

SOLUBILIZACIÓN *in vitro* DE FOSFATOS POR UNA CEPA DE *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson

In vitro PHOSPHATE SOLUBILIZATION BY A STRAIN OF *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson

Tania I. Hernández-Leal, Gloria Carrión*, Gabriela Heredia

Instituto de Ecología A. C. 91070. Carretera antigua a Coatepec 351, El Haya, Xalapa, Veracruz, México. (gloria.carrion@inecol.edu.mx) (isahernandezleal@gmail.com).

RESUMEN

El fósforo es un elemento con escasa disponibilidad en el suelo, la cual puede ser mejorada por hongos solubilizadores de fosfatos de calcio y hierro. Por tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar *in vitro* la solubilización de compuestos fosfatados por *Paecilomyces lilacinus* en medios de cultivo sólidos y líquidos. En medios sólidos se emplearon placas de agar con cada compuesto fosfatado, además de un testigo sin fosfatos, los cuales se inocularon con esporas del hongo. Se evaluaron los halos de solubilización y se calculó la eficiencia relativa de solubilización (ERS). En las pruebas con medios líquidos, *P. lilacinus* se inoculó en medios de cultivo con fosfato de calcio y de hierro sin agar, en los cuales se cuantificó el fósforo (P) soluble y el pH. En las placas de agar con fosfato de calcio se observaron halos de solubilización y la ERS fue 305 % a los 8 d, sin embargo en medios con fosfato de hierro no se formaron halos. En el medio líquido con fosfato de calcio se obtuvo mayor cantidad de P soluble ($71.28 \pm 7.88 \text{ mg L}^{-1}$) en comparación con el medio con fosfato de hierro ($1.75 \pm 0.32 \text{ mg L}^{-1}$). En presencia de fosfato de hierro, *P. lilacinus* inmovilizó la mayor parte del fósforo solubilizado y dejó una proporción disponible mínima. El pH de ambos medios de cultivo disminuyó con la presencia del hongo, por lo cual es probable que el principal mecanismo de solubilización sea la producción de ácidos orgánicos.

Palabras clave: fósforo, hongos solubilizadores, fosfatos, *Paecilomyces lilacinus*.

INTRODUCCIÓN

El fósforo es un elemento indispensable para la constitución celular y las reacciones bioquímicas de las plantas. Sin embargo, las formas

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: diciembre, 2010. Aprobado: noviembre, 2011.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 45: 881-892. 2011.

ABSTRACT

Phosphorus is an element with limited availability in the soil, which can be improved by solubilizing fungi of calcium and iron phosphates. Therefore, the objective of this study was to evaluate *in vitro* the solubilization of phosphate compounds by *Paecilomyces lilacinus* in solid and liquid culture media. In solid media agar plates were used with each phosphate compound, and a control without phosphates, which were inoculated with spores of the fungus. The halos of solubilization were evaluated and the relative efficiency of solubilization (ERS) was calculated. In tests with liquid media, *P. lilacinus* was inoculated in culture media with calcium and iron phosphate without agar, in which the soluble phosphorus (P) and pH were quantified. In agar plates with calcium phosphate solubilization halos were observed and ESR was 305 % at 8 d, but in media with iron phosphate halos were not formed. In the liquid medium with calcium phosphate a greater amount of soluble P ($71.28 \pm 7.88 \text{ mg L}^{-1}$) was obtained compared with the medium with iron phosphate ($1.75 \pm 0.32 \text{ mg L}^{-1}$). In the presence of iron phosphate, *P. lilacinus* immobilized most of the solubilized phosphorus and left a small proportion available. The pH of both culture media decreased in the presence of fungus, which is likely that the main mechanism of solubilization is the production of organic acids.

Key words: phosphorus, solubilizing fungi, phosphates, *Paecilomyces lilacinus*.

INTRODUCTION

Phosphorus is an essential element for the cellular constitution and the biochemical reactions of plants. However, the chemical forms that plants can utilize (orthophosphates: H_2PO_4^- and HPO_4^{2-} , mainly) are scarce, despite the vast total phosphorus content in most soils

químicas que pueden utilizar las plantas (ortofosfatos: H_2PO_4^- y HPO_4^{2-} , principalmente) son escasas, a pesar del vasto contenido de fósforo total en la mayoría de los suelos (Turner *et al.*, 2006). Uno de los principales motivos de la disponibilidad limitada se debe a la unión de los aniones fosfato con otros elementos, con los que forma complejos poco solubles, como los fosfatos de hierro (FePO_4) o aluminio (AlPO_4) en suelos ácidos y fosfatos de calcio [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] en suelos alcalinos (Lavelle y Spain, 2001; Deubel y Merbach, 2005).

La disponibilidad del fósforo puede ser facilitada por la acción de algunos hongos y bacterias solubilizadores de fosfatos de calcio, hierro y aluminio (Tandon y Roy, 2004; Richardson *et al.*, 2009). Estos microorganismos tienen importancia en la nutrición vegetal, ya que pueden incrementar la disponibilidad del fósforo en el suelo. En los últimos cien años se han desarrollado estudios enfocados al aislamiento, caracterización y evaluación del potencial para incrementar el rendimiento de los cultivos de hongos y bacterias solubilizadores de fosfatos (Goldstein, 2007).

Los hongos solubilizadores más estudiados son *Penicillium* y *Aspergillus* (Chun-Chao *et al.*, 2007; El-Azouni, 2008; Pandey *et al.*, 2008). Uno de los mecanismos de solubilización empleado por estos hongos es la producción de diversos ácidos orgánicos, como el cítrico, oxálico, málico y glucónico, y la quelación de los minerales que forman los complejos insolubles con el fósforo (Alam *et al.*, 2002; Chun-Chao *et al.*, 2007; Dighton, 2007).

La actividad solubilizadora de fosfatos de los hongos nematófagos ha sido poco evaluada. Algunos como *Arthrobotrys oligospora* Fresen. tienen la capacidad de solubilizar fosfatos de Ca (Duponnois *et al.*, 2006) y otros como *Paecilomyces* spp. solubilizan tanto fosfatos de Ca como de Fe (Vera *et al.*, 2002). Los hongos nematófagos con estas características además de disminuir la densidad de nematodos fitoparásitos, pueden contribuir a la nutrición del cultivo incrementando la disponibilidad del fósforo.

Paecilomyces lilacinus (Thom) Samson es uno de los hongos más estudiados y utilizados en el control de nematodos fitoparásitos (Saxena, 2004). En invernadero y en campo, se ha detectado infectando 50-100 % de nematodos fitoparásitos como *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949 (Jonathan *et al.*, 2000; Brand *et al.*, 2004;), *M.*

(Turner *et al.*, 2006). One of the main reasons for the limited availability is due to the binding of phosphate anions with other elements, with which forms slightly soluble complexes, such as phosphates of iron (FePO_4) or aluminum (AlPO_4) in acid soils and calcium phosphates [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] in alkaline soils (Lavelle and Spain, 2001; Deubel and Merbach, 2005).

