorus solubilizing fungi depend on the nutrients of the medium for their development and, according to the available nutritional sources, they use alternative metabolic pathway in the solubilization and mineralization processes. **Objective:** Evaluate at greenhouse level, the effect of interaction between two of phosphorus solubilizing fungi strains (alone and consortium) with different nitrogen sources on the phosphorus solubilization and phosphatase production. **Methods:** The strains used were *Aspergillus niger* and *Penicillium brevicompactum*, both were inoculated into tomato plants *Solanum lycopersicum*. Different nitrogen sources (ammonium phosphate, urea and asparagine) and tricalcium phosphate were added to each plant. During a month and every third day, the soluble phosphorus content was quantified and the pH was measured. At the end of the month, the enzymatic activity of acid and alkaline phosphatases was measured. **Results and discussion:** The data obtained showed that *A. niger* strain with ammonium sulfate on day 28 induced the highest concentration of soluble phosphorus and the highest activity of acid phosphatases. A negative relationship between soluble phosphorus and the pH of the substrate was detected; which suggests that phosphorus solubilization occurs mainly by the production of organic acids. The positive relationship detected between soluble phosphorus and phosphatase production suggests that phosphorous mineralization and solubilization occur simultaneously. It is important to highlight that the presence of the fungi inoculated in the substrate of the plants was evidenced.

Keywords: *Aspergillus niger*, *Penicillium brevicompactum*, tricalcium phosphate, urea, asparagine, ammonium sulfate.

INTRODUCCIÓN

El fósforo (P) es considerado el segundo elemento químico más importante después del nitrógeno para el desarrollo y funcionamiento de las plantas [1]. Este elemento cumple roles fisiológicos y bioquímicos esenciales al formar parte de moléculas estructurales (fosfolípidos, ácidos nucleicos y nucleótidos). Participa en

procesos de transferencia de energía, ya que forma parte de las moléculas de ADP y ATP, así como en la transducción de señales químicas [2]. La disponibilidad del P en el suelo es limitada, esto se debe principalmente a que este elemento se transforma en el suelo a formas insolubles por la asociación a elementos iónicos (calcio, hierro y aluminio); los cuales no pueden

ser asimilados por las plantas [3].

Los problemas de escasez de P son resueltos generalmente a través de la aplicación de fertilizantes, sin embargo, estas prácticas son costosas y conducen a la pérdida de la fertilidad del suelo y de la diversidad microbiana [4]. Con el fin de reducir el uso de estos agroquímicos surge la agricultura sostenible, que propone delegar estos compuestos por abonos verdes, humus, compostas y microorganismos benéficos del suelo, entre ellos se encuentran los hongos solubilizadores de fosforo (HSF) [5].

Los HSF ponen a disposición de las plantas el P de la roca del suelo mediante su transformación, principalmente a través de procesos de mineralización y solubilización. El primero consiste en la producción de las enzimas fosfatasa y fitasa, para convertir el P orgánico a inorgánico [6]; mientras que el segundo, consiste en la transformación de P insoluble a soluble por medio de la producción de ácidos orgánicos (ácido láctico, cítrico, acético, oxálico, succínico) que actúan como agentes quelantes de los cationes asociados a los fosfatos insolubles (calcio (Ca), magnesio (Mg), hierro (Fe) y aluminio (Al) [7, 8]. Existen diversos factores que influyen en el proceso de la solubilización del fósforo, los más importantes debido a que tienen una relación directa con los procesos metabólicos de los

microorganismos son: el pH en el suelo, contenido de materia orgánica, iones en el suelo, y elementos como el carbono, potasio, azufre, fósforo y nitrógeno [9, 10]. La influencia de los nutrientes en la solubilización de P se debe principalmente a la capacidad que tienen los hongos saprobios para utilizar una gran variedad de nutrientes como fuentes de carbono y de nitrógeno, desde carbohidratos simples hasta moléculas de difícil degradación como pectinas, celulosas, ligninas, proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos y otros compuestos nitrogenados [11], que utilizan para sintetizar sus propias moléculas (proteínas, ácidos nucleicos y polímeros de la pared celular) [12]. El nitrógeno es uno de los principales elementos que ejerce un efecto directo sobre los microorganismos que solubilizan fósforo, el cual es provisto a través de diferentes fuentes como la materia orgánica (MO) y los compuestos nitrogenados (amonio, nitritos, nitratos).

Debido a que los hongos son organismos heterótrofos dependientes de los nutrientes del medio para su desarrollo, la limitación en la disponibilidad de nitrógeno afecta directamente su desarrollo, y por ende, la producción de metabolitos. Por tanto, la adición de nitrógeno podría ser una alternativa para mejorar la disponibilidad de fósforo en los suelos mediante la estimulación de los HSF. Relwani

et al., [13] han sugerido que los hongos utilizan diversas rutas metabólicas para producir diferentes ácidos orgánicos de acuerdo con el tipo de cepa y fuentes nutricionales disponibles en el medio. Investigaciones *in vitro* han demostrado la influencia del nitrógeno sobre el crecimiento fúngico y, por lo tanto, sobre la solubilización de P y la producción de ácidos orgánicos que disminuye el pH del medio [14]. En la acidificación, los ácidos orgánicos actúan como agentes quelantes o secuestradores del ion asociado (Al^{3+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} y Mg^{2+}) dejando disponible el fósforo en forma de ortofosfato [8]. La forma en cómo el nitrógeno interviene en la solubilización es mediante el mecanismo de asimilación de amonio por parte de los hongos, el cual provoca la liberación de hidronios al medio, causando acidificación y al mismo tiempo contribuyendo a la solubilización [15;12]. En las últimas décadas se han realizado estudios para demostrar el efecto que tienen distintas fuentes de nitrógeno, tanto orgánicas como inorgánicas, sobre la capacidad solubilizadora de hongos de diferentes cepas de *Aspergillus niger* y *Penicillium* sp. [14, 12, 13, 18, 10, 19, 20, 21]. Asimismo, se ha evaluado el efecto que tiene adicionar diferentes concentraciones de fuentes de nitrógeno sobre la solubilización que llevan a cabo *Aspergillus niger* y *Penicillium purpurogenum* [22, 15]. Sin embargo, todos

