

## **Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica**

**Gloria María Restrepo-Franco<sup>1</sup>, Sandra Marulanda-Moreno<sup>1</sup>, Yeised de la Fe-Pérez<sup>2</sup>, Acela Díaz-de la Osa<sup>2</sup>, Vera Lucia-Baldani<sup>3</sup>, Annia Hernández-Rodríguez<sup>2\*</sup>.**

<sup>1</sup>Instituto de Investigación en Microbiología y Biotecnología Agroindustrial, Grupo de Investigaciones Biológicas de la Universidad Católica de Manizales, Caldas, Colombia. <sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Calle 25 # 455 e/ J e I, Vedado, La Habana, Cuba. <sup>3</sup>Laboratorio de Gramíneas. EMBRAPA Agrobiología. Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil. annia@fbio.uh.cu, anniahernandez@yahoo.es

Recibido: 2 de mayo de 2014.

Aceptado: 13 de octubre de 2014.

Palabras clave: Solubilización de fosfato, Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal, *Pseudomonas*, *Bacillus*  
Keywords: Phosphate solubilization, Plant growth Promoting Bacteria, *Pseudomonas*, *Bacillus*.

**RESUMEN.** La mayoría de los suelos tropicales y subtropicales son deficientes en fósforo biodisponible, por lo que el empleo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, principalmente las solubilizadoras de fosfato, pueden reducir el uso de fertilizantes químicos. El objetivo de este trabajo es ofrecer una panorámica actual acerca de los principales géneros y mecanismos de acción de las bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF), así como analizar su posible empleo en cultivos de importancia económica. La utilización de géneros bacterianos con mayores potencialidades de uso como *Pseudomonas* y *Bacillus* unido a aislados promisorios de *Azospirillum* y *Herbaspirillum* en cultivos como arroz y café permitiría reducir a largo plazo el uso de productos químicos en la agricultura, así como desarrollar estrategias agronómicas que preserven el medio ambiente. El éxito de estos inoculantes bacterianos depende de la selección de cepas autóctonas eficientes por tipo de suelo, su capacidad de colonizar la rizosfera y de mantener la actividad biológica.

**ABSTRACT.** Most tropical and subtropical soils are deficient in P bioavailable, so the use of plant growth promoting bacteria, mainly phosphate solubilizing, can reduce the use of chemical fertilizers. The aim of this paper is to provide a current overview about the representative genus and mechanisms of action of phosphate solubilizing bacteria (BSF), and to study the potential of isolated promise in economically important crops. The use of bacterial genera with the greatest potential for use as *Pseudomonas* and *Bacillus* joined isolates promising *Azospirillum* and *Herbaspirillum* in crops such as rice and coffee would reduce long-term use of chemicals in agriculture and develop agronomic strategies that preserve the environment. The success of these bacterial inoculants depends on the selection of efficient strains native soil type, its ability to colonize the rhizosphere and maintain biological activity.

## INTRODUCCIÓN

El fósforo (P) es un macronutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de todos los seres vivos, al formar parte de la composición de las moléculas orgánicas esenciales para la vida. Las mayores reservas en el suelo son las rocas y los depósitos como las apatitas primarias y otros minerales formados durante otras eras geológicas<sup>1</sup> que se encuentran formando parte de un estrato rocoso cuya principal característica es la insolubilidad. La disponibilidad de P para las plantas está relacionada con su concentración en la disolución de suelo.<sup>2</sup> La mayoría de los suelos tropicales y subtropicales son deficientes en P biodisponible por lo que éste elemento debe ingresarse al agroecosistema como fertilizante. Sin embargo, este no es un recurso renovable y las reservas mundiales se agotan rápidamente. Se estima que las reservas actuales de P disminuirán a la mitad entre los años 2040 y 2060, lo que, unido al hecho de que los precios de los fertilizantes fosfóricos se incrementan constantemente, hace necesaria la búsqueda de estrategias sostenibles de fertilización.<sup>3</sup>

Bajo condiciones deficientes de P, las plantas aumentan el crecimiento de las raíces o los pelos radicales o su densidad, con el objetivo de lograr la exploración de una mayor superficie y volumen de suelo<sup>4</sup>. Tanto las plantas como los microorganismos pueden incrementar la solubilidad del P inorgánico (Pi) pobremente soluble a través de la liberación de protones, iones OH<sup>-</sup> o CO<sub>2</sub> y aniones de ácidos orgánicos como citrato, malato y oxalato<sup>5</sup> y pueden mineralizar el P orgánico (Po) por la liberación de varias enzimas fosfatasa.<sup>6</sup>

Muchos microorganismos del suelo tienen la capacidad de transformar el P insoluble en formas asimilables para las plantas, con lo que contribuye a su disponibilidad en el suelo, entre ellos se destacan las bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF) que constituyen una excelente alternativa para reducir la cantidad de fertilizantes aplicados a diferentes cultivos<sup>7</sup>. Estas bacterias solubilizan tanto el Po, como el Pi<sup>8</sup> e incluyen una amplia cantidad y diversidad de géneros. Sin embargo, se requieren estudios que profundicen en los que tienen mayor potencial de empleo para realizar procesos de solubilización y en sus mecanismos de acción.

Este trabajo tuvo como objetivo ofrecer una panorámica actual acerca de los principales géneros y mecanismos de acción de las BSF, así como analizar su posible empleo en cultivos de importancia económica.

## DESARROLLO

### Generalidades de la disponibilidad de P en el suelo

Más del 90 % del P total en el sistema suelo-planta-animal está en los suelos y menos del 10 % en el resto de los sistemas biológicos. Su contenido en los suelos se presenta en un intervalo de 200 a 5000 mg . kg<sup>-1</sup>, con un promedio de 600 mg kg<sup>-1</sup>. En las rocas primarias y en los suelos jóvenes, el P se encuentra unido principalmente a calcio y magnesio<sup>9</sup> con una solubilidad típica cercana a 0.5 mg L<sup>-1</sup>. Las mayores reservas en el suelo son las rocas y los depósitos minerales, como los de apatita, hidroxapatitas y las oxiapatitas cuya principal característica es la insolubilidad.<sup>10</sup>

El desgaste gradual de los minerales primarios da lugar a minerales secundarios a través de procesos de fijación y precipitación, que dependen altamente del pH y el tipo de suelo. En suelos ácidos, el P es fijado por óxidos e hidróxidos libres de hierro y aluminio, mientras que en los alcalinos es fijado por calcio<sup>11</sup>. El fosfato mineral puede encontrarse también asociado a la superficie hidratada de óxidos de hierro, aluminio y manganeso que son pobremente solubles y no asimilables. Esta es una característica de los suelos ferralíticos en los que la hidratación y acumulación de estos óxidos provoca un aumento de la inmovilización del P.<sup>12</sup> En otros tipos de suelos, por ejemplo, los de serpentina, con elevadas concentraciones de metales pesados como níquel, cromo y cobalto, el contenido de P es muy bajo.<sup>13</sup>

En términos de fuentes de nutrientes para las plantas en el suelo se distinguen tres formas principales de P: i) Pi en disolución (Psol), ii) Po y iii) Pi asociado a partículas minerales; de las

cuales, el Psol, principalmente en forma de ortofosfato, es el considerado disponible para las plantas.<sup>14</sup> La concentración del Psol está determinada por los procesos de mineralización e inmovilización del Po, además, por el equilibrio entre los procesos de adsorción-desorción y precipitación-disolución del Pi.