The availability of phosphorus can be facilitated by the action of some solubilizing fungi and bacteria of calcium, iron, and aluminum phosphates (Tandon and Roy, 2004; Richardson *et al.*, 2009). These microorganisms have importance in plant nutrition, since they can increase the availability of phosphorus in the soil. In the last hundred years there have been studies focused on the isolation, characterization and evaluation of the potential for increasing yields of solubilizing fungi and bacteria of phosphates (Goldstein, 2007).

The most studied solubilizing fungi are *Penicillium* and *Aspergillus* (Chun-Chao *et al.*, 2007; El-Azouni, 2008; Pandey *et al.*, 2008). One mechanism of solubilization used by these fungi is the production of various organic acids, such as citric, oxalic, malic and gluconic acids and chelation of minerals that form insoluble complexes with phosphorus (Alam *et al.*, 2002; Chun-Chao *et al.*, 2007; Dighton, 2007).

Phosphate solubilizing activity of nematophagous fungi has been poorly evaluated. Some fungi such as *Arthrobotrys oligospora* Fresen. have the ability to solubilize Ca phosphates (Duponnois *et al.*, 2006) and others as *Paecilomyces* spp. solubilize both Ca and Fe phosphates (Vera *et al.*, 2002). Nematophagous fungi with these characteristics in addition to reduce the density of plant parasitic nematodes, can contribute to crop nutrition by increasing phosphorus availability.

Paecilomyces lilacinus (Thom) Samson is one of the fungi most studied and used in the control of plant parasitic nematodes (Saxena, 2004). Under greenhouse and field conditions, it has been found infecting 50-100 % of plant parasitic nematodes such as *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949 (Jonathan *et al.*, 2000; Brand *et al.*, 2004;), *M. javanica* (Treub, 1985) Chitwood, 1949 and *Heterodera avenae* Wollenweber (Khan *et al.*, 2006), *Radopholus similis* (Cobb, 1983) Thorne, 1949 (Mendoza *et al.*, 2007) and *Rotylenchulus*

javanica (Treub, 1885) Chitwood, 1949 y *Heterodera avenae* Wollenweber (Khan *et al.*, 2006), *Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne, 1949 (Mendoza *et al.*, 2007) y *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliviera, 1940 (Walters & Barker, 1994). Sin embargo, no hay información específica sobre su capacidad de solubilizar fosfatos.

Con la hipótesis de que *P. lilacinus* solubiliza tanto fosfato de calcio como de hierro, el objetivo del presente estudio fue conocer mediante pruebas *in vitro* la actividad solubilizadora de *P. lilacinus* en medios sólidos y líquidos con suplementos de fosfato de calcio y de hierro. En los medios sólidos también se analizó el efecto de los compuestos fosfatados en el crecimiento y la esporulación del hongo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Solubilización de fosfatos en medio sólido

Se usó una cepa de *P. lilacinus* (IE-430), nativa del Cofre de Perote, Veracruz, México, aislada de juveniles de *Globodera rostochiensis* y depositada en el cepario del Instituto de Ecología A. C., cuya determinación morfológica fue realizada con la clave de Samson (1974). El medio de cultivo sólido utilizado fue un indicador cualitativo de la acción solubilizadora de fosfatos de un hongo y se puede observar al formarse un halo claro alrededor del micelio (Sundara y Sinha, 1963). El medio de cultivo Pikovskaya-agar modificado (Nopparat *et al.*, 2009), consistió en una solución base: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.5 g), KCl (0.2 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.1 g), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.004 g), NaCl (0.2 g), D-Glucosa (10 g), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.002 g) (Sigma-Aldrich), extracto de levadura (0.5 g, Bioxon), cloranfenicol (0.1 g, Pfizer), agar (18 g, Bioxon) y agua destilada (900 mL). A esta mezcla se le añadió una solución de fosfato: goma arábiga (0.5 g, Kremer), fosfato de calcio (β -fosfato de tricalcio, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, Sigma-Aldrich, 0.5 g) o hierro (fosfato férrico, $\text{FePO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Química-Barquim, 0.5 g) y agua destilada (100 mL). Se preparó un medio de cultivo testigo sin compuesto fosfatado. La mezcla base y la solución de fosfato se esterilizaron por separado en autoclave durante 15 min a 22 psi y 121 °C. Cuando la temperatura de ambas fue tolerable para ser manipuladas, se mezclaron y vertieron en cajas Petri formando una capa delgada. El pH inicial del medio con fosfato de calcio fue de 5.45 y 4.68 para el medio con fosfato de hierro. Al final del experimento se usaron tiras indicadoras para medir el pH de la superficie de las placas del medio de cultivo.

Se emplearon 10 cajas Petri para cada medio de cultivo, en cuyo centro se inocularon con agujas esterilizadas 15×10^4

reniformis Lindford & Oliviera, 1940 (Walters and Barker, 1994). However, there is not specific information on its ability to solubilize phosphates.

Under the hypothesis that *P. lilacinus* solubilizes both calcium and iron phosphates, the objective of this study was to know through *in vitro* tests the solubilizing activity of *P. lilacinus* in solid and liquid media with supplements of calcium and iron phosphate. In solid media the effect of phosphate compounds on growth and sporulation of the fungus was also analyzed.

MATERIALS AND METHODS

Phosphate solubilization in solid medium

A strain of *P. lilacinus* (IE-430), from the Cofre de Perote, Veracruz, México was used, isolated of juveniles of *Globodera rostochiensis* and deposited in the Cepari of the Instituto de Ecología A. C., whose morphological determination was performed with the key of Samson (1974). The solid medium used was a qualitative indicator of phosphate solubilizing action of a fungus and can be seen to form a clear halo around the mycelium (Sundara and Sinha, 1963). The modified culture medium Pikovskaya-agar (Nopparat *et al.*, 2009), consisted of a base solution ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.5 g), KCl (0.2 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.1 g), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.004 g), NaCl (0.2 g), D-Glucose (10 g), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.002 g) (Sigma-Aldrich), yeast extract (0.5 g, Bioxon), chloramphenicol (0.1 g, Pfizer), agar (18 g, Bioxon) and distilled water (900 mL). To this mixture it was added a solution of phosphate: gum arabic (0.5 g, Kremer), calcium phosphate (β -tricalcium phosphate, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, Sigma-Aldrich, 0.5 g) or iron (ferric phosphate, $\text{FePO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Chemistry Barquim, 0.5 g) and distilled water (100 mL). A control culture medium without phosphate compound was prepared. The base mixture and the phosphate solution were sterilized separately by autoclaving for 15 min at 22 psi and 121 °C. When the temperature was tolerable for both to be manipulated, they were mixed and poured in Petri dishes forming a thin layer. The initial pH of the medium with calcium phosphate was 5.45 and 4.68 for the medium with iron phosphate. At the end of the experiment indicator strips to measure pH of the surface of the plates of culture medium were used.