estos estudios solo se han llevado a cabo bajo condiciones *in vitro*. Por tanto, este estudio tuvo como objetivo, escalar dichas investigaciones para determinar el efecto de la interacción de hongos solubilizadores de fósforo, *Penicillium brevicompactum* y *Aspergillus niger* con diferentes fuentes de nitrógeno (FN) sobre la solubilización y mineralización de fosforo a nivel de invernadero. Para ello se utilizaron plantas de jitomate, *Solanum lycopersicum*, como modelo experimental; en experimentos previos [23] esta planta se adaptó a las condiciones del invernadero y permitió el establecimiento de los hongos solubilizadores. Asimismo, se determinó si existe alguna asociación entre la tasa de solubilización de fosforo en el tiempo, con las trayectorias del pH y de la actividad enzimática de las fosfatasas para tratar de dilucidar los mecanismos implicados en solubilización y la mineralización.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron plantas de *Solanum lycopersicum* comercialmente llamado jitomate saladette como planta modelo. Las semillas de jitomate previo a la germinación se desinfectaron con cloralex comercial al 10% durante 1 minuto, posteriormente se lavaron con agua estéril varias veces, se agregó agua estéril y se dejaron en imbibición durante 1 hora, posteriormente se

transfirieron a cajas Petri con papel filtro húmedo y se colocaron en incubación durante 5 días a 28 °C en la cámara bioclimática (Artificial Climate Chamber RTOP-430D). Se tomaron plantas de la misma altura y de 6 días de germinada y se trasladaron a macetas de 250 g con arena y perlita estéril 1:1 (v/v); a cada una se le agregó fosfato tricálcico como fuente insoluble de fósforo (0.125 g), el inóculo de cada una de las cepas de HSF (1 x 10⁸ UFC/mL) se realizó siguiendo la metodología propuesta por Souchie *et al.*, [24]. De manera independiente se adicionaron 0.5 g/L de cada una de las fuentes de nitrógeno (sulfato de amonio, asparagina y urea).

La aplicación de los inoculantes se realizó directamente al sustrato y sobre el sistema radicular de la planta. Las cepas de HSF empleadas fueron *Penicillium brevicompactum* Dierckx, y *Aspergillus niger* Van Tieghem, las cuales pertenecen a la colección del Laboratorio de micromicetos del Instituto de Ecología, y fueron aisladas de suelos de la región del centro del estado de Veracruz, México y se seleccionaron por su alta capacidad para solubilizar fosfato tricálcico.

Se estableció un diseño experimental de 2 factores (HSF y fuentes de nitrógeno) con 4 niveles cada factor (HSF: *P. brevicompactum*, *A. niger*, Consorcio (*P. brevicompactum* + *A. niger*) y S/H. Fuentes de nitrógeno: asparagina,

sulfato de amonio, urea y S/N) en total 16 tratamientos. Se realizaron 3 repeticiones de cada tratamiento, a través de 5 mediciones en el tiempo (4 x 4 niveles=16 trat. x 3 rep.=48 tratamientos x 5 mediciones = 240 unidades experimentales). Las plantas se mantuvieron en un invernadero no tecnificado durante 1 mes en el Instituto de Ecología, A.C. y se le adicionó semanalmente 25 mL de solución nutritiva de Hewitt sin fósforo [25]. Se realizaron muestreos cada 7 días incluyendo el día de la inoculación (día cero) para medir las variables fósforo soluble y pH. Al finalizar el ensayo se evaluó actividad enzimática de fosfatasas ácida y alcalina. Para corroborar la presencia de los hongos, se realizó un monitoreo de exploración, mediante la técnica de lavado de partícula de suelo en tamices (1 mm, 500 µm, 250 µm y 150 µm) con agua purificada. Se tomaron 300 µL de muestra y se colocaron en medio de cultivo DBRC (rosa de bengala con dicloran y clorafenicol) y se incubaron por 15 días a 25 °C. La determinación del fósforo soluble en el sustrato experimental se llevó a cabo cada siete días durante un mes mediante la técnica de Bray y Kurtz [26], la cual consiste en tomar 2.5 g de sustrato añadiéndole 25 mL de una solución extractante (fluoruro de amonio 0.03 N en ácido clorhídrico 0.025 N) y agitando a 180 rpm en posición vertical. Posteriormente cada extracto se filtró utilizando papel filtro Whatman (No.

42) y de cada filtrado se tomó una alícuota de 5 mL de muestra añadiendo 5 mL de reactivo combinado, se aforó a 50 mL con agua destilada dejando reposar durante 30 minutos. La lectura de cada muestra se realizó en espectrofotómetro (GENESYS 10S UV-VIS) a 882 nm. Los datos se transformaron mediante una curva de calibración. La cantidad de fósforo soluble se calculó mediante la siguiente fórmula: P (mg/kg): ppm en CC x DM x DV. Donde: ppm en CC: partes por millón en la curva de calibración, DM: dilución masa (volumen de la solución extractante)/(gramos de muestra) y DV: dilución del volumen (aforo)/(alícuota de muestra agregada).

Por su parte, la actividad fosfatasa, i.e., ácida o alcalina, se determinó mediante el método de Tabatabai y Bremner [27]. Para ello, se colocó 1 g del sustrato de cada muestra y se les adicionó 4 mL de buffer ácido o alcalino según el caso, más 1 mL de solución de p-nitrofenilfosfato. Las muestras se incubaron durante 1 hora a 37 °C con agitación a 120 rpm. y después de la incubación se sometieron a un baño de hielo para detener la reacción, y, a continuación, añadiendo 1 mL de CaCl₂ y 4 mL de NaOH. Finalmente, la suspensión se filtró (papel Whatman No. 42) y se realizaron las mediciones en el espectrofotómetro a 400 nm. Los datos se transformaron mediante la curva de calibración. La medición del pH del sustrato

de cada uno de los tratamientos se realizó cada siete días durante un mes de incubación por el método de Willard *et al.*, [28], que consistió en pesar 1 g de sustrato al cual se le añadió 10 mL de agua destilada (pH 7). Posteriormente se agitaron y se dejaron reposar 10 minutos, finalmente la medición del pH se realizó con un pH metro (Science MED® mod. SM-3BW)

Análisis estadísticos

El efecto de los factores experimentales sobre el fosforo soluble y el pH fueron determinados mediante un análisis de varianza factorial de medidas repetidas [51], utilizando un nivel alfa de 0.05. Similarmente, el efecto sobre la actividad enzimática al final del experimento fue determinada mediante un análisis de varianza factorial [29] con un alfa de 0.05. La asociación entre el fósforo soluble con el pH y la actividad fosfatasa (ácida y alcalina), se exploró mediante un Análisis de Componentes Principales. y se realizó un análisis de varianza factorial sobre el componente principal I (CP I) para determinar algún efecto de los factores experimentales sobre las variables correlacionadas con dicho CP (i.e., fósforo soluble, pH, fosfatasa ácida o fosfatasa alcalina). La detección de un efecto significativo en la prueba Omnibus de ANOVA, fue seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey para determinar diferencias entre los tratamientos.

