



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ACC DEAMINASA
EN CEPAS DE *Azospirillum*.

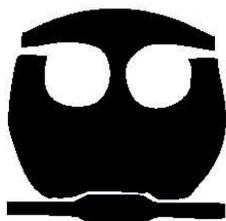
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

ANA MARGARITA CAMARILLO CARPINTERO



MÉXICO D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO :

PRESIDENTE	Prof. ROSA MARIA RAMÍREZ GAMA
VOCAL	Prof. MA. ELSA ESCUDERO GARCÍA
SECRETARIO	Prof. VICTOR MANUEL LUNA PABELLO
1ER SUPLENTE	Prof. MARICARMEN QUIRASCO BARUCH
2DO SUPLENTE	Prof. MA. GUADALUPE TSUZUKI REYES

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA :

**LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA EXPERIMENTAL,
EDIFICIO A, FACULTAD DE QUÍMICA UNAM**

ASESOR :

M. en C. ROSA MARIA RAMÍREZ GAMA

SUPERVISOR TÉCNICO :

M. en C. MARÍA GUADALUPE TSUZUKI REYES

SUSTENTANTE :

ANA MARGARITA CAMARILLO CARPINTERO

AGRADECIMIENTOS.

Al Colegio de Profesores y la Sección 024 del AAPAUNAM, por haber sido designado ganador de la Cátedra Alberto Urbina del Raso en el año 2006. Quienes gracias a su apoyo fue posible la realización e impresión de ésta tesis.

A la M. en C. Rosa María Ramírez Gama, jefa del Laboratorio de Microbiología Experimental, de la Facultad de Química (UNAM), por la oportunidad, el apoyo y las facilidades otorgadas en la realización de ésta tesis.

A la M. en C. Ma. Guadalupe Tsuzuki Reyes, técnico del Laboratorio de Microbiología Experimental, de la Facultad de Química (UNAM), por su atención, confianza y enseñanza, así como por su colaboración y montaje de las técnicas desarrolladas.

A el M en C Luis Manuel Perea Mejía, Profesor Asociado C del Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina por el apoyo, asesoría y montaje de la técnica de PCR para la identificación molecular de las cepas.

A la Dra. Gina Holguín Zehfuss del Laboratorio de Microbiología Ambiental del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C (CIBNOR) en Baja California Sur, quién indirectamente me benefició en el montaje de la técnica de la determinación de la enzima ACC deaminasa, gracias a la estancia de investigación realizada por las compañeras M. en C. Rosalba Esquivel Cote y M. en C. María del Carmen Urzúa Hernández.

A el Dr. Víctor Manuel Luna Pabello y la Prof. Ma. Elsa Escudero García por la revisión y corrección de ésta tesis.

A los profesores que a lo largo de mis estudios en la Facultad, fueron parte de mi preparación académica. Siendo un ejemplo para mi vida profesional.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Microbiología Experimental por su compañía y apoyo en la realización de éste trabajo.

Y a la máxima casa de estudios la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por mi formación académica desde la preparatoria, por el orgullo de pertenecer a ella, así como por haber desarrollado en mi un carácter servicio y compromiso para el ejercicio de mi carrera.

DEDICATORIA :

A mis padres Enrique Camarillo y Margarita Carpintero quienes con cariño, ejemplo y una vida llena de sacrificios, me han apoyado en la realización de mis sueños. Creyendo en mí, aún en tiempos difíciles; dándome otra oportunidad. Y por darme la seguridad que necesito para seguir adelante .

A mis hermanos, Verónica y Enrique por su apoyo, compañía y animo cuando más lo necesite y por llenar de alegría mis días. Ofreciéndoles mi apoyo para cuando me necesiten. Los quiero mucho.

A mi primo Jesús González Camarillo, por ser un ejemplo de vida, quien con su muerte me ha enseñado que “todo va estar bien” aún en la tormenta. Te veo en el cielo.

A mis tías Dolores y Bertha Camarillo, quienes me han brindando cariño y confianza, dándome un ejemplo de valentía para enfrentar las cosas que se presentan en la vida.

A mis pastores Antonio y Alma De León por su oración y consejo, estando conmigo en las buenas y en las malas, así como a la Iglesia de la cual soy parte, especialmente a Claudia, Vicente, Enrique, Tete, Nancy y Diana. Muchas Gracias.

A mis amigos Mahatma Ramos por ser mi confidente y apoyo, del cual he aprendido una cantidad abrumadora de cosas, a Myrna Martínez por ser mi amiga quien me apoya y anima siendo un ejemplo de fe para vida, a Marisol Ramírez por darme su compañía y amistad en todo momento, y al grupo Aliento a los Huesos por su amistad, compañerismos y enseñanza, especialmente a Liliana, Esmeralda, Marco Polo, Isaac, Rebeca, Pablo. Gracias.

Y a la persona más importante en mi vida el Señor Jesucristo quien me sustenta y me alienta, quien renueva y da dirección a mis pasos todos los días.

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	3
I. Objetivos	6
II. Hipótesis de trabajo	6
III. Antecedentes	7
1. Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR)	7
1.1 Etileno e importancia de la ACC-deaminasa.	11
1.2 ACC-deaminasa	14
1.3 Mecanismo de acción	18
1.4 Microorganismos ACC deaminasa positivos	19
1.5 Efectos de la inoculación	21
2. <i>Azospirillum ssp.</i>	24
2.1 Características generales	24
2.2 Aspectos históricos	24
2.3 Taxonomía	24
2.4 Distribución	25
2.5 Enriquecimiento y aislamiento	25
2.6 Caracterización bioquímica	26
2.7 Caracterización genotípica	32
2.8 Características y mecanismos de acción específicos	33
2.9 Importancia agronómica	36
2.10 Conclusiones de la importancia de <i>Azospirillum</i>	37
IV. Material y Métodos	38
1. Cepas de <i>Azospirillum</i>	38
1.1 Activación y verificación de pureza	39
2. Determinación de la actividad de la enzima ACC-deaminasa	40
2.1 Curva estándar de α -cetobutirato	41
2.2 Curva estándar de proteína	41
2.3 Determinación de la actividad de la ACC deaminasa	41
2.4 Diagrama de Trabajo.	44
3. Identificación de cepas	47
3.1 Bioquímica mediante los Sistemas API®20 NE y API®50CH	47
3.2 Genotípica (PCR del gen 16S rDNA)	49
V. Resultados y Discusión	51
1. Verificación de pureza.	51
1.1 Características Microscópicas y coloniales en placas de Gelosa nutritiva o en el medio de Caldo Nutritivo Oxoid (Gnox)	51
1.2 Comparación de la fijación de nitrógeno	51
2. Determinación de la ACC deaminasa en diferentes cepas de <i>Azospirillum</i>	54
3. Identificación de cepas	57
3.1 Bioquímica mediante los Sistemas API®20 NE y API®50CH	57
3.2 Genotípica (PCR del gen 16S rDNA)	67
VI. Conclusiones	72
VII. Recomendaciones	73
VIII. Bibliografía	74
IX. Anexos	82

RESUMEN

La inoculación de semillas o del suelo con rizobacterias promotoras del desarrollo vegetal da lugar a una mejor nutrición de las plantas y consecuentemente a un aumento en la producción de granos y de frutos. Por lo que esta biotecnología es considerada como una alternativa para disminuir el uso de agroquímicos y consecuentemente la contaminación ambiental.

Los procesos mediante los cuales las rizobacterias promueven el desarrollo de los vegetales corresponden a: la fijación de nitrógeno, la formación de sideróforos mediante los cuales proporcionan nitrógeno y hierro a las plantas; la producción de fitohormonas (auxinas, citoquininas y giberelinas), la solubilización de fosfatos, la síntesis de enzimas que modulan el crecimiento de los vegetales y en el caso particular de la ACC deaminasa que reduce el nivel de etileno endógeno en las plantas.

Una bacteria en particular puede promover el desarrollo de las plantas a través de uno o más de estos mecanismos, tal es el caso de *Azospirillum* que fija nitrógeno, produce fitohormonas particularmente ácido indol acético y señales moleculares que inician una serie de reacciones en las plantas, pero que carece de la capacidad de sintetizar ACC deaminasa.

En contraste con lo reportado en la literatura, en el laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química de la UNAM, se demostró que al menos dos cepas de la colección de *Azospirillum* expresan la actividad de esta enzima. Con base en lo anterior en este trabajo se estableció como objetivo evaluar la actividad de la ACC deaminasa en 22 cepas, 15 aisladas en trabajos previos y 7 de referencia; así como, identificar la especie de las cepas aisladas mediante el sistema API y técnicas de biología molecular.

Los resultados indican que siete de las 15 cepas aisladas expresan actividad de la ACC deaminasa, en tanto que las otras ocho, así como las siete de referencia carecen de ésta . Las primeras siete cepas fueron identificadas como *Azospirillum lipoferum*, y de las ocho restantes, cuatro fueron identificadas como *Azospirillum brasilense*, una como *Azospirillum lipoferum* y tres de ellas no pudieron ser identificadas.

INTRODUCCIÓN.

En el suelo existe una gran cantidad y diversidad de microorganismos, los cuales son particularmente abundantes en las zonas inmediatas a las raíces de las plantas. Dentro de éstos grupos microbianos, se han identificado numerosas bacterias benéficas de vida libre, las cuales se conocen como rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas o PGPR (por sus siglas en inglés).

La promoción del crecimiento en la planta puede ocurrir indirectamente por la reducción o prevención de la acción de fitopatógenos, o directamente mediante diferentes vías como; la fijación de nitrógeno, la formación de sideróforos mediante los cuales proporcionan hierro, la producción de fitohormonas (por ejemplo, auxinas, citoquininas o giberelinas), la solubilización de fosfatos y la síntesis de enzimas que modulan el crecimiento; así como la reducción de los niveles de etileno en la planta

En este trabajo se hace una revisión general de los mecanismos directos mediante los cuales diferentes bacterias promueven el desarrollo de los vegetales. Dando mayor énfasis a las bacterias del género *Azospirillum*, así como al efecto de la enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico-deaminasa.

El etileno es esencial para el desarrollo de los vegetales, no obstante cuando éste se encuentra en altas concentraciones tiene un efecto nocivo.

En los vegetales, el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) es el precursor inmediato del etileno y se produce en mayor proporción cuando las plantas se encuentran en condiciones de estrés o como respuesta a la acumulación de ácido indol acético.

Se ha demostrado que algunas rizobacterias son capaces de utilizar el ACC como única fuente de nitrógeno, éste al ser desaminado da lugar a la formación de α -cetobutirato y amonio provocando una disminución en el nivel de etileno endógeno. Una de las consecuencias reportadas de esta vía es el mejoramiento de la elongación de las raíces de las plantas.

Como ejemplo de bacterias que sintetizan la ACC-deaminasa se tiene a *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus circulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus globisporus* y *Kluyvera*

ascorbata. En tanto que se ha reportado que la bacteria del género *Azospirillum* no produce esta enzima. No obstante en el laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química, UNAM, se determinó que dos cepas de la colección del género *Azospirillum*, son capaces de sintetizar la enzima ACC deaminasa, por lo que resulta de interés establecer si esta característica esta presente en las otras cepas de dicha colección.

Azospirillum brasilense corresponde a una de las PGPR más estudiadas y al ser empleada como biofertilizante de gramíneas ha dado lugar al aumento de la producción de granos y a la disminución del uso de fertilizantes químicos.

Sin embargo, es importante señalar que no todas las cepas de un género y especie particular son idénticas en su metabolismo o en su capacidad para interactuar con las plantas. De éste modo, el impacto de la inoculación con estas bacterias, así como de otras dependerá del tipo de cepa empleada. Adicionalmente el efecto de la misma, puede ser influenciado por las características del suelo y las condiciones climáticas.

Lo anterior indica que las cepas que se emplearán para la producción de biofertilizantes deben ser sometidas a un riguroso proceso de selección.

En éste sentido, la Facultad de Química de la UNAM, cuenta con una colección de 17 cepas de *Azospirillum*, en las que a través de diversos trabajos se ha logrado establecer que aún cuando todas fijan nitrógeno, algunas efectúan este proceso de manera más eficiente; así mismo varían en su capacidad para producir fitohormonas *in vitro*, como se demostró en el trabajo realizado en el 2001, Proyecto CONACYT 27972B, en el que se observó que las cepas Cd, VS1, VS9 y CPM-167 producen ácido indol acético (AIA) y ácido giberélico (AG), en tanto que Sp7, VS7 y C4 solo producen el primero y AMs3 sólo produce AG. De ellas las mayores productoras de AIA y AG corresponden respectivamente a VS1 y CPM-167. Por otra parte se estableció que dos expresan actividad de ACC deaminasa, característica que se desconoce en las otras 15 cepas, así como su capacidad para solubilizar fósforo.

Respecto a su interacción con plantas mediante ensayos de invernadero se demostró que todas colonizan eficientemente las raíces de jitomate, y algunas las raíces de pepino, maíz, trigo y sorgo; todas promueven el desarrollo de los cultivos antes indicados, pero

ésta capacidad varía entre cepas, así como con el tipo de planta, lo que repercute en la producción de frutos o de granos.

Con base en lo anterior en éste trabajo se estableció como objetivo contribuir a la caracterización de cepas de *Azospirillum* de la colección existente en el Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química, mediante la evaluación de la presencia de actividad de la enzima ACC-deaminasa en todas las cepas y la identificación de la especie de las mismas.

I. OBJETIVOS

Objetivo General

Contribuir a la caracterización de cepas de *Azospirillum* de la colección existente en el Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química.

Objetivos Particulares

1. Determinar la especie de 15 cepas de *Azospirillum*
2. Establecer en 22 cepas de *Azospirillum* su capacidad para expresar la actividad de la enzima ACC deaminasa.
3. Contribuir a la caracterización fisiológica de la colección de cepas de *Azospirillum*

II. HIPÓTESIS

Sí las cepas del género *Azospirillum sp.* utilizan el ácido-1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) como única fuente de nitrógeno, y se obtiene como producto α -cetobutirato y amonio, se presume la presencia de la enzima ACC deaminasa.

III. ANTECEDENTES.

1. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR).

En el suelo la mayoría de los microorganismos se encuentra en la rizósfera (región del suelo alrededor de la raíz de la planta), donde el ambiente es distinto del resto de la zona edáfica. Uno de los fenómenos importantes que se produce en la rizósfera es la presencia de una gran variedad de sustancias orgánicas, como aminoácidos, ácidos orgánicos, carbohidratos, derivados de ácidos nucleicos, factores de crecimiento y enzimas que estimulan el desarrollo y actividad de los microorganismos, así como, el establecimiento de asociaciones entre plantas y microorganismos, en las que el efecto puede ser benéfico o perjudicial para las plantas (Ramírez-Gama y Luna Millán, 1995).

En las interacciones con efecto benéfico, los microorganismos en ocasiones penetran a las raíces y forman estructuras especializadas en donde fijan nitrógeno, tal es el caso de *Rhizobium sp.* y *Bradyrhizobium sp.* que se asocian a leguminosas. En otros casos, los microorganismos permanecen en la rizósfera o en la superficie o interior de las raíces pero sin formar estructuras especializadas (Jiménez et al., 2001).

Kloepper (1978) definió a las bacterias de vida libre que habitan sobre las raíces (asociativas) y que estimulan significativamente el crecimiento de plantas como "Rizobacterias promotoras del desarrollo vegetal" o PGPR (*promoting growth plant rhizobacteria*). Las características que definen a este grupo son las siguientes:

- a. No invaden internamente los tejidos de las plantas, como ocurre con los hongos micorrízicos que forman arbusculos en el interior de las raíces o como *Rhizobium* que induce la formación de nódulos.
- b. Presentan una capacidad competitiva elevada, lo que asegura su establecimiento en la rizósfera después de su inoculación.
- c. Tienen la capacidad para colonizar eficientemente la superficie de la raíz y, como consecuencia, influyen positivamente en el crecimiento de la planta.
- d. No producen daño al hombre ni a otros organismos (Jiménez et al., 2001).

Las PGPR favorecen el desarrollo de las plantas de manera indirecta o directa.

Mecanismos indirectos. A través de estos procesos se suprime o inhibe el crecimiento de microorganismos perjudiciales para el desarrollo de la planta, por lo que se consideran involucrados en aspectos de control biológico, debido a que reducen o previenen la acción de fitopatógenos, como ejemplos de éstos se tienen:

- a. La producción de antibióticos;
- b. La producción de metabolitos que actúan como determinantes antagónicos;
- c. Producción de sideróforos mediante los que compiten en la obtención de hierro;
- d. Acción de enzimas líticas (glucanasas, quitinasas);
- e. Inducción de mecanismos de resistencia.(Penrose y Glick, 2003).

Mecanismos directos: Estos actúan estimulando el desarrollo de las raíces y la nutrición de las plantas, lo que repercute en un mayor crecimiento de las mismas y en el aumento de la producción de frutos y granos. Esos efectos se producen mediante diferentes vías como son:

- a. La fijación de nitrógeno;
- b. La síntesis de sideróforos;
- c. La solubilización de minerales, en donde es de particular importancia la solubilización de fósforo;
- d. La producción de fitohormonas (auxinas, citoquininas o giberelinas);
- e. La síntesis de enzimas que modulan el crecimiento o bien reducen los niveles de etileno en la planta tal es el caso de la ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico-deaminasa (Ghosh et al., 2003).

Los tres primeros aumentan el suplemento de nutrimentos esenciales, debido a que a través de la acción microbiana, el nitrógeno, hierro y fósforo son transformados a estados de óxido-reducción que son disponibles para las plantas. En tanto que en los otros dos casos actúan directamente en el metabolismo de las mismas (Penrose y Glick, 2003).

El nitrógeno se encuentra dentro de los bioelementos cuantitativamente en cuarto lugar después del hidrógeno, oxígeno y carbono. Este elemento es particularmente abundante en forma de N_2 gaseoso y representa el 99.4 % de todo el nitrógeno existente en la biosfera. Sin embargo, a pesar de ser tan abundante no puede ser utilizado por plantas y

animales, los que solo lo utilizan en forma de amonio y nitratos. La excepción a lo anterior, lo constituyen un grupo de bacterias que a través de la enzima nitrogenasa reducen el nitrógeno a amonio, por lo que éstas bacterias proporcionan una fuente muy importante de nitrógeno asimilable, siendo particularmente importantes las bacterias asociativas formadoras de estructuras especializadas tales como *Rhizobium* y *Frankia* (Postgate, 1981). Otras bacterias que viven libremente en la rizósfera, sobre las raíces o en el interior de las mismas pero sin formar estructuras especializadas también fijan nitrógeno, pero en estos casos la aportación es menor, como ejemplos se tienen a *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Derxia* (aerobias); *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* (aerobias facultativas) y *Clostridium*, *Desulfovibrio* y *Metanobacterium* (anaerobias) (Glick, 1995); y como endófitas *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* y *Azoarcus* (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000).

El hierro es un elemento fundamental en la respiración celular. Es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre, pero solo una pequeña porción de hierro está disponible. En éste sentido, las plantas son beneficiadas por rizobacterias productoras de sideróforos, cuya síntesis es inducida por la deficiencia de hierro. Existen diferentes tipos de sideróforos y su función es quelar el Fe (III). El mecanismo de transporte a través de la membrana interna no se conoce bien; pero se ha establecido que una vez dentro de la célula, el hierro, estrechamente unido a su sideróforo, se separa de éste último de dos maneras. En el caso del ferricromo (un sideróforo presente en los hongos), el Fe(III) se reduce a Fe (II), con lo que se libera y el sideróforo se recicla. Por el contrario, la enteroquelina (sideróforo presente en bacterias) se hidroliza una vez que penetra en la célula, por lo que cada molécula es utilizada solamente en una ocasión. Por otra parte se ha demostrado que los receptores de los sideróforos son muy específicos, lo que representa un papel importante en la naturaleza, en cuanto a la competencia entre diferentes bacterias, cuando la disponibilidad de Fe es baja. (Davis et al., 1996). Entre las rizobacterias productoras de sideróforos y por tanto involucradas en la reducción y solubilización del hierro se reporta un grupo heterogéneo de bacterias heterotróficas que incluyen entre otras a *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Alcaligenes*, *Clostridium* y *Enterobacter* (Atlas y Bartha., 1993).

El fósforo es un elemento esencial en la transferencia y acumulación de energía de todos los seres vivos. Por lo que en la agricultura, el uso de fertilizantes fosfatados es una

práctica ampliamente distribuida; sin embargo, una gran parte del fósforo suministrado no llega a ser utilizado por las plantas, ya que éste forma complejos con algunos metales como el aluminio, hierro y calcio, por lo que es inmovilizado y no puede ser asimilado.

Una alternativa para movilizar el fósforo en el suelo, es el uso de rizobacterias solubilizadoras de fósforo (BSF) también conocidas como fosfobacterias. Este grupo de bacterias es capaz de movilizar de 30 a 50 Kg. de fósforo por hectárea lo que significa, una reducción neta de 50% en el uso de fertilizantes químicos. Como solubilizadoras de fósforo se ha reportado a *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus* y *Flavobacterium*, éstas transforman $[Ca_3(PO_4)_2]$ a fosfatos di y monobásicos los cuales son formas solubles y asimilables para las raíces de las plantas (Díaz, et al., 2001). Estudios realizados con *Pseudomonas* demuestran que es capaz de utilizar el fosfato de inositol como única fuente de fósforo y carbono, liberando el fósforo hacia el suelo el cual puede ser aprovechado por los vegetales (Hernández, 2001).

Respecto a las fitohormonas, se tiene que estos compuestos son sintetizados por los propios vegetales. Las fitohormonas son sintetizadas en una parte de la planta y translocadas a otra en donde a bajas concentraciones inducen una respuesta fisiológica.

En general, con base en su efecto estas son clasificadas en dos grupos:

- a) Estimulantes del crecimiento y desarrollo de las plantas, que se agrupan en tres tipos: auxinas, giberelinas y citocininas; las dos primeras favorecen el alargamiento celular, en tanto que las segundas promueven la división celular.
- b) Inhibitorias del crecimiento, las que incluyen al etileno y al ácido abscísico (Lorence, 1999).

En adición a las hormonas vegetales, Brown (1974) y Tien (1979) fueron los primeros en identificar sustancias de la misma naturaleza química, en cultivos de diferentes rizobacterias. En la naturaleza estos compuestos al ser secretados contribuyen al “pool” endógeno de la planta (Glick et al. 2000).

Entre las rizobacterias que sintetizan fitohormonas se han reportado como:

- a) Productoras de auxinas a: *Azotobacter chroococcum*, *A. vinelandii*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, y *Serratia sp.* La auxina que se produce en mayor cantidad es el ácido indol acético y se han detectado en cantidades menores, pero en niveles biológicamente significativos el ácido indol láctico, ácido indol butírico, indol-3-etanol e indol-3- metanol (Tien et al. 1979; Bashan, et al. 1996; Torres-Rubio, et al 2000).
- b) Como productoras de giberelinas: *Azotobacter*, *Azospirillum lipoferum* y *A. brasilense* (Rademacher, 1994; Bottini et al. 1989).
- c) Como productoras de citocininas a: *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Paenobacillus* y *Pseudomonas* (García de Salamone et al. 2001).

Para explicar el efecto de las PGPR, el mecanismo que se menciona con mayor frecuencia corresponde a la producción de fitohormonas; y las auxinas han sido las más estudiadas, especialmente al ácido indol acético (AIA) el cual estimula la aparición de pelos radicales, así como el crecimiento de las raíces (Glick, 1995).

1.1 Etileno e importancia de la ACC deaminasa.

El etileno es una de las moléculas orgánicas mas simples cuya actividad biológica se presenta a concentraciones tan bajas como 0.05 $\mu\text{L/L}$. Su efecto se manifiesta en el desarrollo normal de las plantas afectando la germinación de semillas y el crecimiento de raíces, tallos y pétalos; así como en su respuesta a condiciones adversas (Glick, 2005).

El etileno es un importante elemento del sistema de regulación endógena de la planta. Durante las etapas de crecimiento de las plantas, los niveles de etileno se mantienen bajos ($< 0.05 \mu\text{L/L}$), en tanto que durante la maduración y senescencia de los frutos el nivel aumenta (100 $\mu\text{L/L}$) lo que ocasiona la estimulación del envejecimiento y frecuentemente causa la pérdida en la producción de flores y de frutos. El problema de inhibir o por lo menos retrasar el proceso de envejecimiento del material vegetal es un tema de gran importancia en la agricultura y almacenamiento de frutos, por lo que existen importantes avances en la investigación sobre este regulador respecto a su biosíntesis (ver figura 1) y su regulación por factores endógenos y medioambientales (Jankiewicz, 2003).

