



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S. C.

---

Programa de Estudios de Posgrado

**Efecto del ácido glucónico sobre la actividad de las enzimas encargadas  
de su metabolismo, en la bacteria promotora de crecimiento en plantas  
*Azospirillum brasilense* Cd asociada a plantas de mezquite  
(*Prosopis articulata* S. Watson)**

**TESIS**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en Biotecnología)

P r e s e n t a

**Luis Alonso Leyva Soto**

La Paz, B. C. S., Abril de 2006

## COMITÉ TUTORIAL Y DE REVISIÓN

**Dr. Yoav Bashan (Director)**  
Laboratorio de Microbiología Ambiental  
Programa de Planeación Ambiental y Conservación  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
La Paz, Baja California Sur, México

**Dr. Fernando Luis García Carreño (Tutor)**  
Laboratorio de Bioquímica  
Programa de Ecología Pesquera  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
La Paz, Baja California Sur, México

**Dr. Humberto Suzan Azpiri (Tutor)**  
Facultad de Ciencias Naturales  
Coordinador de la Licenciatura en Biología  
Universidad Autónoma de Querétaro  
Querétaro, Querétaro, México

## COMITÉ SINODAL

Dr. Yoav Bashan (Director)	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C
Dr. Fernando Luis García Carreño (Tutor)	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C
Dr. Humberto Suzan Azpiri (Tutor)	Universidad Autónoma de Querétaro
Dra. María Esther Puente (Suplente)	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C

## RESUMEN

Las interacciones entre plantas y microorganismos son un tema que ha sido estudiado desde hace varias décadas, por grupos de investigación de diferentes partes del mundo. Las bacterias, particularmente aquellas conocidas como Bacterias Promotoras del Crecimiento en Plantas (PGPB, en inglés), pueden ayudar al crecimiento de las plantas mediante diferentes mecanismos como la fijación de nitrógeno, la producción de fitohormonas y la producción de antibióticos, entre otros. En estas interacciones se beneficia tanto la planta como la bacteria, sin embargo, la mayoría de los estudios se centran en los mecanismos mediante los cuales la bacteria beneficia a la planta; los beneficios que la bacteria recibe no se han estudiado en detalle. Los árboles del Género *Prosopis* tienen importancia económica y ecológica en regiones semidesérticas como es Baja California Sur, mientras que el Género *Azospirillum* comprende las bacterias rizosféricas no simbióticas más estudiadas y mejor conocidas. Los organismos que se utilizaron en este trabajo para estudiar la interacción planta-bacteria fueron el mezquite (*Prosopis articulata* S. Watson) y la PGPB *Azospirillum brasilense* Cd.

La planta de mezquite produce ácido glucónico como exudado radical, el cual es fuente de carbono y energía para diversos microorganismos. El objetivo principal del presente trabajo fue el de evaluar la actividad de las enzimas gluconoquinasa (EC 2.7.1.12) y fosfogluconato deshidrogenasa (EC 1.1.1.44), de *Azospirillum brasilense* Cd, como un indicador del beneficio que la bacteria recibe de la planta. Estas enzimas son claves en la ruta conocida como Pentosas Fosfato (o ruta del fosfogluconato), una ruta metabólica importante en muchos organismos.

Los análisis se realizaron en experimentos con plantas de mezquite cultivadas en hidroponía e inoculadas con la bacteria. Se encontró diferencia significativa (ANOVA de una vía,  $p < 0.05$ ) en la actividad de la gluconoquinasa de *Azospirillum* en presencia de la planta, así como en cultivos in vitro con diferentes concentraciones de gluconato en el medio. Para la otra enzima no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, ni en los cultivos hidropónicos ni en los cultivos in vitro. Los resultados sugieren que: (i) *Azospirillum brasilense* Cd puede aprovechar el gluconato exudado por las raíces del mezquite como fuente de carbono y energía y, (ii) que la cuantificación de la actividad de gluconoquinasa, puede ser un indicador del beneficio que la bacteria recibe por asociarse con la planta.

Vo.Bo.

---

Dr. Yoav Bashan  
Director de Tesis

## ABSTRACT

Plant-microorganisms interaction is a topic that has been studied by many research groups around the world for few decades. The bacteria, mainly those called Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB), can help plants' growth by different mechanisms such as nitrogen fixation, production of phytohormones or production of antibiotics among other lesser known mechanisms. In these interactions the benefit is assumed to be mutual. However, most researches pay more attention to the mechanisms by which the bacterium helps the plant. The advantage for the bacteria from these interactions has not been studied in detail.

The trees of the genus *Prosopis* (mesquite) have economic and ecology significance in semiarid regions as Baja California Sur, while the genus *Azospirillum* includes the most studied and best known non-symbiotic rhizobacteria. The organisms used in this work to study the plant-bacteria interaction were mesquite (*Prosopis articulata*, S. Watson) seedlings and the PGPB *Azospirillum brasilense* Cd. It was found in the first step of this study that gluconic acid is produced by mesquite as root exudates and it is carbon and energy sources for *Azospirillum*. Therefore, the main objective of this work was to evaluate the enzymatic activity of gluconokinase (EC 2.7.1.12) and phosphogluconate dehydrogenase (EC 1.1.1.44) of *Azospirillum brasilense* Cd as an indicator of potential benefit that the bacterium may get from the plant. These are two key enzymes of the Pentose Phosphate Pathway, an important biochemical pathway in many organisms.

The tests for enzymatic activities in the bacterium were done in in-vitro cultures. The tests with plants were done in a hydroponic system with mesquite seedlings inoculated with *Azospirillum*. We found a significant difference (One Way ANOVA,  $p < 0.05$ ) in gluconokinase activity between non inoculated and inoculated plants. For in-vitro cultures of *Azospirillum* the same pattern was shown. For the enzyme phosphogluconate dehydrogenase no significant differences was shown in either in-vitro culture or in hydroponic cultures with plants. The results suggest that: (i) *Azospirillum brasilense* Cd can use the gluconic acid from root exudates of mesquite roots as carbon and energy source and, (ii) that the quantification of gluconokinase can serve as an indicator for the benefit for the bacterium associated with the plant.

## DEDICATORIA

*A mi esposa, Lourdes Mariana Díaz Tenorio, ya que de muchas formas es gracias a ella que estoy aquí.*

## AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca de Maestría # 181894 que me fue otorgada para la realización de mis estudios.

A Mariana que siempre me apoyó, y sobre todo, me presionó a dar lo mejor para sacar adelante el trabajo; porque creyó que podía cuando yo mismo tuve dudas.

A toda mi familia: mis padres (Jova Dimna e Isidro), mis hermanas (Nubia y Nidia), mis tíos, primos y abuelos; se que algunas veces no entendían porqué hacía una Maestría en lugar de ponerme "a trabajar", pero que de todas formas me apoyaron en todo momento, sin condiciones. La mayoría no entenderá muchas cosas de este trabajo, pero estoy seguro que se sentirán muy orgullosos con el sólo hecho de ver mi nombre en él.

A la familia de mi esposa (que ahora también es mía), que me dieron mucho apoyo en todo momento.

A mi comité tutorial por su apoyo y paciencia al revisar cada uno de los informes y avances que les enviaba para revisión. A su modo, cada uno aportó una parte de lo que ahora conozco acerca de la vida dentro de la ciencia.

Al Grupo de Microbiología Ambiental, principalmente al Dr. Bashan, Luz Estela y Esther. Dentro de este grupo encontré el espacio, los equipos, los consejos y la amistad en mis casi siete años como miembro. También a Manuel Antonio Ruiz por su ayuda con las imágenes.

A Manuel Moreno, que ya no pertenece al grupo pero que me ayudó mucho durante el tiempo que fuimos compañeros, incluso después de ya no formar parte del grupo.

Al Grupo de Bioquímica, especialmente a Ann, que me brindó todas las facilidades para realizar muchos análisis en el laboratorio del cual es responsable. Todos me brindaron su amistad, al grado de considerarme uno de ellos.

A Laura Carreón Palau, técnico responsable del Laboratorio de Microalgas quien me asesoró en los análisis de gluconato por Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas.

A Delia Rojas, técnico responsable del Laboratorio de Genética Molecular, por facilitarme reactivos cuando los míos todavía no llegaban.

A Heber Latisnere, responsable del Laboratorio de Biotecnología de Organismos Marinos, por facilitarme el acceso al equipo de sonicación.

Al personal de Posgrado y Biblioteca, que no se conformaron con cumplir su trabajo, que siempre me hicieron sentir confianza al realizar cualquier trámite o consulta. Siempre hicieron su trabajo y "un poquito más".

A mis compañeros de la Maestría, que entre juegos, bromas y mucho trabajo me dejaron ser parte de sus vidas. A muchos es probable que no los vuelva a ver pero seguro que los recordaré con cariño.

## ÍNDICE

	Página
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
Bacterias Promotoras de Crecimiento en Plantas (Plant Growth Promoting Bacteria; PGPB)	3
El Género <i>Azospirillum</i>	4
Procesos de asociación de <i>Azospirillum</i> con las plantas	6
La ecología de <i>Azospirillum</i> en el suelo	7
Promoción de crecimiento	8
Auxinas	8
Giberelinas	10
Citocininas	10
<i>Azospirillum brasilense</i>	10
Inoculación de plantas con <i>Azospirillum</i>	12
Metabolismo del gluconato	13
Importancia del gluconato	16
El árbol de mezquite	18
III. HIPÓTESIS	22
IV. OBJETIVOS	23
Objetivo general	23
Objetivos específicos	23
V. MATERIALES Y MÉTODOS	24
Obtención de las semillas de mezquite	24
Extracción y almacenamiento de las semillas	25
Manejo de las plantas en hidroponia	25
Germinación	25
Posgerminación	26
Hidroponia	26
Inoculación	27
Tratamiento de las plantas con fungicida	27
Cuantificación del gluconato por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS)	28
1. Curva de calibración	28
2. Preparación de la muestra	28
Preparación del inóculo	29