Todos los análisis se llevaron a cabo en el programa Statistica (7.0) [30].

RESULTADOS

Fósforo soluble en el sustrato de los tratamientos

El análisis de varianza sobre los datos obtenidos de fósforo soluble mostró una interacción significativa entre los factores de experimentación a través del tiempo ($F=27.06$, $p=0.0000$) (Figura 1). La concentración más alta de fósforo soluble se detectó en el tratamiento de *A. niger* con sulfato de amonio en el día 28 (154.7 mg kg^{-1}) ($p<0.05$). Los siguientes tratamientos siguieron en orden decreciente respecto a la concentración de fosforo soluble: *P. brevicompactum* + *A. niger* con sulfato de amonio, día 28 (87.3 mg/kg) ($p<0.05$); *P. brevicompactum* con sulfato de amonio, día 21 (75.2 mg/kg) ($p<0.05$) y, finalmente, el tratamiento sin hongos con sulfato de amonio, día 14 (53.4 mg/kg) ($p<0.05$). La cantidad de fósforo soluble obtenido en los tratamientos de *A. niger* y de *P. brevicompactum* + *A. niger* ambos sin nitrógeno adicional, fue significativamente mayor que el obtenido en los tratamientos que incluyeron como fuente de nitrógeno la urea y la asparagina ($p<0.05$) (Figura 1).

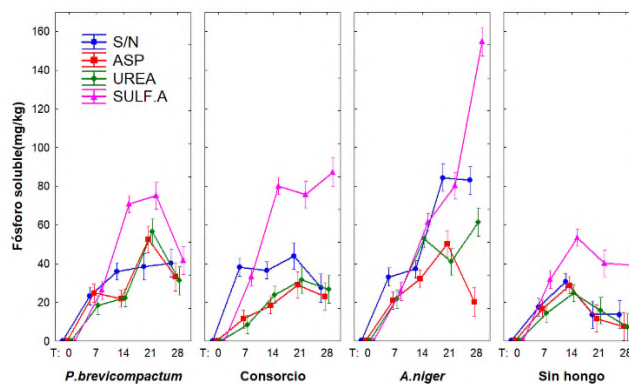


Figura 1. Concentración de fósforo soluble del sustrato de las plantas de jitomate inoculadas con HSF (*P. brevicompactum*, *A. niger* y el consorcio (*P. brevicompactum* + *A. niger*) bajo la influencia de diferentes fuentes de nitrógeno (SN= sin nitrógeno, ASP= asparagina, Urea, Sulf. A.= sulfato de amonio) durante 1 mes de incubación (0, 7, 14, 21 y 28 días). El gráfico muestra los promedios \pm error estándar ($n=3$).

Actividad enzimática de las fosfatasas

Para las fosfatasas ácidas, se detectó una interacción significativa entre los factores hongos solubilizadores de fósforo y fuente de nitrógeno en el día 28 de incubación ($F=8.42$, $p=0.00000$) (Figura 2). La actividad más alta de las fosfatasas ácidas se detectó en el tratamiento consorcio (*P. brevicompactum* + *A. niger*) con sulfato de amonio ($0.806 \mu\text{g}$ de nitrofenol liberado en g/h) ($p<0.05$), y le siguieron en orden decreciente los tratamientos de *P. brevicompactum* con sulfato de amonio ($0.411 \mu\text{g}$ de nitrofenol liberado en g/h) ($p<0.05$), sulfato de amonio sin hongos, y el tratamiento de *A. niger* con sulfato de amonio (0.281 y $0.219 \mu\text{g}$ de nitrofenol liberado en g/h respectivamente) ($p<0.05$) (Figura 2).

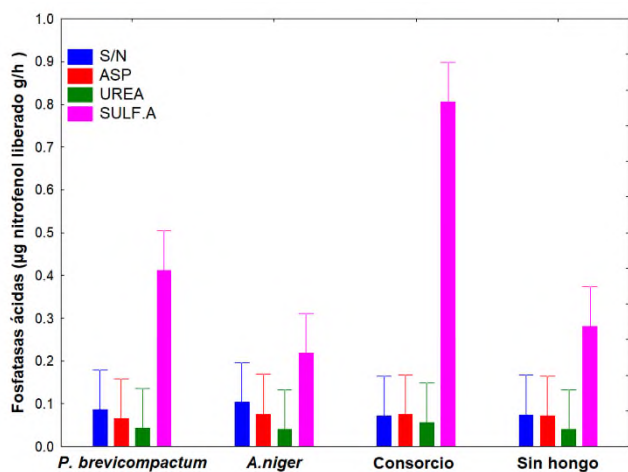


Figura 2. Actividad de fosfatasa ácida del sustrato de las plantas de jitomate inoculadas con las cepas de HSF (*P. brevicompactum*, *A. niger* y el consorcio (*P. brevicompactum* + *A. niger*) y con diferentes fuentes de nitrógeno (SN= sin nitrógeno, ASP= asparagina, Urea, Sulf. A.= sulfato de amonio), en el día 28 de incubación. Las barras son el promedio±error estándar (n=3).

Para las fosfatasa alcalinas, también se detectó una interacción significativa entre ambos factores de experimentación para el día 28 de incubación ($F=16.48$, $p= 0.00000$) (Figura 3). La actividad de estas fosfatasa en los tratamientos de *P. brevicompactum*, *A. niger* y el consorcio (*P. brevicompactum* + *A. niger*) con sulfato de amonio respectivamente (0.024, 0.22 y 0.19 µg de nitrofenol liberado en g/h respectivamente) fue significativamente más alta que en los tratamientos de *P. brevicompactum*, *A. niger* y consorcio (*P. brevicompactum* + *A. niger*) con urea, asparagina y sin adición de N respectivamente ($p<0.05$). En los tratamientos control, i.e., sin hongos y sin adición de N (0.17 µg de nitrofenol liberado en g/h) y sin hongos más urea (0.11 µg

de nitrofenol liberado en g/h) la actividad de las fosfatasa alcalinas fue significativamente más alta que en el tratamiento con sulfato de amonio y asparagina ($p<0.05$) (Figura 3).