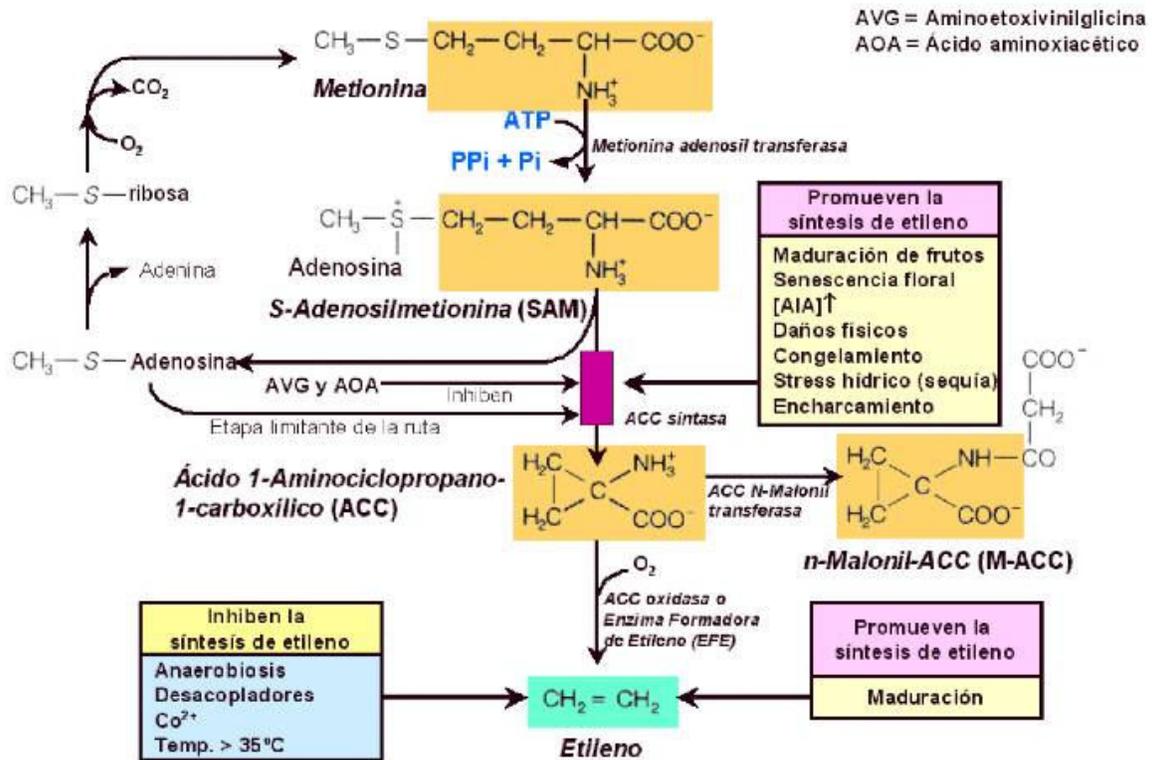


Figura 1. Biosíntesis del etileno y su regulación. El aminoácido metionina es el precursor del etileno en los tejidos de todas las plantas superiores. La etapa limitante de la ruta biosintética es la conversión de la S-adenosilmetionina (SAM) en el intermediario precursor del etileno, el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), etapa catalizada por la ACC sintasa. Otras abreviaturas: AVG, aminoetoxivinilglicina; AOA, ácido aminoxiacético. [Tomada de www.euita.upv.es/variados/biología/Temas/Tema_14.htm]. (García 2006).

Por otra parte se ha demostrado que bajo condiciones adversas los niveles de etileno en las plantas aumentan considerablemente, lo cual constituye una respuesta de defensa a los daños causados por metales pesados, temperaturas extremas, sequía, inundación, ataques por insectos u otros patógenos (Glick, 2005).

La producción de etileno en respuesta al estrés es considerada como un fenómeno característico de la acción de esta hormona. Por esto, el etileno es a veces llamado una “hormona de alarma” que informa a otros tejidos de las perturbaciones en la planta.

El estrés hídrico causa una intensa producción de etileno. La privación de oxígeno a las raíces de plantas es la principal consecuencia de la inundación.

La hipoxia en las raíces provoca una actividad más alta de ACC sintetasa y como consecuencia una concentración más alta de ACC en las raíces. La hipoxia induce genes de ACC sintetasa (*ACS7* y *ACS3*) en un tejido u órgano específico y esta inducción tienen

como resultado un aumento en la actividad de ACC sintetasa en raíces y en consecuencia el ACC sintetizado se oxida a través de una enzima ACC oxidasa formando el etileno (Grichko y Glick. 2001).

Los efectos fisiológicos inducidos por el etileno pueden ser totalmente bloqueados reprimiendo la expresión del gen de la sintetasa del ACC y/o ACC oxidasa- enzimas principales de la biosíntesis del etileno. (Jankiewicz, 2003).

Pero también son conocidos una serie de compuestos antagónicos para el etileno como AVG (aminoetoxivinilglicina) y AOA (ácido α -aminooxiacético). Además de estos existen sustancias, las cuales influyen no sobre la síntesis del etileno sino en su acción sobre los tejidos, o sea, que actúan en los receptores del etileno o en su ruta de transmisión de la señal como el 2,5-norbarnadieno. Este compuesto es difícil aplicarlo en la práctica puesto que debe utilizarse en forma repetitiva a concentraciones relativamente altas y además, tienen un fuerte olor desagradable. Por esta razón se usa principalmente en el ámbito experimental (Apelbaum et al.,1981a).

Otro compuesto con acción bloqueadora es el ión de plata, en forma de tiosulfato; $\text{Ag}(\text{S}_2\text{O}_3)_3$. Este compuesto actúa en forma muy eficaz. Sin embargo, el ión de plata como metal pesado es tóxico y no se puede usar en productos comestibles como frutos y hortalizas. Aun su uso en plantas ornamentales se cuestiona frecuentemente, desde el punto de vista de protección del ambiente. Por lo tanto se ha buscado intensamente algunas sustancias orgánicas que pudiesen reemplazar al tiosulfato de plata.

Esta búsqueda llevó al descubrimiento en los últimos años del diazociclopentadieno, desafortunadamente este compuesto no puede ser incluido en el uso comercial ya que en altas concentraciones es explosivo.

Después, se descubrieron tres ciclopropanos que actúan como inhibidores de los receptores del etileno, ciclopropano, 1-metilciclopropano y 3,3- dimetilciclopropano. El más prometedor entre ellos es el 1-metilciclopropano (1-MCP). Estos tres compuestos son volátiles a las temperaturas ambientales y prácticamente no tienen olor en las concentraciones útiles. El 1-MCP es más estable que el ciclopropano y más activo que el 3,3-dimetilciclopropano. No se sabe a detalle como actúa el 1-MCP. Probablemente se une con el receptor del etileno mucho más fuertemente que el etileno mismo y por esto el etileno no puede desempeñar su papel.

Pero se ha demostrado que el tratamiento con 1-MCP es eficaz solo cuando se tratan frutos en la fase más temprana de la maduración. Cuando se trataron frutos con etileno y después se les almacenó por un día (en 20°C y 90% de la humedad relativa), el tratamiento con 1-MCP fue inefectivo (Apelbaum et al.,1981b).

Debido a las desventajas de los compuestos inhibidores mencionados, la investigación sobre mecanismos alternativos es muy importante. De ahí el uso de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, con la característica de sintetizar enzimas, específicamente la ACC deaminasa la cual ejerce una disminución de los niveles de etileno por desaminación del ACC precursor inmediato del etileno en plantas produciendo α -cetobutirato y amonio.

1.2 ACC-deaminasa

Los estudios bioquímicos de la ACC deaminasa, las propiedades físicas y químicas y el modo de acción fueron iniciados por Honma y colaboradores (1978).

La estructura cristalina de la enzima ACC deaminasa fue determinada en levaduras (Minami et al., 1998) y recientemente en bacterias (Karthikeyan et al., 2004 a, b); las propiedades bioquímicas y termodinámicas de la ACC deaminasa fueron cuantificadas en *Pseudomonas putida* UW4 (Hontzeas et al., 2004).

Recientemente se han aislado un gran número de genes que codifican para la ACC deaminasa. El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de algunos genes indican que existe una conservación de los aminoácidos Lys⁵¹-Cys¹⁶² y ambos son importantes en la actividad enzimática. El análisis filogenético de los genes que codifican para ACC deaminasa indican que muchos de estos genes son heredados directamente y de manera horizontal y es posible que se deba a que la transferencia genética de muchos de estos genes se codifiquen en plásmidos. La principal característica que se ha encontrado de todas las enzimas de ACC deaminasa que se han aislado es que muestran una baja afinidad por el sustrato ACC siendo siempre en un rango milimolar. (Hontzeas et al., 2005).

La ACC deaminasa es miembro de un grupo de enzimas que requieren fosfato 5- piridoxal (PLP) para su actividad enzimática. PLP y fosfato 5-piridoxamino (PMP) son las dos

formas de la vitamina B₆, las cuales son cofactores enzimáticos, muchos de los cuales son involucrados en el metabolismo de aminoácidos. Jansonius en 1998 clasificó las enzimas PLP basándose en su estructura tridimensional, en 4 tipos. Estos son 1) triptofano sintetasa, 2) aspartato aminotransferasa, 3) D-aminoácido transferasa y 4) alanina racemasa. De acuerdo con esta clasificación, el ACC deaminasa pertenece a la familia de las triptofano sintetasa (TRPSβ).

El análisis cristalográfico por rayos X reveló que la ACC deaminasa tiene dos dominios, los cuales tienen una estructura α/β que es similar a la β-subunidad de la enzima triptofano sintetasa. El fosfato de piridoxal es el cofactor de la ACC deaminasa y está unida a la molécula de la proteína. Se han localizado dos sitios catalíticos en la enzima: (1) el grupo tiol reactivo que se encuentra en el aminoácido cisteína¹⁶², localizado en el gap interno entre los dos dominios de la molécula; (2) en el sitio de unión del fosfato de piridoxal y la lisina⁵¹ (Yao 2000).

La ACC deaminasa es una enzima multimérica con una subunidad monomérica con un peso molecular de aproximadamente 35-42 kDa. Es una enzima sulfhidríl que utiliza piridoxal -5-fosfato como cofactor. Mientras que varios aminoácidos como D-serina y D-cisteína pueden actuar como sustratos de la ACC deaminasa (no obstante, estos son menos eficientes que el ACC), L-serina y L-alanina son efectivos en la inhibición competitiva por la enzima. La ACC deaminasa cataliza la hidrólisis del ACC, la cual provoca el rompimiento del anillo ciclopropano y la desaminación del ACC formando α-acetobutirato y amonio (Figura 2) (Glick, 2005).

Sin embargo, la ACC deaminasa es la única de las enzimas dependientes de PLP que al romper el anillo no produce directamente un intermediario α-carbanión, debido a la carencia de un hidrógeno alfa del sustrato ACC. Walsh et al. (1981) propusieron dos mecanismos para este paso de reacción. El primer mecanismo ilustra la posibilidad de una inicial abstracción de un átomo de hidrógeno abriendo el anillo ciclopropano por Lys⁵¹, seguido de una serie de reacciones hidrolíticas (Ose et al., 2003).

El segundo mecanismo involucra un ataque nucleofílico por un aminoácido en la posición pro-S-β-carbono del ACC iniciando el rompimiento del anillo ciclopropano, seguido de la abstracción del protón-β del carbono pro-R por un residuo aminoácido básico,

probablemente por Lys^51 (Zhao et al., 2003). En ambas propuestas de mecanismos de reacción, los productos finales son α -cetobutirato y amonio. (Hontzeas et al., 2006).



Figura 2. Reacción que presenta el rompimiento del anillo ciclopropano por la ACC deaminasa. (Hontzeas et al., 2004).

La característica de todas las ACC deaminasas que se han estudiado es que tienen una baja afinidad por el ACC. La ACC deaminasa sigue una cinética de Michaelis-Menten y el rango de K_{cat}/K_m de la ACC deaminasa de algunas especies bacterianas es de aproximadamente $690 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Zhao et al., 2003).

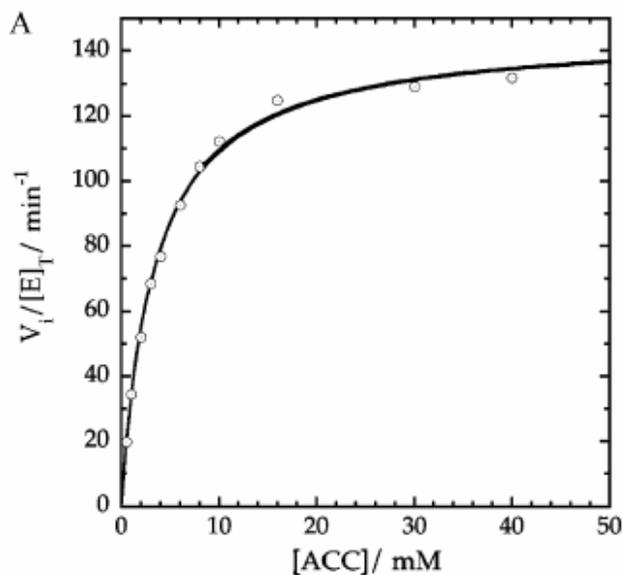


Figura 3. Cinética Enzimática de la enzima ACC deaminasa utilizando como sustrato el ACC. (Hontzeas et al., 2004)

La afinidad de la enzima por el sustrato específico (valor de K_m) se refiere al efecto en la cinética de conversión del sustrato en los productos. Cuando los valores de K_m de unión a el ACC por la ACC deaminasa fueron determinados en extractos enzimáticos de diferentes microorganismos a un pH 8.5, se obtuvo un rango de valores de 1.5 a 17.4 mM, indicando que la enzima no tiene una alta afinidad por el ACC.

En contraposición la ACC oxidasa (la cual cataliza la formación de etileno a partir de ACC) tiene una gran afinidad, por lo que para que la ACC deaminasa compita eficientemente la cantidad de esta debe ser mucho mayor que la de ACC oxidasa enzima que en general se encuentra en cantidades muy pequeñas y solo en tejidos no senescentes y no estresados.

Por otra parte, en las plantas los niveles de ACC son típicamente en el rango micromolar y el Km en el rango milimolar, la cinética de Michaelis-Menton indica que el aumento de la concentración de ACC es acompañado por un aumento en la hidrólisis de ACC, independientemente de la cantidad de enzima presente. Así la enzima puede responder inmediatamente al incremento de los niveles de ACC y provocar el aumento en la proporción de conservación de ACC a amonio y α -cetobutirato (Glick, 2005).

La enzima muestra una alta actividad a pH 8.0-8.5 y el valor de Kcat decrece drásticamente por debajo de pH 7.0 y por arriba de pH 9.0 en una típica curva de campana. En el caso de *Pseudomonas putida* UW4 la actividad óptima esta en pH 8, mostrando una actividad baja por debajo de pH 7.0 con un pKa de 7.4 en el final más bajo y un pKa de 9.5 en el final más alto (Hontzeas et al., 2004b).

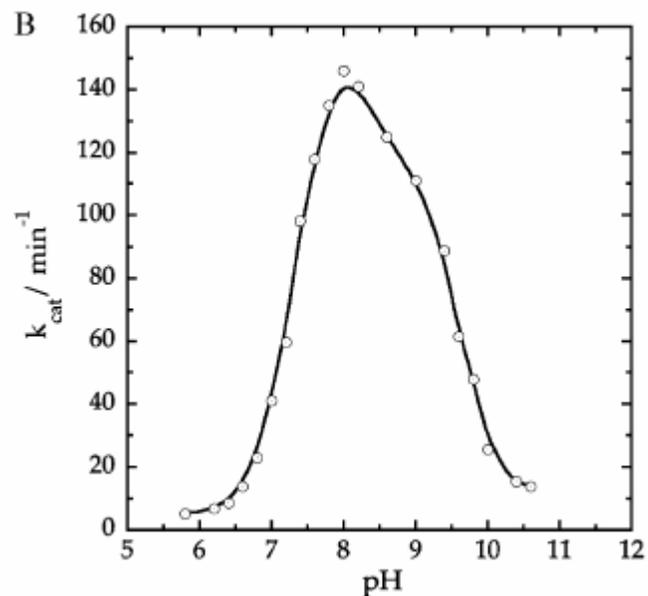


Figura 4. Efecto del pH en la actividad de la enzima ACC deaminasa en *Pseudomonas putida* (Hontzeas et al.,2004)

1.3 Mecanismo de acción

La enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminasa interfiere en la síntesis de etileno por las plantas. La hidrólisis del ACC precursor inmediato del etileno, determina la disminución de este compuesto, lo que es particularmente importante en plantas que crecen en condiciones adversas (Glick, 1995).

Uno de los mecanismos utilizados por las PGPR para facilitar el crecimiento y desarrollo de la planta es el bajar los niveles del etileno por desaminación del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), el precursor inmediato de etileno en plantas, produciendo α -cetobutirato y amonio debido a que contienen la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminasa (ACC deaminasa), y ésta tiene la capacidad de desaminar el ACC, precursor del etileno (Glick, 1995; Glick et. al., 1998; Jacobson et. al., 1994).

Cuando las PGPR contienen ACC deaminasa y son puestas en contacto con la planta, éstas actúan sobre el ACC asegurando que los niveles de etileno producidos no alcancen un nivel en el cual se produzca daño en ella (Glick, 1995).

Las semillas, así como las raíces secretan diversos compuestos orgánicos entre ellos el triptofano, este es transformado a ácido indolacético (IAA) por las PGPR que se encuentran en la superficie de las semillas y raíces. Cierta cantidad de IAA recientemente sintetizado es tomado por la planta y, en conjunción con el IAA endógeno, puede cada uno estimular las células vegetales para proliferación y/o elongación.

Alternativamente, el IAA estimula la actividad de la enzima ACC sintetasa convirtiendo S-adenosilmetionina (SAM) a ACC (Kende, 1993). La porción de ACC es exudada por las raíces o semillas y es tomada por la PGPR e hidrolizada por la enzima ACC deaminasa a amonio y α -cetobutirato, lo que determina la disminución de ACC fuera de la planta; esta a fin de mantener el equilibrio entre los niveles internos y externos de ACC, incrementa la síntesis de éste (ver figura 5). De esta manera la bacteria estimula a la planta a sintetizar ACC, y la planta provee a la bacteria de una única fuente de nitrógeno, de tal modo que permite la proliferación de la PGPR. Como consecuencia a este mecanismo, las plantas que tienen PGPR con actividad de ACC deaminasa, tienden a desarrollar raíces largas y crecen mucho mejor (Glick et al., 1997).

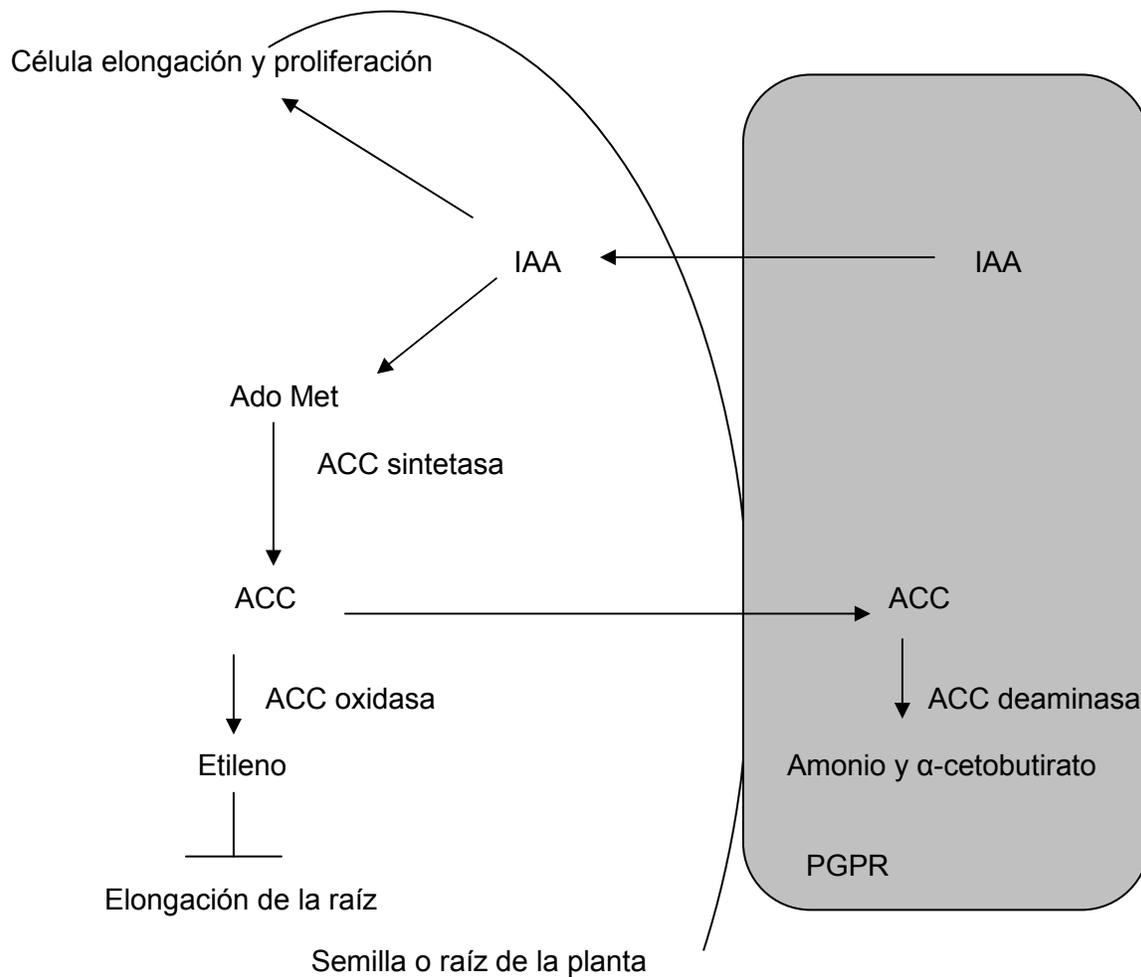


Figura 5. Representación de cómo la PGPR se asocia a la raíz o a la semilla de la planta y como disminuye los niveles de etileno por la acción de la ACC deaminasa. Las flechas indican un paso fisicoquímico en el mecanismo y el símbolo \perp indica la inhibición (en este caso la inhibición de la elongación de la raíz por el etileno). **IAA** ácido indolacético; **ACC** ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico; **Ado Met** S-adenosin-metionina. Tomado y Modificado de Glick et. al. 1998.

1.4 Microorganismos ACC deaminasa (ACCD) positivos.

Se ha demostrado que numerosas rizobacterias utilizan el ACC como única fuente de nitrógeno, por lo que la inoculación de semillas o raíces con estas bacterias constituye una alternativa para regular la concentración de etileno particularmente en plantas que se encuentran en condiciones ambientales extremas.

Los estudios iniciales sobre rizobacterias ACCD positivos se enfocaron a bacterias de vida libre del suelo como *Pseudomonas*, levaduras *Hansenula saturnus* (Minami et. al., 1998) y hongos *Penicillium citrinum* (Jia et. al., 1999). Recientemente la ACC deaminasa fue

encontrada en un gran rango de rizobacterias gramnegativas, grampositivas y hongos (Glick, 2005).

Algunos ejemplos de rizobacterias que utilizan el ACC como única fuente de carbono corresponden a *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* (Penrose y Glick.,2003), *Bacillus circulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus globisporus* (Ghosh et. al.,2003) y *Kluyvera ascorbata* (Belimov et. al.,2005). Además se reporta que la actividad de la ACC-deaminasa varía en los diferentes géneros, así como entre cepas de una misma especie (Cuadro 1).

Cuadro 1. Actividad de la ACC-deaminasa expresada en diferentes bacterias
(*Belimov et.al.,2005; **Wenbo et.al.,2003)

Bacterias	$\mu\text{mol}\alpha\text{-cetobutirato /mg proteína/hora}$
<i>Enterobacter cloacae UW4</i>	21.23 \pm 2.05 **
<i>Enterobacter cloacae CAL2</i>	4.13 \pm 0.08 *
<i>Escherichia coli Prkacc</i>	1.74 \pm 0.06 *
<i>Variovorax paradoxus 2C-1</i>	6.20 \pm 0.10 *
<i>Variovorax paradoxus 2P-1</i>	6.40 \pm 0.10 *
<i>Variovorax paradoxus 2P-4</i>	5.50 \pm 0.20 *
<i>Variovorax paradoxus 3C-2</i>	1.30 \pm 0.20 *
<i>Variovorax paradoxus 3C-3</i>	9.00 \pm 0.80 *
<i>Variovorax paradoxus 3C-5</i>	7.30 \pm 0.50 *
<i>Variovorax paradoxus 3P-3</i>	1.20 \pm 0.10 *
<i>Rhodococcus sp. 4N-4</i>	10.5 \pm 0.20 *
<i>Variovorax paradoxus 5C-2</i>	9.30 \pm 0.80 *
<i>Variovorax paradoxus 5P-3</i>	1.60 \pm 0.10 *
<i>Acidovorax facilis 4P-6</i>	0.70 \pm 0.10 *
<i>Rhizobium leguminosarum bv. viciae 128C53K</i>	1.06 \pm 0.17 **
<i>Rhizobium leguminosarum bv. viciae 128C53G</i>	0.93 \pm 0.25 **
<i>Rhizobium leguminosarum bv. viciae 99 A1</i>	0.43 \pm 0.11 **
<i>Rhizobium leguminosarum bv. viciae 128C53</i>	0.78 \pm 0.13 **
<i>Rhizobium hedysari ATCC 43676</i>	1.78 \pm 0.42 **

Penrose y Glick (2003) indican que niveles de actividad de ACC deaminasa de aproximadamente ≥ 20 nmol de α -cetobutirato $\text{mg}^{-1}\text{h}^{-1}$ son suficientes para permitir que la bacteria actúe como PGPR y que el efecto sobre la elongación de las raíces es similar al

producido por bacterias con una actividad enzimática mayor (300 a 400 nmol de α -cetobutirato $\text{mg}^{-1}\text{h}^{-1}$) (Penrose y Glick., 2003).