Extracto libre de células partiendo de los cultivos líquidos de <i>Azospirillum</i>	29
Extracto libre de células de las raíces de las plantas inoculadas	30
Cuantificación de proteína	30
Actividad de la enzima gluconoquinasa	30
Actividad de la enzima fosfogluconato deshidrogenasa	31
Diseño experimental y análisis estadístico	32
VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES	33
Cuantificación del ácido glucónico en los exudados radicales de mezquite por GC-MS	33
Determinación de la actividad de la enzima fosfogluconato deshidrogenasa comercial	35
Pruebas de sonicación	36
Efecto de la concentración de gluconato en el medio de cultivo	39
Experimento de inoculación con <i>Azospirillum brasilense</i> de plantas de mezquite cultivadas en hidroponía	42
Fosfogluconato deshidrogenasa	42
Gluconoquinasa	44
Respuesta de las plantas a la inoculación con <i>Azospirillum brasilense</i> Cd: Altura	49
VIII. CONCLUSIONES	52
IX. PERSPECTIVAS	54
X. REFERENCIAS	56
XI. ANEXOS	67
Anexo 1. Medio de cultivo TYG para bacterias diazotróficas	67
Anexo 2. Solución nutritiva para plantas	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Rutas Biosintéticas del ácido indolacético en <i>Azospirillum</i> . A triptofano transferasa, B indol piruvato descarboxilasa, C indol acetaldehído oxidasa, D triptofano hidrolasa, E indolacetamida hidrolasa, F triptofano descarboxilasa, G amina oxidasa. Tomada de Holguín y col. (1999)	9
Figura 2. Rutas bioquímicas implicadas en el aprovechamiento del ácido glucónico por parte de <i>Azospirillum brasilense</i> . La enzima marcada con el número 1 es la gluconoquinasa y la número 5 es la fosfogluconato deshidrogenasa. Fuente Westby y col. (1983)	14
Figura 3. Absorción y metabolismo del gluconato en <i>E. Coli</i> . Tomada de Tsunedomi y col., (2003)	15
Figura 4. Rutas alternativas del gluconato de acuerdo a los requerimientos metabólicos. Tomada de Mathews y col. (2000)	17
Figura 5. Cromatograma y espectro de masas de una muestra de exudados radicales de mezquite	34
Figura 6. Determinación de la actividad de la enzima fosfogluconato deshidrogenasa comercial (EC 1.1.1.44) a diferentes concentraciones	36
Figura 7. Cinéticas de la enzima fosfogluconato deshidrogenasa en los extractos de <i>A. brasilense</i> .	38
Figura 8. Cinéticas de la enzima fosfogluconato deshidrogenasa de los extractos de la bacteria crecida en diferentes concentraciones de gluconato en el medio de cultivo	39
Figura 9. Actividad específica de la enzima fosfogluconato deshidrogenasa de extractos de <i>Azospirillum brasilense</i> Cd, crecido en medio de cultivo TYG con seis diferentes concentraciones de gluconato	40
Figura 10. Actividad específica de la enzima gluconoquinasa de extractos de <i>Azospirillum brasilense</i> Cd crecido en medio de cultivo TYG con seis diferentes concentraciones de gluconato	41
Figura 11. Actividad específica de fosfogluconato deshidrogenasa en raíces de plantas de mezquite en hidroponía. Muestreo a los 15 días de inoculadas	42
Figura 12. Actividad específica de fosfogluconato deshidrogenasa en raíces de plantas de mezquite en hidroponía. Muestreo a los 23 días de inoculadas	43
Figura 13. Actividad específica de gluconoquinasa en raíces de plantas de mezquite en hidroponía. Muestreo a los 15 días de inoculadas	44
Figura 14. Actividad específica de gluconoquinasa en raíces de plantas de mezquite en hidroponía. Muestreo a los 23 días de inoculadas	45
Figura 15. Altura de las plantas en el experimento de inoculación de mezquite ( <i>Prosopis articulata</i> ) con la bacteria <i>Azospirillum brasilense</i> Cd en hidroponía, a los 23 días de inoculadas. Los valores son el promedio de dos experimentos. INOC= Plantas que fueron inoculadas, NO INOC= Plantas que no fueron inoculadas	49

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Fuentes de carbono usadas por el Género <i>Azospirillum</i> . Tomada de Hartmann y Zimmer (1994).	5

## INTRODUCCIÓN

Este trabajo formó parte del proyecto “Reforestación del desierto: el rol de los microorganismos del suelo y roca, y de las islas de recursos, en el establecimiento de plantas para la reforestación de áreas perturbadas”, a cargo del Dr. Yoav Bashan. Este proyecto cuenta con financiamiento SEP-CONACyT para la investigación básica, y en él se están evaluando diversas interacciones plantas-microorganismos, en campo, invernadero y laboratorio, siendo en ésta última etapa donde se enmarca este trabajo de tesis de maestría.

Las evaluaciones de interacción planta-microorganismos que se han evaluado son una herramienta importante para entender cómo las bacterias promotoras de crecimiento en plantas benefician a plantas nativas del desierto sudcaliforniano, que son importantes desde el punto de vista ecológico y económico. Una de esas plantas es el mezquite (*Prosopis articulata* S. Watson), la cual formó parte de esta investigación, y su asociación con *Azospirillum brasilense*, una bacteria con probadas capacidades benéficas para las plantas (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000). La importancia primordial del mezquite, además de sus múltiples usos de carácter económico, es el ser una planta nodriza para cactáceas, particularmente para el cardón gigante *Pachycerus pringlei*.

La investigación que se realizó va encaminada a entender cómo la planta puede beneficiar a la bacteria, proporcionándole ácido glucónico, compuesto que a la bacteria le sirve como fuente de energía y como fuente de carbono para la síntesis de moléculas. El mecanismo enzimático mediante el cual la bacteria metaboliza el ácido glucónico es complejo, involucrando alrededor de 20 enzimas.

Este trabajo pretendió conocer de qué manera el ácido glucónico puede modular la actividad de las enzimas fosfogluconato deshidrogenasa (EC 1.1.1.44) y la gluconoquinasa (EC 2.7.1.12), las cuales son importantes dentro de la ruta metabólica en cuestión, modificando la actividad de dichas enzimas. El porque se eligió a estas dos es que son las dos enzimas que se encargan de transformar al gluconato para ser utilizado en la ruta de las pentosas fosfato.

Finalmente se evaluó el crecimiento de las plantas de mezquite para conocer el efecto de la inoculación sobre la altura.

## MARCO TEÓRICO

### **Bacterias promotoras de crecimiento en plantas (Plant Growth Promoting Bacteria; PGPB):**

Para que una bacteria sea considerada como promotora del crecimiento en plantas, debe ejercer efectos favorables al desarrollo de la planta; ser capaz de colonizar las raíces después de que llega al tejido, y tener la capacidad de mantenerse por un período adecuado en la rizosfera. Se han reconocido diversos modos directos de acción de las PGPB según la especie e inclusive la cepa, encontrándose que algunas pueden ejercer más de uno de ellos (Bashan y de-Bashan 2005). Los más importantes son:

- Mejorando la disponibilidad de nutrientes en el suelo (principalmente nitrógeno, fósforo, oxígeno y hierro).
- Aumentando la absorción de nutrientes por las raíces.
- Produciendo antibióticos que reducen la actividad patogénica de otros microorganismos.
- Produciendo hormonas que estimulan la actividad radicular.

También hay efectos indirectos, como el que se da al actuar sobre el crecimiento radicular, que da como resultado una mayor área de contacto raíz-suelo, lo que resulta en una mayor absorción de agua y nutrientes. En general se considera que el efecto de una inoculación con PGPB no puede deberse a un solo modo de acción, sino al conjunto de dos o más simultáneamente (Bashan y col. 2004). Algunas especies de ciertos Géneros de bacterias se caracterizan por acciones específicas como *Rhizobium* para fijar nitrógeno, *Pseudomonas* para solubilización de fósforo o producción de antibióticos, o *Bacillus* para degradación de materia orgánica; por otra parte, todas ellas están

reportadas con capacidad de producir hormonas como auxinas (Tien, y col., 1979), giberelinas (Bottini y col., 1989) y citocininas (Del Gallo y Fendrik, 1994).

### **El Género *Azospirillum*:**

El Género *Azospirillum* comprende bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre que viven en la rizosfera, que proporcionan efectos benéficos sobre el crecimiento de las plantas; por lo anterior, son denominadas PGPB. La primera especie descrita de este género, llamada originalmente *Spirillum lipoferum*, fue aislada del suelo en Holanda en 1925 por Beijerinck (Döbereiner y col., 1976). Olvidada por medio siglo, *Azospirillum* fue “redescubierta” en la década de los 70’s por Döbereiner, durante una investigación sobre fijadoras de nitrógeno en la rizosfera de *Digitaria sp.* y *Zea mays* en Brasil (Döbereiner, 1983). Desde entonces, se han realizado aislamientos de diferentes especies de *Azospirillum*, en plantas tanto silvestres como cultivadas y en diversos tipos de suelos. A la fecha, 8 especies han sido caracterizadas dentro del género *Azospirillum*: *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. halopraeferans*, *A. irakense*, *A. largimobile*, *A. doebereineriae* (Bashan y col., 2004) y *A. oryzae* (Xie y Yokota, 2005).

Las especies del Género *Azospirillum* pueden utilizar una gran variedad de azúcares, alcoholes, y ácidos orgánicos como fuentes de carbono para su crecimiento. Todas las actividades enzimáticas de las rutas catabólicas de Embden-Meyerhof-Parnas, Entner-Doudoroff y ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs), incluyendo las reacciones anapletóricas, han sido detectadas en bacterias del Género *Azospirillum*. Sin embargo, en *A. brasilense* Sp7 y *A. lipoferum* Sp59, la baja actividad de la 6-fosfofructoquinasa indica que la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas no es usada en la dirección catabólica. La ausencia de la NADP<sup>+</sup>-dependiente 6-fosfogluconato deshidrogenasa

indica la ausencia de la ruta oxidativa de la hexosa monofosfato. Lo que indica diferencias en la utilización de algunas fuentes de carbono dependiendo de la especie (Hartmann y Zimmer, 1994).

**Tabla 1:** Fuentes de carbono usadas por el Género *Azospirillum*. Tomada de Hartmann y Zimmer (1994).

Fuente de carbono	<i>A.lipoferum</i>	<i>A. brasilense</i>	<i>A. amazonense</i>	<i>A.halopraeferans</i>	<i>A. irakense</i>
D-Glucosa	+	-	+	-	+
Glicerol	+	+	-	+	-
D-Manitol	+	-	-	+	-
Pectina	-	-	-	-	+
D-Sorbitol	+	-	-	-	-
Sucrosa	-	-	+	-	+

+ fuente de carbono utilizada.