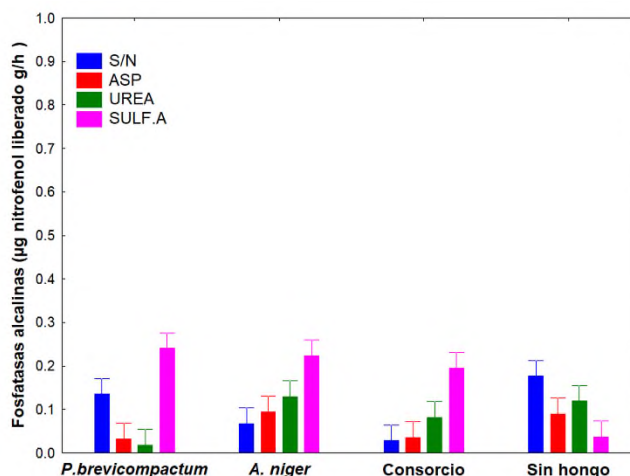


Figura 3. Actividad de fosfatasa alcalina del sustrato de las plantas de jitomate inoculadas con las cepas de HSF (*P. brevicompactum*, *A. niger* y el consorcio (*P. brevicompactum* + *A. niger*) y con diferentes fuentes de nitrógeno (SN= sin nitrógeno, ASP= asparagina, Urea, Sulf. A.= sulfato de amonio), en el día 28 de incubación. Las barras son el promedio±error estándar (n=3).

pH del sustrato

Para el pH del sustrato, medido al final del experimento, se detectó una interacción significativa entre ambos factores de experimentación y el tiempo ($F=3.47$, $p= 0.00000$) (Figura 4). En los tratamientos de *P. brevicompactum*, *A. niger*, consorcio (*P. brevicompactum* + *A. niger*) y sin hongos con las fuentes urea, asparagina y sin adición de N respectivamente, se detectó un aumento significativo del pH respecto del valor inicial (pH inicial = 7 y pH final = 7.5-9.2) ($p<0.05$).

Por su parte, en los tratamientos de *P. brevicompactum*, *A. niger*, consorcio (*P. brevicompactum* + *A. niger*) y sin hongos con sulfato de amonio respectivamente, no se detectó un cambio significativo del pH al final del experimento en comparación al valor inicial (6.8-7 y 7.0 respectivamente) ($p>0.05$) (Figura 4, Tabla 1).

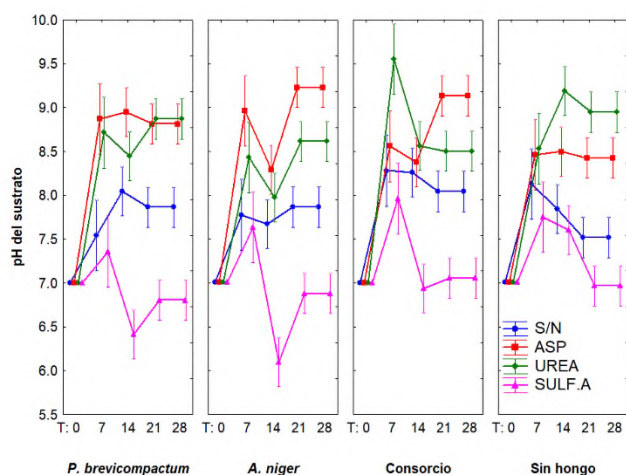


Figura 4. pH del sustrato de las plantas inoculadas con las cepas de HSF (*P. brevicompactum*, *A. niger* y el consorcio (*P. brevicompactum* + *A. niger*) y con diferentes fuentes de nitrógeno (SN= sin nitrógeno, ASP= asparagina, Urea, Sulf. A.= sulfato de amonio) durante 1 mes de incubación (0, 7, 14, 21 y 28 días). Las líneas son el promedio \pm error estándar (n=3).

Relación del fósforo soluble con la actividad enzimática y el pH del sustrato.

El análisis de componentes principales logró resumir la variabilidad contenida en las variables de las fosfatasas, el pH y el fósforo soluble en dos nuevos componentes (I y II), que explicaron conjuntamente el 82% de la variación total (Tabla 2). Los pesos de las variables en los vectores característicos

mostraron que el componente principal I representa variabilidad en orden decreciente en el pH, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida y fósforo soluble con una tendencia a un vector isométrico (Tabla 3), sin embargo, hay una relación inversa de las últimas tres variables con el pH. Un incremento del pH está asociado con una disminución del fósforo soluble y de las fosfatasas (Figura 5). El análisis de varianza efectuado sobre el componente principal I mostró que hubo un efecto significativo de la interacción ($F=2.76$, $p=0.01631$) de ambos factores de experimentación, sobre el fósforo soluble al final del experimento.

Tabla 1. pH promedio del sustrato de las plantas inoculadas con las cepas de hongos solubilizadores de fósforo (HSF) *P. brevicompactum*, *A. niger* y el consorcio (*P. brevicompactum* + *A. niger*) con diferentes fuentes de nitrógeno (sulfato de amonio, asparagina, urea y sin nitrógeno) durante 1 mes de incubación (0, 7, 14, 21 y 28 días).

Cepas de HSF	Fuente nitrógeno	0	7	14	21	28
<i>Penicillium brevicompactum</i>	Sulfato amonio	7.00	7.36	6.20	6.80	6.80
	Asparagina	7.00	8.87	8.95	8.81	8.81
	Urea	7.00	8.71	8.44	8.87	8.87
	Sin nitrógeno	7.00	7.54	8.04	7.86	7.86
<i>Aspergillus niger</i>	Sulfato amonio	7.00	7.64	7.08	6.88	6.88
	Asparagina	7.00	8.96	8.29	9.23	9.23
	Urea	7.00	8.43	7.97	8.61	8.61
	Sin nitrógeno	7.00	7.78	7.68	7.87	7.87
Consorcio	Sulfato amonio	7.00	7.96	6.75	7.06	7.06
	Asparagina	7.00	8.56	8.38	9.14	9.14
	Urea	7.00	9.55	8.56	8.50	8.50
	Sin nitrógeno	7.00	8.28	8.26	8.04	8.04
Sin Hongo	Sulfato amonio	7.00	7.75	7.60	6.84	6.84
	Asparagina	7.00	8.46	8.50	8.43	8.43
	Urea	7.00	8.53	9.19	8.95	8.95
	Sin nitrógeno	7.00	8.13	7.84	7.52	7.52

En cambio, el componente principal II, representó variabilidad asociada al fósforo soluble y la fosfatasa alcalina, mostrándose una relación inversa entre estas variables: una mayor concentración de fosfatasas alcalinas



estuvo asociada con una disminución del fósforo soluble. El análisis de varianza sobre el componente principal II, también mostró un efecto de interacción entre los factores de experimentación ($F=7.58$, $p= 0.000007$), sobre los valores finales del pH, y ambas fosfatasa.