1.5 Efecto de la inoculación con rizobacterias ACC-deaminasa positivas (ACCD+).

Existen numerosos trabajos sobre el efecto de la inoculación con este tipo de rizobacterias, en estos se demuestra que estas rizobacterias disminuyen el nivel de etileno, y a pesar de que esta reducción es pequeña, la protección contra el estrés de la planta es continuo y absolutamente drástico, por lo que se recomienda efectuar mas estudios de invernadero que permitan comprobar el efecto protector de estas bacterias en casos de inundación, la presencia de altas concentraciones de niquel, e hidrocarburos policíclicos aromáticos (Burd, 2000) y posteriormente realizar ensayos de campo (Glick, 2005).

A continuación se describe un resumen de algunos de los estudios sobre la inoculación con rizobacterias ACCD (+) en diversas plantas.

- a) *Rhizobium leguminosarum bv viciae* al reducir el nivel de etileno entre la epidermis y la capa cortical, promueve la infección y formación de nódulos en las raíces de chicharos (Wenbo et al., 2003).
- b) *Bacillus circulans*, *B. firmus* y *B. globisporus* al ser comparados con *Bacillus subtilis* ACCD (-), promueven una mayor germinación y elongación de las raíces de canela (Ghosh et. al., 2003).
- c) *Sinorhizobium meliloti* ACCD (+) induce del 35 al 40% más de nódulos que las cepas ACCD (-) (Wenbo et al., 2004).
- d) *Methylobacterium fujisawaense* es una rizobacteria de la que en trabajos previos se estableció su capacidad para estimular la germinación de las semillas, promover el crecimiento de las raíces e inducir la resistencia; posteriormente se determinó su capacidad para sintetizar ACC deaminasa y al evaluar el efecto de la inoculación con esta cepa sobre canela se observó que ocasiona un incremento en la cantidad de IAA y algunas citocininas, además de disminuir los niveles de ACC y en consecuencia el nivel de etileno, liberando a las raíces del efecto inhibitorio de esta hormona (Madhaiyan et al., 2005).
- e) Respecto a la resistencia de las plantas al estrés de etileno, resulta interesante el trabajo realizado en la India en el que se aislaron de raíces de canela las

rizobacterias *Variovorax paradoxus*, *Rhodococcus sp.* las que resultaron productoras de ACC deaminasa y tolerantes al Cd, Zn, Cu, Ni y Co. Por lo que de acuerdo a estos resultados proponen que la ACC deaminasa al reducir el nivel de etileno, permiten la elongación de las raíces y la absorción de nutrimentos a pesar de la acumulación de metales aún en concentraciones tóxicas, por lo que proponen el uso de estas bacterias como biofertilizantes en casos de fitoremediación (Belimov et al.,2005).

Holguín y Glick (2001) reportaron que el gen *acdS* de *Enterobacter cloacae* UW4 al ser transferido a *Azospirillum brasilense* determina la expresión de la ACC deaminasa en esta bacteria. En un trabajo posterior esta bacteria transformada fue inoculada en semillas de tomate y su efecto se manifestó en el incremento en la síntesis de IAA, la promoción en el desarrollo de las plántulas y una mayor sobrevivencia de la bacteria en la superficie de las hojas (Holguín y Glick, 2003). En un estudio con plántulas de clavel en el que se comparó el efecto de tres tratamientos que corresponden : a) un enraizador comercial (ácido indol butírico al 0.1%), b) la inoculación de *Azospirillum brasilense* Cd1843 ACCD (-) y c) *Azospirillum brasilense* Cd1843 transformada (ACCD(+)) se observó que con este último tratamiento el desarrollo de las raíces fue mucho mayor, lo que indica que el uso de este tipo de trabajos puede tener implicaciones positivas en floricultura (Qiaosi et al.,2005).

Penrose y Glick (2003), indican que la inoculación con PGPR ACCD (+) facilitan el crecimiento de las plantas en una extensión mucho mayor, en aquéllas que son sensibles al etileno, tales como : canela, pimienta y tomate y proponen emplear este tipo de PGPR en prácticas agrícolas, hortícolas y en protocolos de fitoremediación.

La revisión anterior muestra que algunas rizobacterias promueven el crecimiento de la planta y su desarrollo a través de más de uno de los mecanismos indicados y además se reporta que estos son utilizados varias veces durante el ciclo vital de la planta, por lo que algunas de éstas destacan por su potencial para ser empleadas como biofertilizantes (Penrose y Glick, 2003).

Como ejemplos de ellas se reportan a *Azospirillum* y *Azotobacter*, las que además fijar N₂, son capaces de colonizar el interior de las raíces y producir fitohormonas (giberelinas, auxinas, citocininas y ácido abscísico), lo que estimula la formación de pelos radicales y

raíces laterales, así como el crecimiento de éstas. Por lo que al aumentar el volumen radicular, la absorción de nutrimentos es más eficiente, lo que se traduce en un mayor crecimiento de las plantas e incremento del rendimiento en gramíneas.

Así mismo se ha demostrado que algunas especies de *Pseudomonas*, actúan como biocontrol de hongos fitopatógenos, además incrementan la absorción de N, P y K y producen fitohormonas en la rizósfera; lo que favorece el crecimiento de las plantas. En el caso particular de *P. fluorescens* se ha establecido que ésta actúa vía producción de sideróforos extracelulares que secuestran óxidos férricos para convertirlos en formas disponibles para las raíces y mediante la producción de fitohormonas estimulan el desarrollo de las raíces incrementando el volumen radical. Por otra parte se reporta que la colonización del rizoplano por esta bacteria, así como de otras PGPR, varía de acuerdo con los cultivos. Lo anterior se ilustra con los resultados de un experimento en el que se inoculó con *P. fluorescens* el rizoplano de plátano y arroz y se observó que en el primer caso la población fue 10.8 % mayor que la registrada en plátanos sin inocular, en tanto que en el arroz el aumento de la población con respecto al testigo solo fue 4.5 % (Glick, 1995, Bashan y Carrillo, 1996, Caballero Mellado, 2006).

Con base en lo anterior Glick y colaboradores (2001) indican que los microorganismos de la rizósfera con capacidad para efectuar más de uno de los mecanismos con efecto benéfico para las plantas, constituyen un excelente potencial como agentes de biocontrol y como biofertilizantes y su manipulación constituye una interesante práctica para:

- a. Favorecer los aspectos relativos a la nutrición mineral de las plantas;
- b. Incrementar la productividad de los cultivos;
- c. Disminuir el uso de agroquímicos;
- d. Conservar el suelo;
- e. Asegurar el desarrollo sostenido de los ecosistemas.

2. *Azospirillum ssp.*

2.1 Características generales

Azospirillum spp. es una bacteria con morfología de espirilo que vive en forma libre en el suelo, o bien en la superficie de raíces y hojas de una gran variedad de plantas (Bashan et al., 1996). Las características útiles para la identificación rutinaria son la forma vibroide, el pleomorfismo y su movilidad en espiral. Las células son gramnegativas y contienen cantidades elevadas de poli-2-β-hidroxi-butirato (PHB) que se observa como gránulos refringentes. En cultivos viejos se observan numerosos cistos conocidos como formas C (Urzúa, 2001).

2.2 Aspectos históricos

El primer reporte acerca de esta bacteria fue hecho por Beijerinck en 1923 quien la denominó inicialmente *Azotobacter spirillum* y en 1925 le cambió el nombre por *Spirillum lipoferum*. Cuarenta años después, Becking (1963) demostró la fijación de nitrógeno en esta bacteria (Neyra y Döbereiner 1977); y fue hasta 1974 que se reinició el estudio sobre la misma, cuando Peña Cabriales y Döbereiner, la encontraron en pastos tropicales (Bulow y Döbereiner, 1975).

Con base en la importancia y repercusión que podría tener esta bacteria por su capacidad para fijar nitrógeno y asociarse con gramíneas, a partir de entonces, se intensificó el estudio sobre este sistema.

2.3 Taxonomía

En 1978, se hizo una revisión de su taxonomía y se estableció como un nuevo género bajo el nombre de *Azospirillum* con dos especies: *A. lipoferum* y *A. brasilense*. Actualmente este género está ubicado en la subclase alfa de las proteobacterias con *A. lipoferum* como especie tipo y se conocen cinco especies más *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferans*, *A. irakense* y *A. largimobile*. Recientemente, fue propuesta una nueva especie *A. doebereineriae*, cuya denominación fue dada en honor a la investigadora que impulsó los estudios de éste género bacteriano y descubrió otros diazotófos (Eckert, et al. 2001).

2.4 Distribución

Esta bacteria se encuentra ampliamente distribuida alrededor del mundo. Es particularmente abundante en las regiones tropicales, y se encuentra en menor proporción en regiones templadas, frías y desérticas (Ramírez-Gama y Luna-Millán, 1995).

Las características del suelo y de la propia bacteria juegan un papel importante en la distribución de las especies de *Azospirillum*. En suelos con valores de pH cercanos a la neutralidad se encuentran abundantemente *A. brasilense* y *A. lipoferum*, en tanto que en suelos con un pH de 5 se les encuentra en forma esporádica y no se logra su aislamiento de suelos con pH menor a 4.5; en cambio *A. halopraeferans* fue aislada de suelos salinos.

Los estudios iniciales estuvieron enfocados a su aislamiento a partir de raíces de gramíneas (maíz, trigo, arroz, sorgo, avena, pastos forrajeros); posteriormente se demostró que ésta bacteria es habitante natural de las raíces de muchas plantas no gramíneas tales como henequén, cactáceas, palmas cocoteras, soya, alfalfa y frijol. También se ha reportado su aislamiento a partir de semillas de pastos esterilizadas superficialmente y de esporocarpos de los hongos ectomicorrízicos *Hebeloma crustuliniforme*, *Laccaria laccata* y *Rhizopogon vinicolor* (Bashan y Holguín, 1997; Bilal, et al. 1990; Esquivel-Cote, 2002; Gamo y Ahn, 1991; Li y Castellano, 1987; Penot et al. 1992).

2.5 Enriquecimiento y aislamiento

El medio de cultivo usado por excelencia para el enriquecimiento de las especies de *Azospirillum*, así como, para evaluar la capacidad fijadora de nitrógeno de las cepas y la conservación de los cultivos tipo ("stock"), corresponde al descrito por Döbereiner y Day (1975) compuesto por malato, sales, libre de nitrógeno y semisolidificado conocido como medio Nfb. Algunos autores sustituyen el malato por succinato, con el que reportan resultados similares (Fallik y Okon, 1996; Albrecht y Okon 1980).

El crecimiento típico de *Azospirillum* en tubos con Nfb, se observa después de 24 a 48 h de incubación en forma de un velo abajo de la superficie del medio de cultivo, el cual asciende y se transforma en una película blanca densa, y vire del indicador azul de bromotimol. Las características microscópicas que permiten confirmar la existencia de *Azospirillum* son: la presencia de formas vibroides, con movilidad en espiral y abundantes

gránulos refringentes de poli-β-hidroxibutirato (PHB); en algunos casos se observan células pleomórficas. En cultivos semigelificados y gelificados con más de 24 hrs. de incubación se presentan frecuentemente células refringentes con forma ovoide y de paredes gruesas similares a quistes (formas C).

A partir de estos cultivos se resiembra en placas con diferentes medios de cultivo (malato o succinato-sales adicionado con extracto de levadura, malato-papa dextrosa, agar nutritivo, malato-rojo congo) en los que se seleccionan las colonias típicas. Por ejemplo en el medio adicionado con el colorante rojo congo una de las características fenotípicas más usada como criterio para el reconocimiento del género *Azospirillum* es el color rojo escarlata que toman las colonias. No obstante, en este medio pueden encontrarse colonias mutantes de *Azospirillum* de color blanco debido a la incapacidad de producir polisacáridos, por lo que es recomendable emplear varios de los medios indicados (Tarrand et al., 1978; Döbereiner y Baldani, 1979; Rodríguez Cáceres, 1982).

Cuando después de numerosas resiembras se logra la obtención de cultivos puros, se procede a la conservación de los mismos en tubos inclinados con agar nutritivo o con medio Nfb los que se almacenan a 4° C. En estas condiciones las bacterias permanecen viables de 9 a 12 meses (Albrecht y Okon, 1980). Tsuzuki, indica que es mas conveniente emplear el medio Nfb, debido a que en agar nutritivo, la población disminuye su viabilidad y algunas cepas pierden su capacidad para fijar nitrógeno (comunicación personal).

2.6 Caracterización bioquímica

En adición a las pruebas antes descritas que permiten la caracterización primaria de *Azospirillum*, diversos investigadores han descrito numerosas pruebas fisiológicas y bioquímicas que permiten reconocimiento de especies. En el siguiente cuadro se describen algunas de las pruebas que son utilizadas rutinariamente.

Cuadro 2. Características fisiológicas y bioquímicas de las diferentes especies de *Azospirillum*. (Caballero-Mellado,2006).

Característica	<i>A. lipoferum</i>	<i>A. brasilense</i>	<i>A. amazonense</i>	<i>A. halopraeferans</i>	<i>A. irakense</i>
Células pleomórficas	+	-	+	+	+
Rango Temp.. Óptima	32-37 °C	32-37 °C	32-37 °C	35-41 °C	30-32 °C
Rango pH óptimo	5.7-6.8	6.0-7.8	5.7-6.5	6.8-8.0	6.4-6.7
Requiere biotina	+	-	-	+	-
Crecimiento en presencia de NaCl (3%)	-	V	-	+	+
Hidrólisis de pectina	-	-	-	-	+
Fuente de carbono para fijar N ₂ :					
Glucosa	+	-	+	-	+
Sacarosa, maltosa	- ^a	-	+	-	+
α -cetoglutarato	+	-	-	+	
Manitol	+	-	-	±	-

(+) positivo, (-) negativo, (±) crecimiento pobre, (v) variable, (^a) algunas cepas usan sacarosa.

En 1970 la introducción de la gama API revolucionó el campo de la bacteriología. Este sistema consiste en una versión estandarizada y miniaturizada de pruebas bioquímicas existentes, incluidas las complejas de realizar y de leer. API 20 E® fue el primer sistema de identificación desarrollado en el que se asocia una galería de pruebas bioquímicas con una base de datos. La gama se amplió rápidamente en colaboración con los grandes centros de referencia internacionales en EUA, Japón, Australia y Europa. El concepto innovador de API también supuso el desarrollo de un método de cálculo, conocido como la identificación numérica . Este método ha permitido el desarrollo de programas , que hacen la identificación más rápida y más precisa. Pero este sistema aun no esta disponible para el género *Azospirillum* (Biomerieux, 2006).

- *API® 20 NE.*

La galería API 20 NE es un sistema estandarizado para la identificación de los bacilos gramnegativos no enterobacterias y no fastidiosos, que combina 8 ensayos convencionales y 12 ensayos de asimilación.

La galería API 20 NE incluye 20 microtubos que contienen sustratos deshidratados. Los ensayos convencionales se inoculan con una suspensión bacteriana salina que

reconstituye los medios. Las reacciones que se producen durante la incubación se traducen en cambios de color, espontáneos o provocados mediante la adición de reactivos.

Los ensayos de asimilación se inoculan a concentraciones bajas de células bacterianas suspendidas en un medio mínimo y las bacterias crecen solamente si son capaces de utilizar el correspondiente sustrato. La lectura de estas reacciones se hace con la ayuda del siguiente cuadro de identificación.

Cuadro 3. Ensayos de asimilación y convencionales de la galería API 20 NE

Ensayo	Componentes activos	Reacciones/enzimas	Resultados	
			Negativo	Positivo
NO ₃	Nitrato potásico	Reducción de nitratos en nitritos	+ NIT1+NIT incoloro	2 / 5 min. rosa-rojo
		Reducción de nitratos en nitrógeno	+ Zn rosa-rojo	5 min. incoloro
TRP	L-Triptofano	Formación de indol	+ JAMES Incoloro Verde pálido/ amarillo	Inmediato Rosa
GLU	D-glucosa	Fermentación de la glucosa	Azul a verde	Amarillo
ADH	L-arginina	Arginina Dihidrolasa	amarillo	Naranja /rosa/ Rojo
URE	Urea	Ureasa	Amarillo	Naranja/rosa/ rojo
ESC	Esculina citrato férrico	Hidrólisis (β-glucosidasa)	amarillo	Gris/marrón/negro
GEL	Gelatina (origen bovino)	Hidrólisis (proteasa)	Sin difusión del pigmento	Difusión del pigmento
PNPG	4-nitrofenil-βD-galactopiranosida	β-galactosidasa (para-nitrofenilβ-D-galactopiranosidasa)	incoloro	Amarillo
GLU	D-glucosa	Asimilación	transparencia	Turbidez
ARA	L-arabinosa	Asimilación	transparencia	Turbidez
MNE	D-manosa	Asimilación	transparencia	Turbidez
MAN	D-manitol	Asimilación	transparencia	Turbidez
NAG	N-acetil-glucosamina	Asimilación	transparencia	Turbidez
MAL	D-maltosa	Asimilación	transparencia	Turbidez
GNT	Gluconato potásico	Asimilación	transparencia	Turbidez
CAP	Ácido cáprico	Asimilación	transparencia	Turbidez

ADI	Ácido adípico	Asimilación	transparencia	Turbidez
MLT	Ácido málico	Asimilación	transparencia	Turbidez
CIT	Citrato trisódico	Asimilación	transparencia	Turbidez
PAC	Ácido fenilacético	Asimilación	transparencia	Turbidez
OX*	NNNN-tetrametil-1,4-fenilenediamina	Citocromo-oxidasa	Sin color	Violeta

Continuación Cuadro 3.

* La detección de la enzima citocromo oxidasa, se basa en la producción bacteriana de una enzima oxidasa intracelular. En presencia de oxígeno atmosférico y de citocromo C, ésta enzima oxida el reactivo fenilenediamina, para formar un compuesto coloreado violeta, el indofenol. El ácido ascórbico, incorporado en el reactivo, es un agente reductor que limita la auto-oxidación y mejora la estabilidad del reactivo. Permite la diferenciación de bacilos gramnegativos. (BioMérieux-ES-2003/10).

- *API® 50 CHB/E*

En este sistema, el microorganismo en estudio se suspende en el medio API 50CH rojo fenol, y después se inocula en cada uno de los tubos de la galería. Durante la incubación, el catabolismo de los glúcidos produce ácidos orgánicos que hacen cambiar el color del indicador de pH (rojo de fenol) . Los resultados obtenidos constituyen el perfil bioquímico de la cepa que permiten la identificación de la misma.

En cada tubo se investiga la acidificación producida, que se detecta por el cambio de color al amarillo del rojo de fenol contenido en el medio, en el ensayo de esculina (tubo no. 25) se observa un cambio de color del rojo al negro. (BioMérieux-ES-2003/10).

Cuadro 4. Ensayos de utilización de Carbohidratos en las galerías API 50 CHB/E.

Tubo	Ensayo	Componentes Activos	Tubo	Ensayo	Componentes Activos
0		TESTIGO	26	SAL	salicina
1	GLY	Glicerol	27	CEL	D-Celobiosa
2	ERY	Eritritol	28	MAL	D- Maltosa
3	DARA	D-Arabinosa	29	LAC	D- Lactosa
4	LARA	L-Arabinosa	30	MEL	D-Melibiosa
5	RIB	D-Ribosa	31	SAC	D- Sacarosa
6	DXYL	D-Xilosa	32	TRE	D-trehalosa
7	LXYL	L-Xilosa	33	INU	inulina
8	ADO	D-Adonitol	34	MLZ	D-melezitosa
9	MDX	metil-βDxilopiranosida	35	RAF	D-rafinosa

10	GAL	D-galactosa	36	AMD	almidón
11	GLU	D-glucosa	37	GLYG	glucógeno
12	FRU	D-fructosa	38	XLT	xilitol
13	MNE	D-Mamnosa	39	GEN	gentiobiosa
14	SBE	L- sorbosa	40	TUR	D-turanosa
15	RHA	L- rhamnosa	41	LYX	D-lixosa
16	DUL	dulcitol	42	TAG	D-tagatosa
17	INO	inositol	43	DFUC	D-fucosa
18	MAN	D-manitol	44	LFUC	L-fucosa
19	SOR	D-sorbitol	45	DARL	D-arabitol
20	MDM	metil- D-manopiranosida	46	LARL	L-arabitol
21	MDG	metil- D-glucopiranosida	47	GNT	gluconato potásico
22	NAG	N-acetilglucosamida	48	2KG	2- cetogluconato potásico
23	AMY	amigdalina	49	5KG	5- cetogluconato potásico
24	ARB	arbutina			
25	ESC	esculina (citrato férrico)			

Continuación Cuadro 4.

Para la identificación de *Azospirillum* algunos investigadores han empleado los sistemas API ®20 NE y API®50 CHB/E, mismos que se aplican para la identificación de bacterias gramnegativas. En estos se reporta que *Azospirillum*. metaboliza el gluconato y la esculina y es incapaz de hidrolizar la gelatina y la arginina, así como de producir indol y asimilar la maltosa (Penot et al.,1992). También se han establecido diferencias bioquímicas en cuanto a especie teniendo que *A. largimobile* y *A. lipoferum* no tienen la habilidad de usar N-acetilglucosamina y D-ribosa; *A.brasilense* utiliza como fuente de carbono D-manitol y D-sorbitol (Eckert et al.,2001).

Para la identificación y clasificación de los microorganismos, se hace uso de lo que se conoce como Taxonomía Numérica, en la que como su nombre lo indica, mediante métodos numéricos se hace el agrupamiento de las unidades taxonómicas con base a las características fenotípicas. De acuerdo con los resultados obtenidos (+, -) se utilizan coeficientes que miden las coincidencias y diferencias en los estados de caracteres entre dos cepas. Esta medición exige datos del tipo doble-estado; es decir presencia/ ausencia o como en el caso de resultados de pruebas bioquímicas (+, -). Se han propuesto innumerables coeficientes de asociación (coeficientes de similitud). Siendo el coeficiente de asociación Jaccard (CAJ) el más utilizado. A través de dichos coeficientes es posible la

obtención de una matriz de similitud para la cual se dispone de una gran variedad de técnicas de análisis de matrices de similitud cuyo objeto es sintetizar la información de la matriz de similitud a fin de permitir el reconocimiento de las relaciones entre la totalidad de las cepas; las dos técnicas más utilizadas son : el análisis de agrupamiento (“cluster analysis”) y el método de ordenación (“ordination”).

La estructura taxonómica obtenida de la matriz de similitud con las técnicas de análisis de agrupamiento puede representarse gráficamente de varias formas, pero la más utilizada es el fenograma.

El fenograma es un diagrama arborescente que muestra la relación en grado de similitud entre dos cepas o grupos de cepas. Los valores de similitud se expresan en una escala que suele encontrarse en su extremo superior.

Las cepas se colocan en el extremo derecho y dan origen cada una a un eje horizontal. Los ejes horizontales se unirán por ejes verticales que expresan, en relación con la escala, el valor de similitud existente entre las cepas o conjunto de cepas (Austin y Priest.,1992; Crisci y López ,1983).

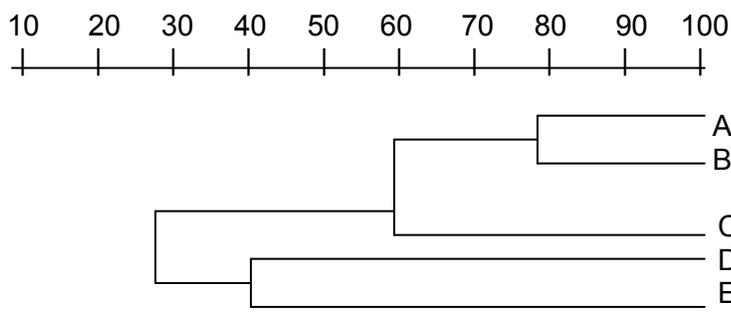


Figura 6. Fenograma de cinco cepas: A, B, C, D, E.

Mediante este procedimiento de Taxonomía Numérica es posible identificar el género y especie al cual pertenecen las cepas en estudio. De acuerdo a la manera que se agrupan se establecen las relaciones taxonómicas entre ellas basándonos en las características fenotípicas de las mismas.