La fuente de carbono más usada en los medios de cultivo es glucosa, en *A. brasilense*, a pesar de que posee todas las enzimas para la degradación de la glucosa, éste azúcar no se utiliza realmente ya que no se absorbe eficientemente. Además de los carbohidratos mono y diméricos, *A. brasilense* y *A. lipoferum* pueden degradar polímeros como xilano, almidón, celulosa y carboximetilcelulosa, los cuales están disponibles en la rizosfera de la planta hospedera (Hartmann y Zimmer, 1994).



### Procesos de asociación de *Azospirillum* con las plantas:

El proceso de asociación *Azospirillum*-planta no es tan ampliamente conocido como el que se da entre algunas leguminosas y bacterias del Género *Rhizobium*. Sin embargo, se han hecho estudios para conocer cómo se da esta interacción y se ha dilucidado parte del mecanismo. A continuación una secuencia hipotética de los eventos que se llevan a cabo en la asociación de las bacterias con la planta.

- La bacteria es atraída quimiotácticamente por los exudados de la raíz, tanto específica (por un compuesto proteico y por compuestos selectivos de carbono) como inespecíficamente.
- La bacteria se adhiere a la superficie de la raíz. Esta unión es débil y es mediada por el flagelo y algunos componentes del glucocálix (fase 1 de la adhesión). Durante este paso puede ser inducida una aglutinación por las lectinas de la planta.
- Hay un intercambio de mensajes entre la planta y la bacteria (no se sabe si sean flavonas/flavonoides como en el caso de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa).
- Las fibras de celulosa y glicoproteínas son producidas por *Azospirillum*, lo que ofrece un mejor anclaje de la bacteria a la superficie de la raíz, siendo esta la fase 2 de la adhesión (Bashan y col., 2004).
- La asociación es completamente establecida. Posteriormente tiene lugar una producción por la bacteria de sustancias promotoras del crecimiento de la planta, así como una estimulación de la producción de las hormonas endógenas de la planta. Las bacterias del género *Azospirillum* están presentes en la rizosfera y dentro de la raíz (en los espacios intercelulares). Ahora las células de la bacteria son pleomórficas, es decir, tienen más de una forma dentro de su ciclo de vida (Del Gallo y Fendrik, 1994).

### **La ecología de *Azospirillum* en el suelo:**

En la literatura existen reportes de *Azospirillum* aislada de suelo, aunque en pocos casos se han realizado análisis específicos de la relación rizosfera/suelo (Döbereiner y col., 1976). De Coninck y col. (1988) analizaron la presencia de *Azospirillum* en un experimento de inoculación en campo y encontraron de 10 a 100 veces más *Azospirillum* en las muestras de rizosfera que en las muestras de suelo. Albrecht y col. (1983) observaron que después de una inoculación masiva de un cultivo forrajero, en pocos días la población disminuía rápidamente y desaparecía en el suelo, aunque permanecía, en un bajo número, muy cerca o adherida a las raíces de las plántulas.

El aislamiento de una bacteria del suelo no indica que la célula es fisiológicamente activa, ya que ésta puede sobrevivir de manera vegetativa hasta la aparición de mejores condiciones para su crecimiento. La sobrevivencia de *Azospirillum* en el suelo sin la planta hospedera es desconocida, aunque estas bacterias muestran estrategias fisiológicas muy eficientes que podrían permitirle sobrevivir bajo condiciones desfavorables; estas estrategias son: enquistación, producción de melanina (Sadasivan y Neyra, 1987), producción de  $\beta$ -polihidroxibutirato y polisacáridos (Sadasivan y Neyra, 1985).

Aparentemente, *Azospirillum* puede mantenerse viable bajo condiciones severas: ha sido recobrada de agar disecado después de varios años lo que probablemente se deba a su capacidad de enquistación. Sin embargo, se debería tener en cuenta su habilidad para sobrevivir en número suficiente para asegurar la colonización y proliferación sin la planta hospedera, al ser usada como inoculante en experimentos de campo (Del Gallo y Fendrik, 1994).

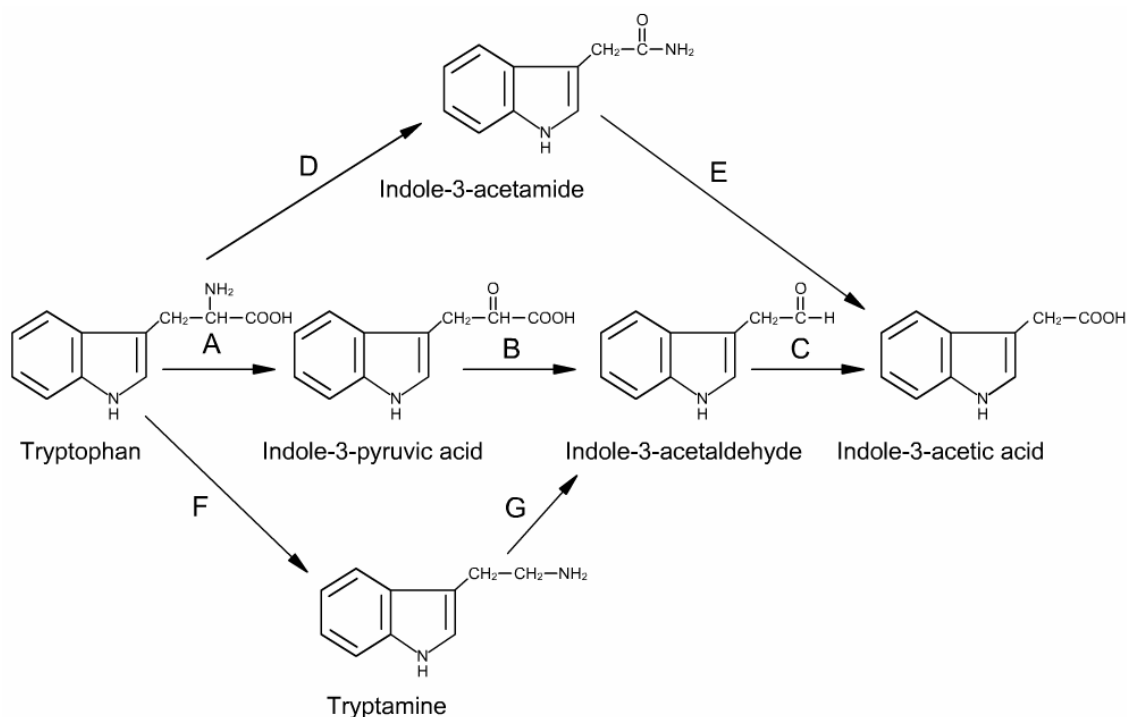
**Promoción de crecimiento:**

Como ya se mencionó anteriormente, los mecanismos mediante los cuales las PGPB ejercen sus efectos son variados. Uno de los que se consideran más importantes es la producción de sustancias con efectos de tipo hormona, comúnmente conocidas como fitohormonas (Bashan y de Bashan, 2005; Glick, 1995). Existen tres grupos principales: auxinas, citocininas y giberelinas (Bashan y Holguín, 1997).

**Auxinas:** Por medio de una mutagénesis con N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina, Katzy y col., (1990) obtuvieron mutantes de *A. brasilense* Cd (con altas tasas de producción de ácido indolacético), seleccionados por resistencia al 5-fluoro-triptófano; Los mutantes con baja producción de ácido indolacético (AIA) fueron seleccionados después de una mutagénesis Tn5, a partir de *A. lipoferum* y *A. brasilense* Sp6, o después de un "plasmid curing" para *A. brasilense* Sp245. Los mutantes de alta producción de AIA (FT326) no tuvieron un efecto significativo sobre el crecimiento de la raíz en trigo y maíz, comparados con la cepa silvestre de *A. brasilense* Cd, aunque en sorgo se requirió de una concentración más baja para producir efectos en la raíz. Los poco productores de AIA tienen casi perdida la habilidad para incrementar el número y longitud de las raíces laterales. Hasta ahora, ninguna de las selecciones realizadas ha logrado dejar a los mutantes de *Azospirillum* incapaces de sintetizar AIA, aunque en algunos casos sólo sea en mínimas cantidades. Debido a lo anterior, se propone que *Azospirillum* posee más de una copia de los genes involucrados en la biosíntesis de AIA, o bien, que tiene más de una ruta biosintética para el AIA (Holguín y col., 1999).

Investigaciones posteriores revelaron que no son dos rutas las que se siguen para la biosíntesis del ácido indolacético como se pensaba hace unos años, sino que hay al menos tres. Una de ellas es independiente del triptofano y dos son dependientes. En la figura 1 se pueden observar las rutas biosintéticas que se han propuesto para el AIA.

La primera ruta es la de ácido indolpirúvico (enzimas A, B y C en la figura) la segunda es la del indolacetamida (enzimas D y E) y la tercera es la ruta de la triptamina (enzimas C, F y G) (Holguín y col., 1999).



**Figura 1.-** Rutas Biosintéticas del ácido indolacético en *Azospirillum*. A triptofano transferasa, B indol piruvato descarboxilasa, C indol acetaldehído oxidasa, D triptofano hidrolasa, E indolacetamida hidrolasa, F triptofano descarboxilasa, G amina oxidasa. Tomada de Holguín y col. (1999).

**Giberelinas:** Se ha sugerido la producción de sustancias tipo giberelinas por *A. brasilense* Sp13t después de un prolongado cultivo de 10 días, ya que los extractos del cultivo causaron un alargamiento de los hipocotilos de la lechuga. Aunque esta prueba ha sido descrita como específica para giberelinas, la elongación de los hipocotilos es a menudo estimulada por auxinas, las cuales también son producidas por esta bacteria. Por lo tanto, la respuesta positiva a esta prueba no demuestra la liberación de giberelinas. Usando la prueba específica de liberación de alfa-amilasa del endospermo de cebada, no fue posible detectar giberelinas (límite de detección <25 pg/mL GA3) en los medios de cultivo de más de tres días de *A. brasilense* Sp7 o *A. lipoferum* Sp59. Las giberelinas A1, A3 e iso A3, fueron detectadas en cultivos de *A. lipoferum* op33 en concentraciones de 20 a 40 pg/mL por cromatografía de gases-espectrometría de masas (Bottini y col., 1989). Estudios más recientes muestran que el efecto observado en las plantas no sólo se debe a la producción de giberelinas por parte de la bacteria, sino que además depende también de una desconjugación de un compuesto giberelina-glucósido/ glucosil éster (Piccoli y col., 1999).

