

ÁCIDOS ORGÁNICOS PRODUCIDOS POR RIZOBACTERIAS QUE SOLUBILIZAN FOSFATO: UNA REVISIÓN CRÍTICA

Organic Acids Produced by Phosphate Solubilizing Rhizobacteria: A Critical Review

Marianela Paredes-Mendoza^{1‡} y David Espinosa-Victoria¹

RESUMEN

La producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular por las rizobacterias es uno de los mecanismos más ampliamente conocidos de solubilización del fosfato del suelo, que hace al fósforo (P) disponible para la nutrición de las plantas. Dentro del período de 1908-2008 se reportó la capacidad solubilizadora de fosfatos por los ácidos: oxálico, cítrico, butírico, malónico, láctico, succínico, málico, glucónico, acético, glicónico, fumárico, adípico, indolacético y 2-cetoglucónico. Los géneros bacterianos con capacidad de producir ácidos orgánicos que solubilizan fosfato se tienen: *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Aereobacter*, *Flavobacterium*, *Yarrowia*, *Streptosporangium* y *Erwinia*. Los ácidos glucónico y 2-cetoglucónico son los agentes más frecuentemente reportados como solubilizadores de fosfato. La capacidad de los ácidos orgánicos para aumentar la disponibilidad de P, no sólo se debe a la acidificación en la rizósfera de la planta, sino también a su capacidad de formar complejos estables con el Al y Fe. Los ácidos orgánicos incrementan la disponibilidad de micronutrientes, como Fe, Zn y Mn, en el suelo al disminuir el pH en la rizósfera, o por la quelación de estos micronutrientes. De igual manera, los ácidos orgánicos participan en el suelo en fenómenos como la quimiotaxis microbiana y la detoxificación de metales. Sin embargo, su papel en la mayoría de estos procesos sigue siendo desconocida, debido a la falta de datos experimentales que expliquen las reacciones de los ácidos orgánicos en el suelo. El objetivo de esta revisión es analizar el papel que juegan los ácidos orgánicos producidos por las rizobacterias

en la solubilización de fosfato mineral y sus implicaciones en el estatus nutricional del suelo.

Palabras clave: rizósfera, P soluble, bacterias solubilizadoras, ácido 2-cetoglucónico, ácidos alifáticos.

SUMMARY

The production of low molecular weight organic acids by the rhizobacteria is one of the most widely known mechanisms of soil phosphate solubilization, a process that makes phosphorus available for plant nutrition. The phosphate solubilizing capacity of organic acids, such as oxalic, citric, butyric, malonic, lactic, succinic, malic, gluconic, acetic, glyconic, fumaric, adipic, indoleacetic, and 2-ketogluconic acids, was reported during the period 1908-2008. Some bacterial genera that exhibit solubilizing phosphate activity through organic acid production are *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Aereobacter*, *Flavobacterium*, *Yarrowia*, *Streptosporangium*, and *Erwinia*. Gluconic and 2-ketogluconic acids are the acids most frequently reported as phosphate solubilizing agents. The capacity of the organic acids to increase P availability not only results from the acidification of the plant rhizosphere, but also from their capacity to form stable complexes with some metals, such as Al and Fe. Organic acids also increase the availability of other soil micronutrients such as Mn, Al, and Zn when pH decreases in the rhizosphere or by chelation of micronutrients. At the same time, organic acids participate in other soil phenomena, such as microbial chemotaxis and metal detoxification. The objective of this paper is to analyze the role of the organic acids produced by rhizobacteria in the solubilization of mineral phosphate and its implications in the soil nutritional status.

Index words: soluble P, solubilizing bacteria, rhizosphere, low molecular weight acids, 2-ketogluconic acid, aliphatic acids.

¹ Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. 56230 Montecillo, estado de México.

[‡] Autor responsable (marianela@colpos.mx)

Recibido: agosto de 2006. Aceptado: julio de 2009.

Publicado como ensayo en

Terra Latinoamericana 28: 61-70.

INTRODUCCIÓN

El fósforo (P) es un elemento esencial para los organismos, tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos; no obstante, algunos procesos del ciclo del fósforo son desconocidos (Lindsay, 1979; Illmer y Schinner, 1992; Stephen y Jisha, 2009). Después del nitrógeno (N), el P es el segundo nutriente inorgánico necesario para todas las formas de vida. Se trata de un componente esencial de moléculas como RNA, DNA y ATP, así como de los fosfolípidos (Coyne, 2000). El P disponible es absorbido por la planta en forma de H_2PO_4^- en suelos ácidos, y como HPO_4^{2-} en suelos alcalinos. El P disponible en el suelo es fácilmente convertido en complejos insolubles, como fosfatos de Fe, Al o Mn en suelos ácidos y fosfatos de Ca o Mg en suelos alcalinos (Torriani-Gorini, 1994). Debido a lo anterior, el P es uno de los elementos que con mayor frecuencia resulta limitante en los suelos. Los microorganismos están involucrados en procesos que afectan la transformación del P del suelo y son componentes integrales del ciclo del P. Los microorganismos participan en la solubilización del fosfato inorgánico y en la mineralización del fosfato orgánico, así como en su inmovilización (Richardson, 1994). En particular, las bacterias solubilizadoras de fosfato (BSP) solubilizan tanto fosfato orgánico, como inorgánico (Banik y Dey, 1982; Goldstein *et al.*, 2003). El fosfato orgánico es mineralizado por la enzima fosfatasa excretada por algunos microorganismos, produciendo la liberación de éste (Gerretsen, 1948; Kucey *et al.*, 1989). Las bacterias *Bacillus megaterium*, *Bacillus mesentericus* y *Pseudomonas putida* mineralizan las formas orgánicas de P (ortofosfato) (Tarafdar y Claassen, 1988; Das *et al.*, 2003). En general, se acepta que el mecanismo más común de solubilización del fosfato mineral es la acción de ácidos orgánicos sintetizados por las BSP (Goldstein, 1995; Wan y Wong, 2004).