En la actualidad se cuenta con programas computacionales que permiten obtener dichos fenogramas (dendogramas) tal es el caso de Bio Diversity Pro Ecological Analysis package disponible en línea en la página http://www.sams.ac.uk/activities/downloads/bd_pro/success.html

2.7 Caracterización genotípica

El tamaño global del genoma en las especies de *Azospirillum* varía de un mínimo de 4800-kb en *A. irakense* a prácticamente el doble, 9600-kb en *A. lipoferum*. En *A. brasilense* y *A. amazonense* el tamaño es alrededor de 7000-kb. En las otras especies de *Azospirillum* también se encontró que el genoma está constituido por varios cromosomas, lo que confirma la hipótesis sugerida sobre la multiplicidad de cromosomas en el género *Azospirillum*. Así, éste género se suma al reducido grupo de bacterias (*Agrobacterium tumefaciens*, *Brucella spp.*, *Burkholderia cepacia*, *Rhodobacter spheroides*, *Vibrio parahaemolyticus*) que presentan varios cromosomas en lugar de un solo cromosoma circular (Martín-Didonet et al., 2000).

Una de las primeras características genómicas reportadas para el género *Azospirillum* es la presencia de plásmidos. En general cada cepa muestra un perfil plasmídico único conformado por 1 a 6 plásmidos, con tamaños en el rango de 6- a 550-kb. Respecto a la función de estos, únicamente se conoce la del p90, involucrado en la biosíntesis de ácido indol acético y en la adherencia a las raíces (Givaudan y Bally, 1991).

Para la identificación genotípica y detección de *Azospirillum* se emplean:

-La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar los genes 16S rDNA mediante el uso de oligonucleótidos iniciadores adecuados como con el 27f (5'GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y 1495r (5'CTACGGCTACCTTGTACGA) y cortando los productos amplificados con enzimas de restricción *AluI*, *Csp61*, *HaeIII*, *Hin6I*, *MspI* y *MvaI* (Saleena et al., 2002). Con ésta estrategia se obtienen fragmentos de DNA de tamaños diferentes que constituyen perfiles específicos para cada especie de *Azospirillum*, y se distinguen fácilmente en geles de agarosa (Grifoni, et al., 1995).

-El uso de sondas basadas en secuencias específicas de los genes 23S rRNA. (Kirchhof y Hartmann., 1992). Con los oligonucleótidos reportados se ha logrado, mediante experimentos tipo "dot blot" y en forma reproducible, la identificación específica del género *Azospirillum*, así como, de las especies *A. lipoferum*, *A. brasilense*,

A. amazonense, *A. halopraeferens* y *A. irakense*, Estas sondas también pueden ser usadas para la detección *in situ* de las especies de *Azospirillum* (Caballero- Mellado., 2006).

-El uso de la biología molecular ha tenido una enorme repercusión en la taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias estableciendo relaciones filogenéticas entre los microorganismos. La identificación molecular basada en el 16S rDNA incluye tres etapas a) amplificación del gen a partir de la muestra apropiada mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); b) determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón haciendo uso de un secuenciador automatizado el cual genera un electroferograma que al someterlo a un análisis genera la secuencia de nucleótidos y c) análisis de la secuencia; esta es la última etapa en la cual se realiza una comparación de las secuencias obtenida con las que se encuentran depositadas en bases de datos públicos cuyo acceso es libre a través de internet, como GenBank NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information), entre otras. Finalmente, se podrá construir un árbol filogenético, que refleja, de forma esquemática , el grado de parentesco genético entre las bacterias comparadas (Rodicio y Mendoza, 2004).

2.8 Características y mecanismos de acción específicos en *Azospirillum*

Azospirillum spp. es una bacteria en forma de espirilo que se encuentra en el suelo, viviendo en forma libre y asociada a las raíces de una gran variedad de plantas. A través de múltiples estudios realizados en diferentes especies se han evidenciado las siguientes características:

- Amplia distribución
- Actividad quimiotáctica elevada
- Respuesta aerotáctica
- Capacidad para colonizar la rizósfera y la superficie e interior de las raíces de diversos vegetales.
- Fija nitrógeno atmosférico
- Produce fitohormonas
- Produce sideróforos
- Produce bacteriocinas

- Produce señales moleculares que activan diferentes funciones de las plantas.
- Carecen de efecto fitopatogénico.

Azospirillum es fuertemente atraído por diversos azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos y compuestos aromáticos exudados por las raíces y la respuesta quimiotáctica a los diferentes compuestos varía, dependiendo de la especie de *Azospirillum* e incluso es cepa-específica.

Respecto a la aerotaxia, se reporta que *A. brasilense* se multiplica preferentemente en las zonas de baja concentración en oxígeno y debido a que esta bacteria fija nitrógeno mediante la expresión de la actividad de la enzima nitrogenasa en condiciones de microaerofilia, se sugiere que la respuesta quimio y aerotáctica son características que contribuyen en el proceso de colonización y asociación con las raíces de las plantas. No obstante, la colonización de la rizósfera y la superficie o el interior de las raíces será el resultado del tipo de sustancias secretadas que determinarán el enriquecimiento selectivo de las diferentes especies o incluso cepas de *Azospirillum*.

Por otra parte, en la adaptación a éstos ambientes también son importantes otras características, tales como la capacidad para producir sideróforos (agentes quelantes del hierro) por algunas cepas de *A. brasilense* lo que representa una ventaja competitiva sobre las cepas de éstas especies o íntimamente relacionadas.

Así mismo, la capacidad de producir bacteriocinas por algunas cepas de *A. brasilense* y *A. lipoferum* juegan un papel importante durante la colonización del ambiente rizosférico y de la superficie de las raíces, debido al efecto antagónico que estos compuestos ejercen contra otros miembros de la comunidad microbiana, incluyendo a microorganismos fitopatógenos que sean sensibles a estas biomoléculas (Bashan y Carrilo, 1996; Caballero- Mellado., 2006)

Respecto a los mecanismos de acción con efecto directo sobre el desarrollo de la planta, los primeros estudios estuvieron enfocados a la fijación de nitrógeno y su asociación con gramíneas. Sin embargo, posteriormente se demostró que la contribución de nitrógeno fijado hacía la planta es mínimo y que fluctúa del 5 al 18 % de nitrógeno total (Bashan y Holguín, 1997).

Posteriormente se demostró que *Azospirillum* tiene la capacidad de producir *in vitro* auxinas, (tales como el ácido indol acético, ácido indol pirúvico, indol láctico, indol acetamida, indol acetaldehído, indol etanol e indol metanol, triptamina, antranilato y otros compuestos indólicos no identificados), así como citocininas y giberelinas y que la aplicación de hormonas sintéticas o purificadas a partir de cultivos bacterianos produce resultados similares a los obtenidos con la inoculación de *Azospirillum* sobre el desarrollo y morfología de las raíces (Jain y Patriquin, 1985; Fallik et al. 1989; Tien et al. 1979; Hernández, 1997).

De estos compuestos, el más ampliamente estudiado es el ácido indol acético (AIA) que induce la aparición temprana de pelos radicales, así como el incremento de la longitud de las raíces y además modifica el contenido de fitohormonas de las plantas conduciendo a la estimulación del crecimiento de las mismas. En este sentido, la literatura indica que la inoculación con *Azospirillum* da origen a un mayor desarrollo del sistema radical, lo que se traduce en una mayor superficie de absorción de nutrientes, lo que fue confirmado al registrar incrementos en el contenido de nitrógeno, fósforo, potasio y otros minerales, así como, con el mayor desarrollo de la parte aérea de las plantas (Okon y Kapulnik, 1986; Bashan y Holguín, 1997; Caballero- Mellado., 2006).

A pesar de que las características fisiológicas de *Azospirillum* están bien definidas, no se ha logrado especificar cual es el principal mecanismo de acción por el que ésta bacteria favorece el desarrollo de las plantas. Existe la tendencia generalizada de atribuir a las fitohormonas, especialmente al AIA, el efecto benéfico de la inoculación con *Azospirillum*, no obstante se descubrió que la bacteria es capaz de sintetizar biomoléculas que transmiten señales que atraviesan la pared celular de las plantas y al ser reconocidas por sus receptores inician una cadena de eventos que resultan en la alteración del metabolismo de las plantas. Así mismo se ha demostrado que los nitritos sintetizados por *Azospirillum* inducen el aumento en la formación de raíces laterales. Y se ha sugerido que el beneficio de la inoculación con *Azospirillum* es el resultado de los diversos mecanismos que efectúa la bacteria, los que actúan solos o simultáneamente a través del ciclo de vida de la planta, los que además son afectados por las condiciones ambientales (Bashan y Holguín., 1997).

Un aspecto importante es que no existen reportes que indiquen efectos patogénicos en las plantas causadas por la inoculación de *Azospirillum* (Caballero- Mellado., 2006).

2.9 Importancia agronómica

A pesar de la abundante información sobre experimentos de invernadero y campo, diseñados para documentar el efecto benéfico de la inoculación de *Azospirillum*; el análisis detallado de los resultados obtenidos en experimentos realizados en diferentes países indican que la respuesta a esta biotecnología es muy variable. En la India, solo el 25 % de los experimentos dio lugar a resultados positivos, en tanto que en EUA. fue de 50% (Bashan y Levanony, 1990), así mismo, en el análisis detallado realizado a nivel mundial en el período de 1974 a 1994 solo en el 65 % de los experimentos se obtuvo incremento en la producción (Okon y Labandera, 1994). Los incrementos de producción también varían ampliamente; en Cuba se reportan fluctuaciones del 17 al 50 % (Klibansky y González, 1996); en México en los estados de Veracruz y Tlaxcala del 13 al 32 % (Mazcarúa et al. 1997). En experimentos realizados en la Facultad de Química en colaboración con diferentes instituciones los resultados han sido similares obteniéndose incrementos de maíz de 15 a 53 %; de sorgo de 6 a 80% (Valtierra, 1992) y de jitomate del 50 al 60% (Urzúa 2001).

Aun cuando el uso de *Azospirillum* como biofertilizante no se ha generalizado mundialmente, es importante mencionar que en México la aplicación de ésta bacteria en diferentes cultivos ha rebasado con mucho lo hecho en otros países. En el ciclo agrícola primavera-verano (PV) del año 1999 la Secretaría de Agricultura, a través de su Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y de la Fundación Mexicana para la Investigación Agropecuaria y Forestal, A. C. en colaboración con el Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno-UNAM, llevó a cabo la inoculación de alrededor de 450,000 hectáreas de maíz y 150,000 hectáreas de sorgo, cebada y trigo, empleando cepas de *Azospirillum* seleccionadas. El incremento promedio en la producción de los cultivos de maíz, trigo, cebada y sorgo bajo las diferentes condiciones evaluadas fue del 26%. Los resultados fueron dependientes de la variedad y cultivo, tipo de suelo, uso y nivel de fertilizantes. La mejor respuesta a la inoculación se presentó en suelos de tipo ligero (arenosos), con niveles intermedios de fertilización en el rango de 45-90 Kg N/ha, y con las variedades “criollas” de maíz. Considerando la cantidad de variedades,

cultivos, suelos y condiciones climáticas evaluadas, los resultados de la inoculación con *Azospirillum* reflejan claramente la capacidad de la bacteria para promover el desarrollo de las plantas y el impacto positivo sobre el rendimiento de los cultivos de grano. El programa de “Biofertilización” se continuó durante el ciclo PV-2000, inoculándose alrededor de un millón y medio de hectáreas (Caballero-Mellado, 2006).

Es importante señalar que la obtención de incrementos hasta del 20 % en el rendimiento se considera comercialmente valiosa para la agricultura moderna, siempre y cuando estos resultados sean consistentes (Bashan et al. 1996).

2.10 Conclusiones de la importancia de *Azospirillum*

Aún en la actualidad hacen falta muchos estudios de investigación básica, tanto sobre la bacteria como en su interacción con la planta, para un mejor entendimiento de la asociación *Azospirillum*- planta. Los resultados en cuanto al incremento en la producción indican que la manipulación y aplicación de esta bacteria en escala comercial ofrece una alternativa para disminuir el uso de fertilizantes químicos, así como la contaminación que estos causan. Por otra parte, considerando que *Azospirillum* es una de las PGPR que posee la capacidad de efectuar numerosos mecanismos mediante los que promueve el desarrollo vegetal, excepto el de sintetizar ACC-deaminasa y de que en este proceso se observó al menos en dos de las cepas que integran la colección de la Facultad de Química se planteó el presente trabajo.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cepas de *Azospirillum*

Se emplearon 22 cepas, 5 de referencia que se encuentran liofilizadas y 17 aisladas en trabajos previos a partir de la rizósfera de diferentes vegetales, las que fueron conservadas en el medio de cultivo Malato-sales libre de nitrógeno.

Cuadro 5. Clave y procedencia de las cepas de *Azospirillum*

Clave	Procedencia
LMG 6509	Lab. de Microbiología de la Univ. Gent de Bélgica. Obtenida de <i>Digitaria decumbens</i> de Río de Janeiro Brasil
LMG 7108	Lab. de Microbiología de la Univ. Gent de Bélgica. Obtenida de <i>Leptochloa fusca</i> en suelos salinos de Pakistán.
LMG 10653	Lab. de Microbiología de la Univ. Gent de Bélgica. Obtenida de raíces de <i>Oryza sativa</i> de Irak.
LMG 13127	Lab. de Microbiología de la Univ. Gent de Bélgica. Obtenida de <i>Digitaria decumbens</i> de Río de Janeiro Brasil
LMG 13128	Lab. de Microbiología de la Univ. Gent de Bélgica. Obtenida de <i>Triticum spp</i> de Río de Janeiro Brasil.
Sp7	ATCC 29710. Donada por la Dra. J. Döbereiner
Cd	ATCC 29145. Donada por el Dr. Y. Okon
AMs1	Raíces de <i>Medicago sativa</i> * LME
AMs2	Raíces de <i>Medicago sativa</i> * LME
AMs3	Raíces de <i>Medicago sativa</i> * LME
AZm1	Raíces de <i>Zea mays</i> * LME
AZm2	Raíces de <i>Zea mays</i> * LME
AZm3	Raíces de <i>Zea mays</i> LME
AZm4	Raíces de <i>Zea mays</i> LME
AZm5	Raíces de <i>Zea mays</i> * LME
APV1	Raíces de <i>Phaseolus vulgaris</i> L LME
C4	Suelo de cultivo de <i>Sorghum vulgare</i>) LME
CPM-167	Donada por el Dr. R. Ferrera-Cerrato. Colegio de Postgraduados.
POX	Raíces de pasto pangola LME
VS1	Rizósfera de <i>Sorghum versicolor</i> ** V. de Santiago, Gto LME
VS7	Rizósfera de <i>Sorghum versicolor</i> ** V, de Santiago, Gto LME
VS9	Rizósfera de <i>Sorghum versicolor</i> ** V. de Santiago, Gto LME

* Esquivel Cote, R. 2002

** Flores Ayala, A. A. 1985.

LME Aisladas en el Lab. de Microbiología Experimental, Depto. Biología, Fac. de Química, UNAM.

1.1 Activación y verificación de pureza

1.1.1 Cepas liofilizadas.

Las ampolletas se limaron por un extremo, cuidando que no se rompieran y se desinfectaron, sumergiéndolas 10 minutos en una solución de hipoclorito de sodio (5% v/v). Después se abrieron las ampolletas sobre una torunda estéril y se hidrataron por 1 o 2 minutos con unas gotas de Caldo Nutritivo Oxoid.

La suspensión obtenida se colocó en un matraz con Caldo Nutritivo Oxoid y se incubó con agitación (150 rpm) a 34° C, durante 72 hrs. A partir de este cultivo, se colocó una gota sobre una caja Petrí con Gelosa Nutritiva Oxoid y se estrió para separar colonias, se incubó a 35° C durante 3-7 días; después de los cuales se verificó la pureza mediante la observación de características macro y microscópicas. En el caso de las cepas de referencia la incubación se hizo a 30° C, que fue la recomendada por el proveedor como temperatura óptima de desarrollo.

1.1.2 Cepas conservadas en Malato-sales libre de nitrógeno semisólido (Nfb).

Se tomó una asada del cultivo y se estrió sobre una caja Petrí con Gelosa Nutritiva Oxoid y se incubó a 35° C durante 3-7 días.

1.1.3. Verificación de pureza. Se realizó mediante la observación de características microscópicas y macroscópicas o coloniales.

a) Preparaciones en fresco.

En éstas se investigó la presencia de bacilos con desplazamientos rápidos, con movimientos en espiral sobre su propio eje y la presencia de gránulos refringentes.

b) Preparaciones fijas con tinción de gram.

En ellas se investigó la presencia de bacilos ligeramente curvos, gramnegativos, con extremos celulares redondeados y/o la presencia de cístos (células refringentes con forma ovoide y de paredes gruesas similares a quistes).

c) En placas de Gelosa Nutritiva Oxoid o Gelosa Nutritiva.

Se observó el desarrollo de un solo tipo de colonias, las que dependiendo de la especie pueden ser:

- Blancas de forma circular, borde entero de aspecto cremoso y elevación convexa con un diámetro aproximado de 2-5 mm; o

- Colonias de color salmón, con forma circular, borde irregular, de aspecto seco y elevación plana formada por círculos concéntricos con un diámetro aproximado de 3-6 mm.

1.1.4. Conservación de las cepas y comprobación de la fijación de nitrógeno

Una vez confirmada la pureza de las cepas, se seleccionó una colonia aislada, se tomó una asada y se suspendió en Caldo nutritivo; a partir de esta suspensión se inocularon por asada 3 tubos con Gelosa Nutritiva Oxoid inclinado y 3 tubos con medio de cultivo Nfb y se incubaron durante 3 días a 35° C o a 30° C.

- Los tubos en gelosa se conservaron en refrigeración.
- Los tubos con Nfb semisólido carente de nitrógeno se utilizaron para comprobar la fijación de nitrógeno que es una de las características distintivas más importantes de *Azospirillum*, la cual se pone de manifiesto en condiciones de microaerofilia por la formación de una película de desarrollo a 2 o 3 mm por debajo de la superficie del medio y la alcalinización del mismo.

2. Determinación de la actividad de la enzima ACC-deaminasa

Se empleó el método de Honma y Shimomura (1978), el que se basa en la medición de α -cetobutirato producido cuando la enzima actúa sobre el ACC. La cantidad de moles producidos por esta reacción se determina comparando la absorbancia a 540 nm de una muestra, con una curva estándar de α -cetobutirato. En este caso se obtuvo la absorbancia Control (absorbancia del extracto bacteriano en ausencia de ACC) y la absorbancia ACC (absorbancia del extracto bacteriano en presencia de ACC). La diferencia entre estas dos absorbancias corresponde a la absorbancia real, es decir, la cantidad de α -cetobutirato producido por cada una de las cepas en estudio.

El número de moles de α -cetobutirato obtenido se relaciona con la cantidad de proteína de la suspensión celular, la cual se determina mediante el método de Bradford (1979), el cual se basa en la reacción entre el azul de Coomassie (colorante presente en el reactivo de Bradford) y los residuos de His, Lys, Tyr, Trp, Phe y se procede a comparar la absorbancia a 595 nm de las muestras con la curva estándar de proteína.

Con base en lo anterior se determina la actividad enzimática de la ACC deaminasa con respecto a la cantidad de proteína.

Debido a que la actividad enzimática se reporta por hora y diferentes autores utilizan tiempos de exposición con el sustrato de 15 o 30 min., con el fin de establecer el tiempo de exposición más conveniente se realizó una curva de actividad enzimática relacionándola con diferentes tiempos (ver anexo D), en la cual se observó que la tendencia es lineal. Por lo anterior, se eligió para este trabajo un tiempo de exposición de 30 min.

La determinación de la actividad de la ACC deaminasa se realizó por cuadruplicado, y se calculo la desviación estándar entre los resultados esperando que la variación sea menor al 1%.

2.1 Curva estándar de α -cetobutirato

Diferentes cantidades de α -cetobutirato se hicieron reaccionar con una solución del reactivo 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNP) con el que se formó un derivado de la hidrazona del α -cetobutirato, al cual se adicionó NaOH para el desarrollo del color y este se midió espectrofotométricamente a 540 nm (Ver tabla 1 del anexo C).

2.2 Curva estándar de proteína

Se preparó una solución stock de Albúmina Sérica Bovina (BSA 1mg/mL). A partir de esta se tomaron diferentes alícuotas a las que se les agregó el reactivo Bradford en las cantidades descritas en la tabla 2 del anexo C y se determinaron las absorbancias a 595 nm.

2.3 Determinación de la actividad de la ACC deaminasa en diferentes cepas de *Azospirillum*.

2.3.1 Activación.

A partir de los cultivos conservados en gelosa se tomó una asada, se inocularon en tubos con el medio de cultivo Nfb-semisólido, e incubaron por 3-5 días a 34 ° C.

2.3.2 Adaptación y propagación.

Una vez que se verificaron las características típicas de desarrollo de *Azospirillum* en el medio Nfb-semisólido (desarrollo superficial después de la formación de una película blanca en zona microaerofílica, con alcalinización de medio):

- a) A partir de los cultivos anteriores se inocularon por asada matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad con 100mL de Caldo nutritivo, y se incubaron a 35° C y en agitación (150 rpm) durante 48 horas;
- b) Con 1 mL de estos cultivos se inocularon otros matraces Erlenmeyer que contienen el mismo medio de cultivo y se incubaron durante 18 horas en las condiciones indicadas.

2.3.3 Inducción de la síntesis de la enzima ACC deaminasa

- a) Este ultimo cultivo se centrifugó tres veces durante 15 minutos a 3000 rpm. En cada ocasión se lavó con solución salina isotónica estéril (SSIE).
- b) El paquete celular se resuspendió en un matraz Erlenmeyer (125 mL) con 50 mL de medio de cultivo Malato Sales al que se adicionó como fuente de nitrógeno 0.3 mL de ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico (500 mM), con lo que se obtiene una concentración de 3.0 mM de ACC en el medio de cultivo, y se incubó 18-20 h, a 150 rpm, a 34° C.

2.3.4 Determinación de la ACC deaminasa en los extractos bacterianos.

- a) El cultivo bacteriano con ACC se lavó por centrifugación (15 minutos, 3000 rpm) tres veces con 10 mL de TRIS-HCl 0.1 M (pH 7.5) estéril.
- b) El paquete celular del último lavado se resuspendió en 5 ml de TRIS- HCl 0.1 M (pH 8.5) estéril.
- c) En 6 tubos Eppendorf estériles se colocaron en cada uno 1000 µL del paquete celular resuspendido. Esto se realizó para cada cepa.
- d) En cada tubo, con otra micropipeta estéril se agregaron 50 µL de tolueno (para tener una concentración del 5%) y se agitaron en Vórtex, por 30 segundos.
- e) Dos de estos tubos se guardaron para la determinación de proteína total.
- f) De cada uno de los otros 4 tubos se tomaron 100µL de la suspensión de células tratadas con tolueno y se pasaron a otros 4 tubos Eppendorf limpios.
- g) A dos tubos se le agregaron 10µL de ACC 500 mM (tratamiento inoculado)

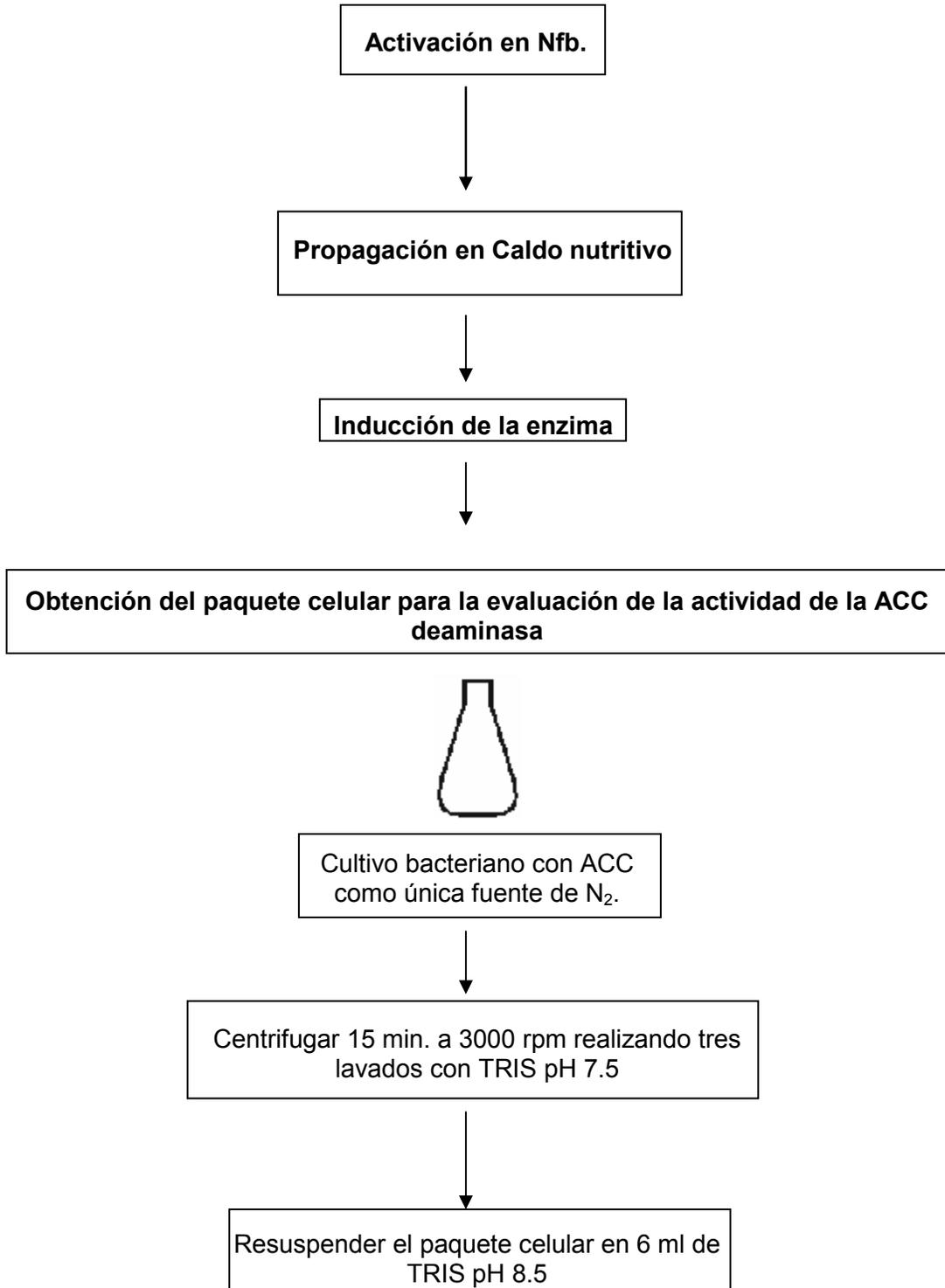
- h) A los otros dos se le agregaron 10 μL de TRIS 0.1M a pH 8.5 estéril (tratamiento control).
- i) Los tratamientos “blanco” se prepararon por duplicado, desde el inciso c, empleando TRIS-HCL 0.1 M pH 8.5, en lugar de cultivo bacteriano. A estos también se les aplicó el mismo procedimiento de tolueno, y con y sin ACC.
- j) Los tubos Eppendorf (tratamientos inoculados, controles y blancos) se agitaron en Vórtex y se incubaron 30 min., a 34° C.
- k) Transcurrido el tiempo de incubación, se adicionó a cada tubo 1000 μL de HCl 0.56N y se centrifugaron a 14000 rpm por 5 min.
- l) Se tomaron 1000 μL del sobrenadante de cada tubo, se adicionaron 800 μL de HCl 0.56N y 300 μL de DNP.
- m) Se agitaron en Vórtex y se incubaron, nuevamente, por 30 min. a 34° C.
- n) A cada tubo se le agregaron 2 mL de NaOH 2N, para detener la reacción.
- o) La absorbancia se midió en Espectrofotómetro Pharmacia Biotech Ultrospec 3000 a 540 nm; en los blancos respectivos, así como en los tratamientos inoculados (con ACC) y los tratamientos control (sin ACC).
- p) Los valores de la absorbancia obtenidos en los tratamientos control fueron restados a los valores de las absorbancias obtenidos en los tratamientos inoculados.