**Citocininas:** La liberación de sustancias tipo citocininas por *Azospirillum* fue propuesta desde que la fracción butanol de un cultivo de 10 días de edad de *A. brasilense* Sp13t mostró efecto similar sobre la retención de clorofila en hojas de avena, en un bioensayo de citocininas. Se encontraron trazas de algunas citocininas como trans-zeatin ribósido, isopenteniladenina y adenosina, en un cultivo de 60 días de *A. brasilense* Cd (mutante FT326) por radioinmunoensayo (Del Gallo y Fendrik, 1994).

#### ***Azospirillum brasilense:***

*Azospirillum brasilense* fue descubierto y descrito en 1979 en Brasil (de donde proviene su nombre) por Tarrand y colaboradores. Es un bacilo suavemente curvado de alrededor de 1 µm de ancho y

2-3  $\mu\text{m}$  de longitud. Es Gram-negativa, pudiendo presentarse alguna variabilidad relacionada con ciertas células encapsuladas conocidas como formas C. Presenta movilidad en medio líquido gracias a un único flagelo polar, pudiéndose formar numerosos flagelos cortos cuando se cultiva en medio sólido a 30°C. Vive normalmente en el suelo, ya sea libre o asociada a las raíces de muchas plantas como cereales, forrajes y tubérculos. Es oxidasa, catalasa, fosfatasa y ureasa positivo, no hidroliza el almidón ni la gelatina, no produce indol, y además es negativo en la prueba de Voges-Proskauer (2% de glucosa, 5 días). El porcentaje molar de G+C del DNA es de 70-71 % (Krieg y Hold, 1984).

Cultivado en placas de agar nutritivo la cepa Cd de *Azospirillum brasilense* presenta colonias redondeadas, mucosas y con una pigmentación rosada; el paquete celular obtenido por centrifugación de un caldo de cultivo conocido como TYG (triptona, extracto de levadura y glucosa, siglas en inglés) a las 16-20 horas de incubación, es rosado. Crece bien con sales de ácidos orgánicos como malato, succinato, lactato y piruvato. Utiliza algunos monosacáridos como fuente de carbono (por ejemplo, fructosa), no así a los disacáridos como maltosa y sacarosa. En medio con malato (semisólido) libre de nitrógeno, las células son principalmente vibroides, incluso cuando el cultivo llega a ser alcalino. Puede presentarse en formas encapsuladas conocidas como formas C, especialmente en cultivos viejos (Sadasivan y Neyra, 1987). Estas formas C son conocidas como quistes y se forman cuando los cultivos tienen una presión parcial de oxígeno alta (generalmente se asocia también con cultivos viejos); la morfología cambia y la bacteria se vuelve redondeada y pierde su movilidad y además acumula grandes cantidades de  $\beta$ -polihidroxibutirato (Pereg y col., 2000).

**Inoculación de plantas con *Azospirillum*:**

En la inoculación de plantas las condiciones bajo las cuales los resultados dan incrementos significantivos en campo, no están bien definidas. Se sabe que para niveles intermedios de fertilización con N<sub>2</sub>, o bien, en suelos con una moderada fertilización natural los resultados son más homogéneos. Los resultados de varios experimentos en campo con *Azospirillum* revelan que la asimilación total de N<sub>2</sub>, P, y K como resultado de la inoculación de las plantas, fue más alta en las plantas inoculadas que en aquellas que no fueron inoculadas. Los incrementos en el rendimiento fueron también acompañados por incremento en la concentración de N<sub>2</sub> en el área foliar, debido a la inoculación bacteriana, lo cual puede ser atribuido al incremento en la fijación de N<sub>2</sub> o incremento en la asimilación de N<sub>2</sub> por las plantas (Tilak y Annapurna, 1993).

Al inicio de las inoculaciones con *Azospirillum* en campo solo se ponía atención a parámetros relacionados con la fijación de nitrógeno, pero hoy se sabe que el efecto se debe a mucho más que simple fijación. En la actualidad existen más de 150 diferentes especies de plantas que pueden ser inoculadas con *Azospirillum*, muchas de ellas son botánicamente muy diferentes a las tradicionales como el sorgo, trigo y maíz (Bashan, y col., 2004). Incluso ha habido éxito con una mayor variedad de especies no cereales que con los propios cereales, demostrándose que *Azospirillum* no es planta-específico.

**Metabolismo del gluconato:**

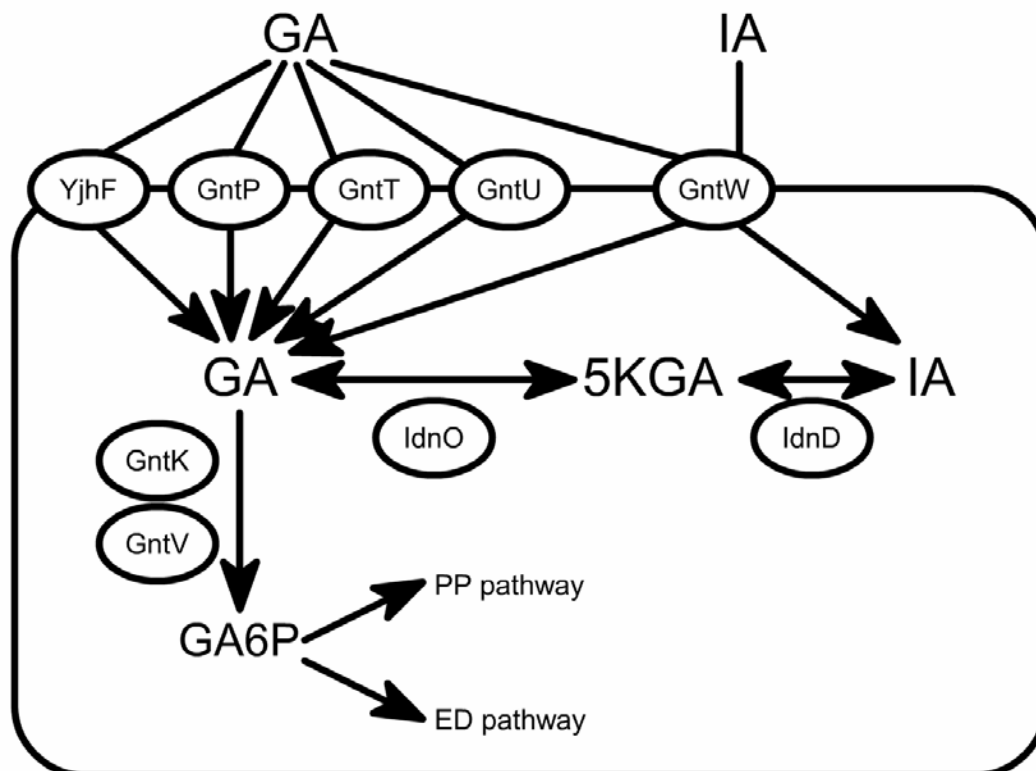
El mecanismo de aprovechamiento del gluconato (o ácido glucónico) es muy parecido al de la glucosa, obviamente debido a que éste es derivado directo de este azúcar, y están implicadas muchas enzimas comunes. Además, debido a que el gluconato es fuente tanto de carbono como de energía su metabolismo dependerá de los requerimientos de la bacteria en un momento dado. Si lo que la bacteria requiere es energía éste será convertido en 2 cetogluconato por la enzima gluconato deshidrogenasa (EC 1.1.99.3), posteriormente es convertido a otras moléculas para incorporarse al Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos (Ciclo de Krebs) para obtener energía (mediante poder reductor que se incorporará a la cadena de transporte de electrones para producir ATP). Por otro lado, puede también ser fosforilado por la enzima gluconoquinasa (EC 2.7.1.12) a fosfogluconato, el cual a su vez será convertido por la fosfogluconato deshidrogenasa (EC 1.1.1.44) en una pentosa fosfato; molécula que formará parte de una importante ruta productora de NADPH y ribosa fosfato para la biosíntesis de otras moléculas de importancia biológica. En este caso sirve como precursor de otras moléculas esenciales para el organismo como el DNA. Otra opción para el fosfogluconato es con la enzima fosfogluconato deshidratasa (EC 4.2.1.12) para obtener un compuesto precursor del glicerol fosfato y del piruvato, quienes juegan un papel central en el metabolismo energético. La interrelación de estas enzimas, así como la complejidad de las rutas, se puede observar en la figura 2 (Westby y col., 1983).





Zimmer, 1994) y también puede producirlo por inducción con glucosa (Puentes y col. 2004; Rodríguez y col., 2004).

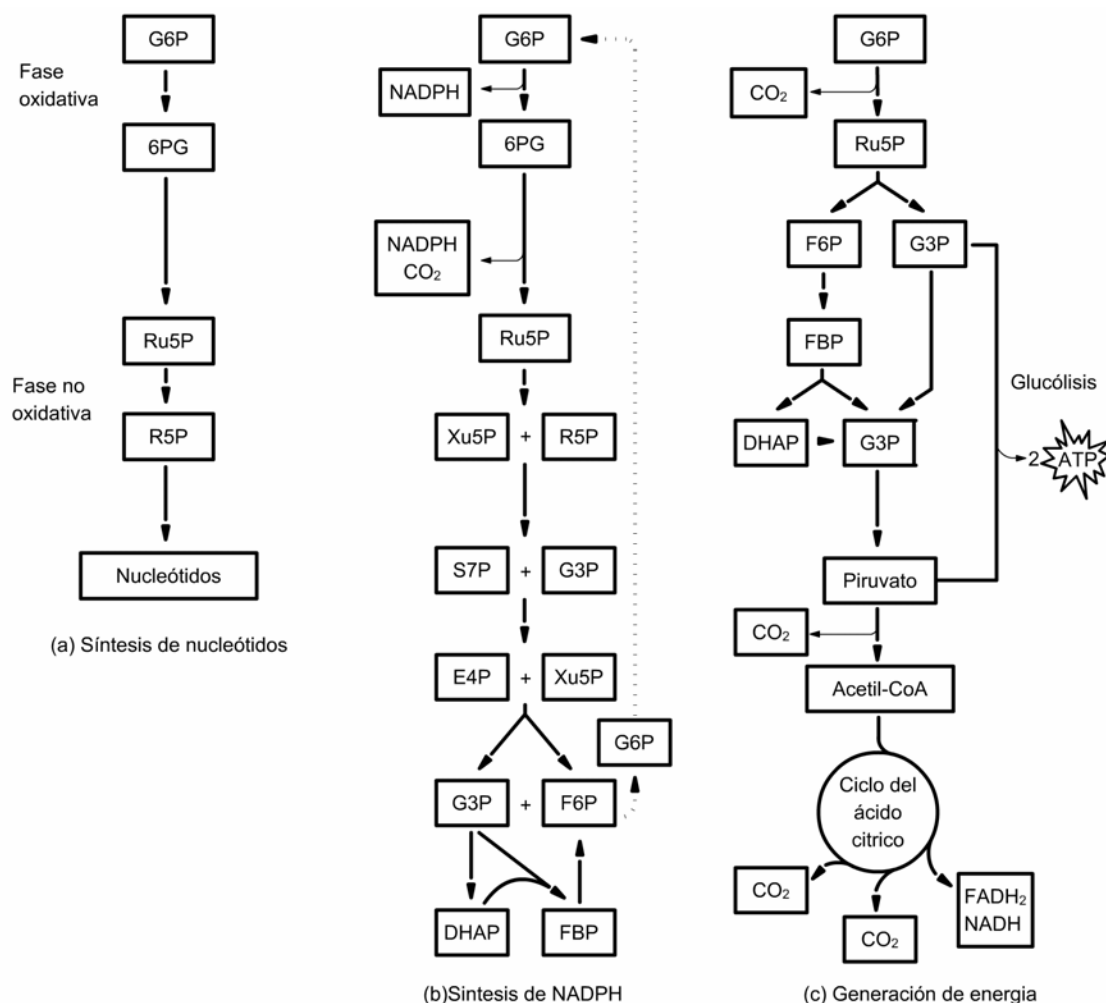
En cuanto a la genética que regula la absorción del gluconato se sabe que existen dos sistemas los cuales son conocidos como GntI y GntII. GntI es el principal y consta de dos gluconato permeasas, una de alta y otra de baja afinidad, así como una gluconoquinasa termoresistente, las cuales están codificadas por los genes *gntT*, *gntU* y *gntK*. El sistema auxiliar GntII consta de otra gluconato permeasa de alta afinidad y de una gluconoquinasa termosensitiva, codificadas por los genes *gntW* y *gntV* (Tong y col., 1996).