La adsorción es la formación de enlaces químicos entre el P y las superficies minerales y la desorción es la liberación del P de estas mismas superficies hacia la disolución del suelo.<sup>15</sup> Las superficies cargadas positivamente de las arcillas, de los minerales de hierro ( $\text{Fe}^{3+}$ ), aluminio ( $\text{Al}^{3+}$ ) y calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), atraen los iones ortofosfato de la disolución, que se adsorben a grupos funcionales superficiales, intercambiándose con grupos hidronio e hidróxido.

Las reacciones de adsorción del P en suelos ácidos son bifásicas, caracterizadas por una rápida reacción inicial, seguida por una reacción mucho más lenta. Diversos estudios han demostrado que la retención de P en el suelo es marcadamente dependiente de sus propiedades fisicoquímicas, por ejemplo, de los contenidos de óxidos amorfos y cristalinos de  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Al}^{3+}$ , y de los de materia orgánica, arcillas y  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>15</sup> Las reacciones de precipitación son controladas, a su vez, por la solubilidad de los minerales secundarios del P (fosfatos de aluminio (Al-P), de hierro (Fe-P) y de calcio (Ca-P)). La solubilidad del mineral representa las concentraciones de sus iones constituyentes que pueden mantenerse en solución bajo condiciones de equilibrio. Cuando la concentración del Psol es mayor que la soportada por la solubilidad química del mineral, el Psol se precipita con los cationes metálicos (Al, Ca, Fe) y forma minerales de P y cuando el Psol es menor, los minerales de P se disuelven en la disolución. Bajo condiciones de pH comunes en los suelos, la solubilidad de los precipitados metálicos del P sigue el orden siguiente:  $\text{Ca-P} > \text{Al-P} > \text{Fe-P}$ .<sup>16</sup>

En el suelo, el Pi forma parte de los minerales primarios (apatita:  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2$ ; siendo  $\text{X}_2 = \text{F}^-$ ,  $\text{OH}^-$  o  $\text{Cl}^-$ ) y de los minerales secundarios (formados por precipitación del P con Al, Ca y Fe), se presenta además como: i) P adsorbido sobre las superficies de los minerales de arcilla; ii) oxihidróxidos de Fe y Al (Fe-P y Al-P); iii) carbonatos de Ca (Ca-P), y iv) P físicamente ocluido dentro de los minerales secundarios. Como parte de estos últimos, los Ca-P [ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ] dominan en suelos neutrales y alcalinos, mientras los Fe-P (strengita:  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) y Al-P (Variscita:  $\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) predominan en los suelos ácidos.<sup>13</sup>

Los suelos agrícolas contienen grandes cantidades de P, pero en formas no asimilables por las plantas. Se calcula que el 70 % del Pi proveniente de la aplicación de productos agroquímicos se convierte rápidamente en complejos insolubles, tales como fosfato de calcio, de aluminio e ión fosfato.<sup>16</sup> Estos fosfatos insolubles solo pueden ser llevados a formas solubles por la acción microbiana.

Las formas iónicas del Pi son dependientes del pH. A un pH que oscila entre 4,0 y 6,0, la mayor del Pi está presente como ión  $\text{H}_2\text{PO}_4^{4-}$ , que puede ser absorbido por las plantas debido a su solubilidad en agua. A pH entre 6,5 y 7,5, el Pi en la solución del suelo está presente principalmente como  $\text{H}_2\text{PO}_4^{4-}$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$ , esta última forma también puede ser absorbida por las raíces de las plantas, pero en menor proporción que la primera. A pH entre 8,0 y 10,0, el ión  $\text{HPO}_4^{2-}$  es dominante. A  $\text{pH} > 10,0$ , la forma iónica dominante es el  $\text{PO}_4^{3-}$ , y solo el fosfato de sodio es disponible para las plantas. En el otro extremo, a valores de pH inferiores a 3,0, el P está presente como  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , una forma química extremadamente reactiva, por lo que en suelos muy ácidos, la fijación o reversión del fosfato es bastante rápida.<sup>14</sup>

La materia orgánica que constituye hasta el 50 % del suelo es un importante reservorio de P inmovilizado. Tres grupos de compuestos forman la reserva de Po en el suelo: los inositolfosfatos (ésteres de inositolfosfato), los ácidos nucleicos y los fosfolípidos. Debido a su gran estabilidad, el inositol fosfato (también denominado ácido fítico o fitato), almacena más del 50% del Po, mientras que el contenido de fosfolípidos comprende entre 0.5 y 7 % del Po total.

Los ácidos nucleicos, que se originan a partir de la descomposición de microorganismos, animales y restos vegetales constituyen la fracción más pequeña (< 3 % del Po total). El contenido de Po depende de varios factores: clima, vegetación, textura, prácticas de fertilización, riegos y drenaje y uso del suelo. El tiempo de residencia media del Po en el suelo se ha estimado entre 350 y 2000 años<sup>17</sup>. El proceso de liberación del Po a Pi se conoce como mineralización y en el suelo tres grupos de enzimas participan en esta transformación.<sup>18</sup> i) Las Fosfatasa ácidas no específicas, que llevan a cabo la desfosforilación de los enlaces fosfoéster o fosfoanhidro de la materia orgánica. ii) Las fitasas, actúan específicamente provocando la liberación de fósforo del ácido fítico. iii) Las fosfonatasas y carbono-fósforo liasas que pueden romper las uniones carbono-fósforo presentes en los organofosforados. La principal actividad enzimática corresponde a las fosfatasa ácidas y a las fitasas, debido a la presencia en el suelo de los sustratos sobre los que actúan de forma predominante.<sup>18</sup>

Se han señalado incrementos en la biodisponibilidad de P en el suelo cuando existen aumentos paralelos en la actividad microbiana.<sup>19</sup> Los mecanismos involucrados en la solubilización-mineralización microbiana de las diferentes formas de fosfato insoluble incluyen procesos de acidificación, quelación, reacciones de intercambio, producción de ácidos y acción enzimática<sup>11,20</sup> en los que se destacan las BSF por su eficiencia en este proceso.