Tabla 2. Análisis de componentes principales de las variables medidas en el experimento (Fósforo soluble, fosfatasa ácida y alcalina y pH).

Componente Principal	Valor característico	Varianza total (%)	Valor característico acumulado	Varianza acumulada (%)
1	2.588841	64.72103	2.588841	64.721
2	0.708076	17.7019	3.296917	82.4229
3	0.511396	12.78489	3.808313	95.2078
4	0.191687	4.79218	4.000000	100.0000

Tabla 3. Vectores característicos para los componentes principales I y II con su respectivo valor de correlación y varianza explicada.

Variable	Vector del componente I	Correlación	Varianza explicada (%)	Vector del componente II	Correlación	Varianza explicada (%)
F. soluble	-0.420815	-0.677085	17.7085	0.847339	0.713013	71.7984
F. ácida	-0.488506	-0.786	23.8638	-0.088661	-0.074606	0.7861
F. alcalina	-0.503581	-0.810256	25.3594	-0.515161	-0.433494	26.5391
pH	0.57505	0.925249	33.0683	0.09362	0.078778	0.8765

El pH del sustrato disminuyó en los tratamientos 5 (An-SN), 8 (An-Sulf. A) y 12 (Con-Sulf. A) provocando un aumento en la cantidad de fósforo soluble; mientras que en los tratamientos 1(Pb-SN), 6 (An-Asp), 13 (SH-SN), 14 (SH-Asp) y 15 (SH-Urea) el pH del sustrato aumentó provocando una disminución en el fósforo soluble. La correlación positiva entre el fósforo soluble y ambas fosfatasa indicó que las fosfatasa y el fósforo soluble aumentaron en los tratamientos 4 (Pb-Sulf. A), 5 (An-SN), 8 (An-Sulf. A), 12 (Con-Sulf. A) y

16 (SH-Sulf. A), mientras que la disminución de estas tres variables ocurrió en los tratamientos 1 (Pb-SN) 2 (Pb-Asp), 3 (Pb-Urea), 6 (An-Asp), 7 (An-Urea), 9 (Con-Asp), 10 (Con-Asp), 11 (Con-Urea), 13 (SH-SN), 14 (SH-Asp) y 15 (SH-Urea).

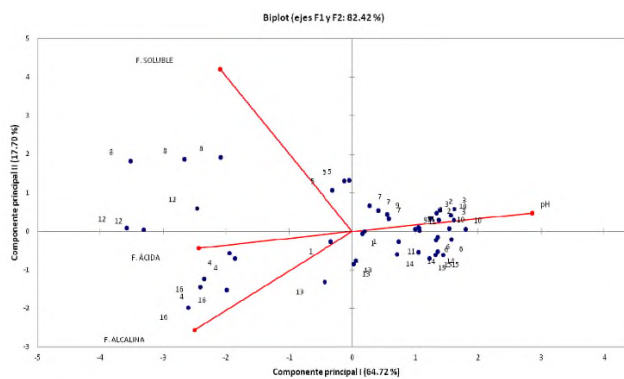


Figura 5. Componente principal I y II donde se observa una relación inversa entre el fósforo soluble y las fosfatasa con el pH (Componente I) y entre el fósforo soluble y la fosfatasa alcalina (Componente II).

Presencia de hongos solubilizadores en los tratamientos.

La presencia de hongos solubilizadores de fósforo inoculados en los tratamientos, fue corroborada al final del experimento. En términos generales, *P. brevicompactum* presentó colonias algodonosas blanquecinas al inicio, para posteriormente tornarse verdosas, sulcadas y con exudados amarillos claros. Por su parte, *A. niger* presentó colonias algodonosas con micelio blanquecino, el cual se tornó amarillento en el centro de colonia al inicio, y, posteriormente, se tornaron negras al momento



de la esporulación. En el consorcio se detectó la presencia de ambas cepas de hongos (*P. brevicompactum* y *A. niger*), sin embargo, fue notoria la dominancia de la cepa *A. niger* (Figura 6).

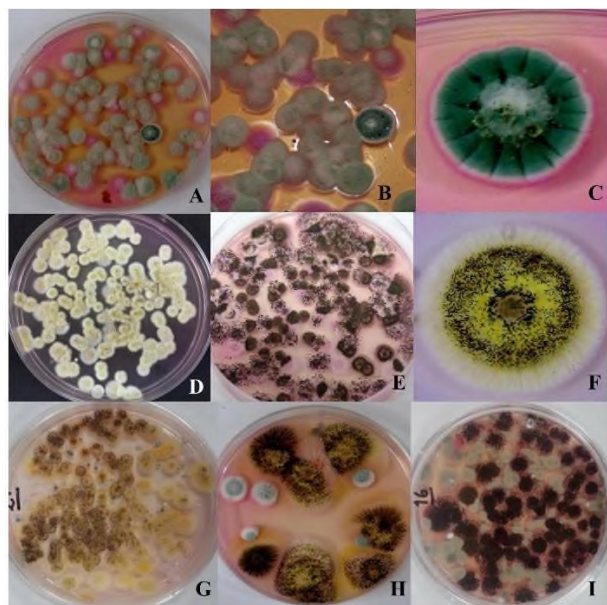


Figura 6. Colonias de las cepas de HSF aisladas del sustrato de las plantas de jitomate. A-C: *P. brevicompactum*; D-F: *A. niger*; G-I: Consorcio (*P. brevicompactum* + *A. niger*).

DISCUSIÓN

Como se ha documentado, la adición de fuentes nitrogenadas interviene en la solubilización de fósforo, debido a que los hongos utilizan diversas rutas metabólicas para producir diferentes ácidos orgánicos que intervienen en este proceso. Esta respuesta ya había sido observada previamente en condiciones *in vitro* [31, 19, 13, 10], sin embargo, bajo condiciones de invernadero o microcosmos la información

hasta la fecha ha sido escasa. En este estudio, evaluado en plantas de jitomate en condiciones de invernadero, la mayor producción de fósforo soluble en el sustrato de las plantas se detectó con la adición de sulfato de amonio; esta respuesta fue evidente con cada una de las cepas evaluadas (*A. niger* y *P. brevicompactum*) incluyendo el consorcio (*A. niger* + *P. brevicompactum*).