Los ácidos orgánicos son constituyentes normales de la mayoría de los suelos agrícolas. Su papel dentro del suelo no ha sido aún bien definido, pero existen numerosas evidencias que indican sus efectos fisiológicos en el crecimiento de las plantas (Illmer y Shinner, 1995; Scheffer y Schachtschabel, 1998; Igual *et al.*, 2001). Algunos ácidos orgánicos incrementan la disponibilidad de formas insolubles de diferentes nutrimentos de las plantas, en especial el P (Goldstein, 1995). Estos ácidos orgánicos de bajo peso molecular son producidos por microorganismos que se encuentran

en la rizósfera. La concentración de los ácidos orgánicos en la solución del suelo normalmente es baja, variando de 1 a 50 μM (Baziramakenga *et al.*, 1995; Strobel, 2001). La producción de ácidos orgánicos por las BSP ha sido poco estudiada, por lo que se requiere generar más conocimiento sobre este tema.

BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO MINERAL

Durante los últimos 10 años, el conocimiento sobre los microorganismos solubilizadores de fosfato (MSP) ha aumentado significativamente. Entre los MSP se encuentran las bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR (del inglés plant growth promotion rhizobacteria). Estas bacterias son de vida libre en el suelo y son capaces de adaptarse, colonizar y persistir en la rizósfera de la planta y favorecer su crecimiento o desarrollo (Bashan, 1998). Las rizobacterias pueden ser benéficas o antagónicas para la planta (Lemanceau, 1992). Las BSP pertenecen al grupo de las PGPRs y son capaces de solubilizar fosfato inorgánico de diferentes compuestos, como son el fosfato bicálcico, fosfato tricálcico y rocas fosfóricas. Con el término rocas fosfóricas se conoce a los minerales que contienen P como es el caso de las apatitas, incluyendo fluorapatita, cloroapatita e hidroxapatita. Hay grandes depósitos en Rusia, Estados Unidos, África del Norte y China; también existen importantes reservas en Brasil, Perú y México (Sperber 1958a; Hoffland, 1992). Existen 13 géneros de bacterias con la capacidad de solubilizar fosfato: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Mesorhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Erwinia* (Sperber, 1958b; Goldstein, 1986; Rodríguez y Fraga, 1999). Se ha reportado al ácido glucónico como el agente más frecuente de solubilización de fosfato, el cual es producido por *Pseudomonas* sp. (Illmer y Shinner, 1992), *Erwinia herbicola* (Liu *et al.*, 1992), *Pseudomonas cepacia* (Goldstein *et al.*, 1993) y *Burkholderia cepacia* (Rodríguez y Fraga 1999; Lin, *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2008). Otro metabolito solubilizador de fosfato es el ácido 2-cetoglucónico, sintetizado por *Rhizobium leguminosarum* (Halder *et al.*, 1990), *Rhizobium meliloti* (Halder *et al.*, 1990), *Bacillus firmus* (Banik y Dey, 1982) y otras bacterias del suelo aún no identificadas (Richardson, 2001). Algunas cepas de *Bacillus liqueniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens*

producen mezclas de ácidos láctico, isovalérico, isobutírico y acético. Otras BSP que producen ácidos orgánicos son: *Rahnella aquatilis* (Kim *et al.*, 1997), *Pseudomonas lutea* sp. nov. (Peix *et al.*, 2004) y *Pantoea agglomerans* (Lin *et al.*, 2006). El P solubilizado es fácilmente absorbido por las raíces de las plantas y utilizado para su crecimiento y desarrollo.

El uso de los MSP no es nuevo. Sackett *et al.* (1908) reportaron, por primera vez, aspectos relacionados con este tópico. Hasta el momento, se conocen varios ácidos orgánicos producidos por las BSP: oxálico (Kim *et al.*, 1997), cítrico (Cunningham y Kuiack, 1992; Drouillon y Merckx, 2003), malónico (Hwangbo *et al.*, 2003), láctico (Jones *et al.*, 2003), succínico (Banik y Dey, 1983; Kucey, 1989), málico (Stevenson, 1967), glucónico (Goldstein y Liu, 1987), oxalacético (Singh y Amberger, 1998a), acético (Loganathan y Nair, 2004), fórmico (Ahonen-Jonnarth *et al.*, 2000), isovalérico (Vazquez *et al.*, 2000), fumárico (Ohtake *et al.*, 1996), glicólico (Sperber, 1958b), adípico (Hwangbo *et al.*, 2003), indolacético (Bric *et al.*, 1991), 2-cetoglucónico (Moghimi y Tate, 1978), butírico e isobutírico (Rodríguez y Fraga, 1999). Las BSP están históricamente asociadas a la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular (Goldstein, 1986). Liu *et al.* (1992) identificaron las bases genéticas y metabólicas para una solubilización eficiente de fosfato de calcio. Liu *et al.* (1992) proponen que la solubilización es el resultado de la acidificación del espacio periplásmico, debida a la oxidación directa de la glucosa (oxidación no fosfolítica) o de otra aldosa por acción de la quinoproteína glucosa deshidrogenasa (PQQGDH). La glucosa se convierte en ácido glucónico y después de dos oxidaciones sucesivas, en el espacio periplásmico, se convierte en ácido 2-cetoglucónico ó 2,5-dicetoglucónico (Anderson *et al.*, 1985).

En la actualidad, las investigaciones sobre las BSP están dirigidas a conocer las bases bioquímicas y genéticas de la actividad de estas bacterias. Los eventos o hechos importantes que han ocurrido durante el estudio de los ácidos orgánicos producidos por las BSP se enlistan en el Cuadro 1.

