



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

---

INSTITUTO DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

EDAFOLOGIA

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN  
BIOQUÍMICA DE METABOLITOS PRODUCIDOS  
POR RIZOBACTERIAS QUE SOLUBILIZAN  
FOSFATO**

**MARIANELA PAREDES MENDOZA**

T E S I S  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**


**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO**


2010

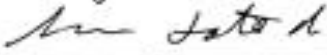
La presente tesis titulada: "AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE METABOLITOS PRODUCIDOS POR RIZOBACTERIAS QUE SOLUBILIZAN FOSFATO" realizada por la alumna: **Marianela Paredes Mendoza**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:


**DOCTORA EN CIENCIAS  
EDAFOLOGIA**


**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO:   
DR. DAVID ESPINOSA VICTORIA

ASESOR:   
DRA. HILDA ARACELI ZA VALETA MANCERA

ASESOR:   
DR. MARCOS SOTO HERNÁNDEZ

ASESOR:   
DR. FLORENTINO VÍCTOR CONDE MARTÍNEZ

ASESOR:   
DR. LUC DENDOOVEN

**Montecillo, Texcoco, Estado de México, Noviembre de 2010.**

## RESUMEN

# AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE METABOLITOS PRODUCIDOS POR RIZOBACTERIAS QUE SOLUBILIZAN FOSFATO

**Marianela Paredes Mendoza, Dra.**

**Colegio de Postgraduados, 2010**

El empleo de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSP) para la solubilización de distintas rocas fosfatadas y de otras fuentes de fósforo es una alternativa para incrementar la cantidad de P disponible para las plantas. Se aislaron 147 BSP de la raíz y rizoplasma de diferentes plantas cultivadas. El medio de cultivo denominado Medio Mínimo para Solubilización de Fosfato Colegio de Postgraduados con MgCl (MMSFCP-Mg) fue el más eficiente, debido a que en medio sólido se observaron halos de solubilización de hasta 3.8 cm a los catorce días, y en medio líquido se determinaron hasta 380 mg mL<sup>-1</sup> de fosfato soluble a los seis días. Veintisiete de las mejores cepas fueron seleccionadas con base en la eficiencia de solubilización de fosfato tricálcico y roca fosfórica (RF). Usando modificaciones del medio de cultivo líquido MMSPCP-Mg con RF (fluoroapatita) y un consorcio bacteriano denominado C27 formado por las 27 BSP, se observó la mayor solubilización de roca fosfórica y producción de ácidos orgánicos. Durante la solubilización de la RF en todas las cepas se detectó la producción de ácido glucónico y 2-cetoglucónico, también se detectó la síntesis de ácidos oxálico, cítrico, maléico, málico, succínico, láctico, fumárico, fórmico, acético, propiónico, adípico y butírico. Las cepas fueron identificadas con base en sus características bioquímicas y fenotípicas con los sistemas API 20E y API 20 NE. Las bacterias aisladas pertenecieron a los géneros *Burkholderia*, *Pseudomonas* y *Pantoea*. En las cepas estudiadas, las fosfatasas alcalinas mostraron mayor actividad que las ácidas. Solo dos de las BSP produjeron ácido indol acético, *Burkholderia cepacia* RT12 y *Pantoea spp* AVN. Sin embargo, todos los aislamientos fueron capaces de oxidar el gluconato a ácido 2-cetoglucónico. En el estudio de inmunodetección en el tejido vegetal se determinó la capacidad de tres cepas de *Burkholderia* de penetrar y colonizar vía simplasto y/o apoplasto la zona apical y basal de las raíces de gramíneas, las bacterias se detectaron en epidermis, parénquima de la corteza y xilema. De acuerdo a la secuenciación del gene 16S rDNA estas cepas fueron identificadas como: *Burkholderia gladioli* 1T13, *Burkholderia cepacia* RT12 y *Burkholderia cepacia* CAFEA. El género *Burkholderia*, alberga especies patógenas oportunistas de humanos y multi-resistentes a antibióticos, por lo que su uso como biofertilizante podría verse limitado.

**Palabras clave:** ácidos orgánicos, fosfatasas, solubilización de fosfato, inmunodetección, roca fosfórica, bacterias solubilizadoras de fosfato y endófitas.

## ABSTRACT

# ISOLATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF METBOLITES PRODUCED BY PHOSPHATE SOLUBILIZING RHIZOBACTERIA

**Marianela Paredes Mendoza, Dra.**

**Colegio de Postgraduados, 2010**

The use of phosphate solubilizing bacteria (PSB) for solubilization of different phosphate rocks and other phosphorous sources is a promissory alternative to increase the amount of available P for plant nutrition. A group of 147 PSB was isolated from roots and rhizoplane of different crop plants. The Minimum Medium for Phosphate Solubilization-Colegio de Postgraduados amended with MgCl (MMPSCP-Mg) was the most efficient culture medium, since solid and liquid medium exhibited solubilization halos and soluble P values bigger than 3.8 cm and 380 mg mL<sup>-1</sup> at 14 and 6 days of incubation, respectively. According to the efficiency for tricalcic phosphate and rock phosphate (RP) solubilization, 27 strains were selected. The highest solubilization of rock phosphate and synthesis of organic acids were observed when the liquid medium MMPSCP-Mg was amended with RP (fluoroapatite) and inoculated with the bacterial consortium C27 (formed by the 27 PSB). During the RP solubilization all strains synthesized gluconic and 2-cetogluconic acids, also the presence of other acids such as oxalic, citric, maleic, malic, succinic, lactic, fumaric, formic, acetic propionic, adipic and butyric was detected. Base on the biochemical and phenotypic characteristics, the bacterial strains were identified using the API 20E and API 20 NE systems. The isolated bacteria belonged to the genera *Burkholderia*, *Pseudomonas* and *Pantoea*. Alkaline phosphatase activity was higher than acid phosphatase activity in the bacteria group studied. Indol acetic acid was produced only for the strains *Burkholderia cepacia* RT12 and *Pantoea spp* AVN. However, all accessions oxidized gloconate to 2-cetogluconic. In the bacteria immunodetection study, the ability of three strains of *Burkholderia* to penetrate and colonize the apical and basal zones of root tissue via symplast/apoplast was evaluated. The bacteria were detected in epidermis, cortex parenchyma and xylem. Based on the sequencing of 16S rDNA gene, the three accessions were identified as *Burkholderia gladioli* 1T13, *Burkholderia cepacia* RT12 and *Burkholderia cepacia* CAFEA. The genus *Burkholderia* comprises opportunistic pathogen species for humans, multi-resistant to antibiotics, which might limit their use as biofertilizers.

**Key words:** organic acids, phosphatases, phosphate solubilization, immunodetection, rock phosphate, phosphate solubilizing bacteria, endophyte.

## **AGRADECIMIENTOS**

AL COLEGIO DE POSTGRADUADOS POR DARMÉ LA OPORTUNIDAD DE AVANZAR EN MI FORMACIÓN ACADÉMICA.

AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) POR EL FINANCIAMIENTO OTORGADO, PARA REALIZAR MIS ESTUDIOS DE DOCTORADO.

AL CONSEJO MEXIQUENSE DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (COMECYT), POR LA BECA PROPORCIONADA PARA LA ELABORACIÓN DE LA TESIS.

A MI CONSEJO PARTICULAR: DR. DAVID ESPINOSA VICTORIA, DRA. HILDA A. ZAVALÉTA MANCERA, VICTOR CONDE MARTINEZ, LUC DENDOOVEN Y DR. MARCOS SOTO HERNÁNDEZ, POR SU AYUDA Y SUGERENCIAS PARA MEJORAR EL TRABAJO CIENTÍFICO.

ESPECIALMENTE AL DR. DAVID ESPINOSA VICTORIA, POR SU APOYO INCONDICIONAL SIN EL CUAL NO HUBIERA PODIDO REALIZAR ÉSTA INVESTIGACIÓN.

A LA DRA. HILDA A. ZAVALÉTA MANCERA, POR GUIARME Y COMPARTIR SU EXPERIENCIA, AMISTAD Y CONOCIMIENTOS PARA HACER ÉSTA INVESTIGACIÓN.

A LA PROFESORA ELVIRA RÍOS LEAL, POR SU APOYO Y CONOCIMIENTO EN LOS ANÁLISIS DE HPLC, ASÍ COMO POR SU AMISTAD Y SABIOS CONSEJOS.

AGRADEZCO ESPECIALMENTE A LA DRA. MA. CRISTINA LÓPEZ PERALTA POR SER UNA PERSONA DE GRAN CALIDAD HUMANA QUE ME APOYO INCONDICIONALMENTE EN MI VIDA ACADÉMICA Y PERSONAL.

A MIS AMIGOS, QUE A TRAVÉS DE CHARLAS DE CAFÉ SOBRE NUESTRA VIDA ESTUDIANTIL Y PERSONAL, ME HIZIERON UNA ESTANCIA AGRADABLE EN EL COLEGIO.

A TODOS Y CADA UNO DE LOS PROFESORES DEL DOCTORADO, NO SOLO POR SU CALIDAD EN LA CÁTEDRA, SINO POR SU CALIDEZ EN LA RELACIÓN INTERPERSONAL QUE ME PERMITIO HACER BUENAS AMISTADES.

## DEDICATORIA

Al Dios, por su inmenso amor y por darme la luz para seguir adelante en la vida.

A las dos lucecitas de mi vida, mis niñas alien, Marianelita y Alexa Alondra.

A mis padres, Estela y José Luis por darme todo el apoyo y amor.

A mis hermanos, David, Julián, José Luis y Braulio por estar conmigo en todo momento.

A mis sobrinos Ericka, David, Maria José y Luis, por todas sus risas, juegos y cariño hacia su tía Yin Yin.

A mis cuñadas en especial a Jazmín, por su apoyo incondicional y a Ericka, Saray e Itzi.

# CONTENIDO

|                          | <b>Página</b> |
|--------------------------|---------------|
| <b>Resumen</b>           | <b>ii</b>     |
| <b>Abstract</b>          | <b>iv</b>     |
| <b>Agradecimientos</b>   | <b>v</b>      |
| <b>Dedicatoria</b>       | <b>vi</b>     |
| <b>Índice</b>            | <b>vii</b>    |
| <b>Índice de cuadros</b> | <b>xi</b>     |
| <b>Índice de figuras</b> | <b>xiii</b>   |

## **CAPITULO I. INTRODUCCIÓN**

**1**

|                          |          |
|--------------------------|----------|
| <b>Literatura citada</b> | <b>3</b> |
|--------------------------|----------|

## **CAPITULO II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

|                              |          |
|------------------------------|----------|
| <b>Objetivo general</b>      | <b>6</b> |
| <b>Objetivos específicos</b> | <b>6</b> |
| <b>Hipótesis</b>             | <b>7</b> |

## **CAPITULO III. ÁCIDOS ORGÁNICOS PRODUCIDOS POR RIZOBACTERIASQUE SOLUBILIZAN FOSFATO: UNA REVISIÓNCRÍTICA**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Resumen</b>                                      | <b>8</b>  |
| <b>Abtract</b>                                      | <b>9</b>  |
| <b>Introducción</b>                                 | <b>10</b> |
| <b>Bacterias solubilizadoras de fosfato mineral</b> | <b>11</b> |
| <b>Ácidos orgánicos que solubilizan fosfato</b>     | <b>14</b> |
| <b>Mecanismos de Acción</b>                         | <b>16</b> |
| <b>Avances</b>                                      | <b>19</b> |
| <b>Conclusiones</b>                                 | <b>19</b> |
| <b>Literatura citada</b>                            | <b>20</b> |

## **CAPITULO IV. MEDIOS DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO DE BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO**

|                             |           |
|-----------------------------|-----------|
| <b>Resumen</b>              |           |
| <b>Introducción</b>         | <b>25</b> |
| <b>Materiales y métodos</b> | <b>26</b> |
|                             | <b>27</b> |

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| Aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfato           | 27            |
| Determinación de la capacidad solubilizadora de fosfato       | 28            |
| Identificación de ácidos orgánicos a través de HPLC           | 30            |
| <b>Análisis estadístico</b>                                   | <b>30</b>     |
| <b>Resultados y discusión</b>                                 | <b>31</b>     |
| Bacterias aisladas de la raíz y rizoplaneo                    | 31            |
| Capacidad solubilizadora de fosfato de las bacterias aisladas | 33            |
| Ácidos orgánicos identificados                                | 37            |
| <b>Conclusiones</b>   | <b>38</b>     |
| <b>Reconocimientos</b>  | <b>39</b>     |
| <b>Literatura citada</b>                                      | <b>39</b>     |

## **CAPITULO V. PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE ÁCIDOS ORGÁNICOS POR BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE ROCA FOSFÓRICA (FLUOROAPATITA)**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Resumen</b>   | <b>42</b> |
| <b>Introducción</b>  | <b>43</b> |
| <b>Materiales y métodos</b>  | <b>44</b> |
| Cepas bacterianas  | 44        |
| Solubilización de roca fosfórica en medio sólido y líquido   | 45        |
| Producción de ácidos orgánicos   | 46        |
| Efecto de la aeración en la solubilización de RF y producción de ácidos orgánicos                      | 46        |
| Solubilización abiótica de la RF a través de los ácidos orgánicos producidos por el consorcio C27      | 47        |
| Identificación de ácidos orgánicos a través de HPLC  | 48        |
| Análisis estadístico   | 48        |
| <b>Resultados y discusión</b>  | <b>48</b> |
| Solubilización de roca fosfórica en medio sólido y líquido   | 48        |
| Efecto de la aeración en la producción de ácidos orgánicos y solubilización de RF por el consorcio C27 | 58        |
| Efecto de diferentes fuentes de carbono en la solubilización de RF y producción de ácidos orgánicos    | 59        |
| Efecto del contenido nitrógeno en la solubilización y producción de ácidos orgánicos                   | 60        |
| Solubilización abiótica de la RF   | 61        |
| <b>Conclusiones</b>  | <b>62</b> |
| <b>Reconocimientos</b>   | <b>63</b> |
| <b>Literatura Citada</b>   | <b>63</b> |



**CAPITULO VI. ACTIVIDAD FOSFATASA EN BACTERIAS  
SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO HABITANTES DE LA RAÍZ Y EL  
RIZOPLANO DE GRAMÍNEAS**

|  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| <b>Resumen</b>   | <b>68</b>     |
| <b>Introducción</b>  | <b>67</b>     |
| <b>Materiales y métodos</b>  | <b>68</b>     |
| Aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfato                  | 68            |
| Determinación de la capacidad solubilizadora de fosfato              | 68            |
| Determinación de colonias activas en la producción de fosfatasas     | 69            |
| Determinación de la actividad fosfatasas <i>in vitro</i>             | 69            |
| Identificación de bacterias  | 70            |
| Producción de AIA  | 71            |
| Oxidación de gluconato   | 71            |
| Análisis estadístico   | 71            |
| <b>Resultados y discusión</b>  | <b>72</b>     |
| Determinación de la capacidad solubilizadora de fosfato              | 72            |
| Determinación de las colonias activas en la producción de fosfatasas | 72            |
| Determinación de la actividad fosfatasas <i>in vitro</i>             | 73            |
| Identificación de bacterias  | 75            |
| Producción de AIA  | 78            |
| Oxidación de gluconato   | 79            |
| <b>Conclusiones</b>  | <b>79</b>     |
| <b>Reconocimientos</b>   | <b>79</b>     |
| <b>Literatura citada</b>   | <b>80</b>     |

**CAPITULO VII. COLONIZACIÓN ENDOFITICA DE RAICES DE AVENA,  
CEBADA, TRIGO Y MAIZ POR CEPAS DE *BURKHOLDERIA*  
SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Resumen</b>   | <b>83</b> |
| <b>Introducción</b>  | <b>84</b> |
| <b>Materiales y métodos</b>  | <b>86</b> |
| Cepas bacterianas  | 86        |
| Determinación de la actividad pectinasa y celulasa de las BSP                        | 86        |
| Obtención de la fracción LPS (lipopolisacárido) de las cepas de <i>Bhurkholderia</i> | 86        |
| Obtención del anticuerpo policlonal antiLPS  | 87        |
| Inoculación de las semillas con las cepas de <i>Burkholderia</i>                     | 88        |
| Inmunodetección de cepas de las cepas de <i>Burkholderia</i>                         | 88        |

|  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| Identificación genética y análisis filogenético de las tres cepas de <i>Burkholderia</i> | <b>90</b>     |
| <b>Resultados y discusión</b>  | <b>91</b>     |
| Actividad pectinasa y celulasa de las BSP  | <b>91</b>     |
| Colonización endofítica  | <b>93</b>     |
| Modelo de invasión de cepas de <i>Burkholderia</i> en raíces primarias de gramíneas      | <b>100</b>    |
| Identificación taxonómica de los endófitos seleccionados                                 | <b>102</b>    |
| <b>Conclusiones</b>  | <b>104</b>    |
| <b>Literatura citada</b>   | <b>105</b>    |
| <br>   |               |
| <b>CAPITULO VIII. CONCLUSIONES GENERALES</b>   | <b>109</b>    |
| <br>   |               |
| <b>ANEXOS</b>  |               |
| <br>   |               |
| <b>Anexo A</b>   | <b>111</b>    |
| <b>Anexo B</b>   | <b>115</b>    |
| <b>Anexo C</b>   | <b>117</b>    |
| <b>Anexo D</b>   | <b>118</b>    |
| <b>Anexo E</b>   | <b>120</b>    |
| <b>Anexo F</b>   | <b>122</b>    |
| <b>Anexo G</b>   | <b>124</b>    |
| <b>Literatura citada</b>   | <b>126</b>    |

## ÍNDICE DE CUADROS

|                    |  | Página    |
|--------------------|--|-----------|
| <b>Cuadro 3.1</b>  | Eventos importantes en el estudio de los ácidos orgánicos producido por bacterias solubilizadoras de fosfato (BSP) de la rizósfera   | <b>13</b> |
| <b>Cuadro 3.2</b>  | Ácidos orgánicos y sus rutas biosintéticas en bacterias solubilizadoras de fosfato (BSP)   | <b>17</b> |
| <b>Cuadro 4.1</b>  | Cepas solubilizadoras de fosfato aisladas en placas de medio PVK (Pikovskaya, 1948) provenientes de raíz y rizoplano de diferentes cultivos y localidades                                      | <b>28</b> |
| <b>Cuadro 4.2</b>  | Formulación de los medios de cultivo PVK, NBRIP, MMSFCP y MMSFCP-Mg, usados para detectar la presencia de bacterias solubilizadoras de fosfato   | <b>29</b> |
| <b>Cuadro 4.3</b>  | Número de bacterias formadoras de halo de solubilización de fosfato, aisladas de la raíz y rizoplano de diferentes plantas, y crecidas en los medios de cultivo PKV, NBRIP, MMSFCP y MMSFCP-Mg | <b>32</b> |
| <b>Cuadro 4.4</b>  | Diámetro del halo de solubilización y concentración de P soluble de 10 aislamientos bacterianos crecidos con cuatro diferentes medios de cultivo   | <b>33</b> |
| <b>Cuadro 4.5</b>  | Comparación en la capacidad solubilizadora de P por bacterias aisladas de la raíz y rizoplano de diferentes plantas usando los medios de cultivo PVK, NBRIP, MMSFCP y MMSFCP-Mg.               | <b>35</b> |
| <b>Cuadro 5.1</b>  | Formulación de los medios de cultivo usados para la solubilización de roca fosfórica y producción de ácidos orgánicos  | <b>45</b> |
| <b>Cuadro 5.2</b>  | Producción de ácidos orgánicos totales en la solubilización de RF y determinación del diámetro de halo por solubilización de fosfato tricálcico  | <b>50</b> |
| <b>Cuadro 5.3A</b> | Ácidos orgánicos producidos por 27 bacterias solubilizadoras de fosfato y el consorcio bacteriano C27 durante la solubilización de roca fosfórica en el medio MMSRCP-MgG                       | <b>52</b> |

|                    | <b>Página</b>   |
|--------------------|---|
| <b>Cuadro 5.3B</b> | Ácidos orgánicos producidos por 27 bacterias solubilizadoras de fosfato y el consorcio bacteriano C27 durante la solubilización de roca fosfórica en el medio MMSRCP-MgG <b>54</b>                                    |
| <b>Cuadro 5.4</b>  | Coefficientes de correlación de diferentes caracteres bioquímicos de las bacterias solubilizadoras aisladas del rizoplasma de cereales <b>57</b>  |
| <b>Cuadro 5.5</b>  | Efecto de diferentes fuentes de carbono en la solubilización de RF y producción de ácidos orgánicos por 27 bacterias aisladas del rizoplasma y raíz de gramíneas <b>60</b>  |
| <b>Cuadro 6.1</b>  | Determinación de las colonias activas en la producción de fosfatasas (ácidas y alcalinas) extracelulares e intracelulares, determinadas a partir de bacterias aisladas de la raíz y rizoplasma de gramíneas <b>73</b> |
| <b>Cuadro 6.2</b>  | Fosfatasas (ácidas y alcalinas) extracelulares e intracelulares, determinadas <i>in vitro</i> a partir de bacterias aisladas de la raíz y rizoplasma de gramíneas <b>75</b>   |
| <b>Cuadro 6.3</b>  | Identificación bioquímica (API System), producción de AIA y oxidación de gluconato, de bacterias aisladas de la raíz y rizoplasma de diferentes gramíneas <b>77</b>   |
| <b>Cuadro 7.1</b>  | Producción de pectinasas y celulasas por las 27 cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSP) <b>92</b>   |
| <b>Cuadro 7.2</b>  | Partes de las raíces de maíz azul, maíz amarillo, trigo, avena y cebada colonizadas por cepas de <i>Burkholderia</i> <b>95</b>  |
| <b>Cuadro E.1</b>  | Composición del Medio AMA (pH 7.2) para determinar la actividad pectinasa Plazinski y Rolfe (1985) <b>120</b>   |
| <b>Cuadro E.2</b>  | Soluciones para preparar el medio del método de Andro para determinar la actividad celulasa Andro <i>et al.</i> , (1984) <b>120</b>   |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                   | <b>Página</b>   |
|-------------------|---|
| <b>Figura 3.1</b> | Hidroxiácidos producidos por bacterias solubilizadores de fosfato <b>14</b>   |
| <b>Figura 3.2</b> | Ácidos orgánicos alifáticos producidos por bacterias solubilizadoras de fosfato <b>15</b>   |
| <b>Figura 4.1</b> | Solubilización de fosfato tricálcico en el medio de cultivo MMSFCP-Mg por las cepas MC2 (A) y MC25 (B), usando diferentes fuentes de carbono. Cada punto representa la media de tres repeticiones y las barras representan el error estándar <b>36</b>  |
| <b>Figura 4.2</b> | P soluble, pH y ácido 2 ceto-glucónico determinados en el medio de cultivo MMSFCP-Mg inoculado con la cepa MP37b aislada del rizoplasma del maíz <b>38</b>  |
| <b>Figura 5.1</b> | Producción de ácido glucónico y 2-cetóglucónico por el consorcio bacteriano C-27 usando el medio MMSRCP-MgG. <b>56</b>  |
| <b>Figura 5.2</b> | Solubilización de RF por el consorcio C27 en el medio MMSRCP-MgG en condiciones de aerobias y de reducción de oxígeno. Abreviaturas de las leyendas: P soluble-oxígeno y pH-oxígeno, el cultivo se desarrollo bajo condiciones de aeración; P soluble y pH el cultivo se desarrollo bajo condiciones de reducción de oxígeno <b>59</b>  |
| <b>Figura 7.1</b> | Inmunodetección de tres cepas de <i>Burkholderia</i> en las raíces cuatro gramíneas. Corte transversal de avena <i>Burkholderia cepacia</i> RT12 (A); Corte longitudinal de maíz con <i>B. gladioli</i> IT13 (B); Corte longitudinal de maíz amarillo con <i>B. gladioli</i> 1T13 (C); Corte transversal de maíz amarillo con <i>B. gladioli</i> IT13 (D); Corte longitudinal de maíz azul con <i>B. cepacia</i> RT12 (E); Corte longitudinal de cebada con <i>B. cepacia</i> 1T13 (F); Corte longitudinal avena con <i>B. gladioli</i> 1T13 (G); Corte longitudinal de maíz azul con <i>B. cepacia</i> RT12 (H); Corte longitudinal de maíz azul con <i>B. cepacia</i> RT12 (I); Corte longitudinal de trigo sin inocular (testigo) (J). Las flechas indican presencia de la bacteria. Barra: 50µm <b>99</b> |
| <b>Figura 7.2</b> | Modelo hipotético de penetración y las rutas de colonización en raíces de gramíneas por especies de <i>Burkholderia</i> <b>101</b>  |

|                   | <b>Página</b>   |
|-------------------|---|
| <b>Figura 7.3</b> | <b>103</b>  |
|                   | Arbol filogenético contruido por el método de Maxima Parsimonia que con base en secuencias del gen 16S DNAr, expresa las relaciones de las tres bacterias endofitas estudiadas ( <i>Burkholderia cepacia</i> RT12, <i>B. cepacia</i> CAFEA y <i>B. gladioli</i> 1T13) con microorganismos similares. El número de acceso al GenBank se muestra entre parentesis para cada organismo que se usó como referencia. La secuencia del gen 16S DNAr de <i>Corynebacterium diphtheria</i> fue usada como una referencia fuera de grupo |
| <b>Figura 7.4</b> | <b>104</b>  |
|                   | Árbol filogenético usando el método de evolución mínima basado en la secuenciación del gen 16-S rDNA de especies representativas de <i>Burkholderia</i> y las tres bacterias endófitas ( <i>Burkholderia cepacia</i> RT12, <i>B. cepacia</i> CAFEA y <i>B. gladioli</i> 1T13) con microorganismos similares. El numero de acceso al GenBank se muestra entre parentesis para cada organismo que se uso de referencia  |
| <b>Figura A1</b>  | <b>111</b>  |
| <b>Figura A2</b>  | <b>111</b>  |
| <b>Figura A3</b>  | <b>112</b>  |
|                   | Sitio de muestreo, Zirahuen, Michoacán, México  |
|                   | Sitio de muestreo, Tlaxcala, México   |
|                   | Raíces de trigo colectadas de Ciudad Sahagún, Hidalgo, México (A); Raíz de maíz criollo colectada de Patzcuaro, Michoacán, México (B)   |
| <b>Figura A4</b>  | <b>113</b>  |
|                   | Colonias bacterianas obtenidas a partir de la dilución de raíces de cebada colectada en Ciudad Sahagún Hidalgo, México  |
| <b>Figura A5</b>  | <b>113</b>  |
|                   | Halo de solubilización de fosfato producido por la cepa <i>Burkholderia cepacia</i> RT12 en medio Picovskaya a los 14 días de incubación  |
| <b>Figura A6</b>  | <b>114</b>  |
|                   | Halo de solubilización de fosfato formado por la cepa <i>Burkholderia cepacia</i> CAFEA en medio Picovskaya a los 14 días de incubación (A); Halo de solubilización de fosfato formado por la cepa <i>Burkholderia cepacia</i> CAFEA en medio MMSFCP-Mg (Medio Mínimo para Solubilización de Fosfato Colegio de Postgraduados adicionado con MgCl) a los 14 días de incubación  |

|                  | <b>Página</b>   |            |
|------------------|---|------------|
| <b>Figura A7</b> | Cepa CH1 (aislada del rizoplano de cebada cultivada en Ciudad Sahagún, Hidalgo) cultivada en medio MMSFCP-Mg (Medio Mínimo para Solubilización de Fosfato Colegio de Postgraduados adicionado con MgCl), la zona clara alrededor de las colonias corresponde al área de solubilización de fosfato (A). Cepa MC25 (aislada de la raíz de maíz azul cultivado en Cacaxtla, Tlaxcala), en medio MMSRCP-Mg (Medio Mínimo para Solubilización de Roca fosfórica Colegio de Postgraduados adicionado con MgCl) conteniendo azul de bromofenol que cambia de color azul al amarillo debido a la producción de ácidos orgánicos por las BSP y por ende la solubilización de la roca fosfórica (B Y C) | <b>114</b> |
| <b>Figura B1</b> | Medio líquido MMSFCP-Mg (Medio Mínimo para Solubilización de Fosfato Colegio de Postgraduados adicionado con MgCl) (A); Prueba de la fosfatasa alcalina (B)   | <b>115</b> |
| <b>Figura B2</b> | Inoculación de las galerías API 20 NE con la cepa <i>Burkholderia gladioli</i> 1T13.  | <b>115</b> |
| <b>Figura B3</b> | Galería API 20 NE en donde se observan reacciones positivas y negativas de la actividad enzimáticas de la bacteria probada  | <b>116</b> |
| <b>Figura C1</b> | Difractograma de fluoroapatita obtenida por Rx  | <b>117</b> |
| <b>Figura D1</b> | Fotomicrografía de los microagregados formados durante la solubilización de la roca fosfórica por la cepa <i>Burkholderia cepacia</i> MC25 y <i>Burkholderia cepacia</i> RT12 respectivamente (A Y C); Microagregados de MC25 y RT12 observados en Microscopia de contraste de fases a 10X (B Y D)  | <b>118</b> |
| <b>Figura D2</b> | Fotomicrografía de la roca fosfórica (RF) sin inocular (testigo)  | <b>119</b> |
| <b>Figura E1</b> | Semillas de maíz amarillo (A) y maíz azul (B) colocadas en cajas Petri para su germinación  | <b>121</b> |
| <b>Figura E2</b> | Semilla de maíz amarillo inoculada con la cepa <i>Burkholderia cepacia</i> RT12 (A); Plantula de maíz amarillo sin inocular (B)   |            |
| <b>Figura E3</b> | Punción en la vena de la oreja del conejo para la obtención de sangre (A); Punción cardiaca del conejo para la obtención de sangre (B)  | <b>121</b> |
| <b>Figura G1</b> | Cromatograma de los filtrados del cultivo de <i>Burkholderia cepacia</i> RT12 en el medio MMSRCP-Mg (Medio Mínimo para Solubilización de Roca fosfórica Colegio de Postgraduados adicionado con MgCl). Detección de ácido 2-cetoglucónico y glucónico a las 24 (A) y 48 (B) h de inoculación, respectivamente   | <b>124</b> |

# CAPITULO I

## INTRODUCCION

El fósforo (P) es un nutriente esencial para las plantas el cual se encuentra en baja disponibilidad (0.1 y 1 Kg por hectárea) en muchos suelos agrícolas (Alexander 1980; Troeh y Thompson, 1993). Estos índices bajos del nutriente se deben a que el fósforo soluble reacciona con iones como el calcio, el hierro o el aluminio que provocan su precipitación o fijación, disminuyendo su disponibilidad para las plantas (Rodríguez Fraga 1999). En vista de que en general las plantas requieren de 10 a 30 Kg de fósforo por hectárea, la capacidad de los microorganismos para solubilizar y mineralizar los depósitos de fósforo disponibles en los suelos resulta crucial. El fósforo orgánico constituye una significativa proporción del fósforo del suelo (entre el 30 y el 50%). El fósforo orgánico está presente en el suelo en más altas concentraciones que el fosfato inorgánico (Hayes *et al.*, 2000). Las formas orgánicas en el suelo están principalmente como: fitatos, ácidos nucleicos y fosfolípidos. A la solubilización de fosfato orgánico también se le llama mineralización de fósforo orgánico. El fosfato orgánico puede mineralizarse en el suelo por medio de 3 grupos de enzimas: las fosfatasas ácidas, fitasas, y fosfatasas alcalinas. Las que están más involucradas son las fitasas y las fosfatasas ácidas. El fósforo orgánico es defosforilado por fosfatasas para ser asimilado por las plantas, las fosfatasas de la rizósfera son exudadas por las plantas o por microorganismos del suelo como las bacterias que mineralizan fosfato orgánico (Tarafdar y Junk, 1987; Pradel y Boquet, 1988). La degradabilidad de compuestos fosforados orgánicos depende principalmente de la fisicoquímica y las propiedades bioquímicas de sus moléculas; por ejemplo los ácidos nucleicos, los fosfolípidos y los fosfatos de azúcar se rompen fácilmente, pero el ácido fítico y los polifosfatos se descomponen más lentamente (Ohtake *et al.*, 1996). Se ha observado que los microorganismos usan más P mineralizado que las plantas. Las bacterias *Bacillus megaterium*, *Bacillus mesentericus* y *Pseudomonas putida* solubilizan las formas orgánicas del fósforo (ortofosfato) y las transforman en fosfatos asimilables por las plantas (Rodríguez *et al.*, 2001).



La naturaleza de los minerales fosfatados predominantes en un suelo depende principalmente de pH del suelo. En suelos neutros o alcalinos la mayor proporción de fosfato se encuentra asociado a calcio. En los suelos de reacción ácida predominan los fosfatos insolubles de hierro y de aluminio. Cuando se utilizan enmiendas cálcicas se fija el fósforo como fosfato tricálcico. Las adiciones sistemáticas y elevadas de fertilizantes fosfatos al suelo, van saturando su capacidad de fijación de fósforo, fijando cada vez más lentamente y en menor proporción el fósforo agregado. Debido a lo descrito anteriormente, menos del 5% de fósforo está disponible para la planta, por lo que el uso de microorganismos puede favorecer la asimilación de éste (Torriani-Gorinni, 1994). Varios estudios han determinado la capacidad de los distintos géneros bacterianos para solubilizar compuestos insolubles de fosfato inorgánico, como el fosfato tricálcico, fosfato dicálcico, hidroxiapatita y roca fosfórica mediante la producción de ácidos orgánicos (Rodríguez y Fraga, 1999). La producción de ácidos orgánicos da como resultado la acidificación de la célula microbiana y sus alrededores (Toro *et al.*, 1997). El ácido glucónico parece ser el agente más frecuente para la solubilización de fosfato mineral, pero estudios han demostrado que el más eficiente es el ácido 2-cetoglucónico (Goldstein, 2003). Las cepas de *Bacillus* pueden producir mezclas de ácido láctico, isovalérico, isobutírico y acético. Otros ácidos como el ácido glicólico, oxálico, malónico y ácido succínico, también son eficientes en la solubilización de fosfato (Rodríguez y Fraga, 1999). Entre las bacterias con mayor capacidad para producirlos, en orden prioritario están los géneros: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium* y *Erwinia* (Trivedi y Sat, 2008). Hay poblaciones considerables de bacterias solubilizadoras de fosfatos en el suelo (BSP) y en la rizósfera (Alexander, 1980), que incluyen aeróbicos y anaerobios (Richardson, 2001). Las bacterias que solubilizan normalmente se encuentran en la rizósfera. Además, distintas especies de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* y *Azospirillum*, son bacterias endófitas debido a que poseen capacidad penetrar y colonizar las raíces de las plantas, así como de fijar nitrógeno y promover el crecimiento vegetal (Halder y Chakrabarty 1993; Surange y Kumar 1993). Las bacterias endófitas han sido aisladas tanto de plantas dicotiledóneas como de monocotiledóneas. Sin embargo, son poco conocidos los mecanismos de penetración y colonización de las bacterias endófitas a la raíz; así como el papel que juegan las enzimas hidrolíticas producidas por las bacterias como las pectinasas y celulasas en el proceso.

Los fosfatos inorgánicos aplicados como fertilizantes químicos también son inmovilizados en el suelo y como consecuencia no son solubles para ser aprovechados por los cultivos (Peix *et al.* 2004). Por lo tanto se considera, que la solubilización de distintas rocas fosfatadas y de otras fuentes de fósforo inorgánico por los microorganismos del suelo es una alternativa fundamental para incrementar la cantidad de nutriente disponible para las plantas (Illmer y Schinner, 1992). El fósforo mineral se solubiliza mediante la quelación, la reducción del hierro y la acidificación, Generalmente, se acepta que el mecanismo mayor de solubilización de fosfato mineral es la acción de ácidos orgánicos sintetizada por los microorganismos de la rizosfera. Por lo tanto, la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular por las bacterias solubilizadoras de fosfato, tiene importancia como mecanismo de movilización del P.

La fisiología de solubilización de fosfato no se ha estudiado completamente (Goldstein *et al.*, 2003). Hoy en día, se están llevando a cabo el entendimiento de la solubilización del fosfato como un bioproceso, donde el paso número uno es la producción de glucosa, el número 2 es el uso de la glucosa por las BSP, para producir el ácido orgánico que solubiliza al fosfato mineral.

La generación de conocimientos acerca de los metabolitos producidos por las BSP, permitirá tener en forma más clara como se da el bioproceso de solubilización de fosfato. Con el presente proyecto, se busca contribuir en el conocimiento de los metabolitos involucrados en la solubilización de fosfato orgánico e inorgánico y al entendimiento de los mecanismos de penetración y colonización de las BSP en la raíz de maíz, trigo, avena y cebada.

## LITERATURA CITADA

Alexander, M. 1980. Introducción a la microbiología del suelo. Libros y Editoriales. México. 491 p.

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.

Halder, A K., and P. K. Chakrabartty. 1993. Solubilization of inorganic phosphates by *Rhizobium*. Folia Microbiol. 38:325-330.

Hayes, J.E., Richardson, A.E., Simpson, R.J. (2000) Components of organic phosphorus in soil extracts that are hydrolysed by phytase and acid phosphatase. Biology and Fertility of Soils 32:279–286.

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

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.

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.

Pradel, E., P. L. Boquet. 1988. Acid phosphatases of *Escherichia coli*: molecular cloning and analysis of *agp*, the structural gene for the periplasmic acid glucose phosphatase. J Bacteriol 170 : 4916–4923.

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.

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.

Surange, S., and N. Kumar. 1993. Phosphate solubilization under varying pH by *Rhizobium* from tree legumes. Indian J. Exp. Biol. 31:855-857.

Tarafdar, J. C., and A. Jungk. 1987. Phosphatase activity in the rhizosphere and its relation on the depletion of soil organic phosphorus. Biol. Fert. Soils 3:199-204.

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.

Troeh, F. R., and L. M. Thompson. 1993. *Soils and Soil Fertility*, 5th ed. New York: Oxford University Press, 1993.

## CAPITULO II

### OBJETIVOS E HIPÓTESIS

#### OBJETIVO GENERAL

Identificar metabolitos producidos por bacterias solubilizadoras de fosfato aisladas de la raíz y rizoplasma de diferentes cultivos, y determinar la capacidad de tres cepas de *Burkholderia* para colonizar las raíces de avena, cebada, trigo y maíz.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar bacterias solubilizadoras de fosfato (BSP) de la raíz y rizoplasma de hortalizas, gramíneas y árboles frutales.
2. Evaluar medios de cultivo para el aislamiento de BSP eficientes.
3. Desarrollar un nuevo medio de cultivo para detectar de forma visual, rápida y eficiente la solubilización del fosfato tricálcico.
4. Evaluar la capacidad de BSP aisladas de raíz y rizoplasma de diferentes gramíneas, solas y en consorcio, para producir *in vitro* ácidos orgánicos relacionados con la solubilización fosfato tricálcico y roca fosfórica.
5. Determinar *in vitro* la producción de fosfatasas ácidas y alcalinas (extracelulares e intracelulares) por las BSP.
6. Determinar la producción de ácido indol acético (AIA) y oxidación del gluconato por las BSP.
7. Identificar taxonómicamente a las BSP más eficientes en la solubilización de fosfato.

8. Determinar la capacidad de tres cepas de *Burkholderia* solubilizadoras de fosfato para penetrar y colonizar las raíces de avena, cebada trigo y maíz.

## **HIPÓTESIS**

- En la raíz y rizoplano de plantas cultivadas en los estados de Michoacán, Tlaxcala, Puebla, Hidalgo y México, existen diferentes géneros bacterianos capaces de solubilizar fosfato inorgánico mediante la producción de ácidos orgánicos, como principal mecanismo de solubilización, y de mineralizar fosfato orgánico a través de la actividad de las fosfatasas.
- Entre las BSP existen bacterias endófitas productoras de enzimas hidrolíticas que les permiten penetrar y colonizar las raíces de sus plantas hospedantes.