### **Bacterias solubilizadoras de fósforo: bases para su selección**

Diferentes autores demostraron que los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Mesorhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pantoea* y *Erwinia* tienen la capacidad de solubilizar fosfato.<sup>11, 21-24</sup> Estudios recientes desarrollados por Estrada *et al.*<sup>19</sup> y Hernández-Rodríguez *et al.*<sup>25</sup> permitieron incluir también al género *Herbaspirillum* dentro de este grupo funcional. Estos autores seleccionaron cepas autóctonas de *Herbaspirillum* asociadas al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.) en diferentes localidades edafoclimáticas de Brasil y Cuba, demostrando sus potencialidades en la solubilización de fosfato en condiciones de laboratorios, macetas y campo. En la literatura, numerosos trabajos informan el aislamiento de especies bacterianas autóctonas como potenciales solubilizadoras de fósforo, demostrando sus capacidades en experimentos *in vitro* a través de la determinación del índice de solubilización (IS)<sup>26</sup> y del P soluble (Tabla 1).

La efectividad de las bacterias solubilizadoras de fósforo depende de la capacidad de los aislados para colonizar la rizosfera y mantener su actividad biológica. El adecuado desempeño de las bacterias solubilizadoras de fosfato, está influenciado por factores tales como el pH, la salinidad y la temperatura.<sup>23, 24,27</sup> En este contexto, es muy importante realizar una adecuada selección de las cepas de BSF para lograr productos eficientes cuando sean aplicados en campo.

### **Bases para la selección de BSP**

Para el aislamiento y selección de BSP, se han informado en la literatura diferentes medios de cultivos que incluyen en su composición variadas fuentes de P, tanto de origen orgánico como inorgánico. Uno de los más antiguos es el Pikovskaya (PVK) (27) o medio Sperber<sup>28</sup> el que presenta en su composición  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  y se utiliza para aislar BSF a partir de muestras de suelo, raíces y rizosfera. En 1992, se diseñó un nuevo medio de cultivo<sup>29</sup> con igual fuente de Pi y finalmente, en 1999, se formuló el medio NBRIP,<sup>30</sup> que ha sido uno de los más usados por su eficiencia para seleccionar microorganismos con alta capacidad para solubilizar fuentes de Pi.

**Tabla 1.** Bacterias solubilizadoras de P aisladas de diferentes cultivos de importancia económica.

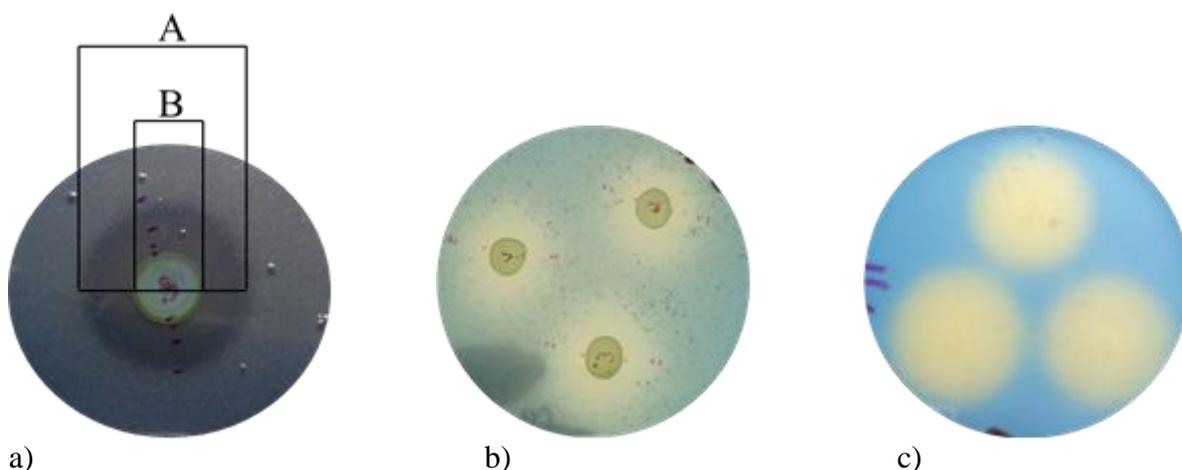
Cultivo de Procedencia	Bacteria	Índice de solubilización de fosfato (NBRIP- pH 7.0)	Cuantificación de P soluble en medio NBRIP líquido (mg P L <sup>-1</sup> )	Referencia	
<i>Oryza sativa</i> L	<i>Pseudomonas putida</i> AI05	2,41	nd	Este trabajo	
	<i>Pseudomonas putida</i> AJ13	2,14	nd		
	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5	2.61	239.0		
	<i>Burkholderia vietnamienses</i> AR1125	<i>Burkholderia vietnamienses</i> AR1125	2.88	226.0	19
		<i>Burkholderia kururiensis</i> AR2236	2.30	206.0	
		<i>Herbaspirillum seropedicae</i> H18	nd	17.0	
		<i>Herbaspirillum sp.</i> ZA15	nd	15.8	
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	<i>Enterobacter sp.</i> TVL1	5.0	189.5	20	
	<i>Enterobacter sp.</i> TVL2	4.26	192.5		
	<i>Pseudomonas putida</i> PSO14	4.32	144.0		
<i>Brassica campestris</i> L.	<i>Pseudomonas poae</i> CPBE 37	2.33	301.3	21	
	<i>Pseudomonas poae</i> CPBE 42	1.78	299.0		
	<i>Pseudomonas poae</i> CPBE 43	2.83	440.9		
	<i>Pseudomonas trivalis</i> CPBE 31	4.33	247.9		
	<i>Pseudomonas trivalis</i> CPBE 40	1.11	276.9		
	<i>Pseudomonas trivalis</i> CPBE 44	1.63	282.1		
	<i>Rhizobium radiobacter</i> CPBE 30	2.33	326.4		
<i>Saccharum officinarum</i> L.	<i>Pantoea sp.</i> 9C	6.00		22	
	<i>Brevibacillus borstelensis</i> B65	nd	308.0		
Plantas ornamentales	<i>Bacillus cereus</i> B3	nd	259.0	23	
	<i>Bacillus thioeparans</i> B53	nd	428.0		
	<i>Paenibacillus rhizosphaerae</i> B89	nd	252.0		
	<i>Paenibacillus lautus</i> B9 6	nd	312.0		
	<i>Bacillus subtilis</i> SR/ B-16	nd	170.0		
<i>Coffea arabica</i> L.	<i>Herbaspirillum sp.</i> C4	4.70	nd	Este trabajo	
	<i>Herbaspirillum sp.</i> C8	6.37	nd		
	<i>Herbaspirillum sp.</i> C9	4.64	nd		
	<i>Azospirillum sp.</i> C7	3.04	nd		

nd – No determinado.