2.3.5 Determinación de proteínas en los extractos bacterianos.

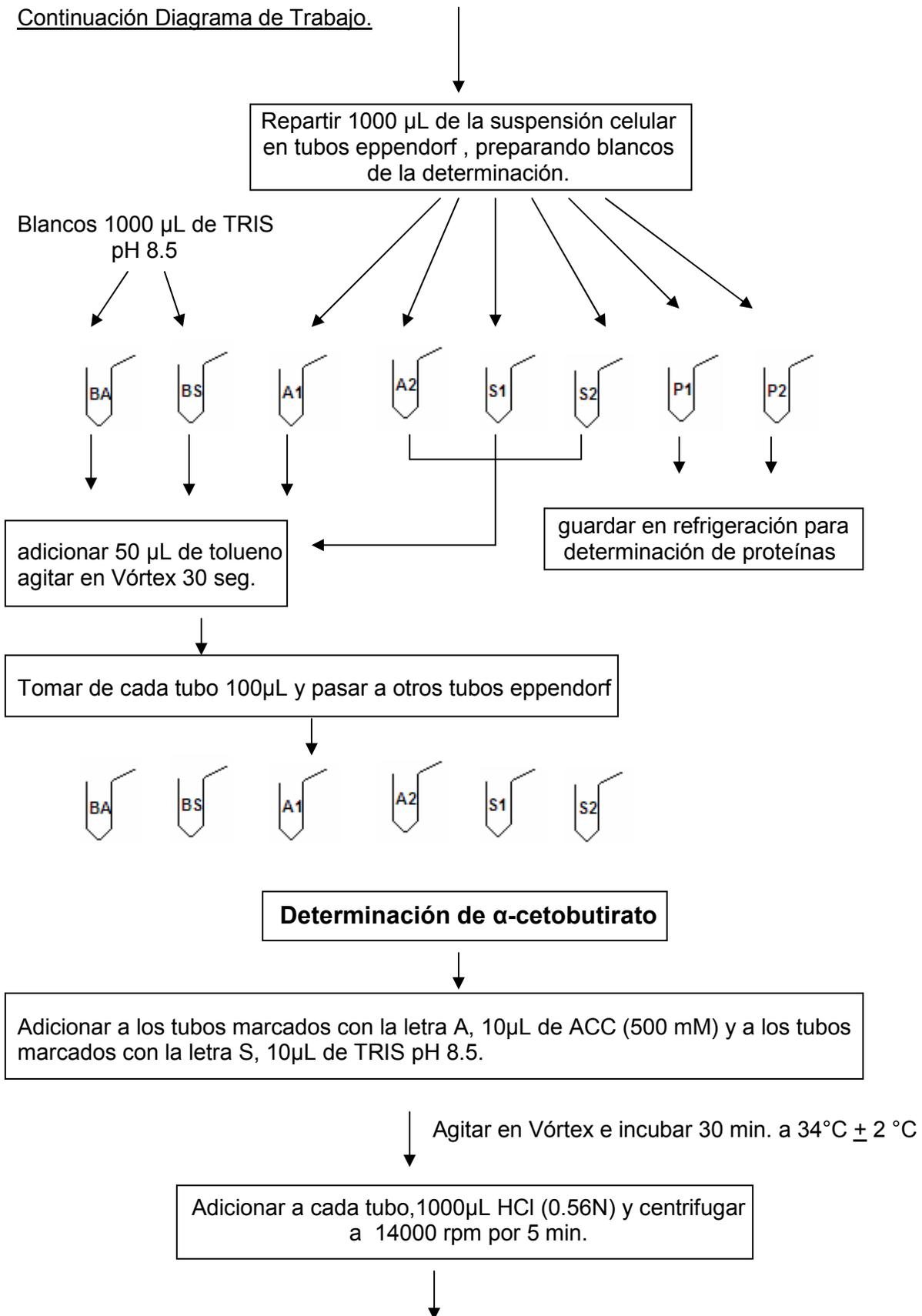
Se realizó a partir de los 2 tubos con cultivo bacteriano más tolueno (inciso e).

- a) Se tomaron 100 μL y se colocaron en otro tubo Eppendorf con perforaciones en la parte superior (lo que permite el intercambio gaseoso) y se agregó 100 μL de NaOH (0.1N), se agitó e incubó (10 min., 100°C o ebullición).
- b) Los tubos se dejaron enfriar y se centrifugaron a 14000 rpm durante 1 minuto; en ultra centrifuga.
- c) El sobrenadante se colocó en tubos de 16 x 150 y se completó a un volumen de 1000 μL con agua destilada.
- d) Se agregaron 1000 μL de reactivo de Bradford (SIGMA-ALDRICH^{MR}) y se dejaron reaccionar por 45 min. a temperatura ambiente.
- e) Se midió la absorbancia a 595 nm.

2.4 Diagrama de Trabajo.



Continuación Diagrama de Trabajo.



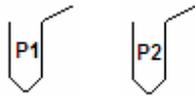
Continuación Diagrama de Trabajo.

A 1000 μ L del sobrenadante agregar 800 μ L de HCl (0.56N) y 300 μ L de DNP

Agitar en Vórtex e incubar 30 min. A $34^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

Adicionar 2 mL de NaOH (2N) y realizar una lectura de Absorbancia a 540 nm.

Determinación de Proteínas



Adicionar 50 μ L de Tolueno y agitar en Vórtex 30 seg.

Pasar 100 μ L de cultivo toluenizado a otro tubo eppendorf Perforado para permitir aeración

Adicionar a cada uno 100 μ L de NaOH (0.1N)

Incubar a ebullición 10 min.
Dejar enfriar y centrifugar a 14000 rpm por 1 min.

Completar el sobrenadante a 1000 μ L con agua destilada, adicionar 1000 μ L de Reactivo de Bradford

Dejar en reposo 45 min. y transcurrido este tiempo Realizar lecturas de absorbancia a 595 nm

3. Identificación de cepas

Para la identificación de la especie de las cepas aisladas se utilizaron dos metodologías y se emplearon como cepas de referencia a *Azospirillum amazonense* LMG 6509, *Azospirillum halopraeferens* LMG 7108, *Azospirillum irakense* LMG10653, *Azospirillum brasilense* LMG 13127, Cd, Sp7, *Azospirillum lipoferum* LMG 13128 .

3.1 Bioquímica mediante los Sistemas API®20 NE y API®50CH.

La técnica empleada corresponde a la indicada por el fabricante del producto (Biomerieux)

- *API®20 NE*

Esta galería incluye 20 micro tubos que contienen sustratos deshidratados, los que se reconstituyen al ser inoculados con la suspensión bacteriana salina. En algunos casos las reacciones que se producen durante la incubación se traducen en cambios de color, en otros es necesario adicionar reactivos que revelen la reacción. En los ensayos de asimilación las bacterias en estudio debe estar suspendidas en un medio mínimo, de manera que al ser inoculadas solamente crecerán aquéllas que son capaces de utilizar el correspondiente sustrato.

- *API®50 CHB/E*

Con la suspensión de la bacteria en estudio se inocula cada tubo de la galería. Durante la incubación, el catabolismo de los glucósidos produce ácidos orgánicos que hacen cambiar el color del indicador del pH. Los resultados obtenidos constituyen el perfil bioquímico de la cepa y permite la identificación de la misma.

Es importante mencionar que aunque *Azospirillum* Sp7 y Cd se han considerado como cepas de referencia de *Azospirillum brasilense*, en este caso se agruparon con las cepas aisladas para verificar su identificación y tener un control interno.

Una vez que se verificaron las características específicas de género *Azospirillum* en nuestras cepas de referencia, se seleccionaron 44 pruebas para la identificación mediante taxonomía numérica, basándonos en lo reportado por Penot et. al,1992, Eckert et .al,2001 y Sly et al,1999. Los cuales han hecho uso de estos sistemas de identificación para el género *Azospirillum*. Estas pruebas son las siguientes :

Cuadro 6. Pruebas Bioquímicas para *Azospirillum* utilizadas en los artículos y seleccionadas para la identificación mediante taxonomía numérica.

Sistemas Bioquímico	Prueba
API 20NE	Desasimilación de NO ₃ ⁻ a NO ₂ ⁻
API 20NE	Fermentación de D-Glucosa
API 20NE	Ureasa
API 20NE	Hidrólisis de la Esculina
API 20NE	Hidrólisis de la Gelatina
API 20NE	Asimilación de D-Glucosa
API 20NE	Asimilación de D-manitol
API 20NE	Asimilación de N-acetil-glucosamina
API 50CH	Fermentación Glicerol
API 50CH	Fermentación de D-arabinosa
API 50CH	Fermentación de L-arabinosa
API 50CH	Fermentación de D-ribosa
API 50CH	Fermentación de D-xilosa
API 50CH	Fermentación de L-xilosa
API 50CH	Fermentación de Metil-β D-xilopiranosida
API 50CH	Fermentación de D-galactosa
API 50CH	Fermentación de D-glucosa
API 50CH	Fermentación de D-fructosa
API 50CH	Fermentación de D-manosa
API 50CH	Fermentación de L-sorbosa
API 50CH	Fermentación de L-rhamnosa
API 50CH	Fermentación de Inositol
API 50CH	Fermentación de D-manitol
API 50CH	Fermentación de D-sorbitol
API 50CH	Fermentación de N-acetilglucosamina
API 50CH	Fermentación de Arbutina
API 50CH	Hidrólisis de la Esculina
API 50CH	Fermentación de Salicina
API 50CH	Fermentación de D-celobiosa
API 50CH	Fermentación de D-maltosa
API 50CH	Fermentación de D-lactosa
API 50CH	Fermentación de D-sacarosa
API 50CH	Fermentación de D-trehalosa
API 50CH	Fermentación de Gentiobiosa
API 50CH	Fermentación de D-lixosa

Sistemas Bioquímico	Prueba
API 50CH	Fermentación de D-fucosa
API 50CH	Fermentación de L-fucosa
API 50CH	Fermentación de Gluconato potásico
API 50CH	5-cetogluconato potásico
Fuente de carbono en NFb	Glucosa
Fuente de carbono en NFb	Sacarosa
Fuente de carbono en NFb	α -cetoglutarato
Fuente de carbono en NFb	Citrato de sodio
Tubo Nfb con	NaCl 3%

Continuación Cuadro 6.

Los resultados de las pruebas bioquímicas se sometieron a un análisis electrónico a través del programa Bio Diversity Pro Ecological Analysis package disponible en línea http://www.sams.ac.uk/activities/downloads/bd_pro/success.html, con el cual es posible realizar los cálculos del coeficiente de similitud por el método de Jaccard obteniendo un dendograma en el que agrupan las cepas en estudio.

3.2 Genotípica (PCR del gen 16S rDNA)

La identificación genotípica de las cepas aisladas de *Azospirillum*, se logra amplificando los genes 16S rDNA mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El PCR se realizó en todas las cepas (referencia y aisladas) a fin de establecer las condiciones óptimas en las que los “primers” utilizados funcionaron eficientemente, y se detectó el producto PCR obtenido de cada una de las cepas realizando una electroforesis en un gel de agarosa. Utilizando como control positivo una cepa de *Escherichia coli* ya que para el diseño de los “primers” utilizados se tomó como base del genoma de dicha cepa.

Con esta estrategia se obtiene la cantidad suficiente de DNA para ser secuenciado, y así elaborar un árbol filogenético para conocer las relaciones filogenéticas entre las cepas. Se sometieron a este análisis solo las cepas aisladas.

La amplificación del 16S rDNA se realizó, extrayendo el DNA de cada una de las cepas, cultivadas en gelosa nutritiva. La extracción del DNA se realizó utilizando el KIT DNAeasy (QIAGEN) y para la purificación de éste se utilizaron las columnas Microconym 100 (Millipore).

La mezcla de reacción de PCR para ser amplificada contenía: 20.7µL de H₂O estéril, 3 µL de Buffer 10x (Promega), 5 µL de dNTPs 200µM , 1 µL de cada primer a una concentración 10 pM, 27f (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y 1495r (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA) sintetizados por AccesoLab S.A de C.V., 1 µL de DNA de la cepa correspondiente y 0.17 µL de Taq Polimerasa (Promega). El PCR se llevó a cabo en un Termociclador Applied Biosystems Mod.9700 bajo las siguientes condiciones: Fase inicial a 94°C/ 5 min., Amplificación: 30 ciclos de 94°C/1 min.(desnaturalización), 55°C/1 min.(alineamiento), 72°C/1 min.(extensión). Fase final a 72°C/7 min. La detección del producto PCR se llevó a cabo realizando una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%(invitrogen) en buffer TBE con bromuro de etidio. Utilizando un marcador de peso molecular LowMass (invitrogen) y empleando el software Kodak 1 D 3.5 fue posible determinar el peso molecular (PM) del producto de PCR obtenido.

De los productos PCR obtenidos se seleccionaron solo los de las cepas aisladas para proceder a su secuenciación. Se realizó una electroforesis cargando 4µL de la muestra y 2 µL del Marcador de peso molecular LowMass(invitrogen). Haciendo uso del programa Kodak 1 D 3.5 fue posible determinar el peso molecular (PM) del material genético obtenido.

Los productos de PCR obtenidos se secuenciaron con los primers 27f y 1495r en un secuenciador automatizado de DNA Applied Biosystems, Modelo 310 en el Instituto de Fisiología Celular. Unidad de Biología Molecular UNAM. Debido a que la secuencia obtenida puede contener errores y/o presentar posiciones ambiguas (indicadas por N) se hace una análisis del electroferograma y la alineación de la cadena directa con la reversa, para resolver las posibles discrepancias.

La última etapa fue la comparación de las secuencias completas obtenidas del 16s rDNA de las cepas aisladas con las depositadas en bases de datos de cepas de referencia. En este caso se obtuvieron las secuencias en una base de datos pública de acceso libre a través de internet GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information) <http://www.ncbi.nlm.gov/Genbank/index.html> . La comparación y el alineamiento de las secuencias se realizó electrónicamente usando los programas EDITSEQ, y MEGALING [ClustalW] (DNASTAR, Madison, Wis). Cuya comparación finalmente generó un árbol filogenético, que refleja, de forma esquemática, el grado de parentesco genético entre las bacterias comparadas.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Verificación de pureza.

1.1 Características Microscópicas y coloniales en placas de Gelosa nutritiva o en el medio de Caldo Nutritivo Oxoid (Gnox)

Con excepción de la cepa CPM-167, en todas las demás se observaron las características típicas de *Azospirillum* que corresponden a la forma vibroide, con movilidad en espiral y gramnegativas. La mayoría presentó abundantes gránulos refringentes de poli- β -hidroxibutirato (PHB) y células pleomórficas; en algunos casos se observaron cistos que son células refringentes con forma ovoide y de paredes gruesas similares a quistes. Respecto a la morfología colonial se observaron algunas diferencias entre las cepas estudiadas, mismas que se describen en el cuadro 7. No obstante, estas también coinciden con las características reportadas en la literatura (Döbereiner y Day, 1975; Holt et al. 1994).

1.2 Comparación de la fijación de nitrógeno

Todas las cepas se desarrollaron en el medio succinato sales libre de nitrógeno semisólido, lo que permitió confirmar que poseen la capacidad para fijar nitrógeno. Por otra parte en todos los casos después de 24 a 48 h de incubación se observó la formación de una película blanca 2 ó 3 mm debajo de la superficie del medio de cultivo, en la mayoría de los casos se presentó en forma de sombrilla, misma que ascendió a la superficie a medida que se aumentó el tiempo de incubación. Asimismo se registró la alcalinización del medio de cultivo a través del vire del indicador (azul de bromotimol) de verde a azul; características que coinciden con las descritas por diversos autores (Döbereiner y Day, 1975; Fallik y Okon, 1996; Albrecht y Okon 1980).

Cuadro 7. Características primarias de las cepas de *Azospirillum* en estudio

Clave de las Cepas	Características Microscópicas	Características coloniales en *Gelosa Nutritiva o ** Gnox, después de 7 días de incubación a 35° C
LMG 6509	Movilidad escasa en espiral. Con gránulos refringentes.	* Dos tipos de colonias estables. 1) Amarillentas indefinidas con un diámetro inferior a 1 mm. 2) Translucidas no definidas de 1 mm de diámetro.
LMG7108	Pleoformismo Movilidad en espiral. Con gránulos refringentes	* Color ligeramente amarillo, opacas, forma circular, borde entero, de aspecto húmedo cremoso y elevación convexa. Diámetro : 1-3 mm.
LMG10653	Pleoformismo Movilidad en espiral. Con gránulos refringentes	* Color ligeramente amarillo, opacas, forma circular, borde entero, de aspecto húmedo cremoso y elevación convexa. Diámetro : 3-5 mm.
LMG13127	Movilidad escasa Presencia de cistos	* Color salmón, con forma circular, borde irregular, con círculos concéntricos, de aspecto seco y elevación plana. Diámetro : 2-5 mm.
LMG13128	Bacilos con forma vibroide muy largos, Pleoformismo Movilidad en espiral. Con gránulos refringentes	** Color ligeramente amarillo, con forma circular, borde irregular, de aspecto húmedo cremoso y elevación plana. Diámetro : 1 mm.
Sp7	Pleoformismo Movilidad en espiral. Con gránulos refringentes	* Color ligeramente salmón, con forma circular, borde irregular, de aspecto seco y elevación plana formada por círculo concéntricos. Diámetro: 4-7 mm.
Cd	Bacilos con forma vibroide muy pequeños Pleoformismo Movilidad en espiral. Con gránulos refringentes	** Color ligeramente salmón, con forma circular, borde entero y elevación convexa. Diámetro : menor a 1 mm.
AMs1	Movilidad escasa. Presencia de cistos	* Color ligeramente amarillo, con forma circular, borde entero, de aspecto húmedo cremoso y elevación convexa. Diámetro : 2-5 mm.
AMs2	Bacilos con forma vibroide muy pequeños. Pleoformismo Movilidad en espiral. Con gránulos refringentes	** Color salmón, con forma circular, borde irregular, de aspecto seco y elevación plana formada por círculos concéntricos. Diámetro : 4-7 mm.

Continuación Cuadro 7.		
Clave de las Cepas	Características Microscópicas	Características coloniales en *Gelosa Nutritiva o ** Gnox, después de 7 días de incubación a 35° C
AMs3	Pleiformismo Movilidad en espiral. Con gránulos refringentes	* Color salmón, con forma circular, borde irregular, de aspecto seco y elevación plana formada por círculos concéntricos. Diámetro : 3-6 mm.
AZm1	Movilidad escasa. Presencia de cistos	* Color salmón, con forma circular, borde irregular, de aspecto seco y elevación plana formada por círculos concéntricos. Diámetro : 3-8 mm.
AZm2	Pleiformismo Movilidad en espiral. Con gránulos refringentes	* Color amarillo, con forma circular, borde irregular, de aspecto seco y elevación plana formada por círculos concéntricos. Diámetro : 4-6 mm.
AZm3	Pleiformismo Movilidad en espiral. Con gránulos refringentes	** Color salmón, con forma circular, borde irregular, de aspecto seco y elevación plana formada por círculos concéntricos. Diámetro : 7-8 mm.
AZm4	Movilidad escasa. Presencia de cistos	* Color amarillo, con forma circular, borde irregular, de aspecto seco y elevación plana formada por círculos concéntricos. Diámetro : 3-5 mm.
AZm5	Pleiformismo Movilidad en espiral. Con gránulos refringentes	* Color ligeramente amarillo, con forma circular, borde entero, de aspecto húmedo cremoso y elevación convexa. Diámetro : 3-5 mm.
APV1	Pleiformismo Movilidad en espiral. Con gránulos refringentes	** Color ligeramente salmón, con forma circular, borde irregular, y elevación plana. Diámetro : 2-5 mm.
C4	Pleiformismo Movilidad en espiral. Con gránulos refringentes	** Color salmón, con forma circular, borde irregular, de aspecto seco y elevación plana formada por círculos concéntricos. Diámetro : 2-5 mm.
CPM-167	Bacilos pequeños, delgados y rectos Movimiento ligero no característico de <i>Azospirillum</i>	* Color ligeramente amarillo, con forma circular, borde entero, de aspecto húmedo cremoso y elevación convexa. Diámetro : 2-3 mm.
POX	Pleiformismo Movilidad en espiral. Con gránulos refringentes	** Color salmón, con forma circular, borde irregular, de aspecto seco y elevación plana formada por círculos concéntricos. Diámetro : 3-9 mm.
VS1	Pleiformismo Movilidad en espiral escasa. Con gránulos refringentes	* Color ligeramente salmón, con forma circular, borde entero, de aspecto seco cremoso y elevación convexa. Diámetro : 3-5 mm.

Continuación Cuadro 7.		
Clave de las Cepas	Características Microscópicas	Características coloniales en *Gelosa Nutritiva o ** Gnox, después de 7 días de incubación a 35° C
VS7	Pleiformismo Movilidad en espiral. Con gránulos refringentes	** Color amarillo, con forma circular, borde irregular, de aspecto seco y elevación plana formada por círculos concéntricos. Diámetro : 2-4 mm.
VS9	Pleiformismo Movilidad en espiral. Con gránulos refringentes	* Color salmón, con forma circular, borde irregular, de aspecto seco y elevación plana formada por círculos concéntricos. Diámetro : 5-10 mm.

* En Medio Gelosa Nutritiva

**En Medio Gelosa Nutritiva Oxoid

2. Determinación de la ACC deaminasa en diferentes cepas de *Azospirillum*

Las curvas estándar de α -cetobutirato y de proteínas, así como, de actividad de la ACC deaminasa a diferentes tiempos de reacción y las lecturas de absorbancia del α -cetobutirato y de proteínas se encuentran en los anexos C, D y E.

