



Acta Botanica
Mexicana

Aislamiento y selección de hongos de suelo solubilizadores de fósforo nativos del estado de Coahuila, México

Isolation and selection of solubilizing phosphate soil fungi native to Coahuila state, Mexico

Abraham de Jesús Romero Fernández¹ , Rosa María Arias Mota^{2,3,5} , Rosalinda Mendoza-Villarreal⁴ 

Resumen:

Antecedentes y Objetivos: La deficiencia de fósforo en los cultivos agrícolas generalmente es atendida mediante la aplicación de fertilizantes. Sin embargo, estas prácticas resultan costosas y causan deterioro al medio ambiente. El uso de bio-productos como los hongos solubilizadores de fósforo constituyen una alternativa promisorio. El objetivo de este trabajo fue aislar y seleccionar hongos del suelo fosfato solubilizadores nativos de Coahuila, México, con potencial para ser utilizados como biofertilizantes.

Métodos: El aislamiento de los hongos se llevó a cabo mediante la técnica de filtración de partículas de suelo. La selección de las cepas se realizó en el medio de cultivo de Sundara con fosfato tricálcico; la capacidad fosfato solubilizadora se detectó visualmente mediante la presencia de halos hialinos en el medio de cultivo. La evaluación cualitativa se determinó mediante el índice de eficiencia de solubilización. En la evaluación cuantitativa, los cultivos se incubaron en medio líquido por 25 días y cada cinco se midió el P soluble, pH y biomasa fúngica.

Resultados clave: Se obtuvo un total de 271 aislamientos de hongos; de éstos 52.76% proyectaron resultados positivos a la prueba cualitativa de solubilización de fósforo. En cuanto a la eficiencia de solubilización, ésta fluctuó entre 2.06-6.85 unidades. Las cepas *Sp. Mz54*, *Aspergillus* sp. 4C19, *Penicillium* sp. Mu73, *Penicillium* sp. Mu77 y *Penicillium* sp. A56 presentaron los mayores índices de eficiencia de solubilización ($t < 0.005$). En la medición cuantitativa, la cepa *Penicillium* sp. Mu73 solubilizó la mayor cantidad de fósforo (83.26 mg l⁻¹) ($t < 0.005$). De acuerdo con los análisis de regresión, el fósforo aumentó a medida que el pH decreció ($r^2 = 0.81$).

Conclusiones: La cepa *Penicillium* sp. Mu73 tiene un alto potencial para ser utilizada como biofertilizante ya que promueve un alto contenido de fósforo soluble en condiciones *in vitro*.

Palabras clave: biofertilizantes, fosfato tricálcico, hongos filamentosos.

Abstract:

Background and Aims: Phosphorus deficiency in crops is generally remediated through the application of fertilizers. However, this practice is costly and deteriorates the environment. The use of biofertilizers such as phosphate-solubilizing fungi is a promising alternative. The objective of the present study was to isolate and select native phosphate-solubilizing soil fungi from Coahuila state, Mexico, with potential to be used as biofertilizers.

Methods: Fungal strains were isolated using the soil-particle washing technique. The selection of phosphate-solubilizing strains was performed in a Sundara medium with tricalcium phosphate, and phosphate-solubilizing capacity was visually detected based on the presence of hyaline halos. The qualitative evaluation was carried out by calculating the solubilization index. In the quantitative evaluation, the cultures were incubated for 25 days in liquid medium, and soluble P, pH, and fungal biomass were measured every five days.

Key results: A total of 271 strains of fungi were isolated. Of these isolates, 52.76% tested positive for phosphate solubilization in the qualitative evaluation. With regard to solubilization efficiency, the values ranged from 2.06-6.85. The strains *Sp. Mz54*, *Aspergillus* sp. 4C19, *Penicillium* sp. Mu73, *Penicillium* sp. Mu77, and *Penicillium* sp. A56 presented the highest solubilization efficiency indices ($t < 0.005$). In the quantitative evaluation, the strain *Penicillium* sp. Mu73 solubilized the highest quantity of phosphorus (83.26 mg l⁻¹) ($t < 0.005$). According to the regression analyses, the phosphorus concentration increased as the pH decreased ($r^2 = 0.81$).

Conclusions: The strain *Penicillium* sp. Mu73 has high potential for use as a biofertilizer because it solubilizes a high amount of phosphorus under *in vitro* conditions.

Key words: biofertilizers, filamentous fungi, tricalcium phosphate.

1 Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Maestría en Ciencias en Horticultura, Calzada Antonio Narro No. 1923, Col. Buenavista, 25315 Saltillo, Coahuila, México.

2 Instituto de Ecología, A.C., km. 2.5 antigua carretera a Coatepec 325, Congregación El Haya, 91070 Xalapa, Veracruz.

3 Investigador independiente, 91070 Xalapa, Veracruz, México.

4 Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Horticultura, Calzada Antonio Narro No. 1923, Col. Buenavista, 25315 Saltillo, Coahuila, México.

5 Autor para la correspondencia: ariasrm27@gmail.com

Recibido: 14 de mayo de 2018.

Revisado: 26 de junio de 2018.

Aceptado por Marie-Stéphanie Samain: 22 de agosto de 2018.

Publicado Primero en línea: 4 de diciembre de 2018.

Publicado: Acta Botanica Mexicana 126 (2019).

Citar como:

Romero Fernández, A. de J., R. M. Arias Mota y R. Mendoza-Villarreal. 2018(2019). Aislamiento y selección de hongos de suelo solubilizadores de fósforo nativos del estado de Coahuila, México. Acta Botanica Mexicana 126: e1390. DOI: [10.21829/abm126.2019.1390](https://doi.org/10.21829/abm126.2019.1390)



Este es un artículo de acceso abierto bajo la licencia Creative Commons 4.0 Atribución-Non Comercial (CC BY-NC 4.0 International).

e-ISSN: 2448-7589

Introducción

En México, 60% de su territorio está constituido por ecosistemas áridos y semiáridos (Montaño et al., 2016). En los climas áridos, los suelos se caracterizan por presentar altos contenidos de carbonatos, pH alcalino, textura arcillosa, poca profundidad y baja disponibilidad de fósforo (Narro, 1985). La mayor parte del fósforo inorgánico se absorbe en la superficie del suelo o se precipita como fosfatos de hierro y aluminio en suelos ácidos y como fosfatos de calcio y magnesio en suelos alcalinos y calcáreos (Bolan, 1991). La disponibilidad de fósforo en los suelos en algunas regiones del estado de Coahuila es baja debido a que el carbonato de calcio produce inmovilización temporal o permanente del ion fosfato (Zamudio González et al., 2011).

La deficiencia de fósforo generalmente es atendida mediante la aplicación de fertilizantes químicos que, al ser aplicados en dosis superiores a las requeridas por los cultivos, conducen a riesgos de contaminación ambiental por su lixiviación hacia aguas subterráneas. Además, conlleva a la degradación de la calidad de los suelos por exceso de salinidad y a un incremento infructuoso en los costos de producción (Cárdenas-Navarro et al., 2004).

Una alternativa ecológicamente aceptable para reducir los insumos externos y mejorar la cantidad y calidad de los recursos internos del suelo es el uso de microorganismos debidamente seleccionados. En el suelo, existen interacciones sinérgicas entre los microorganismos que favorecen el crecimiento y desarrollo de las plantas (Fernández y Rodríguez, 2015). Entre estos microorganismos destacan los hongos solubilizadores de fósforo (HSF), los cuales juegan un rol fundamental en el ciclaje de fósforo en los suelos, ya que tienen la habilidad de transformar el fosfato orgánico e inorgánico al romper los enlaces que forma el fósforo con los iones metálicos de hierro, calcio y aluminio y así transformarlo en soluble (Restrepo-Franco et al., 2015). Los hongos solubilizadores de fósforo son parte de un gran grupo conocido como microorganismos promotores del crecimiento vegetal; gracias a la actividad de estos hongos, las plantas pueden aprovechar grandes reservas de fósforo insoluble que se encuentran fijadas a los minerales del suelo (Beltrán-Pineda, 2014).

Este trabajo se planteó con el objetivo de aislar y seleccionar cepas nativas de hongos del suelo del estado de

Coahuila, con capacidad fosfato solubilizadora con potencial para ser utilizados como biofertilizantes.

Materiales y Métodos

Localización de los sitios de muestreo

Se eligieron cuatro sitios para la toma de muestras de suelo en el estado de Coahuila: sitio 1 (25°13'16"N, 100°23'44"O y 2870 m s.n.m) se encuentra en el municipio Arteaga; sitio 2 (27°59'N, 101°42'41"O y 510 m s.n.m.) municipio Múzquiz; sitio 3 (26°55'22"N, 102°7'22"O y 720 m s.n.m.), municipio Cuatro Ciénegas y sitio 4 (26°25'34"N, 101°19'5"O y 940 m s.n.m.), municipio Castaños (INEGI, 2014) (Fig. 1). Los sitios de estudio representan los principales sistemas de cultivo de hortalizas en la región (SAGARPA, 2015).

Colecta de muestras de suelo

En cada sitio se seleccionaron tres puntos de muestreo separados por una distancia de 100 m. En cada punto se tomó una muestra de suelo de 250 g a una profundidad de 0-20 cm. Posteriormente, en el laboratorio las tres muestras de cada punto y de cada sitio se mezclaron para obtener una muestra mixta. El suelo se secó a temperatura ambiente y se almacenó a 5 °C hasta su procesamiento para el aislamiento de los hongos.