Bashan *et al.*<sup>10</sup> plantearon una hipótesis para el aislamiento y selección de bacterias solubilizadoras de fosfatos que promueven el crecimiento de las plantas, en la que señalan que: i) el fosfato tricálcico (PTC) como factor universal para el aislamiento y evaluación de BSF, no es un buen selector, ya que existen discordancias cuando se seleccionan bacterias usando este compuesto y se inoculan plantas; ii) Se debería reemplazar el uso de solo PTC por una combinación de dos o tres compuestos metal-P, como factor inicial de selección; iii) La selección de candidatos metal-P para potenciales BSF dependerá del tipo de suelo (alcalino, ácido o rico en materia orgánica) donde las BSF serán usadas, se sugiere la adición de compuestos Ca-P (incluyendo roca fosfórica) para suelos alcalinos, compuestos Fe-P y Al-P para suelos ácidos, y fitatos para suelos ricos en Po; iv) la producción de un halo en agar sólido no debería ser considerada la única prueba para la solubilización de fósforo y cuando las colonias crecen sin un halo después de varios repiques en el medio, debería llevarse a cabo una prueba adicional en medio líquido para medir la disolución de P; v) en los pocos aislados bacterianos que sean obtenidos después de esta rigurosa selección, debe ser determinada la producción abundante de

ácidos orgánicos y ser probados en una planta modelo mediante la determinación parámetros nutricionales relacionados con la asimilación de P en las plantas como la última prueba para determinar su potencial solubilización de fosfato.

Teniendo en cuenta estos preceptos, para la selección preliminar de bacterias solubilizadoras de fosfatos, en este trabajo, se recomienda utilizar medio NBRIP suplementado con diferentes fuentes de P, tanto inorgánicas como orgánicas ( $\text{AlPO}_4$ ,  $\text{FePO}_4$ , hidroxiapatita, ácido fítico o fitato de sodio), en correspondencia con el tipo de suelo donde éstas se pretendan aplicar como inoculante microbiano. Para comparar la capacidad de solubilización de diferentes aislados bacterianos y determinar si presuntamente será buen solubilizador, se debe determinar el IS<sup>26</sup>. En la Universidad Católica de Manizales se empleó el medio NBRIP con verde de bromocresol, suplementado individualmente con  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  y  $\text{AlPO}_4$ . En este estudio, en las placas de  $\text{AlPO}_4$  no se evidenció formación de halo de solubilización, solo se apreció un halo de viraje de color del medio que indica la producción de ácidos orgánicos por la bacteria seleccionada, (Figura 1) por tanto, en esta prueba se informó el índice de producción de ácido, en lugar del de solubilización de fosfato



**Fig 1.** Selección de bacterias solubilizadoras de fósforo en medio NBRIP. a) Esquema que muestra medición del diámetro de la colonia (B) y del halo de solubilización (A). Índice de solubilización =  $A/B$ <sup>26</sup>. b) *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5 en medio NBRIP con fosfato tricálcico. Se muestra el halo de solubilización alrededor de la colonia (zona transparente). c) *Serratia marcescens* T146 en medio NBRIP con fosfato de aluminio, se aprecia un halo con viraje de color del medio alrededor de la colonia, atribuido a la producción de ácidos orgánicos por la bacteria en estudio.

Además de esta prueba, es importante realizar los ensayos en medios líquidos para estudiar la dinámica de la solubilización de fosfatos por las bacterias a través de la medición del fósforo liberado en un caldo de cultivo que ha sido previamente suplementado con una cantidad conocida de una fuente única de fosfato insoluble. De este modo, se puede estimar la tasa de solubilización de P por sustracción de la concentración final de P de la cantidad teórica inicial de P suplementado, respecto al control no inoculado.<sup>10,11</sup> Sin embargo, se debe tener en cuenta que las bacterias incorporan parte del P disuelto a partir de los compuestos insolubles durante el crecimiento celular, y que este queda retenido en el interior de las células, por lo que esta fracción no es tenida en cuenta en el momento de la determinación de P soluble. Con el objetivo de vencer esta limitación, Yu *et al.*<sup>31</sup>, emplearon el método de fosfomolibdeno azul<sup>32</sup> para la medición de P

solubilizado en el sobrenadante de cultivos en medio líquido y adicionalmente, emplearon las células presentes en el sedimento para determinar los compuestos residuales de este elemento.

### Principales mecanismos bacterianos de solubilización

Las bacterias transforman los fosfatos insolubles a formas solubles por la acción de diferentes mecanismos directos o indirectos. Entre ellos se destacan: i) la acción de ácidos orgánicos producidos por microorganismos<sup>32</sup> ii) quelación de los elementos responsables de la insolubilidad de los fosfatos presentes<sup>33</sup> y iii) asimilación directa de fosfatos insolubles por microorganismos que lo acumulan en sus células y los liberan posteriormente.<sup>34</sup> Un resumen de los principales procesos involucrados en la solubilización de fosfatos por bacterias se muestra en la (Tabla 2)

**Tabla 2.** Principales procesos microbianos involucrados en la solubilización de fosfatos

Tipo de proceso	Principal causa de disolución mineral	Principal reacción que lleva a la disolución mineral	Aplicabilidad a fosfatos minerales	Referencias
Acidificación del medio	Liberación de protones (H <sup>+</sup> ) o producción de ácidos inorgánicos fácilmente dissociables	Disminución del pH del medio, formación de hidrofosfatos de mayor solubilidad	Fosfatos de Ca <sup>2+</sup>	11,35
Formación de complejos metálicos	Liberación de ácidos orgánicos o complejos (quelantes)	Formación de complejos metálicos (incluyendo quelatos en el caso de ácidos di- tricarboxílicos o hidrocarboxílicos)	Fosfatos de Ca, Al <sup>3+</sup> y Fe <sup>3+</sup>	33,36,37
Reducción de metales	Actividad redox de bacterias o sus exudados (metabolitos secundarios)	Reducción de metales con estados de oxidación variable (ligados a fosfatos) a un bajo estado de oxidación (resultando en un fosfato más soluble)	Fe <sup>3+</sup> fosfato	38,39
Disolución de fosfatos mediada por enzimas	Liberación extracelular de enzimas específicas (Fosfatasas)	Hidrólisis enzimática de ésteres de fosfato orgánicos pobremente solubles liberando fosfatos inorgánicos	Varios ésteres de fosfatos orgánicos (fitatos, fosfolípidos)	18,40,41
Disolución indirecta de fosfatos	Estimulación microbiana de exudación de ácidos orgánicos a la planta	El mismo mecanismo para el tipo 2 (formación de complejos metálicos) pero liberados por la interacción planta-microorganismo	Fosfatos de Ca <sup>2+</sup> , Al <sup>3+</sup> y Fe <sup>3+</sup>	37