Ten Petri dishes were used for each culture medium in whose center spores of the strain IE-430 of *P. lilacinus* were inoculated with sterilized 15×10^4 needles. The dishes were kept in the dark at 25 °C. To evaluate the growth of the fungus with different sources of phosphorus, the diameter of the colony was measured at 4, 5, 6, 8 and 10 d after inoculation. The Relative Efficiency

esporas de la cepa IE-430 de *P. lilacinus*. Las cajas se mantuvieron en oscuridad a 25 °C. Para evaluar el crecimiento del hongo con diferentes fuentes de fósforo, se midió el diámetro de la colonia a los 4, 5, 6, 8 y 10 d posteriores a la inoculación. La Eficiencia Relativa de Solubilización (ERS) se calculó con el diámetro de la colonia y del halo formado alrededor del micelio al octavo y décimo día mediante la fórmula: Diámetro de la solubilización/Diámetro de la colonia × 100 (Vera *et al.*, 2002). Este índice indica el radio de acción del hongo sobre el sustrato, expresado en porcentaje, en relación al tamaño del micelio.

Para conocer el efecto de los dos compuestos fosfatados sobre la esporulación de *P. lilacinus*, después de 15 d, de cada tratamiento se cortó un círculo de 5 mm de diámetro en el centro de la colonia. Cada disco se introdujo en un vial con 1 mL de agua, al cual se le agregó Tween 80 y se agitó vigorosamente. Posteriormente se hicieron diluciones de 1:10 a partir de las cuales se realizaron tres conteos de esporas con una cámara de Neubauer. Los resultados se expresan en número de esporas mL⁻¹ y son el promedio de los tres conteos.

Cuantificación de fósforo soluble en medio líquido

Se cuantificó la cantidad de fósforo solubilizado por *P. lilacinus* en un determinado periodo de tiempo, según Chun-Chao *et al.* (2007) y Pandey *et al.* (2008). Se preparó medio de cultivo sin agar con fosfato de calcio (P-Ca) y con fosfato de hierro (P-Fe), de la forma descrita en los medios sólidos. Para cada tratamiento se emplearon tres matraces (250 mL) con 150 mL del caldo de cultivo, cada uno se inoculó con tres discos de agar avena (5 mm de diámetro) tomados del margen de un cultivo puro de *P. lilacinus* con 4 d de crecimiento (8×10^6 conidiosporas/disco). Se utilizaron matraces con medio sin inóculo como testigos, también por triplicado. Todos los matraces (N=12) se mantuvieron a temperatura ambiente (25 °C), en constante agitación a 130 rpm.

Se tomaron alícuotas de 10 mL de cada matraz, antes de inocularlos y cada 2 d después de agregar el hongo. En el medio P-Ca las alícuotas se tomaron hasta los 12 d y en P-Fe hasta los 18 d, debido a que éste último fue menos soluble. En cada toma, los extractos se filtraron con papel Whatman 42 para separar el micelio sobrenadante y con las soluciones resultantes se cuantificó el fósforo soluble por colorimetría de complejos molibdo-fosfóricos reducidos con ácido ascórbico (AOAC, 1980), realizando las lecturas a 880 nm en un espectrofotómetro (Genesys 20, ThermoSpectronic, EUA). Los resultados son el promedio de las tres réplicas y se expresan en mg L⁻¹. En cada evaluación el pH de los extractos se midió con un potenciómetro (Conductronic PC45, México). Al finalizar los periodos de revisión se analizó la cantidad de Fe y Ca soluble en todos los matraces, con

of Solubilization (ERS) was calculated with the diameter of the colony and halo formed around mycelial at the eighth and tenth day using the formula: Diameter of the solubilization/Diameter of the colony × 100 (Vera *et al.*, 2002). This index indicates the operating range of the fungus on the substrate, expressed as percentage, in relation to the size of mycelium.

To know the effect of the two phosphate compounds on sporulation of *P. lilacinus*, after 15 d of each treatment a circle of 5 mm in diameter was cut in the center of the colony. Each disk was placed in a vial with 1 mL of water, to which Tween 80 was added and stirred vigorously. Subsequently 1:10 dilutions were made from which there were three counts of spores with a Neubauer chamber. The results are expressed as number of spores mL⁻¹ and are average of the three counts.

Quantification of soluble phosphorus in liquid medium

The amount of phosphorus solubilized by *P. lilacinus* was quantified in a given period of time, according to Chun-Chao *et al.* (2007) and Pandey *et al.* (2008). A culture medium without agar was prepared with calcium phosphate (P-Ca) and iron phosphate (P-Fe), as described in solid media. For each treatment three flasks (250 mL) were used with 150 mL of the culture broth, each was inoculated with three oatmeal agar discs (5 mm in diameter) taken from the margin of a pure culture of *P. lilacinus* with 4 d of growth (8×10^6 conidiospores/disc). Flasks with uninoculated medium were used as control, also in triplicate. All flasks (N=12) were maintained at room temperature (25 °C), shaking constantly at 130 rpm.

Aliquots of 10 mL from each flask were taken, before inoculating them and every 2 d after adding the fungus. In the P-Ca medium aliquots were taken up to 12 d and in P-Fe up to 18 d due to the fact the latter was less soluble. In each taken sample, the extracts were filtered through Whatman 42 filter paper to separate the mycelium supernatant and with the resulting solutions the soluble phosphorus was quantified by colorimetry of molybdo-phosphoric complexes reduced with ascorbic acid (AOAC, 1980), making the readings at 880 nm in a spectrophotometer (Genesys 20, ThermoSpectronic, USA). The results are the average of the three replicates and are expressed in mg L⁻¹. In each evaluation the pH of the extracts was measured with a potentiometer (Conductronic PC45, México). At the end of the review periods the amount of soluble Fe and Ca were analyzed in all flasks, with an atomic absorption spectrophotometer and a flame emission spectrometer (Shimadzu AA-6501, Japan).

The initial concentration of P introduced as Ca₃(PO₄)₂ was 99.88 mg L⁻¹ and in FePO₄ was 91.75 mg L⁻¹, calculated according to its molecular weight. The solubility of these two

un espectrofotómetro de absorción atómica y emisión de flama (Shimadzu AA-6501, Japón).

La concentración inicial de P introducido como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ fue de 99.88 mg L^{-1} y en FePO_4 fue 91.75 mg L^{-1} , calculada de acuerdo a su peso molecular. La solubilidad de estos dos compuestos se calculó tomando en cuenta la constante del producto de solubilidad y el peso molecular de cada uno (Garzón, 1991).