De las muestras mixtas de cada uno de los sitios, se tomaron 100 g de suelo y se enviaron al laboratorio de análisis de suelos, plantas y agua del Instituto de Ecología, A.C. (INECOL) para realizar los análisis fisicoquímicos que a continuación se detallan. El pH se midió utilizando un potenciómetro (McKean, 1993), el fósforo disponible se determinó siguiendo la técnica propuesta por Bray 1 (Bray y Kurtz, 1945), la conductividad eléctrica fue evaluada con un conductímetro, la retención de fósforo se calculó siguiendo la técnica propuesta por Blakemore (1981), la materia orgánica y carbono orgánico se cuantificaron con el método Walkley-Black modificado (Walkley y Black, 1934), el carbono total se cuantificó por el método de combustión seca (Nelson y Sommers, 1996), el nitrógeno total se analizó con un micro-Kjeldahl (Bremner, 1965), la relación carbono/nitrógeno por la técnica analizador carbono/nitrógeno, la textura se determinó mediante pipeta con destrucción de materia orgánica y dispersión con hexametáfosfato de sodio. Con los porcentajes de limo, arena y arcilla se determi-



Figura 1: Localización de los cuatro sitios de colecta de suelos en los municipios Arteaga, Múzquiz, Cuatro Ciénegas y Castaños, Coahuila, México.

nó la textura correspondiente en el triángulo de las texturas (Borja Martínez et al., 2015). Los análisis de suelo se apegaron a la norma NOM-021-RECNAT-2000 (SEMARNAT, 2002).

Aislamiento y selección de los hongos solubilizadores de fósforo

El aislamiento de los hongos del suelo se realizó con la técnica de filtración de partículas (Bills et al., 2004), que consiste en lavar 1 g de suelo en una serie de microtamices (1 mm, 500 µm, 250 µm y 150 µm) con agua purificada. Se tomaron las partículas de suelo atrapadas en el tamiz de 150 µm y se colocaron en tubos con agua destilada. Finalmente se tomaron 300 µl de la muestra de suelo y se colocaron en el medio de cultivo rosa de bengala con dicloran y cloranfenicol (Oxoid Limited, Basingstoke, Inglaterra). Las placas se incubaron por 15 días a 25 °C. Una vez crecidas, las colonias se transfirieron a tubos con el medio de cultivo papa dextrosa agar (BIOXON, Estado de México, México).

Una vez aisladas, se realizaron preparaciones en ácido láctico (10%) y se observaron bajo el microscopio compuesto (Nikon Eclipse 80i con interfase Nomarski, Tokio, Japón). Las cepas se identificaron a nivel de género con base en las características morfológicas de sus colonias y por la observación de sus características microscópicas (conidios, conidióforos, arreglo de conidios), siguiendo las obras de Gilman (1963), Barron (1968) y Domsch et al. (1980).

Para la selección de las cepas con capacidad fosfato solubilizadora, se empleó un medio de cultivo sólido revelador con 0.5 g l⁻¹ de Ca₃(PO₄)₂ (Sundara Rao y Sinha, 1963). En las placas de Petri de 90 × 15 mm, se realizaron las inoculaciones de cada una de las cepas aisladas y se dejaron en incubación a 25 °C durante tres días. La capacidad de solubilización de fósforo se detectó mediante la presencia de un halo hialino alrededor de la colonia (Sundara Rao y Sinha, 1963).

Evaluación cualitativa de la eficiencia de solubilización de los hongos

Una vez seleccionadas las cepas solubilizadoras de fósforo, se procedió a medir el índice de eficiencia relativa de solubilización (ERS). Se inocularon las cepas (tres repeticiones) en placas de Petri con medio de cultivo descrito en el párrafo anterior y diariamente durante 10 días se midieron el diámetro del halo formado y el de la colonia.

El índice de eficiencia relativa de solubilización se calculó mediante la fórmula: ERS=diámetro de la colonia + diámetro del halo de solubilización/diámetro de la colonia (Vitorino et al., 2012). Los diámetros se midieron desde el centro de la colonia. Para categorizar el nivel de solubilización de las cepas, se realizó una selección de acuerdo con su índice de ERS. Así se establecieron tres escalas: escala baja I=ERS de 2-2.9 cm; escala media II=ERS de 3-4.9 cm y escala alta III=ERS de 5-6.9 cm (escala empleada por Silva Filho y Vidor, 2000).

Evaluación cuantitativa de la eficiencia de solubilización de los hongos

Las cepas seleccionadas por su mayor índice de eficiencia relativa de solubilización se inocularon en matraces de 250 ml, con 100 ml de medio de cultivo líquido de Sundara Rao y Sinha (1963), adicionado con 0.5 g l⁻¹ de Ca₃(PO₄)₂ como fuente de fósforo insoluble. Los matraces fueron inoculados con cinco discos de 5 mm de diámetro de micelio de los hongos solubilizadores seleccionados con 15 días de crecimiento. Se utilizaron tres réplicas para cada cepa incluyendo un testigo (sin hongo).

Los cultivos se incubaron en la oscuridad a 25 °C durante 25 días sin movimiento. A partir del día cinco y cada cinco días se realizaron los muestreos. En cada muestreo, se registraron el pH y la biomasa fúngica. Para obtener los extractos fúngicos, se filtraron las muestras en papel filtro Whatman® del número 42 y se procedió a medir el contenido de fósforo. El fósforo soluble se valoró por el método del ácido ascórbico (Clesceri et al., 1992), las absorbancias se midieron en un espectrofotómetro (Thermo Scientific GENESYS 10S UV Vis, Madison, EUA) a 880 nm. Los datos se compararon con una curva estándar de fósforo y se expresaron en mg l⁻¹.

Análisis de los datos

En la evaluación cualitativa para detectar diferencias entre los valores de los índices de solubilización se realizaron Anovas de una vía. Para la evaluación cuantitativa, se efectuaron Anovas de una vía con medidas repetidas para conocer las diferencias del fósforo solubilizado entre las cepas inoculadas a través del tiempo de incubación. Cuando las diferencias fueron significativas se realizó la prueba de comparación de medias de Tukey (p≤0.05).

Para conocer la relación entre el contenido de fósforo soluble con el pH y la biomasa fúngica, se llevó a cabo un análisis de regresión simple. Asimismo, se realizó un análisis de regresión lineal simple entre el número de cepas aisladas, el número de cepas positivas a la solubilización, con los valores de los análisis fisicoquímicos de los sitios de estudio. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa Statistica v. 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

Resultados

Aislamiento y selección de cepas de hongos solubilizadores de fósforo

A partir de las muestras de suelos de los cuatro sitios se obtuvo un total de 271 aislamientos de hongos del suelo.

La identificación a nivel de género de algunos de los hongos se realizó considerando las características de las colonias en PDA y observaciones de preparaciones semiper-

manentes en ácido láctico bajo el microscopio compuesto. La mayoría de las cepas se identificaron como *Aspergillus* P. Micheli, *Penicillium* Link, *Trichoderma* Pers. y *Fusarium* Link.

La mayor cantidad de cepas provinieron de los sitios 2 (Múzquiz (84)) y 4 (Castaños (83)), seguidos del 1 (Arteaga (63)) y 3 (Cuatro Ciénegas (41)). La evaluación de la actividad solubilizadora reveló una respuesta positiva con la formación de halos hialinos alrededor de las colonias (Fig. 2) en 143 de los 271 aislamientos evaluados. Este dato representa 52.76% de los aislamientos totales. El sitio Castaños presentó 42 hongos positivos, seguido de Arteaga (39), Múzquiz (38) y, por último, Cuatro Ciénegas (24).

En el análisis de regresión lineal se detectó una relación positiva significativa entre el número de cepas positivas a la solubilización de fósforo con la relación carbono/nitrógeno ($R^2=0.9972$, $p=0.001$) (Fig. 3A). A pesar de no ser significativa se observó una tendencia entre el número de