En los últimos años, se ha avanzado en la comprensión de los procesos bioquímicos involucrados en la solubilización de Pi mediada por ácidos orgánicos. En las bacterias, la reacción de oxidación de la glucosa a ácido glucónico ocurre por acción de la enzima extracelular glucosa deshidrogenasa (GDH, E.C. 1.1.99.17), la que requiere de la pirroloquinolina quinina (PQQ) como coenzima. El ácido glucónico resultante puede a su vez ser oxidado hasta 2-cetogluconato por la actividad catalítica de la enzima ácido glucónico deshidrogenasa (GADH). El paso final de oxidación a ácido 2,5-dicetogluconico es mediado por la 2-cetogluconato deshidrogenasa

(KGDH). Las tres enzimas están localizadas en la membrana celular y son inducidas por elevadas concentraciones de glucosa ( $> 15$  mM).<sup>42,43</sup>

Patel *et al.* (44) aislaron de la rizosfera de *Saccharum officinarum* L. (caña de azúcar), una cepa de *Citrobacter* sp., con la capacidad de crecer en medio suplementado con sacarosa o fructosa y roca fosfórica como únicas fuentes de carbono (C) y P, respectivamente. El análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) de los caldos libres de células demostró que cuando la bacteria creció en medio de cultivo que contenían sacarosa o fructosa, se produjo ácido acético y que cuando creció sobre fructosa se produjo un bajo nivel de ácido pirúvico. Estos resultados indican que la solubilización de P mediada por ácidos orgánicos de origen bacteriano, está directamente relacionada con la fuente de carbono empleada por el microorganismo solubilizador. Sin embargo, otros experimentos *in situ* deben ser realizados para corroborar esta hipótesis.

Algunas bacterias también pueden solubilizar fosfatos insolubles sin producir ácidos orgánicos. En estos casos, se ha propuesto que el mecanismo principal responsable de la solubilización es la producción de protones durante la asimilación del  $\text{NH}_4^+$ , o a través de las actividades respiratorias.<sup>45</sup>

Se ha planteado que existe correlación entre la cantidad de P solubilizado y la producción de exopolisacáridos por los aislados. Yi *et al.*<sup>46</sup> demostraron que la producción de estos compuestos por los aislados *Enterobacter* sp. EnHy-401, *Arthrobacter* sp. ArHy-505 y *Azotobacter* sp. AzHy-510, confería a los microorganismos mayor capacidad de solubilización de fosfatos insolubles en relación con la cepa *Enterobacter* sp. EnHy-402, que no produce exopolisacáridos. Entre las primeras cepas, EnHy-401 produjo la mayor solubilización, lo que se correspondió con una mayor producción de exopolisacáridos. Sin embargo, es importante destacar que los exopolisacáridos por sí solos no solubilizan fosfatos a partir de FTC, sino que actúan de forma sinérgica con la producción de ácidos orgánicos. El grado de sinergismo es dependiente del origen del exopolisacárido y de su concentración.<sup>46</sup> Otros mecanismos que se han propuesto como responsables de la solubilización de fosfatos insolubles son la producción de ácidos inorgánicos como el ácido nítrico y el ácido sulfúrico, la producción de sustancias quelantes y la acción enzimática.<sup>18</sup>

Las fosfatasas ácidas no específicas producidas por las bacterias (fosfohidrolasas) están formadas por tres familias moleculares, que han sido designadas como clases moleculares A, B y C. Debido a su localización celular, se plantea que estas enzimas actúan como secuestradores de fosfoésteres, con lo que abastecen a la célula de nutrientes esenciales y liberando Pi a partir de nucleótidos y azúcares en fosforilados.<sup>18</sup>

En relación con las fitasas, estas pueden dividirse en dos grupos con base en el sitio de iniciación de la hidrólisis del fosfato sobre el anillo de inositol. Las fitasas microbianas, frecuentemente escinden el grupo fosfato en el carbono C1 o C3 del anillo de inositol, y son llamadas 3-fitasas. La mayoría de las fitasas pertenecen a la familia de las fosfatasas ácidas de histidina. Este grupo de enzimas catalizan la hidrólisis del ácido fítico a mono, di, tri, tetra y penta-fosfatos de myo-inositol y Pi.<sup>47</sup> Se debe destacar que la capacidad de las plantas para obtener el P directamente a partir del fitato es muy limitada, a pesar de que el ácido fítico es el mayor componente de las formas orgánicas del P en el suelo.

### **Bases genéticas de la solubilización de P por bacterias**

Goldstein y Liu,<sup>48</sup> fueron los primeros en clonar un gen involucrado en la solubilización del Pi a partir de la bacteria Gram negativa *Erwinia herbicola*. La expresión de este gen permitió la producción de ácido glucónico en *Escherichia coli* HB101 y le confirió la capacidad para solubilizar hidroxapatita. *E. coli* puede sintetizar GDH, pero no PQQ, de tal manera que en condiciones naturales no produce ácido glucónico.