### CAPITULO III

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

### Organic Acids Produced by Phosphate Solubilizing Rhizobacteria: A Critical Review

Marianela Paredes-Mendoza<sup>1\*</sup>; David Espinosa-Victoria<sup>1</sup>

(1) Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México, México. 56230.

\*[marianela@colpos.mx](mailto:marianela@colpos.mx)

\* Corresponding author

### 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-cetogluónico, ácidos alifáticos.

### ABSTRACT

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, gliconic, 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.

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



## 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  $\text{H}_2\text{PO}_4$  en suelos ácidos, y como  $\text{HPO}_4^{2-}$  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  $\mu\text{M}$  (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 hidroxiapatita. 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-diketoglucónico (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 3.1.

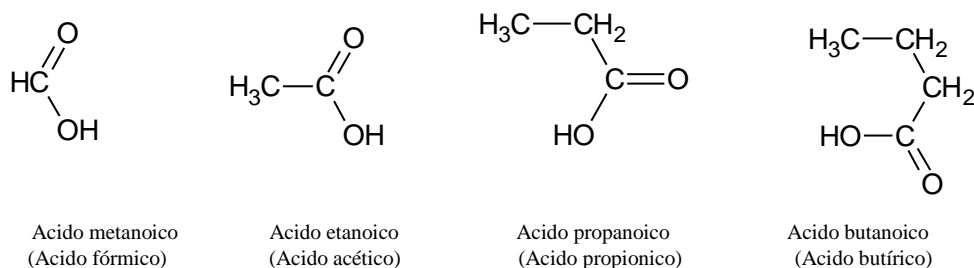
Las BSP solubilizan compuestos como el fosfato tricálcico, el fosfato dicálcico, la hidroxipatita y la roca fosfórica. Hay numerosas especies de bacterias solubilizadoras de fosfatos en el suelo y en la rizósfera (Gupta *et al.*, 1994) que incluyen aerobias y anaerobios (Richardson, 2001). Las bacterias que solubilizan fosfatos se encuentran normalmente en la rizósfera. Las bacterias solubilizan el fosfato inorgánico por medio de la producción de CO<sub>2</sub>, ácidos orgánicos, excreción de protones y asimilación de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (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.

### Cuadro 3.1. 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 de 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 hidroxapatita 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 esta 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 $\text{NH}_4^+$ . | Nuevas aportaciones para entender los mecanismos de solubilización del fosfato.  | Illmer <i>et al.</i> (1995)           |
| Primer congreso de microorganismos solubilizadores de fosfato.  | Intercambio de experiencias entre científicos.   | Velásquez 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 endofitas y epifitas 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 tricalcico por <i>Burkholderia cepacia</i> CC-A174   | Entendimiento del mecanismo de acción del ácido glucónico en la solubilización de fosfato.   | Ta-Fa <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 amonio y la producción de ácidos orgánicos.            | Entendimiento de los mecanismos de solubilización de fosfato por bacterias promotoras de crecimiento.  | Park <i>et al.</i> , (2009)           |

## 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 3.1).

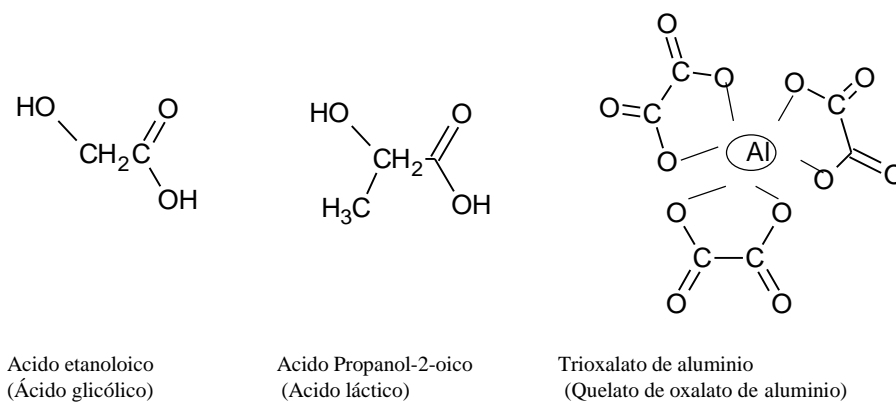


**Figura 3.1. Ácidos orgánicos alifáticos producidos por bacterias solubilizadoras de fosfato.**

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  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Al}^{3+}$ . Reacciones similares ocurren al

prevenir la fijación de fosfatos añadidos al suelo como fertilizantes. Se ha demostrado que los ácidos orgánicos reducen la 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 tricarboxílicos (ácido cítrico) forman quelatos más estables que los ácidos dibásicos (málico y tartárico).

Pero menos estables son aún los quelatos conocidos como  $\alpha$ -hidroxi monobásicos. Algunos ácidos dibásicos alifáticos derivados de alcoholes forman complejos más fuertes y los compuestos  $\alpha$ -hidroxi son más efectivos que los derivados  $\alpha$ -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 hidroxilo se consideran más efectivos en el ataque al fosfato férrico que sus similares no sustituidos (Figura 3.2). 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).



**Figura 3.2. Hidroxiácidos producidos por bacterias solubilizadores de fosfato.**

## 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 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  $\sim 3.4$  y  $\sim 2.6$ , 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

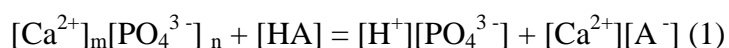
de oxidación directa es el mecanismo primario para la utilización de aldosas. La primera oxidación se cataliza por la quinoproteína glucosa deshidrogenasa, así llamada porque pertenece al grupo de enzimas bacterianas que utilizan el cofactor quinónico PQQ(2,7,9-tricarboxil-1Hpirrolo[2,3-f]quinolina-4,5-diona). 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 que ciertos elementos minerales juegan un papel en este proceso.

### Cuadro 3.2. Ácidos orgánicos y sus rutas biosintéticas en bacterias solubilizadoras de fosfato (BSP).

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



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 3.2). 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 pirroloquinolina 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 yGoel, 2003; Trivedi ySat, 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 (BSP), 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. Hort.* 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. *Agronomie* 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. 1995a. Solubilization of inorganic calcium phosphates solubilization mechanisms. *Soil Biol. Biochem.* 27:257-263.
- Illmer, P., A. Barbato, and F. Schinner. 1995b. 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 phosphatesolubilizing 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,*
- Grupta, W. S., 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, Darmwa IN. 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.

## CAPITULO IV

### MEDIOS DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO DE BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO

Marianela Paredes-Mendoza<sup>1</sup>; David Espinosa-Victoria<sup>1\*</sup>; Luc Dendooven<sup>2</sup>; Elvira Rios-Leal<sup>2</sup>

<sup>(1)</sup> Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México, México. 56230. [despinos@colpos.mx](mailto:despinos@colpos.mx),

<sup>(2)</sup> Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México D.F.

\* Corresponding author

#### RESUMEN

Existen diferentes medios de cultivo para el aislamiento y estudio de las bacterias solubilizadoras de fosfato. En el presente estudio se compararon los medios de cultivo PVK (Picovskaya), NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate growth médium) y dos medios mínimos propuestos que fueron designados como MMSFCP (Medio Mínimo para Solubilización de Fosfato Colegio de Postgraduados) y MMSFCP-Mg (MMSFCP con MgCl) para estudiar la solubilización de fosfato en medio sólido y líquido de las bacterias aisladas de las raíces y rizoplano de diferentes cultivos. Se aislaron 147 cepas bacterianas, el mayor número de bacterias solubilizadoras de fosfato fueron aisladas de maíz y cebada. El medio de cultivo MMSFCP-Mg fue el más eficiente comparado con los otros medios, debido a que en placa se observaron halos de solubilización de hasta 3.8 cm a los catorce días, y en medio líquido se determinaron hasta 380 mg mL<sup>-1</sup> de fosfato soluble a los seis días. Por la eficacia que presentó el medio MMSFCP-Mg este fue utilizado en los estudios de solubilización de fosfato y producción de ácidos orgánicos usando fosfato tricálcico como fuente de P. En adición, se detectó la presencia de ácido 2-cetoglucónico y ácido glucónico, como principales productos de la oxidación directa de la glucosa. Se concluye que el medio MMSFCP-Mg contiene los componentes mínimos adecuados para llevar a cabo una eficiente solubilización del fosfato: la glucosa como principal fuente de carbono, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> como fuente de nitrógeno, Mg y fosfato tricálcico como fuentes de fosfato insoluble.



**Palabras clave:** ácidos orgánicos, medio MPBRIP, microorganismos solubilizadores de fosfato, fosfato insoluble, azul de bromofenol.

## INTRODUCCIÓN

Por ser el fósforo un elemento químicamente muy reactivo, este solo se encuentra en el suelo formando compuestos con otros elementos como el calcio, hierro, aluminio y manganeso (Stephen y Jisha, 2009). El fósforo es liberado en forma de iones ortofosfato primario ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) y ortofosfato secundario ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ), ambos presentes en pequeñas cantidades en la solución del suelo, siendo el primario el más absorbido por las plantas (Beever y Burns 1980; Illmer y Schinner 1992; Richardson, 2001), y la mayor concentración de fósforo en el suelo está en forma no disponible. Aunque, por mucho tiempo los investigadores han tratado de incrementar las concentraciones de P disponibles para las plantas mediante el empleo de microorganismos solubilizadores de fosfato (Gerretsen, 1948; Johnson, 1954; Peix *et al.*, 2001; Alikhani *et al.*, 2006).

Existe un considerable número de poblaciones de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSP) en el suelo y la rizósfera, y que incluyen tanto microorganismos aerobios como anaerobios (Katznelson *et al.*, 1962; Richardson, 1994; Rodríguez y Fraga, 1999). El mecanismo más común de solubilización de fosfato, particularmente del fosfato de calcio es la acidificación, a través de la biosíntesis y secreción de ácidos orgánicos (Toro *et al.*, 1997).

Los análisis semicuantitativos y la detección visual en medio de cultivo sólido, son los métodos más comunes para el aislamiento y selección preliminar de microorganismos solubilizadores de fosfato. Normalmente, el medio de cultivo contiene fosfato mineral insoluble (fosfato tricalcico o hidroxapatita) como fuente de P y los microorganismos solubilizadores son detectados por la formación de un halo o zona clara alrededor de la colonia, resultado de la producción de ácidos orgánicos liberados en el medio circundante, los cuales son los responsables de la solubilización de los fosfatos insolubles presentes en el medio (Vázquez *et al.*, 2000; Rodríguez y Fraga, 1999). Los métodos que usan este principio son el agar PVK (Picovskaya, 1948), el agar Sperber (Sperber, 1958) y el NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium) (Nautiyal, 1999). En algunos casos los resultados han sido contradictorios, sobre todo cuando se compara la detección del halo en medio de cultivo

sólido y la solubilización del fosfato en medio líquido. Se ha indicado que algunas bacterias no producen halo visible en medio sólido, pero son capaces de solubilizar varios tipos de fosfato inorgánico insoluble en medio líquido, debido probablemente a la variación en el grado de difusión de los ácidos orgánicos secretados por los microorganismos (Nautiyal, 1999). También, se han desarrollado medios de cultivo que incluyen en su formulación el indicador azul de bromofenol. Gupta *et al.*, (1994) fueron los primeros que adicionaron azul de bromofenol a los medios sólidos de Picovskaya y Sperber, posteriormente, Meheta y Nautiyal (2001) desarrollaron el medio de cultivo NBRIP con  $0.025 \text{ mgL}^{-1}$  de azul de bromofenol, designándolo NBRIP-BPB. El fundamento del uso del azul de bromofenol se basa en la propiedad que tiene este indicador, de virar del color azul al amarillo cuando se baja el pH del medio, y esto es debido a la producción de ácidos orgánicos por las bacterias solubilizadoras de fosfato (BSP), lo que permite visualizar la solubilización de forma rápida y sencilla (Goldstein, 1986; Illmer *et al.*, 1995; Katiyar y Goel, 2003). El presente trabajo tuvo como objetivos evaluar los medios de cultivo empleados para el aislamiento y detección de BSP, así como desarrollar un nuevo medio de cultivo para detectar de forma visual, rápida y eficiente la solubilización del fosfato tricálcico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfato

Se realizaron muestreos de raíces y del rizoplano de diferentes cultivos (Cuadro 4.1) en localidades de los estados de Michoacán (Patzcuaro, Zirahuén), Tlaxcala (Cacaxtla, San Miguel del Milagro), Puebla (Cholula, San Martín Texmelucan, San Salvador el verde y Huejotzingo), Hidalgo (Pachuca, Ciudad Sahugún, Tulancingo) y México (Texcoco, San Juan Teotihuacán y Amecameca). Las muestras fueron transportadas al laboratorio en una hielera con hielo. Las raíces de cada especie fueron sacudidas suavemente para eliminar el suelo sobrante y conservar la película de suelo adherido a su superficie (rizoplano). A continuación, se maceraron 10 g de raíces y suelo adherido procediéndose a disolver el macerado en 90 mL de NaCl al 0.85%. Con el homogenizado se realizaron diluciones decimales seriadas, inoculando  $0.1 \mu\text{L}$  en placas de medio PVK (Picovskaya, 1948). Las bacterias que formaron halo fueron purificadas.

**Cuadro 4.1. Cepas solubilizadoras de fosfato aisladas en placas de medio PVK (Pikovskaya, 1948) provenientes de raíz y rizoplaneo de diferentes cultivos y localidades.**

| Localidad                               | Cultivo   | Número de aislamientos bacterianos |
|---|---|------------------------------------|
| Pátzcuaro, Michoacán                    | Maíz  | 23                                 |
| Zirahuén, Michoacán                     | Maíz, aguacate, durazno, chirimoya y guayabo    | 20                                 |
| Cacaxtla, Tlaxcala                      | Maíz azul                                       | 17                                 |
| San Miguel del Milagro, Tlaxcala        | Maíz azul, amaranto y girasol                   | 15                                 |
| Amecameca, Estado de México             | Amaranto  | 0                                  |
| Texcoco, Estado de México               | Maíz, cebolla, alfalfa, lechuga y espinacas     | 0                                  |
| San Juan Tehotihuacan, Estado de México | Alfalfa, maíz                                   | 0                                  |
| Cholula, Puebla                         | Maíz  | 0                                  |
| San Martín Texmelucan, Puebla           | Pera, manzano y durazno                         | 0                                  |
| Huejotzingo, Puebla                     | Lechuga y maíz                                  | 0                                  |
| San Salvador el Verde, Puebla           | Ayocote, haba, frijol, espinacas, tomate y maíz | 0                                  |
| Pachuca, Hidalgo                        | Cebada y trigo                                  | 22                                 |
| Ciudad Sahagún, Hidalgo                 | Cebada, avena y trigo                           | 39                                 |
| Tulancingo, Hidalgo                     | Cebada  | 11                                 |
|   |   | Total = 147                        |

### **Determinación de la capacidad solubilizadora de fosfato**

Cada una de las cepas de bacterias aisladas fueron inoculadas en diferentes medios con la finalidad de determinar el medio óptimo para la solubilización de fosfato. Los medios tradicionales usados fueron: PVK (Pikovskaya 1948) y NBRIP (Nautiyal 1999). Adicionalmente, se emplearon dos medios mínimos desarrollados en el laboratorio de Interacción Molecular Planta-Microorganismo del Colegio de Postgraduados, México, que fueron designados como MMSFCP (Medio Mínimo para Solubilización de Fosfato Colegio de Postgraduados) y MMSFCP-Mg (MMSPCP adicionado con MgCl). El pH de todos los medios fue ajustado a 7 después de la

esterilización. Los medios fueron suplementados con 15 gL<sup>-1</sup> Bacto-agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Cada cepa fue inoculada por triplicado. El diámetro del halo de cada colonia bacteriana fue registrado a los 14 días de incubación a 28 °C. El diámetro del halo (Cuadro 4.2) fue calculado restando al diámetro total el diámetro de la colonia.

**Cuadro 4.2. Formulación de los medios de cultivo PVK, NBRIP, MMSFCP y MMSFCP-Mg, usados para detectar la presencia de bacterias solubilizadoras de fosfato.**

| Componente                                      | Medio de Cultivo |                    |                     |                        |
|---|------------------|--------------------|---------------------|------------------------|
|   | PVK <sup>a</sup> | NBRIP <sup>b</sup> | MMSFCP <sup>c</sup> | MMSFCP-Mg <sup>d</sup> |
|   | gL <sup>-1</sup> |                    |                     |                        |
| Glucosa   | 10               | 10                 | 10                  | 10                     |
| Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> | 5                | 5                  | 5                   | 5                      |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0.5              | 0.1                | 1                   | 1                      |
| NaCl  | 0.2              | 0                  | 0                   | 0                      |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O            | 0.1              | 0.25               | 0                   | 0                      |
| KCl   | 0.2              | 0.2                | 0                   | 0                      |
| Extracto de levadura                            | 0.5              | 0                  | 0.5                 | 0.5                    |
| MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O             | 0.002            | 0                  | 0                   | 0                      |
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O            | 0.002            | 0                  | 0                   | 0                      |
| MgCl <sub>2,6</sub> ·H <sub>2</sub> O           | 0                | 5                  | 0                   | 3                      |

<sup>a</sup> Medio Picovskaya (Picovskaya 1948), <sup>b</sup> National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium (Nautiyal 1999), <sup>c</sup> Medio Mínimo para Solubilización de Fosfato Colegio de Postgraduados (MMSFCP) y <sup>d</sup> MMSFCP-Mg (MMSFCP con MgCl).

Para la determinación cualitativa (visual) de la actividad solubilizadora de P se seleccionaron las cepas con mayor diámetro de halo del ensayo anterior, y se empleó azul de bromofenol (Gupta *et al.*, 1994; Mehta y Nautiyal, 2001) en los medios de cultivo. Se adicionaron 0.025 gL<sup>-1</sup> de azul de bromofenol a los medios líquidos MMSFCP, MMSFCP-Mg y PVK a los cuales se les denominó MMSFCP -BR, MMSFCP -MgBR y PVK-BR (Gupta *et al.*, 1994), respectivamente. Se usó el medio NBRIP-BPB (Mehta y Nautiyal, 2001) como control positivo. Cada cepa bacteriana fue ajustada a 0.3 de absorbancia en caldo nutritivo y se adicionaron 10 µL de suspensión bacteriana a tubos de 50 mL que contenían 20 mL de cada uno de los medios. La inoculación se hizo por triplicado y los cultivos fueron incubados a 160 rpm a 25 °C, durante 5 días. El cambio de color del medio de azul a amarillo fue monitoreado cada 24 h.

Para la determinación cuantitativa del P se emplearon matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de los medios MMSFCP, MMSFCP-Mg, PVK y NBRIP los cuales fueron inoculados con la cepa bacteriana respectiva (1 mL de inóculo con aproximadamente  $1 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>). Como testigos se emplearon los medios de cultivo sin inocular. Los matraces se incubaron a 160 rpm a 25 °C, durante 30 días. Se tomó una alícuota de 5 mL cada 2 días la cual se filtró primero a través de papel Watman no. 5 (Whatman, Maidstone, Inglaterra) y luego en filtros con poro de tamaño 0.45 (Millipore, Bedford, USA). Finalmente, se midió el pH del filtrado y se procedió a la determinación del P soluble de acuerdo al método de Bray y Kurtz (1945).

Para la determinación de la solubilización de fosfato se reemplazó a la glucosa usando fructosa y sacarosa como fuentes de carbono en el medio MMSFCP-Mg líquido. Se tomaron alícuotas cada 24 h y se les determinó el pH y P soluble como se indicó previamente (Reyes et al., 2001).

### **Identificación de ácidos orgánicos a través de HPLC**

Una alícuota de 1 mL de los filtrados de los cultivo se empleó para determinar la presencia de ácidos orgánicos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con un detector ultravioleta (Baziramakenga 1994; Kim *et al.*, 1997). Se empleó una columna REXES para detección de ácidos orgánicos (300 X 7.8 mm) marca Phenomex (Phenomenex, Torrance, CA) y como fase móvil H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM, con un flujo de 0.4 mLmin<sup>-1</sup>, a una presión de 10 MPa y temperatura de 25 °C. Los picos correspondientes a cada ácido orgánico fueron detectados a 210 nm e identificados de acuerdo al tiempo de retención de los estándares comerciales ácido 2-cetoglucónico (Sigma, Germany), ácido glucónico (Sigma, Germany) y Organic Acid KiT (SUPELCO, Germany) (Kim *et al.*, 1997).

### **Análisis estadístico**

Los valores obtenidos fueron analizados por medio del programa estadístico XLSTAT-PRO 7.5 (2006). Se efectuó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey, considerando un 5% de significancia para detectar la existencia de diferencias estadísticas significativas entre los diferentes medios de cultivo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Bacterias aisladas de la raíz y rizoplasma

En total, se aislaron 147 cepas bacterianas solubilizadoras de fosfato de la raíz y rizoplasma de diferentes plantas cultivadas (Cuadro 4.1). Las cepas aisladas fueron capaces de utilizar el  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de manera más eficiente, disminuyendo el pH del medio lo que promovió la solubilización de P. En el medio NBRIP se detectó el menor número de bacterias formadoras de halo de solubilización, debido probablemente a la baja concentración de nitrógeno del medio (0.1 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) y a la ausencia del extracto de levadura, esta última es la fuente que aporta los factores de crecimiento. Se ha sugerido que el medio NBRIP es el mejor medio para detección y estudio de los microorganismos solubilizadores de fosfato más eficientes (Mehta y Nautiyal, 2001). Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que las bacterias más eficientes se aislaron en los medios de cultivo PVK, MMSFCP y MMSFCP-Mg (Cuadros 4.3 y 4.4). El medio NBRIP resultó ser un excelente medio mínimo para el aislamiento de microorganismos, que crecen en suelos alcalinos, con bajos contenidos de nitrógeno y en condiciones de estrés, no fue así para microorganismos que crecen en otro tipo de suelos, como son los suelos ácidos o suelos con elevado contenido de materia orgánica (Johri *et al.*, 1999; Mehta y Nautiyal, 2001). Además, se ha indicado que no existe una formulación única debido a la gran biodiversidad de microorganismos solubilizadores de fosfato (Rodríguez y Fraga, 1999). La adecuada concentración de nitrógeno en los medios de cultivo empleados para detectar actividad solubilizadora de fosfato es vital, debido a que algunos mecanismos de solubilización dependen de la presencia de  $\text{NH}_4^+$  (Asea *et al.*, 1988). Por otro lado, la excreción de protones  $\text{H}^+$  que acompaña a la asimilación de  $\text{NH}_4^+$  ha sido sugerido como otro mecanismo para la solubilización de fosfato (Illmer y Schinner, 1995), ya que promueve la disminución del pH del medio y la formación de HCl que solubiliza el fosfato.

**Cuadro 4.3. Número de bacterias formadoras de halo de solubilización de fosfato, aisladas de la raíz y rizoplasma de diferentes plantas, y crecidas en los medios de cultivo PKV, NBRIP, MMSFCP y MMSFCP-Mg.**

| Planta                             | Número de bacterias * formadoras de halo (14 días) |       |        |           |
|------------------------------------|--|-------|--------|-----------|
|                                    | Medio de cultivo                                   |       |        |           |
|                                    | PVK  | NBRIP | MMSFCP | MMSFCP-Mg |
| Maíz                               | 71   | 5     | 71     | 71        |
| Trigo                              | 19   | 2     | 19     | 19        |
| Avena                              | 27   | 0     | 27     | 27        |
| Cebada                             | 26   | 2     | 26     | 26        |
| Amaranto                           | 2  | 0     | 2      | 2         |
| Girasol                            | 2  | 1     | 2      | 2         |
| Durazno                            | 0  | 0     | 0      | 0         |
| Manzano                            | 0  | 0     | 0      | 0         |
| Pera                               | 0  | 0     | 0      | 0         |
| Frijol                             | 0  | 0     | 0      | 0         |
| Haba                               | 0  | 0     | 0      | 0         |
| Ayacote                            | 0  | 0     | 0      | 0         |
| Lechuga                            | 0  | 0     | 0      | 0         |
| Cebolla                            | 0  | 0     | 0      | 0         |
| Tomate                             | 0  | 0     | 0      | 0         |
| Espinacas                          | 0  | 0     | 0      | 0         |
| Girasol                            | 0  | 0     | 0      | 0         |
| Alfalfa                            | 0  | 0     | 0      | 0         |
| Chirimoya                          | 0  | 0     | 0      | 0         |
| Aguacate                           | 0  | 0     | 0      | 0         |
| Guayabo                            | 0  | 0     | 0      | 0         |
| Total bacterias formadoras de halo | 147  | 10    | 147    | 147       |

<sup>a</sup>Cada valor representa la media de tres repeticiones

El mayor número de BSP se presentó en maíz y avena. Las BSP solo se encontraron en gramíneas y no en otro tipo de plantas (Cuadro 4.3). Sylvester-Bradley *et al.*, (1982) propusieron que a pesar de que las leguminosas presentan menor población microbiana a nivel de rizosfera que las gramíneas, en la rizosfera de las leguminosas predominan las bacterias solubilizadoras de P, lo cual sugiere que las leguminosas pudieran exudar a través de las raíces compuestos orgánicos, que promueven la proliferación de bacterias solubilizadoras de P. En el presente estudio no se aislaron bacterias solubilizadoras de fosfato en las leguminosas, debido a que su presencia no depende únicamente de la especie vegetal sino de otros factores como la microbiota y las condiciones del suelo (Nahas, 1996; Nivedita *et al.*, 2003).

## Capacidad solubilizadora de fosfato de las bacterias aisladas

Se ha reportado la existencia de bacterias que no producen halos de solubilización en placas de agar, sin embargo tienen la capacidad de solubilizar el fosfato inorgánico insoluble en medio líquido (Mehta y Nautiyal, 2001). En el Cuadro 4.4 se presentan los resultados de las bacterias seleccionadas porque fueron positivas a la prueba de azul de bromofenol dos días después de la incubación y además tuvieron una alta solubilización de fosfato para alguno de los medios empleados. En el medio MMSFCP-Mg se obtuvo la solubilización más alta de fosfato tricálcico por la cepa NS1 (380 mgL<sup>-1</sup>). Existieron diferencias significativas en el diámetro de halo y en el P soluble entre los medios MMSFCP-Mg, PVK y MMSFCP-Mg. Se ha observado que la adición de Mg en el medio MMSFCP-Mg es vital, ya que juega un papel importante en la producción de ácidos orgánicos, debido a que muchas enzimas involucradas en su síntesis necesitan concentraciones altas de este ión (Johri et al. 1999). La adición de magnesio afectó favorablemente la solubilización de fosfato, pues se observaron halos más grandes en el medio MMSFCP-Mg que en los medios MMSFCP y PVK que no lo incluyeron.

**Cuadro 4.4. Diámetro del halo de solubilización y concentración de P soluble de 10 aislamientos bacterianos crecidos con cuatro diferentes medios de cultivo.**

| Cepa  | Fuente  | Diámetro del halo a los 14 días<br>(cm) |          |         |           | P soluble a los 6 días<br>(mgL <sup>-1</sup> ) |           |           |           |
|-------|---------|---|----------|---------|-----------|--|-----------|-----------|-----------|
|       |         | PVK                                     | NBRIP    | MMSFCP  | MMSFCP-Mg | PVK  | NBRIP     | MMSFCP    | MMSFCP-Mg |
| MC25  | Maíz    | 1.8 fgh                                 | 2.0 defg | 2.1 def | 2.5 cd    | 259.0 cd                                       | 198.3 d   | 253.0 c   | 268.0 cd  |
| MP37b | Maíz    | 1.0 jkl                                 | 0.0 m    | 1.1 jkl | 1.7 fghi  | 160.0 gh                                       | 22.0 pq   | 177.0 efg | 268.0 cd  |
| MP35  | Maíz    | 1.5 ghij                                | 1.3 hij  | 1.3 hij | 1.9 efg   | 105.0 lm                                       | 75.0 o    | 111.4 kl  | 126.2 jk  |
| AVN   | Avena   | 2.0 defg                                | 0.0 m    | 1.8cde  | 2.4 de    | 26.0 p   | 1.0 r     | 24.0 p    | 88.1 no   |
| RT12  | Trigo   | 0.7 i                                   | 0.0m     | 0.7 i   | 1.7 fghi  | 165.0 fgh                                      | 4.9 qr    | 133.0 ij  | 127.0 jk  |
| NS1   | Cebada  | 1.0 jkl                                 | 0.0m     | 0.8 hi  | 2.0 defg  | 351.0 b  | 1.0 r     | 361.4 ab  | 380.0 a   |
| GT14  | Girasol | 3.5 ab                                  | 0.0m     | 3.0 bc  | 3.8 a     | 160.0 gh                                       | 111.4 kl  | 165.3 fgh | 180.0 ef  |
| IT13  | Trigo   | 1.5 ghij                                | 1.0 jkl  | 0.8 hi  | 2.2 def   | 106.0 lmn                                      | 2.3 qr    | 92.0 mno  | 99.0 lmn  |
| MC1   | Maíz    | 0.0 m                                   | 0.2 m    | 0.0 m   | 0.2 m     | 177.0 efg                                      | 181.0 efg | 254.0 cd  | 260.0 cd  |
| MC4   | Maíz    | 2.1 def                                 | 0.0 m    | 1.2 ij  | 2.5 cd    | 149.0 hi                                       | 4.9 p     | 158.0 h   | 198.0 d   |
| MC2   | Maíz    | 1.7 fghi                                | 0.0 m    | 1.9 cd  | 2.4 de    | 160.0 gh                                       | 37.4p     | 152.2 h   | 195.0 d   |

ANOVA ( $P \leq 0,05$ ) valores con igual letra minúscula en las hileras no presentaron diferencias significativas, según la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) para separación de medias con  $P < 0.05$ .



Para la determinación cuantitativa de la concentración del P soluble es necesaria la utilización de métodos químicos, que son tardados y caros. Gupta *et al.*, (1994) y Mehta y Nautiyal (2001) desarrollaron métodos para la estimación cualitativa y cuantitativa de la solubilización de fosfatos por hongos y bacterias, usando un indicador de pH como el azul de bromofenol, debido a que la solubilización ha sido asociada con la disminución del pH (Seshadri *et al.*, 2007). Sus resultados sugieren que estos métodos son excelentes para el estudio inicial de los microorganismos solubilizadores de fosfato. La utilización de estos métodos indicó que en bacterias donde no se produce una alta concentración de ácidos orgánicos y de protones, no hay un cambio de color del indicador. Por ejemplo, la cepa MC2 disminuyó el pH de 7.6 a 3.5 y cambió el color del medio a los 2 días incubación, mientras que la cepa AVN no cambió el color del medio ya que su pH fue de 5.4 y el rango de pH del azul de bromofenol es de 3.0 a 4.6. Así, estos métodos aunque sencillos y económicos tienen como limitante no detectar bacterias con poca capacidad solubilizadora. En la prueba de azul de bromofenol y en la de P-soluble con los medios MMSFCP, PVK y MMSFCP-Mg se observaron diferencias significativas (Cuadro 4.5), siendo el medio NBRIP-PBP donde se obtuvo el menor número de bacterias positivas a la prueba. En el medio MMSFCP-Mg se obtuvo un rango de solubilización de 58-370 mgL<sup>-1</sup> y el mayor número de bacterias aisladas fueron positivas a la prueba de azul de bromofenol. Debido a que el medio MMSFCP-Mg resultó ser el más eficaz para determinar la solubilización de fosfato, fue empleado en los estudios de solubilización usando diferentes fuentes de carbono, así como en la identificación de ácidos orgánicos.

**Cuadro 4.5. Comparación en la capacidad solubilizadora de P por bacterias aisladas de la raíz y rizoplasma de diferentes plantas usando los medios de cultivo PVK, NBRIP, MMSFCP y MMSFCP-Mg.**

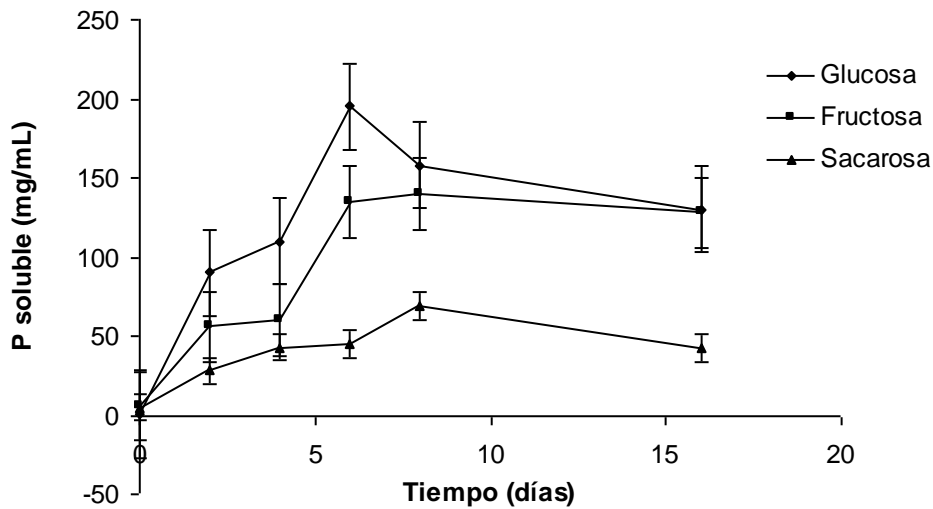
| Planta                   | P soluble determinado a los 6 días<br>(mgL <sup>-1</sup> ) |        |               |        | Número de Bacterias <sup>a</sup> Positivas a la prueba azul de<br>bromofenol a los 6 días de incubación |           |             |           |
|--------------------------|--|--------|---------------|--------|---|-----------|-------------|-----------|
|                          | PVK  | MMSFCP | MMSFCP-<br>Mg | NBRIP  | PVK-<br>BR  | MMSFCP-BR | MMSFCP-MgBR | NBRIP-BPB |
| Maíz                     | 33-259   | 34-253 | 65-370        | 1-198  | 54  | 55        | 65          | 3         |
| Trigo                    | 26-165   | 28-133 | 70-133        | 4.9-11 | 17  | 17        | 19          | 1         |
| Avena                    | 26-174   | 24-167 | 58-88         | 0      | 25  | 27        | 27          | 0         |
| Cebada                   | 28-358   | 35-361 | 87-380        | 0-7    | 17  | 18        | 26          | 1         |
| Amaranto                 | 55-80  | 50-82  | 64-98         | 0      | 2   | 2         | 2           | 0         |
| Girasol                  | 14-160   | 17-157 | 75-180        | 0-111  | 2   | 2         | 2           | 0         |
| Durazno                  | 0  | 0      | 0             | 0      | 0   | 0         | 0           | 0         |
| Manzano                  | 0  | 0      | 0             | 0      | 0   | 0         | 0           | 0         |
| Pera                     | 0  | 0      | 0             | 0      | 0   | 0         | 0           | 0         |
| Fríjol                   | 0  | 0      | 0             | 0      | 0   | 0         | 0           | 0         |
| Haba                     | 0  | 0      | 0             | 0      | 0   | 0         | 0           | 0         |
| Ayacote                  | 0  | 0      | 0             | 0      | 0   | 0         | 0           | 0         |
| Lechuga                  | 0  | 0      | 0             | 0      | 0   | 0         | 0           | 0         |
| Cebolla                  | 0  | 0      | 0             | 0      | 0   | 0         | 0           | 0         |
| Tomate                   | 0  | 0      | 0             | 0      | 0   | 0         | 0           | 0         |
| Espinacas                | 0  | 0      | 0             | 0      | 0   | 0         | 0           | 0         |
| Girasol                  | 0  | 0      | 0             | 0      | 0   | 0         | 0           | 0         |
| Alfalfa                  | 0  | 0      | 0             | 0      | 0   | 0         | 0           | 0         |
| Chirimoya                | 0  | 0      | 0             | 0      | 0   | 0         | 0           | 0         |
| Aguacate                 | 0  | 0      | 0             | 0      | 0   | 0         | 0           | 0         |
| Guayabo                  | 0  | 0      | 0             | 0      | 0   | 0         | 0           | 0         |
| Total bacterias          |  |        |               |        | 121   | 125       | 141         | 5         |
| Intervalo                | 14-358   | 17-361 | 58-380        | 0-198  |   |           |             |           |
| Media ± SEM <sup>b</sup> | 164±85   | 159±88 | 172±70        | 40±60  |   |           |             |           |

<sup>a</sup>Cada valor representa la media de tres repeticiones

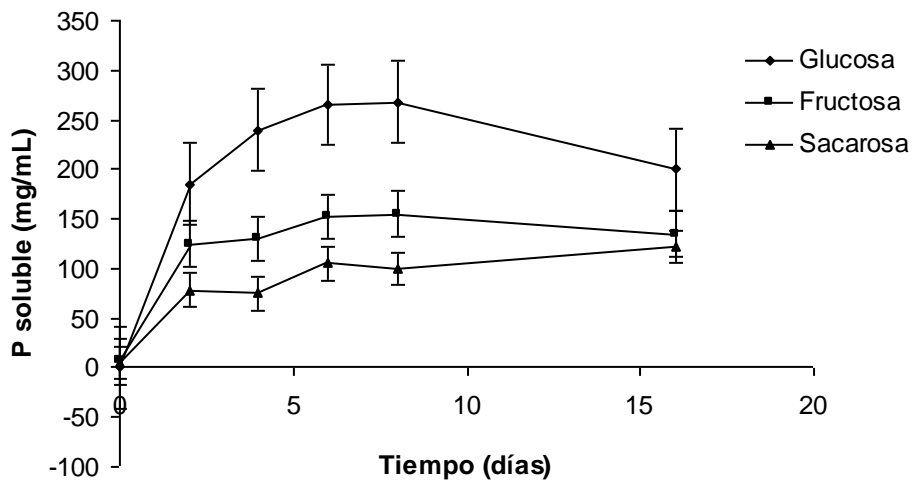
<sup>b</sup>Los valores son expresados como la media ± la desviación estándar de tres repeticiones.

La solubilización de fosfato por las cepas aisladas fue evaluada en presencia de tres fuentes de carbono, substituyendo la glucosa del medio MMSFCP-Mg por fructosa o sacarosa. Las cepas mostraron diversos niveles de solubilización de fosfato que fluctuaron entre los 0 a 380 mgL<sup>-1</sup>. La producción de ácidos se vio claramente afectada por la naturaleza de la fuente de carbono. La glucosa fue la que tuvo la máxima disminución de pH del medio y por lo tanto una mayor solubilización de fosfato. Esto es debido a que los cultivos que son limitados por glucosa no producen gluconato o 2-cetoglucónico (Hommes *et al.*, 1989). También pudiera estar dado por la facilidad que

tienen algunas bacterias de incorporar directamente la glucosa para sus funciones metabólicas (Piatkin y Krivoshein, 1981), a diferencia de la sacarosa y fructosa que necesitan de enzimas capaces de desdoblar la molécula en sus monosacáridos, trayendo consigo un gasto mayor de energía. En la Figura 4.1 se observa la solubilización de fosfato por las cepas MC2 y MC25, que fueron las únicas cepas capaces de utilizar las tres fuentes de carbono para la solubilización de fosfato en medio líquido. La fuente de carbono es uno de los elementos requeridos en el medio de cultivo para la solubilización de fosfato.



A



B

Figura 4.1. Solubilización de fosfato tricálcico en el medio de cultivo MMSFCP-Mg por las cepas MC2 (A) y MC25 (B), usando diferentes fuentes de carbono. Cada punto representa la media de tres repeticiones y las barras representan el error estándar.