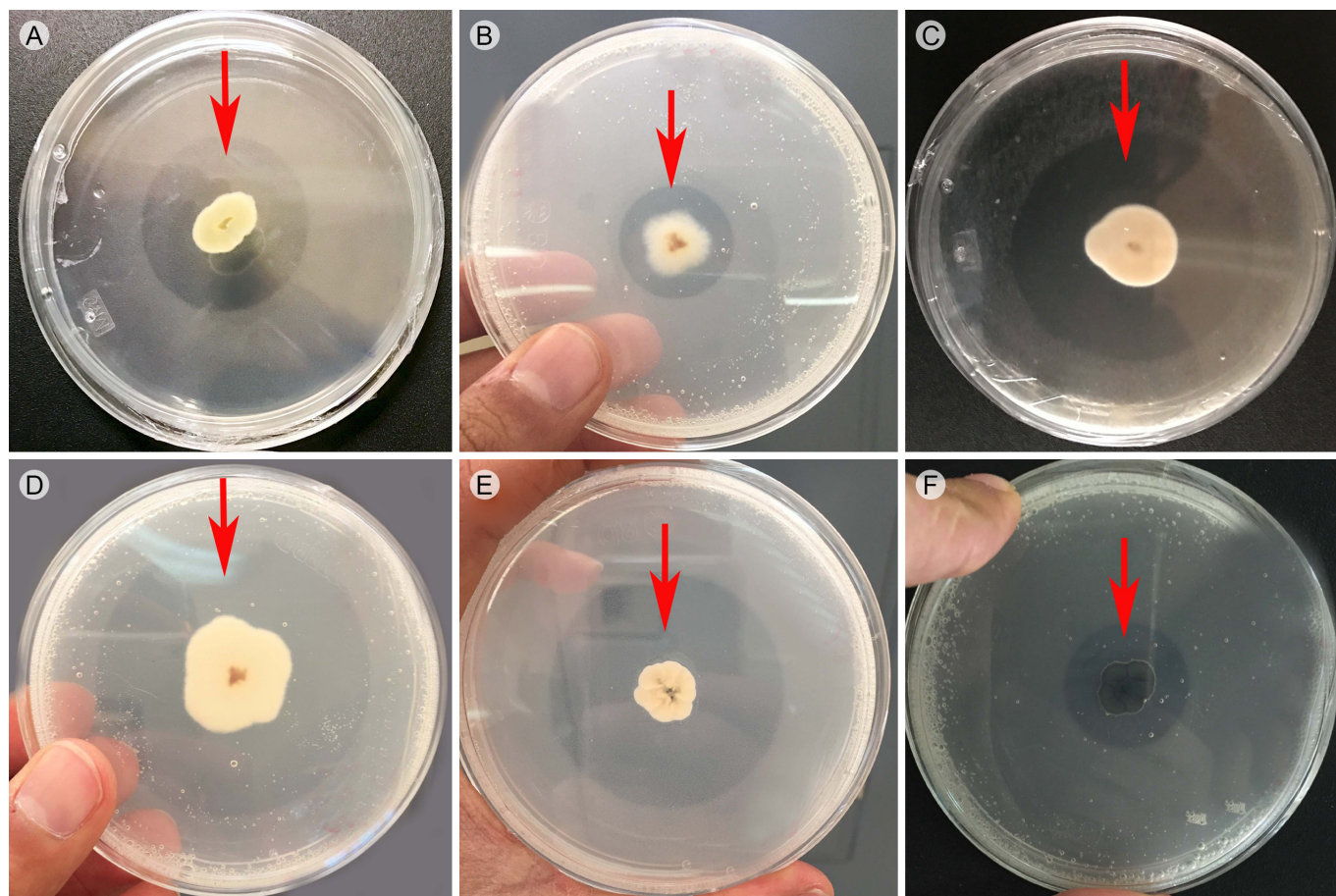


Figura 2: Halos de solubilización (zona hialina) de algunas de las cepas solubilizadoras de fósforo en medio sólido de Sundara con fosfato tricálcico a diferentes días de incubación*. A. *Sp. Mz76* (6*); B. *Aspergillus* sp. 4C39 (4*); C. *Penicillium* sp. A51 (4*); D. *Sp. 4C16* (6*); E. *Penicillium* sp. 4C37 (3*); F. *Cladosporium* sp. 4C20 (4*).

cepas aisladas y la relación carbono/nitrógeno ($R^2=0.8191$, $p=0.07$) (Fig. 3B). Es decir, en los sitios con mayor relación carbono/nitrógeno (Arteaga, Múzquiz y Castaños) se recuperó una mayor cantidad de cepas de hongos del suelo y se detectó el mayor número de cepas fosfato solubilizadoras.

En Arteaga, Múzquiz y Castaños, la relación carbono/nitrógeno fue de 22-24%, mientras que en Cuatro Ciénegas fue de 13 (Cuadro 1).

Evaluación cualitativa de eficiencia de solubilización de los hongos

En los resultados de la evaluación cualitativa, los índices de solubilización mostraron una variación significativa entre las cepas evaluadas ($F=16.25$, $p=0.00005$). Los valores de los ín-

lices de solubilización estuvieron en un rango de 2.06-6.85. De acuerdo con las escalas establecidas; nueve cepas se ubicaron en la escala III (alta), 112 cepas en la escala II (media) y 22 cepas en la escala I (baja) de solubilización (Cuadro 2).

Las cepas colocadas en la mayor escala de solubilización (III) fueron los aislados *Aspergillus* sp. Mu42, 4C19, *Penicillium* sp. A56, Mu54, Mu73, Mu77 y Sp. Mu28, Mu82, Mz54. Entre las cepas de mayor escala de solubilización se revelaron diferencias significativas entre los valores del índice de eficiencia de solubilización ($p<0.0005$). Los valores de eficiencia de solubilización de las cepas Sp. Mz54, *Aspergillus* sp. 4C19, *Penicillium* sp. Mu73, Mu77 y A56 fueron significativamente mayores que en Sp. Mu82, Mu28, *Penicillium* sp. Mu54 y *Aspergillus* sp. Mu42 ($t<0.005$).

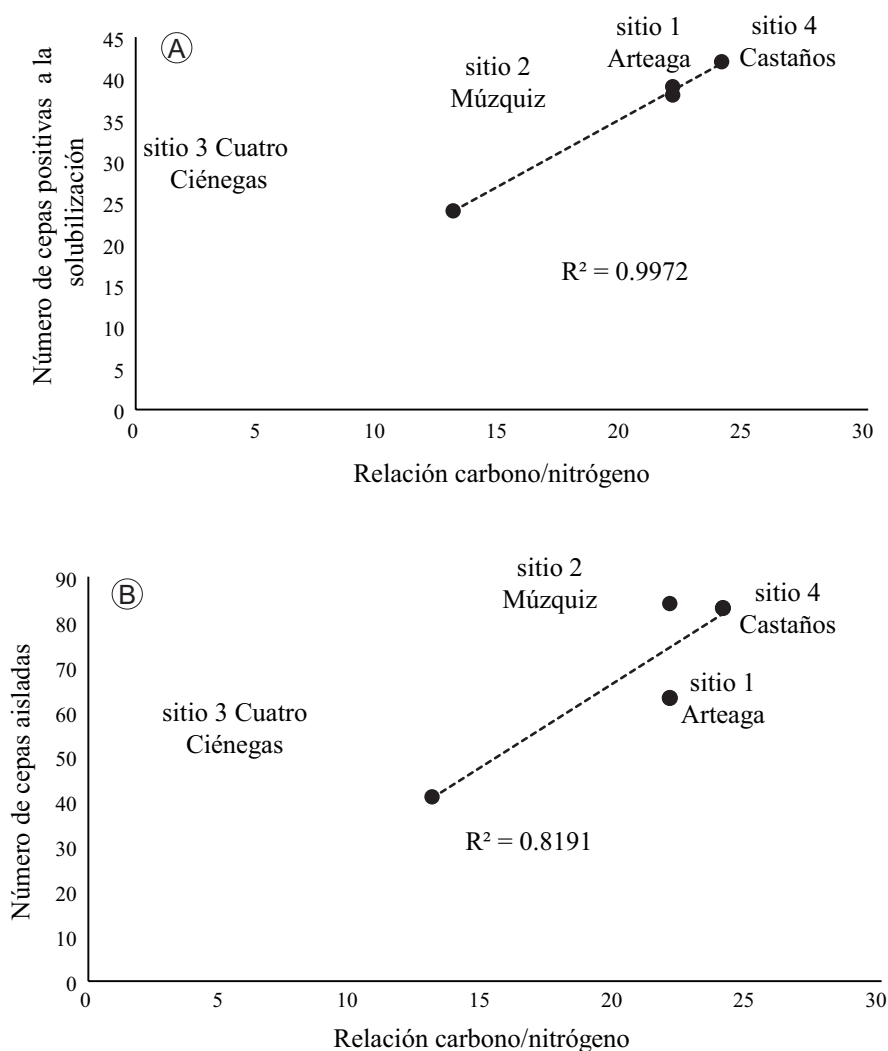


Figura 3: Relación entre el número de colonias aisladas (A) y el número de cepas positivas a la solubilización de fósforo (B), con la relación carbono/nitrógeno de los suelos de los sitios de colecta en los municipios Arteaga, Múzquiz, Cuatro Ciénegas y Castaños, Coahuila, México.

Cuadro 1: Datos fisicoquímicos de las muestras de suelo analizadas en cuatro sitios de muestreo en los municipios Arteaga, Múzquiz, Cuatro Ciénegas y Castaños, Coahuila, México. Fósforo disponible (P mg kg⁻¹), conductividad eléctrica (CE mS cm⁻¹), retención de fósforo (RP %), materia orgánica (MO), carbono orgánico (CO), carbono total (C), nitrógeno total (N), relación carbono/nitrógeno (C/N), arcilla (%), limo (%), arena (%) y la textura.

		P	CE	RP									Arcilla	Limo	Arena	
Sitio	pH	mg kg ⁻¹	mS cm ⁻¹	%	MO	CO	C	N	C/N	%	%	%	Textura			
Sitio 1 Arteaga	7.4	18	0.27	14	1.73	9.12	13.2	0.59	22	53.28	29.64	17.08	Arcilla			
Sitio 2 Múzquiz	8.1	4	0.21	7	3.01	1.71	5.1	0.23	22	39.28	31.64	29.08	Migajón Arcilloso			
Sitio 3 Cuatro Ciénegas	8.6	4	2.51	3	1	0.58	1.2	0.09	13	21.28	3.64	75.08	Migajón Arcillo-arenoso			
Sitio 4 Castaños	8.2	5	0.11	4	1.73	1	5.3	0.23	24	27.28	15.64	57.08	Migajón Arcillo-arenoso			

Cuadro 2: Índice de eficiencia de solubilización (ERS) (día de máxima solubilización) y escala de solubilización de las especies de hongos fosfato solubilizadoras, aisladas de los cuatro sitios de colecta en los municipios Arteaga, Múzquiz, Cuatro Ciénegas y Castaños, Coahuila, México. Se incluye la clave de la cepa.