En el cuadro 8 se observa que de las 22 cepas en estudio, quince no presentan la actividad de la enzima ACC deaminasa; de estas, siete corresponden a las cepas de referencia y ocho a cepas aisladas, en tanto que las otras siete cepas aisladas expresan esta actividad enzimática en un intervalo de 1.21 ± 0.25 a 3.31 ± 0.21 μmol de α -cetobutirato/mg de proteína /hora, destacando la cepa AZm3 como la mayor productora. Estos resultados contrastan con lo reportado por otros autores, quienes indican que las especies de *Azospirillum* no producen ACC deaminasa (Holguín y Glick, 2001, 2003).

No obstante un año después de que se inició el presente trabajo, apareció el primer artículo en el que se reporta que algunas cepas de *Azospirillum lipoferum* producen esta enzima; en este trabajo se analizó la presencia del gen *acdS*, así como la actividad de la ACC deaminasa en una colección de *Proteobacterias* dando mayor énfasis a los géneros *Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Burkholderia* y *Pseudomonas*; encontrando que dos de tres especies de *Azospirillum* aisladas de suelos de Pakistán presentan el gen *acdS* y expresan la actividad ACC deaminasa, en este se plantea la hipótesis de que esta bacteria haya adquirido el gen *acdS* por transferencia horizontal de plásmidos entre bacterias (Blaha et al., 2006).

Cuadro 8. Actividad de ACC deaminasa en cepas de *Azospirillum* sp.

Clave de las cepas	$\mu\text{mol } \alpha\text{-acetobutirato/mg}$ proteína/hora
LMG 6509 <i>Azospirillum amazonense</i>	0.00 \pm 0.00
LMG7108 <i>Azospirillum halopraeferans</i>	0.00 \pm 0.00
LMG10653 <i>Azospirillum irakense</i>	0.00 \pm 0.00
LMG13127 <i>Azospirillum brasilense</i>	0.00 \pm 0.00
LMG13128 <i>Azospirillum lipoferum</i>	0.00 \pm 0.00
Sp7 <i>Azospirillum brasilense</i>	0.00 \pm 0.00
Cd <i>Azospirillum brasilense</i>	0.00 \pm 0.00
AMs1	1.67 \pm 0.11
AMs2	0.00 \pm 0.00
AMs3	0.00 \pm 0.00
AZm1	2.41 \pm 0.53
AZm2	1.60 \pm 0.09
AZm3	3.31 \pm 0.21
AZm4	2.25 \pm 0.41
AZm5	2.81 \pm 0.92
APV1	0.00 \pm 0.00
C4	0.00 \pm 0.00
CPM-167	0.00 \pm 0.00
POX	0.00 \pm 0.00
VS1	1.21 \pm 0.25
VS7	0.00 \pm 0.00
VS9	0.00 \pm 0.00

En cuanto a los intervalos de actividad enzimática obtenidos, estos se encuentran dentro de los reportados en otras bacterias, tales como: *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Kluyvera* y *Enterobacter*, de las cuales la menor actividad se reporta en *Rhizobium* y la mayor para *Enterobacter cloacae* con un intervalo de 1.06 \pm 0.17 a 0.43 \pm 0.11 y para la segunda de 21.21 \pm 2.05 μmol de α -cetobutirato/mg de proteína /hora (Wenbo et. al., 2003).

Se ha reportado que mediante la incorporación del gen *acdS* (responsable de la expresión de ACC deaminasa) en *Azospirillum brasilense* Cd1843, esta cepa modificada expresa un valor de actividad enzimática alrededor de 1.74 \pm 0.06 μmol de α -

acetobutirato/mg de proteína /hora (Holguín y Glick 2000, 2003). Los datos anteriores son similares a los obtenidos en este estudio los que fluctúan de 1.21 ± 0.25 a 3.31 ± 0.21 μmol de α -cetobutirato/mg de proteína /hora.

Datos experimentales indican que la inoculación de plantas con PGPR ACC deaminasa positivas reducen los niveles de etileno en la raíz de las plantas (Penrose y Glick, 2003). Se ha comprobado que al inactivar el gen *acdS* en *Pseudomonas putida* GR12-2 y *Enterobacter cloacae* UW4 se inhibe la habilidad de las bacterias para promover la elongación de las raíces de canela (Glick et al., 1994; Ma et al., 2003). Por otra parte, Qiaosi y colaboradores (2005) al comparar el efecto en el desarrollo de las raíces de clavel que producen: a) en enraizador (ácido indol butírico al 0.1%), b) la inoculación con la cepa silvestre de *Azospirillum brasilense* Cd1843 y c) la inoculación con la cepa transformada y capaz de producir ACC deaminasa, observaron que el desarrollo de las raíces fue mucho mayor con este último tratamiento, atribuyendo este efecto a la presencia de la ACC deaminasa.

En relación con las cepas en estudio en un trabajo previo se comparó el efecto que produce la inoculación con diversas cepas de *Azospirillum* y de *Pseudomonas* en el desarrollo de jitomate; en este el mayor peso fresco de la raíz se obtuvo en las plantas inoculadas con las cepas AZm5, AZm1 y AZm3, resultados que probablemente estén relacionados con la actividad de la ACC deaminasa registrada en el presente trabajo .

Estas cepas fueron aisladas de la rizósfera de alfalfa y maíz desarrollados en los distritos de riego 03 Tula y 100 Alfajayucan los cuales son regados con aguas residuales crudas del área metropolitana de la Ciudad de México (Esquivel-Cote 2002).

Considerando la contaminación que este tipo de agua genera en los suelos y los reportes respecto a que los factores ambientales inducen cambio en ciertas bacterias, lo que les permite adaptarse o sobrevivir en nuevas condiciones (Klug y Cummings 1999); así como aquellos referentes a que los genes que codifican la ACC deaminasa se encuentran en los plásmidos y pueden ser transferidos de manera horizontal (Hontzeas et al., 2005), es posible que las cepas analizadas hayan adquirido este gen por transferencia horizontal de plásmidos de manera natural, como un mecanismo de sobrevivencia y adaptación a las condiciones altamente contaminadas de los suelos de los cuales fueron aisladas.

Ha sido ampliamente demostrado que *Azospirillum* es una rizobacteria que promueve el desarrollo vegetal a través de diversos mecanismos (Bashan et al., 1996; Caballero-Mellado, 2006), excepto la producción de ACC deaminasa (Holguín y Glick, 2003). No obstante con base en los resultados obtenidos en este trabajo y lo reportado por Blaha et al., (2006) parece necesario incluir la contribución de la actividad de la ACC deaminasa en el beneficio del desarrollo vegetal causado por esta bacteria.

Para dar mayor sustento a los resultados obtenidos es necesario investigar la presencia del gen *acdS* en las cepas que resultaron ACCD (+), así como determinar, si el beneficio que estas cepas proporcionan a los cultivos en los que se inoculen se debe mayoritariamente a este mecanismo.

3. Identificación de cepas

3.1 Bioquímica mediante los Sistemas API®20 NE y API®50CH

Al comparar los resultados obtenidos, con los reportado como características bioquímicas específicas del género *Azospirillum* (Flores, 1985 . Penot et. al,1992) obtuvimos que las cepas de referencias utilizadas cumplen con estas características, teniendo que las pruebas negativas para el género son hidrólisis de la gelatina, indol, hidrólisis del almidón y arginina dihidrolasa, y las pruebas positivas son hidrólisis de la esculina, oxidasa y la desasimilación de NO_3^- a NO_2^- (nitratos).

Cuadro 9. Pruebas bioquímicas en los sistemas API20NE y API50CH de las cepas utilizadas como referencia.

	<i>A. amazonense</i>	<i>A. halopraeferens</i>	<i>A. irakense</i>	<i>A. brasiliense</i>	<i>A. lipoferum</i>
Cepa	LMG 6509	LMG7108	LMG 10653	LMG 13127	LMG13128
Prueba Bioquímica					
NO2 Nitratos	+	+	+	+	+
TPR L-Triptofano (indol)	-	-	-	-	-
GLU D-glucosa	-	-	-	-	-
ADH L-arginina	-	-	-	-	-
URE urea	-	+	-	+	+
ESC esculina	+	+	+	+	+
PNPG galactopiranosida	+	+	+	+	+
GLU D-glucosa (ana)	+	-	+	+	+
ARA L-arabinosa	-	+	+	+	+
MNE D-manosa	-	-	+	+	-
MAN D-manitol	+	-	-	-	-
NAG N-acetilglucosamina	+	-	+	-	-
MAL D-maltosa	-	-	+	-	-
GNT gluconato potasio	-	+	-	+	+
CAP ácido cáprico	-	-	+	-	-
ADI ácido adípico	-	-	-	-	-
MLT ácido málico	+	+	+	+	+
CIT citrato trisódico	+	+	-	-	-
GEL gelatina	-	-	-	-	-
PAC ácido fenilacético	+	-	-	-	-
OX citocromo oxidasa	+	+	+	+	+
1 GLY Glicerol	-	-	-	+	+
2 ERY Eritrinol	-	-	-	+	-
3 DARA D-arabinosa	-	-	+	+	-
4 LARA L-arabinosa	-	+	+	+	+
5 RIB D-ribosa	-	-	-	-	-
6 DXYL D-xilosa	+	-	+	+	+
7 LXYL L-xilosa	-	-	-	-	-
8 ADO D-adonitol	-	-	-	-	-
9 MDX mD-xilopiranosida	+	-	-	+	-
10 GAL D-galactosa	-	-	+	+	+

Continuación Cuadro 9.					
Cepa	LMG 6509	LMG7108	LMG 10653	LMG 13127	LMG13128
11 GLU D-glucosa	-	-	+	-	-
12 FRU D-fructosa	+	+	-	+	+
13 MNE D-mannosa	+	-	+	-	-
14 SBE L-sorbosa	+	-	-	+	-
15 RHA L-rhamnosa	+	-	+	+	-
16 DUL dulcitol	+	-	-	-	-
17 INO inositol	+	-	-	-	+
18 MAN D-manitol	+	-	-	-	-
19 SOR D-sorbitol	+	-	-	+	-
20 MDM D-manopiranosida	-	-	-	-	-
22 NAG N-acetilglucosamin	-	-	-	-	-
23 AMY amigdalina	-	-	-	-	+
24 ARB arbutina	-	-	+	-	-
25 ESC esculina	+	+	+	+	+
26 SAL salicina	-	-	-	+	+
27 CEL D-celobiosa	-	+	-	-	-
28 MAL D-maltosa	+	-	+	-	-
29 LAC D-lactosa	-	-	+	-	-
30 MEL D-melibiosa	-	-	-	-	-
31 SAC D-sacarosa	-	-	+	-	-
32 TRE D-trehalosa	+	-	+	-	-
33 INU inulina	-	-	-	-	-
21 MDG D-glucopiranosida	-	-	-	-	-
34 MLZ D-melezitosa	-	-	-	-	-
35 RAF D-rafinosa	+	-	-	-	+
36 AMD almidón	-	-	-	-	-
37 GLY glicógeno	-	-	-	-	-
38 XLT xilitol	-	-	-	-	-
39 GEN gentiobiosa	-	-	-	-	-
40 TUR D-turanosa	-	-	-	-	-
41 LYX D-lixosa	-	-	-	-	-
42 TAG D-tagatosa	+	-	-	-	-
43 DFUC D-fucosa	-	+	+	+	+
44 LFUC L-fucosa	-	-	+	-	-

Continuación Cuadro 9.

Cepa	LMG 6509	LMG7108	LMG 10653	LMG 13127	LMG13128
45 DARL D-arabitol	-	-	-	-	-
46 LARL L-arabitol	-	-	-	-	-
47 GNT gluco- potásico	-	+	-	-	-
48 2KG 2-cetogluconato p	-	-	-	-	-
49 5KG 5-cetogluconato p	+	-	-	-	-
FC Nfb Glucosa	+	-	-	-	+
FC Nfb Sacarosa	+	-	-	-	-
FC Nfb α -cetogluturato	-	+	+	-	+
FC Nfb citrato sódico	-	+	+	+	+
NaCl 3%	-	+	-	-	-

FC Nfb : Fuente de carbono en medio NFb.

Cuadro 10. Pruebas bioquímicas en los sistemas API20NE y API50CH de las cepas aisladas

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Cepa	AZm1	AZm2	AZm3	AZm4	AZm5	AMs1	AMs2	AMs3	VS1	VS7	VS9	Sp7	Cd	C4	APV1	POX	CPM-167
Prueba Bioquímica																	
NO2 Nitratos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TPR L-Triptofano (indol)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU D-glucosa	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADH L-arginina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
URE urea	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ESC esculina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
GEL gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PNPG galactopiranosida	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLU D-glucosa (ana)	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
ARA L-arabinosa	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
MNE D-manosa	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
MAN D-manitol	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
NAG N-acetilglucosamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
MAL D-maltosa	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
GNT gluconato potásico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
CAP ácido cáprico	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
ADI ácido adípico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MLT ácido málico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT citrato trisódico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAC ácido fenilacético	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
OX citocromo oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Continuación Cuadro 10.

Cepa	AZm1	AZm2	AZm3	AZm4	AZm5	AMs1	AMs2	AMs3	VS1	VS7	VS9	Sp7	Cd	C4	APV1	POX	CPM-167
1 GLY Glicerol	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
2 ERY Eritrinol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 DARA D-arabinosa	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
4 LARA L-arabinosa	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
5 RIB D-ribosa	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
6 DXYL D-xilosa	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
7 LXYL L-xilosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
8 ADO D-adonitol	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
9 MDX mD-xilopiranosida	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
10 GAL D-galactosa	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
11 GLU D-glucosa	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-
12 FRU D-fructosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13 MNE D-mamnosa	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14 SBE L-sorbosa	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15 RHA L-rhamnosa	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
16 DUL dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17 INO inositol	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18 MAN D-manitol	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
19 SOR D-sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
20 MDM D-manopiranosida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
21 MDG D-glucopiranosida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22 NAG N-acetilglucosamin	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-

Continuación Cuadro 10.

Cepa	AZm1	AZm2	AZm3	AZm4	AZm5	AMs1	AMs2	AMs3	VS1	VS7	VS9	Sp7	Cd	C4	APV1	POX	CPM-167
23 AMY amigdalina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
24 ARB arbutina	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
25 ESC esculina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26 SAL salicina	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+
27 CEL D-celobiosa	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
28 MAL D-maltosa	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
29 LAC D-lactosa	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
30 MEL D-melibiosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31 SAC D-sacarosa	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
32 TRE D-trehalosa	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33 INU inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34 MLZ D-melezitosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
35 RAF D-rafinosa	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36 AMD almidón	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37 GLYG glicógeno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38 XLT xilitol	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
39 GEN gentiobiosa	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40 TUR D-turanosa	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
41 LYX D-lixosa	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
42 TAG D-tagatosa	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43 DFUC D-fucosa	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
44 LFUC L-fucosa	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45 DARL D-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Continuación Cuadro 10.

Cepa	AZm1	AZm2	AZm3	AZm4	AZm5	AMs1	AMs2	AMs3	VS1	VS7	VS9	Sp7	Cd	C4	APV1	POX	CPM-167
46 LARL L-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47 GNT gluco- potásico	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
48 2KG 2-cetogluconato p	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49 5KG 5-cetogluconato p	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FC Nfb Glucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
FC Nfb Sacarosa	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
FC Nfb α -cetogluturato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FC Nfb citrato sódico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
NaCl 3%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FC Nfb : Fuente de Carbono en medio Nfb

En la figura 6 se observa que las 22 cepas en estudio de acuerdo con las pruebas bioquímicas dieron lugar, a la formación de 5 grupos a los que se les asignó una letra (A a la E) para su análisis.

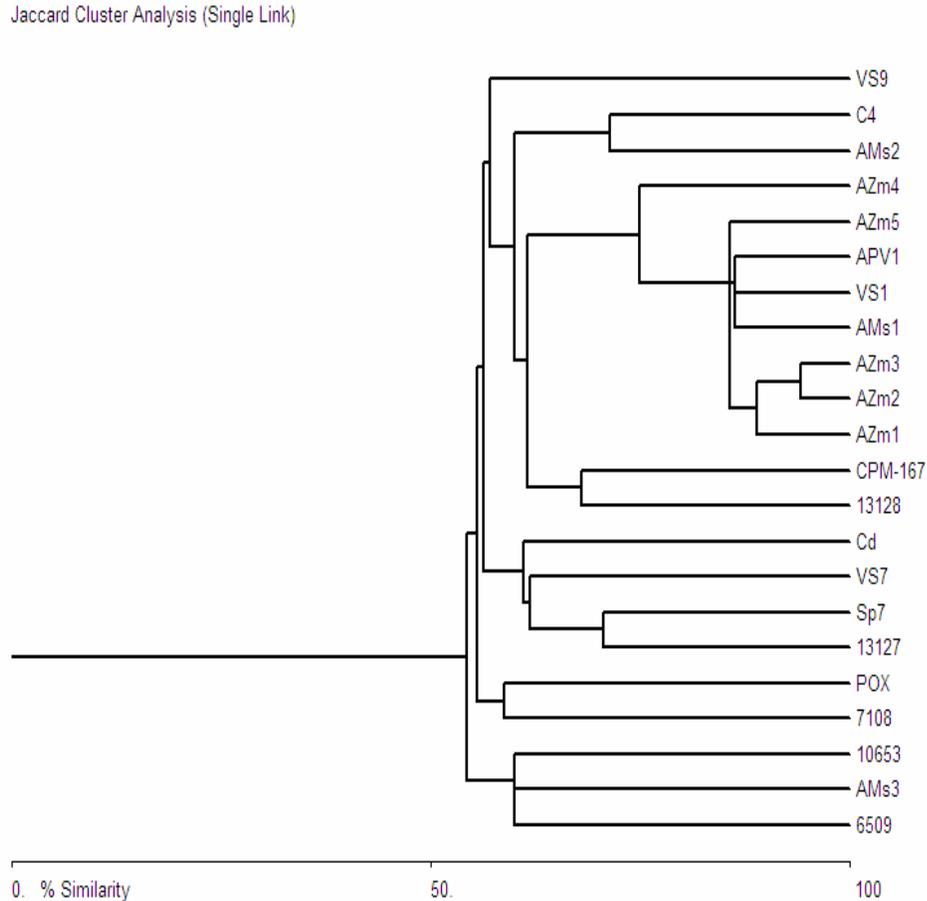


Figura 7. Fenograma de similitud obtenido a través del calculo de los coeficientes de similitud Jaccard utilizando el ligamiento simple mediante el programa Bio Diversity Pro relacionando las 22 cepas de *Azospirillum*.

Grupo A; este grupo esta compuesto por las cepas aisladas AZm1, AZm2, AZm3, AZm4, AZm5, AMs1, VS1, APV1, CPM.167 asi como la cepa de referencia LMG 13128 *Azospirillum lipoferum*. Estas se relacionan entre sí con un porcentaje de similitud superior al 70%, por lo que dichas cepas fueron identificadas como *Azospirillum lipoferum*. Flores (1985), mediante pruebas bioquímicas convencionales identificó a la cepa VS1 como *Azospirillum lipoferum*.,en tanto que las otras cepas no había sido identificada su especie.

Grupo B; se encuentra formado por la cepa aislada VS7 y las cepas de referencia Sp7, Cd y LMG 13127 que corresponden a *Azospirillum brasilense*. En este caso los porcentajes de

similitud entre la cepa aislada VS7 y las tres cepas de referencia son mayores al 60% . Se comprobó que las cepas de referencia Sp7 y Cd conservaron las características fenotípicas propias de *Azospirillum brasilense*.

Respecto a la cepa VS7 el resultado obtenido coincide con la identificación previa realizada a través de pruebas bioquímicas convencionales (Flores, 1985).

Grupo C se encuentra formado por la cepa de aislada POX y por la cepa de referencia LMG 7108 *Azospirillum halopraeferans*. Relacionadas en un porcentaje del 58% por lo que no es posible asegurar la identificación de cepa POX mediante este sistema.

Grupo D; aquí podemos encontrar la cepa aislada AMs3 y las cepas de referencia LMG 6509 *Azospirillum amazonense* y LMG 10653 *Azospirillum irakense*. Pero debido a que su porcentaje de similitud determinado es menor al 60% no es posible establecer una relación de AMs3 con dichas cepas de referencia. Por lo que su identificación no es posible mediante este sistema.

Grupo E; esta conformado por las cepas aisladas C4, AMs2, en este grupo no se encuentra incluida ninguna cepa de referencia con las que se puedan relacionar estas cepas. Por lo que no es posible realizar su identificación mediante este sistema. Por otro lado Flores (1985) identificó la cepa VS9 como *Azospirillum brasilense* y en este caso no se puede establecer una relación con ninguna de las cepas de referencia de *Azospirillum brasilense*., debido al bajo porcentaje de similitud obtenida por dicha asociación.

3.2 Genotípica (PCR del gen 16S rDNA)

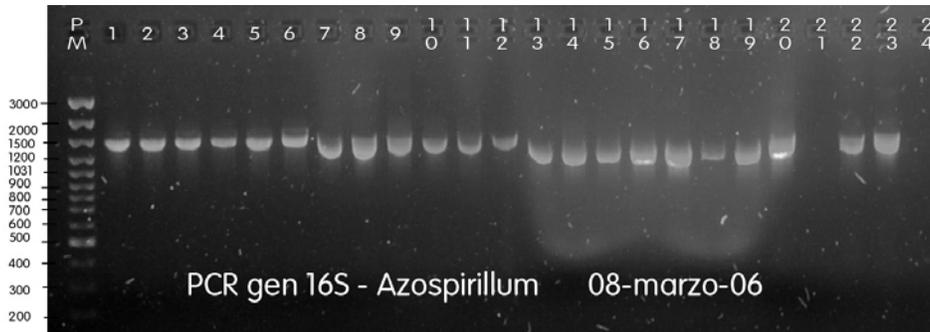


Figura 8. Gel de electroforesis obtenido de cada una de las cepas analizadas. PM (Marcador de pesos moleculares LowMass (invitrogen)), 1 (AZm1), 2 (AZm2), 3 (AZm3), 4 (AZm4), 5 (AZm5), 6 (AMs1), 7 (AMs2), 8 (AMs3), 9 (VS1), 10 (VS7), 11 (VS9), 12 (C4), 13 (Cd), 14 (POX), 15 (Sp7), 16 (APV1), 17 (CPM-167), 18 (LMG 6509 *A.amazonense*), 19 (LMG 7108 *A. halopraeferans*), 20 (LMG 10653 *A. irakense*), 21 (LMG 13127 *A. brasilense*), 22 (LMG 13128 *A. lipoferum*), 23 (Control Positivo *Escherichia coli*), 24 (Control Negativo).

En la figura 8 se observa que bajo estas condiciones de PCR y utilizando los primer 27f y 1495r; se logró amplificar los genes 16S rDNA de las cepas aisladas y de referencia, excepto en el caso del pozo (21) LMG 13127 *Azospirillum brasilense* lo que se atribuye a un error al colocar en la mezcla de reacción de PCR el 1 µL de DNA extraído.

Los productos PCR para secuenciar y pesos moleculares del material genético de las cepas aisladas se muestran en las figuras 9 y 10.

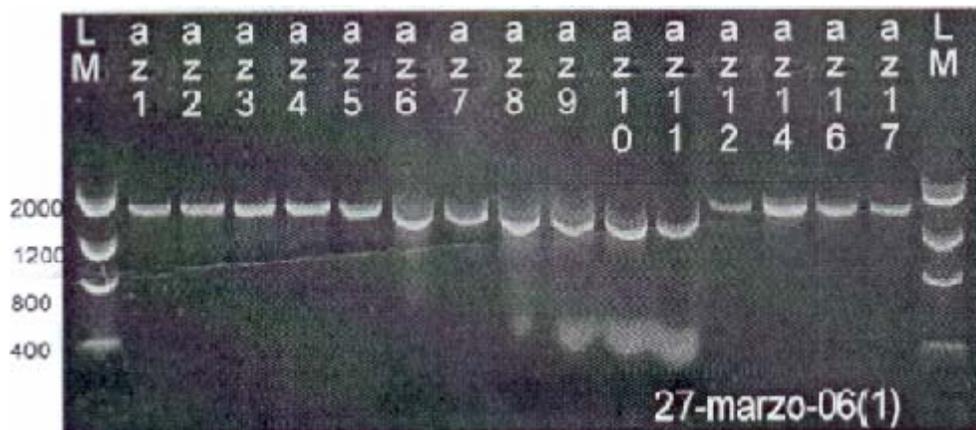


Figura 9. Gel de electroforesis obtenido las cepas aisladas. LM (Marcador de pesos moleculares LowMass (invitrogen)), az1 (AZm1), az2 (AZm2), az3 (AZm3), az4 (AZm4), az5 (AZm5), az6 (AMs1), az7 (AMs2), az8 (AMs3), az9 (VS1), az10 (VS7), az11 (VS9), az12 (C4), az14 (POX), az16 (APV1), az17 (CPM-167).

	Cepa	PM	[ng]
Secuenciar con primers 27f Y 1495R	az1	1930	33.97
	az2	1930	44.59
	az3	1910	47.41
	az4	1910	41.79
	az5	1870	42.2
	az6	1670	67.73
	az7	1710	42.23
	az8	1570	60.94
	az9	1550	43.05
	az10	1470	93.38
	az11	1510	32.93
	az12	1910	21.08
	az14	1850	54.36
	az16	1850	37.09
	az17	1850	28.21

Figura 10. Pesos Moleculares y concentración del material genético de cada cepa a secuenciar.