**Figura 3.-** Absorción y metabolismo del gluconato en *E. Coli*. Tomada de Tsunedomi y col., (2003).

**Importancia del gluconato:**

El gluconato es una molécula importante en la ruta bioquímica conocida como Pentosas Fosfato o del fosfogluconato. Las principales funciones de la vía de las pentosas fosfato son: generar NADPH y sintetizar azúcares de cinco carbonos (PENTOSAS-P). La unidad del poder reductor más provechosa con fines biosintéticos en las células es el NADPH. El NADH se oxida mediante la cadena respiratoria para generar ATP, mientras que el NADPH sirve como dador de electrones en las biosíntesis reductoras, sin generar ninguna energía como consecuencia. Esta vía metabólica se compone de dos fases, una primera oxidativa y otra de interconversión de azúcares. En la primera, la oxidación de glucosa-6-P hasta ribulosa-5-P se produce en dos reacciones que además generan CO<sub>2</sub> y 2 NADPH. En fase de interconversión se producen un conjunto de reacciones de: isomerización, epimerización, transaldolizaciones y transcetolizaciones, reacciones glicolíticas-gluconeogénicas que procuran un amplio conjunto de azúcares fosforilados, interconvitiendo las pentosas-P entre si, y finalmente de nuevo en hexosas-P. En la siguiente figura (figura. 4) se puede observar como se lleva a cabo el control de esta ruta (Mathews y col., 2000).



**Figura 4.-** Rutas alternativas del gluconato de acuerdo a los requerimientos metabólicos. Tomada de Mathews y col. (2000).

La ruta de las pentosas-P está controlada, a nivel de su primera reacción por la concentración de NADP<sup>+</sup>. En general el flujo de Glucosa-6-P por esta vía depende de las necesidades celulares de NADPH, ribosa-5-P y de ATP: *a-* Síntesis de nucleótidos el producto final será Ribosa 5-P. *b-* Demanda de poder reductor (NADPH) la Ribulosa-5P se convertirá en Fructosa-6P o en Glucosa-6P, que podrá iniciar de nuevo la vía. *c-* Generación de energía, cuando las necesidades de nucleótidos o de poder reductor son moderadas, los productos de reacción se oxidan en glicólisis y CAT (ciclo de los ácidos tricarboxílicos) para originar ATP (Mathews y col., 2000).

**El árbol de mezquite:**

El origen del Género *Prosopis* no está claro, según Landeras y col. (2005) éste tuvo lugar hace unos 70 millones de años, antes de que Sudamérica y África se separaran. El Género es nativo de América, África y Asia y comprende 44 especies agrupadas en 5 secciones y seis series; se acepta la presencia de dos grandes centros de diversidad para *Prosopis*: el México-Texano y el Argentino-Chileno-Peruano (Burkart, 1976). A pesar de ser un árbol muy común y de importancia económica en gran parte del país, existen muy pocos trabajos de investigación sobre el efecto de la inoculación con las PGPB del género *Azospirillum*; En el área de enzimología la cantidad de información disponible es todavía menor. El mezquite es una planta con múltiples usos en los lugares en los que se desarrolla. Además de su importancia económica (Felker y Guevara, 2003), también hay mucho que resaltar respecto a su importancia ecológica.

- Árbol o arbusto espinoso caducifolio, de 2-12 metros de altura
- Tronco corto y torcido, monopódico o ramificado desde la base
- Inflorescencias amarillentas dispuestas en racimos espigados
- Vaina fibrosa, recta, linear de 11-21 centímetros de largo
- Semillas aplanadas, redondeadas por una pulpa dulce, con testa delgada y permeable al agua
- Sistema radical freatofítico, muy eficiente, de rápido desarrollo, capaz de aprovechar las aguas del subsuelo. Raíces profundas
- Algunas especies son originarias de México; en nuestro país es muy común en los estados de B.C.S., Chihuahua, Coahuila, Guerrero, Michoacán, Oaxaca, S.L.P., Sonora, Veracruz y Yucatán

- Se desarrolla en climas cálidos y semicálidos con altas temperaturas, escasa precipitación e intensa insolación
- Crece en una gran variedad de suelos, incluso en suelos pobres como dunas, y pH mayor de 10
- Especie pionera, colonizadora, considerada para los procesos de regeneración, facilita el establecimiento de otros elementos
- Florece de diciembre a febrero, fructifica de febrero a abril
- El crecimiento radical es hasta 10 veces más rápido que el del tallo
- Como individuo adulto tiene gran capacidad para competir con malezas, pero como plántula le es difícil competir (Instituto Nacional de Ecología, 1994).

Sin duda la gran importancia ecológica del mezquite se basa principalmente en su capacidad para servir como árbol nodriza, es decir, facilita el crecimiento de otras plantas bajo el área que abarca su follaje. Es común en lugares semidesérticos (como los alrededores de La Paz) encontrar árboles de mezquite y apreciar que bajo su sombra crecen, protegidas, diferentes especies de plantas que incluyen cardón (*Pachycreus pringlei*), cholla (*Opuntia cholla*), pitahaya (*Stenocereus thurberi*) y garambullo (*Lophocereus schottii*). Cabe destacar que la capacidad de ser nodriza, cualidad que comparte con otras leguminosas como el palo fierro (*Olnella tesota*), se presenta casi exclusivamente en árboles maduros; los árboles jóvenes sólo ocasionalmente presentan este fenómeno (Carrillo-García y col., 1999).

Muchas especies del Género *Prosopis* pueden crecer en condiciones de alta salinidad, incluso a orillas del mar. Hay muchas otras plantas que pueden crecer en suelos con alta salinidad, sin

embargo, los mezquites son uno de los más benéficos tanto por sus vainas como por su madera. Las especies *Prosopis tamarugo* y *P. pallida* originarios de Hawai pueden crecer con agua marina pero *P. juliflora*, originario de Senegal, es la especie que presenta la mejor combinación entre tolerancia a la salinidad y velocidad de crecimiento (Velarde, y col., 2003).

Por otro lado, su importancia económica es también amplia, sobre todo por el ecosistema en el que se desarrolla, ya que es una parte importante del paisaje de lugares semidesérticos, donde las condiciones extremas de humedad y temperatura no permiten que crezcan muchos árboles; así que el mezquite proporciona muchas facilidades a los pobladores de esos lugares. Entre otros usos se conocen los siguientes:

Como alimento, en el suroeste de Estados Unidos y en varias regiones de México se utiliza como alimento, las vainas tienen un 80% de carbohidratos con gran contenido de fibra, 13% de proteínas y 3% de grasas. En algunas regiones se utiliza para preparar una bebida refrescante llamada mezquitatol, y la fermentación de las vainas produce una bebida semejante al whisky (SEMARNAT, 2001).

Como forraje, en 1965 se utilizaron en México alrededor de 40,000 toneladas de vainas para alimento de caballos, cerdos, ovejas y vacas; Como combustible, la madera, el carbón y las astillas de mezquite son excelentes combustibles (la madera proporciona alrededor de 17,000 BTU/kg) (Felker y col., 1983). Como materia prima en carpintería, donde proporciona un excelente balance entre el secado y el encogimiento o contracción, lo cual lo hace muy adecuado también para su uso en construcción de cercas (Felker y Guevara, 2003) Algunos otros usos del mezquite son: control de

los piojos, irritación de la garganta y úlceras de la piel (Felger, 1977). Además produce goma de calidad (comparable a la goma arábica, el algarrobo y el guar) que puede tener un valor económico apreciable.



## HIPÓTESIS

**“El ácido glucónico, producido como exudado radical por la planta de mezquite (*Prosopis articulata*), activará las enzimas encargadas de su metabolismo en *Azospirillum brasilense* permitiéndole colonizar las raíces de las plantas”**

## OBJETIVOS

### General

Cuantificar la actividad de las enzimas (fosfogluconato deshidrogenasa y gluconoquinasa) responsables del aprovechamiento del ácido glucónico por parte de *Azospirillum brasilense* Cd.