Especies	Clave	ERS	Escala	Especies	Clave	ERS	Escala	Especies	Clave	ERS	Escala
Sp.	Mu47	2.06 (3)	I	Sp.	4C16	3.41 (6)	II	<i>Fusarium</i> sp.	A41	4.23 (7)	II
<i>Trichoderma</i> sp.	Mz34	2.32 (3)	I	Sp.	Mu61	3.42 (8)	II	Sp.	Mu34	4.24 (5)	II
Sp.	Mz11	2.34 (7)	I	<i>Fusarium</i> sp.	A40	3.43 (3)	II	<i>Aspergillus</i> sp.	4C17	4.26 (4)	II
Sp.	Mu43	2.36 (4)	I	<i>Acremonium</i> sp.	Mu19	3.47 (5)	II	Sp.	Mu44	4.26 (7)	II
Sp.	Mz62	2.44 (5)	I	Sp.	Mz20	3.47 (3)	II	Sp.	Mu50	4.27 (9)	II
<i>Aspergillus</i> sp.	Mu20	2.46 (5)	I	Sp.	4C9	3.50 (11)	II	<i>Penicillium</i> sp.	A57	4.27 (6)	II
Sp.	Mz71	2.49 (7)	I	<i>Penicillium</i> sp.	Mu24	3.50 (7)	II	<i>Penicillium</i> sp.	A50	4.31 (6)	II
<i>Fusarium</i> sp.	Mz82	2.50 (6)	I	<i>Penicillium</i> sp.	A9	3.52 (8)	II	<i>Penicillium</i> sp.	Mu14	4.32 (6)	II
Sp.	4C25	2.50 (6)	I	Sp.	Mz40	3.52 (10)	II	Sp.	Mu5	4.34 (6)	II
Sp.	Mz29	2.50 (8)	I	Sp.	4C27	3.54 (8)	II	<i>Aspergillus</i> sp.	Mz58	4.35 (8)	II
<i>Penicillium</i> sp.	Mu10	2.59 (4)	I	Sp.	A15	3.57 (7)	II	Sp.	Mz19	4.36 (5)	II
Sp.	A27	2.73 (3)	I	<i>Trichoderma</i> sp.	Mu21	3.58 (6)	II	Sp.	A54	4.38 (9)	II
Sp.	Mz70	2.79 (3)	I	<i>Cladosporium</i> sp.	4C20	3.60 (8)	II	Sp.	Mu83	4.38 (9)	II
Sp.	Mu72	2.80 (3)	I	<i>Penicillium</i> sp.	4C37	3.61 (3)	II	Sp.	Mz76	4.38 (9)	II
<i>Aspergillus</i> sp.	Mz45	2.81 (4)	I	<i>Penicillium</i> sp.	Mz83	3.63 (4)	II	Sp.	A26	4.38 (4)	II
Sp.	A13	2.82 (3)	I	<i>Acremonium</i> sp.	Mz17	3.66 (4)	II	Sp.	A36	4.40 (8)	II
Sp.	A4	2.82 (3)	I	<i>Penicillium</i> sp.	A43	3.66 (3)	II	<i>Penicillium</i> sp.	A53	4.42 (6)	II
Sp.	Mz53	2.89 (7)	I	Sp.	Mu67	3.67 (10)	II	<i>Penicillium</i> sp.	Mu53	4.44 (3)	II
<i>Aspergillus</i> sp.	Mz63	2.91 (5)	I	<i>Penicillium</i> sp.	Mu32	3.69 (9)	II	Sp.	4C35	4.45 (12)	II
Sp.	Mz25	2.93 (3)	I	Sp.	A60	3.70 (5)	II	<i>Penicillium</i> sp.	Mu36	4.47 (3)	II
<i>Penicillium</i> sp.	A24	2.95 (4)	I	<i>Penicillium</i> sp.	A38	3.75 (3)	II	Sp.	4C34	4.48 (3)	II
Sp.	A46	2.97 (9)	I	<i>Fusarium</i> sp.	Mz36	3.75 (5)	II	<i>Myrothecium</i> sp.	Mu33	4.48 (8)	II
Sp.	A16	3.00 (5)	II	Sp.	Mz65	3.76 (9)	II	<i>Penicillium</i> sp.	A10	4.49 (9)	II
Sp.	4C23	3.13 (4)	II	<i>Penicillium</i> sp.	A21	3.77 (5)	II	<i>Penicillium</i> sp.	A58	4.49 (5)	II
Sp.	Mz35	3.13 (3)	II	Sp.	Mu18	3.77 (8)	II	<i>Penicillium</i> sp.	A14	4.53 (5)	II

Cuadro 2: Continuación.

Especies	Clave	ERS	Escala	Especies	Clave	ERS	Escala	Especies	Clave	ERS	Escala
Sp.	A17	3.16 (9)	II	<i>Aspergillus</i> sp.	Mz24	3.78 (5)	II	<i>Penicillium</i> sp.	A51	4.54 (4)	II
<i>Fusarium</i> sp.	Mu6	3.16 (3)	II	Sp.	A23	3.80 (8)	II	<i>Penicillium</i> sp.	A45	4.59 (3)	II
Sp.	Mu30	3.16 (6)	II	Sp.	Mu63	3.81 (7)	II	Sp.	A39	4.66 (6)	II
Sp.	Mu9	3.19 (9)	II	<i>Aspergillus</i> sp.	4C1	3.82 (9)	II	Sp.	Mz44	4.67 (6)	II
Sp.	A25	3.19 (3)	II	<i>Penicillium</i> sp.	A35	3.83 (5)	II	<i>Cladosporium</i> sp.	4C22	4.85 (12)	II
<i>Penicillium</i> sp.	A42	3.2 (3)	II	Sp.	Mz52	3.83 (5)	II	<i>Penicillium</i> sp.	A11	4.90 (10)	II
Sp.	4C3	3.2 (10)	II	<i>Fusarium</i> sp.	Mz68	3.84 (9)	II	Sp.	Mu59	4.94 (3)	II
Sp.	Mu15	3.21 (9)	II	Sp.	Mz74	3.89 (4)	II	<i>Aspergillus</i> sp.	4C15	4.96 (7)	II
Sp.	Mu49	3.21 (3)	II	Sp.	Mz75	3.89 (8)	II	Sp.	4C2	4.97 (11)	II
Sp.	4C10	3.21 (6)	II	<i>Aspergillus</i> sp.	4C12	3.90 (10)	II	<i>Aspergillus</i> sp.	4C39	4.97 (12)	II
Sp.	M80	3.22 (3)	II	<i>Penicillium</i> sp.	A2	3.91 (3)	II	Sp.	Mu35	4.98 (7)	II
Sp.	4C32	3.24 (10)	II	<i>Aspergillus</i> sp.	Mz66	3.91 (9)	II	Sp.	Mz60	4.98 (9)	II
Sp.	Mu27	3.25 (8)	II	<i>Fusarium</i> sp.	Mz3	3.91 (6)	II	<i>Fusarium</i> sp.	Mu52	4.99 (6)	II
<i>Penicillium</i> sp.	Mu1	3.26 (3)	II	Sp.	A37	3.92 (5)	II	Sp.	Mu82	5.35 (6)	III
Sp.	4C29	3.28 (11)	II	Sp.	Mz46	3.92 (9)	II	Sp.	Mu28	6.03 (7)	III
<i>Aspergillus</i> sp.	Mu70	3.28 (6)	II	Sp.	4C38	3.97 (11)	II	<i>Penicillium</i> sp.	Mu54	6.26 (11)	III
<i>Fusarium</i> sp.	Mu7	3.28 (8)	II	Sp.	A49	3.97 (5)	II	<i>Aspergillus</i> sp.	Mu42	6.60 (8)	III
<i>Aspergillus</i> sp.	Mz73	3.29 (5)	II	<i>Penicillium</i> sp.	A59	4.06 (4)	II	Sp.	Mz54	6.71 (7)	III
<i>Fusarium</i> sp.	Mz15	3.31 (8)	II	Sp.	Mz2	4.09 (9)	II	<i>Aspergillus</i> sp.	4C19	6.73 (6)	III
<i>Aspergillus</i> sp.	Mu17	3.38 (9)	II	Sp.	Mu2	4.13 (7)	II	<i>Penicillium</i> sp.	Mu73	6.78 (5)	III
<i>Penicillium</i> sp.	A47	3.38 (5)	II	Sp.	4C21	4.13 (6)	II	<i>Penicillium</i> sp.	Mu77	6.82 (7)	III
<i>Myrothecium</i> sp.	A34	3.39 (9)	II	Sp.	Mz4	4.14 (9)	II	<i>Penicillium</i> sp.	A56	6.85 (10)	III
Sp.	4C36	3.40 (10)	II	Sp.	Mz47	4.22 (8)	II				

Evaluación cuantitativa de eficiencia de solubilización de los hongos

Con respecto a la eficiencia de solubilización en el medio líquido; los valores de fósforo soluble mostraron una variación significativa entre las nueve cepas evaluadas ($F=60.82$, $p=0.00005$) y a través del tiempo de incubación ($F=72.39$, $p=0.00005$).

El día de máxima solubilización en la mayoría de las cepas fue el día 15 de incubación. En este punto se detectó también la máxima actividad solubilizadora, con un rango de 65.84-83.26 mg l⁻¹. La cepa *Penicillium* sp. Mu73 exhibió la mayor concentración de fósforo soluble (83.26 mg l⁻¹) ($t<0.00005$). En el tratamiento control, el rango de solubilización fue de 2.8-12.6 mg l⁻¹. La concentración de fósforo

soluble en todas las cepas evaluadas aumentó a medida que el pH del medio decrecía (Figs. 4A-I); sin embargo, en el tratamiento control el pH se mantuvo sin descender (Fig. 4J). A través de un análisis de regresión lineal simple, se corroboró que el contenido de fósforo soluble se relaciona de manera negativa y fuertemente significativa con el pH del medio de cultivo ($p<0.005$) (Fig. 5). La relación entre el fósforo soluble y la biomasa fúngica no fue significativa ($p>0.005$).