Estudios realizados *in vitro* con cepas de *A. niger* mostraron una inducción de la solubilización de fósforo en presencia de sulfato de amonio [32, 33, 19, 14, 13, 10]. Otros estudios evidenciaron que la presencia de sales de amonio (nitrógeno inorgánico) favorece una mayor solubilización de fosfato en comparación con el nitrógeno orgánico (urea, peptona y caseína) [32, 34]. Lo anterior ha sido atribuido a la asimilación de amonio en las células fúngicas para la síntesis de aminoácidos, en el cual se convierte el amonio (NH_4^+) en amoniaco (NH_3) y se liberan protones (H^+) acidificando el medio, lo que favorece la solubilización del fosfato [11, 35, 12].

Es interesante señalar que, si bien en presencia de sulfato de amonio se detectó una solubilización de fósforo más alta en presencia de *A. niger* y en presencia del consorcio (*P. brevicompactum* + *A. niger*), en el caso del tratamiento sin nitrógeno, la solubilización

también fue significativamente más alta que en los tratamientos con adición de urea y asparagina. Una respuesta similar fue observada *in vitro* con las mismas especies [46] y con *P. rugulosum* [18] y *P. purpurogenum* [15]. Este comportamiento ha sido atribuido a la limitante de nitrógeno en el medio, la cual puede causar una alta conversión de carbohidratos en ácido cítrico, y esto a su vez, producir un aumento de la solubilización [16, 17]. En este sentido, Cunningham y Kuiak [36] y Gallmetzer y Burgstaller [37] observaron una mayor producción de ácido cítrico bajo concentraciones mínimas de nitrógeno usando cepas de *P. bilaii* y *P. simplicissium*. En este contexto, sería interesante evaluar, en estudios posteriores, el efecto de distintas concentraciones de las fuentes de nitrógeno en interacción con hongos, sobre la solubilización de fósforo durante diferentes periodos de incubación.

A mayor escala, existen estudios que demuestran que la inoculación de hongos solubilizadores puede aumentar la disponibilidad de fósforo en cultivos de trigo [38], garbanzo [39], frijol [40] y soya [41]. En el presente estudio, la concentración de fósforo soluble al finalizar el ensayo fue considerable alta (rango de 70-154 mg/kg) considerando una concentración inicial de fósforo soluble de 0 mg/kg en el sustrato de las plantas. Las

cantidades de fósforo soluble fueron más altas que las obtenidas en trabajos previos sin la adición de una fuente de nitrógeno. Por ejemplo, Velázquez *et al.*, [42] reportaron 3.5 mg/L en plantas de jitomate, Babu y Reddy [43] 4.7 mg/L en bambú, Londoño [44] 5 mg/L en huaje, y Zhang *et al.*, [45] 1.6 mg/L en higuera; los últimos tres bajo condiciones de campo. Valores similares fueron detectados por Mittal *et al.*, [39], en garbanzos (248 mg/kg) con cepas de *Aspergillus* sp., y por Saber *et al.*, [40] en frijol mungo con cepas de *Penicillium* sp. (46.2 mg/kg) y de *Aspergillus niger* (67 mg/kg) ambos en condiciones de campo y sin la adición de fuentes de nitrógeno. Los valores de solubilización reportados en este trabajo fueron más altos a los reportados por Hernández-Merel [46] para estas mismas cepas de hongos con la adición de las mismas fuentes de fósforo y nitrógeno, pero bajo condiciones *in vitro* (14.3-86 mg/L).

Respecto a las enzimas fosfatasas, el sulfato de amonio indujo también una mayor actividad enzimática. La presencia de ambas fosfatasas indica que el proceso de mineralización se está llevando a cabo: como parte del ciclo de vida de los hongos, ocurre la senescencia del micelio a partir del cual se genera fósforo orgánico que puede mineralizarse, dando como resultado la liberación de enzimas fosfatasas ácidas [47]. En el presente estudio, la interacción del consorcio

P. brevicompactum + *A. niger* con sulfato de amonio resultó en valores más altos de las fosfatasa s ácidas. Resultados similares a este fueron obtenidos por Stefanoni-Rubio *et al.*, [48] con la cepa de *Talaromyces flavus*. Estos autores relacionaron esta actividad con la mineralización y sugirieron que este proceso se relaciona principalmente con la fuente de fosfato utilizada, la fuente de carbono y, en menor medida, por la naturaleza y disponibilidad de los diferentes nutrientes, entre ellos el nitrógeno que utilizan los hongos. En el caso de las fosfatasa s alcalinas, no se detectó variación en el fosforo soluble, entre las combinaciones de *P. brevicompactum*, *A. niger* y su asociación, con la fuente sulfato de amonio. Este evento podría estar relacionado a que las fosfatasa s alcalinas son liberadas por las raíces de las plantas [49] como una respuesta de defensa a la inoculación de los hongos y no por efecto de los HSF.

Finalmente, es importante señalar que se detectó una mayor cantidad de fosfatasa s ácidas que de fosfatasa s alcalinas, sin embargo, ambas se relacionaron directa y significativamente con la concentración de fósforo soluble. Esto sugiere que las fosfatasa s juegan un importante papel en la transformación de fósforo a través de su mineralización y que ambos procesos ocurren de manera simultánea, tal como lo expresan Relwani *et al.*, [13]. Esta relación de

la solubilización de fósforo con la mineralización a través de fosfatasa s ya ha sido mencionada por otros autores [50, 51]. Además, se detectó una relación entre la solubilización de fosfato tricálcico en el sustrato de las plantas de jitomate con la disminución del pH; de este modo, podemos inferir para los tratamientos con HSF utilizados en este estudio y adicionadas con sulfato de amonio, asparagina y con urea, que la solubilización podría ocurrir a partir de la producción de ácidos orgánicos y por la extrusión de H⁺. La disminución del pH se ha reportado como el principal mecanismo por el cual los compuestos fosfatados son solubilizados [52]. Barroso *et al.*, [14] reportaron una concentración alta de ácido cítrico, ácido láctico, ácido maleico, ácido oxálico y ácido tartárico usando cepas de *A. niger* como resultado de la solubilización de fosfato de calcio y fosfato de aluminio. Por otra parte, Relwani *et al.*, [13], encontraron una solubilización más alta de fosfato tricálcico con una producción alta de ácido oxálico, ácido succínico y ácido acético usando una cepa de *Aspergillus tubingensis*. De igual manera, Scervino *et al.*, [15] reportaron una mayor disponibilidad de fosfato tricálcico usando una cepa de *Penicillium purpurogenum* registrando una producción alta de ácido glucónico, ácido cítrico y ácido fumárico.