Las BSP solubilizan compuestos como el fosfato tricálcico, el fosfato dicálcico, la hidroxipatita y la roca fosfórica. Hay numerosas especies de bacterias solubilizadoras de fosfatos en el suelo y en la rizósfera (Gupta *et al.*, 1994) que incluyen aerobias y anaerobios (Richardson, 2001). Las bacterias que solubilizan fosfatos se encuentran normalmente en la rizósfera. Las

bacterias solubilizan el fosfato inorgánico por medio de la producción de CO₂, ácidos orgánicos, excreción de protones y asimilación de NH₄⁺ (Ohtake *et al.*, 1996). El mecanismo más importante de solubilización de fosfatos de calcio es la acidificación por medio de la biosíntesis y secreción de ácidos orgánicos.

ÁCIDOS ORGÁNICOS QUE SOLUBILIZAN FOSFATO

Los ácidos orgánicos que solubilizan fosfato son de bajo peso molecular y poseen uno o más grupos carboxilo. Dependiendo de las propiedades de disociación y el número de grupos carboxilo, los ácidos orgánicos tienen carga negativa, por lo que pueden formar complejos con cationes metálicos en solución y el desplazamiento de aniones de la solución del suelo (Stevenson, 1967; Sagoe *et al.*, 1998). Los ácidos orgánicos de bajo peso molecular provienen del metabolismo de compuestos de alto peso molecular, como carbohidratos, péptidos y lípidos (Baziramakenga *et al.*, 1995). Éstos juegan un papel determinante en el ciclo biológico de nutrientes, en la agricultura y los ecosistemas forestales. Los ácidos orgánicos o carboxílicos son sustancias polares y son capaces de formar puentes de hidrógeno entre sí y con el agua. La mayoría de los ácidos orgánicos producidos por las BSP son alifáticos, es decir, son ácidos no aromáticos (Figura 1).

El entendimiento de la química y biología de la rizósfera es esencial para la determinación de la movilidad y disponibilidad de los metales en la interfase raíz-suelo. La producción de ácidos orgánicos por las BSP tiene acción directa en la acidificación, quelación, precipitación y las reacciones de óxido-reducción en la rizósfera (Kucey *et al.*, 1989). Son importantes los ácidos orgánicos en la agricultura, por que forman complejos con metales, solubilizan metales y participan en su transporte (Fuentes-Ramírez *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2003). Ácidos como el oxálico, cítrico, láctico, tartárico y 2-cetoglucónico tienen propiedades quelantes y solubilizadoras sobre los metales (Babu-Khan *et al.*, 1995). La acción de los ácidos orgánicos en la solubilización de minerales puede atribuirse a que disminuyen el pH y, más aún, a la formación de complejos estables con Ca²⁺, Mg²⁺, Fe³⁺ y Al³⁺. Reacciones similares ocurren al prevenir la fijación de fosfatos añadidos al suelo como fertilizantes. Se ha demostrado que los ácidos orgánicos reducen la

Cuadro 1. Eventos importantes en el estudio de los ácidos orgánicos producidos por bacterias solubilizadoras de fosfato (BSP) de la rizósfera.

Evento	Significado	Referencia
Aislamientos bacterianos que presentaban solubilización de roca fosfórica visible (36 de 50).	Primer reporte de las BSP publicado en una revista científica.	Sacket <i>et al.</i> (1908)
Caracterización de ácidos orgánicos producidos por BSP aisladas del suelo.	Primera demostración de que la solubilización de fosfato por bacterias se debía a la producción extracelular de ácidos orgánicos.	Sperber (1958b)
El ácido 2-cetoglucónico, como un agente importante en la solubilización del fosfato mineral del suelo.	Primera evidencia de que la ruta de oxidación directa producía el ácido 2-cetoglucónico. Se aportan las primeras bases sobre el entendimiento de las rutas metabólicas de las BSP.	Duff y Webley (1963)
Las BSP en el rizóplano del trigo presentan oxidación de glucosa más activa que las bacterias del suelo.	Se enfatiza la importancia de las rutas de oxidación directa en las BSP.	Katznelson y Bose (1959)
El ácido 2-cetoglucónico exhibe mayor capacidad solubilizadora que otros compuestos relacionados con la rizósfera.	Nuevamente, se remarca la importancia de las rutas de oxidación directa en las BSP.	Moghimi y Tate (1978)
Modificación genética de una cepa de <i>E. coli</i> capaz de disolver hidroxiapatita debido a la clonación y expresión del gen <i>MSP</i> de <i>Erwinia herbicola</i> .	Primera BSP transgénica, modificada mediante la técnica del DNA recombinante.	Goldstein y Liu (1987)
La secuenciación del gen <i>MSP</i> de <i>Erwinia herbicola</i> sugiere que la enzima codificada está involucrada en la síntesis de la enzima quinona pirroloquinolina sintetasa (PQQ).	Primera demostración de que la ruta de oxidación directa es la que proporciona la capacidad solubilizadora de las bacterias Gram negativas.	Liu <i>et al.</i> (1992)
La acidificación artificial del medio de cultivo con HCl, no produce una considerable solubilización de fosfato, en contraste con la actividad de dos aislamientos microbianos.	Demostración de que los ácidos orgánicos producidos por bacterias tienen mayor capacidad solubilizadora de fosfatos que el HCl.	Illmer y Schimer (1992)
La producción de ácidos orgánicos es el mecanismo más importante de solubilización de fosfato, pero necesita de otros como la excreción de protones acompañada de la asimilación de NH_4^+ .	Nuevas aportaciones para entender los mecanismos de solubilización del fosfato.	Illmer <i>et al.</i> (1995)
Primer congreso sobre microorganismos solubilizadores de fosfato.	Intercambio de experiencias entre científicos.	Velázquez y Rodríguez-Barrueco (2007)
Las células de <i>Yarrowia lipolytica</i> encapsuladas producen más ácido cítrico que las no encapsuladas.	Aplicación en la tecnología de inóculos para mayor producción de ácido orgánico.	Vassileva <i>et al.</i> (2000)
Aislamientos de bacterias endófitas y epífitas que producen ácido indolacético.	Aislamiento de microorganismos que solubilizan fosfato y fijan nitrógeno	Conn y Franco (2004)
Los protones del ácido glucónico son los que producen la solubilización de fosfato tricálcico por <i>Burkholderia cepacia</i> CC-A174.	Entendimiento del mecanismo de acción del ácido glucónico en la solubilización de fosfato.	Lin <i>et al.</i> (2006)
Aislamiento de <i>Xanthomonas campestris</i> , una bacteria solubilizadora de fosfato tolerante a suelos salinos y alcalinos debido a que produce xantano y ácidos orgánicos.	Uso de una bacteria en la industria alimenticia y como biofertilizante.	Sharan <i>et al.</i> (2008)
Los posibles mecanismos de solubilización de fosfato por <i>Pseudomonas fluorescens</i> RAF15 son: la excreción de protones por asimilación de NH_4^+ y la producción de ácidos orgánicos.	Entendimiento de los mecanismos de solubilización de fosfato por bacterias promotoras del crecimiento vegetal.	Park <i>et al.</i> (2009)