Discusión

Aislamiento y selección de cepas de hongos solubilizadores de fósforo

Son pocos los estudios encaminados al conocimiento de la microfiora del suelo en general y del estado de Coahuila,

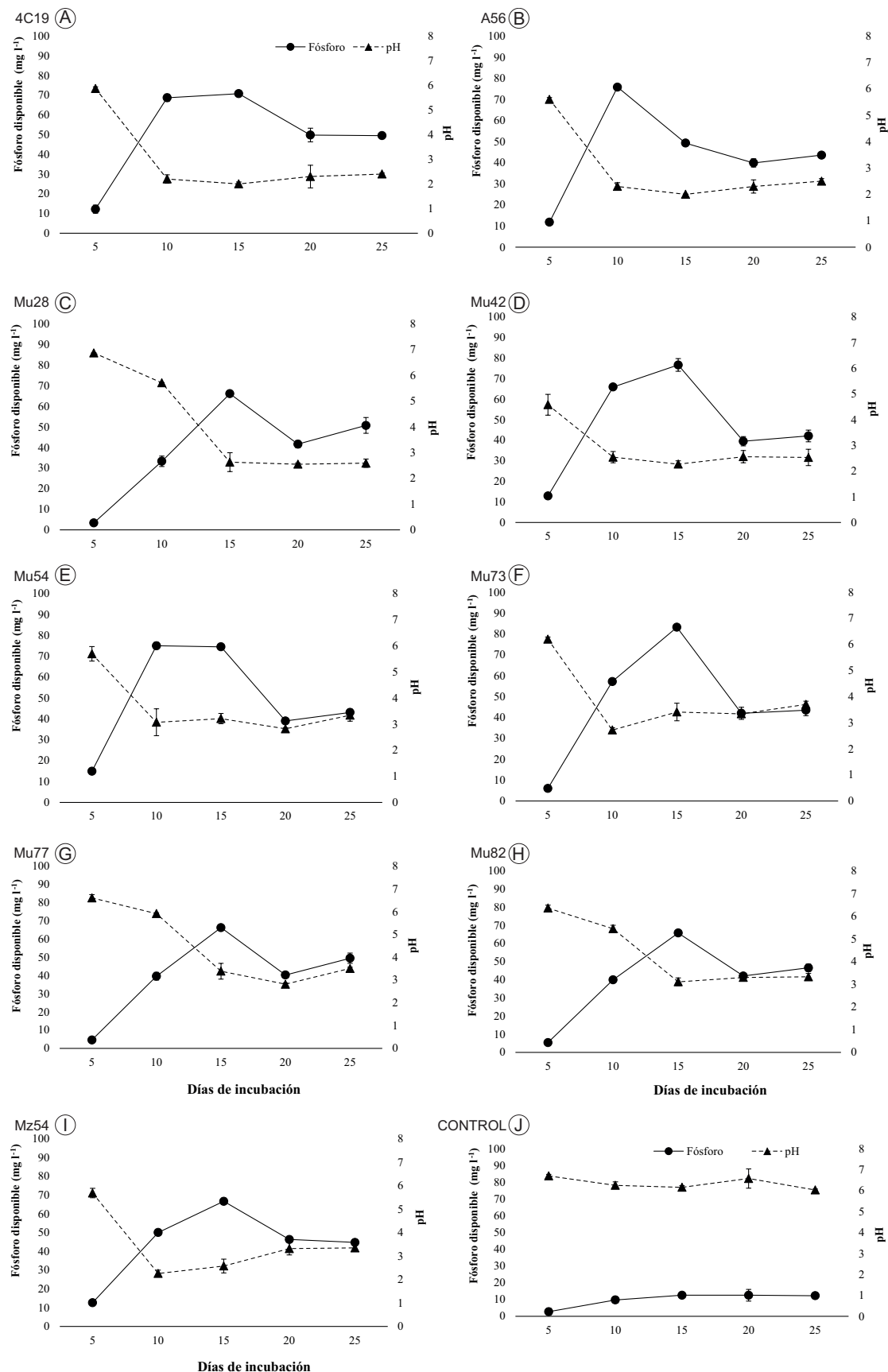


Figura 4: Concentración de fósforo soluble (mg l⁻¹) y pH del medio líquido, con fosfato tricálcico inoculado con las cepas después de 5, 10, 15, 20 y 25 días de incubación. A. *Aspergillus* sp. 4C19; B. *Penicillium* sp. A56; C. Sp. Mu28; D. *Aspergillus* sp. Mu42; E. *Penicillium* sp. Mu54; F. *Penicillium* sp. Mu73; G. *Penicillium* sp. Mu77; H. Sp. Mu82; I. Sp. Mz54; J. Control (sin hongo). Los datos son el promedio de 3 réplicas $\pm$ la desviación estándar.

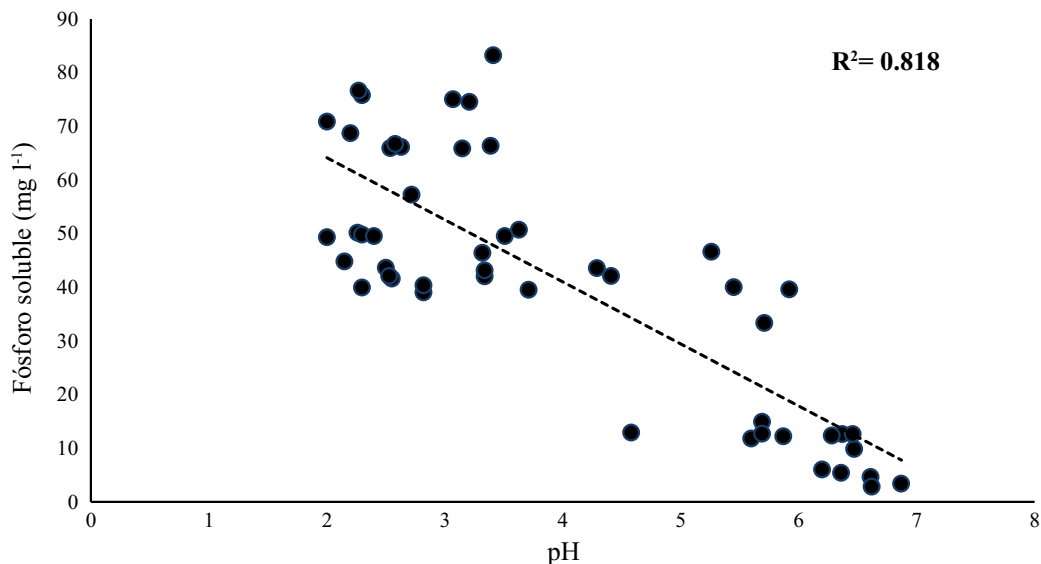


Figura 5: Relación entre el fósforo soluble y el pH producido en medio de cultivo líquido con fosfato tricálcico inoculado, con las cepas fosfato solubilizadoras después de 5, 10, 15, 20 y 25 días de incubación.

en particular. Entre los pocos trabajos publicados figura el de Samaniego et al. (1988), quienes aislaron 115 especies de hongos de suelo de dos huertas de nogales infestados con *Phymatotrichum omnivorum* Duggar, con el objetivo de seleccionar hongos antagonistas en la supervivencia o patogenicidad de este hongo fitopatógeno. Samaniego y Chew-Madinaveitia (2007), en un estudio de biodiversidad para conocer la estructura de géneros de hongos del suelo en tres campos de cultivo agrícola (dos de nogal y uno de alfalfa), aislaron 23 géneros en los cultivos de nogal y 12 en el cultivo de alfalfa.

En el presente estudio, se obtuvo un total de 271 cepas de hongos de los sitios Múzquiz (84), Castaños (83), Arteaga (63) y Cuatro Ciénegas (41). Cabe señalar que estos sitios no habían sido muestreados para hongos del suelo anteriormente, por lo que representa una importante contribución para el estado de Coahuila. A pesar de que este estudio no tiene un enfoque taxonómico, se ubicaron algunas cepas a nivel de género. En los estudios mencionados anteriormente, así como en el presente trabajo, sobresalen *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium*. Estos géneros son representantes de zonas áridas (Flanagan, 1981).

A la fecha no existen estudios que hagan referencia al potencial de los hongos solubilizadores de fosfato, nativos de suelos del estado de Coahuila. En México, específicamente para el estado de Veracruz, existen algunos

estudios sobre hongos solubilizadores de fósforo. Hernández-Leal et al. (2011) evaluaron *in vitro* la solubilización de compuestos fosfatados por *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson en medios de cultivo sólidos y líquidos. Posada et al. (2012), mediante pruebas cualitativas, aislaron cepas de hongos del suelo de cafetales y seleccionaron cepas solubilizadoras de fosfato de calcio (40) y de fosfato de hierro (48). Lima-Rivera et al. (2016) evaluaron la efectividad de dos cepas de hongos solubilizadoras de fosfato de calcio (*Geomyces pannorum* Singler y Carmichy, *Metarhizium carneum* (Duché & R. Heim) Kepler, S.A. Rehner & Humber) en la reducción de la población del nematodo *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Skarbilovich. Recientemente Perea et al. (2018) evaluaron el efecto de la interacción de hongos micorrízicos y solubilizadores de fósforo (*Aspergillus niger* Tiegh. y *Penicillium brevicompactum* Dierckx), en el desarrollo de plantas de café (*Coffea arabica* L. variedad Garnica). Estos microorganismos están fuertemente involucrados en la transformación de fósforo a través de la solubilización, mineralización e inmovilización (Begonia et al., 2004). Gracias a la efectividad de este tipo de microorganismos se ha logrado la disminución de la aplicación de fertilizantes químicos en algunos cultivos importantes como los de papa (Núñez y Acevedo, 2005), maíz (Patil et al., 2012) y chícharo (Ramírez Gil et al., 2013). La reducción en el uso de fertilizantes químicos demanda la creación de estrate-

gias alternativas que mantengan una producción vegetal competitiva y sin deterioro del medio ambiente. En este contexto, el uso de hongos del suelo que solubilizan fosfato insoluble posee gran potencial para ser utilizados como biofertilizantes, ya que constituyen medios ecológicamente plausibles para reducir los insumos externos y mejorar la calidad de los recursos internos.