La disminución del pH del medio es explicada

por la liberación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, que favorecen la quelación y la formación de complejos insolubles con metales, para finalmente liberar el fosfato [53]. Sin embargo, no es el único mecanismo involucrado que podría explicar la disminución del pH, también podría ser el resultado del mecanismo de asimilación de amonio que llevan a cabo los hongos, lo cual causa una acidificación del medio mediante el transporte de protones del citoplasma al exterior de la célula [35]. Un mecanismo adicional que podría estar relacionado es la respiración fúngica, consiste en la expulsión de iones hidronio al exterior durante la fosforilación oxidativa.

CONCLUSIONES

En este estudio, bajo condiciones de invernadero, se detectó que la interacción de la fuente de nitrógeno con HSF determinaron la magnitud de la solubilización de fósforo. La cantidad de fósforo soluble más alta se produjo con sulfato de amonio y las diferentes combinaciones de HSF. Asimismo, una relación negativa entre el pH del sustrato y la concentración de fósforo soluble fue hallada, lo cual sugiere que la solubilización de fósforo está mediada por la producción de ácidos orgánicos que a su vez son el resultado del metabolismo celular. Sin embargo, para dilucidar el mecanismo principal implicado en

la solubilización de fósforo por parte de las especies de HSF utilizadas, sería de gran relevancia cuantificar y analizar la producción de los tipos de ácidos orgánicos liberados por cada cepa, solas y en combinación. La relación positiva detectada entre la producción de fosfatasas y el contenido de fósforo soluble sugiere que los procesos de mineralización y solubilización de fósforo ocurren de manera simultánea. Esta contribución aporta las bases para futuros estudios encaminados al entendimiento de los mecanismos o rutas metabólicas implicados en la solubilización de fósforo a nivel de invernadero.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por CONACyT (C01-0194) “Aplicación de las interacciones fúngicas en la restauración y fertilización del suelo” (2011/169124) desarrollado en el Instituto de Ecología, A.C. Los autores agradecen a la M en C. Yamel del Carmen Perea y a la Ing. Noemi Orozco por su ayuda en el procesamiento de las muestras.

REFERENCIAS

- [1]. Coyne M. Microbiología del suelo: Un enfoque exploratorio. Paraninfo. Madrid: España 2000.
- [2]. Múnera-Vélez GA. El fósforo elemento indispensable para la vida vegetal. Disponible en:
<http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/11059/5248/1/el%20f%20sforo%20elemento.pdf> (recuperado en: diciembre 2018).
- [3]. Torriani-Gorini A, Yagil E, Silver S. Phosphate in microorganisms: Cellular and molecular biology. ASM Press: Washington DC 1994.
- [4]. Gyaneshwar P, Kumar GN, Parekh LJ, Poole PS. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. In Food Security in Nutrient-Stressed Environments: Exploiting Plants' Genetic Capabilities. Springer Netherlands 2002; 95(2): 133-143.
- [5]. Barrer SE. El uso de hongos micorrizicos arbusculares como una alternativa para la agricultura. Biotecnol. Sector Agropecuario Agroind 2009; 7(1): 134- 126.
- [6]. Guija E, Soberón M, Haak-Mares H. Mecanismo de acción de las fosfatasas ácidas de bajo peso molecular. An Fac Med 2007; 68(4): 356-362.
- [7]. Carvalho-dos Santos D, Rodrigues-de Lima CL, Nailto-Pillon C, Filippini-Alba JM, Machado-da Rosa C, Oliveira-Farias MD. Distribución de la materia orgánica en clases de agregados en un Latosol Arcilloso Rojo bajo forestación y pastizal. Agrobiencia 2012; 46(3): 231-241.
- [8]. Rashid M, Khalil S, Ayub N, Alam S, Latif F. Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganism (PSM) under *in vitro* conditions. Pakistan J Biol Sci 2004; 7(2): 187-196.
- [9]. Nahas E. Phosphate solubilizing microorganisms: Effect of carbon, nitrogen, and phosphorus sources. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Springer Netherlands, 102: 111-115. 2007.
- [10]. Rinu K, Malviya, MK, Sati P, Tiwari SC, Pandey A. Response of cold-tolerant *Aspergillus* spp. to solubilization of Fe and Al phosphate in presence of different nutritional sources. Soil Sci 2013; 1-10.
- [11]. Garraway MO, Evans RC. Fungal Nutrition and Physiology. Wiley: New York 1984
- [12]. Habte M, Osorio NW. Effect of nitrogen form on the effectiveness of a phosphate-solubilizing fungus to dissolve rock phosphate. J Biofertil Biopestic 2012; 3(5): 1-4.
- [13]. Relwani L, Krishna P, Reddy MS. Effect

of carbon and nitrogen sources on phosphate solubilization by a wild-type strain and UV-induced mutants of *Aspergillus tubingensis*. *Curr Microbiol* 2008; 57:401–406.

[14]. Barroso CB, Pereira GT, Nahas E. Solubilization of CaHPO_4 and AlPO_4 by *Aspergillus niger* in culture media with different carbon and nitrogen sources. *Braz J Microbiol* 2006; 37(4): 434-438.

[15]. Scervino JM, Papinutti VL, Godoy MS, Rodríguez MA, Della-Monica I, Recchi M, Pettinari MJ, Godeas AM. Medium pH, carbon and nitrogen concentrations modulate the phosphate solubilization efficiency of *Penicillium purpurogenum* through organic acid production. *J Appl Microbiol* 2011; 110: 1215-1223.

[16]. Kristianses B, Charley RC, Seviour B, Harvey L, Habeeb S, Smith JE. Overproduction of metabolites by filamentous fungi. In: Krumphanzl V, Sikyta B, Vanek Z, Eds. *Overproduction of microbial products*. Academic Press: Londres 1982.

[17]. Vrabl P, Fuchs V, Pichler B, Schinagl CW, Burgstaller. Organic acid excretion in *Penicillium ochrochloron* increases with ambient pH. *Front Microbiol* 2012; 3(121): 1-10.

[18]. Reyes I, Bernier L, Simard RR, Antoun H. Effect of nitrogen source on the solubilization

of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *Microb Ecol* 1999; 28: 281-290.

[19]. Seshadri S, Ignacimuthu S, Lakshminarasimhan C. Effect of nitrogen and carbon sources on the inorganic phosphate solubilization by different *Aspergillus niger* strains. *Chem Eng Commun* 2004; 191: 1043-1052.