precipitación de fosfato por el hierro y el aluminio (Stevenson, 1967; Moghimi y Tate, 1978; Illmer *et al.*, 1995).

En estudios con ácidos alifáticos, los ácidos tricarbónicos (ácido cítrico) forman quelatos más estables que los ácidos dibásicos (málico y tartárico),

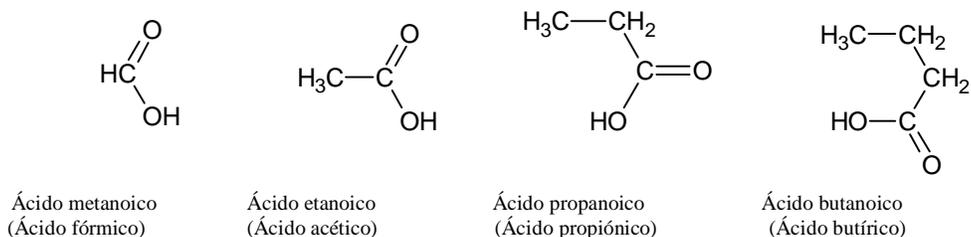


Figura 1. Ácidos orgánicos alifáticos producidos por bacterias solubilizadoras de fosfato.

pero menos estables son aún los quelatos conocidos como α -hidroxi monobásicos. Algunos ácidos dibásicos alifáticos derivados de alcoholes forman complejos más fuertes y los compuestos α -hidroxi son más efectivos que los derivados β -hidroxi para la quelación del calcio.

Struthers y Sieling (1959) observaron que la efectividad de los ácidos orgánicos para prevenir la precipitación de fosfatos por el hierro y el aluminio se incrementa progresivamente con el número de grupos hidroxilo, debido a la formación de complejos más estables con el Fe y Al, y por lo tanto más efectivos. Los derivados hidroxi se consideran más efectivos en el ataque al fosfato férrico que sus similares no substituidos (Figura 2). El ácido que produce la mayoría de bacterias es el ácido láctico. Los hidroxiácidos se consideran mejores para disolver la apatita que los ácidos volátiles, debido a que forman quelatos con el calcio (Gyaneshwar *et al.*, 1998).

Mecanismo de Acción

La solubilización del fosfato por los ácidos orgánicos depende del pH y la mineralogía del suelo. Existen dos mecanismos para que esto ocurra. El primero es un intercambio del ácido, por ejemplo, los H^+ provenientes

del citrato se intercambian por el P ligado a la superficie de los cristales de $Al(OH)_3$ o $Fe(OH)_3$, reduciéndolos y liberando al P (Andrews, 1990; Halder *et al.*, 1990). El segundo mecanismo depende de la concentración de los ácidos orgánicos producidos por las BSP, el cual involucra la formación de complejos con iones de metales provenientes de la roca fosfórica (Singh y Amberger, 1998b). Sin embargo, la enorme cantidad de rutas metabólicas generadoras de ácidos por las bacterias, han hecho imposible el desarrollo de un conocimiento unificado sobre la microbiología de la solubilización del fosfato. Lo anterior no ha ocurrido en el estudio de fijación de N_2 , donde todas las rutas deben converger a alguna variación del sistema de la nitrogenasa (Beever y Burns, 1980; Ohtake *et al.*, 1996). Illmer y Schinner (1995) sugieren que los ácidos orgánicos producidos por las BSP no son determinantes para la solubilización y el único factor determinante para la solubilización de P es la concentración de H^+ originados que se producen de la respiración o asimilación de NH_4^+ .

El gran número de rizobacterias Gram negativas aisladas que solubilizan fosfato usan la glucosa como fuente de carbono (Goldstein *et al.*, 2003). Al usar este criterio, entonces las bacterias que posean la ruta de la oxidación directa de la glucosa tienen la habilidad

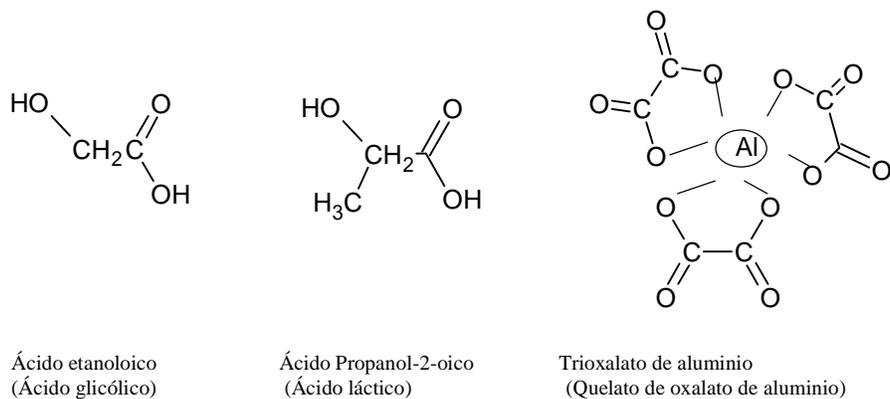


Figura 2. Hidroxiácidos producidos por bacterias solubilizadores de fosfato.