Diseño experimental y análisis estadísticos

El diseño experimental en las pruebas con los medios sólidos y líquidos fue completamente al azar. Para determinar las diferencias en el crecimiento del hongo entre los distintos medios sólidos [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 y testigo] se realizaron comparaciones en cada día de evaluación. Para determinar las diferencias entre los tratamientos se empleó un ANDEVA de una vía y la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), cuando los valores presentaron una distribución normal y homogeneidad de varianza (valores del crecimiento del micelio al cuarto y décimo día de evaluación). En caso contrario se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis (valores del quinto, sexto y octavo día de evaluación) y después la comparación múltiple por rangos ($p \leq 0.05$). En relación al P soluble en los medios líquidos, se aplicó la prueba U de Mann-Whitney para determinar diferencias entre los tratamientos. Por último, se llevó a cabo una correlación de Spearman entre el pH y la cantidad de P soluble en los medios líquidos inoculados con *P. lilacinus*. Todos los análisis se efectuaron con el programa Statistica 8.0 para Windows (StatSoft, 2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Solubilización de fosfatos en medio sólido

Paecilomyces lilacinus mostró actividad solubilizadora hacia el fosfato de calcio desde el cuarto día después de su inoculación, cuando se observó la formación de halos alrededor de la colonia en las placas de agar (Figura 1). Por el contrario, para el fosfato de hierro no se formaron los halos. Al respecto, Jones *et al.* (1991) y Whitelaw (1999) mencionan que la ausencia de halos de solubilización en los medios de cultivo sólido no necesariamente indica que el organismo carezca de habilidad solubilizadora, sino que posiblemente este tipo de medios son insensibles para detectar la actividad de algunos microorganismos. Por lo cual es necesario recurrir a los medios líquidos para obtener resultados más precisos.

La ERS promedio del hongo en el sustrato con fosfato de calcio fue de 298 % al décimo día, sin

compounds was calculated taking into account the constant of the solubility product and molecular weight of each (Garzón, 1991).

Experimental design and statistical analysis

The experimental design in the tests with the solid and liquid media was completely random. To determine the differences in the fungal growth among the different solid media [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 and control] comparisons were made on each day of evaluation. To determine between treatments a one-way ANOVA and Tukey's test ($p \leq 0.5$) were used when the values had a normal distribution and homogeneity of variance (values of mycelium growth at fourth and tenth day of evaluation). Otherwise the Kruskal-Wallis test (values of the fifth, sixth and eighth day of evaluation) was used and then the multiple comparison by ranges ($p \leq 0.05$). In relation to the soluble P in the liquid media, the Mann-Whitney U test was applied to determine differences between treatments. Finally, a Spearman correlation was carried out between pH and the amount of soluble P in the liquid media inoculated with *P. lilacinus*. All analyses were performed using the program Statistica 8.0 for Windows (StatSoft, 2007).

RESULTS AND DISCUSSION

Solubilization of phosphates in a solid medium

Paecilomyces lilacinus showed solubilizing activity toward calcium phosphate from the fourth day after inoculation, when it was observed the formation of halos around the colony on agar plates (Figure 1). On the contrary, for the iron phosphate halos were not formed. In this regard, Jones *et al.* (1991) and Whitelaw (1999) mention that absence of solubilization halos in the solid culture media does not necessarily indicate that the organism lacks solubilizing ability, but possibly this type of media are insensitive to detect the activity of some microorganisms. Therefore it is necessary to use liquid culture media to obtain more accurate results.

The average ERS of the fungus in the substrate with calcium phosphate was 298 % on the tenth day, however, the maximum value of this index is presented in the eighth day with 305 %. These results indicate that the area of solubilization of the fungus was approximately three times larger than the size of its mycelium (Table 1). When comparing these data with results obtained by Vera *et al.* (2002), who used a similar culture medium, it is concluded

embargo el máximo valor de este índice se presentó en el octavo día con 305 %. Estos resultados indican que el área de solubilización del hongo fue aproximadamente tres veces más extensa que el tamaño de su micelio (Cuadro 1). Al comparar estos datos con los resultados obtenidos por Vera *et al.* (2002), quienes emplearon un medio de cultivo muy similar, se concluye que la cepa de *P. lilacinus* empleada en este trabajo posee una eficiencia de solubilización superior que la mayoría de las cepas probadas (*Trichoderma* spp., *Paecilomyces* spp., *Aspergillus* spp., entre otras) por los autores mencionados, las cuales tuvieron ERS menores a 250 %.

El crecimiento de *P. lilacinus* fue mayor ($p \leq 0.05$) en el medio de cultivo testigo en comparación con los medios con fosfato de calcio y hierro (Figura 2). El diámetro del micelio fue 22.15 ± 1.75 mm ($\bar{x} \pm DE$) en el medio testigo al décimo día (pH=3), mientras que en el tratamiento con fosfato de calcio y de hierro fue 19.82 ± 1.19 (pH=4) y 16.88 ± 0.82 mm (pH=2.5). No hubo diferencias significativas en el crecimiento del hongo entre los medios con calcio y hierro, con excepción del décimo día de evaluación ($F(2, 27) = 37.88, p \leq 0.01$), en el cual el diámetro del micelio fue significativamente mayor en el medio con fosfato de calcio (Figura 2). Estos resultados indican un gasto de energía para el hongo debido a la disolución de los compuestos fosfatados [$Ca_3(PO_4)_2$ o $FePO_4$]. La fuente de C, N y P del medio de cultivo influyen notablemente sobre la solubilización y el crecimiento de los hongos, la producción de las sustancias implicadas en la solubilización requiere la absorción de nutrientes, sobre todo de carbono (Nahas, 2007). Aún cuando se registraron pH muy



Figura 1. Halo de solubilización (indicado con la flecha) formado por *P. lilacinus* en medio sólido con fosfato de calcio a los 10 días.

Figure 1. Solubilization halo (indicated by the arrow) formed by *P. lilacinus* in a solid medium with calcium phosphate at 10 days.

that the strain of *P. lilacinus* used in this study has a solubilization efficiency higher than most of the strains tested (*Trichoderma* spp., *Paecilomyces* spp., *Aspergillus* spp., among others) by the mentioned authors, which had ERS lower than 250 %.

The growth of *P. lilacinus* was higher ($p \leq 0.05$) in the control culture medium compared to media with calcium and iron phosphate (Figure 2). The diameter of the mycelium was 22.15 ± 1.75 mm ($\bar{x} \pm SD$) in the control medium at tenth day (pH=3), whereas in treatment with calcium and iron phosphate was 19.82 ± 1.19 (pH=4) and 16.88 ± 0.82 mm

Cuadro 1. Eficiencia relativa de solubilización (ERS) de *Paecilomyces lilacinus* sobre medio de cultivo sólido con fosfato de calcio. Diámetro del micelio y del halo de solubilización ($\bar{x} \pm DE$).