Los análisis de regresión indican que tanto el número de cepas aisladas como el de respuestas positivas a la solubilización de fósforo se relacionan con el porcentaje de carbono/nitrógeno del suelo de los sitios muestreados. El mayor número de cepas aisladas y de cepas con capacidad fosfato solubilizadora se recuperaron en Castaños (sitio 4), Arteaga (S1) y Múzquiz (S2); en éstos la relación carbono/nitrógeno fue mayor (22-24%). Es bien sabido que una adecuada disponibilidad de carbono favorece la actividad de los microorganismos heterótrofos y regula su capacidad de mineralizar el nitrógeno y el fósforo (Montaño et al., 2016).

Evaluación cualitativa de eficiencia de solubilización de los hongos

El empleo de las pruebas reveladoras, mediante la presencia o la formación de halos hialinos alrededor de la colonia en el medio sólido, es una determinación rápida y ampliamente utilizada por diversos autores (Vera et al., 2002; Moratto et al., 2005; Noppararat et al., 2007; Oliveira et al., 2009; Verma y Ekka, 2015; Elías et al., 2016; Hajjam y Cherkaoui, 2017). Esta prueba resultó de gran utilidad para detectar cualitativamente las cepas con capacidad solubilizadora.

En este estudio 52.76% de los hongos aislados resultaron positivos por su capacidad para solubilizar fósforo; la mayoría de las cepas que expresaron respuesta positiva pertenecen a los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*. Éstos han sido relacionados como solubilizadores de fósforo en numerosas investigaciones (Kumar et al., 2014; Rathore et al., 2014; Yasser et al., 2014; Verma y Ekka, 2015).

Existen investigaciones que señalan que *Aspergillus* y *Penicillium* poseen una alta capacidad de solubilización (Asea et al., 1988; Cunningham y Kuiack, 1992; Vassilev et al., 1996; Nunes-Silva et al., 2002; Pandey et al., 2008; Morales et al., 2011; Rathore et al., 2014; Gizaw et al., 2017). Se ha expresado que la capacidad solubilizadora del fósforo

por parte de los géneros indicados está relacionada con la habilidad de producción de ácidos orgánicos (Swaby y Sperber, 1958; Roche y De Barac, 1959), lo cual produce el descenso del pH (Sperber, 1958). La acidificación del medio, producto del metabolismo fúngico, es el principal mecanismo involucrado en el proceso de solubilización (Beltrán-Pineda, 2014): 1) como resultado de la excreción de protones a través de ATPasas de la membrana plasmática, 2) del intercambio de protones en la absorción de nutrientes, 3) por la producción de ácidos orgánicos que son el producto del metabolismo de péptidos, lípidos y carbohidratos, y finalmente 4) por la producción de dióxido de carbono durante la respiración fúngica (Relwani et al., 2008). 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 (Picone y Zamuner, 2002).

A la fecha, la mayoría de los estudios sobre hongos solubilizadores *in vitro* se han desarrollado con diversas cepas de *Aspergillus niger* (Vassilev et al., 1996; Narsian y Patel., 2000; Singh et al., 2011; Ashok et al., 2012; Zeroual et al., 2012). Numerosos trabajos (Mesa Garriga et al., 2005; Velásquez et al., 2010; Paredes-Mendoza y Espinosa-Victoria, 2010; Leal et al., 2011; Pérez et al., 2012) evidencian que *A. niger* produce una gran cantidad de ácidos orgánicos tales como ácido cítrico, láctico, málico, oxálico o tartárico (Paredes-Mendoza y Espinosa-Victoria, 2010; Pérez et al., 2012). En la actualidad, existen en el mercado dos biofertilizantes elaborados con especies del género *Penicillium*; el producto JumpStart® a base de *Penicillium bilaiae* Chalab. elaborado en Canadá, y Fosfosol® cuyo ingrediente principal es *Penicillium janthinellum* Biourge, fabricado en Colombia. De acuerdo con los análisis estadísticos, las mejores cepas considerando los valores de los índices de eficiencia de solubilización son: el aislamiento no identificado Sp. Mz54, *Aspergillus* sp. 4C19, *Penicillium* sp. Mu73, *Penicillium* sp. Mu77 y *Penicillium* sp. A56.

En este trabajo, la cepa *Penicillium* sp. A56 presentó el índice de solubilización más alto (ERS=6.85). Estos valores ERS pertenecen a diámetros de los halos de 3-8.2 cm. De Freitas et al. (1997) sugieren que las cepas que forman halos alrededor de sus colonias con diámetros superiores a 1.5 cm, se consideran buenos solubilizadores de fósforo. En

la literatura se han registrado valores de índice de solubilización de fosfato de hasta 5.3 ERS para *Trichosporon beigei* (Küchenm. & Rabenh.) Vuill. (Hajjam y Cherkaoui, 2017), de 3 ERS para *Paecilomyces lilacinus* (Hernández-Leal et al., 2011); 2.87 para *Aspergillus* sp. (Elías et al., 2016) y de 2.25 ERS para *Penicillium purpureogenum* Stoll (Verma y Ekka, 2015). En esta publicación, los valores de ERS para las nueve cepas dispuestas en la escala más alta de solubilización (escala III) fueron de 5.35-6.85.

Los estudios de Narsian y Patel (2000), Reddy et al. (2002), Barroso y Nahas (2002) y Mittal et al. (2008) indican que la eficiencia de disolución del fosfato tricálcico depende del tipo de fuente de fósforo utilizada, el tipo de microorganismo, así como de la calidad y cantidad de ácidos orgánicos secretados en el medio de cultivo.

Evaluación cuantitativa de eficiencia de solubilización de los hongos

Comparando los resultados de la cepa con mayor capacidad fosfato solubilizadora, *Penicillium* sp MU73, en el medio líquido, se observa que sus valores de fósforo solubilizado (83.26 mg/L día 15 de incubación) son mayores a los reportados para una cepa de *Paecilomyces lilacinus* (71.28 mg/L día 12) (Hernández-Leal et al., 2011) (día 15); para diferentes cepas de *Penicillium* (9-65 mg/L) (Morales et al., 2011), *Penicillium aurantiogriseum* Dierckx (77.70 mg/L) (día 7); *P. claviforme* Bainier (75.01 mg/L) y *Aspergillus niger* (80.22 mg/L) (Saxena et al., 2013) (día 12); *Mucor* sp. Micheli y *Penicillium* sp. (59.16 y 55.58 mg/L, respectivamente) (Rathore et al., 2014) (día 21); *Penicillium* sp. (20.7 mg/L) (Moreno Quevedo et al., 2015) (día 15); para *Geomyces pannorum* (71.40 mg/L) (Lima-Rivera et al., 2016) (día 15) y para cepas de *Aspergillus* spp. (37-50 mg/L), *Fusarium* sp. (30 mg/L), *Trichoderma viride* Pers., (37 mg/L) y *Penicillium* sp. 1 y *Penicillium* sp. 2 (54-27 mg/L) (Selvi et al., 2017) (día 15). Fueron similares a las obtenidas para *Paecilomyces carneus* (83.2 mg/L) (Lima-Rivera et al., 2016) (día 18). Sin embargo, la concentración de fósforo disuelto fue menor que la reportada para *Aspergillus* sp. (167.7 mg/L) (Rathore et al., 2014) (día 21); *Aspergillus niger* (93.5 mg/L) (Moreno Quevedo et al., 2015) (día 15). Cabe señalar que en todos estos trabajos se utilizó fosfato tricálcico (0.5 g/L) como fuente de fósforo inorgánico y el fósforo se midió por la técnica de

ácido ascórbico (Clesceri et al., 1992). Es importante señalar que, además de la mayoría de las cepas evaluadas en este estudio, así como en las cepas de los estudios anteriormente señalados, en el día 15 de incubación ocurrió la mayor solubilización de fósforo.

La producción de fósforo soluble se relacionó con el descenso del pH en el medio líquido; los resultados sugieren la liberación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular por parte de los hongos, cuyas propiedades quelantes favorecen la formación de complejos insolubles con metales, con la consecuente liberación del fosfato (Fernández et al., 2005); estos resultados experimentales concuerdan con estudios previos (Pandey et al., 2008, Saxena et al., 2013, Selvi et al., 2017). Whitelaw et al. (1997), Pradhan y Sukla (2006) y Varsha et al. (2010) mencionan que los microorganismos fosfato solubilizantes disuelven el fosfato insoluble, mediante la producción de ácidos inorgánicos u orgánicos, lo que resulta en la disminución de los valores de pH. En este estudio, el cultivo de *Penicillium* sp. Mu73 fue en el que se obtuvo la mayor concentración de fosfato soluble (83.26 mg/L) y también se detectó una significativa disminución de pH (2.5 a los 15 días de incubación).

De acuerdo con la evaluación cualitativa y cuantitativa, la cepa *Penicillium* sp. Mu73 tiene un alto potencial para ser utilizada como biofertilizante ya que promueve un alto contenido de fósforo soluble en condiciones *in vitro*. Es importante puntualizar que se requieren experimentos en vivero y condiciones de campo para evaluar el efecto de estos hongos como bioinoculantes sobre el rendimiento de los cultivos.