### Específicos

Cultivar plantas de mezquite en sistema hidropónico semi-axénico

Cuantificar la producción de ácido glucónico como exudado radical de mezquite mediante Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas

Detectar actividad enzimática de fosfogluconato deshidrogenasa y gluconoquinasa en cultivos *in vitro* de *Azospirillum brasilense* sin gluconato

Determinar el efecto del gluconato en el medio sobre la expresión de la actividad enzimática de la bacteria

Detectar actividad enzimática en la bacteria colonizando las raíces del mezquite cuando ha estado en contacto con los exudados de la planta

Medir la respuesta de la planta a la inoculación con *Azospirillum brasilense* evaluando su crecimiento.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Al menos que así se indique todos los reactivos fueron obtenidos de la misma compañía: (Sigma St. Louis, MO, USA)

### **Obtención de las semillas de mezquite:**

Las semillas se recolectaron en los terrenos del Comitán, La Paz, Baja California Sur, México, en un área localizada en los 24 °07' 36''N, 110° 25' 48''W. Geomorfológicamente es una planicie aluvial formada por la deposición de aluvión granítico derivado de la erosión de las montañas de la Sierra de la Laguna. El clima es cálido con una precipitación media anual de 180 mm, con lluvias principalmente a finales del verano. La temperatura media varía desde 18°C en enero (periodo frío) a 35°C en agosto (periodo cálido), con grandes variaciones durante el día-noche. Las temperaturas máximas y mínimas son: 26°C y 44°C en verano; 12°C y 24°C en invierno. La flora se caracteriza por ser una transición entre el matorral xerófito y el bosque tropical seco; muestra una relativamente modesta diversidad de plantas, incluyendo 136 especies de angiospermas (Carrillo-García y col., 1999).

Las vainas de mezquite se recolectaron en julio-agosto 2004 y 2005, época donde las plantas presentan casi la totalidad de las vainas ya bien maduras. Se muestrearon 10 árboles, obteniendo aproximadamente 0.2 Kg. /árbol. Es importante que las vainas sean de las que están secas pero que aun permanecen en el árbol, ya que son las que presentan el mayor porcentaje de germinación, el cual puede ser de hasta un 80%. Las vainas se pusieron en bolsas plásticas que se etiquetaron con los datos de la ubicación del árbol, la fecha y características de la planta. Se llevaron al

laboratorio para extraer las semillas y seleccionarlas debido a que algunas presentan infección con la larva de un escarabajo de la familia Bruchidae, identificado como *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Laboratorio de entomología, CIBNOR, S.C., 2006) un parásito natural muy común en Baja California Sur, conocido comúnmente como gorgojo del frijol.

### **Extracción y almacenamiento de las semillas:**

Para extraer las semillas se utilizó un molino mecánico para carne adaptado con una malla con perforaciones de alrededor de 1 centímetro (Felker, P. comunicación personal). Se pusieron las vainas en la tolva del molino y se hizo girar el tornillo sinfín, las semillas que pasaron la malla fueron recogidas en una charola y se les retiró la paja. Se seleccionaron las semillas eliminando aquellas que presenten la larva del escarabajo; en ocasiones la presencia es fácilmente detectada a simple vista, caso contrario se debe poner atención a un pequeño punto negro en alrededor de un tercio de la longitud de la semilla. La presencia de este punto indica contaminación con la larva. Una vez seleccionadas las semillas se pusieron en un recipiente de cristal con tapa hermética y se refrigeraron a unos 2-6°C. Estas semillas pueden ser utilizadas posteriormente cuando sea necesario.

### **Manejo de las plantas en hidroponia:**

**1. Germinación:** Las semillas de mezquite se germinaron en charolas especiales de plástico con tapa de 25 x 40 cms. Se esterilizaron toallas de papel en autoclave a 121 °C a 15 libras/pulgada<sup>2</sup> de presión (psi) y se colocaron en la charola previamente higienizada con una solución de hipoclorito de sodio al 3% en agua. Las semillas se higienizaron de la siguiente manera: 5 minutos en agitación con la solución de hipoclorito al 3%, se decanta el líquido y se lava 5 veces con agua destilada, un

minuto cada lavado. Después de higienizadas es necesario llevar a cabo un proceso de escarificación para facilitar la germinación; para esto se sumergieron las semillas en agua hirviendo durante 1 minuto dentro de una red metálica, se sacaron, se lavaron con agua destilada, se dejaron 4 horas en agua destilada y finalmente se sembraron en la charola. La charola se guardó en oscuridad durante dos días a 33°C; al tercer día se sacó a la luz (40 micromoles/m<sup>2</sup>/s) para evitar que las plantas puedan etiolarse, esto se logró poniendo las charolas en la cámara de cultivo (Modelo 125L, Conviron, Manitoba, Canada).

**2. Posgerminación:** Al sacar las plantas de las charolas de germinación se pusieron en un recipiente con área grande pero poca profundidad (25x25x5 cms) y se dejaron ahí con solución nutritiva (ANEXO 2), diluida 1:2 con agua, unos dos o tres días en cámara de cultivo a 33°C, 70% de humedad relativa y fotoperiodo 12-12 luz-oscuridad. También se realizó la germinación en charolas metálicas de 45x20x10 cms esterilizadas en autoclave (15 minutos, 121°C, 15 libras por pulgada cuadrada (psi) de presión), y cubiertas con papel aluminio. La mayoría de estos pasos se hicieron en campana de flujo laminar para evitar el crecimiento de hongos parasíticos.

**3. Hidroponia:** Después de dos o tres días en la luz, las plantas tenían una radícula fuerte (de alrededor de 10 cms de largo) y con una longitud foliar de 5 cms; se trasplantaron en tubos de ensaye con tapa de rosca perforada de 25 mL. Los tubos se llenaron con 20 mL de agua destilada y se les agregó 5 mililitros de solución Hoagland (solución nutritiva, ANEXO 2) concentrada 5X. Se dejó crecer hasta que las primeras hojas verdaderas aparecieron; una vez que las hojas aparecieron las plantas estaban listas para inocularse. El tiempo para la aparición de estas hojas es alrededor de dos días. Las condiciones son las mismas que se describieron para el crecimiento postgerminación.

**4. Inoculación:** Para la inoculación se utilizó una suspensión de *Azospirillum brasilense* en solución salina (NaCl 0.85%) de  $10^9$  Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mL; se agregó 1 mL de esta suspensión en cada tubo, obteniendo una concentración celular de  $10^9$  UFC/planta. Posteriormente se agregó solución nutritiva una vez por semana (alrededor de 10 mL/semana para mantener las plantas sanas). Cuando fue necesario se recuperó el volumen original con agua destilada estéril, para evitar que las raíces de las plantas estén fuera del agua. Es muy importante mantener las raíces y la solución nutritiva en oscuridad, para evitar que crezcan microalgas en los tubos. Lo anterior se logró envolviendo las gradillas en papel aluminio, permitiendo que las plantas mantengan el área foliar en contacto directo con la luz. Mismas condiciones mencionadas anteriormente.

**5. Tratamiento de las plantas con fungicida:** Muchos hongos pueden crecer bajo las condiciones que se manejaron las plantas y es necesario evitarlos hasta donde sea posible. Se usaron dos diferentes formas de tratar las plantas con fungicida: la primera es con un tratamiento con previcur® (Bayer, México) (Carbamato de propil[3-(dimetilamino) propil] clorhidrato 72,2% p/v en agua) disuelto (1 mL/L ) en la solución en la que se encontraban las plantas previo a la inoculación; la segunda fue un tratamiento con el mismo fungicida. Se pusieron las plantas en vasos de precipitado con una solución de previcur® ahora más concentrado (2 mL/L agua) con las raíces totalmente sumergidas y se dejaron media hora. Después de este tratamiento se lavaron las raíces con agua destilada y se pusieron en los tubos para inocular.

## **Cuantificación del gluconato por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS):**

**1. Curva de calibración:** Se pesó un miligramo del estándar de gluconato y se agregó a un tubo de ensaye con tapa de rosca. Se derivatizó la muestra agregando 500  $\mu\text{L}$  de una solución de Metanol-Ácido clorhídrico (1:1 v/v, concentrados) enfriado previamente en congelador de  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se selló el tubo con teflón y se puso a baño maría ( $90^{\circ}\text{C}$ ) durante dos horas. Se sacó el tubo de baño maría y se dejó enfriar a una temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ - $30^{\circ}\text{C}$ , se agregaron 1.5 mL de hexano grado HPLC y se agitó suavemente. Se dejó reposar el tubo y se tomó la capa superior que es donde se encontraba el metil-gluconato. Se tomaron 6 viales y se pusieron en ellos el equivalente a 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 y 400  $\mu\text{g/mL}$ , ajustando las concentraciones con hexano. Se sellaron los viales y se pusieron en el carrusel de muestras del equipo. Se cargó el método y la secuencia de muestreo y se inició el equipo.

**2. Preparación de la muestra:** Se obtuvieron los exudados radicales de las muestras necesarias (250 mL de la solución de germinación) y se secaron a baja temperatura (en horno de convección a  $40^{\circ}\text{C}$ ). Se derivatizaron de la forma descrita previamente y se inyectaron en los viales diferentes cantidades de la muestra (100, 200, 300, 400 y 500  $\mu\text{L}$ ), necesarias para entrar al rango manejado en la curva de calibración. Una vez terminada la corrida en el equipo se calcularon las concentraciones en la muestra utilizando los parámetros obtenidos en la curva de calibración. El método utilizado fue generado bajo la supervisión de la M. en C. Laura Carreón Palau, técnico responsable del Laboratorio de Microalgas, CIBNOR, S.C. (2005)

**Preparación del inóculo:**

El inóculo se obtuvo mediante la reactivación de la cepa, conservada en nitrógeno líquido, en cajas Petri con agar nutritivo por la técnica de estría cruzada, incubando a 36-37 °C, durante 48 horas. Posteriormente se seleccionó una colonia aislada y se verificó pureza por morfología colonial y celular (macro y microscópicamente). Se transfirió una asada abundante a matraces Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de medio de cultivo líquido TYG (medio mineral con triptona, extracto de levadura y glucosa) (ANEXO 1) y se incubaron a 35°C, 130 rpm durante 24 horas. Después de transcurrido este tiempo se tomaron dos mililitros del cultivo celular y se transfirieron a matraces con el mismo medio de cultivo fresco y se incubaron a las mismas condiciones durante 16 horas para tener un cultivo joven (Bashan y col., 2002). Es importante respetar los tiempos debido a que la bacteria tiene un tiempo de duplicación corto, por lo que una o dos horas de diferencia pueden representar una gran diferencia en la cantidad y fisiología de las células.

**Extracto libre de células partiendo de los cultivos líquidos de *Azospirillum*:**

Un total de 400 mL del cultivo celular se centrifugó para obtener el paquete celular (4000 x g, 10 min), el cual se lavó dos veces con solución salina (0.85%) y se resuspendió en Buffer de rompimiento ("Breacking Buffer" (BB), 0.01 M Tris [2-amino-(hidroximetil)-1,3 propanodiol]) pH 7.2, 0.01 M MgCl<sub>2</sub>, 0.001 M DTT [dithiothreitol]) a una relación de 2% del volumen original de medio de cultivo. Para romper las células se sometieron a un proceso de sonicación (tres ciclos de 30 segundos y dos de 1 minuto con un minuto de incubación en baño de hielo después de cada ciclo (Ultrasonic Homogenizer 4710Series, Cole-Parmer Instruments, USA)). Se centrifugó a 10,500 x g, durante 30 minutos en refrigeración para separar los restos celulares; se descartó el pellet y se trabajó el sobrenadante como el extracto enzimático (Fraenkel y Levisohn, 1967).