Table 1. Relative efficiency of solubilization (ERS) *Paecilomyces lilacinus* on solid culture medium with calcium phosphate. Diameter of mycelium and solubilization halo ($\bar{x} \pm SD$).

Día de evaluación	Diámetro del micelio (mm) [†]	Diámetro del halo (mm) [†]	% ERS [‡]
4	8.95 ± 0.52	18.41 ± 2.5	206
5	11.05 ± 0.52	28.55 ± 1.57	258
6	12.68 ± 0.56	37.23 ± 1.4	294
8	15.68 ± 0.56	47.77 ± 1.72	305
10	19.82 ± 1.19	59.09 ± 3.33	298

[†]Los valores mostrados son el promedio de 10 réplicas; [‡]ERS=eficiencia relativa de solubilización ❖
[†]The values shown are the average of 10 replicates; [‡]ERS=relative efficiency of solubilization.

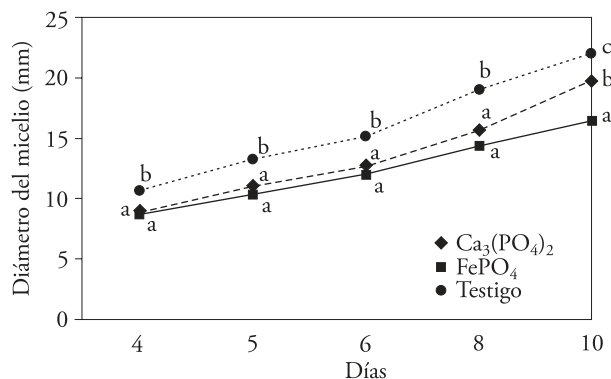


Figura 2. Crecimiento del hongo *Paecilomyces lilacinus* en medios de cultivo con fosfato de calcio y fosfato de hierro. Promedios (n=10). Letras diferentes en el mismo día indican diferencia estadística entre tratamientos ($p \leq 0.05$). Se usó ANDEVA para el día cuarto y décimo de evaluación; Kruskal-Wallis para los otros días. Día 10: ($F_{(2, 27)} = 37.88$, $p \leq 0.01$).

Figure 2. Growth of the fungus *Paecilomyces lilacinus* in culture media with calcium phosphate and iron phosphate. Averages (n=10). Different letters on the same day indicate statistical difference between treatments ($p \leq 0.05$). ANOVA was used for the fourth and tenth days of evaluation; Kruskal-Wallis for the other days. Day 10: ($F_{(2, 27)} = 37.88$, $p \leq 0.01$).

ácidos en la superficie de las placas del medio de cultivo Pikovskaya-agar modificado, éstas mantuvieron su forma y consistencia.

El número de esporas producidas en el medio con fosfato de calcio fue $90.8 \pm 3.2 \times 10^6$ esporas mL^{-1} $\bar{x} \pm \text{DE}$, superior al resto de los demás medios de cultivo (fosfato de hierro = $41.6 \pm 4.9 \times 10^6$ y testigo = $50.4 \pm 6.7 \times 10^6$ esporas mL^{-1}). La mayor esporulación obtenida en el medio con fosfato de calcio se debió a la presencia de los iones de Ca^{+2} libres en el medio, lo cual coincide con lo descrito por Mosley *et al.* (1989), Shaw y Hoch (2007) y Koslova *et al.* (2010).

Solubilización de fosfatos en medio líquido

P. lilacinus solubilizó 71.28 mg L^{-1} de fósforo en el medio con fosfato de calcio a los 12 d de crecimiento, lo cual representó 71 % del contenido de P inicial introducido como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. En comparación con su testigo, el medio inoculado con el hongo presentó mayor cantidad de P soluble ($p \leq 0.05$) a partir del cuarto día, la mayor concentración del elemento se

(pH=2.5). There were no significant differences in the fungus growth between the media with calcium and iron, with the exception of the tenth day of evaluation ($F(2, 27) = 37.88$, $p \leq 0.01$), in which the diameter of the mycelium was significantly higher in the medium with calcium phosphate (Figure 2). These results indicate an expenditure of energy for the fungus due to the dissolution of phosphate compounds [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ or FePO_4]. The source of C, N and P from the culture medium greatly influence on the solubilization and fungi growth, the production of substances involved in the solubilization requires the absorption of nutrients, especially carbon (Nahas, 2007). Even when there was very acidic pH on the surface of plates of the modified medium Pikovskaya-agar, these maintained their shape and consistency.

The number of spores produced in the medium with calcium phosphate was $90.8 \pm 3.2 \times 10^6$ spores mL^{-1} $\bar{x} \pm \text{SD}$, higher than the rest of other culture media (iron phosphate = $41.6 \pm 4.9 \times 10^6$ and control = $50.4 \pm 6.7 \times 10^6$ spores mL^{-1}). The highest sporulation obtained in the medium with calcium phosphate was due to the presence of Ca^{+2} free ions in the medium, which is consistent with that described by Mosley *et al.* (1989), Shaw and Hoch (2007) and Koslova *et al.* (2010).

Solubilization of phosphates in liquid medium

P. lilacinus solubilized 71.28 mg L^{-1} of phosphorus in the medium with calcium phosphate at 12 d of growth, which represented 71 % of the content of initial P introduced as $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Compared with control, the medium inoculated with the fungus had a higher amount of soluble P ($p \leq 0.05$) from the fourth day; the highest concentration of the element was obtained in the last day of reading (Table 2). At the end of the experiment, the concentration of Ca in the treatment with the fungus was $219.16 \pm 20.63 \text{ mg L}^{-1}$, exceeding the content of the control flasks ($16.94 \pm 0.33 \text{ mg L}^{-1}$).

In the iron phosphate treatment, *P. lilacinus* solubilized less amount of phosphorus compared to the calcium phosphate (Table 3). The treatment inoculated with the fungus initially had a concentration of $4.28 \pm 0.07 \text{ mg of P L}^{-1}$ representing 4.66 % of the phosphorus incorporated

obtuvo en el último día de lectura (Cuadro 2). Al finalizar el experimento, la concentración de Ca en el tratamiento con el hongo fue $219.16 \pm 20.63 \text{ mg L}^{-1}$, superando el contenido de los matraces testigo ($16.94 \pm 0.33 \text{ mg L}^{-1}$).