de disolver los fosfatos. Estas bacterias se han designado como fenotipo MSP⁺. Las bacterias de MSP⁺ pueden disolver los fosfatos muy insolubles, como la roca fosfórica (fluoroapatita), debido al pH sumamente bajo de los productos de oxidación de la glucosa: los ácidos glucónico y 2-cetoglucónico (pH de ~3.4 y ~2.6, respectivamente). Además, desde que estos ácidos se producen en el espacio periplásmico, los protones son eficazmente liberados en el medio extracelular de la rizósfera. Las especies de MSP⁺ superiores no sólo tienen los genes de la oxidación directa, sino que también expresan la ruta metabólica a un nivel alto para que haya una correlación directa entre la producción de ácidos y la disolución de fosfatos. También es de interés notar que bajas concentraciones de P pueden inducir la ruta de oxidación directa en algunas especies. Babu-Kan *et al.* (1995) sugiere que existe una relación entre las BSP Gram negativas muy eficaces y la expresión de la ruta de la oxidación directa de glucosa.

La oxidación directa es una de las cuatro rutas metabólicas para la utilización de glucosa por

las bacterias. Para muchas especies bacterianas, la ruta de oxidación directa es el mecanismo primario para la utilización de aldosas. La primera oxidación se cataliza por la quinoproteína glucosa deshidrogenasa, así llamada porque pertenece al grupo de enzimas bacterianas que utilizan el cofactor quinónico PQQ (2,7,9-tricarboxil-1H-pirrolo[2,3-f]quinolina-4,5-diona). La PQQGDH transfiere dos electrones directamente de las aldosas a la ubiquinona en la membrana plasmática, ocurren dos oxidaciones que generan protones y que están mediadas por el cofactor PQQ. La oxidación directa de glucosa al ácido glucónico genera un protón transmembranal que puede usarse para la bioenergética y funciones de transporte de la membrana, mientras el protón del ácido glucónico está disponible para la solubilización de fosfatos. Las bacterias que producen ácido 2-cetoglucónico, normalmente llevan a cabo la segunda oxidación del ácido glucónico periplásmico a 2-cetoglucónico (Liu *et al.*, 1992).

La fisiología de solubilización de fosfato no se ha estudiado completamente. Algunos trabajos indican

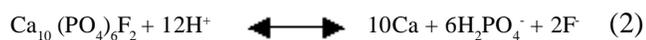
Cuadro 2. Ácidos orgánicos y sus rutas biosintéticas en bacterias solubilizadoras de fosfato (BSP).

Ácido	Fórmula	Ruta biosintética	Bacteria que lo produce	Referencia
Acético	CH ₃ CO ₂ H	Oxidación incompleta de azúcares (fermentación acética)	<i>Acetobacter aceti</i> , <i>Gluconobacter oxydans</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Singh y Amberger (1998a)
Láctico	CH ₃ CHOHCO ₂ H	(Glicólisis) Fermentación láctica primaria	<i>Bacillus liqueniformis</i> y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Bano y Musarrat (2003)
Oxálico	HO ₂ CCO ₂ H	Ácidos tricarbóxicos	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Singh y Amberger (1998a)
Cítrico	HO ₂ CCH ₂ COHCO ₂ HCHO ₂ CO ₂ H	Ácidos tricarbóxicos	<i>Erwinia herbicola</i> y <i>Yarowia lipolytica</i>	Goldstein (1995); Vassileva et al. (2000)
Butírico	CH ₃ (CH ₂) ₂ CO ₂ H	Oxidación anaerobia del piruvato	<i>Bacillus liqueniformis</i> y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Wan y Wong (2004)
Succínico	HO ₂ CCH ₂ CH ₂ CO ₂ H	Ciclo del glioxilato y ácidos tricarbóxicos	<i>Pseudomonas putida</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Liu <i>et al.</i> (1992)
Málico	HO ₂ CCHOHCH ₂ CO ₂ H	Ácidos tricarbóxicos	<i>Bacillus megaterium</i>	Singh y Amberger (1998b)
Glucónico	HO ₂ C(CHOH) ₄ CH ₂ OH	Oxidación directa de la glucosa	<i>Erwinia herbicola</i> , <i>Pseudomonas cepacia</i> y <i>Burkholderia cepacia</i>	Goldstein y Liu (1987)
Fumárico	HO ₂ CCOCH ₂ CO ₂ H	Ácidos tricarbóxicos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Harrison <i>et al.</i> (1972)
2-Cetoglucónico	HO ₂ CO(CHOH) ₄ CH ₂ OH	Oxidación directa de la glucosa	<i>Rhizobium leguminosarum</i> , <i>Rhizobium meliloti</i> y <i>Bacillus firmus</i>	Anderson <i>et al.</i> (1985)

que ciertos elementos minerales juegan un papel en este proceso. Es necesaria una concentración de K crítica (concentración mínima necesaria) para la solubilización óptima, mientras que la concentración de Mg y Na parecen ser importantes en algunos hongos (Beever y Burns, 1980), pero no en *Pseudomonas* (Illmer y Shinner, 1992). Los microorganismos pueden relacionarse entre sí, dando lugar, en muchos casos, a interacciones sinérgicas que favorecen la nutrición de la planta e incrementan su producción. Un ejemplo de este sinergismo lo constituye la interacción entre las micorrizas y los microorganismos solubilizadores de fosfato (Toro *et al.*, 1997). Los fosfatos de calcio son disueltos por la acidificación, por consiguiente, cualquier bacteria que acidifica muestra algún nivel de actividad de MSP (Cuadro 2). En la mayoría de los suelos, las reacciones de sustitución del protón se manejan para la producción microbiana de ácidos orgánicos:



No hay ninguna estequiometría en la Ecuación 1, debido a la complejidad química del fosfato de calcio y a que los ácidos orgánicos que intervienen en el suelo difieren en su número de protones disociables (Goldstein *et al.*, 1993). La aplicación de roca fosfórica al suelo, como fuente de P, requiere de un ambiente apropiado que facilite el proceso de disolución de la misma. Éste se ha descrito para la fluorapatita (Andrew, 1990), de acuerdo con la ecuación:



Se han adjudicado a los ácidos orgánicos muchas funciones en el suelo, incluso la adquisición de nutrientes por la raíz, la solubilización mineral, quimiotaxis microbiana y la detoxificación de metales (Jones *et al.*, 2003). Sin embargo, su papel en la mayoría de estos procesos sigue siendo desconocido, debido a la falta de evidencias experimentales que expliquen las reacciones de los ácidos orgánicos en el suelo (Singh y Amberger, 1998b; Jones *et al.*, 2003).

AVANCES

Goldstein y Liu (1987) identificaron y clonaron el gen *HB101* (pMCG8) de *Erwinia herbicola*, el cual

está involucrado en la biosíntesis del cofactor quinona de pirrolo-quinolina presente en un gran número de deshidrogenasas bacterianas que oxidan alcoholes, aldehídos y azúcares. Este gen se expresa en *E. coli*, la cual es capaz de sintetizar la enzima glucosa deshidrogenada (GDH), pero no al cofactor PQQ, esencial para la formación de la haloenzima. Con la inserción del gen *HB101* (pMCG8) en *E. coli* ésta produce ácido glucónico mediante la haloenzima PQQGDH. La acumulación de ácido glucónico favorece la disolución de minerales, como la hidroxiapatita. Posteriormente, Rodríguez *et al.* (2001) realizaron trabajos similares. Por otro lado, se han obtenido mutantes de *Pseudomonas fatiga*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas corrugata* tolerantes al frío, sin perder su capacidad solubilizadora (Wasaki *et al.*, 2003; Katiyar y Goel, 2003; Trivedi y Sat, 2008), con la finalidad de que el inóculo bacteriano sea funcional bajo temperaturas extremas. También, se han empleado bacterias inmovilizadas, ya que se ha reportado que estos sistemas producen una mayor cantidad de ácidos orgánicos y, por lo tanto, una solubilización de fosfato más eficiente (Vassileva *et al.*, 2000; Rekha *et al.*, 2007).

CONCLUSIONES

- En años recientes se ha optado por la búsqueda de fertilizantes de alta calidad, cuya producción y uso sean ecológicamente amigables con el ambiente. En este sentido, la bioconversión y consecuente disponibilidad del fosfato de las rocas fosfóricas se han convertido en área de investigación promisorias.
- El principio básico de la transformación biotecnológica de los fosfatos naturales reside en la producción bacteriana de ácidos orgánicos, principalmente cítrico, oxálico, glucónico y 2-cetoglucónico que los disuelven, dejándolos disponibles para la absorción por las plantas.
- No obstante, se requiere de investigaciones adicionales con la finalidad de entender de forma más clara los mecanismos de solubilización del fosfato mineral, los factores que intervienen en este proceso y la función de estos ácidos en el ciclo del fósforo en el suelo.
- Este conocimiento dará las pautas para optimizar el uso de las bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSPs), así como de los ácidos orgánicos que éstas sintetizan, con lo que se contribuirá a la cultura del uso de fertilizantes de origen natural.