**Extracto libre de células con las raíces de las plantas inoculadas:**

Se sacaron las plantas de la cámara de crecimiento y se tomaron 5 muestras de cada tratamiento. Cada muestra consta de las raíces de tres plantas. Se cortaron las raíces de las plantas en partes pequeñas y se pusieron en un tubo de dos mililitros con 1 mililitro de BB preenfriado y se maceraron con ayuda de un émbolo de cristal. Desde el momento en que se agregó el BB las muestras se mantuvieron en frío (baño de hielo). Una vez maceradas las muestras se llevaron a homogenizar por sonicación a las mismas condiciones descritas en el punto anterior. La recuperación del extracto se hizo también de la misma forma que se describió previamente para la bacteria.

**Cuantificación de proteína:** Se midió proteína mediante el método descrito por Bradford (1976).

**Actividad de la enzima Gluconoquinasa:**

El análisis está basado en un método descrito por Wang y Dykhuizen (2001). A un volumen de 100  $\mu$ L de extracto libre de células se le agregó 1 mL de una mezcla de reacción a 37°C. Esta mezcla contenía 50 mM de buffer HEPES (1-Piperazina etano ácido sulfónico 4-(2-hydroxyethyl)- sal de sodio, pH 7.6 a 37°C)(J.T. Baker, Phillipsburg, N.J., USA), 10 mM de  $MgCl_2$ , 3 mM de ATP, 1 mM de gluconato, 0.2 mM de NADP, y una unidad de 6 fosfogluconato deshidrogenasa. Se midió la absorbancia a 340 nm a 37°C con un espectrofotómetro (UV/VIS Lambda Bio 20, Perkin-Elmer, USA). La reacción inició al agregar el extracto enzimático y se monitoreó por 10 minutos. Este equipo cuenta con un dispositivo de 8 celdas lo que permitió utilizar las 5 réplicas y dos controles (positivo y negativo) al mismo tiempo. Como control positivo se utilizó un estándar enzimático comercial (de la enzima fosfogluconato deshidrogenasa) y como control negativo la misma mezcla de reacción pero sustituyendo el extracto por 100  $\mu$ L de agua destilada.

**Actividad de la enzima Fosfogluconato deshidrogenasa:**

Para este ensayo se utilizaron las mismas condiciones que para el anterior, sin agregar ATP ni fosfogluconato deshidrogenasa. En lugar de gluconato se agregaron 500  $\mu\text{M}$  de fosfogluconato como sustrato para la enzima. Al igual que la enzima anterior, se midió absorbancia a 340 nm en un ensayo cinético de 10 minutos en un espectrofotómetro (UV/VIS Lambda Bio 20, Perkin-Elmer, USA). En ambos casos, una unidad enzimática es aquella cantidad de enzima que produce un cambio de absorbancia por minuto de 0.5.

La mezcla de reacción fue preparada justo en el momento en que iba a ser utilizada, debido a que se perdía actividad si se almacenaba.

## DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El diseño experimental es por bloques completamente al azar, donde cada bloque consta de 40 plantas inoculadas y otras 40 no inoculadas como control. El diseño de bloques al azar o Random Block se debe a que se trata de eliminar la variabilidad propia de las plantas, las cuales pueden presentar marcadas diferencias en la altura por germinar con unas horas de diferencia. Además, se trató de seleccionar las plantas de un tamaño homogéneo (aproximadamente 5 cms de longitud foliar), por la misma razón anterior. Se realizó el experimento con su respectiva repetición, para corroborar los datos obtenidos en el primero. En cada uno de los experimentos se llevaron a cabo dos muestreos; el primero fue a los 15 días posteriores a la inoculación y el segundo 8 días después (a 23 días de la inoculación). Los resultados corresponden al promedio de dos experimentos idénticos realizados en diferentes tiempos. Los análisis estadísticos que se emplearon para estos experimentos fueron en cada caso un Análisis de Variancia (One Way ANOVA), con un coeficiente de confianza del 95% utilizando el paquete Statistica versión 6.0 (Kernel release, StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Lo anterior debido a que en cada caso las condiciones se mantuvieron controladas y se trataba de determinar el efecto de la variable inoculación. Los resultados a los que no se les realizó análisis estadístico, dado que no se consideró necesario, se presentan como gráficas generadas con el programa SigmaPlot 9.0 (Systat Software Inc. Richmond, CA, USA).

En todas las gráficas a partir de la número 11 los rótulos son como sigue: INOCULAD (rótulo de la izquierda) se refiere a plantas que recibieron la inoculación con *Azospirillum brasilense* Cd; las rotuladas como NO INOC (a la derecha en la gráfica) son las plantas que no se inocularon. CONTROL se refiere a un extracto de la bacteria sola, en un cultivo de 16 horas en TYG.

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

### **Cuantificación del ácido glucónico en los exudados radicales de mezquite por GC-MS:**

Se cuantificó el gluconato por Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas en un equipo Modelo GCD Plus (Hewlett Packard, USA). Se realizó una curva de calibración y posteriormente se realizó la inyección de muestras de exudados radicales de mezquite y se encontró que la concentración en dichos exudados es de alrededor de 20  $\mu\text{g/mL}$ , que de acuerdo al peso molecular del gluconato representa alrededor de 0.1 mM, es decir, 1/10 de la concentración utilizada en los ensayos previos que es de 1 mM. Cabe mencionar que la concentración de 1 mM está calculada de tal forma que éste no sea el reactivo limitante. El cromatograma y el espectro de masa para la muestra se puede observar en la figura 5. Para los estándares el tiempo de retención fue de 14.24 minutos y el pico más abundante es aquel que corresponde a una relación masa/carga ( $m/z$ ) de 43. En la figura 5 se ve un pico correspondiente al tiempo de retención de 14.24 minutos, y además el espectro de masas muestra que el pico más abundante es también el de  $m/z$  de 43. Una búsqueda en la librería del equipo arroja una semejanza entre espectros (estándar y muestra) mayor del 85 %, de tal modo que podemos decir, con un grado de confiabilidad bastante alto, que el pico presente en la muestra corresponde al gluconato. En ambos casos, el pico marcado con la  $m/z$  de 18 corresponde al agua, común en casi la totalidad de las muestras analizadas por este método.

Además del método utilizado en este trabajo se puede cuantificar gluconato de otras formas. En los años 50-60 se utilizaba la propiedad de los hidroxiacidos (el gluconato es uno de ellos) para reaccionar con compuestos de fierro y formar compuestos coloridos, para cuantificar de forma espectrofotométrica a 400 nm (Reinder, 1955). Por supuesto no era un método muy preciso, así que

surgieron otras formas para la cuantificación como la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), que es un método muy preciso y sensible (Zelic y col., 2002, Herrmann y col., 2004). Previo al análisis realizado con el GC-MS si hicieron análisis preliminares con el método espectrofotométrico, para saber si había gluconato, aunque no se pudiera cuantificar, este análisis nos sirvió para preparar las muestras para el análisis más detallado del cromatógrafo.