La glucosa es un precursor de ácidos orgánicos de bajo peso molecular como el ácido glucónico y el 2-cetoglucónico que son importantes en la solubilización del fosfato (Johnston, 1954; Moghimi y Tate, 1978; Goldstein *et al.*, 2003). Reyes *et al.*, (1999) evaluaron diferentes fuentes de carbono y nitrógeno como parámetros para evaluar la diversidad de los microorganismos solubilizadores de fosfato. Kim *et al.* (1997) determinaron que la BSP *Enterobacter intermedium* oxida la glucosa a ácido glucónico, el cual después es convertido a 2-cetoglucónico. El grado de conversión de ácido glucónico a 2-cetoglucónico depende de las condiciones de cultivo incluyendo la fuente de carbono, nitrógeno, pH, temperatura, oxígeno, agitación etc. (Qazi *et al.*, 1991; Reyes *et al.*, 1999). La oxidación directa de la glucosa para la producción de 2-cetoglucónico a partir de la glucosa la lleva a cabo la enzima glucosa deshidrogenada, y esta es altamente dependiente de las condiciones de cultivo (Goldstein y Liu, 1987).

### **Ácidos orgánicos identificados**

El principal ácido detectado por HPLC en los medios que contenían glucosa fue el ácido 2-cetoglucónico, seguido del ácido glucónico, también se identificaron los ácidos láctico, málico, adípico, fumárico y propiónico. Estos compuestos se identificaron por sus tiempos de retención en relación con los respectivos patrones. La cepa MP37B fue la que tuvo una mayor producción de ácido 2-cetoglucónico en el medio MMSFCP-Mg. En la figura 4.2 se observa que el pH descendió a 3.2 a los 6 días y a los 10 días se obtuvo la mayor concentración de P soluble ( $268 \text{ mgL}^{-1}$ ). Illmer y Schinner (1995) sugieren que el descenso de pH tan bajo no se debe exclusivamente a la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular (AOBPM), y que el único factor determinante para la solubilización de P es la concentración de  $\text{H}^+$  originados que se producen de la respiración o asimilación de  $\text{NH}_4^+$  provenientes de las fuentes de nitrógeno, demostraron que la formación de complejos con el ácido glucónico no participa en la solubilización de apatita y brishita aunque es el único ácido producido por los dos microorganismos solubilizadores de fosfato, debido a que la concentración de P y el pH no se comportan de acuerdo a una curva sigmoideal, esto es porque existe una precipitación y una subsiguiente resolubilización del fosfato tricalcico, y es difícil predecir las concentraciones de P soluble en la solución del medio. A pesar de que la cepa MP37B fue la que tuvo mayor producción de ácido 2-cetoglucónico no fue la de

mayor capacidad solubilizadora (Cepa NS1,  $380 \text{ mgL}^{-1}$ ). Debido a que existen dudas razonables si los ácidos orgánicos son exclusivamente los que participan en los mecanismos de solubilización. Incluso los autores que apoyan la teoría de ácidos orgánicos no son capaces de encontrar una correlación entre la cantidad de P solubilizado, el pH y las concentraciones de ácido orgánico (Gaid, 1989).

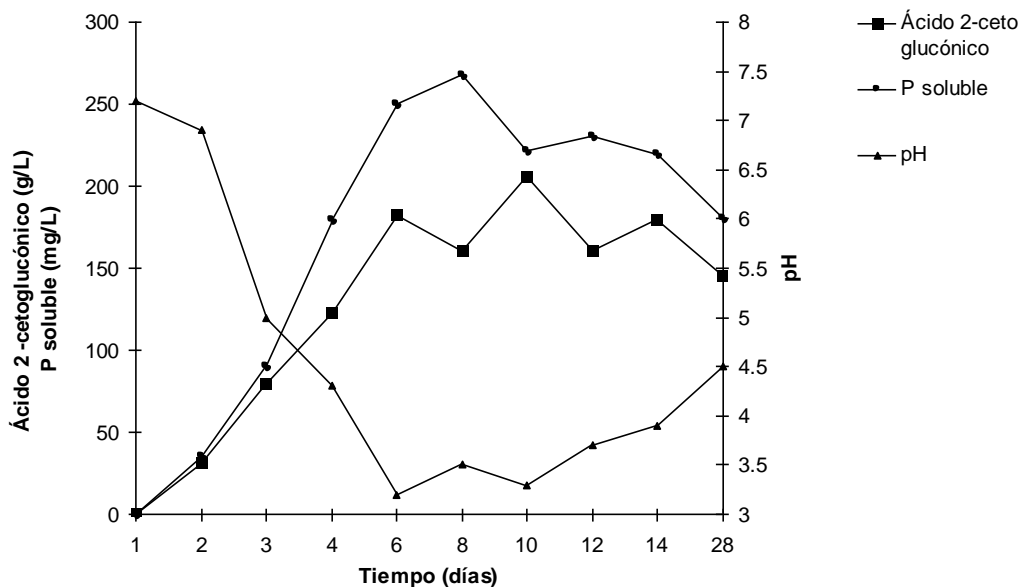


Figura 4.2. P soluble, pH y ácido 2 ceto-glucónico determinados en el medio de cultivo MMSFCP-Mg inoculado con la cepa MP37B aislada del rizoplano del maíz.

## CONCLUSIONES

El nuevo medio mínimo desarrollado MMSFCP-Mg empleado para el crecimiento de bacterias solubilizadoras de fosfato resultó ser el más eficiente comparado con los otros medios estudiados. En el medio MMSFCP-Mg se registraron los halos de solubilización de mayor tamaño, así como el mayor número de bacterias positivas empleando el indicador azul de bromofenol. En los estudios de solubilización de fosfato en medio líquido fue dos veces más eficiente que el medio NBRIP. El medio MMSFCP-Mg es un medio que contiene una menor cantidad de componentes que el medio PVK, por lo que resulta más económico. Igualmente, el medio MMSFCP-Mg contiene los componentes básicos en concentraciones óptimas para obtener la máxima solubilización, es decir: una fuente de nitrógeno, en forma de  $\text{NH}_4^+$ , una fuente de carbono preferentemente glucosa o dependiendo de la habilidad del microorganismo de sintetizar glucosa de otras fuentes de carbono, un factor de crecimiento como el extracto

de levadura, altas concentraciones de iones Mg en forma de MgCl (3.5 gL<sup>-1</sup> que contiene extracto de levadura, el medio NBPRIP es un medio sintético que no contiene, se observó que en los medios que contienen extracto de levadura se obtiene una mayor solubilización de fosfato, debido a que el extracto de levadura aporta factores de crecimiento como son aminoácidos, nitrógeno y vitamina B12, esenciales para el crecimiento y producción de metabolitos bacterianos. Existieron resultados contradictorios cuando se comparó la detección del halo en medio de cultivo sólido y la solubilización del fosfato en medio líquido. Algunas bacterias como la cepa MC1 no producen halo visible en medio sólido, pero son capaces de solubilizar varios tipos de fosfato inorgánico insoluble en medio líquido y otras como AVN y GT14 formaron halos visibles en medio sólido pero presentan una baja solubilización de fosfato en medio líquido, debido probablemente a la variación en el grado de difusión los ácidos orgánicos secretados por los microorganismos y también al hecho de que los ácidos orgánicos no son el único mecanismo de solubilización de fosfato. Por lo tanto, los estudios de solubilización de fosfato deben de ser escrupulosos, requiriéndose el empleo de medios de cultivo adecuados para detectar de manera rápida el mayor número de cepas capaces de solubilizar en medio líquido.

## RECONOCIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de postgrado otorgada a la primera autora y al Programa de Apoyo de Becas Tesis del Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT).

## LITERATURA CITADA

- Alikhani, H., N. Saleh-Rastin, H. Antoun. 2006. Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. *Plant and Soil* 287:1-2.
- Asea, P., R. M. N Kucey, J. Stewart. 1988. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. *Soil Biol Biochem* 20: 459-464.
- Baziramakenga, R., R. Simard, and D. Leroux. 1994. Determination of organic acids in soil extracts by ion chromatography. *Soil Biol and Biochem* 27(3)249-356.
- Beever, R., D. Burns. 1980. Phosphorus uptake, store and utilization by fungi. *Adv. Bot. Res.* 8:127-219.
- Bray, R., L. Kurtz. 1945. Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil Sci.* 59: 39-45.
- Gaind, S. 1989. Effect on pH on Phosphate solubilization by microbes. *Current Science*, 58(21):1208-1211.

- Gerretsen, F. 1948. The influence of microorganisms on the phosphate intake by the plant. *Plant Soil* 1:51–81.
- Goldstein, A. 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. *American Journal Alternative Agriculture* 1:51–7.
- Goldstein, A., T. Lester, 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. *Biochimica et Biophysica Acta Proteins and Proteomics* 164:266-271 .
- Goldstein, A., S. Liu. 1987. Molecular cloning and regulation of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola*. *Bio/Technology* 5:72-74.
- Gupta, A., A. Singal, R. Sankar, M. Chander, R. Kumar. 1994. A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. *Journal Genetic Applied Microbiology* 40:255–60.
- Illmer, P., A. Barbato, and F. Schinner. 1995. Solubilization of hardly-soluble  $\text{AlPO}_4$  with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biol and Biochem* 27(3): 265-270.
- Illmer, P., E. Schinner. 1995. Solubilization of inorganic calcium phosphates – solubilization mechanisms. *Soil Biol Bioche.* 27:257-263.
- Illmer, P., and F. Schinner. 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. *Soil Bioland Biochem* 24(2):329-335.
- Johnston, H. 1954. The solubilization of "insoluble" phosphate. II -A quantitative and comparative study of the action of selected aliphatic acids on tricalcium phosphate. *N Z J Sci Tech B* 36: 49-55.
- Johri, J., S. Surange and Nautiyal. 1999. Occurrence of salt, pH, and temperature-tolerant, phosphate solubilizing bacteria in alkaline soils. *Current Microbiology* 39:88-93.
- Katiyar, V. and R. Goel R. 2003. P solubilization potential of plant growth promoting *Pseudomonas* mutants at low temperature. *Microbiological Research* 158(2):359-362.
- Katznelson, H., A. Petersone, J. Roualt. 1962. Phosphate-dissolving microorganisms on seed and in the root zone of plants. *Can J Bot* 40: 1181-1186.
- Kim, K., D. Jordan and H. Krishnan. 1997. *Rahnella aquatilis*, a bacterium isolated from soybean rhizosphere can solubilize hydroxyapatite. *Microbiology Letters* 35:273-277.
- Kucey, R., H. H. Janzen, and M. M. Leggett. 1989. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. *Adv. Agron.* 42: 199-228.
- Mehta, S., S. Nautiyal. 2001. An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Current Microbiol* 4:351-56.
- Moghimi, A., E. Tate. 1978. Does 2-ketogluconic chelate calcium in the pH range 2.4 to 6.4? *Soil Biol Biochem* 10:289-292.
- Nahas, E. 1996. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. *World J Microbiol Biotech* 12: 567 – 572.
- Nautiyal, C. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 170: 265 – 270.
- Nivedita, P., H. Misra, and S. Apte. 2003. Solubilization of inorganic phosphate and plant growth promotion by cold tolerant mutants of *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology Research* 158(2):163-168.
- Peix, A., A. Rivas-Boyer, P. Mateos, C. Rodriguez-Barrueco, E. Martinez-Molina, and E. Velasquez. 2001. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil Biol Am. J. Altern. Agricult and Biochem* 33:103-110.
- Piatkin, K., and Y. Krivoshein. 1981. *Microbiología*. MIR, Moscú 60-73.

- Pikovskaya, R. 1948. Mobilization of phosphates in soil in connection with the vital activities of some microbial species. *Mikrobiologia* 17: 362 – 370.
- Qazi, G., R. Parshad, V. Verma, C. Chopra, R. Buse, M. Trager, and H. Onken. 1991. *Enzyme Microb. Technol.* 13:504–507.
- Reyes, I., R. Baziramakenga, L. Bernier, H. Antoun. 2001. Solubilization of phosphate rocks and minerals by a wild-type strain and two UV-induced mutants of *Penicillium*. *Soil Biol and Biochem* 33(12-13):1741-1747.
- Reyes, I., L. Bernier, R. Simard, and H. Antoun. 1999. Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microbiol Ecol* 28: 281-290.
- Richardson, A. E. 2001. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Australian J Plant Physiol* 28:897-906.
- Richardson, A. E. 1994. Soil microorganisms and phosphorus availability. In: C. E. Pankhurst, B. M. Doube, W. S. R. Gupta and, P. R. Grace (eds). *Soil Biota: Management in sustainable farming systems*. CSIRO. Melbourne, Australia pp 50–62.
- Rodriguez, H., and R. Fraga. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Advanc* 17:319-339.
- Seshadri, S., S. Ignacimuthu, M. Vadivelu. 2007. Inorganic phosphate solubilization by two insect pathogenic *Bacillus* sp. In: *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*. Ed. E Velázquez and C Rodríguez-Barrueco. Springer Netherlands 351-355.
- Sperber, J. 1958. Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. *Australian J Agricul Res* 9(6):782-787.
- Sylvester-Bradley, R., N. Akasawa, S. Torranca, F. Magalhães, L. Oliveira, L. Pereira. 1982. Levantamiento cuantitativo de microorganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazonia. *Acta Amazonica* 12:15-22.
- Toro, M., R. Azcon, and J. Barea. 1997. Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate-solubilizing rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability ( $^{32}\text{P}$ ) and nutrient cycling. *Appl. Environ Microbiol.* 4408-4412.
- Vazquez, P., G. Holguin, M. E. Puente, A. Lopez-Cortes, Y. Bashan. 2000. Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biol. Fertil. Soils* 30: 460-468.



## CAPITULO V

# PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE ÁCIDOS ORGÁNICOS POR BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE ROCA FOSFÓRICA (FLUOROAPATITA)

Marianela Paredes-Mendoza<sup>1</sup>; David Espinosa-Victoria<sup>1\*</sup>;

Hilda A. Zavaleta-Mancera<sup>1</sup>

<sup>(1)</sup>Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México, México. 56230. [despinos@colpos.mx](mailto:despinos@colpos.mx)

\* Corresponding author

### RESUMEN

Muchos microorganismos del suelo son capaces de transformar el fósforo insoluble a formas solubles contribuyendo así tanto a la nutrición de las plantas como de los microorganismos promotores del crecimiento vegetal. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad, individual y en consorcio, de las bacterias solubilizadoras de fosfato (BSP) aisladas del rizoplasma de gramíneas para producir *in vitro* de ácidos orgánicos para la solubilización de roca fosfórica (RF) y fosfato tricálcico (CaPO<sub>4</sub>). Veintisiete de las mejores cepas aisladas del rizoplasma y de la raíz de maíz, trigo, cebada, avena y girasol cultivados en suelos de México fueron seleccionadas con base en la eficiencia de solubilización de las fuentes de fosfato inorgánico usando modificaciones del medio de cultivo líquido Medio Mínimo para Solubilización de Fosfato Colegio de Postgraduados con MgCl (MMSPCP-Mg) con roca fosfórica (fluoroapatita). Las cepas fueron identificadas con base en sus características bioquímicas y fenotípicas. Las bacterias del consorcio denominado C-27 produjeron la mayor solubilización de roca fosfórica y producción de ácidos orgánicos, cuando se empleó glucosa como fuente de carbono y aeración. Durante solubilización de la RF en todas las cepas se detectó la producción de ácido glucónico y 2-cetoglucónico, también se detectó la síntesis de ácidos oxálico, cítrico, maleico, málico, succínico, láctico, fumárico, fórmico, acético, propiónico, adípico y butírico. Las cepas MARC36 (2105.7 mgL<sup>-1</sup> de ácido 2-cetoglucónico) y CAFEA 30N (2100 mgL<sup>-1</sup> de ácido 2-cetoglucónico), identificadas ambas como *Burkholderia cepacia*, fueron las más

eficientes en la solubilización de RF y producción de ácidos orgánicos. En el presente estudio se determinó que el principal mecanismo de solubilización de fluoroapatita podría ser la producción de ácidos orgánicos. Tal afirmación se basa en la existencia de una positiva y alta correlación entre la producción de ácidos orgánicos y la solubilización de RF.

**Palabras clave:** ácidos orgánicos de bajo peso molecular, liberación de fosforo, rizósfera y microorganismos solubilizadores de fosfato.

## INTRODUCCION

El fósforo (P) es el segundo nutriente en la planta más importante después de nitrógeno (Donahue *et al.*, 1990). El P existe en la naturaleza en formas orgánica e inorgánica. La disponibilidad de P es baja en los suelos debido a su fijación como fosfatos insolubles de hierro, aluminio y calcio. Dado que la deficiencia de P es el factor químico más importante que restringe el crecimiento vegetal, los fertilizantes químicos fosfatados se utilizan en gran medida para lograr rendimientos óptimos. Las formas solubles de P del fertilizante utilizado son fácilmente precipitadas como formas insolubles, esto conduce a una excesiva y repetida aplicación de fertilizantes fosfatados en suelos de cultivo. El suministro a través de medios biológicos, como la inoculación de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSP) es una alternativa viable (Illmer *et al.*, 1995). Aunque los mecanismos de solubilización de fosfato por las BSP todavía no están totalmente entendidos, en general se acepta que el mecanismo de solubilización de minerales de fosfato está relacionado con la liberación de ácidos orgánicos (Gupta *et al.*, 1994; Illmer y Schinner, 1992, 1995; Illmer *et al.*, 1995). Entre los ácidos orgánicos de bajo peso molecular (AOBPM) que oscilan entre (46 a 200 g mol<sup>-1</sup>) liberados por las BSP se encuentran los ácidos cítrico, glucónico, 2-cetoglucónico, láctico, succínico, propiónico y butírico, los cuales a través de sus grupos hidroxilo y carboxilo, quelan los cationes que envuelven el fosfato, convirtiéndolo en formas solubles (Kpombrekou y Tabatabai, 1994). Sin embargo, la solubilización de fosfato es un fenómeno complejo, que depende de muchos factores tales como los nutricionales, fisiológicos y las condiciones de crecimiento del cultivo (Reyes *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2005). Las interacciones entre los microorganismos que liberan ácidos orgánicos y

otros productos en las superficies de minerales pueden liberar iones de sus capas superficiales. En este sentido, la disolución de roca fosfórica por microorganismos afecta directamente la fertilidad de los suelos (Reyes *et al.*, 2001). Kapomblekov y Tabatabai (1994), estudiaron el efecto de los ácidos orgánicos en la liberación de fósforo a partir de la roca fosfórica (RF) y encontraron que esta tendría una relación con la estructura química, tipo y posición de los grupos funcionales de los ligandos y de la concentración de los ácidos. Además, al estar el fósforo principalmente asociado a la RF, los ácidos orgánicos que quelan efectivamente a este elemento aumentarían la liberación de P (Paredes-Mendoza y Espinosa-Victoria, 2010). En estudios de solubilización de roca fosfórica se ha observado que la inoculación de microorganismos aumenta la concentración de P soluble y una mayor eficiencia de los cultivos (Pandey y Maheshwari, 2008). Es cada vez más evidente que en la naturaleza, las bacterias no se encuentran como individuos solos, sino que actúan en grupos, donde cada bacteria tiene un papel funcional dentro de las comunidades que les permite su supervivencia (Reyes *et al.* 2002). Distintas poblaciones microbianas en la rizósfera con frecuencia interactúan entre sí. Se ha demostrado las relaciones entre géneros de diferentes microorganismos en varios ecosistemas microbianos. Cuando un consorcio de cepas bacterianas que promueven crecimiento como las solubilizadoras de fosfato son empleadas en un inóculo, cada una de las cepas constituyentes del consorcio no sólo tienen competencia con otras del mismo consorcio y/o de cepas nativas para su establecimiento rizosférico, sino que complementan su funcionalidad para la producción de metabolitos que promueven el crecimiento vegetal (Mukred *et al.*, 2008). En el presente estudio se evaluó la capacidad de las BSP aisladas de raíz y rizoplano de diferentes gramíneas, solas y en consorcio, en la producción *in vitro* de ácidos orgánicos para la solubilización de RF y  $\text{CAPO}_4$ .

## MATERIALES Y METODOS

### Cepas bacterianas

Se utilizaron 27 cepas bacterianas solubilizadoras de fosfato, 23 del género *Burkholderia* y 2 de *Pseudomonas* y 2 de *Pantoea* aisladas de la raíz y rizoplano de maíz criollo, maíz azul, trigo, avena, amaranto, girasol y cebada. Fueron caracterizadas fenotípicamente usando los sistemas multipuebas API 20NE Test System for non-fermenters y el API 20E for fermentative bacteria (API System, S.A., La Balme les

Grottes, France) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Además se realizaron pruebas complementarias como: oxidasa, oxidación-fermentación de Hugh-Leifson, Catalasa, Movilidad, Citrato Simmons, MacConkey, licuefacción de gelatina a 22 °C, producción de nitrito o reducción a N<sub>2</sub>, rojo fenol y rojo de metilo. Posteriormente, los resultados de cada cepa bacteriana fueron analizados usando el software apiweb<sup>TM</sup> (Farmer y Kelly, 1999). Las cepas bacterianas fueron almacenadas a -71 °C en medio nutritivo suplementado con glicerol al 20% (v/v) hasta su uso.

### Solubilización de roca fosfórica en medio sólido y líquido

Para la determinación cualitativa de la solubilización de RF se usó como base el medio mínimo MMSPCP-Mg (Paredes-Mendoza *et al.*, in press) desarrollado en el laboratorio Interacción Molecular Planta-Microorganismo del Colegio de Postgraduados, México adicionado con diferentes fuentes de carbono y otros componentes. Se usó RF proveniente de Baja California como fuente de fosfato insoluble y azul de bromofenol para detectar de forma visual la solubilización de la RF al cambiar el color del medio de azul a amarillo. La composición de los medios empleados se presenta en el Cuadro 5.1. Las cepas fueron previamente reactivadas en tubos de 10 mL de medio líquido MMSPCP-Mg y posteriormente se tomó 0.1 mL de cada cultivo bacteriano y se inoculó por triplicado en placas de medio MMSPCP-Mg, incubándose por 10 días para medir el diámetro del halo de solubilización (DHS) el cual se calculó con la siguiente fórmula: DHS = diámetro total - diámetro de la colonia.

**Cuadro 5.1. Formulación de los medios de cultivo usados para la solubilización de roca fosfórica y producción de ácidos orgánicos.**

| Medio      | Componentes<br>gL <sup>-1</sup> |          |          |   |                            |                                      |                       |                                   |
|------------|---------------------------------|----------|----------|---|----------------------------|--------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|
|            | Glucosa                         | Fructosa | Sacarosa | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | Extracto<br>de<br>levadura | MgCl <sub>2,6</sub> H <sub>2</sub> O | Fosfato<br>tricálcico | Roca fosfórica<br>(Fluoroapatita) |
| MMSRCP-MgG | 14                              |          |          | 1   | 0.5                        | 3                                    |                       | 7                                 |
| MMSRCP-MgF |                                 | 14       |          | 1   | 0.5                        | 3                                    |                       | 7                                 |
| MMSRCP-MgS |                                 |          | 14       | 1   | 0.5                        | 3                                    |                       | 7                                 |
| MMSFCP-MgG | 14                              |          |          | 1   | 0.5                        | 3                                    | 5                     |                                   |

**MMSRCP- MgG, Medio Mínimo para Solubilización de roca fosfórica del Colegio de Postgraduados con magnesio y glucosa; MMSRCP-MgF, Medio Mínimo para Solubilización de roca fosfórica del Colegio de Postgraduados con magnesio y fructosa; MMSRCP-MgS, Medio Mínimo para Solubilización de roca fosfórica del Colegio de Postgraduados con magnesio y sacarosa; MMSFCP-MgG, Medio Mínimo para Solubilización de roca fosfórica del Colegio de Postgraduados con magnesio (Paredes-Mendoza *et al.*, in press).**

Una vez confirmada la capacidad solubilizadora de fosfato, cada cepa fue inoculada por triplicado en medio líquido y sólido, con RF y azul de bromofenol. A las 48 y 72 h se observó o el cambio de color de los medios. Antes del experimento, se determinó la mineralogía de la RF por difracción de rayos X. La muestra de RF se molió finamente y se colocó en un porta muestras y la medición se realizó con la técnica de barrido (Álcala *et al.*, 2009) a una velocidad de  $4^{\circ} \text{ min}^{-1}$  de  $2$  a  $60^{\circ} 2\theta$ , la RF se identificó a partir de las reflexiones reportadas en las fichas de Mineral Power Diffraction File. La RF empleada resultó estar compuesta en un 100% por el mineral fluoroapatita la composición de la misma fue la siguiente:  $\text{P}_2\text{O}_5$  total, 27.7%, P hidrosoluble, trazas; P soluble-citrato, 2.4%; P insoluble-citrato, 25.3% (Rodas-Cifuentes *et al.*, 2001).

### **Producción de ácidos orgánicos**

Se inocularon dos frascos con 250 mL de los medios del Cuadro 5.1 con 2 mL de cada cultivo bacteriano puro a una concentración de  $2700 \times 10^7 \text{ UFC mL}^{-1}$ . Como testigo se empleó un frasco con el mismo medio de cultivo pero inoculado con 2 mL de agua destilada estéril. A todos los medios se les adicionó anfoterecina B como antimicótico. Los cultivos se incubaron bajo rotación (160 rpm) a  $25^{\circ} \text{C}$  durante 28 días. Se tomaron alícuotas de 5 mL al 1, 2, 4, 6, 8, 10, 14, 21, 28 días del cultivo, a las cuales se les determinó el número de células mediante la técnica de recuento en placas de Agar nutritivo. Una porción de las alícuotas fue centrifugada a 10,000 rpm durante 10 min y pasada por filtros con poro de tamaño  $0.45 \mu\text{m}$ . (Millipore, Bedford). Posteriormente, se midió el pH de los filtrados y el fósforo soluble con un espectrofotómetro Beckman DU<sup>6</sup> a 620 nm de acuerdo al método de Bray (1945).

### **Efecto de la aeración en la solubilización de RF y producción de ácidos orgánicos**

Las veintisiete BSP se usaron para formar el consorcio bacteriano C27. Se realizaron dos tratamientos, uno con aeración y otro sin aeración. Setenta y cuatro  $\mu\text{L}$  de cada cepa ( $2700 \times 10^7 \text{ UFC mL}^{-1}$ ) fueron inoculadas en seis frascos (tres para cada tratamiento) con 250 mL con medio MMSRCP-MgG (Cuadro 5.1). A todos los frascos se les adicionó anfoterecina B. Para el tratamiento sin aeración, tres de los frascos inoculados se colocaron en incubación bajo las mismas condiciones de cultivo descritas.

Los otros tres frascos se usaron para evaluar el efecto de la aeración en la solubilización de P y producción de ácidos orgánicos por el consorcio C27. A los frascos empleados en aeración se les colocó una tapa con un puerto para la entrada de aire filtrado estéril. La difusión de aire en el líquido se realizó a través de filtros de membrana de tamaño de poro de 2  $\mu\text{m}$  y se empleó un sistema de aeración (bomba de aire) utilizado en acuarios y peceras, el cual proporciona un caudal de aire de 2  $\text{ml min}^{-1}$  sin presencia de fluctuaciones a lo largo del tiempo. El resto de las condiciones de cultivo fueron las mismas que las empleadas en los experimentos descritos. Se tomaron alícuotas cada 24 horas y se les determinó el número de bacterias en placa de agar nutritivo. A los filtrados de las alícuotas de los cultivos se les determinó el pH y P soluble.

### **Solubilización abiótica de la RF a través de los ácidos orgánicos producidos por el consorcio C27**

Los ácidos orgánicos producidos por el consorcio C27 (Cuadro 4.4A y B) se colocaron a las mismas concentraciones determinadas en el medio MMSRCP-MgG, en tres frascos con de 25 mL de agua deionizada estéril que contenían 7  $\text{g L}^{-1}$  de RF esterilizada, se colocaron bajo rotación (160 rpm) a 25 °C durante 4 días. Al término del tiempo de incubación se tomaron alícuotas de 5 mL y se centrifugaron a 10000 rpm por 5 min. Al sobrenadante se le determino el pH y P soluble.

### **El efecto del contenido nitrógeno en la solubilización y producción de ácidos orgánicos**

Al medio MMSRCP-MgG se les suprimió el sulfato de amonio para ver el efecto de la solubilización de RF de las cepas sin la presencia de iones  $\text{NH}_3^+$  y se le adicionó sólo 0.3  $\text{g L}^{-1}$  de extracto de levadura. Las cepa MC25 y MC2 fueron las que se inocularon debido a que en estudios previos fueron capaces de crecer a bajas concentraciones de nitrógeno (Paredes *et al.*, in press). Los frascos inoculados por triplicado se colocaron bajo rotación (160 rpm) a 25 °C durante 28 días. A los filtrados del cultivo, se le determino el pH y P soluble.

## **Identificación de ácidos orgánicos a través de HPLC**

Una parte de las alícuotas de los filtrados de los cultivos de los experimentos de solubilización de RF se empleó para determinar la presencia de ácidos orgánicos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con un detector ultravioleta (Baziramakenga, 1994; Kim *et al.*, 1997). Se empleó una columna REXES para detección de ácidos orgánicos (300 X 7.8 mm) marca Phenomex (Phenomenex, Torrance, CA) y como fase móvil H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM, con un flujo de 0.4 mL min<sup>-1</sup>, a una presión de 10 MPa y temperatura de 25 °C. Los picos correspondientes a cada ácido orgánico fueron detectados a 210 nm e identificados de acuerdo al tiempo de retención de los estándares comerciales: ácido 2-cetoglucónico (Sigma, Germany), ácido glucónico (Sigma, Germany) y Organic Acid KiT (SUPELCO, Germany) (Kim *et al.*, 1997).

## **Análisis estadístico**

Los valores obtenidos de los tratamientos fueron analizados por medio del programa estadístico XLSTAT-PRO 2009.1. Se efectuó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey, considerando un 5% de significancia para detectar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en los tratamientos, así como pruebas de correlación de Pearson.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Solubilización de roca fosfórica en medio sólido y líquido**

Veinte siete de las mejores cepas aisladas del rizoplasma y raíz de maíz, trigo, cebada y avena fueron seleccionados con base en la eficiencia para solubilizar fosfato tricálcico en el medio MMSFCP-Mg. De las 27 cepas bacterianas solubilizadoras de fosfato tricálcico utilizadas, todas fueron capaces de solubilizar RF en medio líquido usando como fuente de carbono glucosa. Las BSP empleadas fueron capaces de cambiar el color del medio MMSRCP-MgG con azul de bromofenol en un rango de tiempo de 2 a 5 días. El cambio de color es debido a los ácidos orgánicos producidos por las BSP que bajan el pH del medio, el uso del indicador azul de bromofenol en el

medio con RF permitió visualizar la solubilización al cambiar el color del medio de azul a amarillo. Se ha determinado que la solubilización de fosfatos por un microorganismo varía con la fuente de fósforo inorgánico. Algunos autores atribuyen la solubilización bacteriana de fosfatos insolubles a la producción de ácidos orgánicos (Vassileva *et al.*, 2001). En los medios que contienen RF, es necesario el uso de un indicador debido a que no es fácil observar los halos o zonas de solubilización de fosfatos como ocurre en los medios sólidos que contienen  $\text{Ca}_3\text{PO}_4$ . Los métodos existentes para determinar la solubilización de la RF son tardados, laboriosos y caros, ya que implican la determinación en medio líquido de la solubilización y la posterior cuantificación del P soluble (Sangeeta y Nautiyal; 2001) es una forma de identificación cualitativa de las bacterias solubilizadoras de RF que se basa en un método visual. Por otro lado, con el consorcio C-27 se obtuvo la máxima solubilización de RF y producción de ácidos orgánicos debido a que puede tratarse de una asociación sinérgica. Las actividades sinérgicas de las poblaciones microbianas pueden permitir la terminación de una ruta metabólica que de forma individual no podría ser terminada. Por la tanto, el uso de inoculantes mixtos (combinación de microorganismos) que interactúan sinérgicamente es un método promisorio usado actualmente, debido a que se obtienen resultados rápidos y mejores rendimientos. En el Cuadro 5.2 se observa que de forma individual la cepa que tuvo mayor solubilización de roca fosfórica ( $545.5 \text{ mgL}^{-1}$ ) y producción de ácidos orgánicos ( $6810.6 \text{ mgL}^{-1}$ ) fue la cepa *Burkholderia cepacia* CAFEA 20N aislada del rizoplano de maíz, al emplear los datos de solubilización de fosfato tricálcico (FTC) obtenidos usando las mismas cepas generados por Paredes *et al.*, (in press) la cepa NS1 ( $380 \text{ mgL}^{-1}$ ) fue la que tuvo mayor solubilización de fosfato tricálcico.

En ambos medios se uso glucosa como fuentes de carbono, pero diferente fuente de fosfato inorgánico y bajo las mismas condiciones de cultivo, se esperaba que la cepa que presentó mayor solubilización de fosfato tricálcico, de igual forma fuera una alta solubilizadora de RF ( $122 \text{ mgL}^{-1}$ ). Del mismo modo, la solubilización superior y una mayor producción de ácidos orgánicos en la presencia de FTC se pueden atribuir a su naturaleza amorfa, estructura simple y la ausencia de cualquier carbonato libre en comparación con la estructura cristalina y compleja de la RF.



**Cuadro 5.2. Producción de ácidos orgánicos totales en la solubilización de RF y determinación del diámetro de halo por solubilización de fosfato tricálcico.**

| Cepa             | Cultivo      | Especie bacteriana            | Medio  |     |                                |                                       |
|------------------|--------------|-------------------------------|--|-----|--------------------------------|---------------------------------------|
|                  |              |                               | MMSRCP-MgG                                     | pH  | P soluble (mgL <sup>-1</sup> ) | MMSFCPMgG                             |
|                  |              |                               | Total de ácidos orgánicos (mgL <sup>-1</sup> ) |     |                                | Tamaño de diámetro del halo (10 días) |
| AVN              | Avena        | <i>Pantoea sp</i>             | 2055.7   | 3.9 | 82.2 kl                        | 0.9 g                                 |
| MP37BL           | Maíz criollo | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 1270.3   | 3.4 | 109.0 jk                       | 1.3 e                                 |
| MP35             | Maíz criollo | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 1516.0   | 3.9 | 44.4 lm                        | 1.2 ef                                |
| MP37             | Maíz criollo | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 202.0  | 4.8 | 85.0 kl                        | 0.9 g                                 |
| MP37b            | Maíz criollo | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 1185.4   | 3.5 | 138.8 ijk                      | 1.1 f                                 |
| MC4              | Maíz azul    | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 1068.6   | 6.5 | 14.0 m                         | 0.7 h                                 |
| MC25CG           | Maíz azul    | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 1705.2   | 4.6 | 159.0 ghi                      | 1.4 de                                |
| C-20             | Cebada       | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 792.3  | 3.4 | 260.5 e                        | 1.7 c                                 |
| MARC36           | Maíz azul    | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 2934.0   | 4.2 | 423.0 d                        | 1.6 cd                                |
| MC25             | Maíz azul    | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 2764.8   | 3.5 | 212.5 efg                      | 1.3 e                                 |
| MC1              | Maíz azul    | <i>Pantoea sp</i>             | 499.6  | 4.4 | 133.0 ijk                      | 0.4 i                                 |
| IT13             | Trigo        | <i>Burkholderia gladioli</i>  | 3831.6   | 3.3 | 156.5 hij                      | 0.8 h                                 |
| MP36             | Maíz criollo | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 1490.4   | 3.7 | 207.0 efgh                     | 0.4 i                                 |
| MP32             | Maíz criollo | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 125.8  | 3.4 | 222.1 efg                      | 1.3 e                                 |
| CH1              | Cebada       | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 2371.0   | 3.6 | 174.0 fghi                     | 1.3 e                                 |
| MP38             | Maíz criollo | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 1812.8   | 3.6 | 152.7 hij                      | 1.3 e                                 |
| MC2              | Maíz negro   | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 1842.2   | 3.5 | 151.2 hij                      | 1.5 d                                 |
| MP3              | Maíz criollo | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 2498.3   | 3.7 | 244.5 ef                       | 1.3 e                                 |
| RF1              | Avena        | <i>Pseudomonas luteola</i>    | 1923.2   | 3.9 | 127.0 ijk                      | 1.3 e                                 |
| NS1              | Cebada       | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 2027.8   | 4.1 | 122.0 ijk                      | 0.8 gh                                |
| CAFEA            | Maíz azul    | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 6810.6   | 3.5 | 545.5 b                        | 1.6 cd                                |
| RT12             | Trigo        | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 2323.9   | 4.1 | 336.3 e                        | 2.1 a                                 |
| MARC1            | Maíz azul    | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 5100.3   | 3.7 | 541.9 c                        | 1.9 b                                 |
| MP35FS           | Maíz criollo | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 2839.4   | 4.7 | 160.0 ghij                     | 1.7 c                                 |
| GT14             | Girasol      | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 93.4   | 4.5 | 47.0 lm                        | 0.4 i                                 |
| MC21ML           | Amaranto     | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 2540.5   | 5.4 | 154.2 hij                      | 1.2 ef                                |
| A-7              | Avena        | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 2127.8   | 3.6 | 133.2 ijk                      | 1.5 d                                 |
| C27 <sup>1</sup> |              |                               | 8684.8   | 4.7 | 693.3 a                        |                                       |

ANOVA ( $P \leq 0,05$ ) valores con igual letra minúscula en las columnas, no presentaron diferencias significativas según la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) para separación de medias, con  $P < 0.05$ . <sup>1</sup>A C-27 no se le determino diámetro de halo por ser un consorcio bacteriano. Indique que significa MMSRCP-MgG y la otra sigla. MMSRCP-MgG, Medio Mínimo para Solubilización de roca fosfórica del Colegio de Postgraduados con Magnesio y glucosa; MMSFCP-MgG, Medio Mínimo para Solubilización de roca fosfórica del Colegio de Postgraduados con Magnesio.

Una mayor cantidad de bacterias solubilizadoras altamente efectivas fueron aisladas del rizoplasma de los genotipos de maíz lo que sugiere que la eficiencia de P en estos cultivares puede estar relacionado con buscar mejorar las interacciones entre los microorganismos P solubilizadores. Entre los géneros bacterianos con mayor capacidad para producir ácidos en orden prioritario están: los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*,

*Flavobacterium* y *Erwinia* (Trivedi y Sa, 2008). En el presente estudio solo se pudieron detectar bacterias pertenecientes a tres géneros, por lo que la biodiversidad de nuestros aislados fue baja.

Al aumentar, la concentración de glucosa ( $14 \text{ gL}^{-1}$ ) y de RF ( $7 \text{ gL}^{-1}$ ) se obtuvo mayor concentración de P soluble. Esto se pueden deber a que las BSP utilizan la glucosa como fuente de carbono para producir ácidos orgánicos. Estos resultados son similares a Nautiyal *et al.* (1999) que afirmaron que más ácidos orgánicos son producidos por microorganismos cuando la glucosa se utiliza como fuente de carbono. Por lo tanto, al aumentar el contenido de glucosa a concentraciones que son osmóticamente tolerables para la bacterias aumenta la producción de ácidos orgánicos y por lo tanto la solubilización de RF. Se sabe que los ácidos orgánicos producidos por las BSP solubilizan fosfatos insolubles por un descenso del pH, quelación de cationes y compitiendo por los sitios de adsorción de fosfato en el suelo (Nahas, 1996). Durante solubilización de RF en todas las cepas se detectó la producción de ácido glucónico y 2-cetoglucónico (Cuadro 5.3A), también se detectaron ácido oxálico, cítrico, maleico, málico, succínico, láctico, fumárico, fórmico, acético, propiónico, adípico y butírico. Se detectaron otros picos que no pudieron ser identificados, el ácido 2-cetogluconico es el que mayor concentración presentó. Con en el consorcio C-27 se obtuvieron  $3219.9 \text{ mgL}^{-1}$  de ácido 2 cetoglucónico y las cepas que presentaron la máxima producción de 2-cetoglucónico fueron *B. cepacia* MARC36 ( $2105.7 \text{ mgL}^{-1}$ ) y *B. cepacia* CAFEA 30N ( $2100 \text{ mgL}^{-1}$ ).