El DNA obtenido fue secuenciado con los dos primers utilizados para el PCR, 27f y 1495r, en un secuenciador automatizado de DNA Applied Biosystems, Modelo 310 en el Instituto de Fisiología Celular. Unidad de Biología Molecular UNAM.

Se obtuvieron las secuencia completas y los electroferogramas de cada una de las cepas, exceptuando las cepas (8) AMs3, (11) VS9, (14) POX de las cuales los electroferogramas obtenidos presentaban una gran interferencia, presentando en las secuencias obtenidas ambigüedades (indicadas por la letra N) por lo que ni aun alineando la cadena directa con la reversa fue posible establecer la secuencia completa de dichas cepas. Por lo que es necesario repetir la secuenciación.

Las secuencias depositadas en la base de datos pública de acceso libre a través de internet GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information)

<http://www.ncbi.nlm.gov/Genbank/index.html> que se utilizaron para la comparación tienen las siguientes claves de acceso Z29619, X79732, AE009348.

La comparación y el alineamiento de las secuencias se realizó electrónicamente usando los programas EDITSEQ y MEGALING [ClustalW] (DNASTAR, Madison, Wis). Dicha comparación generó un árbol filogenético, que refleja, de forma esquemática, el grado de parentesco genético entre las bacterias comparadas, resultados que se presentan en la figura 11, en la que se observan dos grupos.

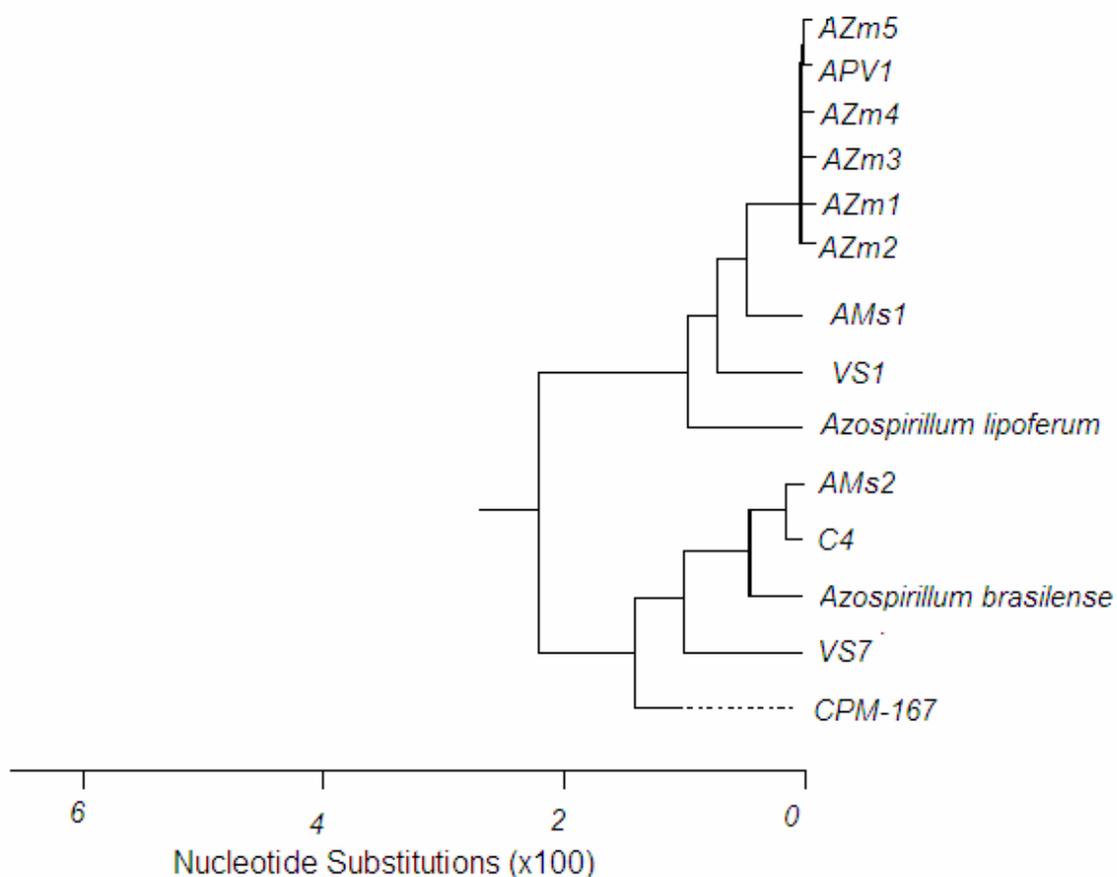


Figura 11. Árbol filogenético que relaciona las cepas aisladas con cepas de referencia. Obtenido por análisis electrónico utilizando el programa MEGALING [ClustalW] (DNASTAR, Madison, Wis).

En el Grupo A se encuentran AZm5, APV1, AZm4, AZm3, AZm1, AZm2, AMs1 y VS1 las cuales establecen una relación filogenética con *Azospirillum lipoferum*.

En el Grupo B se relacionan con *Azospirillum brasilense* , las cepas AMs2, C4(estas a su vez guardando una estrecha relación) VS7 y CPM-167.

Comparando los resultados de la identificación bioquímica (fenotípica) y la identificación genotípica.

Cuadro 10. Relación comparativa entre los resultados de identificación de las cepas aisladas.

Cepa aislada Clave	Resultado de la identificación bioquímica	Resultado de la identificación genotípica.
AZm1	<i>Azospirillum lipoferum</i>	<i>Azospirillum lipoferum</i>
AZm2	<i>Azospirillum lipoferum</i>	<i>Azospirillum lipoferum</i>
AZm3	<i>Azospirillum lipoferum</i>	<i>Azospirillum lipoferum</i>
AZm4	<i>Azospirillum lipoferum</i>	<i>Azospirillum lipoferum</i>
AZm5	<i>Azospirillum lipoferum</i>	<i>Azospirillum lipoferum</i>
AMs1	<i>Azospirillum lipoferum</i>	<i>Azospirillum lipoferum</i>
AMs2	No fue posible su identificación	<i>Azospirillum brasilense</i>
AMs3	No fue posible su identificación	No fue posible su secuenciación
VS1	<i>Azospirillum lipoferum</i>	<i>Azospirillum lipoferum</i>
VS7	<i>Azospirillum brasilense</i>	<i>Azospirillum brasilense</i>
VS9	No fue posible su identificación	No fue posible su secuenciación
C4	No fue posible su identificación	<i>Azospirillum brasilense</i>
CPM-167	<i>Azospirillum lipoferum</i>	<i>Azospirillum brasilense</i>
APV1	<i>Azospirillum lipoferum</i>	<i>Azospirillum lipoferum</i>
POX	No fue posible su identificación	No fue posible su secuenciación

Se tiene coincidencia en 9 de las 15 cepas en estudio. Por otra parte en las cepas CPM-167, AMs2 y C4, aún cuando se presentaron discrepancias, se considera que estas corresponden a *Azospirillum brasilense*. En el primer caso la identificación bioquímica reveló un grado de similitud bajo (68%) con *Azospirillum lipoferum* por lo que la identificación no fue determinante, en tanto por biología molecular, la relación filogenética resultó muy cercana a *Azospirillum brasilense*. Por lo cual se consideró determinante. Es conveniente aclarar que en el electroferograma obtenido con estas cepas no se presentaron interferencias (lo que asegura la confiabilidad de la metodología) y su relación filogenética con *Azospirillum brasilense* es muy cercana.

Respecto a las cepas AMs3, POX y VS9, los resultados de las pruebas bioquímicas indican que los porcentajes de similitud con respecto al género *Azospirillum* son bajos, lo que puede ser indicativo de que estas cepas pertenezcan a un género diferente a *Azospirillum* . Así mismo a través de biología molecular no se logró la secuenciación debido a que en el electroferograma se presentaron interferencias notables y la presencia de señales N, lo que impidió analizar el tipo de relación con las cepas de referencia.

VI. CONCLUSIONES

1. En las cepas de *Azospirillum* de la colección del Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química, existe un mecanismo mas por el cual estas cepas actúan como PGPR, la presencia de la enzima ACC deaminasa.
2. La filogenia de doce de las quince cepas aisladas estudiadas quedo establecida. Ocho cepas son *Azospirillum lipoferum* y cuatro *Azospirillum brasilense*.
3. Siete cepas de la colección pertenecientes al género *Azospirillum lipoferum* tienen la capacidad de expresar actividad de la enzima ACC deaminasa.
4. El uso de sistemas API de identificación bioquímica no coincidió completamente con las técnicas de Biología Molecular (PCR y secuenciación del gen 16S rDNA) en la identificación de algunas de las cepas aisladas pertenecientes a la colección de *Azospirillum*.

VII. RECOMENDACIONES

- Las cepas encontradas con una actividad enzimática de ACC deaminasa positiva, es necesario someterlas a ensayos biológicos de invernadero para establecer el efecto de esta actividad en sus hospederos vegetales.
- Investigar mediante técnicas de biología molecular la presencia del gen *acds* y de la proteína en las cepas estudiadas para confirmar la presencia y la expresión de ACC deaminasa.
- Las cepas aisladas AMs3, VS9 y POX, es necesario repetir la amplificación y la secuenciación del gen 16S rDNA, y comparar dicha secuenciación con secuencias de referencia del género *Azospirillum* y otros géneros.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Albrecht S. L. y Okon Y. (1980). Cultures of *Azospirillum*. In: San Pietro, A. (ed.). Photosynthesis and Nitrogen Fixation. Methods of Enzymology . *Academic Press*, New York., 69: 740-749.

Apelbaum A., Burgoon A. C., Anderson J. D., Lieberman M., Ben-Arie R. y Mattoo A. K. (1981a) .Polyamine inhibit biosíntesis of ethylene in higher plant tissue and protoplast. *Plant. Physiol.*, 68 : 453-456.

Apelbaum A., Wang S. Y. Burgoon A. C., Baker J.E.y Lieberman M. (1981b).Inhibitors of conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene by structural analogs, inhibitors of electron transfer, uncouplers of oxidative phosphorylation, and free radical scavengers. *Plant. Physiol.*, 67: 74-79.

Atlas R. M. y Bartha R. (1993). Microbial Ecology Fundamentals and Applications. *Benjamin/Cummings*. pp. 69-74, 334-335.

Austin Brian y Fergus Priest. (1992). "Taxonomía Bacteriana Moderna". *Editorial Limusa*.

Bashan Y. y Levanony H. (1990). Curren status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.*, 36: 591-608.

Bashan Y. y Carrillo A. (1996). Inoculantes microbianos para la agricultura sostenible. In: Pérez-Moreno J. y Ferrera-Cerrato R. (eds.). Nuevos Horizontes en Agricultura: Agro ecología y Desarrollo Sostenible. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Montecillo, México. pp. 125-155.

Bashan Y., Holguín G. y Ferrera-Cerrato R. (1996). Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos I. *Azospirillum*. *Terra.*, 14: 159-194.

Bashan Y. y Holguín G. (1997). *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Can. J. Microbiol.*, 43: 103-121.

Belimov A. A., Hontzeas N., Safronova V. I., Demchinskaya S. V., Piluzza G., Bullitta S. y Glick B. R. (2005). Cadmium- tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L.Czern.) *Soil Biol. Biochem.*, 37; 241-250.

Bilal R., Rasul G., Qureshi J. A. y Malik K. A. (1990). Characterization of *Azospirillum* and related diazotrophs associated with roots of plants growing in saline soils. *W. J Microbiol. Biotech.*, 6:46-52.

Biomerieux (2006). [en línea]. [citado 4 abril 2006]. Disponible en world wide web : <http://www.biomerieux.com/servlet/srt/bio/spain/home>

Blaha D., Prigent-Combaret C., Sajad M. y Moënne-Loccoz Y. (2006). Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene acids in phytobeneficial and pathogenic Proteobacteria and relation with strain biogeography. *FEMS Microbiol Ecol.*, 56:455-470.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, 72; 248-254.

Bulow J. L. y Döbereiner J. (1975). Potential for Nitrogen Fixation in maize genotypes in Brasil. *Proc. Nat. Sci.*, 72: 2389-2393.

Burd G. I., Dixon D.G., y Glick B.R. (2000). Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Can. J. Microbiol.*, 46: 237-245.

Caballero-Mellado J. (2006). El género *Azospirillum*. [en línea]. Programa de Ecología Molecular y Microbiana, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM, Cuernavaca Mor., México [citado 27 enero 2006]. Microbios en línea. Capítulo 14. Disponible en world wide web : http://www.microbiologia.org.mx/microbios_en_linea/CAPITULO14.pdf

Crisci J. y López A. (1983). "Introducción a la teoría y practica de la taxonomía numérica". Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de la Plata Argentina. Secretaria General de la Organización de los estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico Washington DC.

Davis D. B., Dulbecco R., Eisen N. H. y Ginsberg S. H. (1996). Tratado de Microbiología. 4ª edición , Ed. Masson S. A. pp. 61- 80.

Díaz V .P., Ferrera-Cerrato R., Almaraz S. y Alcántar G. G. (2001). Inoculación de Bacterias Promotoras de Crecimiento en Lechuga. *Terra* .,19: 327-335.

Döbereiner J. y Day J. M. (1975). Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can. J. Microbiol.*, 25: 1264-1269.

Döbereiner J. y Baldani L. (1979). Selective infection of maize roots by streptomycin-resistant *Azospirillum lipoferum* and other bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 22: 343-352.

Eckert B., Baller O., Kirchhof G., Halbritter A., Stoffels M. y Hartmann A. (2001). *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C-4 Grass Miscanthus. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51: 17-26.

Esquivel-Cote R. (2002). Selección e identificación de rizobacterias promotoras del desarrollo vegetal aisladas de cultivos regados con aguas residuales y su efecto sobre el desarrollo del jitomate (*Lycopersicon esculentum*). Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 154 pp.

Fallik E. y Okon Y. (1996). Inoculants of *Azospirillum brasilense*: biomass production, survival and growth promotion of *Setaria italica* and *Zea mays*. *Soil Biol. Biochem.*, 28: 123-126.

Fallik E., Okon Y., Epstein E., Goldman A. y Fisher M. (1989). Identification and quantification of IAA and IBA in *Azospirillum brasilense* –inoculated maize roots. *Soil Biol. Biochem.*, 21:147-153.

Flores Ayala A. A. (1985). Aislamiento y caracterización de *Azospirillum sp.* de la rizósfera de sorgo en Valle de Santiago, Guanajuato. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México.

Gamo T. y Ahn S. B. (1991). Growth-promoting *Azospirillum* spp. Isolated from the roots of several non gramineous crops in Japan. *Soil. Sci. Plant. Nutr.*, 37: 455-461.

García B. F. (2006). Fitorreguladores [en línea]. Universidad Politécnica de Valencia. [citado 23 enero 2006]. Parte III. Tema 14. Disponible en world wide web : <http://www.euita.upv.es/varios/biologia/Temas/tema_14.htm>

García de Salamone, Hynes R. K. y Nelson, L.M. (2001). Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Can. J. Microbiol.*, 47: 404-411.

Ghosh S., Penterman J. N., Little R. D., Chavez R. y Glick B. R. (2003). Three newly isolated plant growth-promoting bacilli facilitate the seedling growth of canola, *Brassica campestris*. *Plant Physiol Biochem.*, 41: 277-281.

Grifoni A., M. Bazzicalupo C., Di Serio S. Fancelli, y R. Fani. (1995). Identification of *Azospirillum* strains by restriction fragment length polymorphism of the 16SrDNA and of the histidine operon. *FEMS Microbiol Lett.*, 127: 85-91.

Givaudan A. y Bally R. (1991). Similarities between large plasmids of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiol Lett.*, 78 : 245-252.

Glick B. R. (2005). Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiol Lett.*, 251:1-7.

Glick B. R., Penrose D. M. y Wenbo M. (2001). Meetin report. Bacterial promotions of plant growth. *Biotech Adv.*, 19: 135-138.

Glick B.R., Patten C.L., Holguin G. y Penrose D. M. (2000). Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria. *Imperial College Press*. pp 267.

Glick BR, Penrose DM y Li J. (1998). A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *J Theor Biol.*, 190:63–8.

Glick.B.R., Liu. C., Ghosh. S. y Dumbroff. E.B. (1997). Early development of canola seedlings in the presence of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR 12-2. *Soil Biol. Biochem.*, 29:1233-1239.

Glick B. R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 41: 109-117.

Glick B.R, Jacobson CB., Schwarse MMK. y Pasternak JJ. (1994). 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 do not stimulate canola root elongation. *Can J Microbiol.*, 40: 911-915.

Grichko V. P y Glick B.R. (2001). Ethylene and flooding stress in plants. *Plant Physiol Biochem.*, 39; 1-9.

Grifoni A., Bazzicalupo M., Di C., Serio S., Fancelli S. y Fani R. (1995). Identification of *Azospirillum* strains by restriction fragment length polymorphism of the 16SrDNA and of the histidine operon. *FEMS Microbiol Lett.*, 127 : 85-91.

Hernández O. (1997). *Azospirillum* como productor de fitohormonas (auxinas y giberelinas) *in vitro*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

Hernández Bautista M. A. (2001). "Evaluación de efectos de dos grupos de rizobacterias productoras de fitohormonas : *Azospirillum* y Solubilizadores de fósforo, sobre el crecimiento del jitomate (*Lycopersicon esculentum*)". Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.

Holguin G. y Glick B.R. (2003). Transformation of *Azospirillum brasilense* Cd with an ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4 fused to the Tet^r gene promoter improves its fitness and plant growth promoting ability . *Microb. Ecol.*, 46 : 122-133.

Holguin G. y Glick B.R. (2001). Expression of the ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4 in *Azospirillum brasilense*. *Microb. Ecol.*, 41: 281-288.

Holguin G. y Glick B.R. (2000). Inoculation of tomato plants with *Azospirillum brasilense* transformed with the ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4. Disponible en línea <http://www.ag.auburn.edu/~mlowens/argentina/pdfmanuscripts/kloepper.pdf> [Acceso 17 de abril de 2005]

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. y Williams, S. T. (1994). Bergey,s Manual of Determinative Bacteriology. 9a ed. *William & Wilkins*. pp. 754.

Honma M y Shimorura T. (1978). Metabolism of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid. *Agric.Biol.Chem.*, 42 (10) : 1825-1831.

Hontzeas N., Hontzeas C.E. y Glick B. R. (2006) Reaction mechanisms of the bacterial enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Biotech Adv.*, Article in press.

Hontzeas N, Richardson AO, Belimov AA, Safronova VI, Abu-Omar MM y Glick BR. (2005). Evidence for horizontal gene transfer (HGT) of ACC deaminase genes. *Appl Environ Microbiol.*, 71: 7556–8.

Hontzeas N, Zoidakis J, Glick BR y Abu-Omar MM. (2004) Expression and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the rhizobacterium *Pseudomonas putida* UW4: a key enzyme in bacterial plant growth promotion. *Biochem Biophys Acta.*, 1703 :11–19.

Jacobson CB, Pasternak JJ y Glick BR. (1994). Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Can J Microbiol.*,40:1019–25.

Jain D. K. y Patriquin D. G. (1985). Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching of wheat root hairs. *Can. J. Microbiol.*, 31: 206-210.

Jankiewicz Leszek S. (2003). Reguladores del crecimiento. Desarrollo y resistencia en plantas. Propiedades y acción. Vol 1. Universidad Autónoma de Chapingo. Departamento de fitotecnia. Instituto de Horticultura. Ediciones Mundi- Prensa. México pp. 487.

Jansonius NJ. (1998) Structure, Evolution and action of vitamin B6-dependent enzymes. *Curr Opin Struct Biol.*, 8:759–69.

Jia Y.J, Kakuta Y, Sugawara M., Igarashi T., Oki N., Kasaki M., Shoji T., Kanetuna Y., Horita T., Matsui H. y Honma M. (1999) Synthesis and degradation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid by *Penicillium citrinum*. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 63: 542-549.

Jiménez D.R., Virgen C. G., Tabares F. S. y Olalde P. V. (2001). Bacterias promotoras del crecimiento de plantas: agro-biotecnología. *Avance y Perspectiva.*, 20: 395-400.

Karthikeyan S, Zhou Q, Zhao Z, Kao C, Tao Z y Robinson H. (2004a) Structural analysis of *Pseudomonas* 1-aminocyclopropane-1-carboxylate Deaminase complexes: insight into the mechanism of a unique pyridoxal-5-phosphate dependent cyclopropane ringopening reaction. *Biochem.*,43:13328–39.

Karthikeyan S, Zhao Z, Kao C, Zhou Q, Tao Z y Zhang H. (2004b) Structural analysis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase: observation of an aminyl intermediate and identification of Tyr294 as the active site nucleophile. *Angew Chem Int Ed.*,43:3425–9.

Kende. H. (1993). Ethylene biosynthesis. *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, 44: 283-307.

Kirchhof G. y A. Hartmann. (1992). Development of gene-probes for *Azospirillum* based on 23 S-rRNA sequences. *Symbio.*, 13: 27-35.

Klibansky M.M., y González F.M., (1996). Algunas Experiencias en la aplicación de la Biotecnología en la producción de biofertilizantes en Cuba. *Rev. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería* , 143 – 150.

Klug William S y Michael R. Cummings (1999). Conceptos de Genética. 5 a ed. Ediciones Prentice Hall. Madrid. pp 814.

Li C. Y. y Castellano M. A.(1987). *Azospirillum* isolated from within sporocarps of the mycorrhizal fungi *Hebeloma crustuliniforme*, *Laccaria laccata* and *Rhizopogon vinicolor*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 88: 563-565.

Lorence Quiñónez A. (1999) Agro-biológicos. Cuaderno de Vigilancia Biotecnológica No 5. Ed. CamBioTec., Dirección de Investigación y Posgrado Universidad Autónoma de Chihuahua, México. pp. 3-21.

- Ma W., Guinel F. y Glick BR. (2003). *Rhizobium leguminosarum biovar viciae* 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminasa promotes nodulation of pea plants. *Appl Environ Microbiol.*, 69: 4396-4402.
- Madhaiyan M., Poonguzhali S., Ryu J. y Sa T. (2005) Regulation of ethylene levels in canola (*Brassica campestris*) by 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-containing *Methylobacterium fujisawaense*. *Plant. Sprenger-Velag*. Article in press.
- Martin-Didonet C. C. G., Chubatsu L. S., Souza E. M., Kleina F.G., Rego M., Rigo L.U., Yates M. G. y Pedrosa F.O.. (2000) Genome structure of the genus *Azospirillum*. *J. Bacteriol.*, 182 : 4113-4116.
- Mazcarúa M. A., Caballero-Mellado, J y Carcaño M. (1997). Tecnología ambientales para el desarrollo sustentable. Biofertilización en gramíneas : <http://dellieco.conacyt.mx/ta/tae.htm>
- Minami R, Uchiyama K, Murakami T, Kawai J, Mikami K y Yamada T. (1998) Properties, sequence, and synthesis in *Escherichia coli* of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Hansenula saturnus*. *J Biochem* (Tokyo).,123:1112–8.
- Neyra C. A. y Döbereiner J. (1977). Nitrogen fixation in grass. *Acces Agron.*, 29: 1-39.
- Okon Y. y Labandera-González C. A. (1994). Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.*, 26: 1591-1601.
- Okon Y. y Kapulnik Y. (1986). Development and function of *Azospirillum* –inoculated roots. *Plant Soil.*, 90; 3-16.
- Ose T, Fujino A, Yao M, Watanabe N, Honma M y Tanaka I. (2003) Reaction intermediate structures of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase: insight into PLP-dependent cyclopropane ring-opening reaction. *J Biol Chem.*, 278:41069–76.
- Penot I., Berges N., Guinguene C. y Fages J. (1992). Characterization of *Azospirillum* associated with maize (*Zea mays*) in France, using biochemical test and plasmid profiles. *Can J Microbiol.*,38: 798-803.
- Penrose D. M y Glick B.R. (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiol Plantarum.*, 118: 10-15.
- Postgate J. (1981). Fijación de nitrógeno. Ed. Omega. Barcelona. España. pp. 83
- Qiaosi L., Zalema S-L. y Glick B. R. (2005). The effect of native and ACC deaminase-containing *Azospirillum brasilense* Cd 1843 on the rooting of carnation cuttings. *Can J Microbiol.*, 51: 511-514.
- Rademacher W. (1994). Gibberellin formation in microorganisms. *Plant Growth Regulation.*, 15: 303-314.

Ramírez-Gama R. M. y Luna-Millán B. (1995). Simbiosis asociativas. En: Ferrera-Cerrato, R. y J. Pérez Moreno (eds) Agromicrobiología, elemento útil en la agricultura sustentable. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Montecillo, México. Pp. 143-165.