Contribución de autores

RMA y ARF idearon y diseñaron el estudio, aislaron las cepas de hongos del suelo, realizaron las pruebas cualitativas y cuantitativas de solubilización de fósforo, los análisis estadísticos e interpretaron los resultados y escribieron el manuscrito. RMV participó en la selección de los sitios de estudio y la colecta de las muestras de suelo. Todos los autores contribuyeron a la revisión y aprobación del manuscrito final.

Financiamiento

Este estudio fue apoyado por Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (610453) a través de la beca otorgada al primer

autor en el programa de Maestría en Ciencias en Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Agradecimientos

Al Laboratorio de Micromicetos Saprobios del Instituto de Ecología, A.C., por las facilidades brindadas para la realización de este estudio. A Allison Marie Jermain por la traducción del resumen al inglés.

Literatura citada

- Asea, P. E. A., R. M. N. Kucey y J. W. B. Stewart. 1988. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. *Soil Biology and Biochemistry* 20(4): 459-464. DOI: [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(88\)90058-2](https://doi.org/10.1016/0038-0717(88)90058-2)
- Ashok, V. G., S. S. Sabina y G. D. Preeti. 2012. Isolation and identification of phosphate solubilizing fungi from rhizosphere (soil). *International Journal of Science Innovation and Discoveries* 2: 310-315.
- Barron, G. L. 1968. The genera of Hyphomycetes from soil. The Williams and Wilkins Company. New York, USA. 364 pp.
- Barroso, C. B. y E. Nahas. 2002. Solubilization of hardly soluble iron and aluminum phosphates by the fungus *Aspergillus niger* in the soil. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. *Developments in Plant and Soil Sciences* 102: 193-198. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5765-6_29
- Begonia, M. T., G. B. Begonia, G. Miller, D. Gilliard y C. Young. 2004. Phosphatase activity and populations of microorganisms from cadmium and lead contaminated soils. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 73(6): 1025-1032. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00128-004-0528-4>
- Beltrán-Pineda, M. E. 2014. La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 15(1): 101-113. DOI: https://doi.org/10.21930/rcta.vol15_num1_art:401
- Bills, G., M. Christensen, M. Powell y G. Thorn. 2004. Saprobie soil fungi. In: Mueller, G. M., G. F. Bills y M. S. Foster (eds.). *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier. Amsterdam, The Netherlands. Pp. 271-302.
- Blakemore, L. C. 1981. Soil Bureau laboratory methods: A methods for chemical analysis of soils. New Zealand Soil Bureau Scientific Report 10: 8-1. DOI: <https://dx.doi.org/10.7931/DL1-SBSR-10A>
- Bolan, N. S. 1991. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant and Soil* 134(2): 189-207. DOI: <https://doi.org/10.1007/bf00012037>
- Borja Martínez, K., J. Mercado Lázaro y E. M. Combatt Caballero. 2015. Dispersantes químicos y cuantificación de fracciones texturales por los métodos Bouyoucos y pipeta. *Acta Agronómica* 64(4): 308-314. DOI: <https://doi.org/10.15446/acag.v64n4.45722>
- Bray, R. H. y L. T. Kurtz. 1945. Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soil. *Soil Science* 59(1): 39-46. DOI: <https://doi.org/10.1097/00010694-194501000-00006>
- Bremner, J. M. 1965. Inorganic forms of nitrogen. *Agronomy* 9: 1179-1237.
- Cárdenas-Navarro, R., J. M. Sánchez-Yáñez, R. Farías-Rodríguez y J. J. Peña-Cabriales. 2004. Los aportes de nitrógeno en la agricultura. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 10(2): 173-178. DOI: <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2002.07.039>
- Clesceri, L. S., A. E. Greenberg y R. R. Trussell. 1992. Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Ed. Díaz de Santos, S.A. Madrid, España. Pp. 4-187.
- Cunningham, J. E. y C. Kuiack. 1992. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. *Applied and Environmental Microbiology* 58(5): 1451-1458.
- De Freitas, J. R., M. R. Banerjee y J. J. Germida. 1997. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biology and Fertility of Soils* 24(4): 358-364. DOI: <https://doi.org/10.1007/s003740050258>
- Domsch, K. H., W. Gams y T. H. Anderson. 1980. Compendium of soil fungi. Volume 1. Academic Press. London, UK. 860 pp.
- Elías, F., D. Woyessa y D. Muleta. 2016. Phosphate solubilization potential of rhizosphere fungi isolated from plants in Jimma Zone, Southwest Ethiopia. *International Journal of Microbiology* 2016: 1-11. DOI: <https://dx.doi.org/10.1155/2016/5472601>
- Fernández, M. y H. Rodríguez. 2015. El papel de la solubilización del fósforo en los fertilizantes microbianos. *ICIDCA: Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar* 39(3): 27-34.
- Fernández, L. A., P. Zalba, M. A. Gómez y M. A. Sagardoy. 2005. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Ciencia del Suelo* 23(1): 31-37.

- Flanagan, P. W. 1981. Fungal taxa, physiological groups and biomass: a comparison between ecosystems. In: Wicklow, D. T. y G. C. Carroll (eds.). *The fungal community*. Marcell Dekker. New York, USA. Pp. 569-592.
- Gilman, J. C. 1963. *Manual de los hongos del suelo*. CECSA. México, D.F., México. 572 pp.
- Gizaw, B., Z. Tsegay, G. Tefera, E. Aynalem, M. Wassie y E. Abatneh. 2017. Phosphate solubilizing fungi isolated and characterized from Teff rhizosphere soil collected from North Showa zone, Ethiopia. *African Journal of Microbiology Research* 11(17): 687-696. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJMR2017.8525>
- Hajjam, Y. y S. Cherkaoui. 2017. The influence of phosphate solubilizing microorganisms on symbiotic nitrogen fixation: Perspectives for sustainable agriculture. *Journal of Materials* 8(3): 801-808.
- Hernández-Leal, T., G. Carrión y G. Heredia. 2011. Solubilización *in vitro* de fosfatos por una cepa de *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Agrociencia* 45(8): 881-892.
- Index Fungorum. 2018. Index Fungorum base de datos. <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp> (consultado julio de 2018).
- INEGI. 2014. *Anuario estadístico y geográfico de Coahuila de Zaragoza*. Cd. Mx., México. 501 pp.
- Kumar, M. V., P. A. Kumar, K. K. Sanjay y S. B. Pratap. 2014. Molecular characterization of phosphate solubilizing fungi associated with rhizospheric soils of banana. *Science Technology Journal* 2(1): 57-66.
- Leal, D., Y. Pico, J. Castro, J. Guerra y G. Castro. 2011. Producción de ácido cítrico a partir de suero lácteo entero e hidrolizado con *Aspergillus niger*, por vía fermentativa. *Alimentos Hoy* 19(19): 32-38.
- Lima-Rivera, D. L., D. López-Lima, D. Desgarennes, A. S. Velázquez-Rodríguez y G. Carrión. 2016. Phosphate solubilization by fungi with nematicidal potential. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 16(2): 507-524. DOI: <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162016005000042>
- Mckean, S. 1993. *Manual de análisis de suelos y tejido vegetal: una guía teórica y práctica de metodologías*. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT. Cali, Colombia. Pp. 9-10.
- Mesa Garriga, L., E. González Suárez, R. de la Cruz y Y. López. 2005. Avances en la producción de ácido cítrico a partir de miel final por *Aspergillus niger*. *Revista Cubana de Química* 17(1): 171-178.
- Mittal, V., O. Singh, H. Nayyar, J. Kaur y R. Tewari. 2008. Stimulatory effect of phosphate-solubilizing fungal strains (*Aspergillus awamori* and *Penicillium citrinum*) on the yield of chickpea (*Cicer arietinum* L. cv. GPF2). *Soil Biology and Biochemistry* 40(3): 718-727. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.10.008>
- Montaño, N. M., F. Ayala, S. H. Bullock, O. Briones, F. García, O. R. García, S. Y. Maya, Y. Perroni, C. Siebe, Y. Tapia, T. E. Troyo y E. Yépez. 2016. Almacenes y flujos de carbono en ecosistemas áridos y semiáridos de México: Síntesis y perspectivas. *Terra Latinoamericana* 34: 39-59.
- Morales, A., M. Alvear, E. Valenzuela, C. E. Castillo y F. Borie. 2011. Screening, evaluation and selection of phosphate-solubilising fungi as potential biofertiliser. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 11(4): 89-103. DOI: <https://doi.org/10.4067/S0718-95162011000400007>
- Moratto, C., L. J. Martínez, H. Valencia y J. Sánchez. 2005. Efecto del uso del suelo sobre hongos solubilizadores de fosfato y bacterias diazotróficas en el páramo de Guerrero (Cundinamarca). *Agronomía Colombiana* 23(2): 299-309.
- Moreno Quevedo, A. P., N. W. Osorio Vega y O. A. González Muriillo. 2015. *In vitro* dissolution of acidulated rock phosphate by phosphate solubilizing microorganisms. *Acta Biológica Colombiana* 20(2): 65-71. DOI: <https://dx.doi.org/10.15446/abc.v20n2.42713>
- Narsian, V. y H. H. Patel. 2000. *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. *Soil Biology and Biochemistry* 32(4): 559-565. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00184-4](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00184-4)
- Narro, F. E. 1985. Mejoradores de suelos calcáreos y fertilización fosfatada en el cultivo de la papa. *Agraria, Revista Científica UAAAN* 1(1): 57-70.
- Nelson, D. W y L. E. Sommers. 1996. Total carbon, organic carbon and organic matter. In: Sparks, D. L. (ed.). *Methods of Soil Analysis. Part 3: chemical methods*. Soil Science Society of America. Madison, USA. Pp. 961-1010.
- Nopparat, C., M. Jatupornpipat y A. Rittiboon. 2007. Isolation of phosphate solubilizing fungi in soil from Kanchanaburi, Thailand. *Journal of Science and Technology* 7(2): 137-146.
- Nunes-Silva, G., C. Narloch y R. Scharf. 2002. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de *Pi-*