En el tratamiento con fosfato de hierro, *P. lilacinus* solubilizó menor cantidad de fósforo en comparación con el fosfato de calcio (Cuadro 3).

as $\text{FePO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; however, on the fourth day there was a decrease in the concentration of this element ($0.42 \pm 0.14 \text{ mg L}^{-1}$). In the following evaluations there was a slight increase of soluble phosphorus, but was always less than the control treatment, ending with a concentration of $1.75 \pm 0.32 \text{ mg P L}^{-1}$ (1.91 % of the initial phosphorus (Table 3). In the control treatment, the content of soluble phosphorus

Cuadro 2. Concentración de fósforo soluble y pH del medio líquido con fosfato de calcio sin inocular e inoculado con *Paecilomyces lilacinus* ($\bar{x} \pm \text{DE}$).

Table 2. Concentration of soluble phosphorus and pH of the liquid medium with calcium phosphate uninoculated and inoculated with *Paecilomyces lilacinus* ($\bar{x} \pm \text{SD}$).

Tratamiento	Variable	Días después de la inoculación						
		0	2	4	6	8	10	12
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + P. \text{ lilacinus}$	P soluble	7.71 a	10.36 a	22.12 a	33.70 a	48.38 a	57.72 a	71.28 a
	P- PO_4 (mg L^{-1})	± 0.15	± 0.43	± 1.09	± 1.68	± 3.03	± 5.27	± 7.88
	pH	5.84 ± 0.08	5.89 ± 0.04	5.27 ± 0.07	4.12 ± 0.08	4.00 ± 0.08	4.06 ± 0.05	4.06 ± 0.05
Testigo	P soluble	7.48 a	7.39 b	6.98 b	6.94 b	7.88 b	8.02 b	9.54 b
	(mg L^{-1})	± 0.13	± 0.15	± 0.43	± 1.40	± 0.13	± 0.26	± 0.07
	pH	5.83 ± 0.06	5.77 ± 0.09	5.76 ± 0.04	5.68 ± 0.07	5.59 ± 0.32	5.72 ± 0.02	5.79 ± 0.03

Letras diferentes en cada día de evaluación indican diferencia entre los tratamientos ($p \leq 0.05$). $n=3$; C.V.=98.94 ❖ Different letters in each day of evaluation indicate difference between treatments ($p \leq 0.05$). $n=3$; C.V.=98.94.

Cuadro 3. Concentración de fósforo soluble y pH del medio líquido con fosfato de hierro sin inocular e inoculado con *Paecilomyces lilacinus* ($\bar{x} \pm \text{DE}$).

Table 3. Concentration of soluble phosphorus and pH of the liquid médium with iron phosphate uninoculated and inoculated with *Paecilomyces lilacinus* ($\bar{x} \pm \text{SD}$).

Tratamiento	Variable	Días después de la inoculación									
		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18
$\text{FePO}_4 + P. \text{ lilacinus}$	P soluble	4.28a	4.06a	0.42a	0.78a	0.85a	1.00a	1.26a	1.98a	1.72a	1.75a
	P- PO_4 (mg L^{-1})	± 0.06	± 0.07	± 0.14	± 0.42	± 0.40	± 0.10	± 0.14	± 0.72	± 0.58	± 0.32
	pH	4.53 ± 0.01	4.39 ± 0.04	3.40 ± 0.08	2.94 ± 0.03	2.80 ± 0.03	2.73 ± 0.03	2.62 ± 0.03	2.58 ± 0.01	2.47 ± 0.03	2.45 ± 0.02
Testigo	P soluble	4.32a	4.48b	3.96b	4.61b	4.28b	4.72b	4.62b	4.93b	4.82b	5.22b
	(mg L^{-1})	± 0.08	± 0.24	± 0.04	± 0.44	± 0.18	± 0.03	± 0.53	± 0.27	± 0.24	± 0.13
	pH	4.50 ± 0.00	4.50 ± 0.02	4.49 ± 0.01	4.48 ± 0.01	4.54 ± 0.02	4.49 ± 0.05	4.41 ± 0.11	4.48 ± 0.03	4.47 ± 0.04	4.49 ± 0.02

Letras diferentes en cada día de evaluación indican diferencia entre los tratamientos ($p \leq 0.05$). $n=3$; C.V.=53.32 ❖ Different letters in each day of evaluation indicate difference between treatments ($p \leq 0.05$). $n=3$; C.V.=53.32.

El tratamiento inoculado con el hongo inicialmente tuvo una concentración de 4.28 ± 0.07 mg de P L⁻¹ representando 4.66 % del fósforo incorporado como FePO₄·H₂O; sin embargo, al cuarto día se presentó una disminución en la concentración de dicho elemento (0.42 ± 0.14 mg L⁻¹). En las siguientes evaluaciones se registró un ligero incremento del fósforo soluble, aunque siempre fue menor al tratamiento testigo, terminando con una concentración de 1.75 ± 0.32 mg de P L⁻¹ (1.91 % del P inicial) (Cuadro 3). En el tratamiento testigo, el contenido de fósforo soluble no tuvo variación durante todo el experimento. La concentración de hierro soluble en el último día de evaluación fue mayor en el medio tratado con el hongo (52.39 ± 3.25 mg L⁻¹) que en el testigo (13.83 ± 0.24 mg L⁻¹). Estos resultados indican que hubo disolución de fosfato de hierro, aunque la concentración de fósforo soluble disminuyó en los matraces inoculados con el hongo, como lo reportan Jones *et al.* (1991) en sus experimentos de laboratorio.

La mayor capacidad de *P. lilacinus* para solubilizar fosfato de calcio que fosfato de hierro, puede estar relacionada con el grado de solubilidad de ambos compuestos químicos. El Ca₃(PO₄)₂ tiene mayor solubilidad (2.21×10^{-4} g L⁻¹) que el FePO₄ (1.78×10^{-9} g L⁻¹), por lo que el primer compuesto se solubiliza con mayor facilidad (Reyes *et al.*, 1999 a y b; Barroso y Nahas, 2005).

Es probable que la cantidad de fósforo que *P. lilacinus* solubilizó en el medio líquido con fosfato de hierro, fue incorporada a su propio metabolismo. Reyes *et al.* (1999a) en estudios con *Penicillium rugulosum* Thom atribuyen la disminución del P soluble a su inmovilización por el crecimiento del micelio. Estos mismos autores indican que utilizando nitrato (NO₃⁻) como fuente de nitrógeno y sacarosa como suplemento de carbono se obtiene mayor solubilización de fosfatos de hierro que con el amonio y glucosa utilizados en este experimento (Reyes *et al.*, 1999a,b). El fósforo es indispensable en las funciones celulares de todos los seres vivos, como la producción de ATP, ADN y ARN. Los hongos pueden almacenar este elemento como sustancia de reserva, en forma de polifosfatos dentro de las vacuolas celulares (Beever y Burns, 1980; Carlile *et al.*, 2001).