Algunas bacterias Gram negativas, no poseen los genes *pqq* que les confieran la capacidad de solubilización de fosfatos. Vikram *et al.*<sup>49</sup> produjeron transconjugantes en *Azospirillum* sp.,

usando el constructo pMCG 898. Este plásmido artificial contiene los genes *pqq* necesarios para la biosíntesis del cofactor PQQ, responsable del ensamblaje de la holoenzima glucosa-deshidrogenasa. Al contrario de la cepa nativa, los transconjugantes mostraron actividad solubilizadora de fosfatos *in vitro*, cuando se utilizó fosfato dicálcico y PTC como fuente de P en el medio de cultivo. Los transconjugantes conservaron intacta su capacidad de fijación de Nitrógeno, al mismo nivel que la cepa nativa, lo que demuestra que esta actividad no fue afectada. Se han aislado y caracterizado varios genes que codifican para fosfatasa ácida provenientes de bacterias Gram negativas. Algunos de ellos codifican para enzimas que funcionan adecuadamente en el suelo, por ejemplo, el gen *acpA* aislado de *Francisella tularensis*, codifica para una fosfatasa ácida con acción óptima a pH 6.0 y con un amplio rango de especificidad de sustrato.<sup>50</sup> Otros genes analizados, codifican para las fosfatasas ácidas no específicas PhoC y PhoA en *Morganella morganii*. Estas enzimas no son sujetas a represión por el P y en consecuencia, presentan una amplia acción de sustrato y una gran actividad a pH 6.0 y 30 °C.<sup>18</sup>

Rodríguez *et al.* (51), aislaron un gen de *Burkholderia cepacia* que se relaciona con la actividad fosfatasa. Este codifica para una proteína exterior de la membrana que amplifica la síntesis en ausencia de fosfatos insolubles en el medio y podría estar involucrado en el transporte de P dentro de la célula. También se han clonado los genes *napD* y *napE* que codifican para dos fosfatasas ácidas no específicas periplásmicas de *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*.<sup>18</sup>

Desde el punto de vista genético, la producción de fitasas en bacterias es inducible y su expresión es regulada de manera compleja, sin embargo, su control es diferente para grupos bacterianos distintos.<sup>52</sup>

En bacterias, se han clonado genes de fitasas (*phy*) térmicamente estables a partir de *Bacillus* sp. DS11 y *B. subtilis* VVT E-68013. Los genes de las fitasas / fosfatasas ácidas de *E. coli* (*appA* y *appA2*) también han sido aislados y caracterizados. La naturaleza bifuncional de estas últimas enzimas las hacen atractivas para la solubilización del P en el suelo;<sup>18</sup> además, genes de fitasas que actúan a pH neutros también han sido clonados de *B. subtilis* y *B. licheniformis*.

A pesar de que la solubilización de fosfato por BSF ha sido bien estudiada, y muestra resultados promisorios para algunos cultivos, aun son limitados los estudios relacionados con las bases moleculares de los mecanismos de acción involucrados en este proceso.

### **Beneficios de la aplicación de las BSF en cultivos de importancia económica**

El potencial de empleo de las bacterias solubilizadoras de fósforo como alternativa a la fertilización tradicional, ha sido demostrada por varios autores.<sup>19,21,53</sup> Su aplicación como inoculantes a las semillas o al suelo, puede tener un efecto positivo sobre la disponibilidad de P para los cultivos, siempre que en el suelo existan fuentes disponibles de Pi y Po, a partir de las cuales ocurra la liberación de este nutriente.

Múltiples ejemplos demuestran los beneficios de la aplicación de las BSF en cultivos de importancia económica. Por ejemplo, Estrada *et al.*<sup>19</sup> inocularon plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) con las bacterias diazotróficas *Herbaspirillum seropedicae* (H18, ZA15 y ZAE 94), *Burkholderia vietnamiensis* (AR114), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5) y *Azotobacter chroococcum* (Ac1) y promovieron la eficiencia en la toma de P en un 47 %, en comparación con las plantas fertilizadas con FTC. Sanchez *et al.*<sup>53</sup> inocularon plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) con las cepas *Pseudomonas putida* PSO14 y *Enterobacter* sp. TVL-2, en condiciones de invernadero, alcanzando incrementos en los rendimientos entre el 17 % y 49 %, con relación al testigo químico. Leungvutiviroj *et al.*<sup>54</sup> encontraron efectos similares sobre el crecimiento de plantas de maíz (*Zea mays* L.) y col común (*Brassica oleracea* L.) al aplicar una cepa solubilizadora de fosfatos de *Burkholderia unamae* en mezcla con *Bacillus subtilis*, *Azotobacter tropicalis*, y la cepa productora de auxinas KJB9, con incrementos en el peso seco de 4.14 a 8.76 g planta<sup>-1</sup> en el caso de maíz y de 11.1 a 40.8 g planta<sup>-1</sup> en col común. Asimismo,

Oliveira *et al.*<sup>55</sup> demostraron que las bacterias *Bacillus* sp. B17 y *Burkholderia* sp. B5, asociadas a maíz, solubilizan P en medio con FTC y movilizan entre el 58.5 % y 67 % del P total. Caballero-Mellado *et al.*<sup>56</sup> informaron que cepas diazotróficas de *Burkholderia*, aisladas de la rizósfera y el rizoplaneo de tomate, tenían la capacidad de solubilizar fósforo mineral en ensayos *in vitro* y señalaron a la producción de ácidos orgánicos como el mecanismo responsable de esta actividad. En el caso de *B. tropica*, estos investigadores señalaron que la producción de ácidos orgánicos no era el único mecanismo involucrado en la solubilización de P. Por otro lado, Bonilla (57), desarrolló alternativas de fertilización en especies forrajeras mediante cepas de *Burkholderia cepacia* solubilizadoras de fosfatos, con impactos en el tiempo de germinación de las semillas e incrementos en la producción de materia seca de plantas de igua (*Pseudosamanea guachapele* (Kunth) Harms), trupillo (*Prosopis juliflora* (SW) D.C) y acacia (*Caesalpinia peltophoroides* Benth).

En aras de avanzar en el desarrollo de alternativas de biofertilización, en Cuba se han realizado trabajos de aislamiento y selección de BSF asociadas de diferentes cultivos de importancia económica. Sin embargo, el empleo de inoculantes bacterianos basados en de estas cepas en la agricultura aún es limitado. Se cuenta con un producto comercial FOSFORINA<sup>®</sup>, basado en *Pseudomonas* para incrementar la disponibilidad de fósforo en el suelo y la promoción del crecimiento vegetal.<sup>58</sup>

En Colombia existe una extensa tradición en la selección y uso de BSF y diversos cultivos han sido impactados con esta tecnología.<sup>59</sup> Por su parte, el Laboratorio de Microbiología Agroindustrial de la Universidad Católica de Manizales cuenta con cepas de BSF de las especies *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Serratia marcescens* y *Pantoea dispersa* con elevados niveles de eficiencia en la solubilización (187-254 mg P · L<sup>-1</sup>).