LITERATURA CITADA

- Ahonen-Jonnarth, U., P. A. W. van Hees, U. S. Lundström, and R. D. Finlay. 2000. Production of organic acids by mycorrhizal and non-mycorrhizal *Pinus sylvestris* L. seedlings exposed to elevated concentrations of aluminium and heavy metals. *New Phytol.* 146: 557-567.
- Anderson, S., C. B. Marks, R. Lazarus, J. Miller, K. Stafford, S. Seymour, D. Light, W. Rastetter, and D. Estell. 1985. Production of 2-keto-L-gluconate, an intermediate in L-ascorbate synthesis, by a genetically modified *Erwinia herbicola*. *Science* 230: 144-149.
- Andrews, G. F. 1990. Large-scale bioprocessing of solids. *Biotechnol. Prog.* 6: 225-230.
- Babu-Khan, S., T. C. Yeo, W. L. Martin, M. R. Duron, R. D. Rogers, and A.H. Goldstein. 1995. Cloning of a mineral phosphate solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 972-978.
- Banik, S. and B. K. Dey. 1982. Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing microorganisms. *Plant Soil* 69: 353-364.
- Banik, S. and B. K. Dey. 1983. Alluvial soil microorganisms capable of utilising insoluble aluminium phosphate as a sole source of phosphorus. *Z. Allg. Mikrobiol.* 138: 437-442.
- Bano, N. and J. Musarrat. 2003. Isolation and characterization of phosphate degrading soil bacteria of environmental and agronomic significance. *Lett. Appl. Microbiol.* 36: 349-353.
- Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol. Adv.* 16: 729-770.
- Baziramakenga, R., R. R. Simard, and G. D. Leroux. 1995. Determination of organic acids in soil extracts by ion chromatography. *Soil Biol. Biochem.* 27: 349-356.
- Beever, R. E. and D. J. Burns. 1980. Phosphorus uptake, storage and utilization by fungi. *Adv. Bot. Res.* 8: 127-219.
- Bric, J. M., R. M. Bostock, and S. E. Silverstone. 1991. Rapid *in situ* assay for indolacetic production by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 535-538.
- Conn, V. M. and C. M. Franco. 2004. Analysis of the endophytic actinobacterial population in the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) by terminal restriction fragment length polymorphism and sequencing of 16S rRNA clones. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1787-1794.
- Coyne, M. 2000. *Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio*. Paraninfo D. L. Madrid, España.
- Cunningham, J. E. and C. Kuiack. 1992. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilajii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1451-1458.
- Das, K., V. Katiyar, and R. Goel. 2003. 'P' solubilization potential of plant growth promoting *Pseudomonas* mutants at low temperature. *Microbiol. Res.* 158: 359-362.
- Drouillon, M. and R. Merckx. 2003. The role of citric acid as a phosphorus mobilization mechanism in highly P-fixing soils. *Gayana Bot.* 60: 55-62.
- Duff, R. B., D. M. Webley, and R. O. Scott. 1963. Solubilization of minerals and related materials by 2-ketogluconic acid-producing bacteria. *Soil Sci.* 95: 105-114.
- Fuentes-Ramírez, L. E., J. Caballero-Mellado, J. Sepúlveda y E. Martínez-Romero. 1999. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29: 117-128.
- Gerretsen, F. C. 1948. The influence of microorganisms on the phosphate intake by the plant. *Plant Soil* 1: 51-81.
- Goldstein, A. H. 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. *Am. J. Altern. Agric.* 1: 51-57.
- Goldstein, A. H. 1995. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by gram negative bacteria. *Biol. Agric. Hortic.* 12: 185-193.
- Goldstein, A. H. and S. T. Liu. 1987. Molecular cloning and regulation of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola*. *Biotechnology* 5: 72-74.
- Goldstein, A. H., R. D. Rogers, and G. Mead. 1993. Separating phosphate from via bioprocessing. *Biotechnology* 11: 1250-1254.
- Goldstein, A., T. Lester, and J. Brown. 2003. Research on the metabolic engineering of the direct oxidation pathway for extraction of phosphate from ore has generated preliminary evidence for PQQ biosynthesis in *Escherichia coli* as well as a possible role for the highly conserved region of quinoprotein dehydrogenases. *Biochim. Biophys. Acta Proteins and Proteomics* 1647: 266-271.
- Gupta, A. R., A. Singal, R. Sankar, M. Chander, and R. S. Kumar. 1994. A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 40: 255-260.
- Gyaneshwar, P., G. N. Kumar, and L. J. Parekh. 1998. Effect of buffering on the phosphate-solubilizing ability of microorganisms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 669-673.
- Halder, A. K., A. K. Mishra, P. Bhattacharya, and P. K. Chakrabarty. 1990. Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 36: 81-92.
- Harrison, M. J., R. E. Pacha, and R. Y. Morita. 1972. Solubilization of inorganic phosphates by bacteria isolated from upper Klamath Lake sediment. *Limnol. Oceanogr.* 17: 50-57.
- Hoffland, E. 1992. Quantitative evaluation of the role of organic acid exudation in the mobilization of rock phosphate by rape. *Plant Soil* 140: 279-289.
- Hwangbo, H., R. D. Park, Y. W. Kim, Y. S. Rim, K. H. Park, T. H. Kim, J. S. Suh, and K. Y. Kim. 2003. 2-Ketogluconic acid production and phosphate solubilization by *Enterobacter intermedium*. *Curr. Microbiol.* 47: 87-92.
- Igual, J. M., A. Valverde, E. Cervantes, and E. Velazquez. 2001. Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. *Agronomía* 21: 561-568.
- Illmer, P. and F. Schinner. 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. *Soil Biol. Biochem.* 24: 389-395.
- Illmer, P. and F. Schinner. 1995. Solubilization of inorganic calcium phosphates solubilization mechanisms. *Soil Biol. Biochem.* 27: 257-263.
- Illmer, P., A. Barbato, and F. Schinner. 1995. Solubilization of hardly-soluble $AlPO_4$ with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* 27: 265-270.
- Jones, D. L., P. G. Dennis, A. G. Owen, and P. A. W. van Hess. 2003. Organic acid behavior in soils-misconceptions and knowledge gaps. *Plant Soil* 248: 31-41.
- Katiyar, V. and R. Goel. 2003. Solubilization of inorganic phosphate and plant growth promotion by cold tolerant mutants of *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiol. Res.* 158: 163-168.