**Cuadro 5.3A. Ácidos orgánicos producidos por 27 bacterias solubilizadoras de fosfato y el consorcio bacteriano C27 durante la solubilización de roca fosfórica en el medio MMSRCP-MgG.**

| Cepa                          | Ácidos orgánicos de bajo peso molecular<br>mgL <sup>-1</sup> |                 |         |           |         |         |           |
|-------------------------------|--|-----------------|---------|-----------|---------|---------|-----------|
|                               | Oxálico  | 2-Cetoglucónico | Cítrico | Glucónico | Maleico | Málico  | Succínico |
| <i>Pantoea spp</i>            |  |                 |         |           |         |         |           |
| AVN                           | ND   | 244.6 klm       | ND      | 923.5 g   | ND      | 192.1 c | 196.8 ghi |
| MC1                           | ND   | 119.3 lm        | ND      | 142.2 no  | ND      | ND      | 130.0 ijk |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |  |                 |         |           |         |         |           |
| MC2                           | ND   | 317.2 kl        | ND      | 564.0 i   | ND      | 217.1 b | 450.0 b   |
| <i>Pseudomonas luteola</i>    |  |                 |         |           |         |         |           |
| RF1                           | ND   | 821.3 ghi       | ND      | 425.7 k   | ND      | ND      | 240.8 fg  |
| <i>Burkholderia gladioli</i>  |  |                 |         |           |         |         |           |
| 1T13                          | ND   | 1914.0 bc       | ND      | 33.0 s    | ND      | ND      | 25.5 no   |
| MC4                           | 0.9 c  | 141.8 lm        | ND      | 199.2 m   | ND      | ND      | 249.4 fg  |
| <i>Burkholderia cepacia</i>   |  |                 |         |           |         |         |           |
| MP37BL                        | ND   | 1033.2 fg       | ND      | 38.0 rs   | ND      | ND      | ND        |
| MP35                          | 1.3 c  | 968.5 fgh       | ND      | 41.4 qrs  | ND      | 117.0 d | 321.0 de  |
| MP37                          | ND   | 75.2 lm         | ND      | 41.4 qrs  | ND      | ND      | 45.7 mno  |
| MP37b                         | ND   | 731.3 hij       | ND      | 177.0 mn  | ND      | ND      | 108.6 jkl |
| MC25CG                        | ND   | 1210.7 ef       | ND      | 451.0 k   | ND      | 20.5 g  | ND        |
| CH1                           | ND   | 493.2 ij        | ND      | 208.0 m   | ND      | ND      | 50.0 lmno |
| MARC36                        | ND   | 2105.7 b        | ND      | 1510.4 c  | 47.1 a  | 38.0 f  | 720.0 a   |
| MC25                          | ND   | 1811.8 cd       | ND      | 220.0 l   | ND      | ND      | 318.7 de  |
| MP36                          | ND   | 22.0 m          | ND      | 1431.0 d  | ND      | ND      | 5.2 o     |
| MP32                          | ND   | 35.3 m          | ND      | 90.5 pq   | ND      | ND      | ND        |
| C-20                          | ND   | 1722.5 cde      | 3.0 d   | 123.5 op  | 0.5 b   | 19.6 g  | 282.7 def |
| MP38                          | ND   | 1482.9 e        | ND      | 85.3 pqr  | ND      | ND      | 200.0 gh  |
| MP3                           | ND   | 933.9 gh        | ND      | 502.8 j   |         | 218.6 b | 340.0 cd  |
| NS1                           | ND   | 961.4 fgh       | ND      | 1025.4 f  | ND      | 7.1 h   | 425.0 b   |
| CAFEA 20N                     | 29.4 b   | 2100.0 b        | 40.7 a  | 4300.0 a  | ND      | 29.6 fg | 90.0 klm  |
| RT12                          | ND   | 604.8 jk        | 30.0 b  | 1148.8 e  | ND      | ND      | 260.0 def |
| MARC1                         | ND   | 1458.0 e        | 20.0 c  | 367.3 l   | ND      | 72.2 e  | 60.0 lmno |
| MP35FS                        | 72.8 a   | 1008.0 gh       | ND      | 1509.0 c  | 2.6 b   | 117.2 d | 12.0 o    |
| GT14                          | ND   | 5.7 m           | ND      | 146.6 no  | ND      | ND      | 16.0 o    |
| MC21ML                        | ND   | 973.4 fgh       | ND      | 751.8 h   | ND      | ND      | 390.0 bc  |
| A-7                           | ND   | 1544.2 cd       | ND      | 211.3 m   | ND      | ND      | 164.4 hij |
| C27                           | 28.9 b   | 3219.9 a        | ND      | 3800.0 b  | ND      | 788.0 a | 788.0 a   |

ANOVA ( $P \leq 0,05$ ) valores con igual letra minúscula en las columnas, no presentaron diferencias significativas según la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) para separación de medias, con  $P < 0.05$ . ND = Indica que no se detectó la producción del ácido.

Existieron diferencias significativas en la producción de ácidos orgánicos por cepa, los ácidos que se encontraron en menor concentración y que no fueron detectados en la mayoría de las cepas fueron los ácidos oxálico, cítrico, maléico y málico (Cuadro 5.3A, 5.3B). La cepa *B. cepacia* MARC36 aislada del rizoplano de maíz azul también tuvo una alta producción de ácido fórmico ( $1920 \text{ mgL}^{-1}$ ) y también una alta capacidad solubilizadora de RF ( $541.9 \text{ mgL}^{-1}$ ).

Estos resultados son similares a los obtenidos por Vyas y Gulati (2009) con fosfato tricálcico empleando cepas de *Pseudomonas*. No obstante, difieren con el tipo de ácidos orgánicos que ellos encontraron, detectando concentraciones de 8 a  $26.6 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido oxálico,  $631.7$  a  $10903 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido glucónico,  $16.4$  a  $255 \text{ mg L}^{-1}$  de 2-cetogluónico,  $41.3$  a  $164 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido láctico,  $56.1$  a  $108 \text{ mg L}^{-1}$  de succínico y  $34.5$  a  $350 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido málico. La falta de producción de ácido oxálico por las cepas estudiadas, no afectó su eficiencia en la solubilización de fosfato aunque este ácido está implicado en la solubilización de fosfato además de los ácidos cítrico, glucónico, láctico y succínico en la solubilización de fosfatos en vertisoles.

Sin embargo, Vyas y Gulati (2009) encontraron que la cepa *Pseudomonas sp.* BIHB 751 tuvo la más alta producción de ácido 2-cetogluconico pero la más baja solubilización de FTC y de RF. Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con un estudio realizado con *Enterobacter intermedium* (Hwangbo *et al.*, 2003) en donde se reportó una mayor solubilización de fosfato al aumentar la producción de 2-cetogluónico por dicha bacteria. Algunos estudios han encontrado que las cantidades de fósforo solubilizado pueden no correlacionarse con las cantidades de ácidos orgánicos en el medio de cultivo (Illmer y Schinner, 1995).

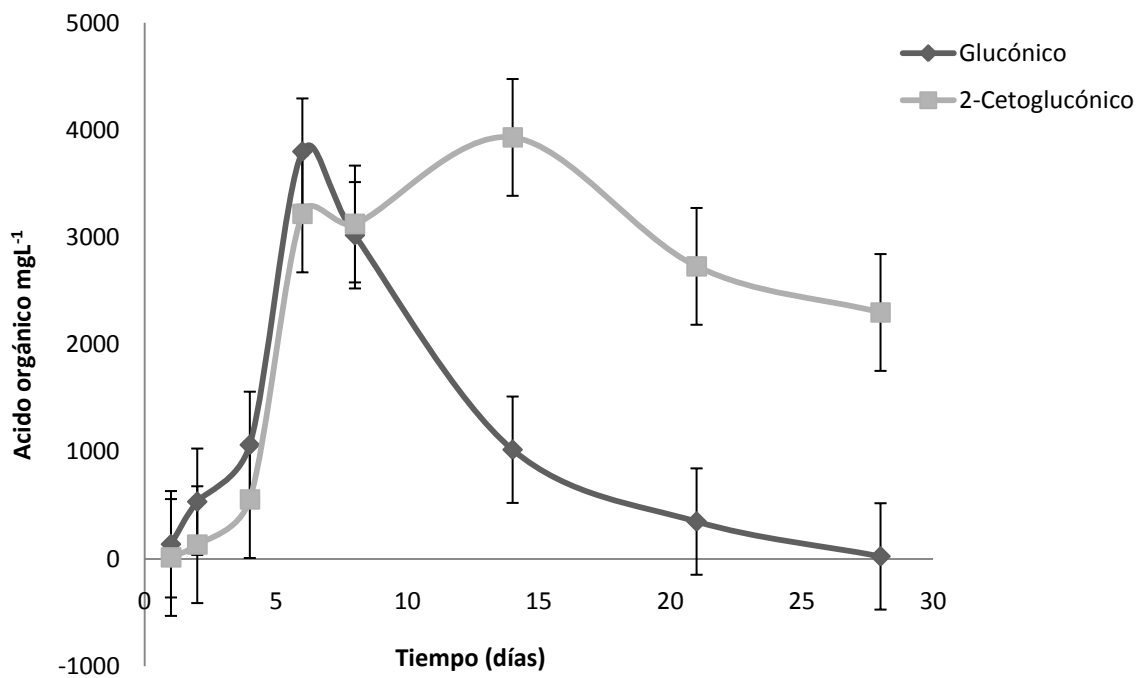
**Cuadro 5.3B. Ácidos orgánicos producidos por 27 bacterias solubilizadoras de fosfato y el consorcio bacteriano C27 durante la solubilización de roca fosfórica en el medio MMSRCP-MgG.**

| Cepa                          | Ácidos orgánicos de bajo peso molecular<br>mgL <sup>-1</sup> |          |          |          |            |          |          |
|-------------------------------|--|----------|----------|----------|------------|----------|----------|
|                               | Láctico  | Fumárico | Fórmico  | Acético  | Propiónico | Adípico  | Butírico |
| <i>Pantoea spp</i>            |  |          |          |          |            |          |          |
| AVN                           | 277.9 cd   | 6.7 d    | ND       | 8.4 abcd | 126.1 b    | 38.0 cd  | 42.6 c   |
| MC1                           | 4.6 lm   | 3.9 de   | 80.0 f   | 2.2 ef   | 13.3 f     | 4.1 fg   | ND       |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |  |          |          |          |            |          |          |
| MC2                           | 263.3 d  | ND       | ND       | ND       | ND         | 30.6 d   | ND       |
| <i>Pseudomonas luteola</i>    |  |          |          |          |            |          |          |
| RF1                           | 129.4 g  | 30.2 b   | ND       | 11.4 ab  | 152.7 a    | 56.4 b   | 55.3 c   |
| <i>Burkholderia gladioli</i>  |  |          |          |          |            |          |          |
| 1T13                          | 61.2 i   | ND       | 1730.0 b | 2.8 ef   | ND         | 18.3 e   | 46.8 c   |
| MC4                           | 293.6 c  | ND       | 124.6 e  | 8.1 abcd | ND         | 51.9 bc  | 125.1 b  |
| <i>Burkholderia cepacia</i>   |  |          |          |          |            |          |          |
| MP37BL                        | 170.7 f  | ND       | ND       | ND       | 29.1 e     | ND       | ND       |
| CH1                           | 63.4 h   | 4.2 d    | ND       | 9.8 abc  | 36.5 d     | 34.3 d   | 37.6 cd  |
| MP37                          | 36.3 k   | 0.8 f    | ND       | 0.7 f    | 1.9 g      | ND       | ND       |
| MP37b                         | 117.1 gh   | ND       | 51.4 g   | ND       | ND         | ND       | ND       |
| MC25CG                        | 15.8 lm  | ND       | ND       | ND       | ND         | ND       | 7.2 e    |
| MP35                          | 41.1 jk  | ND       | ND       | ND       | ND         | ND       | ND       |
| MARC36                        | 17.7 l   | 2.2 ef   | ND       | 7.5 bcd  | ND         | ND       | 41.4 c   |
| MC25                          | 352.7 b  | ND       | ND       | 1.6 ef   | 13.5 f     | ND       | 46.5 c   |
| MP36                          | 18.6 l   | ND       | ND       | ND       | 13.6 f     | ND       | ND       |
| MP32                          | ND   | ND       | ND       | ND       | ND         | ND       | ND       |
| C-20                          | 180.6 ef   | ND       | 41.6g    | ND       | ND         | ND       | ND       |
| MP38                          | 44.6 ij  | ND       | ND       | ND       | 40.0 d     | ND       | ND       |
| MP3                           | 133.8 f  | 1.3 f    | 294.0 c  | 11.7 a   | 47.4 c     | ND       | 14.8 de  |
| NS1                           | 431.1 a  | ND       | ND       | ND       | ND         | 14.0 ef  | ND       |
| CAFEA 20N                     | 38.6 k   | 4.0 de   | 160.0 d  | 4.7 de   | ND         | 12.3 ef  | 40.7 c   |
| RT12                          | 124.1 g  | 5.2 d    | ND       | 0.7 f    | ND         | 11.1 efg | 139.3 ab |
| MARC1                         | ND   | 0.7 f    | 1920.0 a | 3.0 ef   | 1.9 g      | 4.1 fg   | 13.1 de  |
| MP35FS                        | 108.1 gh   | ND       | ND       | ND       | 2.3 g      | ND       | 7.4 e    |
| GT14                          | ND   | 1.3 f    | ND       | 7.4 cd   | ND         | 16.4 e   | ND       |
| MC21ML                        | 336.3 b  | ND       | ND       | 2.9 ef   | 27.3 e     | 58.3 b   | 0.5 e    |
| A-7                           | 195.0 e  | 12.9 c   | ND       | ND       | ND         | ND       | ND       |
| C27                           | 79.9 klmn  | 440.0 a  | 21.0 b   | ND       | ND         | ND       | 180.0 a  |

**ANOVA ( $P \leq 0,05$ ) valores con igual letra minúscula en las columnas, no presentaron diferencias significativas según la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) para separación de medias, con  $P < 0.05$ . ND = Indica que no se detectó la producción del ácido.**

En el caso de hongos, los ácidos producidos más comúnmente son el cítrico y ácido oxálico y en algunos el ácido acético. En un estudio realizado con microorganismos solubilizadores de fosfato, una cepa de *Aspergillus clavatus* obtuvo una concentración de ácido cítrico ( $2385 \text{ mgL}^{-1}$ ) y también produjo más ácidos ( $1880 \text{ mgL}^{-1}$ ) que los otros microorganismos estudiados. El ácido oxálico es uno de los principales ácidos orgánicos producido por diferentes especies de hongos como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Sclerotium* (Banik y Dey, 1983, Gupta *et al.*, 1994; Illmer y Schinner, 1995). Kim *et al.* (1998) reportaron la producción de ácido oxálico por *Enterobacter agglomerans*, en el presente estudio, la cepa que produjo mayor cantidad de ácido oxálico fue *Burkholderia cepacia* MP35FS ( $72.8 \text{ mgL}^{-1}$ ). Sin embargo, en la mayor parte de las cepas estudiadas no se detectó la producción de ácido cítrico y acético.

Los ácidos orgánicos producidos por las 27 cepas y el consorcio C-27 (datos no presentados) fueron estudiados durante 28 días de crecimiento, siendo el C-27 donde se produjo una mayor solubilización de RF, además presentó la más alta producción de ácido 2-cetoglucónico. En la Figura 5.1 se observa como el ácido glucónico alcanza una mayor concentración en los dos primeros días de incubación con respecto al 2-cetoglucónico pero posteriormente la concentración decrece a medida que la concentración de 2-cetoglucónico aumenta. El ácido glucónico y el 2- y 2, 5-ceto derivados son producidos por hongos como *Penicillium luteum* y *Aspergillus niger*, y algunas bacterias del género *Pseudomonas* o géneros relacionados como *Burkholderia*, que poseen una efectiva ruta externa oxidativa de la glucosa y otras aldosas. Los cambios que ocurren en la concentración de ácido glucónico, como se observa en la Figura 5.2, se deben a que la oxidación externa de la glucosa por consorcio C-27 produce un transitorio incremento de la concentración de ácido glucónico (Drosinos y Board, 1994). Una acumulación externa de ácido glucónico resulta en una acidificación del medio, lo cual contribuye a la solubilización de fosfato mineral. El ácido glucónico es subsecuentemente tomado por sistemas de transporte de la célula y utilizado por rutas metabólicas celulares, entre ellas la producción de ácido 2-cetoglucónico. Finalmente, el ácido glucónico fue completamente convertido a 2-cetoglucónico a los 10 días. Kim *et al.* (2006) obtuvieron resultados similares con *Enterobacter* en la solubilización de hidroxiapatita.



**Figura 5.1. Producción de ácido glucónico y 2-cetoglucónico por el consorcio bacteriano C-27 usando el medio MMSRCP-MgG.**

El decremento de los ácidos glucónico y 2-cetoglucónico en el supernadante también sugiere una progresiva inactivación de las enzimas involucradas, quizás debido al aumento de P soluble. Goldstein (2003) propuso que la oxidación periplásmica directa de la glucosa a ácido glucónico, y después a 2-cetoglucónico, es una de las bases metabólicas de fenotipos de bacterias gran negativas que pueden solubilizar fosfato mineral. En el Cuadro 5.4 se observa que la correlación entre la cantidad de ácidos orgánicos producida y la solubilización de RF resultó ser alta (0.736), lo mismo ocurre cuando se correlacionan con el diámetro del halo y la producción de ácidos orgánicos; por lo que se determina que para las cepas estudiadas el principal mecanismo de solubilización es la producción de ácidos orgánicos.

**Cuadro 5.4. Coeficientes de correlación de diferentes caracteres bioquímicos de las bacterias solubilizadoras aisladas del rizoplasma de cereales.**

| Variables                   | P soluble mgL <sup>-1</sup> | pH            | Total de ácidos mgL <sup>-1</sup> | Tamaño de diámetro del halo (cm) |
|-----------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| P soluble mgL <sup>-1</sup> |                             | <b>-0.335</b> | <b>0.736</b>                      | <b>0.609</b>                     |
| pH                          | <b>-0.335</b>               |               | <b>-0.227</b>                     | <b>-0.276</b>                    |
| Total de ácidos             | <b>0.736</b>                | <b>-0.227</b> |                                   | <b>0.461</b>                     |
| Tamaño de halo              | <b>0.609</b>                | <b>-0.276</b> | <b>0.461</b>                      |                                  |

**Matriz de correlación (Pearson): Los valores en negrita son diferentes de 0 con un nivel de significación  $\alpha = 0.01$**

Existe evidencia experimental que comprueba la relación entre la capacidad para sintetizar ácidos orgánicos y la eficiencia en la solubilización por parte de las BSP. Halder *et al.* (1990) demostraron que los ácidos orgánicos aislados de una cultivo de *Rhizobium leguminosarum* solubilizan una cantidad de P casi equivalente a la cantidad de fosfato que fue solubilizado por todo el cultivo. Además de esto, el tratamiento de los cultivos filtrados de varias cepas de *Rhizobium* con pepsina o la eliminación de proteínas por precipitación con acetona no afectó la capacidad de liberación de fosfato, lo que indica que no es un proceso enzimático y si por lo tanto si un proceso mediado por la producción de ácidos orgánicos, que se reafirmó debido a que al neutralizar los ácidos con NaOH se destruyó la actividad de los ácidos por lo que no se detectó la solubilización de fosfato. Sin embargo, existen la posibilidad de otros mecanismos de solubilización que no sean los ácidos orgánicos los solubilizan fosfato debido a la falta de correlación lineal entre el pH y la cantidad de P solubilizado, como sucedió en el presente estudio donde las correlaciones de las diferentes variables frente al pH fueron todas negativas. Alam *et al.*, 2002 encontraron que había una baja correlación entre el índice de solubilización y el pH con las BSP que estudiaron.

La correlación positiva más alta la obtuvieron con el índice de solubilización y los ácidos orgánicos producidos ( $r = 0.825$ ). Esto se debe al hecho de que tal vez son los ácidos orgánicos el mecanismo principal responsable de la solubilización de P. Illmer y Schinner (1992) en un estudio con BSP, no detectaron una cantidad significativa de ácidos orgánicos en cepas con alta solubilización de fosfato. Vyas y Gulati (2009) observaron que si existía una correlación entre una alta solubilización y una mayor producción de ácidos orgánicos por parte de cepas de *Pseudomonas* en presencia de fosfato tricálcico. En cambio, en medios con roca fosfórica la cantidad de fosforo



solubilizado no se correlacionaba con la cantidades de ácidos orgánicos en el medio de cultivo. Esto podría deberse a la mayor reactividad y desviación de los ácidos orgánicos que se produce por la unión con carbonatos libres de la roca fosfórica. Dado, que el pH y los ácidos orgánicos no se correlacionan significativamente, es probable que otros factores bajan el pH, por ejemplo la respiración microbiana, por lo que se puede determinar que la producción de ácidos orgánicos nos es el único mecanismo en la solubilización de fosfato. Todas estas contradicciones o similitudes en la producción de ácidos orgánicos pueden ser explicadas con base en que la cantidad y tipo de ácido depende de la cepa de BSP, la composición del medio y las condiciones de cultivo.

### **Efecto de la aeración en la producción de ácidos orgánicos y solubilización de RF por el consorcio C27**

El oxígeno es un factor importante en la respiración y los procesos metabólicos que involucran transferencia de electrones de las bacterias. En la Figura 5.2 se observa que en condiciones aerobias el consorcio C27 produce casi el doble de solubilización de RF a los 6 días que en condiciones limitadas de oxígeno, debido a que se produce una mayor cantidad de ácidos orgánicos ( $11320 \text{ mgL}^{-1}$ ) frente a los  $8729 \text{ mgL}^{-1}$  cuando no se aplica aeración.

En ambos casos se observa un descenso brusco del pH, habiendo una disminución mayor cuando se aplica aeración, debido quizás al aumento de la producción de ácidos orgánicos y a la producción de protones derivados de la respiración. En la Figura 5.2 se observa que el P soluble en ambos casos comienza a descender entre los 12 y 14 días de incubación.

Esta disminución se puede atribuir según Narsian *et al.* (1995), citado por Goenadi *et al.* (2000), a la disponibilidad de formas solubles de fósforo que tendrían un efecto inhibitorio. Según Illmer y Schinner (1992), otra posible explicación estaría dada por la formación de compuestos órgano-fosforado inducidos por metabolitos orgánicos liberados, los que volverían a disminuir la cantidad de fósforo disponible. Por último, Vassilev *et al.* (1995), citados en Whitelaw *et al.* (1999), sugirieron que la disminución del fósforo observada en la solubilización de roca fosfórica por *A. niger*, probablemente se deba a la utilización del ácido cítrico en condiciones de carencia de nutrientes por parte del hongo.

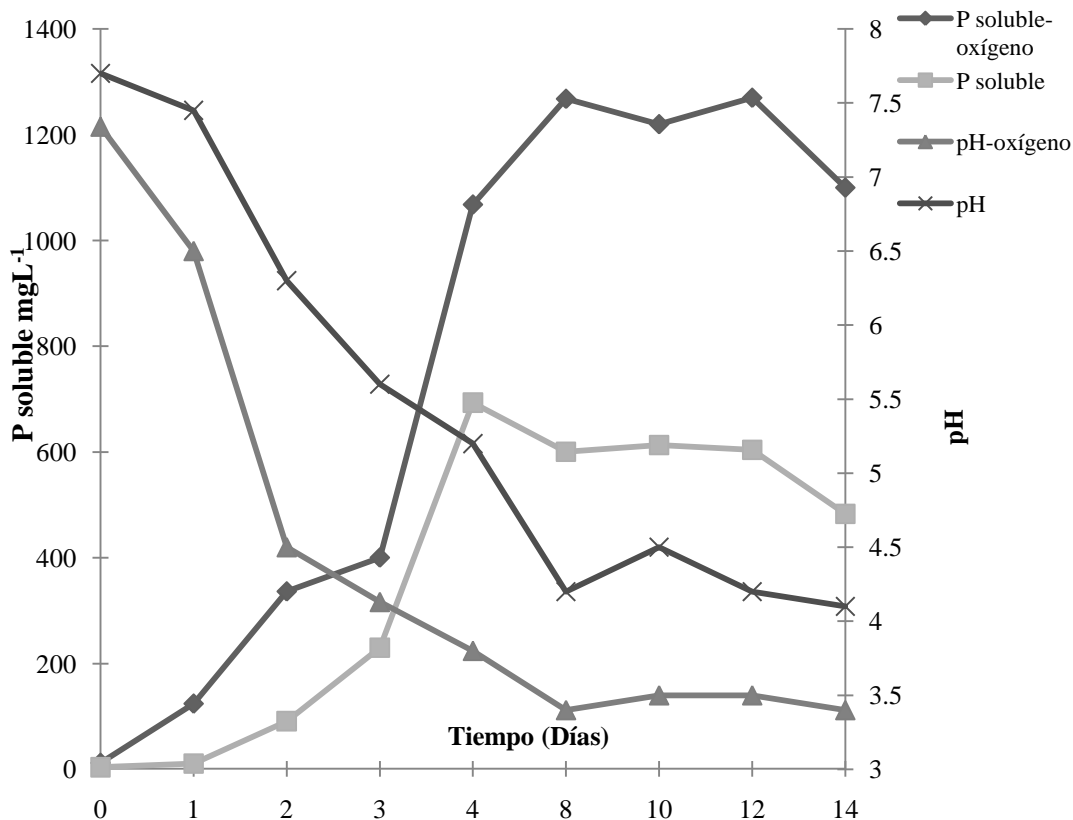


Figura 5.2. Solubilización de RF por el consorcio C27 en el medio MMSRCP-MgG en condiciones aerobias y de reducción de oxígeno. Abreviaturas de las leyendas: P soluble-oxígeno y pH-oxígeno, el cultivo se desarrollo bajo condiciones de aeración; P soluble y pH el cultivo se desarrollo bajo condiciones de reducción de oxígeno.

### Efecto de diferentes fuentes de carbono en la solubilización de RF y producción de ácidos orgánicos

En el caso de las fuentes de carbono de todos los aislamientos fueron capaces de crecer y solubilizar en presencia de glucosa, no así en sacarosa (excepto 3 cepas) y fructosa (excepto 4 cepas). Las cepas *Pseudomonas aeruginosa* MC2 y *Burkholderia cepacia* MC25 fueron las únicas cepas capaces crecer en las tres fuentes de carbono (glucosa, fructosa y sacarosa) usadas por separado en los medios con RF (MMSRCP-MgG, MMSRCP-MgF y MMSRCP-MgS), lo que coincide con los resultados obtenidos previamente con fosfato tricálcico. La solubilización de fosfatos minerales mediada por bacterias Gram negativas ha sido ampliamente estudiada usando la glucosa como fuente de carbono. El ácido glucónico es una de los ácidos orgánicos más eficientes

responsables de la solubilización de P y es producido por la oxidación directa de la glucosa a través de las enzimas ligadas a la enzima GDH (glucosa deshidrogenasa). La enzima GDH se sabe que presenta una amplia especificidad de en algunos organismos, ya que también puede convertir otras aldosas como la xilosa, galactosa, maltosa, además de glucosa, a sus ácidos aldónicos correspondientes, que pueden también tener solubilización de P eficiente (Goldstein *et al.*, 2003). En el Cuadro 5.5 se observa que se detectaron más tipos de ácidos y concentración de los mismos en su mayoría en el medio que contenía glucosa, así como una mayor solubilización.

**Cuadro 5.5. Efecto de diferentes fuentes carbono en la solubilización de RF y producción de ácidos orgánicos por 27 bacterias aisladas del rizoplasma y raíz de gramíneas.**

| Fuente de Carbono | Ácidos orgánicos de bajo peso molecular<br>mgL <sup>-1</sup> |                                |           |           |            |            |           |         |
|-------------------|--|--------------------------------|-----------|-----------|------------|------------|-----------|---------|
|                   | Oxálico  | 2-Cetogluconico                | Cítrico   | Glucónico | Maleico    | Málico     | Succínico |         |
| Sacarosa          | 0.1-0.23   | 78-5420                        | ND        | 120-2230  | ND         | 5,-29      | 1-1.23    |         |
| Fructosa          | ND   | 41-115                         | ND        | 29-2582   | ND         | ND         | 3-8       |         |
| Glucosa           | 1.3-72.8   | 5.7-2105                       | 3-40.7    | 38-4300   | 0.5-47.1   | 19.6-217.1 | 5.2-720   |         |
|                   | Láctico  | Fumárico                       | Fórmico   | Acético   | Propionico | Adípico    | Butírico  |         |
| Sacarosa          | 10.4-558.3   | 3.5-13                         | ND        | 1.8-3.6   | 1.2-9.31   | 5,-13      | 14.4-17.7 |         |
| Fructosa          | 17-92  | 9-15                           | 1.3-30    | 2.3-5.6   | ND         | 6-52.19    | 5.9-9.1   |         |
| Glucosa           | 15.8-336.3   | 0.8-30                         | 41.6-1920 | 0.7-11.7  | 1.9-27.3   | 4.1-180    | 0-5-139.3 |         |
|                   | No. de bacterias positivas a la prueba de azul de bromofenol | P soluble (mgL <sup>-1</sup> ) |           |           |            |            |           | pH      |
| Sacarosa          | 3  | 25-520.3                       |           |           |            |            |           | 6.5-3.1 |
| Fructosa          | 9  | 22.8-133.5                     |           |           |            |            |           | 6.8-4.7 |
| Glucosa           | 25   | 14-549.9                       |           |           |            |            |           | 6.7-3.3 |

ND = Indica que no se detecto la producción del ácido.

### Efecto del contenido nitrógeno en la solubilización y producción de ácidos orgánicos

En el caso de la cepa MP35 FS en el medio que contenía sacarosa se detecto la más alta concentración de ácido 2-cetogluconico (5420 mgL<sup>-1</sup>), así como un mayor descenso de pH (5.3A). Buch *et al.*, (2008) informaron que *P. aeruginosa*, en condiciones anaeróbicas y en presencia de glucosa y nitrato, la oxidación directa de la glucosa está ausente, pero se activa con la disponibilidad de oxígeno. En *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* PAO1 en virtud de la limitación de glucosa, el catabolismo es producido principalmente a través de la ruta fosforilativa, mientras que en el exceso de glucosa, el

vía de oxidación directa es la predominante. En *P. fluorescens* E20, un aumento de temperatura causa catabolismo de la glucosa se pasa de la oxidación directa a la ruta fosforilativa (Bush *et al.*, 2008). Entonces, la utilización de las fuentes de carbono no depende solamente de la cepa si no de diversos factores bióticos.

El comportamiento de las cepas a bajas concentraciones de nitrógeno fue muy distinto. Mientras que la cepa MC25 tuvo una alta solubilización ( $226 \text{ mgL}^{-1}$ ), siendo similar a la obtenida en presencia de nitrógeno, la cepa MC2 fue de  $28 \text{ mgL}^{-1}$  por debajo de la obtenida en cuando existe una cantidad adecuada de nitrógeno (Cuadro 5.2).

Uno de los mecanismos implicados en la actividad de solubilización de fosfato es la secreción de protones asociados a la absorción de amoníaco (Illmer y Schinner, 1992). Sin embargo, los ácidos 2-cetoglucónico y glucónico fueron producidas por MC25 en ausencia de sulfato de amonio, La adición de esta sal estimuló la producción de estos ácidos en la cepa MC2 pero no en la MC25. De lo anterior se infiere que en algunas cepas el amonio no es necesario para la solubilización de RF en algunas de las cepas empleadas, por lo que los protones generados de su asimilación tampoco se pueden considerar como el mayor y único mecanismo de solubilización de RF.

### **Solubilización abiótica de la RF**

Al evaluar si el total de ácidos orgánicos producidos por el consorcio C-27 (Cuadro 5.3A y 5.3B) podrían producir solubilización abiótica de RF, se determinó que si se efectuaba y que se alcanzaba una completa solubilización de la RF, al detectarse una solubilización de  $1727 \text{ mgL}^{-1}$  a un pH de 3.0. Esta mayor solubilización puede deberse a que los ácidos orgánicos no se ven afectados por la competencia por los sitios de unión como ocurre cuando las bacterias forman agregados. En algunos casos se ha reportado la solubilización de fósforo inorgánico en ausencia de la detección de ácidos orgánicos, principalmente como resultado de la acidificación del medio de cultivo (Asea *et al.*, 1988; Illmer y Schinner, 1995). Según Illmer y Schinner (1995), la explicación más probable estaría dada por la excreción de protones del citoplasma a la superficie externa de la célula. Pero Valenzuela *et al.*, (2002) comentan que de ser cierta esta hipótesis permitiría asumir que la roca fosfórica puede ser solubilizada directamente en la superficie de la célula. Si esto fuera efectivo, entonces el peso seco de los micelios de

los hongos estudiados deberían estar estrechamente relacionados con el fósforo solubilizado lo cual no ocurrió en los resultados reportados.

## CONCLUSIONES

Debido a las contradicciones que existen en los resultados de estudios sobre cuáles son los mecanismos de solubilización de fosfatos, resulta necesario efectuar investigaciones que lleven a una mejor comprensión de los fenómenos que ocurren en las diferentes etapas de solubilización, no solo en el aspecto biológico y bioquímico, si no en el fisicoquímico y genético. Debido a lo complejo del fenómeno en sí, y a que intervienen diversos factores que van desde la cepa, las condiciones de cultivo, la composición del medio, la fuente de fosfato, no se puede decir que exista un solo mecanismo de solubilización. Una misma cepa en ciertas condiciones va a producir ácidos orgánicos, como mecanismo de solubilización de fosfato al haber deficiencia de éste en el medio. Al haber una baja concentración de P soluble en el medio por inducción enzimática las bacterias sintetizan los ácidos orgánicos necesarios para oxidar la glucosa. Pero si se cambia la fuente de carbono o la de nitrógeno, se puede inhibir la síntesis de esos ácidos orgánicos y ser otros los mecanismos empleados por la bacteria como la producción de protones, o de ciertas enzimas dependiendo la fuente de carbono. Si esto ocurre usando una misma cepa, se debe entender que habiendo tanta diversidad de microorganismos, los mecanismos de solubilización que se realicen y las correlaciones que se den entre las diferentes variables bioquímicas pueden ser muy distintas, de un microorganismo a otro. En el presente estudio con las cepas empleadas, con los medios y condiciones de cultivo usados, se concluye el principal mecanismo de solubilización de fluoroapatita podría ser la producción de ácidos orgánicos, siendo la glucosa fuente de carbono y la de nitrógeno sulfato de amonio. Tal afirmación se basa en que existe una positiva y alta correlación entre la producción de ácidos orgánicos y la solubilización de RF, aunque faltarían estudios que correlacionen la actividad enzimática. Se observó también que se obtiene una mayor solubilización de RF y de ácidos orgánicos al usar un consorcio bacteriano debido a las relaciones sinérgicas que se dan entre las bacterias. En condiciones de aeración, se estimula la producción de ácidos orgánicos debido a que su síntesis involucra procesos oxidativos. Por la tanto, en condiciones de aeración la solubilización se vio aumentada al doble. También se determinó que los principales ácidos orgánicos involucrados en los procesos de

solubilización de las cepas empleadas fueron el ácido glucónico y el 2-cetoglucónico, siendo el primero un precursor del segundo, así como el iniciador de la solubilización en las primeras horas. Por lo que se determina con base en los resultados experimentales y la literatura que es un mito decir que existe un mecanismo único y universal. El mecanismo o mecanismos que se efectúen van a depender de la cepa, de los componentes del medio y de las condiciones ambientales en que se desarrolle el proceso de solubilización de fosfatos. Finalmente, dado los resultados obtenidos en la solubilización de RF con el consorcio C-27, éste podría tener un uso potencial como biofertilizante o para aumentar la eficiencia de la RF cuando se emplea como fertilizante de cultivos de interés agrícola.

## RECONOCIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de postgrado otorgada a la primera autora y al Programa de Apoyo de Becas Tesis del Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT).

## LITERATURA CITADA

- Alam, S., S. Khalil, N. Ayub, and M. Rashid. 2002. *In vitro* solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) from maize rhizosphere. *Int. J. Agri. Biol.* 4: 454-458.
- Alcalá, de Jesús M, C. Hidalgo-Moreno, M. C. Gutiérrez-Castorena. 2009. Mineralogía y retención de fosfatos en andisoles. *TERRA Latinoamericana* 27: 275-286.
- Asea, P. E. A., Kucey, R.M.N., Stewart, J.W.B. 1988. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. *Soil. Biol. Biochem.* 20: 459-464.
- 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 and Soil* 69: 353-364.
- Baziramakenga, R., R. R. Simard and G. D. Leroux. 1995. Determination of organic acids in soil extracts by ion chromatography. *Soil Biology and Biochemistry* 27(3):349-356.
- Buch, A., G. Archana, and G. Naresh Kumar. 2008. Metabolic channeling of glucose towards gluconate in phosphate-solubilizing *Pseudomonas aeruginosa* P4 under phosphorus deficiency. *Res. Microbiol.* 159:635-642.
- Chen, Y.P., P.D. Rekha, A.B. Arun, F.T. Shen, W.A. Lai and C.C. Young, 2005. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate abilities. *Appl. Soil Ecol.* 34:33-41.

- Donahue, R.L., R.W. Miller and J.C. Shickluna, 1990. An Introduction to Soils and Plant Growth. Prentice Hall of India Private Ltd., New Delhi, pp: 222.
- Farmer, J. J. and M. T. Kelly.1999. *Enterobacteriaceae*. In: A. Ballows, W. Hausler, K. Herrmann, H. Isenberg, H. J. Shadom, editors. Manual Clinical Microbiology. 5th ed., Washington, D.C.: American Society for Microbiology. p.360-83.
- Goenadi, D.H. 1996. Bioactivation of low water-soluble-P phosphate rocks by phosphate-solubilizing bacteria. p. 68. In Nutrient management for sustainable food production in Asia IMPHOS-AARD/CSAR Int Conf, Bali, 9–12 Dec 1996 Central Soil Res Inst, Bogor, Indonesia.
- 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. *Biochimica et Biophysica Acta Proteins and Proteomics* 164:266-271.
- Gupta, A. R., A. Singal, R. Sankar, M. Chander and R. S. Kumar. 1994. A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. *Journal Genetic Applied Microbiology* 40:255-60.
- Halder, A. K., A. K. Mishra, P. Bhattacharya and P. K. Chakrabarty. 1990. Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *Journal Genetic Applied Microbiology* 36:81–92.
- 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*. *Current Microbiology* 47: 87-92.
- Illmer, P. and E. Schinner. 1995. Solubilization of inorganic calcium phosphates solubilization mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry* 27:257-263.
- Illmer, P. and F. Schinner. 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. *Soil Biology and Biochemistry* 24(2):329-335.
- Illmer, P. and F. Schinner. 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. *Soil Biology and Biochemistry* 24(2):329-335.
- Kim, K. Y., D. Jordan and H. B. Krishnan. 1997. *Rahnella aquatilis*, a bacterium isolated from soybean rhizosphere, can solubilize hydroxyapatite. *Microbiology Letters* 35:273-277.
- Kim, K.Y., D. Jordan and G. A. McDonald. 1998. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biol. Fertil. Soils* 26:79-87.
- Kpombekou, K and M. A. Tabatabai. Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks. *Soil Science* 158: 442-453; 1994.
- Nahas, E., D.A. Banzatto and L.C. Assis, 1990. Fluorapatite solubilization by *Aspergillus niger* in vinasse medium. *Soil Biol. Biochem.* 22: 1097-1101.
- Nautiyal, C. S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 170: 265 - 270.
- Paredes-Mendoza, M. y Espinosa-Victoria D.2010. Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *TERRA Latinoamericana* 28(1):61-70.
- Reyes, I., R. Baziramakenga, L. Bernier, and H. Antoun. 2001.Solubilization of phosphate rocks and minerals by a wild-type strain and two UV-induced mutants of *Penicillium*. *Soil Biology and Biochemistry* 33(12-13):1741-1747.