- nus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. Pesquisa Agropecuária Brasileira 37(6): 847-854. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2002000600014>
- Ñúñez, C. E. y J. C. Acevedo. 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.
- Oliveira, C. A., V. M. C. Alves, I. E. Marriel, E. A. Gomes, M. R. Scotti, N. P. Carneiro, C. T. Guimarães, R. E. Schaffert y N. M. H. Sá. 2009. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. Soil Biology and Biochemistry 41(4): 1782-1787. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.01.012>
- Pandey, A., N. Das, B. Kumar, K. Rinu y P. Trivedi. 2008. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. isolated from soil samples of Indian Himalayan region. World Journal of Microbiology and Biotechnology 24(1): 97-102. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9444-1>
- Paredes-Mendoza, M. y D. Espinosa-Victoria. 2010. Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfatos: una revisión crítica. Terra Latinoamericana 28(1): 61-70.
- Patil, P. M., V. B. Kuligod, N. S. Hebsur, C. R. Patil y G. N. Kulkarni. 2012. Effect of phosphate solubilizing fungi and phosphorus levels on growth, yield and nutrient content in maize (*Zea mays*). Karnataka Journal of Agricultural Sciences 25(1): 58-62.
- Perea Rojas, Y. C., R. M. Arias, R. Medel Ortiz, D. Trejo, G. Heredia y Y. Rodríguez Yon. 2018. Effects of native arbuscular mycorrhizal and phosphate-solubilizing fungi on coffee plants. Agroforestry Systems (2018)1-12. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10457-018-0190-1>
- Pérez, C. A., V. J. de la Ossa y V. D. Montes. 2012. Hongos solubilizadores de fosfatos en fincas ganaderas del departamento de Sucre. Revista Colombiana de Ciencia Animal 4(1): 35-45.
- Picone, L. y E. Zamuner. 2002. Fósforo orgánico y fertilidad fosfórica. Informaciones Agronómicas del Cono Sur 16: 11-15.
- Posada, R., M. Sánchez de Prager, E. Sieverding, K. Aguilar y G. Heredia. 2012. Relaciones entre los hongos filamentosos y solubilizadores de fosfatos con algunas variables edáficas y el manejo de cafetales. Revista de Biología Tropical 60(3): 1075-1096. DOI: <https://doi.org/10.15517/rbt.v60i3.1759>
- Pradhan, N. y L. B. Sukla. 2006. Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. African Journal of Biotechnology 5(10): 850-854.
- Ramírez Gil, J. G., L. Osorno Bedoya, N. W. Osorio Vega y J. G. Morales Osorio. 2013. Alternativas microbiológicas para mejorar el crecimiento del caupí. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín 66(2): 7035-7044.
- Rathore, P., N. Phanse y B. Patel. 2014. Screening for microorganisms possessing phosphate solubilizing potential. Indian Journal of Research 3(1): 172-174. DOI: <https://doi.org/10.15373/22501991/JAN2014/53>
- Reddy, M. S., S. Kumar, K. Babita y M. S. Reddy. 2002. Biosolubilization of poorly soluble rock phosphates by *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger*. Bioresource Technology 84(2): 187-189. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00040-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00040-8)
- Relwani, L., P. Krishna y M. S. Reddy. 2008. Effect of carbon and nitrogen sources on phosphate solubilization by a wild-type strain and UV-induced mutants of *Aspergillus tubingensis*. Current Microbiology 57(5): 401-406. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9212-y>
- Restrepo-Franco, G., S. Marulanda-Moreno, Y. de la Fe-Pérez, A. Díaz-de la Osa, V. Lucia-Baldani y A. Hernández-Rodríguez. 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.
- Roche, A. y De Barsac. 1959. Solubilization de phosphate naturelles par les germes du sol. Annales De l'Institut Pasteur 96: 781-789.
- SAGARPA. 2015. Agenda técnica agrícola de Coahuila. Segunda edición. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México, D.F., México. Pp. 1- 127.
- Samaniego, J. A. y Y. Chew-Madinaveitia. 2007. Diversidad de géneros de hongos del suelo en tres campos con diferente condición agrícola en La Laguna, México. Revista Mexicana de Biodiversidad 78(2): 383-390.
- Samaniego, J. A., M. Ulloa y T. Herrera. 1988. Micobiota del suelo en huertas de nogal atacadas por *Phymatotrichum omnivorum* en Coahuila, México. Revista Mexicana de Micología 4: 43-57.
- Saxena, J., P. Basu, V. Jaligam y S. Chandra. 2013. Phosphate solubilization by a few fungal strains belonging to the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. African Journal of Microbiology Research 7(41): 4862-4869. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.5991>

- Selvi, K. B., J. J. A. Paul, V. Vijaya y K. Saraswathi. 2017. Analyzing the efficacy of phosphate solubilizing microorganisms by enrichment culture techniques. *Biochemistry and Molecular Biology Journal* 3(1): 1-7. DOI: <https://doi.org/10.21767/2471-8084.100029>
- SEMARNAT. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-021-REC-NAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de los suelos. Estudios, muestreo y análisis. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial de la Federación. Segunda sección. 31 de diciembre 2002. Cd. Mx., México. Pp. 1-75.
- Silva Filho, G. N. y C. Vidor. 2000. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 24(2): 311-329. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832000000200008>
- Singh, M. S., L. S. Yadav, S. K. Singh, P. Singh, P. N. Singh y R. Ravindra. 2011. Phosphate solubilizing ability of two Arctic *Aspergillus niger* strains. *Polar Research* 30(1): DOI: <https://doi.org/10.3402/polar.v30i0.7283>
- Sperber, J. I. 1958. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Australian Journal of Agricultural Research* 9(6): 778-781. DOI: <https://doi.org/10.1071/AR9580778>
- StatSoft Inc. 2007. Statistica para Windows v. 8.0. Data analysis software system. Tulsa, USA.
- Sundara Rao, W. y M. K. Sinha. 1963. Phosphate dissolving organisms in the soil and rizosphere. *Indian Journal of Science* 33: 272-278.
- Swaby, R. J. y J. I. Sperber. 1958. Phosphate dissolving microorganisms in the rhizosphere of legumes. In: Hollworth, E. G. (ed.). *Nutrition of the legumes*. Academic Press. New York, USA. Pp. 289-294.
- Varsha, M., M. Nidhi y M. Anurag. 2010. Heavy metals in plants: phytoremediation: plants used to remediate heavy metal pollution. *Agriculture and Biology Journal of North America* 1(1): 40-46.
- Vassilev, N., I. Franco, M. Vassileva y R. Azcon. 1996. Improved plant growth with rock phosphate solubilized by *Aspergillus niger* grown on sugar-beet waste. *Bioresource Technology* 55(3): 237-241. DOI: [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(96\)00008-9](https://doi.org/10.1016/0960-8524(96)00008-9)
- Velásquez, J., F. D. Beltrán, L. Padilla y G. Giraldo. 2010. Obtención de ácido cítrico por fermentación con *Aspergillus niger* utilizando sustrato de plátano Dominico-Hartón (*Musa AAB Simmonds*) maduro. *Tumbaga* 1(5): 135-147.
- Vera, D. F., H. Pérez y H. Valencia. 2002. Aislamiento de hongos solubilizadores de fosfatos de la rizosfera de arazá (*Eugenia stipitata*, Myrtaceae). *Acta Biológica Colombiana* 7(1): 33-40.
- Verma, A. y A. Ekka. 2015. Isolation, screening and assessment of phosphate solubilizing efficiency of some fungal isolates of Raipur, Chhattisgarh. *Journal of Environmental Science Toxicology and Food Technology* 1(1): 29-39.
- Vitorino, L. C., F. G. Silva, M. A. Soares, E. L. Souchie, A. Costa y W. Lima. 2012. Solubilization of calcium and iron phosphate and *in vitro* production of Indoleacetic acid by Endophytic isolates of *Hyptis marruboides* Epling (Lamiaceae). *International Research Journal of Biotechnology* 3(4): 47-54.
- Walkley, A. e I. A. Black. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science* 37(1): 29-38.
- Whitelaw, S., K. McKeown y J. Williams. 1997. Global health promotion models: enlightenment or entrapment? *Health Education Research* 12(4): 479-490. DOI: <https://doi.org/10.1093/her/12.4.479>
- Yasser, M. M., A. S. M. Mousa, O. N. Massoud y S. H. Nasr. 2014. Solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing fungi isolated from Egyptian soils. *Journal of Biology and Earth Sciences* 4(1): 83-90.
- Zamudio González, A., A. Vázquez, G. Alcántar González, J. D. Etchevers Barra y M. Tadeo Robledo. 2011. Movimiento vertical de fósforo en suelos arenosos con fertirriego y uso de mejoradores. *Terra Latinoamericana* 29(3): 249-258.
- Zeroual, Y., R. Chadghan, A. Hakam y A. Kossir. 2012. Biosolubilization of mineral insoluble phosphates by immobilized fungi (*Aspergillus niger*) in fluidized bed bioreactor. *Journal of Biotechnology and Biomaterials* 6: 1-5. DOI: <https://doi.org/10.4172/2155-952X.S6-004>