[20]. Silva-Filho GN, Vidor C. Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. *Pesqui Agropecu Bras* 2001; 36(12): 1495-1508.

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

[22]. Dixon-Hardy JE, Karamushka VI, Gruzina TG, Nikovska GN, Sayer JA, Gadd GM. Influence of the carbon, nitrogen and phosphorus source on the solubilization of insoluble metal compounds by *Aspergillus niger*. *Mycol Res* 1988; 102(09): 1050-1054.

[23]. Arias RM, Romero A, Bañuelos-Trejo J, De la Cruz-Elizondo Y. Inoculación de hongos solubilizadores de fósforo y micorrizas arbusculares en plantas de jitomate. *Rev. Mexicana Cienc. Agric* 2019;10(8):1747-1755.

[24]. Souchie EL, Azcón R, Barea JM, Saggin-

Júnior OJ, Da Silva EMR. Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. *Pesqui Agropecu Bras* 2006; 40(11):1149-1152.

[25]. Hewitt EJ. Sand and water culture methods used in the study of plants nutrition. Technical communication. Commonwealth Agricultural Bureaux: Inglaterra 1969.

[26]. Bray RH, Kurtz LT. Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soil. *Span J Soil Sci* 1945; 59: 39-45.

[27]. Tabatabai MA, Bremner JM. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol Biochem* 1969; 1(4): 301-307.

[28]. Willard HH, Merrit LL, Dean JA. Instrumental methods of analysis. Van Nostrand. 1974.

[29]. Zar JH. Biostatistical Analysis. Prentice Hall, Upper Saddle River 1999.

[30]. StatSoft, Inc. Statistica para Windows v. 8.0. Data analysis software system. Tulsa. [cd-Rom] 2007.

[31]. Silva-Filho GN, Vidor C. Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. *Pesqui Agropecu Bras* 2001; 36(12): 1495-1508.

[32]. Cerezine PC, Nahas E, Banzatto DA.

Soluble phosphate accumulation by *Aspergillus niger* from fluorapatite. *Appl Microbiol Biotechnol* 1988; 29: 501-505.

[33]. Narsian V, Patel HH. *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. *Soil Biol Biochem* 2000; 32: 559-565.

[34]. Harinathan B, Sankaralingam S, Prabhu D, Shankar T. Screening and characterization of phosphate solubilizing bacterium *Enterobacter cancerogenus* isolated from rhizosphere soil of local weed plants. *International J Adv Sci Res* 2014; 1: 721-735.

[35]. Roos W, Luckner M. Relationships between proton extrusion and fluxes of ammonium ions and organic acids in *Penicillium cyclopium*. *J Gen Microbiol* 1984; 130:1007-1014.

[36]. Cunningham JE, Kuiack C. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1992; 58(5): 1451-1458.

[37]. Gallmetzer M, Burgstaller W. Citrate efflux in glucose-limited and glucose-sufficient chemostat culture of *Penicillium simplicissimum*. *Anton Leeuw Int J G* 2001; 79: 81-87.

[38]. Singh H, Reddy MS. Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. *Eur J Soil Biol* 2011; 47(1): 30-34.

- [39]. 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: 718–727.
- [40]. Saber WIA, Ghanem KM, El-Hersh MS. Rock phosphate solubilization by two isolates of *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp. and their promotion to mungbean plants. *Res J Microbiol* 2009; 4(7): 235-250.
- [41]. El-Azouni IM. Effect of phosphate solubilizing fungi on growth and nutrient uptake of soybean (*Glycine max* L.) plants. *Res J Appl Sci* 2008; 4(6): 592-598.
- [42]. Velázquez M, Elíades L, Irrazabal G, Saparrat C, Cabello M. Mycobization with *Glomus mosseae* and *Aspergillus niger* in *Lycopersicon esculentum* plants. *J Agr Sci Tech-Iran* 2005; 1(2): 315-326
- [43]. Babu AG, Reddy MS. Dual inoculation of arbuscular mycorrhizal and phosphate solubilizing fungi contributes in sustainable maintenance of plant health in fly ash ponds. *Water Air Soil Pollut* 2011; 219(1-4): 3-10.
- [44]. Londoño A. Efecto de la inoculación con un hongo micorrizal y un hongo solubilizador de fósforo en la absorción de fosfato y crecimiento de *Leucaena leucocephala* en un oxisol. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de Colombia, Febrero 2010.
- [45]. Zhang HS, Qin FF, Qin P, Pan J. Evidence that arbuscular mycorrhizal and phosphate-solubilizing fungi alleviate NaCl stress in the halophyte *Kosteletzkya virginica*: nutrient uptake and ion distribution within root tissues. *Mycorrhiza* 2014; 24(5):383-395.
- [46]. Hernández-Merel ND. Efecto de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno sobre la solubilización de fosfato tricálcico por tres cepas de hongos filamentosos de suelo. Tesis de Licenciatura, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México, Febrero 2015.
- [47]. Gómez-Guiñán. Actividad de las fosfatasa ácidas y alcalinas (extracelulares e intracelulares) en hongos de la rizosfera de *Arachis hypogaea* (Papilionaceae). *Rev Biol Trop* 2004; 52(1): 287-295.
- [48]. Stefanoni-Rubio PS, Godoy MS, Della Mónica IF, Pettinari MJ, Godeas AM, Scervino JM. Carbon and Nitrogen Sources Influence Tricalcium Phosphate Solubilization and Extracellular Phosphatase Activity by *Talaromyces flavus*. *Curr Microbiol* 2016; 72(1): 41-47.
- [49]. Schneider K, Turrión MB, Gallardo JF. Modified method for measuring acid phosphatase activities in forest soils with high organic matter content. *Commun. Commun Soil Sci Plan* 2000; 31: 3077-3088.

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

[51]. Kishchenko EM, Komarnitskii IK, Kuchuk NV. Production of transgenic sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) plants resistant to phosphinothricin. *Cell Biol Int* 2005; 29(1): 15-19.

[52]. Lara C, Sanes SC, Oviedo LE. Impact of

native phosphate solubilizing bacteria on the growth and development of radish (*Raphanus sativus* L.) plants. *Biotechnol Apl* 2013; 30(4): 271-275.

[53]. Whitelaw MA, Harden TJ, Bender GL. Plant growth promotion of wheat inoculated with *Penicillium radicum* sp. nov. *Aust J Soil Res* 1997; 35(2): 291-300.