- Reyes, I., L. Bernier, R. Simard and H. Antoun. 1999. Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28: 281-290.
- Rodas, A., R. Nuñez, V. Espinosa, G. Alcántar. 2001. Asociación lupino-maíz en la nutrición fosfatada en un Andosol. *TERRA Latinoamericana* 19:141-154.
- Sangeeta, M. and C.S. Nautiyal. 2001. An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Curr. Microbiol.* 43:51-56.
- Trivedi, P., and T. Sa. 2008. *Pseudomonas corrugate* (NRRL B-30409) mutants increased phosphate solubilization, organic acid production, and plant growth at lower temperatures. *Curr. Microbiol.* 56:140-144.
- Valenzuela, E. 2002. Solubilización de roca fosfórica carolina del norte con cepas de *Aspergillus niger* aisladas desde un suelo trumao. *Boletín micológico* 17:81-88
- Vassileva, M., R. Azcon, J. Barea and N. Vassilev. 2000. Rock phosphate solubilization by free and encapsulated cells of *Yarrowia lipolytica*. *Resources, Conservation, and Recycling* 35(7):693-697.
- Vyas, P. and A. Gulati, 2009. Organic acid production *in vitro* and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. *BMC Microbiol.* 9: 174-174.
- Whitelaw, M. A., T.J. Harden and K.R. Helyar, 1999. Phosphate solubilization in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. *Soil Biol.Biochem.*, 31: 655-65.



## CAPITULO VI

# ACTIVIDAD FOSFATASA EN BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO HABITANTES DE LA RAÍZ Y EL RIZOPLANO DE GRAMÍNEAS

Marianela Paredes-Mendoza<sup>1</sup>; David Espinosa-Victoria<sup>1\*</sup>; Hilda Araceli Zavaleta Mancera<sup>1</sup>; Victor Conde Martinez<sup>1</sup>.

(1) Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México, México.56230. [despinos@colpos.mx](mailto:despinos@colpos.mx)

\* Corresponding author

### Resumen

Las bacterias aisladas de los géneros *Burkholderia*, *Pseudomonas* y *Pantoea*, conocidas como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, son bacterias solubilizadoras de fosfato, productoras de fosfatasas y de sustancias reguladoras del crecimiento, por lo que ejercen un efecto benéfico en las plantas con las cuales interactúan. Se evaluó *in vitro* el potencial de las bacterias aisladas de la raíz y rizoplaneo de gramíneas para la producción de fosfatasas ácidas y alcalinas extracelulares e intracelulares. Las fosfatasas alcalinas mostraron mayor actividad que las ácidas, y las especies de *Burkholderia* fueron las más eficientes en su producción. La bacteria *Burkholderia cepacia* MC25 aislada de maíz azul fue la que presentó mayor capacidad de producir fosfatasa intra y extracelular alcalina (172.5 y 106  $\mu\text{mol.pml}^{-1}\text{d}^{-1}$ , respectivamente). Solo dos de las cepas aisladas produjeron ácido indol acético, *Burkholderia cepacia* RT12 aislada del trigo y *Pantoea spp* AVN aislada de la avena. Sin embargo, todos los aislamientos fueron capaces de oxidar el gluconato a ácido 2-cetoglucónico, considerado uno de los ácidos responsable de la solubilización de fosfato mineral. La capacidad de producción de fosfatasas y factores de crecimiento por parte de las bacterias estudiadas sugiere su uso como biofertilizantes dado el potencial de las mismas para contribuir a la utilización del P no disponible del suelo.

**Palabras clave:** Fosfato orgánico, enzimas, suelo, actividad enzimática, fosfatasa.

## INTRODUCCIÓN

El fósforo es esencial para el crecimiento y productividad de las plantas, presenta un papel importante como la división celular, fotosíntesis, desarrollo de raíces y utilización de carbohidratos (White *et al.*, 2008). En suelos con alto contenido de fosfato orgánico, por ejemplo en suelos forestales, las fosfatasas juegan un papel importante para la adquisición de fósforo por la raíces de las plantas (Häussling y Marchner, 1989). El nombre genérico de fosfatasas fue usado para describir un grupo de enzimas que cataliza la hidrólisis de ésteres y anhídros de ácido fosfórico (Murphy y Kantrowitz, 1994). Las fosfatasas alcalinas predominan en suelos alcalinos y las fosfatasas ácidas en suelos ácidos (Eivazi y Tabatabai, 1977). Las fosfatasas son introducidas al suelo por exudación activa, fuga o lisis celular (Tadano y Sakai, 1991). Esta actividad la producen tres componentes de la rizósfera del suelo (Tarafdar y Jungk, 1987), las raíces de las plantas (Ridge y Rovira, 1971; Luan, 2003), hongos como los ectomicorrizicos (Bowen, 1973; Yadav y Tarafdar, 2007) y las bacterias (Tarafdar y Classen, 1988; Sakurai *et al.*, 2008). Las plantas producen fosfatasas ácidas, las bacterias y hongos producen fosfatasas ácidas y alcalinas (Eivazi y Tabatabai, 1977).

Las bacterias producen fosfatasas para hidrolizar ésteres de fosfato cuando el Pi es limitado, esto es crucial para la supervivencia de las bacterias en el suelo, debido a que ellas no pueden sintetizar fosfato (de Prada *et al.*, 1996; Casanova *et al.*, 2002). Dado que los microorganismos pueden enfrentar una intensa competencia por el fósforo del suelo, es probable que muchos organismos produzcan fosfatasas y desarrollan mecanismos para la regulación de su síntesis y actividad. Adicionalmente, es sorprendente la diversidad de fosfatasas que existen en el suelo (de Prada *et al.*, 1996). Por otro lado, las sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, llamadas inapropiadamente fitohormonas, como el ácido indol-3-acético (AIA) y otros índoles de origen microbiano, también pueden beneficiar a diferentes especies vegetales (Patten y Glick, 1996). La utilización biotecnológica de estos microorganismos benéficos requiere de su caracterización fenotípica previa, con la finalidad de seleccionar aquellas cepas con mayor potencial de uso en las plantas con las cuales interactúan.

Este trabajo tuvo como objetivos evaluar el potencial de las bacterias solubilizadoras de fosfato, habitantes de la rizósfera de gramíneas, en la mineralización del fósforo orgánico, mediante la cuantificación *in vitro* de la producción de fosfatasas

ácidas y alcalinas (extracelulares e intracelulares), así como determinar su capacidad de producción de AIA y oxidación del gluconato.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfato**

Se tomaron muestras de la raíz y rizoplaneo de diferentes cultivos como avena, maíz (criollo y azul), trigo, amaranto y cebada en las localidades de los estados de Michoacán (Patzcuaro y Zirahuén), Tlaxcala (Cacaxtla y San Miguel del Milagro), Puebla (Cholula, San Martín Texmelucan, San Salvador el verde y Huejotzingo), Hidalgo (Pachuca, Ciudad Sahagún y Tulancingo) y México (Texcoco, San Juan Teotihuacán y Amecameca). Las muestras fueron transportadas al laboratorio en una hielera con hielo. Las raíces de cada especie fueron sacudidas suavemente para eliminar el suelo sobrante y conservar el suelo adherido a su superficie (rizoplaneo). A continuación, se maceraron 10 g de raíces y suelo adherido con solución de NaCl al 0.85% w/v procediéndose a disolver el macerado en 90 ml de NaCl al 0.85%. Con el homogenizado se realizaron diluciones seriadas, inoculando 0.1 µL en placas de medio Picovskaya (PVK) (Picovskaya, 1948). Las 127 bacterias que formaron halo fueron purificadas y almacenadas a -71 °C. Para determinar las cepas aisladas con mayor tamaño del halo en medio sólido, primero se preparó un inóculo donde se tomaron 20 µL ( $2700 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>) de las bacterias purificadas y colocaron en tubos con 20 mL de caldo Nutritivo y se incubaron durante dos días a 24 °C. Se sembraron 10 µL de cada cultivo bacteriano (Densidad Óptica=0.6) en medio PVK, cada cepa fue inoculada por triplicado. El diámetro del halo de cada colonia bacteriana fue registrado a los 14 días de incubación a 28 °C. El tamaño de los halos se calculó restando el diámetro de la colonia del diámetro total y se seleccionaron las que mostraron halos mayores a 0.5 cm.

### **Determinación de la capacidad solubilizadora de fosfato**

Los 27 aislamientos bacterianos con mayor tamaño del halo, se utilizaron para cuantificar el fósforo solubilizado en medio líquido (de Freitas *et al.* 1997). Se transfirió 1 mL de cada cultivo bacteriano con aproximadamente  $1 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> a matraces

Erlenmeyer con 100 mL de medio Picovskaya. Se establecieron tres repeticiones por cepa y dos testigos sin inocular. Los matraces se incubaron bajo rotación (160 rpm) a 25 °C por 30 días. Se tomó una alícuota de 5 mL cada 2 días y se filtró a través de papel no. 5 (Whatman, Maidstone, Inglaterra) y luego en filtros con tamaño de poro 0.45  $\mu$  (Millipore, Bedford, USA). Se determinó el pH del filtrado y el fósforo soluble con espectrofotómetro Beckman DU<sup>6</sup> a 620 nm de acuerdo al método de Bray y Kurtz (1945).

### **Determinación de colonias activas en la producción de fosfatasas**

Las colonias activas en la producción de fosfatasas, se determinaron siguiendo el método descrito por Nahas *et al.* (1994). Para ello, los aislamientos bacterianos seleccionados por el mayor tamaño de halo se inocularon en el medio de crecimiento Agar Nutritivo y se incubaron por 3 días a 27 °C. Posteriormente, las placas fueron inundadas con una solución de p-nitrofenilfosfato (0.025 M), en buffer Universal (0.17 M) ajustado a pH 5.5 y pH 9.0 para la determinación cualitativa de las fosfatasas ácidas y alcalinas, respectivamente. Se eliminó el excedente de p-nitrofenilfosfato y los medios inoculados se incubaron por 90 min a 37 °C, y luego se sometieron a vapores de NaOH. La visualización de halos de color amarillo alrededor de las colonias, indicó la presencia de fosfatasas en el medio de cultivo. Las bacterias que resultaron positivas para la producción de fosfatasas ácidas y alcalinas, fueron empleadas para la posterior determinación de la producción de fosfatasas extracelulares e intracelulares.

### **Determinación de la actividad fosfatasas *in vitro* (Antibius *et al.*, 1992)**

Frascos con 50 mL de caldo nutritivo fueron inoculados por triplicado con las bacterias seleccionadas y se incubaron por dos días a 24 °C. Finalizado el período de incubación, se tomaron 10 mL del cultivo y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min, posteriormente las bacterias fueron lavadas tres veces con solución buffer universal y centrifugadas a 10,000 rpm durante 5 min y se les añadieron 10 mL de buffer universal (0.17 M) ajustado a pH 5.5 y 9.0 para la determinación de las fosfatasas ácidas y alcalinas intracelulares, respectivamente. Se tomaron 3 mL de sobrenadante y se le adicionó 1 mL de p-nitrofenilfosfato 0.025 M (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) esterilizado por filtración en un filtro de 0.2  $\mu$ m. Las mezclas de reacción se incubaron

por 24 h a temperatura ambiente, y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 min. A 0.5 ml del sobrenadante le fue añadido 4.5 mL de NaOH (0.5 M). Como controles se usaron medios en los cuales no se hicieron crecer bacterias. La determinación de la actividad de las fosfatasa ácidas y alcalinas extracelulares se realizó en forma similar a la descrita anteriormente, usando 3 mL del sobrenadante. En este caso, el control consistió en medio hervido por 15 min y 1 mL de p-nitrofenilfosfato (Antibius *et al.* 1992). La actividad de la fosfatasa fue medida por la cantidad de nitrofenol del nitrofenilfosfato liberada por el cultivo. Un mol de nitrofenol es equivalente a 1 átomo de fósforo. La absorbancia fue leída a 410 nm usando un espectrofotómetro Beckman DU<sup>-6</sup>. La actividad fue expresada como  $\mu \text{ mol.Pml}^{-1}\text{d}^{-1}$ .

### **Identificación de bacterias**

A las bacterias seleccionadas se les determinó su morfología colonial y microscópica (tinción de Gram). Posteriormente, se resembraron por estría cruzada en agar nutritivo y se incubaron a 24 °C durante 24 h. Nuevamente, se les realizó un examen macroscópico y microscópico para determinar su pureza. Una vez que las cepas estuvieron completamente puras se resembraron en medios de cultivo para las pruebas de identificación preliminar. Los medios para la identificación preliminar fueron: agar nutritivo (microbiota total), King B (*Pseudomonas*), Watanabe (*Bacillus*), agar caseína almidón (*Streptomyces*), Asbhy (*Azotobacter*) y agar Nfb-rojo congo (*Azospirillum*) (Rodríguez *et al.*, 1999). Posteriormente, fueron identificadas usando los sistemas multipuebas API 20NE Test System for non-fermenters y el API 20E for fermentative bacteria (API System, S.A., La Balme les Grottes, France) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Además se realizaron pruebas complementarias que fueron: oxidasa, prueba de oxidación-fermentación de Hugh-Leifson, Catalasa, Movilidad, Citrato Simmons, MacConkey, licuefacción de gelatina a 22° C, producción de nitrito o reducción a N<sub>2</sub>, rojo fenol y rojo de metilo. Posteriormente, los resultados de cada cepa bacteriana fueron analizados usando el software apiweb<sup>TM</sup> (Farmer y Kelly, 1999).

## **Producción de AIA**

Las cepas aisladas se propagaron en el medio de cultivo BT (Tien *et al.*, 1979; Hartmann *et al.*, 1983) líquido con 20 gL<sup>-1</sup> de triptona y se inoculó 1 mL de cada cepa, con una concentración 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> (unidades formadoras de colonias por mililitro). Los cultivos se mantuvieron a 30 °C, durante 96 h en agitación a 220 rpm y se centrifugaron a 9,500 g por 15 min a 4 °C. El ácido 3-indol acético (AIA) se extrajo del sobrenadante con acetato de etilo, el cual se evaporó a sequedad al vacío a 37 °C, resuspendiendo el residuo con 1.0 mL de metanol. Se determinó la producción de AIA con el reactivo de Salkowsky preparado con ácido perclórico al 5.8M y cloruro férrico al 10 nM, según la metodología propuesta por Gallardo y Celis (2008). Las concentraciones de AIA se obtuvieron con base a la curva patrón de concentraciones de AIA (Tien *et al.*, 1979; Hartmann *et al.*, 1983).

## **Oxidación de gluconato**

La oxidación del gluconato se realizó según la técnica reportada por Mac Faddin (1993). Se inoculó 1mL de cada cepa crecida en caldo Nutritivo, con una concentración 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> (unidades formadoras de colonias por mL ) en un medio que tenía gluconato como única fuente de carbono, los ingredientes del medio fueron (por litro): peptona, 1.5 g; extracto de levadura, 1 g y gluconato de potasio, 40 g. Se incubó a 28 °C durante 48 h y al final se adiciono 1 mL de reactivo de Benedict directamente al tubo de gluconato incubado, se mezcló y se colocó en ebullición por 10 min y se observo la formación de un precipitado naranja.

## **Análisis estadístico**

Los valores obtenidos de los tratamientos fueron analizados por medio del programa estadístico XLSTAT-PRO 7.5 (2009). Se efectuó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey, considerando un 5% de significancia para detectar si existieron diferencias estadísticamente significativas de los tratamientos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Determinación de la capacidad solubilizadora de fosfato

Se aislaron 147 cepas bacterianas solubilizadoras de fosfato de las cuales 48% provinieron de raíz y rizoplaneo de maíz. Los halos formados por estas bacterias variaron entre los 0.3 y 3.5 cm de diámetro a los 14 días de incubación en el medio PVK, siendo mayores a los reportados por Nautiyal (1999). Este autor determinó, después de incubar a 28°C durante 14 días, 0.2 cm de diámetro del halo en *Bacillus polymyxa*, 0.6 cm en *Pseudomonas aeruginosa* y 0.7 cm en *P. fluorescens* procedentes de suelos neutros y alcalinos de Lucknow (India). Las cantidades de fosfato solubilizadas por las bacterias aisladas oscilaron entre 15 y 351  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . El pH del medio PVK disminuyó de 7 a 3 en dos días cuando se empleó la cepa MC2. De igual manera, Kim *et al.*, (1997) trabajando con *Rahnella aquatilis* ISL 19, aislada de rizófora de soja, reportaron que esta cepa solubilizó en cultivo líquido conteniendo hidroxapatita, 230  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de fósforo y disminuyó el pH del medio de cultivo de 6.9 a 4.5 en 3 días de incubación. Nahas (1996), indica que la solubilización de fosfatos depende del tipo de microorganismo y el tipo de fosfato insoluble utilizado. La capacidad de algunos microorganismos (bacterias y hongos), para solubilizar fosfatos minerales poco o casi insolubles, constituye una característica fenotípica que ha sido denominada MPS<sup>+</sup> (del inglés Mineral Phosphate Solubilization).

### Determinación de las colonias activas en la producción de fosfatasas

Las bacterias aisladas produjeron más fosfatasas alcalinas debido a que presentaron mayor intensidad de color amarillo a pH 9 que a pH 5, lo cual fue corroborado con la determinación cuantitativa a través de la técnica del p-nitrofenil fosfato, el cual se empleó como sustrato artificial de la enzima fosfatasa. En total se detectaron 27 cepas productoras de fosfatasas alcalinas (Cuadro 6.1), las enzimas fosfatasas son metabolitos asociados al crecimiento bacteriano ya que se forman directamente como productos finales o subproductos del metabolismo energético.

**Cuadro 6.1. Determinación de las colonias activas en la producción de fosfatasa (ácidas y alcalinas) extracelulares e intracelulares, determinadas a partir de bacterias aisladas de la raíz y rizoplasma de gramíneas.**

| Cepa      | Fosfatasa extracelulares alcalinas | Fosfatasa extracelulares ácidas | Fosfatasa intracelulares alcalinas | Fosfatasa intracelulares ácidas |
|-----------|------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| MARC36    | 1                                  | 1                               | 1                                  | 1                               |
| MP37BL    | 0                                  | 0                               | 1                                  | 1                               |
| MC25CG    | 0                                  | 0                               | 1                                  | 1                               |
| 1T13      | 0                                  | 0                               | 1                                  | 1                               |
| RF1       | 0                                  | 0                               | 1                                  | 1                               |
| MP35      | 1                                  | 0                               | 1                                  | 1                               |
| MC2       | 1                                  | 1                               | 1                                  | 1                               |
| MP38      | 1                                  | 1                               | 1                                  | 1                               |
| MC1       | 1                                  | 0                               | 1                                  | 1                               |
| AVN       | 0                                  | 0                               | 1                                  | 1                               |
| MC4       | 0                                  | 0                               | 1                                  | 1                               |
| CH1       | 1                                  | 1                               | 1                                  | 1                               |
| MARC1     | 1                                  | 0                               | 1                                  | 1                               |
| MC21ML    | 1                                  | 0                               | 1                                  | 1                               |
| MC25      | 1                                  | 0                               | 1                                  | 1                               |
| MP3       | 1                                  | 1                               | 1                                  | 1                               |
| MP36      | 1                                  | 0                               | 1                                  | 1                               |
| A-7       | 1                                  | 0                               | 1                                  | 1                               |
| MP32      | 1                                  | 0                               | 1                                  | 1                               |
| NS1       | 1                                  | 0                               | 1                                  | 1                               |
| MP37b     | 0                                  | 1                               | 1                                  | 1                               |
| CAFEA 20N | 0                                  | 0                               | 1                                  | 1                               |
| MP35FS    | 1                                  | 0                               | 1                                  | 1                               |
| GT14      | 0                                  | 0                               | 1                                  | 1                               |
| RT12      | 0                                  | 0                               | 1                                  | 1                               |
| C-20      | 0                                  | 0                               | 1                                  | 1                               |
| MP37      | 1                                  | 0                               | 1                                  | 1                               |

**0, Indica que no se detectó formación de halo amarillo; 1, Indica formación de halo amarillo.**

#### **Determinación de la actividad fosfatasa *in vitro***

Las 27 bacterias estudiadas variaron en su capacidad para producir fosfatasa ácida y alcalina extracelulares e intracelulares. Se encontró que, las fosfatasa ácida y alcalina producidas extracelular e intracelularmente fueron significativamente



diferentes entre sí para las diferentes bacterias estudiadas, resultando las fosfatasas alcalinas intra y extracelulares las de mayor actividad. La cepa *Burkholderia cepacia* MC25 aislada de maíz negro fue la que presentó mayor capacidad de producir fosfatasa intra y extracelular alcalina. ( $172.5$  y  $106 \mu \text{ mol.Pml}^{-1}\text{d}^{-1}$ ). Las especies de *Burkholderia cepacia* (Cuadro 6.2) fueron las más activas en la producción de fosfatasas ácidas y alcalinas extracelulares y fosfatasa ácida intracelular. Además se observó muy poca actividad de fosfatasas ácidas intra y extracelulares de las bacterias aisladas siendo *Burkholderia cepacia* MARCS36 la que presentó mayor actividad. Esto es debido a que las fosfatasas ácidas se presentan principalmente en hongos. Casida (1959) y Nahas *et al.* (1994), indicaron que las fosfatasas ácidas en comparación con las fosfatasas alcalinas, son más comunes entre los hongos del suelo, lo cual pudiera considerarse como un índice de la actividad metabólica de estos microorganismos. En términos generales, las diferencias existentes con relación a la producción de fosfatasas ácidas y alcalinas (extracelulares e intracelulares), entre las diferentes bacterias estudiadas (Cuadro 6.1 y 6.2), podrían estar asociadas no sólo a los mecanismos de inducción y regulación enzimática (Jonner y Johansen, 2000) o a las demandas nutricionales y a la disponibilidad de nutrientes (Dighton, 1991), sino también a las diferentes combinaciones e interacciones de las isoenzimas de las fosfatasas (Kroehler 1988); es decir, que estas diferencias pueden estar controladas poligenéticamente (Kropp 1990). Debido a la poca movilidad del fósforo en el suelo y a su baja concentración en la solución del mismo, los fertilizantes fosfatados aplicados en los suelos agrícolas dan como resultado la acumulación de una gran cantidad de fósforo total en el suelo, en donde la fracción orgánica es del 20 al 80% en forma orgánica (Richardson *et al.* 1994). No obstante, la disponibilidad de fósforo en el suelo depende principalmente de la actividad microbiana.

**Cuadro 6.2. Fosfatasa (ácidas y alcalinas) extracelulares e intracelulares, determinadas *in vitro* a partir de bacterias aisladas de la raíz y rizoplasma de gramíneas.**

| Cepa      | Fosfatasa<br>extracelulares<br>alcalinas | Fosfatasa<br>extracelulares<br>ácidas | Fosfatasa<br>intracelulares<br>alcalinas | Fosfatasa<br>intracelulares<br>ácidas |
|-----------|--|---------------------------------------|--|---------------------------------------|
|           | $\mu \text{ mol.pml}^{-1}\text{d}^{-1}$  |                                       |  |                                       |
| MARC36    | 61.4 f                                   | 36.8 jkl                              | 118.0 b                                  | 45.2 h                                |
| MP37BL    | ND                                       | 1.7 z                                 | 21.4 rs                                  | 28.0 p                                |
| MC25CG    | ND                                       | ND                                    | 31.0 no                                  | 35.0 klm                              |
| 1T13      | ND                                       | ND                                    | 8.2 wxy                                  | 39.3 i                                |
| RF1       | ND                                       | ND                                    | 45.2 h                                   | 1.0 z                                 |
| MP35      | 19.5 st                                  | ND                                    | 39.0 ij                                  | 34.9 klm                              |
| MC2       | ND                                       | 2.4 z                                 | 7.8 wxy                                  | 21.4 rs                               |
| MP38      | 8.5 wx                                   | ND                                    | 34.5 lm                                  | 27.1 pq                               |
| MC1       | 8.5 wx                                   | ND                                    | 65.9 e                                   | 27.0 pq                               |
| AVN       | ND                                       | ND                                    | 15.2 u                                   | 25.5 q                                |
| MC4       | 1.0 z                                    | ND                                    | 8.6 wx                                   | 6.6 xy                                |
| CH1       | 11.0 v                                   | 14.4 u                                | 49.6 g                                   | 5.3 z                                 |
| MARC1     | 1.9 z                                    | 3.0 z                                 | 32.8 mn                                  | 31.3 n                                |
| MC21ML    | 7.3 xy                                   | ND                                    | 115.0 c                                  | 32.9 mn                               |
| MC25      | 106.0 d                                  | ND                                    | 172.5 a                                  | 32.9 mn                               |
| MP3       | 2.9 z                                    | 1.5 z                                 | 41.1 i                                   | 45.2 h                                |
| MP36      | 23.2 r                                   | ND                                    | 28.0 p                                   | 28.8 op                               |
| A-7       | 27.0 pq                                  | ND                                    | 49.3 g                                   | 30.8 no                               |
| MP32      | 27.0 pq                                  | ND                                    | 36.8 jkl                                 | 30.8 no                               |
| NS1       | 14.3 u                                   | 1.0 z                                 | 49.3 g                                   | 34.9 klm                              |
| MP37b     | 1.0 z                                    | 10.3 vw                               | 39.4 i                                   | 37.0 jk                               |
| CAFEA 20N | 8.0 wxy                                  | ND                                    | 41.1 i                                   | 30.8 no                               |
| MP35FS    | 18.2 t                                   | ND                                    | 49.4 g                                   | 11.5 v                                |
| GT14      | 5.0 z                                    | ND                                    | 2.0 z                                    | 3.3 z                                 |
| RT12      | ND                                       | ND                                    | 6.6 xy                                   | 11.5 v                                |
| C-20      | ND                                       | ND                                    | ND                                       | 11.5 v                                |
| MP37      | 2.2 z                                    | ND                                    | 1.0 z                                    | 6.2 xy                                |

ND = Indica que no se detectó la actividad fosfatasa. Las medias entre las actividades de las fosfatasas ácidas y alcalinas, seguidas con letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

### Identificación de bacterias

En el Cuadro 6.2 se muestran las 27 bacterias identificadas con API 20 E® y API 20 NE® habitantes de la raíz y rizoplasma de gramíneas. Se identificaron 3 géneros: *Burkholderia*, *Pseudomonas* y *Pantoea*, utilizando la base de datos de

APIweb™: En el caso de *Burkholderia cepacia* se identificaron (23 cepas) de las cuales el 80% se aislaron de maíz provenientes de las localidades de Cacaxtla (10 cepas) y Patzcuaro (9), lo que corrobora la interacción entre cepas pertenecientes a este grupo microbiano y el cultivo del maíz.

El género *Burkholderia* comprende bacilos rectos, Gram negativos, oxidasa y catalasa positivos y con una proporción de GC (contenido de guanina y citosina) que oscila entre el 59 y el 69.5%. Son bacterias móviles con un flagelo polar único o bien con un penacho de flagelos polares según la especie. También son mesófilos y no esporulados. Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y se aíslan del suelo, el agua y de las plantas. Posee una gran plasticidad para usar diferentes sustratos (hay especies, como *B. cepacia*, que pueden utilizar como nutrientes más de 100 compuestos químicos diferentes). Se ha reportado que las especies de *Burkholderia* inoculadas en gramíneas estimularon el crecimiento de las plantas. Estudios realizados con *B. vietnamiensis* en arroz indicaron un aumento en su peso radical (49%), en comparación con el mismo cultivo fertilizado con la dosis de fósforo y nitrógeno (FN) recomendada para la región, sin inocular y en condiciones de invernadero (Tran Van *et al.*, 2000). *B. vietnamiensis* incrementó el peso seco del arroz por sustancias promotoras del crecimiento vegetal (SPCV) (Gillis *et al.*, 1995; Tran Van *et al.*, 2000). *Burkholderia spp* inoculada en arroz sin FN produjo un aumento de un 50% en el contenido de nitrógeno total; existe la hipótesis de que este incremento fue por la vía de la fijación biológica del N<sub>2</sub> capacidad demostrada en esta especie de *Burkholderia* y por la medición de la actividad reductora de acetileno en el arroz (Megalhaes-Cruz *et al.*, 2001). Existe el reporte que *Burkholderia* es un endófito en el sistema de conducción del arroz (Minerdi *et al.*, 2001; Guillis *et al.*, 1995; Mundt y Hinkle, 1976). En la actualidad la fijación biológica del N<sub>2</sub>, se considera una forma de promoción del crecimiento vegetal (Minerdi *et al.*, 2001), otro ejemplo es *B. brasilensis* una endófito de caña de azúcar que causa un incremento del 25% en su rendimiento, por la vía de la fijación del N<sub>2</sub> (Nejad y Jonson, 2000), en comparación con la caña cultivada exclusivamente con el fertilizante, y en el cultivo sin inocular se detectó la actividad nitrogenasa de *Burkholderia* en los órganos de la gramínea (Mattos *et al.*, 2001).

**Cuadro 6.3. Identificación bioquímica (API System), producción de AIA y oxidación de gluconato, de bacterias aisladas de la raíz y rizoplasma de diferentes gramíneas.**

| Cepa      | Fuente       | Identificación bioquímica     | AIA $\mu\text{gL}^{-1}$ | Oxidación de gluconato |
|-----------|--------------|-------------------------------|-------------------------|------------------------|
| MARC36    | Maíz azul    | <i>Burkholderia cepacia</i>   | ND                      | 1                      |
| MP37BL    | Maíz criollo | <i>Burkholderia cepacia</i>   | ND                      | 1                      |
| MC25CG    | Maíz azul    | <i>Burkholderia cepacia</i>   | ND                      | 1                      |
| 1T13      | Trigo        | <i>Burkholderia gladioli</i>  | ND                      | 1                      |
| RF1       | Avena        | <i>Pseudomonas luteola</i>    | ND                      | 1                      |
| MP35      | Maíz criollo | <i>Burkholderia cepacia</i>   | ND                      | 1                      |
| MC2       | Maíz azul    | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ND                      | 1                      |
| MP38      | Maíz criollo | <i>Burkholderia cepacia</i>   | ND                      | 1                      |
| MC1       | Maíz azul    | <i>Pantoea sp</i>             | ND                      | 1                      |
| AVN       | Avena        | <i>Pantoea spp 2</i>          | 33.2 b                  | 1                      |
| MC4       | Maíz azul    | <i>Burkholderia gladioli</i>  | ND                      | 1                      |
| MP37      | Maíz criollo | <i>Burkholderia cepacia</i>   | ND                      | 1                      |
| CH1       | Cebada       | <i>Burkholderia cepacia</i>   | ND                      | 1                      |
| MARC1     | Maíz azul    | <i>Burkholderia cepacia</i>   | ND                      | 1                      |
| MC21ML    | Amaranto     | <i>Burkholderia cepacia</i>   | ND                      | 1                      |
| MC25      | Maíz azul    | <i>Burkholderia cepacia</i>   | ND                      | 1                      |
| MP3       | Maíz criollo | <i>Burkholderia cepacia</i>   | ND                      | 1                      |
| MP36      | Maíz criollo | <i>Burkholderia cepacia</i>   | ND                      | 1                      |
| A-7       | Avena        | <i>Burkholderia cepacia</i>   | ND                      | 1                      |
| MP32      | Maíz criollo | <i>Burkholderia cepacia</i>   | ND                      | 1                      |
| NS1       | Cebada       | <i>Burkholderia cepacia</i>   | ND                      | 1                      |
| MP37b     | Maíz criollo | <i>Burkholderia cepacia</i>   | ND                      | 1                      |
| CAFEA 20N | Maíz negro   | <i>Burkholderia cepacia</i>   | ND                      | 1                      |
| MP35FS    | Maíz criollo | <i>Burkholderia cepacia</i>   | ND                      | 1                      |
| GT14      | Girasol      | <i>Burkholderia cepacia</i>   | ND                      | 1                      |
| RT12      | Trigo        | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 42.3 a                  | 1                      |
| C-20      | Cebada       | <i>Burkholderia cepacia</i>   | ND                      | 1                      |

ND = Indica que no se detectó la producción de AIA.

1 = Indica que si oxido la bacteria el ácido glucónico a 2-cetoglucónico.

ANOVA ( $P \leq 0,05$ ) valores con igual letra minúscula en las columnas, no presentaron diferencias significativas según la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) para separación de medias, con  $P < 0,05$ .

Las bacterias del grupo *Pseudomonas* están constituidas por microorganismos Gram-negativos, siempre móviles con flagelación polar. Se encuentran normalmente en

el suelo, aunque pueden ser patógenos oportunistas de animales (*P. aeruginosa*) y patógenos de plantas (*P. syringae*). Su metabolismo es siempre respiratorio, o bien aerobio (la mayoría usa como aceptor de electrones O<sub>2</sub>) o anaerobio (algunos usan NO<sup>-</sup>). Presentan una versatilidad metabólica muy grande que se traduce en su capacidad de utilizar como fuente de carbono substratos muy variados. Por otra parte, hay algunos individuos del grupo que son quimiolitotrofos usando H<sub>2</sub> o CO como donadores de electrones. El género *Pseudomonas* es el que ha manifestado especies que poseen mayor capacidad solubilizadora mineral y mayor producción de fitohormonas que inducen a un gran desarrollo radicular

El género *Pantoea* está compuesto por Bacilos Gram negativos rectos (0.5 -1.3 x 1-3 µm) no encapsulados, no formadores de esporas, motiles por la presencia de flagelación peritrica. Son promotores del crecimiento y se encuentran en el suelo, agua y plantas. Son fijadores de nitrógeno y solubilizadores de fosfato, son patógenos oportunistas en humanos.

### **Producción de AIA**

En relación con la producción de AIA por las cepas seleccionadas, se encontró que solo dos produjeron AIA, *Burkholderia cepacia* RT12 (42.25 µgL<sup>-1</sup>) aislada del trigo y *Pantoea spp* AVN (33.2 µgL<sup>-1</sup>) aislada de avena. Resultados similares obtenidos por Hernández (1995) reporta que cepas de *Pseudomonas* y *Burkholderia cepacia* produjeron diversas hormonas vegetales cuando se cultivaban en medios líquidos con triptófano. Una de las principales es el AIA, demostrando que las cepas más activas en cuanto a la producción de esta auxina producían entre 5 y 20.6 µgL<sup>-1</sup> de AIA. Sin embargo, los resultados obtenidos y comparados con los reportados para bacterias de la rizosfera, incluyendo las cepas del género *Azospirillum* y *Rhizobium* (Pazos *et al.*, 2000; Rojas y Pérez, 1998), se observa que los niveles producidos por las cepas de *Pseudomonas* y *Burkholderia* son bajos. Estas diferencias entre bacterias con capacidad para sintetizar AIA en medio de cultivo pueden deberse a las condiciones del mismo cultivo; por ejemplo, de la etapa de crecimiento, la constitución genética y la concentración del sustrato (Fallik *et al.*, 1989). En adición, se ha determinado que la cantidad de oxígeno y la limitación de nitrógenos en el suelo, elevan la producción de AIA y la fijación de nitrógeno (Frankenberger y Arshad, 1995).

## **Oxidación de gluconato**

Se observó que todas las cepas oxidan el gluconato (Cuadro 6.3) para producir ácido 2-cetoglucónico. La glucosa es un precursor de ácidos orgánicos de bajo peso molecular como el ácido glucónico y el 2-cetoglucónico ambos son importantes en la solubilización del fosfato (Goldstein *et al.*, 2003). Reyes *et al.* (2007) evaluaron diferentes fuentes de carbono y nitrógeno como parámetros para evaluar la diversidad de los microorganismos solubilizadores de fosfato. Kim *et al* (1997) determinaron que la BSP *Enterobacter intermedium* oxida la glucosa a ácido glucónico, el cual después es convertido a 2-cetoglucónico.

## **CONCLUSIONES**

Se aislaron 23 cepas de *Burkholderia* y 2 de *Pseudomonas* y 2 de *Pantoea* de la raíz y rizosfera de maíz, trigo, avena, amaranto, girasol y cebada. Dichos microorganismos pueden vivir en el suelo y en las plantas. Se demostró que las cepas aisladas *Burkholderia cepacia* RT12 aislada del trigo y *Pantoea spp* Avn aislada de la avena secretan sustancias que regulan el crecimiento vegetal en diferentes concentraciones. Se detectó la oxidación de gluconato a ácido 2-cetoglucónico en todas las cepas estudiadas lo que indica que pueden solubilizar fosfato. Dentro de las 27 cepas estudiadas, la que presentó mayor producción de fosfatasas alcalinas intra y extracelulares fue la cepa *Burkholderia cepacia* MC25 aislada de maíz azul. Debido a estas propiedades, estas cepas podrían tener un enorme potencial para usarse en la inoculación de gramíneas o de otros cultivos de interés agrícola. La identificación de estas bacterias seleccionadas y su aplicación en ensayos directamente en el suelo, permitirá avanzar en el estudio de las mismas como potenciales herramientas de inoculación en los suelos deficientes en fósforo.

## **RECONOCIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de posgrado otorgada a la primera autora y al Programa de Apoyo de Becas Tesis del Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT).

## LITERATURA CITADA

- Antibius, R. K., R. L. Sinsabugh, A. E. Linkins. 1992. Phosphatase activities and phosphorus uptake from inositol phosphate by ectomycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Botany* 70:794-800.
- Bowen, G. D. 1973. Mineral nutrition of ectomycorrhizae, p. 151-205. In G. C. Marks and T. T. Kozlowski (ed.), *Ectomycorrhizae*. Academic Press, Inc. New York.
- Bray, R., L. Kurtz. 1945. Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soil. *Soil Sci* 59: 39-45.
- Casanova, E., A. M. Salas, M. Toro. 2002. The use of nuclear and related techniques for evaluating the agronomic effectiveness of phosphate fertilizers, in particular rock phosphate, in Venezuela: initial available P and its changes in soils amended with rock phosphate. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 63:13-20.
- Casida, L.E. 1959. Phosphatase activity of some common soil fungi. *Soil Sci.* 87: 305-310.
- Prada, P., J. Loveland-Curtze, J. E. Brenchley. 1996. Production of two extracellular alkaline phosphatases by a psychrophilic arthrobacter strain. *Appl Environ Microbiol* 62(10):3732-8.
- Defreitas, J. R., M. R., and J. J. Germida. 1997. Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biol Fertil Soils* 24: 358-364.
- Dighton, J. 1991. Acquisition of nutrients from organic sources by mycorrhizal autotrophic plants. *Experientia* 47: 362-369.
- Eivazi, H., and M. A. Tabatabai. 1977. Phosphatases in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 9: 167-172.
- Fallik, E., Y. Okon, E. Epstein, A. Goldman, and M. Fischer. 1989. Identification and quantification of IAA and IBA in *Azospirillum brasilense*-inoculated maize roots. *Soil Biol Biochem* 21: 147-153.
- Farmer, J. J., and M. T. Kelly. 1999. *Enterobacteriaceae*. In: Ballows A, Hausler W, Herrmann K, Isenberg H, Shadomy HJ, editors. *Manual Clinical Microbiology*. 5th ed., Washington, D.C.: American Society for Microbiology; .p.360-83.
- Gillis, M., T. V. Van, R. Bardin, M. Goor, and P. Heebar. 1995. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an amended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp.nov. for N<sub>2</sub>-fixing isolates from rice in Vietnam. *Int. J Syst Bacteriol* 45:274-289.
- 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. *Biochimica et Biophysica Acta Proteins and Proteomics* 164:266-271.
- Hammond, J. P., M. R. Broadle, and P. J. White. 2004. Genetic responses to phosphorus deficiency. *Annals of Botany* 94:323-332.
- Hartmann, A., M. Singh, and W. Klingmuller. 1983. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants, excreting high amounts of indolacetic acid. *Can. J Microbiol* 29: 916-923.
- Häussling, M., and H. Marschner. 1989. Organic and inorganic soil phosphates and acid phosphates activity in the rhizosphere of 80-year-old Norway spruce (*Picea abies* L.) Karst.) trees. *Biol Fertil Soils* 8: 128-133.
- Hernández, A. N., A. Hernández, and M. Heydrich. 1995. Selección de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz. *Cultivos Tropicales* (CU) 16 (3): 5-8.