Brasil, es pionero en la aplicación de inoculantes bacterianos en la agricultura con importantes ahorros monetarios por disminuir o suprimir la aplicación de fertilizantes de síntesis química.<sup>59</sup> Actualmente, cuentan con un inoculante comercial, Masterfix gramínea, basado en *Azospirillum*, recomendado para los cultivos de maíz y trigo (*Triticum aestivum* L.), y con cepas solubilizadoras de fosfato de los géneros *Herbaspirillum* y *Burkholderia* eficientes en la toma de nutrientes en el cultivo del arroz.<sup>19</sup>

La integración de estos resultados y las investigaciones desarrolladas por otros autores, demuestran que los géneros microbianos que con mayor frecuencia intervienen en el proceso de solubilización de fosfato son: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Enterobacter* y *Azospirillum*. *Pseudomonas* se destaca por presentar amplia versatilidad genética y por utilizar varios mecanismos de solubilización, entre ellos, la producción de ácidos orgánicos y elevados niveles de enzimas fosfatasas. El clima, el tipo de suelo y el manejo del cultivo tienen gran influencia en la cantidad de bacterias con capacidad solubilizadora de fosfato y en sus potenciales de uso. Esto refuerza la necesidad de trabajar con cepas autóctonas procedentes de los ecosistemas en estudio, de forma tal que se obtengan resultados consistentes cuando son aplicadas en condiciones de campo.

## CONCLUSIONES

Los suelos agrícolas contienen grandes cantidades de fosfatos insolubles que solo pueden convertirse en formas asimilables para las plantas mediante la acción microbiana. Las bacterias solubilizadoras de fosfato mejoran la disponibilidad de este nutriente en el suelo y desempeñan un papel fundamental en la nutrición de las plantas. Los géneros bacterianos con mayores potencialidades de uso son *Pseudomonas* y *Bacillus*. Sus principales mecanismos de acción incluyen la producción de ácidos orgánicos, la quelación de los elementos responsables de la insolubilidad de los fosfatos presentes y asimilación directa de fosfatos insolubles, lo que está relacionado con la fuente de P disponible. La elaboración de inoculantes a partir de estas bacterias

permitiría reducir a largo plazo el uso de productos químicos en la agricultura, así como desarrollar estrategias agronómicas que preserven el medio ambiente.

### AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por el Proyecto CAPES/MES 110/11 «Aplicación de bacterias diazotróficas promotoras del crecimiento vegetal en la producción sustentable del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.)».

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Odum EP, BarreT GW. Fundamentals of Ecology. 5ta ed Belmont, CA: 2005.
2. Kauwenbergh, SJV. World phosphate rock reserves and resources. International Fertilizer Development Center (IFDC), Alabama, USA, 2010.
3. Lambers H, Shane MW, Cramer MD, Pearse SJ, Veneklaas EJ. Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits. *Annals Bot.* 2006; 98: 693-713.
4. Gahoonia TS, Nielsen NE, Joshi PA, Jahoor A. A root hairless barley mutant for elucidating genetics of root hairs and phosphorus uptake. *Plant Soil.* 2001;235: 211-9.
5. Jones DL. Organic acids in the rhizosphere - a critical review. *Plant Soil.* 1998;205: 25-44.
6. Zhang H, Huang Y, YE X, XU F. Analysis of the contribution of acid phosphatase to P efficiency in *Brassica napus* under low phosphorus conditions. *Science China - Life Sciences* 2010;53: 709-17.
7. Kaur G, Reddy MS. Influence of P-solubilizing bacteria on crop yield and soil fertility at multilocal sites. *European Journal of Soil Biology.* 2014;61: 35-40.
8. Park KH, Lee OM, Jung HI, Jeong JH, Jeon YD, Hwang DY, Lee, CY, Son HJ. Rapid solubilization of insoluble phosphate by a novel environmental stress-tolerant *Burkholderia vietnamiensis* M6 isolated from ginseng rhizospheric soil. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 2010;86: 947-955.
9. Tiessen H. Phosphorus in the global environment. In: White PJ, Hammond JP, editors. *The ecophysiology of plant-phosphorus interactions* Springer; 2008. p.1-7.
10. Bashan Y, Kamnev AA, De-Bashan LE. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biol Fert Soils.* 2013;49: 465-79.
11. Rodríguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances.* 1999;17: 319-39.
12. Ohtake H, Wu h, Imazu K, Ambe Y, Kato J, Kuroda A. Bacterial phosphonate degradation, phosphite oxidation and polyphosphate accumulation. *A Res Conserv Recycling.* 1996;18 :125-34.
13. Rajkumar M, Narasimha M, Vara PF, Noriharu A. Biotechnological applications of serpentine soil bacteria for phytoremediation of trace metals. *Biotechnol.* 2009;29(2): 120-30.
14. Arai Y, Sparks DL. Phosphate reaction dynamics in soils and soil components: a multiscale approach. *Adv Agron.* 2007;94: 135-79.
15. Sims JT, Vadas PA. Phosphorus in soils. Overview. In: Hatfield J, Scow K, Powlson D, Singer M, Rosenzweig C, Sparks D, editors. *Encyclopedia of soils in the environment.* 3: Academic Press; 2005. p. 202-10.
16. Chuang C, Kuo YL, Chao C, Chao W. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. *Biol Fert Soils.* 2007;43: 575-84.

17. Kögel-Knabner I. Chemical structure of organic N and organic P in soil. In: Nannipieri P, Smalla K, editors. *Nucleic Acids and Proteins in Soil*. Berlin.: Springer Verlag; 2006. p. 23-48.
18. Rodríguez H, Fraga R, Gonzalez T, Bashan Y. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil* 2006;287: 15-21.
19. Estrada GA, Baldani VLD, De oliveira DM, Urquiaga S, Baldani JI. Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. *Plant Soil*. 2012;361.
20. Sánchez López DB, Gómez-vargas RM, Garrido rubiano MF. Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 2012;3(7): 1401-15.
21. Poonguzhali S, madhaiyan M, SA T. Isolation and Identification of Phosphate Solubilizing Bacteria from Chinese Cabbage and Their Effect on Growth and Phosphorus Utilization of Plants. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2008; 18( 4): 773-7.
22. Cordero-Elvia J, Ortega-Rodés P, Ortega E. La inoculación de plantas con *Pantoea* sp., bacteria solubilizadora de fosfatos, incrementa la concentración de P en los tejidos foliares. *Rev Colomb Biotecnol* Julio 2008; X(1): 111-21.
23. Orberá T, Pérez I, Ferrer D, Cortés N, González Z. Aislamiento de cepas de *Bacillus* sp con potencialidades para la bioprotección y la estimulación del crecimiento vegetal. *Rev Cub Quím*. 2005; XVII(1): 189-95.
24. Sharan A, Shikha SDN, Gaur R. *Xanthomonas campestris*, a novel stress tolerant, phosphate-solubilizing bacterial strain from saline-alkali soils. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2008; 24(6): 753-9.
25. Hernández-rodríguez A, Rives-rodríguez N, Acebo-guerrero Y, Diaz-de la osa A, Heydrich-pérez M, Divan baldani VL. Potencialidades de las bacterias diazotróficas asociativas en la promoción del crecimiento vegetal y el control de *Pyricularia oryzae* (Sacc.) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Rev Protección Vegetal*. 2014; 29(1) : 1-10.
26. Kumar V, Narula N. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Biol Fertil Soils*. 1999; 28: 301-5.
27. Pikovskaya RI. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiologiya*. 1948;17: 362-70.
28. Sperber J. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Austr J Agric Res*. 1958;9: 778-81.
29. Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganism isolated from forest soil. *Soil Biol Biochem*. 1992;24: 389-95.
30. Nautiyal CS. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 1999;170: 265-70.
31. Yu X, Liu X, Zhu TH, Liu GH, Mao C. Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from walnut and their effect on growth and phosphorus mobilization. *Biol Fertil Soils*. 2011;47: 437-46.
32. Watanabe F. Test of an ascorbic acid method for determining phosphorus in water and NaHCO<sub>3</sub> extracts from soils. *Soil Sci Soc Am J*. 1965;29: 677-8.
33. Paredes-Mendoza M, Espinosa-Victoria D. Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana*. 2010;28(1): 61-70.