Ramírez- Gama R. M., Tsuzuki-Reyes G., Arreguín Espinosa de los Monteros R., Ferrera-Cerrato R., Urzúa M. C., Esquivel-Cote R., González D., Hernández-Bautista, M., Tenorio M. E., Rodríguez J. L., Castillo N. D., Franco Mendoza M., Quiroga M. A. 2001. Estudio comparativo del efecto de bacterias promotoras del desarrollo vegetal sobre el crecimiento y rendimiento del jitomate. Informe final del Proyecto 27972B CONACYT.

Rodicio D. M y Mendoza M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm. Infecc. Microbiol Clin.*, 22 (4): 238-245.

Rodríguez-Cáceres E. (1982). Improved medium for isolation of *Azospirillum sp.* *Appl. Environ. Microbiol.*, 44: 990-991.

Saleena L.M., Rangarajan S. y Nair S. (2002) .Diversity of *Azospirillum* strains isolated from rice plants grown in saline and nonsaline sites of coastal agricultural ecosystem. *Microbiol Ecol.*, 44 : 271-277.

Sly L. I. y Stackebrandt E. (1999). Description of *Skermanella parooensis* gen. nov., sp. nov. to accommodate *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* following the transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum*. *Int J Syst Bacteriol.*, 49: 541-544.

Steenhoudt O. y Vanderleyden J. (2000). *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol Rev.*, 24: 487-506.

Tarrand J. R. Krieg R. y Döbereiner J. (1978). A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.*, 24: 967-980.

Tien M., Gaskins H. y Hubell H. (1979). Plant growth. Substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of Pearl Millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.*, 37: 1016-1024.

Torres-Rubio M. G., Valencia-Plata S. A., Bernal-Castillo J. y Martínez-Nieto P. (2000). Isolation of Enterobacteria, *Azotobacter* sp. and *Pseudomonas* sp., Producers of Indole-3-Acetic Acid and Siderophores, from Colombian Rice Rhizosphere. *Revista Latinoamericana de Microbiología.*, 42: 171-176.

Urzúa Hernández M.(2001) Selección de la concentración óptima de *Azospirillum* y su combinación con diferentes dosis de fertilización en dos sistemas de cultivo de jitomate (*Lycopersicon esculentum* M.) Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. México. Pp 66

Valtierra L.M. (1992). Potencial de *Azospirillum sp.* como biofertilizante biológico de *Sorghum bicolor* (L). Moench. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo.

Walsh JRA, Pascal M, Johnston R, Raines D, Dikshit A y Krantz R. (1981). Mechanistic studies on the pyridoxal phosphate enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Pseudomonas* sp. *Biochem.*, 20:7509–19.

Wenbo M., Sebestianova S. B Sebestian J., Burd G. I., Guinel F. C y Glick B. R. (2003). Prevalence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase in *Rhizobium* spp. *Antonie van Leeuwenhoek.*, 83: 285-291.

Wenbo M., Guinel F.C. y Glick B.R. (2003) *Rhizobium leguminosarum* Biovar viciae 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase Promotes Nodulation of pea plants. *Appl Environ Microbiol.*, 69 (8) : 4396-4402.

Wenbo M., Trevor C., Charles C., Glick B.R. (2004). Expresión of an Exogenous 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene en *Sinorhizobium meliloti* increases its ability to nodulate alfalfa. *Appl Environ Microbiol.*, 70 (10) : 5891-5897.

Yao M., Ose T., Sugimoto H., Horiuchi A., Nakagawa A., Wakatsuki S., Yokoi D., Murakami T., Honma M. y Tanaka I. (2000). Crystal structure of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Hansenula saturnus*. *J.Biol. Chem.*, 275 : 34557-34565.

Zhao H, Chen K, Li W, Du S y Liu H.W. (2003). Reaction of 1-amino-2-methylenecyclopropane-1-carboxylate with 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase: analysis and mechanistic implications. *Biochem.*, 42:2089–103.

IX. ANEXOS

Anexo A. Reactivos

1. BSA (Bovine Serum Albumine) SIGMA. Albúmina Sérica Bovina [1mg/mL]

Disolver 1.00 mg (0.001 g) de BSA en 1 mL de agua destilada, en un matraz aforado de 1 mL, agitar con suavidad evitando la formación de burbujas hasta su completa disolución. Guardar la solución en refrigeración a 10 °C.

2. Reactivo de Bradford

No. catalogo B6916 de SIGMA-ALDRICH^{MR}. Guardar en refrigeración a 10°C

3. α-cetobutirato (sal de sodio)

α-Ketobutirate acid (C₄H₅O₃Na) PM =124.1 g. No. Catálogo K-0875 de SIGMA-ALDRICH^{MR}

Para el empleo de este reactivo es necesario el uso de guantes y lentes de seguridad.

Disolver 1.24 mg (0.00124g) de α-cetobutirato en 10.0 mL de TRIS-HCl 0.1M pH 8.5, en un matraz aforado de 10 mL, esta disolución nos da una concentración 1 mM.

Guardar en refrigeración a 10°C

4. TRIS -HCl

TRIZMA-BASE (NH₂C(CH₂OH)₃) PM 121 g (No. catalogo T4661 de SIGMA-ALDRICH^{MR})

TRIZMA-HCl (NH₂C(CH₂OH)₃) HCl PM 124.1g(No. catalogo T3253 de SIGMA-ALDRICH^{MR})

Para preparar :

3 TRIS-HCl 0.1 M pH 7.5. Pesar 6.35 g de TRIZMA-HCl y 1.18 g de TRIZMA-BASE, y se aforan a un volumen de 500 mL de agua destilada. Guardar en refrigeración a 10°C

4 TRIS-HCl 0.1 M pH 8.5. Pesar 2.21 g de TRZMA-HCl y 4.36 g de TRIZMA-BASE, se aforan en un volumen de 500 mL de agua destilada. Guardar en refrigeración a 10°C

5. DNP (2,4-dinitrofenilhidrazina)

2,4-dinitrofenilhydrazine (CO₂N₂C₆H₃NHNH₂) PM 198.14g (No. catalogo D-19. 930-3 de SIGMA-ALDRICH^{MR})

Para el empleo de este reactivo se requiere de uso de guantes y lentes de seguridad.

Disolver 0.05 g de DNP en 50 mL de HCl 2N, en un matraz aforado de 50.0 mL. Guardar en refrigeración a 10°C

Tener mucho cuidado con el manejo de este reactivo. Los residuos no deben ser vertidos en la tarja, deben ser colectados como residuos tóxicos.

6. Ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico ACC

1-amino-cyclopropane-carboxylic acid (C₄H₇NO₂) PM 101.11 g (No. catalogo 149101 de SIGMA-ALDRICH^{MR})

Disolver 0.250 g en 5 mL de agua destilada. Ya que esta solución es lábil, se esteriliza filtrando por membrana (45 µm) en un Sween^{MR}. Esta solución tiene una concentración de 500 mM y se reparte en tubos eppendorf (1mL) estériles, en partes iguales, y se conservan a -20°C . Descongelar sólo dos veces como máximo ya que va perdiendo efectividad. Para descongelar el ACC, poner en un baño de hielo.

7. NaOH 2N y NaOH 0.1 N

8. HCl 2N y HCl 0.56 N

9. Tolueno

Anexo B. Medios de Cultivo

1. Caldo Nutritivo

Reactivos

Extracto de carne	3 g
Peptona de carne	5 g
Agua destilada	1000 mL
pH	6.8-7.0

Disolver los reactivos en el agua destilada, agitando y ajustando el pH

2. Agar Nutritivo

Reactivos

Extracto de carne	3 g
Peptona de carne	5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL
pH	6.8-7.0

Disolver los reactivos en el agua destilada, agitando y ajustando el pH

3. Caldo nutritivo Oxoid CM3

Reactivos

Extracto de carne	1 g
Peptona de carne	5 g
Extracto de levadura	2 g
NaCl	5g
Agua destilada	1000 mL
pH	7.4

Disolver los reactivos en el agua destilada, agitando y ajustando el pH

4. Agar Nutritivo Oxoid CM3

Reactivos

Extracto de carne	1 g
Peptona de carne	5 g
Extracto de levadura	2 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL
pH	7.4

Disolver los reactivos en el agua destilada, agitando y ajustando el pH

5. Medio Mínimo Malato Sales

Reactivos

Ácido Succínico	5 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.2g
NaCl	0.1 g
CaCl ₂	0.02g
Na ₂ MoO ₄ *H ₂ O	0.002 g
MnSO ₄ *H ₂ O	0.01 g
FeCl ₃ *6H ₂ O (sol. 0.002g/mL)	4 mL
KOH	4.5 g
Biotina (sol. 0.01%)	1 mL
NH ₄ Cl (ACC 500 mM)	1 g (3 mL)
pH	6.8

Disolver los reactivos en el agua destilada, agitando y ajustando el pH

Importante: para la determinación de la ACC deaminasa se emplea el reactivo ACC (500mM) en sustitución del NH₄Cl, como única fuente de nitrógeno.

6. Medio Nfb semisólido libre de nitrógeno

Reactivos

Ácido Succínico	5 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.1 g
CaCl ₂	0.02 g
Na ₂ MoO ₄ *H ₂ O	0.002 g
MnSO ₄ *H ₂ O	0.01 g
FeCl ₃ *6H ₂ O (sol. 0.002g/mL)	4 mL
Azul de Bromotimol (sol. Alcohólica 0.5%)	3 mL
KOH	4.5 g
Biotina (sol. 0.01%)	1 mL
Agar	1.8 g
pH	6.8

Disolver los reactivos en el agua destilada, agitando y ajustando el pH

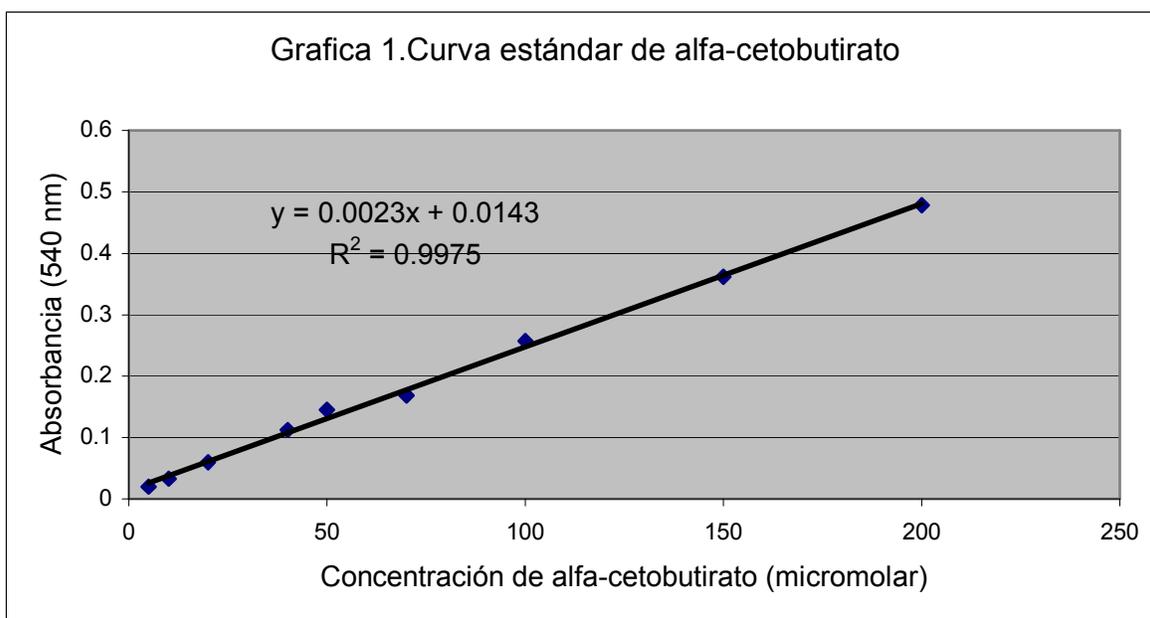
Anexo C. Curvas de alfa-cetobutirato y proteínas BSA.

Curva estándar de α-cetobutirato

1. A partir de una solución stock de α -cetobutirato (1mM)^(*) se toman diferentes alícuotas en tubos de ensaye de 13*100.
2. De acuerdo con la tabla 1 se agregan TRIS pH 8.5 (0.1 M) y el reactivo DNP (0.2% de 2,4- dinitrofenilhidrazina en HCl 2N) agitando en vórtex cada uno.
3. Incubar a 35°C por 30 minutos, trascurrido este tiempo a cada tubo se adiciona 2000 μ L de NaOH (2N).
4. Cada muestra se lee en un espectrofotómetro Pharmacia Biotech Ultrospec 3000 a una absorbancia a 540 nm.
5. Con los resultados obtenidos de absorbancia y concentración de α -cetobutirato se construye una curva estándar de α -cetobutirato.

Tabla 1. Curva estándar de α -cetobutirato.

Solución stock de α -cetobutirato (1mM) [μ L]	Tris pH 8.5 (0.1 M) [μ L]	DNP [μ L]	Incubación	NaOH (2N) [μ L]	Concentración final de α -cetobutirato (μ M)	Absorbancia (540 nm)
0	1000	300	30' 35°C	2000	0	0.000
5	995	300	30' 35°C	2000	5	0.019
10	990	300	30' 35°C	2000	10	0.033
20	980	300	30' 35°C	2000	20	0.059
40	960	300	30' 35°C	2000	40	0.112
50	950	300	30' 35°C	2000	50	0.147
70	930	300	30' 35°C	2000	70	0.168
100	900	300	30' 35°C	2000	100	0.257
150	850	300	30' 35°C	2000	150	0.361
200	800	300	30' 35°C	2000	200	0.478

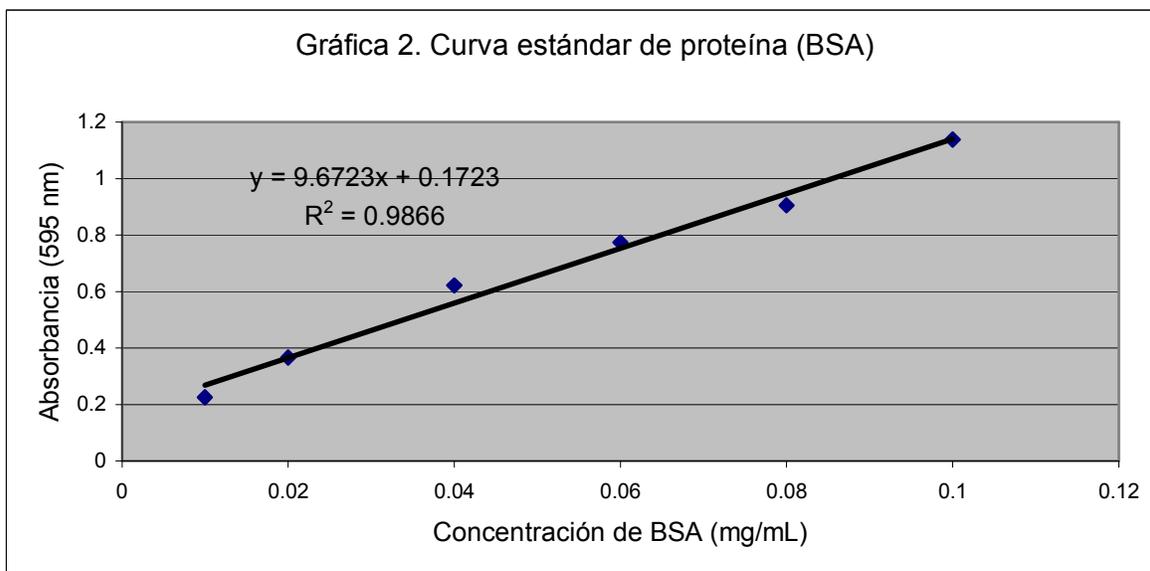


Curva estándar de Proteína BSA

1. Partiendo de una solución stock de Albúmina Sérica Bovina 1mg/mL (BSA-SIGMA) *, tomar diferentes alícuotas con micropipeta y colocarlas en tubos de 13 x 100 (ver tabla 2).
2. Ajustar con agua destilada hasta un volumen de 1000µL y adicionar 1000µL de reactivo de Bradford, mezclar en vórtex y dejar reaccionar por 45 minutos a temperatura ambiente.
3. Leer cada una de las soluciones en un espectrofotómetro Pharmacia Biotech Ultrospec 3000 a una absorbancia de 595 nm en celdas de plástico de 1000µL.
4. Con los resultados de absorbancia y concentración de BSA obtenidos construir una curva estándar de proteína.

Tabla 2. Curva estándar de proteína (BSA).

Stock de BSA (1mg/mL) [µL]	Agua destilada [µL]	Reactivo de Bradford [µL]	Concentración final de BSA (mg/mL)	Absorbancia (595 nm)
0	1000	1000	0	0.000
10	990	1000	0.01	0.226
20	980	1000	0.02	0.367
40	960	1000	0.04	0.621
60	940	1000	0.06	0.774
80	920	1000	0.08	0.906
100	900	1000	0.10	1.138

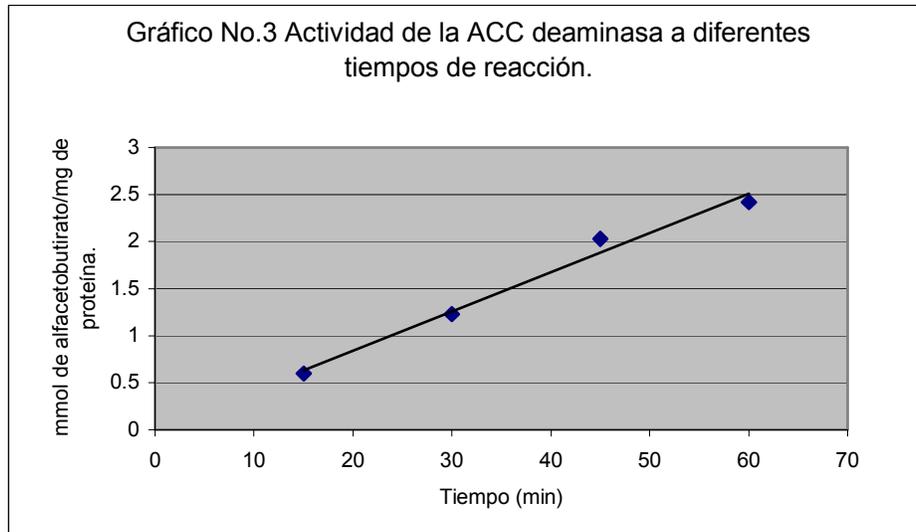


Anexo D. Actividad enzimática del ACC deaminasa a diferentes tiempos.

Debido a que en los artículos consultados existían discrepancias en cuanto al tiempo en el que la enzima (ACC deaminasa) se ponía con el sustrato (ACC). Se realizó una determinación para conocer el comportamiento de la actividad enzimática con respecto al tiempo.

Se tomó la cepa aislada AZm5 y se sometió a la determinación de la ACC deaminasa donde se vario el tiempo de incubación con el sustrato partiendo de 15 minutos hasta 60 minutos.

Así se obtuvo la siguiente gráfica.



Por lo que podemos observar la cantidad de α -cetobutirato producido por la acción de la enzima guarda una relación directamente proporcional con respecto al tiempo en el cual la enzima se pone en contacto con el sustrato. Por lo que para nuestra determinación aunque el tiempo de reacción fue de 30 min. es posible extrapolar los resultados a 60 min. Y así expresar la cantidad de α -cetobutirato producido por la enzima en una hora; es decir la actividad enzimática por hora.

Anexo E. Absorbancias obtenidas en la determinación de la actividad de la enzima ACC deaminasa, en 22 cepas de *Azospirillum*.

CEPA	Abs. a 540 nm SIN ACC	Abs. a 540 nm CON ACC	Abs. a 595 nm Proteínas.
AZm1	0.009	0.242	0.937
AZm1	0.015	0.301	1.015
AZm1	0.017	0.222	1.131
AZm1	0.018	0.36	1.132
AZm2	0.006	0.18	1.056
AZm2	0.015	0.198	1.097
AZm2	0.014	0.202	1.069
AZm2	0.025	0.224	1.081
AZm3	0.014	0.284	0.882
AZm3	0.016	0.311	0.883
AZm3	0.019	0.393	1.072
AZm3	0.022	0.414	1.072
AZm4	0.022	0.197	0.77
AZm4	0.029	0.271	0.849
AZm4	0.008	0.151	0.714
AZm4	0.012	0.156	0.74
AZm5	0.01	0.463	1.196
AZm5	0.012	0.466	1.234
AZm5	0.023	0.162	0.588
AZm5	0.024	0.179	0.893
AMs1	0.015	0.207	1.038
AMs1	0.015	0.199	1.013
AMs1	0.014	0.189	1.064
AMs1	0.019	0.222	1.073
VS1	0.007	0.118	0.978
VS1	0.01	0.132	1.019
VS1	0.013	0.092	0.633
VS1	0.025	0.132	0.667
LMG 6509	0.001	0	0.018
LMG 6509	0.004	0.001	0.03
LMG 7108	0	0.007	0.052
LMG 7108	0.001	0.008	0.059
LMG 10653	0.008	0.009	1.05
Continuación Anexo E.			
CEPA	Abs. a 540 nm	Abs. a 540 nm	Abs. a 595 nm

	SIN ACC	CON ACC	Proteínas.
LMG 10653	0.11	0.013	1.066
LMG13127	0.007	0.014	1.147
LMG13127	0.009	0.017	1.203
LMG13128	0	0.002	0.526
LMG13128	0.002	0.007	1.014
Sp7	0.005	0.005	0.907
Sp7	0.005	0.008	0.917
AMs2	0.001	0	0.99
AMs2	0.002	0.004	1.007
VS7	0.004	0.008	1.139
VS7	0.007	0.01	1.141
C4	0.005	0.009	0.861
C4	0.009	0.01	0.996
VS9	0.005	0.003	1.134
VS9	0.007	0.009	1.162
APV1	0	0.006	0.034
APV1	0.005	0.008	0.055
POX	0.004	0.008	1.156
POX	0.005	0.009	1.172
AMs3	0	0.002	0.194
AMs3	0	0.003	0.22
CPM-167	0.007	0.006	0.616
CPM-167	0.009	0.005	0.683
Cd	0.002	0.002	0.053
Cd	0.006	0.005	0.1

Calculo de la cantidad de α -cetobutirato (α -KB) en la cepa AZm1.

Se realiza una sustracción entre las absorbancias obtenidas teniendo el valor real de la absorbancia de α -cetobutirato

Abs. sin ACC = 0.009

Abs. con ACC = 0.242

Abs. real de α -KB = 0.233

La absorbancia real de α -cetobutirato se interpola con la curva patrón de α -cetobutirato teniendo:

$$\text{Concentración } [\mu\text{M } \alpha\text{-KB}] = \frac{\text{Absorbancia real a 540 nm} - \text{ordenada [b]}}{\text{Pendiente [m]}}$$

$$\text{Concentración } [\mu\text{M } \alpha\text{-KB}] = \frac{0.233 - 0.0143}{0.0023} = 95.0869 \mu\text{M } \alpha\text{-KB}$$

$$\begin{array}{r} 95.09 \mu\text{moles de } \alpha\text{-KB} - 1000 \text{ mL} \\ X \quad \quad \quad - 1 \text{ mL} \end{array}$$

$$X = \mathbf{0.09509 \mu\text{moles de } \alpha\text{-KB/ mL}}$$

Calculo de la cantidad de proteína total.

Absorbancia a 595 nm = 0.937

Interpolando con la curva patrón de BSA (proteína) teniendo :

$$\text{Concentración [mg/mL]} = \frac{\text{Absorbancia a 595 nm} - \text{ordenada [b]}}{\text{Pendiente [m]}}$$

$$\text{Concentración [mg/mL]} = \frac{0.937 - 0.1723}{9.6723} = \mathbf{0.07906 \text{ mg/mL de proteína}}$$

Relacionando la cantidad de $\mu\text{moles de } \alpha\text{-KB/ mL}$ con los mg/mL de proteína tenemos :

$$\frac{0.09509 \mu\text{moles de } \alpha\text{-KB/ mL}}{0.07906 \text{ mg/mL de proteína}} = 1.2027 \mu\text{moles de } \alpha\text{-KB / mg de proteína.}$$

Para finalizar se relaciona la cantidad de $\mu\text{moles de } \alpha\text{-KB / mg de proteína}$ con el tiempo para obtener la actividad de la enzima ACC deaminasa expresada por la cepa AZm1.

$$\begin{array}{r} 1.20 \mu\text{moles de } \alpha\text{-KB / mg de proteína} - 30 \text{ min.} \\ X \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad - 60 \text{ min} \end{array}$$

$$X = \mathbf{2.40 \mu\text{moles de } \alpha\text{-cetobutirato / mg de proteína / h}}$$

Cepa	$\mu\text{moles de } \alpha\text{-cetobutirato / mg de proteína / h}$
AZm1	2.40
AZm1	2.71
AZm1	1.67
AZm1	2.87

Promedio	Desviación estándar	Resultado final
2.41	0.5315	$2.41 \pm 0.53 \mu\text{moles de } \alpha\text{-cetobutirato / mg de proteína /h}$