- Joner, E. J., and A. Johansen. 2000. Phosphatase activity of external hyphae of two arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycol Res* 104: 81-86.
- Kim, K., D. Jordan, and H. Krishnan. 1997. *Rahnella aquatilis*, a bacterium isolated from soybean rhizosphere can solubilize hydroxyapatite. *Microbiology Letters* 35:273-277.
- Kroehler, C. 1988. The effects of organic and inorganic phosphorus concentration on the acid phosphatase activity of ectomycorrhizal fungi. *Can J Bot* 66: 750-756
- Kropp, B. R. 1990. Variation in acid phosphatase activity among progeny from controlled crosses in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *Can. J. Bot* 68: 864-866.
- Luan, S. 2003. Protein phosphatases in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 63-92.
- Mattos, K. A., C. Jones, N. Heise, J. O. Previsto, and L. Mendoca-Previato. 2001. Structure of an acidic exopolysaccharide produced by the diazotrophic endophytic bacterium *Burkholderia brasilensis*. *Eur J Biochem* 268: 3174-3179
- Megalhaes-Cruz, L., E. Maltempi de Souza, O. B. Weber, J. I. Baldani, J. Dobereiner, and F. Oliveira-Redroza. 2001. 16 S Ribosomal characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp) and pineapple (*Ananas comosus* L). *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2375-2379.
- Minerdi, D., R. Fani, R. Gallo, A. Boarino, and P. Bonafante. 2001. Nitrogen fixation genes in an endosymbiotic *Burkholderia* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 725-732.
- Mundt, J.O., and Hinkle, N.F. 1976. Bacteria within ovules and seed. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 694-698.
- Murphy, J. E., and E. R. Kantrowitz. 1994. Why are mammalian alkaline phosphatases much more active than bacterial alkaline phosphatases? *Mol Microbiol* 12: 351-357.
- Nahas, E. 1996. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. *World J. Microbiol. Biotech.* 12: 567 – 572.
- Nahas, E., F. Centurion, and L. C. Assis. 1994. Microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases de vários solos. *Rev. Bras. Cien. Solo.* 18: 43-48.
- Nautiyal, C. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 170: 265 – 270.
- Nejad, P., P. A. Johnson. 2000. Endophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oilseed rape and tomato. *Biol Control* 18: 208-215.
- Patten, C. L., and B. R. Glick. 2002. The role of bacterial indoleacetic acid in the development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol* 68: 3795-3801.
- Pazos, M., A. Hernández, V. M. Paneque, and J. L. Santander. 2000. Caracterización de cepas del género *Azospirillum* aisladas de dos tipos de suelos de la localidad de San Nicolás de Bari. *Cultivos Tropicales* (CU) 21 (3): 19-23.
- Pikovskaya, R. I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiologiya* 17 :362-370.
- Reyes, I., L. Bernie, R. Simard, H. Antoun. 1999. Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28: 281-290.
- Richardson, A. E. 1994. Soil microorganisms and phosphorus availability. In: C. E. Pankhurst, B. M. Doube, W. S. R. Gupta and, P. R. Grace (eds). *Soil Biota: Management in sustainable farming systems*. CSIRO. Melbourne, Australia pp 50-62.
- Ridge, E.H., and A.D. Rovira. 1971. Phosphatase activity of intact young wheat roots under sterile and non-sterile conditions. *New Phytol.* 70: 1017-1026.



- Rodriguez, H., and R. Fraga. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17:319-339.
- Rojas, M. M., and L. C. Pérez. 1998. Mejoramiento de las condiciones de cultivo para la producción de ácido-3-indol acético por *R. meliloti*. *Biología (CU)* 12: 65-70.
- Sakurai, M., J. Wasaki, Y. Tomisawa, T. Shinato, and M. Osaki. 2008. Analysis of bacterial communities on alkaline phosphatase genes in soil supplied with organic matter. *Soil Science Plant Nutrition* 54: 62–71.
- Tabatabai, M. A., and J. M. Bremner. 1969. Use of p-nitrophenylphosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol Biochem* 1: 301-307.
- Tadano, T., and H. Sakai. 1991. Secretion of acid phosphatase by the roots of several crop species under phosphorus- deficient conditions. *Soil. Sci. Plant Nutr.* 37:129-140.
- Tarafdar, J. C., and A. Jungk. 1987. Phosphatase activity in the rhizosphere and its relation on the depletion of soil organic phosphorus. *Biol Fert Soils* 3:199-204.
- Tarafdar, J.C., and N. Classen. 1988. Organic phosphorus compounds as a phosphorus source for higher plants through the activity of phosphatase produced by plant roots and microorganisms. *Biol Fertil Soil* 5: 308-312.
- Tien, T. M., M. H. Gaskin, and D. H. Hubbell. 1979. Plant Growth Substance produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl Environ.Microbiol.* 37: 219-226.
- Tran, Van V., O. Berge, S. N. Ke S, J. Balandreau, and T. Heulin. 2000. Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. *Plant Soil* 218:273–284.
- Yadav, B. K., J. C. Tarafdar. 2007. Availability of unavailable phosphate compounds as a phosphorus source for clusterbean (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.) through the activity of phosphatase and phytase produced by actinomycetes. *Journal of Arid Legumes* 4:110-11.

## CAPITULO VII

### COLONIZACIÓN ENDOFITICA DE RAÍCES DE AVENA, CEBADA, TRIGO Y MAÍZ POR CEPAS DE *BURKHOLDERIA* SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO

Marianela Paredes-Mendoza<sup>1</sup>; Hilda A. Zavaleta-Mancera<sup>1</sup>; David Espinosa-Victoria<sup>1</sup>

<sup>(1)</sup>Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México, México. 56230. [despinos@colpos.mx](mailto:despinos@colpos.mx)

\* Corresponding author

#### RESUMEN

El género *Burkholderia* ha sido considerado como un endófito facultativo, se ha encontrado en raíces, tallos y hojas de monocotiledóneas como de dicotiledóneas. Los objetivos de este estudio fueron: evaluar los mecanismos de penetración y colonización de tres cepas *Burkholderia* en maíz amarillo, maíz azul, avena y trigo y cebada. Así como la cuantificación de la producción de enzimas hidrolíticas y su papel en la invasión de estas bacterias en la raíz. Para la realización del estudio de inmunodetección se produjeron anticuerpos policlonales de la fracción LPS en conejo para cada una de las tres cepas bacterianas, que fueron identificadas genéticamente por la secuenciación del gene 16S rDNA como: *Burkholderia gladioli* IT13, *Burkholderia cepacia* RT12 y *Burkholderia cepacia* CAFEA. Las cepas IT13 y RT12 fueron aisladas del rizoplaneo de trigo, mientras que la cepa CAFEA del rizoplaneo de maíz. Se determinó la capacidad de las cepas de *Burkholderia* de penetrar y colonizar la zona apical y basal de las raíces cuando las plántulas presentaron la segunda y tercera hoja madura por medio del marcaje de los anticuerpos con FAST RED (Chemicon) y se observaron con microscopia de fluorescencia. Los resultados sugieren que las cepas de *Burkholderia* colonizan la raíz penetrando la epidermis vía simplasto por medio de la acción de las pectinasas, así como el parénquima de la corteza vía apoplasto y/o simplasto. El incipiente desarrollo de la banda de Caspary, pudo haber facilitado la entrada de las bacterias al cilindro vascular. Aunque las especies del género *Burkholderia* evaluadas han sido caracterizadas como solubilizadoras de fosfato y productoras de fosfatasas y

ácidos orgánicos, su inclusión en la elaboración de biofertilizantes, podría verse limitado por su potencial patogenicidad para los seres humanos. La investigación futura deberá enfocarse en conocer si estas bacterias invaden células animales así como los mecanismos involucrados.

**Palabras clave:** inmunodetección, endófito, xilema, apoplasto, raíces, bacterias patógenas, pectinasa, intracelular.

## INTRODUCCIÓN

Los endófitos son microorganismos que tienen la capacidad de penetrar y proliferar en el interior de las raíces, y de este órgano trasladarse por el sistema vascular, sin causar daño, y establecerse y desarrollar poblaciones endófitas en tejidos de tallo, hojas u otros órganos (Hurek *et al.*, 1994; Hell *et al.*, 1995; Sturz *et al.*, 2000). Las bacterias endófitas se pueden tornar patógenas bajo ciertas condiciones y con genotipos específicos de la planta hospedera (Misaghi y Donndelinger, 1990). La colonización de bacterias en la raíz ha sido estudiada con bacterias no simbióticas, tales como *Pseudomonas*, *Azospirillum*, o *Bacillus*. Las cuales son capaces de crecer rápidamente en sustratos fácilmente degradables como hidratos de carbono monoméricos o ácidos orgánicos (Kloepper y Beauchamp; 1992). Estas bacterias poseen mecanismos específicos que interactúan con la superficie y/o interior de la raíz.

Se reconocen como sitios de penetración de la planta: los estomas, heridas áreas, el sitio de emergencia de raíces laterales, aunque también se sabe que las bacterias endófitas pueden producir enzimas hidrolíticas capaces de degradar la pared celular vegetal (McCully, 2002). Esta hipótesis fue derivada del análisis de datos acerca de la presencia de enzimas pectinolíticas producidas por bacterias endófitas como *Azoarcus* sp. (Hurek *et al.*, 1994), *Azospirillum irakense* (Khammas y Kaiser, 1991) y *Pseudomonas fluorescens* (Quadt-Hallmann *et al.*, 1997). Estas bacterias estimulan el crecimiento de muchos cultivos mediante la producción de sustancias como sideróforos, ácidos orgánicos y la fijación del nitrógeno atmosférico (Sturz *et al.*, 2000). Las bacterias endófitas han sido aisladas de plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas, incluyendo especies leñosas, como el roble (*Quercus robur*) la pera (*Pirus comunis*), y plantas herbáceas como la remolacha azucarera (*Beta vulgaris*), el maíz (*Zea mays*) y trigo (*Triticum Sativum*) Entre los endófitos asociados a maíz se encuentran

*Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella sp.*, y *Burkholderia sp.*

Dentro del género *Burkholderia* existen cepas patógenas para humanos, animales y plantas. El género *Burkholderia* comprende 19 especies, siendo *B. cepacia*, probablemente la especie más importante, la cual es un bacilo Gram negativo, no fermentador y multiresistente a antibióticos. Las especies de *Burkholderia* tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, solubilizar fosfato, producir fitohormonas y degradar compuestos tóxicos. A pesar de las ventajas económicas y ecológicas que representan para la agricultura, existen opiniones en contra de su uso debido a su conocido papel como patógeno oportunista en las infecciones nosocomiales, en pacientes con fibrosis quística y neutropénicos (Heungens y Parke, 2000; Parke y Gurian-Sherman, 2001; Singh *et al.*, 2006).

El complejo *B. cepacia* comprende por lo menos 10 genovares (*B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria*, *B. anthina*, *B. pyrrocinia* y *B. ubonensis*). Otras especies de *Burkholderia* son *B. gladioli*, *B. mallei* y *B. pseudomallei*. Los factores de virulencia propios de *B. cepacia* han sido poco estudiados, se han identificado proteasas, lipasas, hemolisinas y sideróforos, pero se desconoce la relación entre estos productos y su patogénesis. Poco se conoce de los mecanismos por los que las bacterias entran y colonizan los tejidos vegetales, pero el hecho de que en las diferentes etapas del proceso de colonización de la raíz, las bacterias atraviesan las paredes celulares vegetales indica que las enzimas hidrolíticas de la pared celular vegetal producidas por las bacterias como celulasas, hemicelulasas y pectinasas pueden estar implicados en este proceso, lo cual ha sido demostrado en estudios de represión enzimática (García-Romera *et al.*, 1990). A falta de estudios sobre estos procesos, el objetivo del presente estudio fue determinar la capacidad de dos cepas de *Burkholderia cepacia* y una de *Burkholderia gladioli* solubilizadoras de fosfato para penetrar y colonizar las raíces de avena, cebada, trigo, maíz amarillo y maíz azul.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas bacterianas

Inicialmente se utilizaron 27 bacterias solubilizadoras de fosfato (BSP), 21 cepas del género *Burkholderia*, 4 de *Pseudomonas* y 2 de *Pantoea* aisladas de la raíz y rizoplano de maíz, trigo, avena, amaranto, girasol y cebada, que fueron caracterizadas fenotípicamente usando los sistemas multipuebas API 20NE Y API 20E (Paredes-Mendoza *et al.*, in press). Las cepas bacterianas fueron almacenadas a -71 °C en medio nutritivo suplementado con glicerol al 20% (v/v) hasta su uso.

### Determinación de la actividad pectinasa y celulasa de las BSP

Para estudiar la actividad pectinasa de las cepas se usó el medio AMA de acuerdo al método de Plazinski y Rolfe (1985) con algunas modificaciones. Las placas inoculadas fueron incubadas a 30 °C de 7 a 12 días (Elbeltagy *et al.*, 2000). La actividad de la celulasa fue determinada mediante el método de Andro *et al.*, (1984) usando el medio, la actividad de la celulasa se determinó cubriendo las placas de medio con rojo congo 0.1% (w/v) por 15 a 30 min y blanqueandolas en seguida con NaCl 1 M para la observación de los halos de degradación.

Para cuantificar la capacidad de producir pectinasas y celulasas en medio líquido, frascos con 50 mL de los medios AMA y Andro se inocularon por triplicado con 1 mL del cultivo bacteriano ( $2700 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>) y se incubaron en rotación (160 rpm) a 25 °C durante 9 días. Posteriormente se determinó o la glucosa liberada por el método de punto final de la glucosa oxidasa (Kunst *et al.*, 1997) empleando Glucose (HK) ensaye Kit QGAHK-20 de Sigma, según las instrucciones del fabricante. Una unidad de enzima fue definida como la cantidad en  $\mu\text{mol min}^{-1}$  de glucosa liberada.

### Obtención de la fracción LPS (lipopolisacárido) de las cepas de *Burkholderia*

Se emplearon las cepas (RT12, CAFEA y 1T13) para realizar los estudios de inmunolocalización, debido que presentaron la mayor capacidad de producir pectinasas y celulasas en medio sólido; así como una alta solubilización de RF (Paredes-Mendoza

y Espinosa-Victoria; in press). Las cepas RT12, CAFEA y 1T13, fueron cultivadas en medio Caldo Nutritivo a 28 °C a 200 rpm durante 8 h y se procedió según el método descrito por Westphal *et al.*, (1965). La biomasa celular obtenida por centrifugación (17,700 g) a 4 °C durante 1 h, se resuspendió en agua deionizada estéril a 60 mg mL<sup>-1</sup>. Posteriormente, se añadió igual volumen de fenol al 90% y se incubó durante a 68 °C durante 30 min. Luego la mezcla se enfrió en agua helada y se colocó a 4 °C durante toda la noche hasta la formación de fases. La fase superior o acuosa, se centrifugó a 33,300 g durante 30 min, el sobrenadante se dializó con agua destilada para eliminar los residuos de fenol y se ultracentrifugó dos veces a 65,000 g a 4 °C durante 5 h. Finalmente, el sedimento obtenido se resuspendió en agua, y el rendimiento estimado fue de 1.56 mg mL<sup>-1</sup> de polisacárido, con la utilización del método fenol-sulfúrico. La concentración de proteínas determinada por el método de Lowry fue de 0.3 mg mL<sup>-1</sup> (Lowry *et al.*, 1970) y se almacenó a -71 °C.

### **Obtención del anticuerpo policlonal antiLPS**

Se utilizaron como inmunógenos un antígeno celular (Agc) y el antígeno lipopolisacárido (Ag-LPS), obtenidos a partir de las cepas CAFEA, RT12 y 1T13. Para la preparación del Agc, la cepa fue cultivada en placas de agar nutritivo a 28 °C por 24 h. La biomasa obtenida fue resuspendida en solución salina estéril e inactivada con formaldehído 0.5 %, y la concentración celular se ajustó a  $1.5 \times 10^9$  células mL<sup>-1</sup>. La obtención de anticuerpos específicos anti-LPS se hizo mediante la inmunización activa de conejos hembras de aproximadamente dos meses de edad, los cuales permanecieron en jaulas individuales. Se ensayó un esquema de inmunización que constó de 2 etapas según Falcon *et al.*, (2001). Durante la primera, se utilizó como inmunógeno el Agc, este fue administrado por vía endovenosa y en dosis de 0.5, 1, 1.5 y 2 mL, con intervalos de 3 d, entre dosis hasta obtener sueros con títulos mayores o iguales a 1:16 por el método de Mancini de inmunodifusión radial simple (CIE). En una segunda etapa del esquema se procedió a la inoculación del Ag-LPS dos veces por semana, en dosis ascendentes de 0.1 a 1 mL. Al finalizar la primera etapa, se obtuvo un título de anticuerpos de hasta 1:32 frente al Agc, y en la segunda fase los títulos ascendieron hasta la dilución 1:256 frente al Ag-LPS.

### **Inoculación de las semillas con las cepas de *Burkholderia***

Las semillas de trigo, maíz amarillo, maíz azul, avena y cebada se sumergieron en una solución de etanol al 70% durante 5 min y se enjuagaron tres veces con agua esterilizada. Luego se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 4% durante 20 min y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Posteriormente, se trataron con Benlate (Benomyl)  $1 \text{ gL}^{-1}$  y Tween-20 por 2 h y ciprofloxacino  $250 \text{ mgL}^{-1}$  por 2 h realizando un enjuague con agua estéril entre cada tratamiento de desinfección. Finalmente, se colocaron en benomyl ( $500 \text{ mgL}^{-1}$ ) y agua estéril, por 1 h y se enjuagaron tres veces con agua deionizada estéril. Las semillas esterilizadas se germinaron en placas con papel filtro humedecido con agua deionizada estéril, en oscuridad y a  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Cada semilla germinada se trasplantó a una caja de Petri cuadrada de  $100 \times 15 \text{ mm}$  con 10 mL con Agar nutritivo, se usaron 3 cepas, 5 especies vegetales, 5 controles por especie vegetal y se realizaron dos muestreos, en total fueron 175 unidades experimentales. Al día siguiente se inocularon por goteo ( $10^7 \text{ UFC mL}^{-1}$ ) en la zona de la raíz con bacterias crecidas por 24 h en caldo nutritivo de las cepas de CAFE, RT12 y 1T13, centrifugadas, lavadas y resuspendidas en solución salina isotónica.

Para corroborar la presencia de las bacterias inoculadas, el tejido vegetal fue puesto en una solución amortiguadora de fosfatos con glicerol al 10% y se agitó con vortex durante un minuto. La solución se dejó en reposo y con ésta se realizaron diluciones decimales para después inocular placas de Agar nutritivo, que fueron incubadas a  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 48 h. Posteriormente, de las cepas crecidas se tomó al azar una colonia por cepa y se identificó fenotípicamente mediante el sistema multipruebas API 20 NE siguiendo las instrucciones del fabricante (Dong *et al.*, 2003).

### **Inmunodetección de cepas de las cepas de *Burkholderia***

Las raíces se muestrearon cuando las plantas presentaron la segunda hoja madura (primer muestreo) y la tercera hoja madura (segundo muestreo). Se obtuvieron fragmentos (0.5 cm) de la región apical y basal de la raíz. En las plántulas muertas de maíz y trigo inoculadas con 1T13 además de raíz se tomaron muestras de tallo y hoja. El tejido se fijó en una solución de paraformaldehído al 4% en amortiguador Sørensen 0.2

M (Sørensen, 1909), pH de 7.2, aplicando vacío por 15 min para depositar las muestras en el fondo y mantenerlas a 4 °C por 12 h. Se retiró el fijador de los frascos y las muestras se lavaron 1 vez con amortiguador Sorensen 0.1 M, pH 7.2 y se incubaron por 30 min en el mismo amortiguador. En seguida las muestras se lavaron con agua destilada y se incuban por 30 min en agua destilada. Después las muestras se incubaron en series graduales con etanol-xileno. El tejido fue incluido en Paraplast según Beesley (1993). Del material procesado con parafina se realizaron cortes en un micrótopo rotatorio de 8 a 10 µm de grosor, los cuales fueron colocados en portaobjetos que contenían poly A y se desparafinaron, con series graduales de etanoles. Para detectar la fracción LPS asociadas a las cepas de *Burkholderia* se usaron cuatro anticuerpos, tres anticuerpos primarios (los anticuerpos policlonales anti-LPS obtenidos de cada una de las cepas de *Burkholderia*) diluidos 1:150 y el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con biotina sin diluir. El marcaje se realizó usando el Fast Red (CHEMICON IHC Select), el lavado y tratamiento con la solución bloqueadora de las muestras se realizaron según las instrucciones del fabricante y la incubación se realizó en una cámara húmeda. Se adicionó de 1 a 2 gotas del anticuerpo primario por laminilla correspondiente a cada cepa de *Burkholderia* y se dejó incubar a 4 °C. En seguida se adicionó de 1 a 2 gotas del anticuerpo secundario y se dejó incubar a 4 ° por 10 min, se siguió el protocolo de lavado del fabricante. Se colocaron 1 a 2 gotas de estreptavidina inmunofosfatasa diluida en TBS y se incubó por 10 min, siguiendo el protocolo de lavado del fabricante. Se adicionaron 100 µL del fast red que consiste en un cromógeno A (fast red violeta diluido en TBS) y un cromógeno B (naftol). Los portaobjetos fueron colocados en un cuarto oscuro durante 10 min, se lavaron de acuerdo al protocolo del fabricante, se colocaron en agua estéril deionizada y se secaron temperatura ambiente. Como testigo se usó el suero obtenido antes de la inmunización bacteriana en lugar del anticuerpo primario. Las bacterias marcadas se observaron bajo un microscopio de epifluorescencia Axioplan 2 plus (Zeiss, Alemania) con un filtro de excitación 546 y emisión 590 nm. Para discriminar la autofluorescencia del tejido la bacteria se usó en combinación con el filtro rojo un filtro verde (excitación 450, emisión 490 nm) y el software de Axiovision en modo multicanal. La bacteria aparece en rojo brillante y el tejido de raíz en verde. Las imágenes se capturaron con una cámara AxioCam MRc5 (Zeiss, Alemania).



## **Identificación genética y análisis filogenético de las tres cepas de *Burkholderia***

Las cepas 1T13, RT13 y CAFEA, se cultivaron en agar nutritivo a 25° C por 24 h para la extracción de ADN bacteriano. Posteriormente, se tomó una porción de la colonia con una puntilla de 10 µl y se colocó en tubos Eppendorf® con 30 µl de la solución de lisis (SDS, NaCl, Tris-HCl y Proteinasa K) según lo descrito por Silva (2009). A partir de 10-20 ng de ADN extraído, se amplificó el gen del RNAr 16S por PCR, utilizando el primer 8F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') y el primer 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) (Weisburg *et al.*, 1991; Baker *et al.*, 2003). Todas las reacciones de PCR se hicieron en un Peltier Thermal Cycler PTC-200 (BIORAD, México). Las amplificaciones se verificaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% preparado con 1x TAE amortiguador (Tris Acetate- EDTA) y corrido a 87 V cm<sup>-3</sup> durante 1 h. El gel se tiñió con bromuro de etidio (3 mg L<sup>-1</sup>), y las bandas se visualizaron en un transiluminador UV. Los productos amplificados se limpiaron con el kit de purificación QIAquick PCR (Qiagen, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Estos productos se secuenciaron en ambas direcciones con un sistema automatizado de 3730XL (Applied BioSystems, USA) para asegurar que no hubiera lecturas de nucleótidos incorrectas. Las secuencias de ambas regiones se ensamblaron y editaron usando BioEdit versión 7.0.5 (Hall, 1999), con el cual se creó una secuencia consenso. Esta secuencia, se comparó con las secuencias depositadas en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante la opción BLASTN 2.2.19 (Zhang *et al.*, 2000). Para el análisis filogenético, la secuencia consenso se compiló en un archivo fasta y se alineó con el W 1.8.1. (Thompson *et al.*, 1994), incluido en el programa Mega 4.0.2 (Tamura *et al.*, 2007) y se analizó con el método de Máxima Parsimonia utilizando la opción Close Neighbour Interchange (CNI) search (nivel=1), con Initial tree por adición al azar (10 reps), considerando los gap/missing como completas deleciones y el método de evolución mínima.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Actividad pectinasa y celulasa de las BSP

El 78% de las 27 cepas usadas creció y formó halos de degradación de pectina en el medio AMA usando ésta como única fuente de carbono. El crecimiento de las cepas capaces de degradar la pectina en este medio fue rápido (24 a 48 h) y abundante. Existieron diferencias significativas de la actividad pectinasa entre las 27 BSP en medio líquido (Cuadro 6.1); la cepa que mostro mayor eficiencia en degradar la pectina fue la cepa *B. cepacia* RT12 (2.34  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de glucosa liberada) aislada del rizoplano del trigo. La actividad celulasa fue muy baja en la mayoría de las cepas estudiadas, 30% de las cepas aisladas formó colonias y degradó la celulosa, pero su crecimiento fue lento (72 h) y escaso (colonias puntiformes), comparado con el crecimiento de las mismas cepas en el medio que contenía pectina. La cuantificación de la actividad enzimática celulolítica en medio líquido (Cuadro 7.1) también fue menor en la mayoría de las cepas a diferencia de la pectinolítica, siendo la cepa *B. cepacia* MP37 MBL, aislada de la rizósfera del maíz criollo, la que presentó mayor actividad (1.78  $\mu\text{mol min}^{-1}$  de glucosa liberada) seguida de la cepa de *B. gladioli* 1T13 (1.78  $\mu\text{mol min}^{-1}$  de glucosa liberada), aislada del rizoplano del trigo (Cuadro 7.1). No se hizo el análisis comparativo de la actividad pectinasa y celulasa de las cepas estudiadas con otros estudios publicados, debido a que se reportan en unidades de actividad enzimática distintas ( $\text{mol } \mu\text{g}^{-1}\text{min}^{-1}$ , UI). De manera general, los resultados obtenidos coinciden en que las bacterias regularmente presentan una mayor actividad pectinolítica con respecto a su actividad celulolítica, en contraste con los hongos que presenta una mayor actividad celulolítica (Villalba *et al.*, 2004).

**Cuadro 7.1. Producción de pectinasas y celulasas por las 27 cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSP).**

| Cepa   | Cultivo      | Especie                       | Celulasa                  |   | Pectinasa                 |  |
|--------|--------------|-------------------------------|---------------------------|---|---------------------------|--|
|        |              |                               | Halo <sup>z</sup><br>(cm) | µmol min <sup>-1</sup> de<br>glucosa liberada | Halo <sup>z</sup><br>(cm) | µg mL <sup>-1</sup> de<br>glucosa liberada |
| AVN    | Avena        | <i>Pantoea sp</i>             | 1                         | ND  | 0                         | 0.36 ij                                    |
| MP37BL | Maíz criollo | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 3                         | 1.78 a  | 1                         | 0.77 ef                                    |
| MP35   | Maíz criollo | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 1                         | ND  | 1                         | 0.63 fgh                                   |
| MP37   | Maíz criollo | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 3                         | 1.08 c  | 1                         | 1.79 b                                     |
| MP37b  | Maíz criollo | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 1                         | 0.18 h  | 1                         | 0.63 fgh                                   |
| MC4    | Maíz azul    | <i>Burkholderia gladioli</i>  | 2                         | 0.18 h  | 3                         | 1.35 c                                     |
| MC25CG | Maíz azul    | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 1                         | 0.36 f  | 2                         | 0.90 de                                    |
| C-20   | Cebada       | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 0                         | 0.27 g  | 0                         | 0.45 hij                                   |
| MARC36 | Maíz azul    | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 1                         | ND  | 1                         | 0.63 fgh                                   |
| MC25   | Maíz azul    | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 3                         | 0.62 e  | 3                         | 0.35 ij                                    |
| MC1    | Maíz         | <i>Pantoea sp</i>             | 0                         | ND  | 3                         | 1.90 b                                     |
| 1T13   | Trigo        | <i>Burkholderia gladioli</i>  | 3                         | 1.26 b  | 2                         | 1.46 c                                     |
| MP36   | Maíz criollo | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 1                         | 1.80 h  | 1                         | 0.81 def                                   |
| MP32   | Maíz criollo | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 0                         | ND  | 2                         | 0.63fgh                                    |
| CH1    | Cebada       | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 1                         | 0.99 i  | 2                         | 0.54 ghi                                   |
| MP38   | Maíz criollo | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 1                         | 0.36 f  | 2                         | 0.99 d                                     |
| MC2    | Maíz azul    | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 0                         | ND  | 2                         | 0.90 de                                    |
| MP3    | Maíz criollo | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 0                         | ND  | 2                         | 0.27 j                                     |
| RF1    | Avena        | <i>Pseudomonas luteola</i>    | 0                         | ND  | 0                         | ND   |
| NS1    | Cebada       | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 0                         | 0.89 i  | 0                         | ND   |
| CAFEA  | Maíz azul    | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 1                         | 0.36 f  | 3                         | 1.53 c                                     |
| RT12   | Trigo        | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 3                         | 0.72 d  | 3                         | 2.34 a                                     |
| MARC1  | Maíz azul    | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 1                         | 0.36 f  | 0                         | ND   |
| MP35FS | Maíz criollo | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 0                         | ND  | 0                         | ND   |
| GT14   | Girasol      | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 0                         | ND  | 3                         | 1.44 c                                     |
| MC21ML | Amaranto     | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 1                         | 0.18 h  | 1                         | 0.72 efg                                   |
| A-7    | Avena        | <i>Burkholderia cepacia</i>   | 1                         | 0.22 h  | 1                         | 0.29 ij                                    |

ANOVA ( $P \leq 0,05$ ) valores con igual letra minúscula en las columnas no presentaron diferencias significativas según la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) para separación de medias, con  $P < 0.05$ . <sup>z</sup> Tamaño del halo de degradación en medio sólido AMA para pectinasas y en el medio Andro para celulasas: 0 (no hubo crecimiento); 1 (0.1 a 0.3 cm); 2 (0.4 a 0.6 cm); 3 (0.7 a 1 cm). ND, No se detecto actividad enzimática.

El crecimiento lento de las bacterias en el medio con celulosa, obedece a la naturaleza cristalina de este carbohidrato, debido a que las glucosas se encuentran entrelazadas y son menos accesibles a la degradación. Los patólogos vegetales han pensado tradicionalmente que las celulasas no son particularmente importantes en la patogénesis ya que la degradación de la celulosa, si ocurre, es generalmente en etapas tardías de la infección. Sin embargo, se ha observado que cuando se inactivan los genes que codifican las endoglucanasas en las bacterias fitopatógenas *Pseudomonas solanacearum* y *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, la virulencia de las mismas

disminuye (Walton, 1994). Se ha descrito que la infección de las raíces por microorganismos mutualistas, como *Rhizobium*, *Azospirillum* y *Gluconacetobacter diazotrophicus* parece estar mediada por enzimas hidrolíticas de la pared celular (Umali-García *et al.*, 1980; Mateos *et al.*, 1992; Jiménez-Zurdo *et al.*, 1996; Adriano-Anaya *et al.*, 2006). Se sabe que la mayoría de los hongos y bacterias fitopatógenas producen enzimas hidrolíticas como pectinasas, celulasas y hemicelulasas, capaces de degradar polisacáridos de la pared celular. Sin embargo, se han llevado a cabo muy pocos estudios sobre el papel de estas enzimas en los procesos de penetración y desarrollo de los microorganismos simbióticos en raíces (Collmer *et al.*, 1991; Fry *et al.*, 1992; Maclachlan y Brady, 1992; Carpita, 1996). Las pectinasas que rompen los enlaces glucosídicos mediante eliminación, se denominan pectato y pectín liasas, según si degradan pectato sódico o pectina, respectivamente. Este grupo de enzimas degradadores de la pectina incluyen también la pectin esterasa que cataliza la deesterificación de este polisacárido. Las pectinasas juegan un papel clave en la infección patogénica permitiendo a los hongos y bacterias colonizar la raíz del hospedador y obtener nutrientes a partir de la degradación de sustratos pécticos (Bonfante y Perotto, 1995).

### **Colonización endofítica**

Tres antisueros policlonales antiLPS fueron producidos contra las cepas de *Burkholderia* RT12, 1T13 y CAFEA, en donde se comprobó lo descrito por Perez *et al.*, 2007, que al iniciar el esquema de inmunización con el empleo del Agc garantiza una potente proliferación linfocitaria, y la posterior inoculación del antígeno parcialmente purificado estimula una respuesta IgG antiLPS. El lipopolisacárido (LPS) o endotoxina es el principal componente de la envoltura celular bacteriana, representa la base química de la seroespecificidad somática de las bacterias y es uno de los principales determinantes de la virulencia de las bacterias estudiadas (Karapetyan *et al.*, 2006). Los polisacáridos nativos le permiten a la bacteria adherirse a tejidos epiteliales (Pérez *et al.*, 2007), le confiere resistencia a la fagocitosis, a la acción de anticuerpos y el sistema de complemento. En el Cuadro 7.2 se observa que las bacterias fueron detectadas principalmente en epidermis y parénquima de la corteza de la raíz, tanto en la zona apical como en la basal. En la zona apical, se localizaron sobre todo en la epidermis. Estas observaciones fueron realizadas en los cortes transversales de raíz de

plántulas que presentaban la segunda hoja madura expuesta. Sin embargo, la cepa RT12 se encontró presente en toda la zona de la raíz de cebada, al igual que IT13, la cual se detectó en toda la raíz de maíz y avena. En los cortes de plantas con la tercera hoja madura expuesta, la bacteria se encontró dentro del cilindro vascular tanto en el parénquima del xilema como en los elementos de vaso del xilema.

En el caso de la cepa IT13 la bacteria ocasionó la muerte de las plántulas de maíz y avena, debido a la pudrición del tallo y necrosis de la hoja. La cepa IT13 se identificó fenotípica y genéticamente como *B. gladioli* y las cepas RT12 y CAFEA fueron identificadas como *B. cepacia*. La *B. gladioli* es un fitopatógeno que ataca entre otros cultivos, cebolla y arroz, en maíz se ha observado que causa estriado de las hojas y pudrición del tallo (Gijon *et al.*, 2008). En avena, *B. gladioli* no se ha reportado como patógeno. Varias especies del género *Burkholderia* pueden inducir enfermedades en plantas; por ejemplo *B. cepacia* causa la pudrición de cebolla mediada por infección de las láminas y base de las hojas que forman el bulbo (Burkholder, 1950), *B. plantarii* provoca el tizón de plántulas de arroz (Azegami *et al.*, 1987; Tanaka y Katoh, 1999). *B. gladioli* produce la pudrición blanda bacteriana de la cebolla, y la pudrición de la vaina del grano del arroz, y enfermedades foliares en gladiolos (Palleroni, 1984; Ura *et al.*, 2006), e infecta otras plantas, lo que sugiere que patovares de *B. gladioli* tienen diferentes rangos de cultivos hospederos.

Los mecanismos de entrada de las bacterias promotoras de crecimiento al interior de plántulas de cultivos no se conocen exactamente. La literatura indica que la entrada de las bacterias se produce vía los espacios creados por la emergencia de las raíces laterales y por heridas y ranuras en otros puntos de la superficie radical. James *et al.*, (1994) encontraron que las células desprendidas de la caliptra fueron sitios de entrada de *Azospirillum diazotrophicus* al tejido radical de la caña de azúcar. La penetración de la bacteria *Klebsiella oxytoca* a la raíz está relacionada con la producción de pectinasas, cuyo aumento en su producción se correlacionó con una alta tasa de colonización interna de plántulas de trigo (Kovtunovich *et al.*, 1999).