34. Puente me, LI CY, Bashan Y. Rock-degrading endophytic bacteria in cacti. *Environ Exp Bot.* 2009;66: 389-401.
35. Richardson AE, Simpson RJ. Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability. *Plant Physiology.* 2011; July 156:989-96.
36. Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms. *Soil Biol Biochem.* 1995;27: 257-63.
37. Chen Y, Rekha P, Arum A, Shen F, LA W, Young C. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl Soil Ecol.* 2006; 34: 33-41.
38. Arcand M, Schneider K. Plant and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences.* 2006;78: 791-807.
39. Gerretsen FC. The influence of microorganisms on the phosphate intake by the plant. *Plant Soil.* 1948;1: 51-81.
40. Schwab AP. Manganese-phosphate solubility relationships in an acid soil. *Soil Sci Soc Am J.* 1989;53: 1654-60.
41. Nannipieri P, Giagnoni L, Landi L, Renella G. Role of phosphatase enzymes in soil. In: Bunemann EK, Oberson A, Frossard E, editors. *Phosphorus in action Soil biology.* 26. Berlin: Springer; 2011. p. 215-41.
42. He Z, Ohno T, Cade-menun BJ, Erich MS, Honeycutt CW. Spectral and chemical characterization of phosphates associated with humic substances. *Soil Sci Soc Am J.* 2006; 70: 1741-51.
43. Ramachandran S, Fontanille P, Pandey A, Larroche C. Gluconic Acid: properties, applications and microbial production. *Food Technol Biotechnol.* 2006; 44(2): 185-95.
44. Sashidhar B, Podile AR. Mineral phosphate solubilization by rhizosphere bacteria and scope for manipulation of the direct oxidation pathway involving glucose dehydrogenase. *Journal of Applied Microbiology.* 2010; 109: 1-12.
45. Patel DK, Archana G, Kumar N. Variation in the nature of organic acid secretion and mineral phosphate solubilization by *Citrobacter* sp. DHRSS in the presence of different sugars. *Curr Micro.* 2008; 56: 168-74.
46. Mullen MD. Phosphorus in soils. Biological interactions. In: Hatfield JL, Scow KM, Powlson DS, Singer MJ, Rosenzweig C, Sparks DL, editors. *Encyclopedia of soils in the environment.* 3: Academic Press; 2005. p.210-6
47. Yi Y, Huang W, GE Y. Exopolysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2007.
48. Lei XG, Porres JM. Phytase enzymology, applications and biotechnology. *Biotech Letters.* 2003; 25: 1787-94.
49. Goldstein AH, Liu ST. Molecular cloning and regulation of a mineral phosphate solubilizing (mps) gene from *Erwinia herbicola*. *Biotechnology.* 1987; 5 :72-4.
50. Vikram A, Alagawadi AR, Krishnaraj PU, Kumar M. Transconjugation studies in *Azospirillum* sp. negative to mineral phosphate solubilization. 2007.
51. Reilly TJ, Baron GS, Nano F, Kuhlenschmidt MS. Characterization and sequencing of a respiratory burst inhibiting acid phosphatase from *Francisella tularensis*. *JBiol Chem.* 1996; 271: 10973-83.
52. Rodríguez H, Rossolini GM, González T, Jiping L, Glick BR. Isolation of a gene from *Burkholderia cepacia* IS-16 encoding a protein that facilitates phosphatase activity. *Curr Microbiol.* 2000; 40: 362-6.
53. Konietzny U, Greiner R. Bacterial phytase: potential application, *in vivo* function and regulation of its synthesis. *Braz J Micro.* 2004; 35: 11-8.

54. Sánchez-lópez DB, Gómez-vargas RM, Garrido-rubiano MF, Bonilla-Buitrago RR. Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. *Revista mexicana de Ciencias Agrícolas* 2012; 3(7): 1401-15.
55. Leungvutiviroj C, Ruangphisarn P, Hansanimitkul P, Shinkawa H, Sasaki K. Development of a new biofertilizer with a high capacity for N<sub>2</sub> fixation, phosphate and potassium solubilization and auxin production. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2010; 74(5): 1098-101.
56. Oliveira CA, Alves Vmc, Marriel IE, Gomes EA, Scotti MR, Carneiro NP, *et al.* Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biology and Biochemistry.* 2009; 41: 1782-7.
57. Caballero-Mellado J, Onofre-Lemus J, Estrada-de los Santos P, Martínez-Aguilar L. The Tomato Rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology.* 2007; 73(16): 5308-19.
58. Bonilla R. Alternativa de fertilización para especies agrícolas y leguminosas arbóreas mediante utilización de bacterias asimbióticas del género *Azotobacter* y solubilizadoras de fosfato. *Redes de Recursos forrajeros: Resúmenes de la Primera Reunión de C.I. Tibaítata 2005.* p.50.
59. Díaz-blanco PO, Márquez-Reina E. Validación de los biofertilizantes *Azotobacter*, *Rhizobium* y Fosforina en cuatro sistemas de cultivos en condiciones de producción *Avances.* 2011; 13(2).
60. Pedraza RO, Teixeira KRS, Fernández Scavino A, García de Salamone I, Baca BE, Azcón R, *et al.* Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. *Revisión. Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria.* 2010; 11(2): 155-64.