El pH de los medios con fosfato de calcio y de hierro bajó durante el experimento, mientras que en los matraces testigo no hubo variación (Cuadros 2 y

had no change throughout the experiment. The soluble iron concentration in the last evaluation day was higher in the medium treated with the fungus (52.39 ± 3.25 mg L⁻¹) than in the control (13.83 ± 0.24 mg L⁻¹). These results indicate that there was dissolution of iron phosphate, although the concentration of soluble phosphorus decreased in the flasks inoculated with the fungus, as reported by Jones *et al.* (1991) in their laboratory experiments.

The greater ability of *P. lilacinus* to solubilize calcium phosphate than iron phosphate may be related to the degree of solubility of both compounds. Ca₃(PO₄)₂ has higher solubility (2.21×10^{-4} g L⁻¹) than FePO₄ (1.78×10^{-9} g L⁻¹), so the first compound is solubilized more easily (Reyes *et al.*, 1991a and b; Barroso and Nahas, 2005).

It is likely that the amount of phosphorus that *P. lilacinus* solubilized in the liquid medium with iron phosphate was incorporated into its own metabolism. Reyes *et al.* (1999a) in studies with *Penicillium rugulosum* Thom attribute the decrease of soluble P to its immobilization by the growth of the mycelium. These authors suggest that using nitrate (NO₃⁻) as a nitrogen source and sucrose as carbon supplement results in greater solubilization of iron phosphates than with ammonium and glucose used in this experiment (Reyes *et al.*, 1991a,b). Phosphorus is essential in the cellular functions of all living beings, as the production of ATP, DNA and RNA. Fungi can store this element as a reserve substance, in the form of polyphosphates in cell vacuoles (Beever and Burns, 1980; Carlile *et al.*, 2001).

The pH of the media with calcium and iron phosphates decreased during the experiment, while in the control flasks there was no variation (Tables 2 and 3). The acidification of both culture media with respect to the control was consequence of the fungus activity, since one of the main mechanisms used by solubilizing fungi to dissolve the phosphate complexes is the production of organic acids (Gómez-Guiñán and Zabala, 2001; Pradham and Sukla, 2005; Chun-Chao *et al.*, 2007).

A significant negative correlation was found between the amount of soluble phosphorus and the pH of the medium with calcium phosphate inoculated with *P. lilacinus* ($r_s = -0.801$, $p \leq 0.05$). This coincides with other studies which indicate that by decreasing the pH (5.5-2.4), increases the

3). La acidificación de ambos medios de cultivo con respecto al testigo fue consecuencia de la actividad del hongo, ya que uno de los principales mecanismos empleados por los hongos solubilizadores para disolver los complejos fosfatados es la producción de ácidos orgánicos (Gómez-Guiñán y Zabala, 2001; Pradham y Sukla, 2005; Chun-Chao *et al.*, 2007).

Se encontró una correlación negativa significativa entre la cantidad de fósforo soluble y el pH del medio con fosfato de calcio inoculado con *P. lilacinus* ($r_s = -0.801$, $p \leq 0.05$). Lo anterior coincide con otros estudios en los cuales se indica que al disminuir el pH (5.5-2.4), aumenta la concentración de P soluble ($0.32-110 \text{ mg L}^{-1}$) (Thomas *et al.*, 1985; Pandey *et al.*, 2008; Xiao *et al.*, 2009). Sin embargo, en el cultivo con fosfato de hierro no se halló correlación entre las variables citadas ($r_s = 0.053$, $p > 0.05$), la disminución del pH no significó un aumento de P soluble. La acidez registrada en los medios de cultivo y la solubilización de fosfatos dependen de varios factores, como la capacidad solubilizadora del organismo, los ácidos orgánicos producidos, el tipo de compuesto fosfatado, así como la fuente de C y N (Barroso y Nahas, 2005; Pradham y Sukla, 2005; Souchie *et al.*, 2006).

CONCLUSIONES

La eficiente capacidad solubilizadora de *Paecilomyces lilacinus* hacia los fosfatos de calcio y en menor medida hacia los fosfatos de hierro fue comprobada *in vitro*. Este hongo nematófago usado con fines de control biológico tiene el potencial para favorecer la disponibilidad de fósforo en el suelo, en presencia de fosfatos de calcio. Sin embargo, es necesario realizar experimentos en condiciones de invernadero y campo, para evaluar la solubilización de los compuestos fosfatados al interactuar con los microorganismos del suelo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la M. en C. Ariadna Virues del Laboratorio de Ecología Funcional, INECOL, por la asesoría técnica brindada en la determinación del fósforo soluble. La primera autora agradece al CONACYT por la beca otorgada (224640) para realizar los estudios de Maestría en Ciencias. Este trabajo se llevó a cabo en las instalaciones del INECOL, en el laboratorio Hongos de la Red de Biodiversidad y Sistemática (20030-10138).

concentration of soluble P ($0.32-110 \text{ mg L}^{-1}$) (Thomas *et al.*, 1985; Pandey *et al.*, 2008; Xiao *et al.*, 2009). However, in the culture with iron phosphate there was no correlation between the variables mentioned previously ($r_s = 0.053$, $p > 0.05$), the decrease in pH did not mean an increase of soluble P. The acidity recorded in the culture media and phosphate solubilization depend on several factors, including the solubilizing capacity of the organism, the organic acids produced, the type of phosphated compound, as well as the C and N (Barroso and Nahas, 2005; Pradham and Sukla, 2005; Souchie *et al.*, 2006).

CONCLUSIONS

The efficient solubilizing ability of *Paecilomyces lilacinus* to calcium phosphates and to a lesser extent iron phosphates was tested *in vitro*. This nematophagous fungus used for biological control has the potential to enhance the availability of soil phosphorus in the presence of calcium phosphates. However, it is necessary to conduct experiments under greenhouse and field conditions, to evaluate the solubilization of the phosphate compounds when interact with soil microorganisms.

—End of the English version—



LITERATURA CITADA

- Alam, S., S. Khalil, N. Ayub, and M. Rashid. 2002. *In vitro* solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) from maize rhizosphere. *Int. J. Agr. Biol.* 4: 454-458.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1980. *Official Methods of Analysis*. 13th ed. Washington D. C. pp: 561-562.
- Barroso, C. B., and E. Nahas. 2005. The status of soil fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. *Appl. Soil. Ecol.* 29: 73-83.
- Brand, D., S. Roussos, A. Pandey, P. C. Zilioli, J. Pohly, and C. R. Soccol. 2004. Development of a bionematicide with *Paecilomyces lilacinus* to control *Meloidogyne incognita*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 118: 81-88.
- Carlile, M. J., S. C. Watkinson, and G. W. Gooday. 2001. *The Fungi*. Academic Press, Great Britain. 588 p.
- Chun-Chao, C., K. Yu-Lin, C. Chen-Ching, and C. Wei-Liang. 2007. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. *Biol. Fertil. Soils* 43: 575-584.