**Cuadro 7.2. Partes de las raíces de maíz azul, maíz amarillo, trigo, avena y cebada colonizadas por cepas de *Burkholderia*.**

| Cepa y tratamiento              | Cultivo       | Observaciones                       |                                      |
|---------------------------------|---------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
|                                 |               | Primer muestreo<br>(2ª hoja madura) | Segundo muestreo<br>(3ª hoja madura) |
| <b>Primera sección</b>          |               |                                     |                                      |
| <b>(zona apical de la raíz)</b> |               |                                     |                                      |
| <i>Burkholderia cepacia</i>     |               |                                     |                                      |
| RT12                            | Maíz azul     | E y CP                              | E, CP, XP, CV                        |
|                                 | Maíz amarillo | E y CP                              | E, CP, XP, CV                        |
|                                 | Trigo         | E y CP                              | E, CP, CV                            |
|                                 | Avena         | E Y CP                              | E, CP, CV (X y M)                    |
|                                 | Cebada        | En toda la raíz                     | En toda la raíz                      |
| CAFEA                           | Maíz azul     | E y CP                              | Abundante CV                         |
|                                 | Maíz amarillo | E y CP                              | E, CP, XP, CV                        |
|                                 | Trigo         | E y CP                              | E, CP, CV (X y M)                    |
|                                 | Avena         | E, CP y E                           | X, F y P                             |
|                                 | Cebada        | E, CP y E                           | E, CP, CV (TX, X, M)                 |
| <i>Burkholderia gladioli</i>    |               |                                     |                                      |
| 1T13                            | Maíz azul     | En toda la raíz                     | Muerte de plántula                   |
|                                 | Maíz amarillo | En toda la raíz                     | Muerte de plántula                   |
|                                 | Trigo         | E, CP, E                            | E, CP, CV                            |
|                                 | Avena         | En toda la raíz                     | Muerte de plántula                   |
|                                 | Cebada        | E, CP, E                            | E, CP, CV                            |
| <b>Segunda sección</b>          |               |                                     |                                      |
| <b>(zona basal de la raíz)</b>  |               |                                     |                                      |
| <i>Burkholderia cepacia</i>     |               |                                     |                                      |
| RT12                            | Maíz azul     | E y CP                              | E, CP, XP, CV                        |
|                                 | Maíz amarillo | E, CP y E                           | E, CP, CV (X y M)                    |
|                                 | Trigo         | E y CP                              | E, CP, CV                            |
|                                 | Avena         | E, CP y E                           | E, CP, CV (X y M)                    |
|                                 | Cebada        | E, CP y E                           | E, CP, CV (X y M)                    |
| CAFEA                           | Maíz azul     | E y CP                              | E, CP, XP, CV                        |
|                                 | Maíz amarillo | E y CP                              | E, CP, XP, CV                        |
|                                 | Trigo         | E y CP                              | E, CP, CV                            |
|                                 | Avena         | E, CP y E                           | E, CP, XP, CV                        |
|                                 | Cebada        | E, CP, E y XP                       | E, CP, XP, CV                        |
| <i>Burkholderia gladioli</i>    |               |                                     |                                      |
| 1T13                            | Maíz azul     | En toda la raíz                     | Muerte de plántula                   |
|                                 | Maíz amarillo | En toda la raíz                     | Muerte de plántula                   |
|                                 | Trigo         | E, CP, E y XP                       | E, CP, CV (X, XP y M)                |
|                                 | Avena         | En toda la raíz                     | Muerte de plántula                   |
|                                 | Cebada        | E, CP, E y XP                       | E, CP, CV (X, XP y M)                |

**X, Xilema; P, Parénquima; CP, parénquima de la corteza; CV, Cilindro vascular; XP, parénquima del xilema; M, Medula; E, Epidermis; TX, Elemento de vaso del xilema.**

Algunos autores consideran que la semilla puede ser una importante fuente de inóculo de endófitos (Elvira-Recuenco y van Vuurde, 2000). Esto último fue corroborado en el presente estudio al tratar de obtener semillas libres de bacterias y hongos, con los métodos de esterilización tradicionales con hipoclorito y etanol, con

estos métodos se conseguía esterilizar solo la superficie de la semilla, teniéndose que usar ciprofloxacino, antibiótico sistémico de amplio espectro, y benomyl, un fungicida sistémico. Obteniendo así porcentajes de contaminación por bacterias del 0% en semillas de maíz criollo y azul, 6% en semillas de avena, 7 % en semillas de trigo, 2 % en semillas de cebada. En el caso de hongos se determinaron los porcentajes de contaminación los cuales fueron del 5% en semillas de maíz criollo y azul, 7% en semillas de avena, 5 % en semillas de trigo y 8 % en semillas de cebada. A las concentraciones de benomyl y ciprofloxacino empleadas no se observó fitotoxicidad en el embrión debido a que el promedio de la tasa de germinación para las semillas de las especies empleadas fue del 92 al 94%. Sin embargo cuando se empleo el método de hipoclorito al 5% y etanol se detectaba una contaminación hasta del 70% de bacterias y hongos. Debido a ello se tuvo que aumentar la concentración de hipoclorito al 7.5% y 10% en ambos caso se disminuyó drásticamente el porcentaje de germinación hasta un 7%. Con el empleo de ciprofloxacino y benomyl para desinfectar las semillas en ninguna de las raíces de las plantas testigo se observó el crecimiento de microorganismos. Por otro lado en ninguna de las raíces de las plantas testigo se encontraron indicios de colonización externa ni endófito.

En el presente trabajo la inmunolocalización de las especies de *Burkholderia* indicaron la presencia de la bacteria sobre la epidermis íntegra y en algunas regiones se observó la degradación de la pared celular. Estas observaciones sugieren la acción de las pectinasas y celulasas de estas bacterias para la formación de sitios de entrada. (Fig. 6.1A). En la corteza de trigo se observó la presencia de la bacteria en los espacios intercelulares evidenciando una vía apoplasto en la corteza (Fig. 7.1A). En la raíz de maíz amarillo se observó la bacteria en la endodermis (Fig. 7.1D). La endodermis, es un estrato de células con una banda de suberina “banda de Caspary”, por lo que se le conoce como barrera para la ruta apoplástica (Esau, 1977). La banda de Caspary es muy incipiente o ausente cerca del ápice de la raíz por lo que se esperaba la entrada de las bacterias al cilindro vascular, más eficiente en el muestreo de la región apical, condición que fue observada en el presente trabajo. El cilindro vascular de la raíz de gramíneas está formado por numerosos haces vasculares (con xilema y floema) dispersos (Esau, 1977). Tanto en el parénquima como dentro de los elementos traqueales del xilema del cilindro vascular se observó la presencia de *B. gladioli* IT13 en maíz amarillo, de *B. cepacia* RT12 en maíz azul y cebada (Fig.7.1 C, D, E), y *B. gladioli* IT13 en avena (Fig. 7.1 F) de las bacterias tanto en los espacios intercelulares

como dentro de las células. En el cilindro vascular (cilindro central) se detectaron en los elementos del vaso con engrosamiento reticular y parénquima apotraqueal debido que pueden atravesar las aberturas naturales de las células como punteaduras y placas de perforación del xilema (Fig. 7.1I). En el xilema de cebada se observó en los elementos de vaso con engrosamiento anular y en el parénquima adyacente (Fig. 7.1F), y en las punteaduras del xilema (Fig. 7.1E, I), por donde pueden entrar y colonizar el interior de la células. En otro caso *B. cepacia* se observó cruzando de una célula a otra (Fig. 7.1H). La Fig. 7.1J muestra la raíz de trigo sin inocular (testigo) en corte longitudinal la cual se observa sin la presencia de bacterias. El proponer que la penetración de la bacteria se debe a que degrada la pared de la epidermis debido a la acción de las celulasas se determino al observar en el microscopio, células de la epidermis con daño en su pared celular asociadas a un con un intenso marcaje y abundante presencia de bacteria. Se propone la penetración a través de la disolución de la lámina media por acción de la pectinasas producidas por las cepas de *Burkholderia* debido a que en algunas células no se observa daño en su pared celular pero si colonización intercelular (Fig. 7.1A). Campell *et al.*, 1987, en un estudio de penetración y colonización en raíces de canola con *Pseudomonas sp* observaron que la penetración se produce por la intrusión de las bacterias a lo largo de las paredes celulares epidérmicas debido a la distensión de microfibrillas de celulosa, debido posiblemente a la acción de una pectinasa bacteriana. La penetración bacteriana se produjo a través de la corteza de la raíz, resultando en la formación de grandes colonias en los espacios intercelulares. No en observaron penetración de bacterias a través de la endodermis ni en ninguna capa del tejido interior a la endodermis, por lo tanto no observaron bacterias en el cilindro vascular. Sin embargo, Compant *et al.*, (2005a) observaron mediante el uso de la proteína verde fluorescente (PVF) que *Burkholderia phytofirmans* coloniza frutos de uva, primero a través de la colonización de la superficie de la raíz, y después de entrar a los vasos del xilema se extiende a los tallos, pedicelos y racimos inmaduros. Se ha demostrado que *B. phytofirmans* PsJN secreta endoglucanasa y endopoligalacturonasa (Compant *et al.*, 2005b), lo que puede facilitar su entrada en la raíz. Tras su entrada dentro de las raíces, la cepa PsJN pasa de la rizodermis a la exodermis y luego a células de la capa de la corteza cortical intercelularmente. Después ellos detectaron que la cepa PsJN pasa la barrera de la endodermis por rompimiento. Sin embargo, este estudio fue realizado en condiciones no estériles, el paso de la cepa PsJN a través de la endodermis puede también atribuirse a brechas abiertas por otros



microorganismos, observados en cortes de fructificación no esterilizados. Por otra parte, el hecho de que la endodermis se rompió también puede ser atribuye a la aparición de raíces secundarias (Hallmann, 2001). Sin embargo, en el presente estudio se detectaron bacterias sobre la endodermis, de la región apical de la raíz. La condición meristemática del ápice de la raíz, y el incipiente desarrollo de la banda de Caspary, pudo haber facilitado la entrada de las bacterias al cilindro vascular.

En estudios hechos con *Herbaspirillum frisingens* mediante PVF y con el método de inmunogold demostraron una colonización masiva del cilindro vascular de tejidos de la raíz de cebada en el centro y en especial en los vasos del xilema. Resultados similares fueron obtenidos en el presente trabajo con las cepas de *Burkholderia* estudiadas, donde se observó colonización del los vasos del xilema en raíces de cebada (Fig. 7.1F). Tan pronto como las bacterias llegan a los vasos del xilema pueden ser transportadas a pasivamente a toda la planta. La evidencia de una colonización sistémica se observo en raíces de maíz y avena inoculadas con la cepa *B. gladioli* 1T13 debido a que la infección produjo la muerte de las plántulas. Para corroborar la causa se re aisló la bacteria de muestras de hoja, tallo de esas plántulas y exudados de la hoja, encontrándose *B. gladioli* 1T13. Los resultados indican que *B. gladioli* 1T13 es un potente colonizador endofítico a diferencia de *B. cepacia* RT12 la cual se detecto en menor abundancia en todos los casos. Sin embargo *B. cepacia* CAFEA si se encontró de forma abundante en raíces de maíz de donde fue aislada. Pero estas cepas de *B. cepacia* no produjeron muerte de plántulas. Debido que existieron signos notables de degradación de la pared celular, como lo documentado para *Azoarcus* sp. (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993, 2006), determino que se debía a una entrada por acción de enzimas hidrolíticas. Tampoco se puede descartar la entrada en la planta a través de grietas en producidas por la emergencia de raíces nuevas, lesiones en la raíz o por el meristemo apical de la raíz.

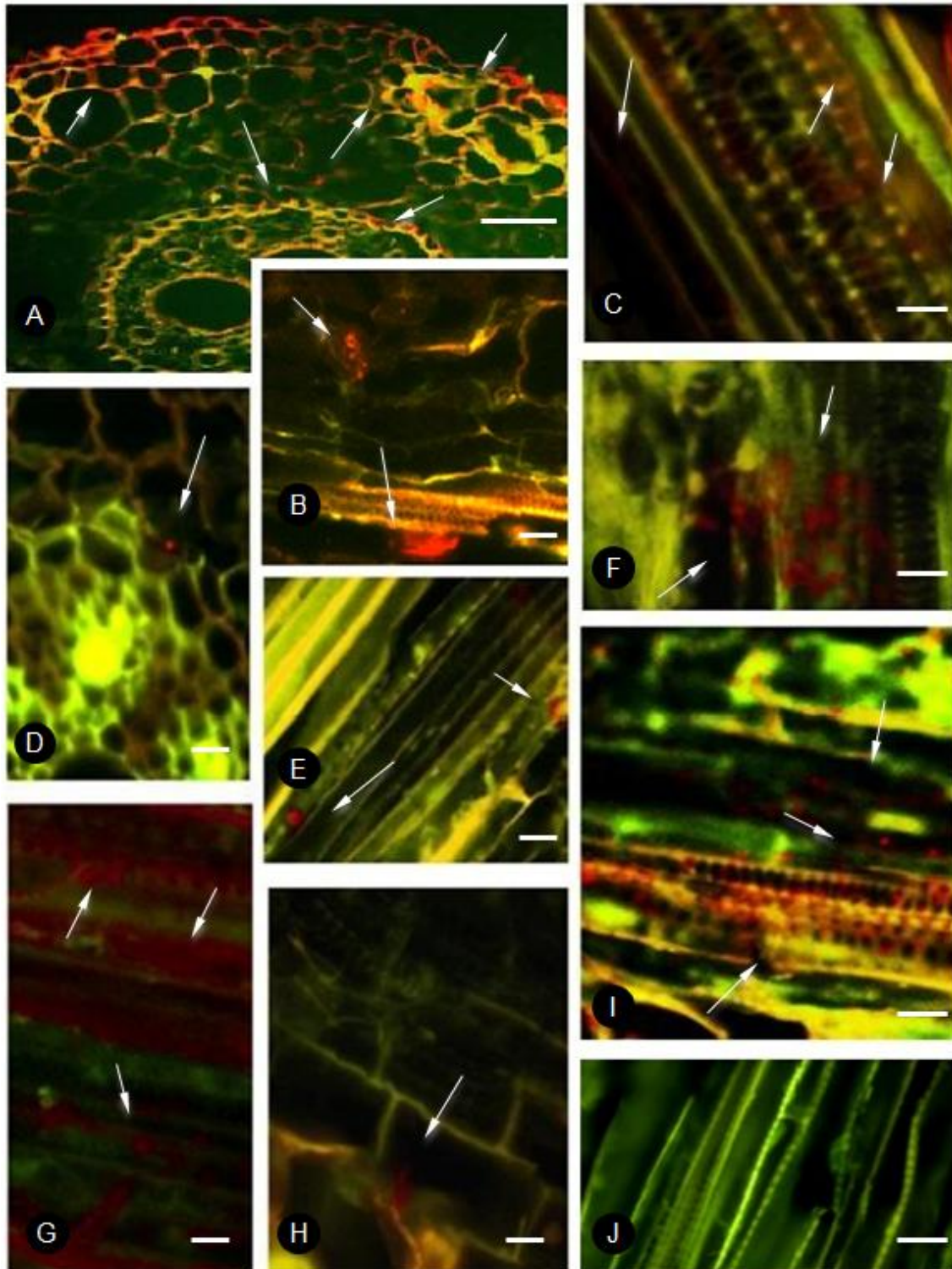


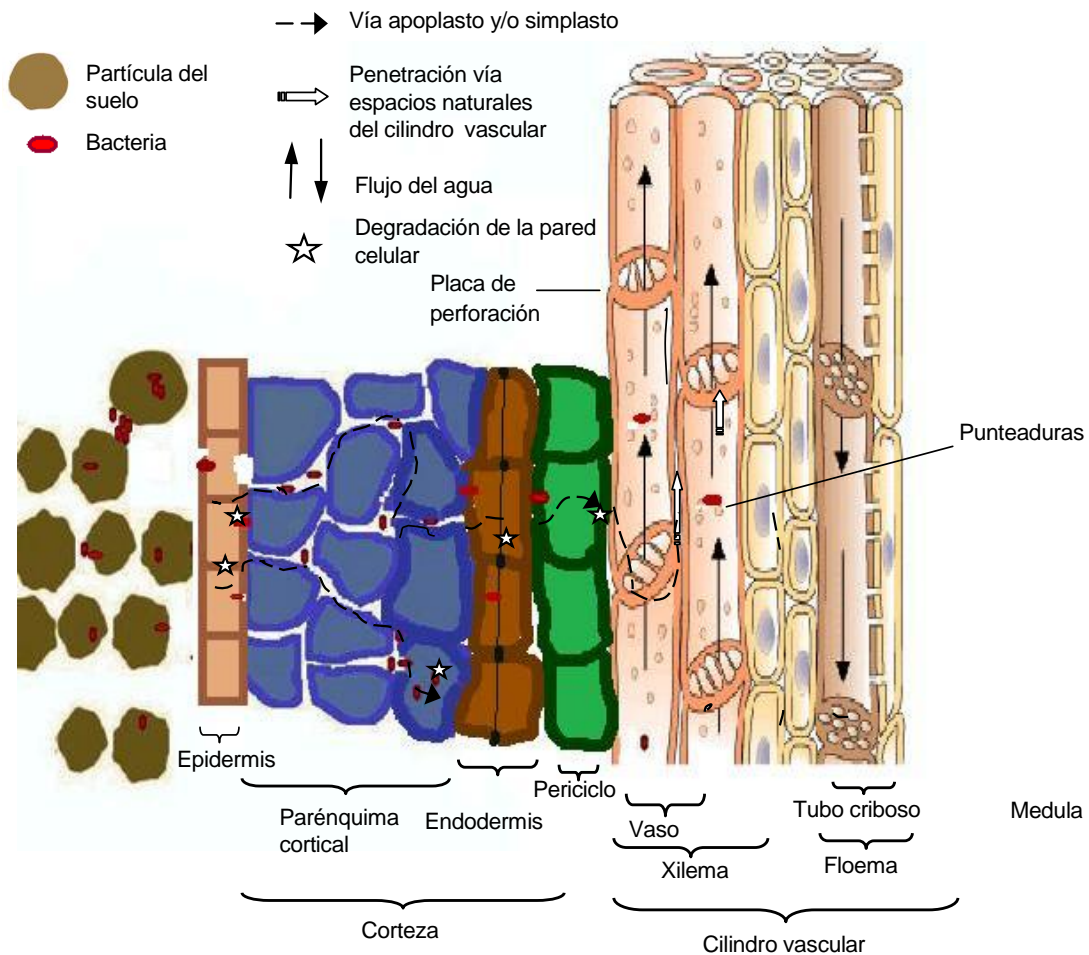
Figura 7.1. Inmunodetección de tres cepas de *Burkholderia* en las raíces cuatro gramíneas. Corte transversal de avena *Burkholderia cepacia* RT12 (A); Corte longitudinal de maíz con *B. gladioli* IT13 (B); Corte longitudinal de maíz amarillo con *B. gladioli* IT13 (C); Corte transversal de maíz amarillo con *B. gladioli* IT13 (D); Corte longitudinal de maíz azul con *B. cepacia* RT12 (E); Corte longitudinal de cebada con *B. cepacia* IT13 (F); Corte longitudinal avena con *B. gladioli* IT13 (G); Corte longitudinal de maíz azul con *B. cepacia* RT12 (H); Corte longitudinal de maíz azul con *B. cepacia* RT12 (I); Corte longitudinal de trigo sin inocular (testigo) (J). Las flechas indican presencia de la bacteria. Barra: 50µm.

El cilindro central de las raíces es histológicamente aislado de la corteza por la endodermis, que protege a la planta de la intrusión transversal de las bacterias. Pero cuando las raíces laterales se forman, esta barrera natural se rompe y permite que las bacterias entren al cilindro vascular; esta vía de entrada fue demostrado para *H. seropedicae* (Olivares *et al.*, 1995) y otras bacterias de la rizósfera como *Azospirillum sp.* (Patriquin *et al.* 1983), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (James *et al.*, 1994) y *Azoarcus sp.* (Reinhold y Hurek, 1988). Con respecto a la promoción de crecimiento de las plántulas, la cepa de *B. cepacia* RT12 (aislada de trigo) fue la única detectó que promovió un mayor crecimiento de raíces y tallos cuando fue inoculada en trigo, cebada y avena. Se necesitarían estudios más detallados con la planta hospedante y a diferentes combinaciones de inoculos para llegar a conclusiones definitivas en este sentido.

### **Modelo de invasión de cepas de *Burkholderia* en raíces primarias de gramíneas**

Al analizar las observaciones hechas al microscopio y con base en la literatura se propuso el siguiente modelo de invasión de cepas de *Burkholderia* en raíces primarias de gramíneas (Figura 7.2). Las bacterias se encuentran adheridas a las partículas del suelo debido la producción de exopolisacáridos, originando la formación de agregados entre bacterias y partículas del suelo, Los exopolisacáridos así como otros componentes y productos de la bacteria como la fracción LPS presente en la pared celular, ayudan a La adhesión a la epidermis de la raíz. Una vez adheridas a la epidermis de la raíz, el primer paso es la acción de enzimas hidrolíticas, principalmente pectinasas, los subproductos de la degradación le sirven como fuente de energía que disuelve la lamina media de células epidérmicas, facilitando la entrada de las bacterias a los espacios intercelulares de la corteza. En células donde se observa degradación de la pared celular, se puede deber a la acción de celulasas. En el segundo paso las bacterias avanzan por los espacio intercelulares del parénquima de la corteza (vía apoplasto) pero también pueden hacerlo vía simplasto (intracelular) a través de los plasmodesmos (cordones citoplasmicos de comunicación intercelular) entre células. Los espacios intercelulares poseen en solución nutrientes tales como minerales y glucosa que le sirven como alimento a las bacterias. Una vez que han avanzado de la periferia hacia el centro, cruzan la endodermis, por acción de enzimas hidrolíticas, en las regiones meristemáticas de la raíz, donde la banda de Caspary está poco desarrollada e

incipientemente suberizada. Una vez cruzando la endodermis viajan a través del periciclo inter o intracelularmente para llegar a los elementos de vaso del xilema, a los cuales entran por las punteaduras y suben a la parte aérea cruzando las placas de perforación hasta llegar a los tallos y hojas; la colonización de la médula también es posible.



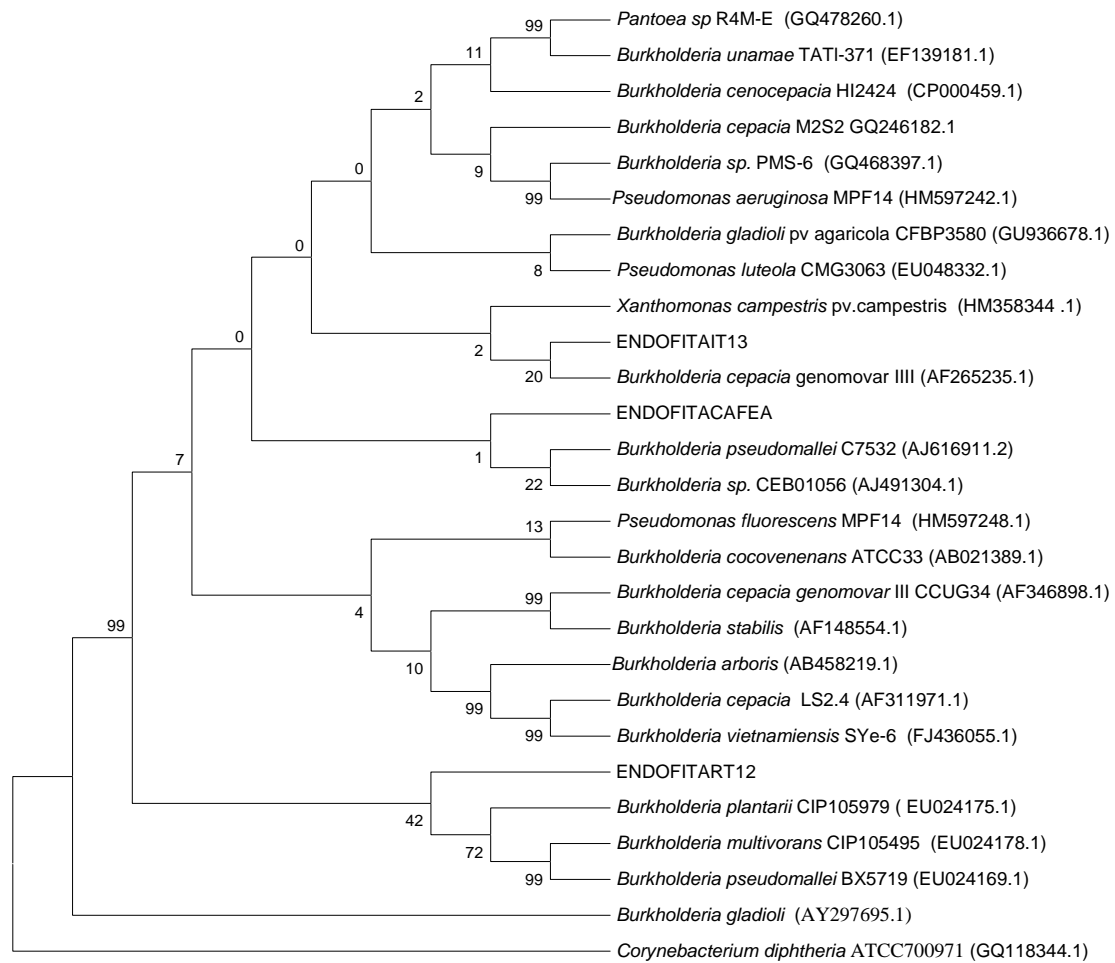
**Figura 7.2. Modelo hipotético de penetración y las rutas de colonización en raíces de gramíneas por especies de *Burkholderia*.**

La mayoría de las bacterias fitopatogénicas invaden los tejidos de la planta por los mecanismos antes citados. Sin embargo, unas pocas son introducidas directamente dentro de los tubos cribosos ricos en azúcares del floema o en los haces que transportan agua y nutrientes del xilema por insectos que se alimentan de dichos tejidos vasculares, como ocurre también con cepas de *B. cepacia* y *Serratia marcescens* (Bruton *et al.*, 2007). La bacteria patógena oportunista en humanos *S. marcescens*, es colonizadora de floema y es el agente causal de la enfermedad denominada amarillamiento vascular de las cucurbitáceas cuyo vector es el insecto conocido como squash bugs (*Anasa tristis*)

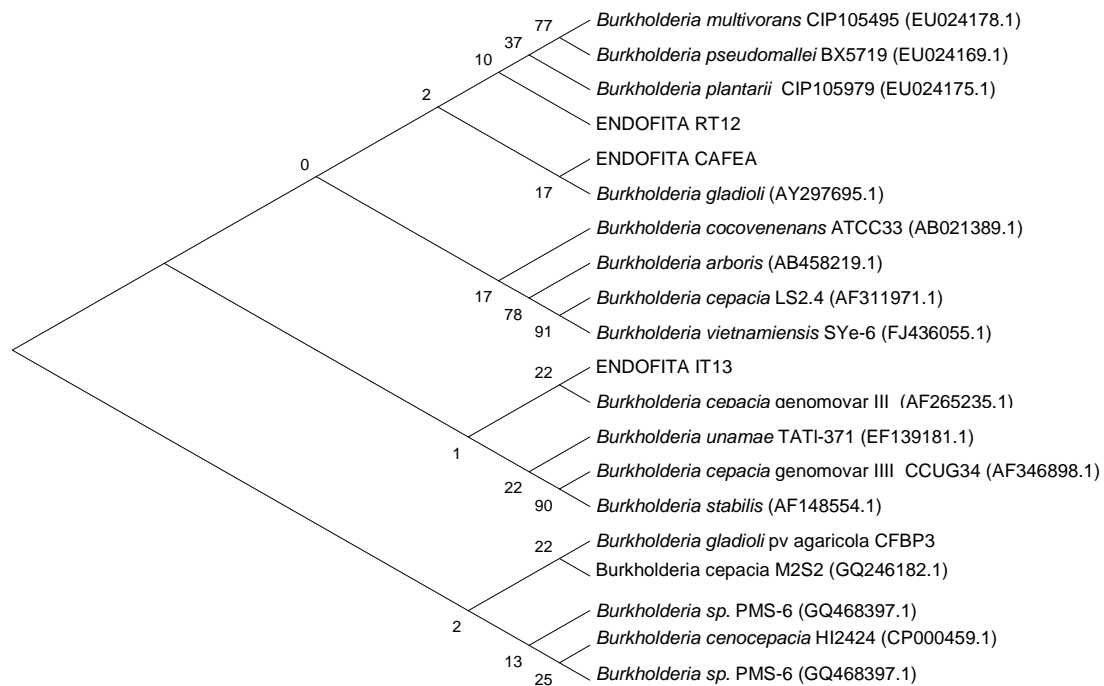
(Bruton *et al.*, 2007). Otras bacterias no necesitan insectos para llegar a floema como es el caso de *Bacillus subtilis* que coloniza los espacios intercelulares de floema de *Brassica spp.* (Wulff *et al.*, 2003) En el presente trabajo no se observaron cepas de *Burkholderia* en el floema de la raíz de avena, maíz, cebada y trigo.

### **Identificación taxonómica de los endófitos seleccionados**

Las tres cepas estudiadas fueron identificadas bioquímica, fisiológica y genéticamente como pertenecientes al género *Burkholderia*. Las cepas CAFEA y RT12 fueron identificadas a nivel de especie como *B. cepacia* y la cepa 1T13 como *B. gladioli* la cual producía un pigmento amarillo que se difundía en el medio. Las tres son bacterias solubilizadoras de fosfato tricálcico y roca fosfórica, productoras de ácido 2-cetogluconico y fosfatasas; la cepa *B. cepacia* RT12 además produce ácido indolacético (Paredes *et al.*, in press). El complejo *B. cepacia* (CCO) se compone de varias especies de bacterias Gram negativas estrechamente relacionados y versátiles que se encuentran naturalmente en el suelo, el agua y la rizósfera de las plantas. La versatilidad ecológica de estas bacterias se debe probablemente a sus genomas inusualmente grandes, que a menudo se componen de varios (normalmente dos o tres) replicones grandes, así como a su capacidad de utilizar una gran variedad de compuestos como fuente de carbono. La especie original de *B. cepacia* se ha dividido en 10 especies genéticas (genomovares). En la figura 7.3 y 7.4 se observa como la cepa *B. gladioli* 1T13 se agrupa en ambos arboles con la *B. cepacia* genomovar III aislada del esputo de pacientes con fibrosis quística, esto puede ser debido a que se originan evolutivamente de un organismo en común. En la Figura 7.3 también se agrupa con *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* un fitopatogenos de plantas. La cepa *B. cepacia* CAFEA, se agrupa en la Figura 7.3 con un patógeno a humanos *B. pseudomallei* al igual que *B. cepacia* RT12 (Figura 7.4) un patógeno que causa la meloidosis en animales que se puede transmitir a humanos (Nelson, 2004).



**Figura 7.3.** Arbol filogenético contruido por el método de Maxima Parsimonia que con base en secuencias del gen 16S DNAr, expresa las relaciones de las tres bacterias endofitas estudiadas (*Burkholderia cepacia* RT12, *B. cepacia* CAFEA y *B. gladioli* 1T13) con microorganismos similares. El número de acceso al GenBank se muestra entre parentesis para cada organismo que se usó como referencia. La secuencia del gen 16S DNAr de *Corynebacterium diphtheria* fue usada como una referencia fuera de grupo.



**Figura 7.4.** Árbol filogenético usando el método de evolución mínima basado en la secuenciación del gen 16-S rDNA de especies representativas de *Burkholderia* y las tres bacterias endófitas (*Burkholderia cepacia* RT12, *B. cepacia* CAFEA y *B. gladioli* IT13) con microorganismos similares. El número de acceso al GenBank se muestra entre parentesis para cada organismo que se uso de referencia.

## CONCLUSIONES

Los datos obtenidos en el presente estudio contribuyen al entendimiento de los mecanismos de colonización de las bacterias en la raíz. Se ha argumentado que las bacterias pueden penetrar solo indirectamente a la epidermis de la raíz y colonizar la planta vía apoplasto en monocotiledóneas. Según esta hipótesis las enzimas hidrolíticas que poseen no tendrían ninguna participación. Contrariamente, en el presente estudio se logró relacionar la actividad de las enzimas pectinasa y celulasa, y su detección *in situ*, con la penetración y colonización de las cepas de *Burkholderia* en las raíces de gramíneas. Se entiende que las rutas de penetración y colonización pueden ser vía simplasto y/o apoplasto, logrando atravesar la endodermis, preferentemente en la región más joven (ápice) de la raíz, y penetrar a los vasos del xilema por aberturas naturales como las punteaduras. La importancia de la localización de estas bacterias en el interior de la planta radica que las especies pertenecientes al género *Burkholderia* poseen características tales como la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, producir fitohormonas, solubilizar y degradar compuestos tóxicos, lo que sugiere la posibilidad



de su uso en la producción de biofertilizantes y en la biorremediación. No obstante, este potencial biotecnológico, su uso podría estar obstaculizado por la potencial amenaza que estas cepas presentan a la salud humana. Así, es necesario determinar si las cepas de *Burkholderia* estudiadas son capaces de infectar células animales. Igualmente, será necesario identificar los factores de virulencia de estas bacterias en relación a las células animales con el objeto de desterrar el actual conflicto que se presenta entre su uso agrícola y su potencial riesgo para la salud humana.

### LITERATURA CITADA

- Adriano-Anaya, M.L., M. Salvador-Figueroa, J. A. Ocampo y I. García-Romera. 2005. Plant cell- degrading hydrolytic enzymes of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Symbiosis* 40: 151-156.
- Andro, T., J. Chambost, A. Kotoujansky, J. Cattaneo, Y. Bertheau, F. Barras, F. Gijsegem, Van and A. Coleno. 1984. Mutants of *Erwinia chrysanthemi* defective in secretion of pectinase and cellulase. *Journal of Bacteriology* 160: 1199-1203.
- Aranda, E, I. Sampedro, R. Díaz and M. García. 2007. Arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *NewPhytol.* 130: 3-21.
- Azegami, K., K. Nishiyama, Y. Watanabe, I. Kadota, A. Ohuchi and C. Fukazawa. 1987. *Pseudomonas plantarii* sp. nov., the causal agent of rice seedling blight. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:144–152.
- Beesley, J.E. 1993. Immunocytochemistry. A practical Approach. IRL Press. Oxford University press, Oxford, England 248 pp.
- Bruton, B. D., F. L. Mitchell, J. Pair, A. Wayadand, U. Melcher and J. Brady. 2003. *Serratia marcescens*, a phloem-colonizing, squash bug-transmitted bacterium: Causal agent of cucurbit yellow vine disease. *Plant Disease*, 87(8):937.
- Campbell, J. N., D. D. Cass and D. J. Peteya. 1987. Colonization and penetration of intact canola seedling roots by an opportunistic fluorescent *Pseudomonas* sp. and the response of host tissue. *Phytopathology* 77: 1166-1173.
- Carpita, N.C. 1996. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 445-476.
- Chen, Y. S., H. H. Lin, J. J. Mu, C. S. Chiang, C. H. Chen, L. M. Buu, Y. E. Lin and Y. L. Chen. 2010. Distribution of melioidosis cases and viable *Burkholderia pseudomallei* in soil: Evidence for emerging melioidosis in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* 48 (4):1432–4
- Collmer, A., D.W. Bauer, S.W. He, M. Lindeberg, S. Kelemu, P. Rodríguez-Palenzuela, T.J. Burr and A.K. Chatterjee. 1991. Pectic enzyme production and bacterial plant pathogenicity. En: H. Hennecke y D.P.S. Verma (eds.). *Advances in Molecular Genetics of Plant- Microbe Interactions*. 1. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda. pp. 65-72.
- Compant, S. J. Nowak, T. Coenye, C. Clément and E. Ait Barka. 2008. Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. *FEMS Microbiol Rev.* 32(4):607-626.
- Compant, S., B. Duffy, J. Nowak, C. Clément and E. Ait Barka. 2005a. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:4951–4959.



- Compant, S., B. Reiter, A. Sessitsch, J. Nowak, C. Clément and E. Ait Barka . 2005b. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. Strain PsJN. *Appl Environ Microbiol* 71:1685–1693.
- Dong, Y.-H., Xu, J.-L., Li, X.-Z. and L. H. Zhang. 2000. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc Natl Acad Sci* 97:3526–3531.
- Elbeltagy, A., K. Nishioka, H. Suzuki, T. Sato, Y. Sato and H. Morisaki. 2000. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. *Soil Sci. Plant Nutr.* 46:617-629.
- Elvira-Recuenco, M. and J. W. L van Vuurde. 2000. Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. *Can. J. Microbiol.* 46:1036–1041.
- enzymes in plant pathogenesis. *Annu Rev. plant cells. New Phytol.* 161: 641-675.
- Esau, K. 1977. *Anatomy of Seed Plants*. Wiley. New York.
- Falcon, M., G. P. Toraño, B. Victoria y I. Tamargo. 2001. Novedoso esquema de inmunización para la obtención de anticuerpos anti-LPS de *Haemophilus influenzae* tipo B. *Rev Cubana Med Trop, Ciudad de la Habana*, 53(1):66-68.
- Fry, S.C. 2004. Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. *New Phytologist*, 161: 641–675.
- A., O. D. Téliz, S. E. Cárdenas, C. De León, A. A. Mora, S. D. Mejía, and A. de la Torre. 2008. Leaf stripe and stem rot caused by *Burkholderia gladioli*, a new disease of maize in México. *Plant Disease* 92:1249.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hallmann, J. 2001. Plant interactions with endophytic bacteria. *Biotic Interactions in Plant–Pathogen Associations* (Jeger MJ & Spence NJ, eds), pp 87–119. CABI Publishing, Wallingford.
- Hell, K., J. Udoh, M. Setamou, K. F. Cardwell and A. Visconti. 1995. Fungal infection and mycotoxins in maize in the different agroecological zones of Benin and Nigeria, West Africa. In: Cardwell KF. ed. *Workshop on mycotoxins in food in Africa*. November 6–10, 1995. Cotonou, Republic of Benin. International Institute of Tropical Agriculture. p 31.
- Heungens, K. K. and J. L. Parke. 2000. Zoospore homing and infection events: effects of the biocontrol bacterium *Burkholderia cepacia* AMMDR1 on two oomycete pathogens of pea. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5192-5200.
- Hurek, T., B. Reinhold-Hurek, M. Van and E. Kellenberger. 1994. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. Strain BH72 in grasses. *Journal of Bacteriology* 176:1913-1923.
- James, E. K., V. M. Reis, F. L. Olivares, J. I. Baldani and J. Döbereiner. 1994. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal of Experimental Botany* 45:757-66.
- James, E.K., V. M. Reis, F. L. Olivares, J. I. Baldani and J. Döbereiner. 1994. Infection of sugar cane by the nitrogenfixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal of Experimental Botany* 45:757–766.
- Jimenez-Salgado, T., L. E. Fuentes-Ramirez, A. Tapia-Hernandez, M. A. Mascarua-Esparza, E. Martinez-Romero and J. Caballero-Mellado. 1997. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3676–3683.
- Kato, T., T. Tanaka and Y. Fujita. 1992. Studies on bacterial seedling blight of rice. 1. Classification of bacteria, obtained from diseased seedling of rice in Yamagata prefecture. *Bull Yamagata Agric Exp Stn* 26:103–109.

- Khammas, K. M. and P. Kaiser. 1991. Characterization of a pectinolytic activity in *Azospirillum irakense*. *Plant Soil* 137:75–79.
- Kloepper, J. W., and C. J. Beauchamp. 1992. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Can. J. Microbiol.* 38:1219–1232.
- Kovtunovych, G., O. Lar, S. Kamalov, V. Kordyum, V., D. Kleiner, and N. Kozyrovska. 1999. Correlation between pectate lyase activity and ability of diazotrophic *Klebsiella oxytoca* VN 13 to penetrate into plant tissues. *Plant Soil*. 215:1-6.
- Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, and 148 other authors. 1997. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390:249–256.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. Lewis, and R. J. 1951. Randall. Protein measurement with the folin phenol reagent *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Maclachlan, G. and C. Brady. 1992. Multiple forms of 1,4- $\beta$ -glucanase in ripening tomato fruits include a xyloglucanase activable by xyloglucan oligosaccharides. *Aust. J. Plant Physiol.* 19: 137- 146.
- Mateos, P. F., J. I. Jimenez-Zurdo, J. Chen, A. S. Squartini, S. K. Haack, E. Martinez-Molina, D. H. Hubbell and F. B. Dazzo. 1992. Cell associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1816-1822.
- McCully, M. E. 2001. Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. *Aust. J. Plant Physiol* 28: 983–990.
- Olivares, F. L., V. L. D. Baldani, V. M. Reis, J. I. Baldani and J. Döbereiner. 1996. Occurrence of endophytic diazotroph *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of gramineae. *Biol Fertil Soils* 21:197–200.
- Palleroni, N. 1. 1984. Genus I *Pseudomonas* Migula 1894, 237ALI. in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, pp. 141-199. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkin.
- Patriquin, D. G, J. Döbereiner and D. K. Jain. 1983. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. *Can. J. Microbiol.* 29:900–915.
- Pérez, J. L., Y. Aranguren, Y. Alvarez, M. Acevedo, R. Pérez and O. García. 2007. Cuantificación de lipopolisacárido en un proteoliposoma obtenido a partir de la superficie externa de *Vibrio cholerae* *VacciMonitor* 16 (1):13-17.
- Plazinski, J. and B. J. Rolfe. 1985. Analysis of pectolytic activity of *Rhizobium* and *Azospirillum* strains isolated from *Trifolium repens*. *J. Plant Physiol.* 120:181-187.
- Quadt-Hallmann, A., N. Benhamou and J. Kloepper. 1997. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. *Canadian Journal of Microbiology* 43:577-582.
- Reinhold, B. and T. Hurek. 1988. Location of diazotrophs in the root interior with special attention to the Kallar grass association. *Plant Soil* 110:259–268.
- Reinhold-Hurek, B., T. Hurek, M. Claeysens and M. van Montagu. 1993. Cloning, expression in *Escherichia coli*, and characterization of cellulolytic enzymes of *Azoarcus* sp., a root-invading diazotroph. *Journal of bacteriology* 175(21):7056-65.
- Reinhold-Hurek, B., T. Maes, S. Gemmer, M. Van Montagu and T. Hurek. 2006. An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not-cellulose-metabolizing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Molecular plant-microbe interactions* 19(2):181-8.
- Reinhold-Hurek, B., T. Maes, S. Gemmer, M. Van Montagu and T. Hurek. 1993. *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing proteobacteria associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth) and description of two species *Azoarcus*

- indigenus* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 43:574–584.
- Sørensen, S. 1909. Über die messung und die bedeutung der wasserstoffionenkonzentration bei enzymatischen prozessen (mit einer ergänzung). Biochem Z 21:131–304.
- Sturz, A. V., B. R. Christie and J. Nowak. 2000. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production, Crit. Rev. Plant. Sci. 19:1-30.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24: 1596-9.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nuc. Ac. Res. 22:4673-4680.
- Umali-Garcia, M., D.H. Hubbell, M.H. Gaskins and F.B. Dazzo. 1980. Association of *Azospirillum* with grass roots. Appl. Environ. Microbiol. 39: 219-226.
- Ura, H., N. Furuya, K. Iiyama, M. Hidaka, K. Tsuchiya and N. Matsuyama. 2006. *Burkholderia gladioli* associated with symptoms of bacterial grain rot and leaf-sheath browning of rice plants. J Gen Plant Pathol 72: 98–103.
- Villalba, L. S., J. F. Mikán, J. Sánchez. 2004. Actividades hidrolíticas y caracterización isoenzimática de poblaciones microbianas aisladas del patrimonio documental del Archivo General de Colombia. Nova 2:50-58.
- Walton, J.D. 1994. Deconstructing the cell wall xylog lucan hydrolyzing glucanases. Plant Physiol. 104:1113-1118.
- Westphal, O. and K. Jann. 1965. Bacterial Lipopolysaccharides: Extraction with Phenol-water and Further Applications of the Procedure. In: Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol.5, R.L. Whistler, J.N. BeMiller, and M.L. Wolfrom, Eds., New York: Academic Press, Inc., pp. 83-91.
- Wulff, E.G., J. W. L. van Vuurde and J. Hockenhull. 2003. The ability of the biological control agent *Bacillus subtilis*, strain BB, to colonise vegetable brassicas endophytically following seed inoculation. Plant Soil 255:463-474.
- Zhang Z, *et al.* 2000. Greedy algorithm for aligning DNA sequences. J. Comp. Biol. 7:203-214.