- Katznelson, H. and B. Bose. 1959. Metabolic activity and phosphate-dissolving capability of bacterial isolates from wheat roots, rhizosphere, and non-rhizosphere soil. *Can. J. Microbiol.* 5: 79-85.
- Kim, K. Y., D. Jordan, and H. B. Krishnan. 1997. *Rahnella aquatilis*, a bacterium isolated from soybean rhizosphere, can solubilize hydroxyapatite. *FEMS Microbiol. Lett.* 153: 273-277.
- Kucey, R. M. N., H. H. Janzen, and M. E. Leggett. 1989. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. *Adv. Agron.* 42: 199-228.
- Lemanceau, P. 1992. Effets benefiques de rhizobacteries sur les plantes: exemple des *Pseudomonas* spp. fluorescent. *Agronomie* 12: 413-437.
- Lin, T. F., H. I. Huang, F. T. Shen, C. C. Young. 2006. The protons of gluconic acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate by *Burkholderia cepacia* CC A174. *Bioresour. Technol.* 97: 957-960.
- Lindsay, W. L. 1979. *Chemical equilibrium in soil*. John Wiley. New York, NY, USA.
- Liu, T. S., L. Y. Lee, C. Y. Tai, C. H. Hung, Y. S. Chang, J. H. Wolfram, R. Rogers, and A. H. Goldstein. 1992. Cloning of an *Erwinia herbicola* gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli* HB101: nucleotide sequence and probable involvement in biosynthesis of the coenzyme pyrroloquinoline quinone. *J. Bacteriol.* 174: 5814-5819.
- Loganathan, P. and S. Nair. 2004. *Swaminathania salitolerans* gen. nov., sp. nov., a salt-tolerant, nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacterium from wild rice (*Porteresia coarctata* Tateoka). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1185-1190.
- Moghimi, A. and E. Tate. 1978. Does 2-ketogluconic chelate calcium in the pH range 2.4 to 6.4? *Soil Biol. Biochem.* 10: 289-292.
- Ohtake, H., H. Wu, K. Imazu, Y. Anbe, J. Kato, and A. Kuroda. 1996. Bacterial phosphonate degradation, phosphite oxidation and polyphosphate accumulation. *Resour. Conserv. Recy.* 18: 125-134.
- Park, K. H., C. Y. Lee, and H. J. Son. 2009. Mechanism of insoluble phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF15 isolated from ginseng rhizosphere and its plant growth-promoting activities. *Lett. Appl. Microbiol.* 49: 222-228.
- Peix, A., R. Rivas, I. Santa-Regina, P. F. Mateos, E. Martínez-Molina, C. Rodríguez-Barrueco, and E. Velázquez. 2004. *Pseudomonas lutea* sp. nov., a novel phosphate-solubilizing bacterium isolated from the rhizosphere of grasses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 847-850.
- Rekha, P. D., W. A. Lai, A. B. Arun, and C. C. Young. 2007. Effect of free and encapsulated *Pseudomonas putida* CC-FR2-4 and *Bacillus subtilis* CC-pg104 on plant growth under gnotobiotic conditions. *Bioresour. Technol.* 98: 447-451.
- Richardson, A. E. 1994. Soil microorganisms and phosphorus availability. pp. 50-62. *In*: C. E. Pankhurst, B. M. Doube, W. S. R. Gupta, and P. R. Grace (eds). *Soil biota: management in sustainable farming systems*. Commonwealth Scientific Institute Research Organization. Melbourne, Australia.
- Richardson, A. E. 2001. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Austr. J. Plant Physiol.* 28: 897-906.
- Rodríguez, H. and R. Fraga. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* 17: 319-339.
- Rodríguez, H., T. Gonzalez, and G. Selman. 2001. Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. *J. Biotechnol.* 84: 155-161.
- Sackett, W. G., A. J. Patter, and C. W. Brown. 1908. The solvent action of soil bacteria upon the insoluble phosphates of raw bone meal and natural raw rock phosphates. *Zbl. Bacteriol* 28: 228.
- Sagoe, C. I., T. Ando, K. Kouno, and T. Nagaoka. 1998. Effects of organic-acid treatment of phosphate rocks on the phosphorus availability to Italian ryegrass. *Soil Sci. Plant Nutr.* 43: 1067-1072.
- Scheffer, F. und P. Schachtschabel. 1998. *Lehrbuch der Bodenkunde*. Enke. Stuttgart, Germany.
- Sharan, A., Shikha, Darmwal N. S. and Gaur S. 2008. *Xanthomonas campestris*, a novel stress tolerant, phosphate-solubilizing bacterial strain from saline-alkali soils. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 753-759.
- Singh, C. P. and A. Amberger. 1998a. Organic acids and phosphorus solubilization in straw composted with rock phosphate. *Bioresour. Technol.* 63: 13-16.
- Singh, C. P. and A. Amberger. 1998b. Solubilization of rock phosphate by humic and fulvic acids extracted from straw compost. *Agrochimica* 41: 221-228.
- Song, O. R., S. J. Lee, Y. S. Lee, S. C. Lee, K. K. Kim, and Y. L. Choi. 2008. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soil. *Braz. J. Microbiol.* 39: 151-156.
- Sperber, J. I. 1958a. Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. *Austr. J. Agric. Res.* 9: 782-787.
- Sperber, J. I. 1958b. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Austr. J. Agric. Res.* 9: 778-781.
- Stephen, J. and M. S. Jisha. 2009. Buffering reduces phosphate solubilizing ability of selected strains of bacteria. *World J. Agric. Sci.* 5: 135-137.
- Stevenson, F. J. 1967. Organic acids in soil. pp. 119-146. *In*: A. D. McLaren and G. H. Peterson. (eds). *Soil biochemistry*. Marcel Dekker. New York, NY, USA.
- Strobel, B. W. 2001. Influence of vegetation on low-molecular-weight carboxylic acids in soil solution: A review. *Geoderma* 99: 169-198.
- Struthers, P. H. and D. H. Sieling. 1959. Effects of organic anions on phosphate precipitation by iron and aluminum as influenced by pH. *Soil Sci.* 69: 205-213.
- Tarafdar, J. C. and N. Claassen. 1988. Organic phosphorus compounds as a phosphorus source for higher plants through the activity of phosphatases produced by plant roots and microorganisms. *Biol. Fertil. Soils* 5: 308-312.
- Toro, M., R. Azcon, and J. M. Barea. 1997. Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate-solubilizing rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability (³²P) and nutrient cycling. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4408-4412.
- Torriani-Gorini, A. 1994. Regulation of phosphate metabolism and transport. pp. 1-4. *In*: A. Torriani-Gorini, E. Yagil, and S. Silver (eds). *Phosphate in microorganisms: Cellular and Molecular Biology*. ASM Press. Washington, DC, USA.
- Trivedi, P. and T. Sat. 2008. *Pseudomonas corrugata* (NRRL B-30409) mutants increased phosphate solubilization, organic acid production, and plant growth at lower temperatures. *Curr. Microbiol.* 56: 140-144.

- Vassileva, M., R. Azcon, J. Barea, and N. Vassilev. 2000. Rock phosphate solubilization by free and encapsulated cells of *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochem.* 35: 693-697.
- Vazquez, P., G. Holguin, M. E. Puente, A. Lopez-Cortes, and Y. Bashan. 2000. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biol. Fertil. Soils* 30: 460-468.
- Velázquez, E. and C. Rodríguez-Barrueco. 2007. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. *Plant Soil* 287: 1-84.
- Wan, J. H. C. and M. H. Wong. 2004. Effects of earthworm activity and P-solubilizing bacteria on P availability in soil. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 167: 209-213.
- Wasaki, J., T. Yamamura, T. Shinano, and M. Osaki. 2003. Secreted acid phosphatase is expressed in cluster roots of lupin in response to phosphorus deficiency. *Plant Soil* 248: 129-136.