- Dighton, J. 2007. Nutrient cycling by saprotrophic fungi in terrestrial habitats. *In*: Kubicek, C. P., and I. S. Druzhinina (eds). *Environmental and Microbial Relationships*. Second edition. The Mycota. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp: 287-300.
- Deubel, A., and W. Merbach. 2005. Influence of microorganisms on phosphorus bioavailability in soils. *In*: Buscot, F., and A. Varma (eds). *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*. Springer-Berlin Heidelberg, New York. pp: 177-191.
- Duponnois, R., M. Kisa, and C. Plenchette. 2006. Phosphate-solubilizing potential of the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 169: 280-282.
- El-Azouni, I. M. 2008. Effect of phosphate solubilizing fungi on growth and nutrient uptake of soybean (*Glycine max* L.) plants. *J. Appl. Sci. Res.* 4: 592-598.
- Garzón, G. G. 1991. *Fundamentos de Química General*. Segunda edición. McGraw-Hill, México. 472 p.
- Goldstein, A. H. 2007. Future trends in research on microbial phosphate solubilization: one hundred years of insolubility. *In*: Velázquez, E., and C. Rodríguez-Barruco (eds). *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*. *Developments in Plant Soil Sciences* 102. Springer, The Netherlands. pp: 91-96.
- Gómez-Guiñán, Y., y M. Zabala. 2001. Determinación de la capacidad solubilizadora del P en hongos aislados de la rizósfera del maní (*Arachis hypogea* L.). *Saber* 13: 8-13.
- Jones, D., B. F. L. Smith, M. J. Wilson, and B. A. Goodman. 1991. Phosphate solubilizing fungi in a Scottish upland soil. *Mycol. Res.* 95: 1090-1093.
- Jonhatan, E. I., R. Arulmozhiyan, S. Muthusamy, and W. W. Manuel. 2000. Field application of *Paecilomyces lilacinus* for the control of *Meloidogyne incognita* on betelvine, Piper betle. *Nematol. Mediterr.* 28: 131-133.
- Khan, A., K. L. Williams, and H. K. M. Nevalainen. 2006. Infection of plant-parasitic nematodes by *Paecilomyces lilacinus* and *Monacrosporium lysipagum*. *BioControl* 51: 659-678.
- Kozlova, O. V., S. Y. Egorov, and F. G. Kupriyanova-Ashina. 2010. The Relationship between cellular and calcium responses of *Aspergillus awamori* to external influences. *Microbiology* 79: 294-299.
- Lavelle, P., and A. V. Spain. 2001. *Soil Ecology*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 654 p.
- Mendoza, A. R., R. A. Sikora, and S. Kiewnick. 2007. Influence of *Paecilomyces lilacinus* strain 251 on the biological control of the burrowing nematode *Radopholus similis* in banana. *Nematotropa* 37: 203-213.
- Mosley, M. J., D. Pitt and J. C. Barnes. 1989. Adenine and pyridine nucleotide levels during calcium-induced conidiation in *Penicillium notatum*. *Antonie van Leeuwenhoek* 56: 191-199.
- Nahas, E. 2007. Phosphate solubilizing microorganism: Effect of carbon, nitrogen and phosphorus sources. *In*: Velázquez, E., and C. Rodríguez-Barruco (eds). *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*. *Developments in Plant and Soil Sciences* 102. Springer, The Netherlands. pp: 111-115.
- Nopparat, C, M. Jatupornpipat, and A. Rittiboon. 2009. Optimization of the phosphate-solubilizing fungus, *Aspergillus japonicus* SA22P3406, in solid-state cultivation by response surface methodology. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 43: 172-181.
- Pandey, A., N. Das, B. Kumar, K. Rinu, and P. Trivedi. 2008. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. isolated from soil samples of Indian Himalayan region. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 97-102.
- Pradhan, N., and L. B. Sukla. 2005. Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. *Afr. J. Biotechnol.* 5: 850-854.
- Reyes, I., L. Bernier, R. R. Simard, and H. Antoun. 1999a. Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28: 281-290.
- Reyes, I., L. Bernier, R. R. Simard, P. Tanguay, and H. Antoun. 1999b. Characteristics of phosphate solubilization by an isolate of a tropical *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28: 291-295.
- Richardson, A. E., J. M. Barea, A. M. McNeill, and C. Prigent-Combaret. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 321: 305-339.
- Samson, R. A. 1974. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. *Studies in Mycology*, 6. Centraalbureau Voor Schimmelcultures Baarn. 119 p.
- Souchie, E. L., R. Azcón, J. M. Barea, O. J. Saggin-Júnior, and E. M. Ribeiro-da Silva. 2006. Phosphate solubilization and synergism between P-solubilizing and arbuscular mycorrhizal fungi. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 41: 1405-1411.
- StatSoft Inc. 2007. *Statistica for Windows v. 8.0*. Data analysis software system. Tulsa, Okalahoma, USA.
- Sundara, R., and M. Sinha. 1963. Organisms phosphate solubilizers in soil. *Indian J. Agr. Sci.* 33: 272-278.
- Shaw, B. D., and H. C. Hoch. 2007. Ions regulate spore attachment, germination, and fungal growth. *In*: R. J. Howard and N. A. R. Gow (eds). *Biology of the Fungal Cell*, 2nd Edition The Mycota VIII Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Tandon, H. L. S., and R. N. Roy. 2004. *Integrated Nutrient Management - A glossary of terms*. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación), Organización para el Desarrollo y Concertación en materia de Fertilizantes, Nueva Delhi. http://www.fao.org/ag/agl/agll/ipns/index_es.jsp?term=p070 (Consultado: agosto, 2009).
- Thomas, G. V., M. V. Shantaram, and N. Saraswathy. 1985. Occurrence and activity of phosphate-solubilizing fungi from coconut plantation soils. *Plant Soil* 87: 357-364.
- Turner, B. L., E. Frossard, and A. Oberson. 2006. Enhancing phosphorus availability in low-fertility soils. *In*: Uphoff, N. (ed). *Biological Approaches to Sustainable Soil Systems*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. pp: 191-205.
- Vera D., F., H. Pérez, y H. Valencia. 2002. Aislamiento de hongos solubilizadores de fosfatos de la rizósfera de arazá (*Eugenia stipitata*, Myrtaceae). *Acta Biol. Colomb.* 7: 33-40.
- Walters, S. A., and K. R. Barker. 1994. Efficacy of *Paecilomyces lilacinus* in suppressing *Rotylenchulus reniformis* on tomato. *Supplement to J. Nematol.* 26: 600-605.

Whitelaw, M. A. 1999. Growth promoting of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *In*: Sparks, D. L. (ed). *Advanced in Agronomy* 69. pp: 99-151.

Xiao, C., R. Chi, H. He, G. Qiu, D. Wang, and W. Zhang. 2009. Isolation of phosphate-solubilizing fungi from phosphate mines and their effect on wheat seedling growth. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 159: 330-342.