## CAPITULO VIII

### CONCLUSIONES

De las cepas nativas aisladas de la raíz y rizoplasma de diferentes cultivos, el mayor número de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSP) se presentó en maíz y avena. El género *Burkholderia* fue el que mayor número de cepas se aislaron. En el presente estudio, las BSP solo se encontraron en gramíneas y no en otro tipo de plantas.

Se aislaron BSP capaces de solubilizar *in vitro*  $\text{CaHPO}_4$  y roca fosfóricas (RF). La solubilización más alta de fosfato tricálcico se obtuvo con la cepa NS1 ( $380 \text{ mgL}^{-1}$ ) aislada del rizoplasma de cebada en el medio denominado Medio Mínimo para Solubilización de Fosfato Colegio de Postgraduados con  $\text{MgCl}$  (MMSFCP-Mg). La mayor solubilización de roca fosfórica ( $545.5 \text{ mgL}^{-1}$ ) y producción de ácidos orgánicos ( $6810.6 \text{ mgL}^{-1}$ ) se detectó en la cepa *Burkholderia cepacia* CAFEA 20N aislada del rizoplasma de maíz usando el medio MMSFCP-Mg con RF. Se concluye que los estudios de solubilización de fosfato deben de ser escrupulosos, requiriéndose el empleo de medios de cultivo adecuados para detectar de manera rápida el mayor número de cepas capaces de solubilizar en medio líquido.

Se reafirma que los principales ácidos orgánicos involucrados en los procesos de solubilización de las cepas empleadas fueron el ácido glucónico y el 2-cetoglucónico, siendo el primero un precursor del segundo, así como el iniciador de la solubilización en las primeras horas.

Debido a que la solubilización del fosfato tricálcico y roca fosfórica se correlacionó positivamente con la producción de ácidos orgánicos, se hipotetiza e que la producción de ácidos orgánicos es uno de los mecanismos principales en la solubilización de fosfato. Sin embargo, las cepas usadas no mostraron una clara relación entre el P soluble y la disminución del pH del medio de cultivo, sugiriendo la existencia de otros mecanismos para solubilizar P.

Se observó que con el uso de un consorcio bacteriano (C27) se obtiene una mayor solubilización de RF y síntesis de ácidos orgánicos, debido a las relaciones sinérgicas que se dan entre las bacterias.

Las fosfatasa alcalinas extracelulares e intracelulares mostraron mayor actividad y las especies de *Burkholderia* fueron las más eficientes en su producción.

En el presente estudio se logró relacionar la actividad de las enzimas pectinasa y celulasa de las tres especies de *Burkholderia*, con la penetración y colonización vía simplasto y/o apoplasto de las raíces de maíz, avena, trigo y cebada. Se hipotetiza que las especies de *Burkholderia* son capaces de llegar a los vasos del xilema y de ahí colonizar de forma pasiva toda la planta.

La capacidad de producción de ácidos orgánicos y fosfatasa, por parte de las bacterias aisladas de la raíz y rizoplasma de gramíneas, sugiere el gran potencial de las mismas para contribuir a la solubilización de fosfato inorgánico y mineralización de fosfato orgánico en suelos agrícolas. Sin embargo, el mayor número de BSP aisladas pertenece al género *Burkholderia*, que alberga especies patógenas oportunistas en humanos y multirresistentes a antibióticos, por lo que su uso como biofertilizante podría verse obstaculizado.

## ANEXO A



**Figura A1. Sitio de muestreo, Zirahuén, Michoacán, México.**



**Figura A2. Sitio de muestreo, Tlaxcala, México.**





**Figura A3. Raíces de trigo colectadas de Ciudad Sahagún, Hidalgo, México (A); Raíz de maíz criollo colectada de Patzcuaro, Michoacán, México (B).**



Figura A4. Colonias bacterianas obtenidas a partir de la dilución de raíces de cebada colectada en Ciudad Sahagún Hidalgo, México.

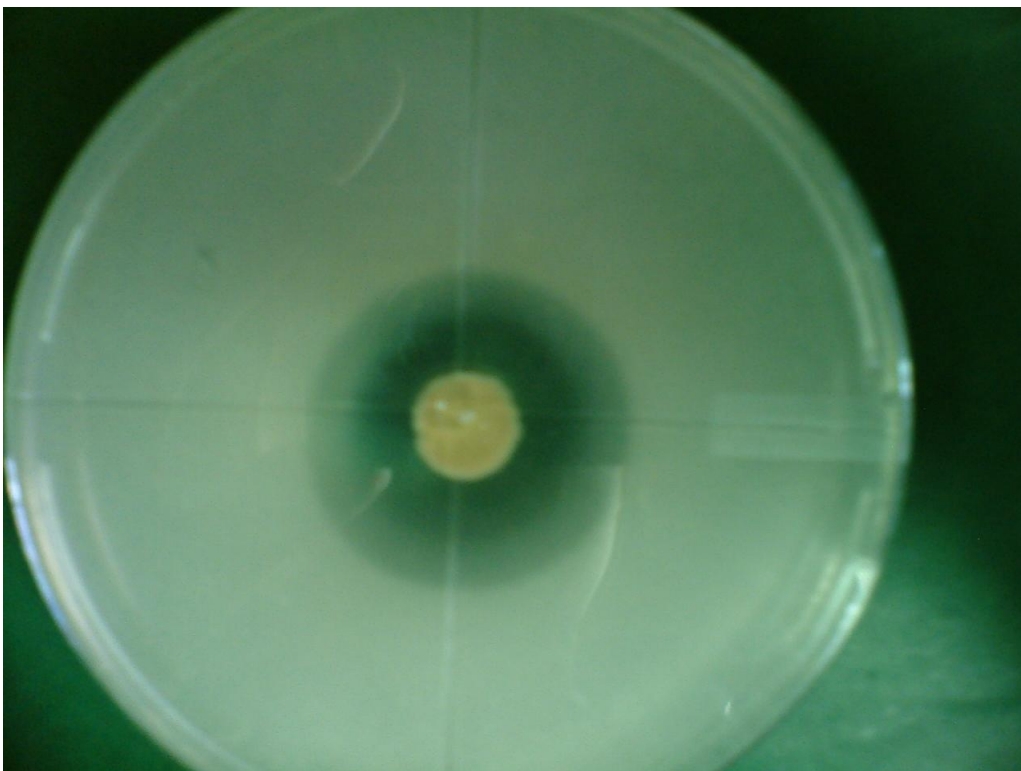


Figura A5. Halo de solubilización de fosfato producido por la cepa *Burkholderia cepacia* RT12 en medio Picovskaya a los 14 días de incubación.



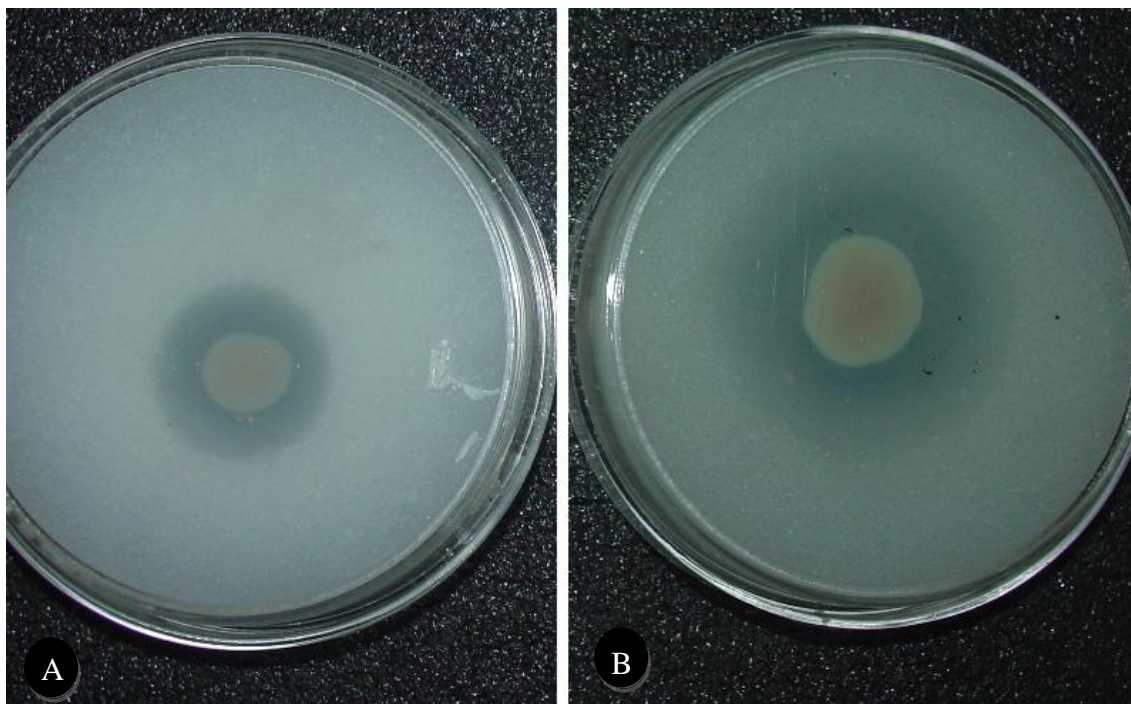


Figura A6. Halo de solubilización de fosfato formado por la cepa *Burkholderia cepacia* CAFEA en medio Picovskaya a los 14 días de incubación (A); Halo de solubilización de fosfato formado por la cepa *Burkholderia cepacia* CAFEA en medio MMSFCP-Mg (Medio Mínimo para Solubilización de Fosfato Colegio de Postgraduados adicionado con MgCl) a los 14 días de incubación (B).

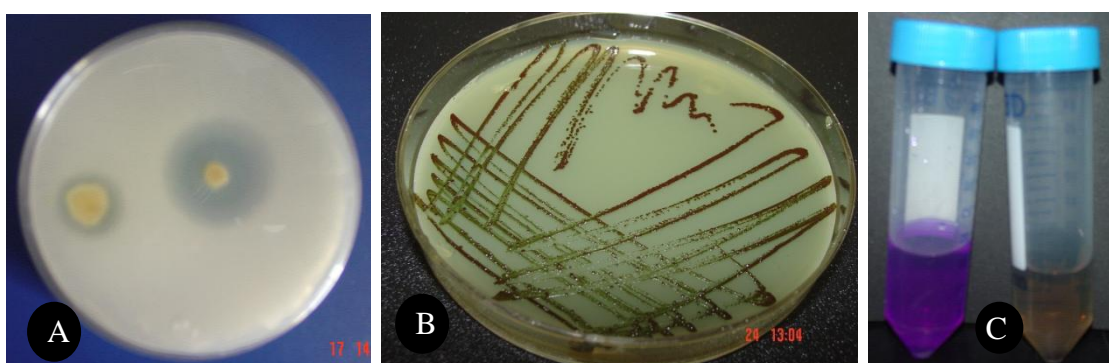


Figura A7. Cepa CH1 (aislada del rizoplano de cebada cultivada en Ciudad Sahagún, Hidalgo) cultivada en medio MMSFCP-Mg (Medio Mínimo para Solubilización de Fosfato Colegio de Postgraduados adicionado con MgCl), la zona clara alrededor de las colonias corresponde al área de solubilización de fosfato (A). Cepa MC25 (aislada de la raíz de maíz azul cultivado en Cacaxtla, Tlaxcala), en medio MMSRCP-Mg (Medio Mínimo para Solubilización de Roca fosfórica Colegio de Postgraduados adicionado con MgCl) conteniendo azul de bromofenol que cambia de color azul al amarillo debido a la producción de ácidos orgánicos por las BSP y por ende la solubilización de la roca fosfórica (B Y C).

## ANEXO B

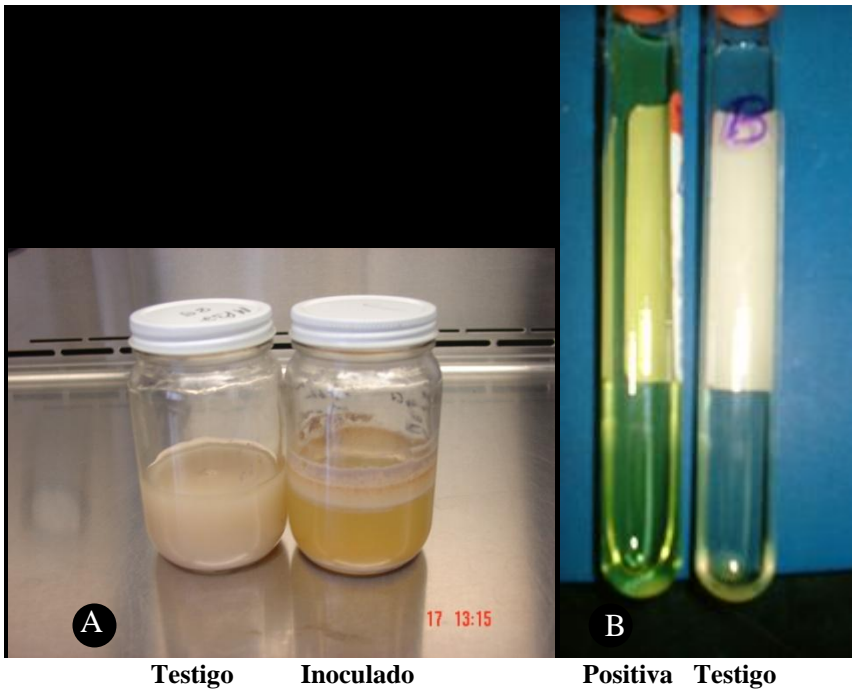
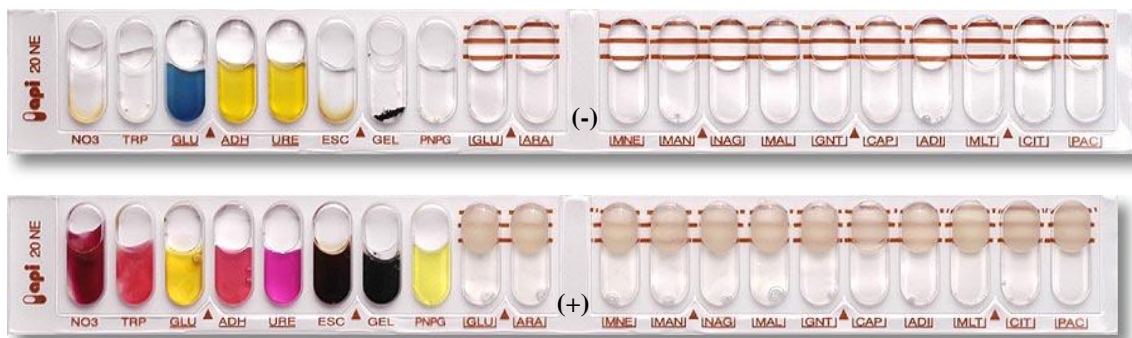


Figura B1. Medio líquido MMSFCP-Mg (Medio Mínimo para Solubilización de Fosfato Colegio de Postgraduados adicionado con MgCl) (A); Prueba de la fosfatasa alcalina (B).



Figura B2. Inoculación de las galerías API 20 NE con la cepa *Burkholderia gladioli* 1T13.



**Figura B3.** Galería API 20 NE en donde se observan reacciones positivas y negativas de la actividad enzimáticas de la bacteria probada

## ANEXO C

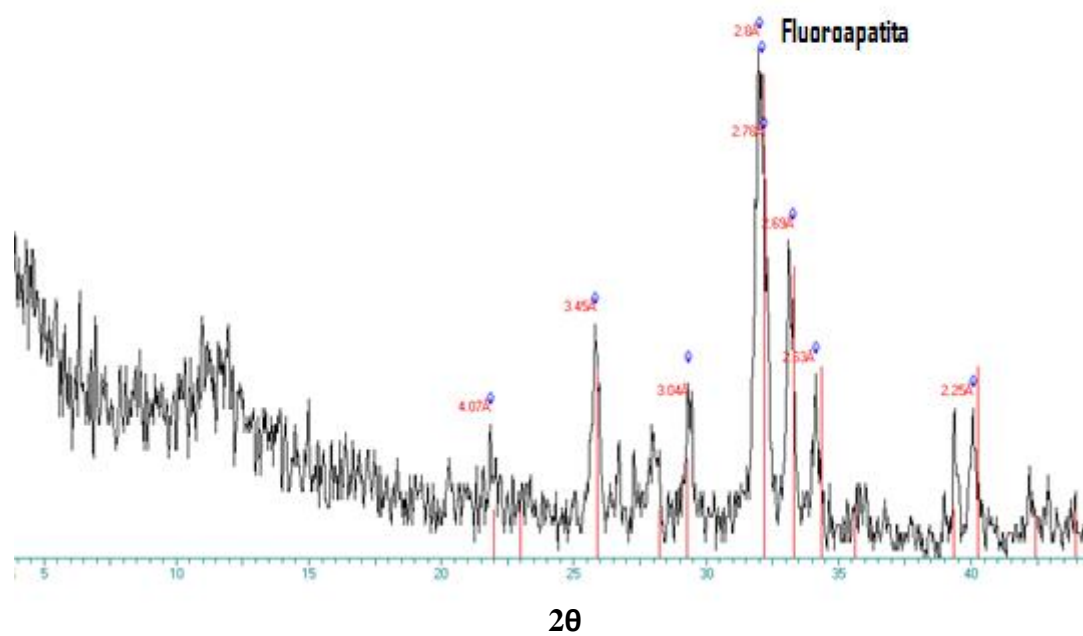
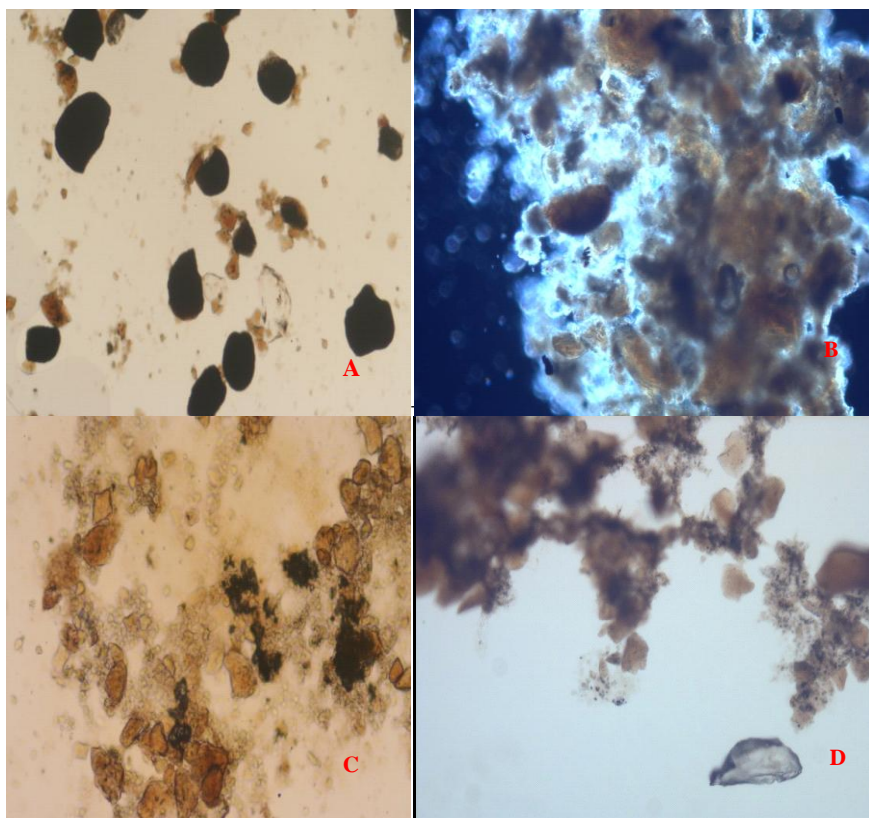


Figura C1. Difractograma de fluoroapatita obtenida por Rx.

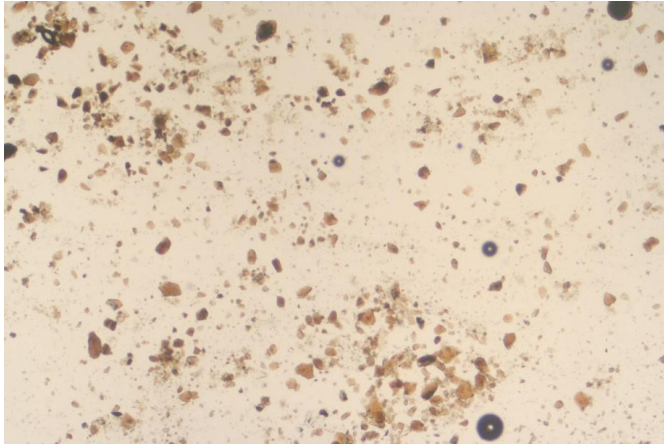


## ANEXO D

Algunas de las cepas usadas formaron microagregados en el fondo de los frascos. Los precipitados formados por algunas cepas en el medio RF se secaron al aire y se impregnaron con resina poliéster insaturada para ser observados bajo microscopio petrográfico (Olimpus, USA) y en fresco bajo microscopio compuesto (Nikon, Japón) con contraste de fases a 10X. La formación de los agregados se puede deber a que, las bacterias que producen exopolisacáridos que funcionan como agente cementante que unen a los gránulos de RF (Figura D1, comparar con el testigo Figura D2). La función de los microorganismos del suelo en la formación y estabilidad de la estructura del suelo ahora se reconoce, por ejemplo en las raíces, en particular en los pelos radicales. Las hifas de los hongos exudan polisacáridos y otros compuestos orgánicos formando una malla pegajosa que une a las partículas individuales del suelo y microagregados para formar macroagregados (Andrade *et al.*, 1998). Las bacterias también producen polisacáridos y otros materiales que forman microagregados.



**Figura D1.** Fotomicrografía de los microagregados formados durante la solubilización de la roca fosfórica por la cepa *Burkholderia cepacia* MC25 y *Burkholderia cepacia* RT12 respectivamente (A Y C); Microagregados de MC25 y RT12 observados en Microscopia de contraste de fases a 10X (B Y D).



**Figura D2. Fotomicrografía de la roca fosfórica (RF) sin inocular (testigo).**

## ANEXO E

**Cuadro E1. Composición del Medio AMA (pH 7.2) para determinar la actividad pectinasa Plazinski y Rolfe (1985).**

| Sustancia   | Concentración g L <sup>-1</sup> |
|---|---------------------------------|
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>     | 2.0                             |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 3.0                             |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                    | 4.5                             |
| Extracto de levadura                                | 1.5                             |
| Pectina de manzana                                  | 5.0                             |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O,               | 0.3                             |
| CaCl <sub>2</sub>                                   | 0.002                           |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 0.0001                          |
| ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>  | 0.00017                         |
| CuSO <sub>4</sub> .8H <sub>2</sub> O                | 0.0005                          |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 0.0001                          |
| Agar  | 15.0                            |

**Cuadro E2. Soluciones para preparar el medio del método de Andro para determinar la actividad celulasa Andro *et al.*, (1984).**

| Solución stock                                       |              |
|--|--------------|
| <b>Solución A</b>                                    |              |
| NaCl   | 0.25 g       |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ,                    | 1.50 g       |
| Carboxi metil celulosa                               | 2.50 g       |
| H <sub>2</sub> O destilada                           | 400.00 mL    |
| <b>Solución B</b>                                    |              |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub>                   | 0.1 M        |
| <b>Solución C</b>                                    |              |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O | 3.00 g       |
| NH <sub>4</sub> Cl                                   | 4.00 g       |
| Glicerol   | 2.50 g       |
| Extracto de levadura                                 | 0.50 g       |
| Agar   | 6.50 g       |
| H <sub>2</sub> O destilada                           | 100.00 mL    |
| <b>Solución D</b>                                    |              |
| CaCl <sub>2</sub>                                    | 7.50 % (w/v) |

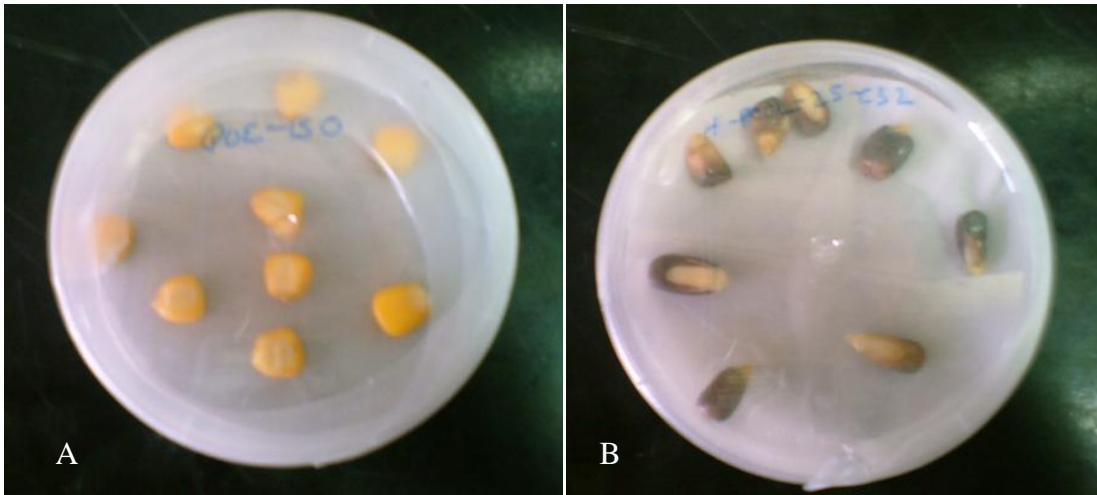


Figura E1. Semillas de maíz amarillo (A) y maíz azul (B) colocadas en cajas Petri para su germinación.

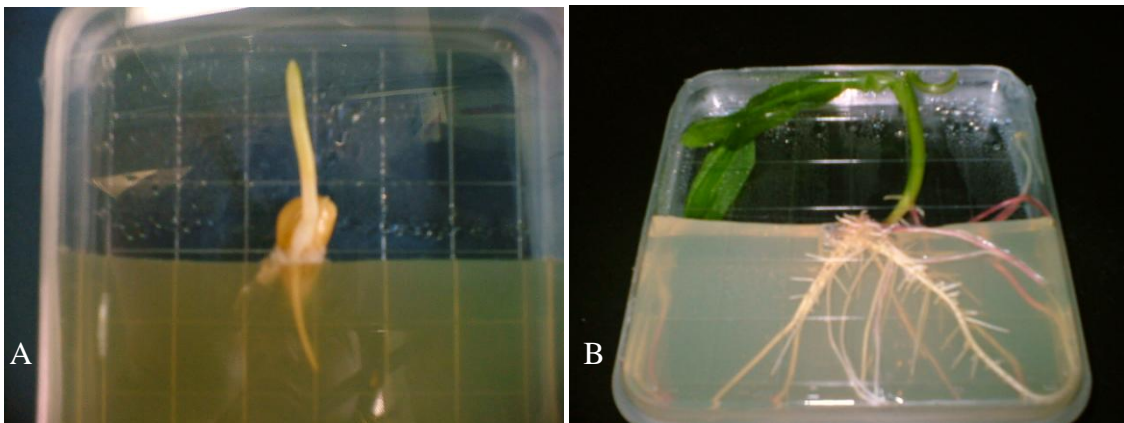


Figura E2. Semilla de maíz amarillo inoculada con la cepa *Burkholderia cepacia* RT12 (A); Plantula de maíz amarillo sin inocular (B).

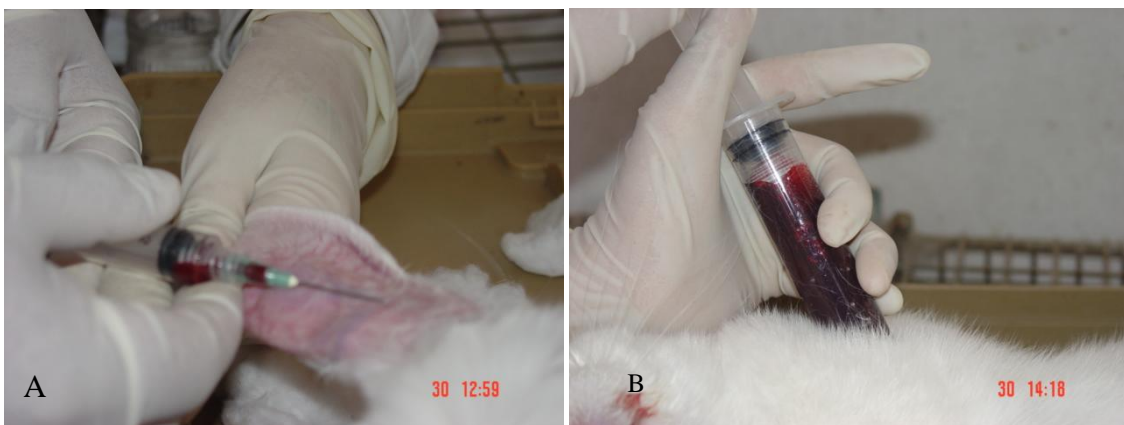


Figura E3. Punción en la vena de la oreja del conejo para la obtención de sangre (A); Punción cardiaca del conejo para la obtención de sangre (B).



## ANEXO F

### *Burkholderia cepacia* CAFEA (Número de bases: 800)

AGGCAGGTCGAACGGCAGCACGGGTGCTTGCACCTGGTGGCGAGTGGCGAA  
CGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGGATAGCCCGGCGA  
AAGCCGGATTAATACCGCATAACGATCTACGGATGAAAGCGGGGGACCTTCG  
GCCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA  
GGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACA  
CTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATT  
TTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGG  
CCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGAAAGAAATCCTTGGCTCTAATAC  
AGTCGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCA  
ACAGCCGCGGTAATACGTAAGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGT  
AAAGCGTGCGCATGCGGTTTGCTAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAA  
CCTGGGAAGTGCATTGGTACTGGCATGCTACAGTATGGCAGATGGGGGTA  
GAATTCCACGTCTACAAGTAAATGCATAGATATGTGGGATGAATACCCAT  
GGCAAATGCACCCGTTTGGGCCCTACCGATCCTCATGCAGCATCGCGAGT  
GGGAGCAAACGGGAGTAGATACCCATGGTAGTCCCCTGCCCAACTCTATG  
TCATCTAGTTGCTAGACGAGTCAATTTCTATTCA

### *Burkholderia gladioli* 1T13 (Número de bases: 829)

TGCAAGTCGAACGGCAGCACGGGTGCTTGCACCTGGTGGCGAGTGGCGAAC  
GGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGGATAGCCCGGCGAA  
AGCCGGATTAATACCGCATAACGATCTACGGATGAAAGCGGGGGACCTTCG  
GCCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA  
GGCCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACA  
CTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATT  
TTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGG  
CCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGAAAGAAATCCTGAGGGCTAATAT  
CCTTCGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCA  
ACAGCCGCGGTAATACGTAGGGTTCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGT  
AAAGCGTGCGCATGCGGTTTGTTAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAA

CCTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCAAGCTACAGTATGGCAGAGGGGGGTA  
AAATTCCACGTGTACCACTGAAATGCATAGATATGTGGAGGAATACCGATG  
GCGAATGCAGCCCCCTGCTCCATACTGACTCTCATGCACGAATCGCGTAG  
TGGAGCCACACAGGGATGTACGATCCCCATGCGTAGTCCACTCCCCTAAAT  
CGATCGTCAACTTAGTTGCTGGCGCGATGCATATTCCATTCCCTCACCTGC  
CCTAACTCTA

***Burkholderia cepacia* RT12 (Número de bases: 842)**

TGCACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCC  
TG TAGTGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATAACGATCTA  
CGGATGAAAGCGGGGGACCTTCGGGCCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGG  
CTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGC  
TGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC  
CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCC  
AGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCC  
GGAAAGAAATCCTTGGCTCTAATACAGTCGGGGGATGACGGTACCGGAAGA  
ATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCG  
AGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGCTAAG  
ACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCA  
TGCTACAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTACCACTGAAATGC  
GTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAATGCACCCCCCTGCGCCACTAT  
GACGCTCATGCACGATCGCTTGTGGAGCAACGGGATTAGATACCCTGATAG  
TCCACTCCCCTAAATCTATGTCAACTAGTTGGTAGAGGATTTGAGTATCTTA  
CTCACTCGTGAGCATAACTCTATGAAGTCGAGCCACTAATGCAGTATCTCTC  
GCTAGGATTCAGAACGTATTA

## ANEXO G

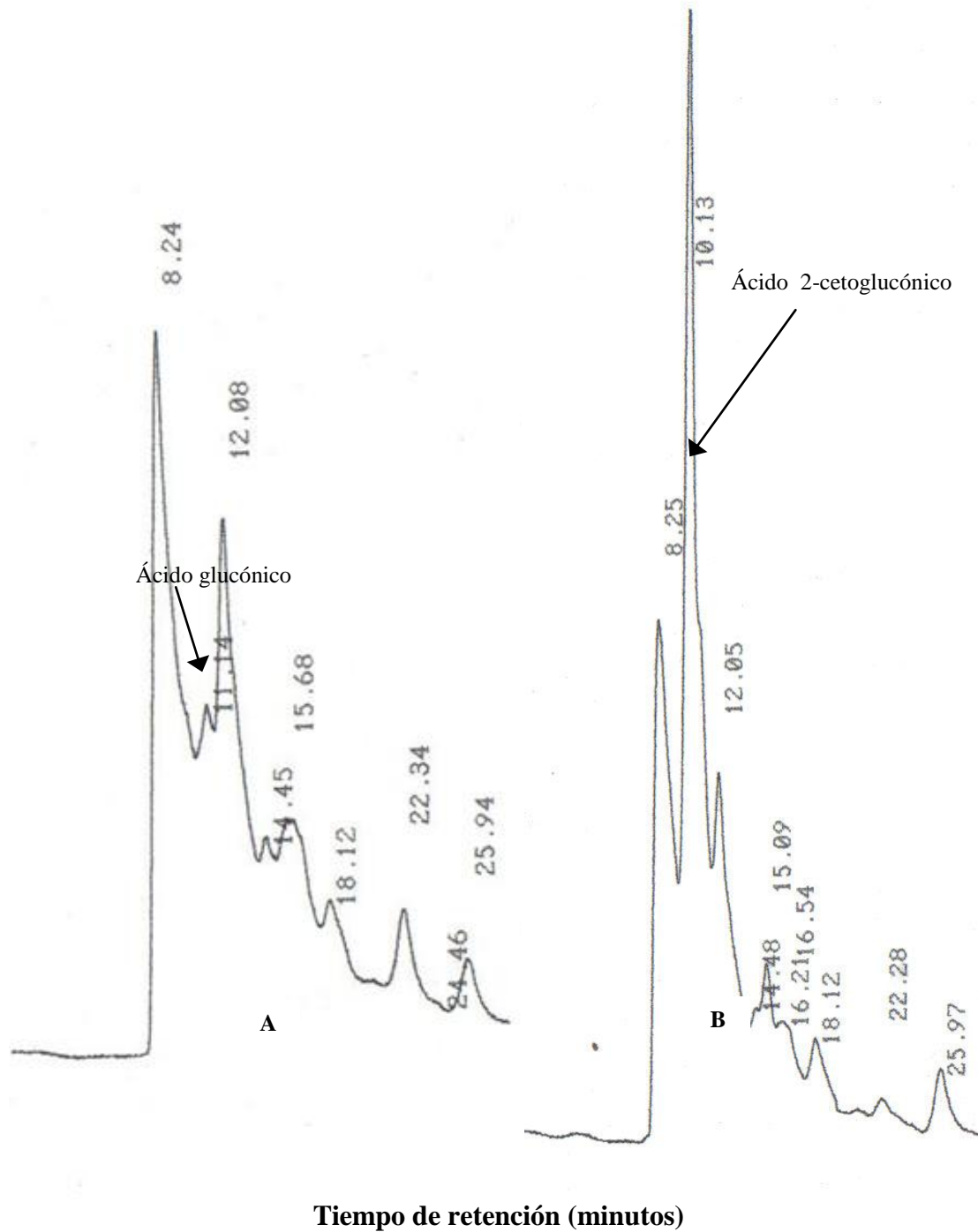


Figura G1. Cromatograma de los filtrados del cultivo de *Burkholderia cepacia* RT12 en el medio MMSRCP-Mg (Medio Mínimo para Solubilización de Roca fosfórica Colegio de Postgraduados adicionado con MgCl). Detección de ácido 2-cetoglucónico y glucónico a las 24 (A) y 48 (B) h de inoculación, respectivamente.

## LITERATURA CITADA

Andrade, G., Mihara, K.L., Linderman, R.G., and Bethienfalvay, G.J., 1998. Soil aggregation status and rhizobacteria in the mycorrhizosphere. *Plant Soil*. 202: 89-96.

Andro, T., Chambost, J.P., Kotoujansky, A., Cattaneo, J., Bertheau, Y., Barras, F., Van Gijsegem, F., and Coeno, A. 1984. Mutants of *Erwinia chrysanthemi* defective in secretion of pectinase and cellulase. *J. Bacterology* 160:1199-1203.

Plazinski, J. and B. J. Rolfe. 1985. Analysis of pectolytic activity of *Rhizobium* and *Azospirillum* strains isolated from *Trifolium repens*. *J. Plant Physiol.* 120:181-187.