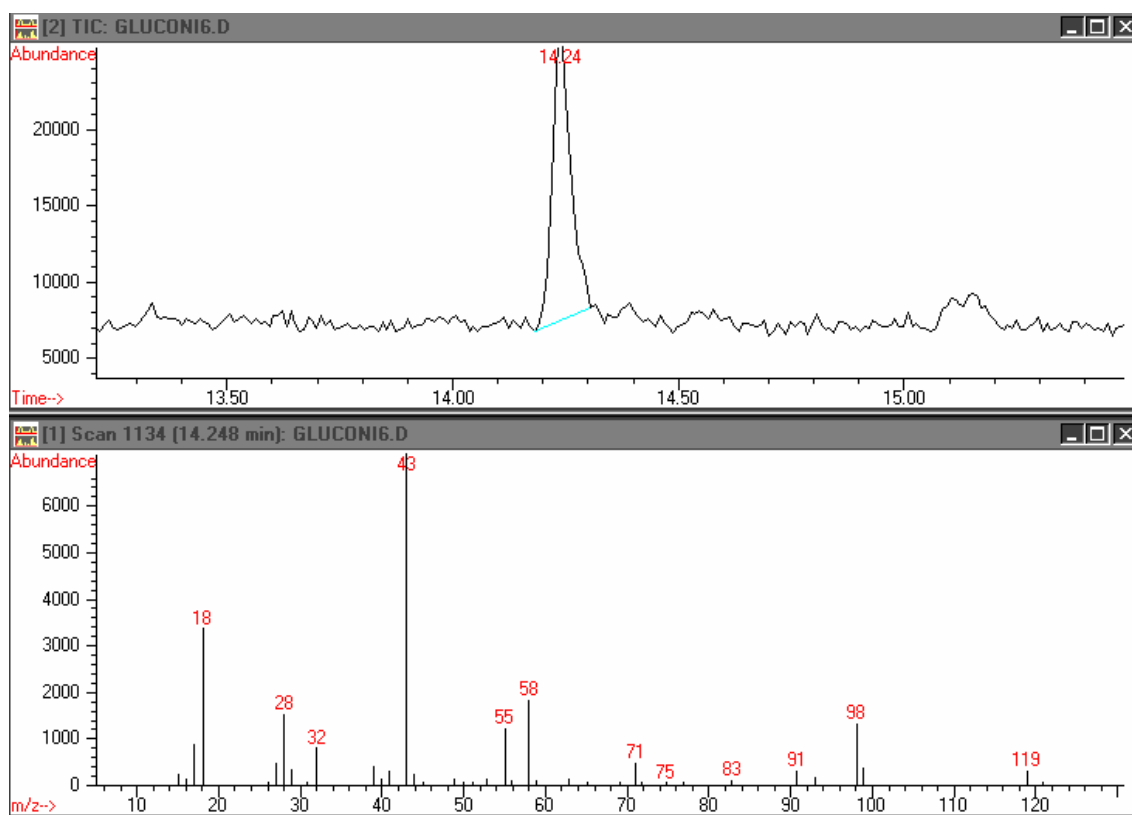


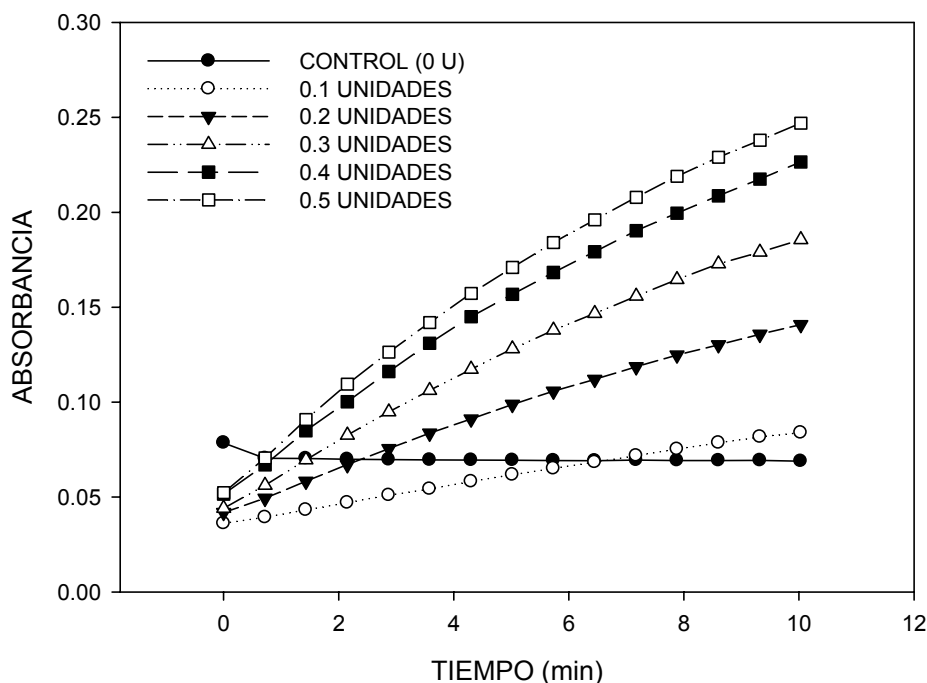
Figura 5.- Cromatograma y espectro de masas de una muestra de exudados radicales de mezquite.

**Determinación de la actividad de la enzima fosfogluconato deshidrogenasa comercial:**

Se realizó un ensayo cinético con la enzima fosfogluconato deshidrogenasa (EC 1.1.1.44) (Sigma, St. Louis, MO, USA) para corroborar la metodología correspondiente a la determinación de su actividad. Se probaron diferentes concentraciones de la enzima comercial y se obtuvo el resultado que se muestra en la figura 6. Este ensayo nos permitió conocer el comportamiento de la enzima Fosfogluconato deshidrogenasa comercial, la cual nos serviría posteriormente como control positivo en las siguientes pruebas.

Las enzimas que se cuantificaron son secuenciales, es decir, el producto de la primera es el sustrato para la segunda. La reacción completa va desde el gluconato, se fosforila con la gluconokinasa y el fosfogluconato obtenido sirve de sustrato a la deshidrogenasa. De tal manera, que se puede realizar la cuantificación de las dos con un mismo estándar comercial.

## CINÉTICA DE FGDH



**Figura 6.-** Determinación de la actividad de la enzima fosfogluconato deshidrogenasa comercial (EC 1.1.1.44) a diferentes concentraciones.

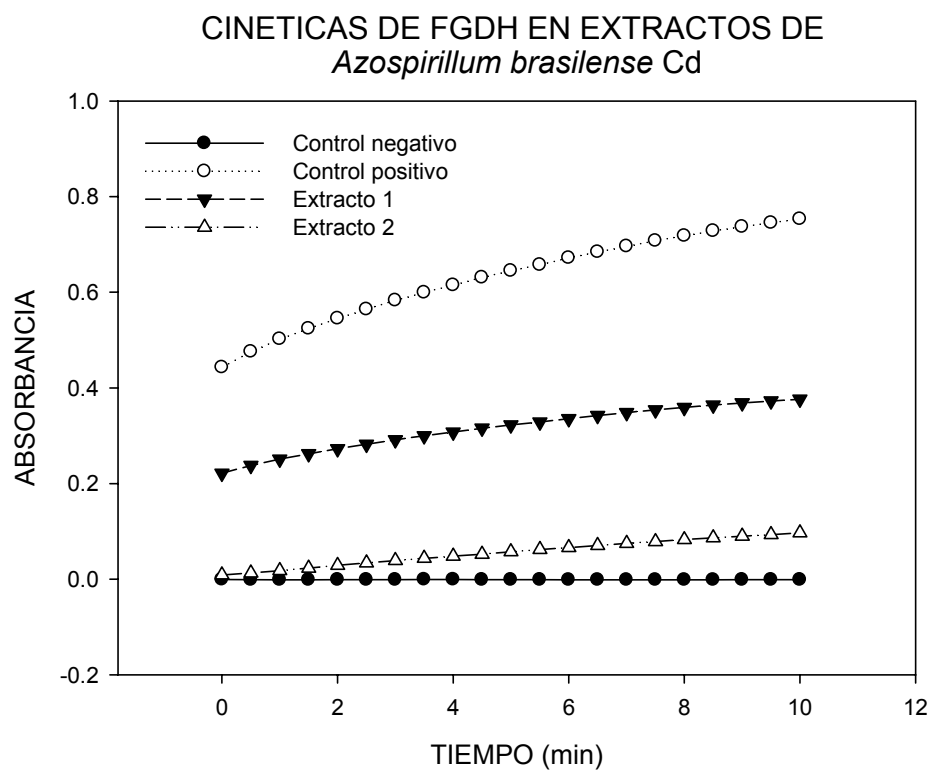
### Pruebas de sonicación:

El paso crítico para la extracción correcta de la enzima es el de homogenizado; si se hace bien el ensayo puede llevarse a cabo, de no ser así, se presentan problemas que pueden llegar a ser complejos. En la literatura existen variaciones en cuanto al tiempo de sonicación, debido a que cada organismo presenta diferentes características en su membrana y/o pared celular. En Ocasiones sólo es necesario utilizar un homogenizador de tejidos (Yum y col., 1997), otras veces se requiere un buffer de rompimiento junto con la sonicación (Wang y Dykhuizen 2001); otras más se utiliza un método de congelación-descongelación (Tetaud y col., 1999) o una prensa francesa (Matsuchita y

col., 2003). Lo que se busca al utilizar cualquiera de estos métodos (o incluso otros), es exponer el contenido citoplásmico rompiendo la membrana celular.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en la figura anterior se procedió a realizar ensayos cinéticos con extractos celulares tomando como control positivo la enzima comercial en una concentración equivalente a 0.2 U de actividad. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6. Se trabajaron dos métodos para la homogenización, el primero (extracto 1) con 5 pulsos de 1 minuto con baños de hielo de 1 minuto después de cada pulso; el segundo (extracto 2) fueron tres pulsos de 30 segundos y dos más de 1 minuto con intervalos en baño de hielo de 1 minuto; se realizaron dos lecturas de cada extracto. En la figura 7 puede verse que el extracto manejado con el método 2 presenta un mejor resultado, es decir, el cambio de absorbancia por minuto es mayor que con el otro método. El control positivo, como ya se mencionó, es enzima comercial, mientras que en control negativo es la mezcla de reacción a la que le fueron adicionados 100  $\mu$ L de agua destilada en lugar del extracto enzimático.





**Figura. 7.-** Cinéticas de la enzima fosfogluconato deshidrogenasa en los extractos de *A. brasilense*.

### Efecto de la concentración de gluconato en el medio de cultivo:

Posteriormente se realizaron dos experimentos con diferentes concentraciones de gluconato en el medio de cultivo de la bacteria para ver el efecto que éste pudiera tener sobre la actividad de fosfogluconato deshidrogenasa. Los resultados se presentan en la figura 8. El control negativo es la misma mezcla de reacción pero sin agregar enzima, mientras que el control positivo es una preparación con la enzima comercial. En este ensayo no encontramos diferencias en el cambio de absorbancia por minuto entre las 3 concentraciones, a pesar de que en la gráfica se vean diferencias en los valores. La diferencia entre en el punto de inicio de cada concentración se debe a que el color del extracto era diferente porque el medio cambiaba de color a diferentes concentraciones de gluconato; sin embargo, el cambio de absorbancia es casi constante.

### CINÉTICA DE FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA

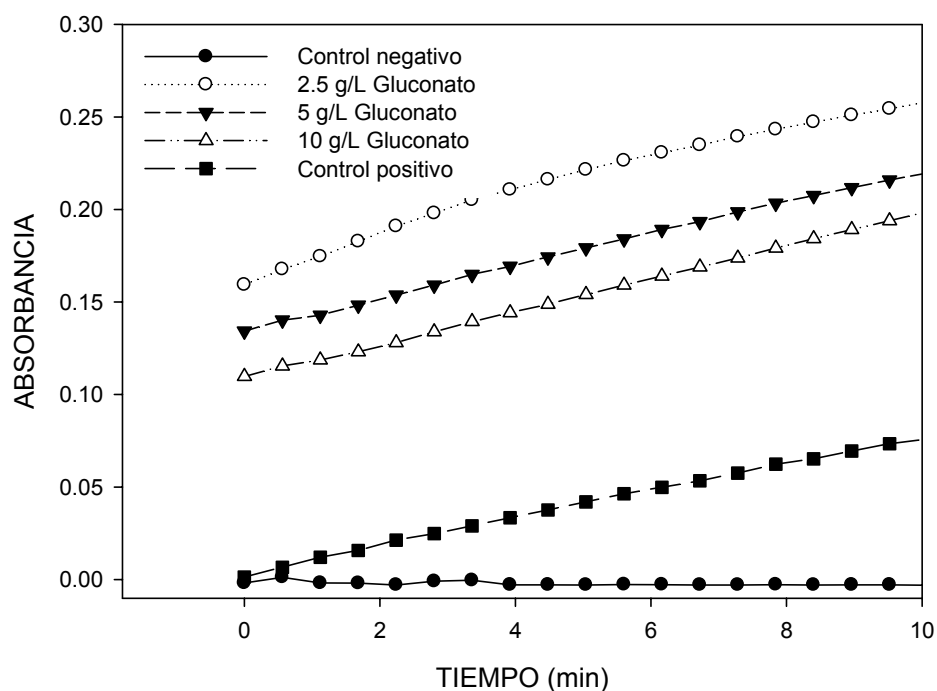
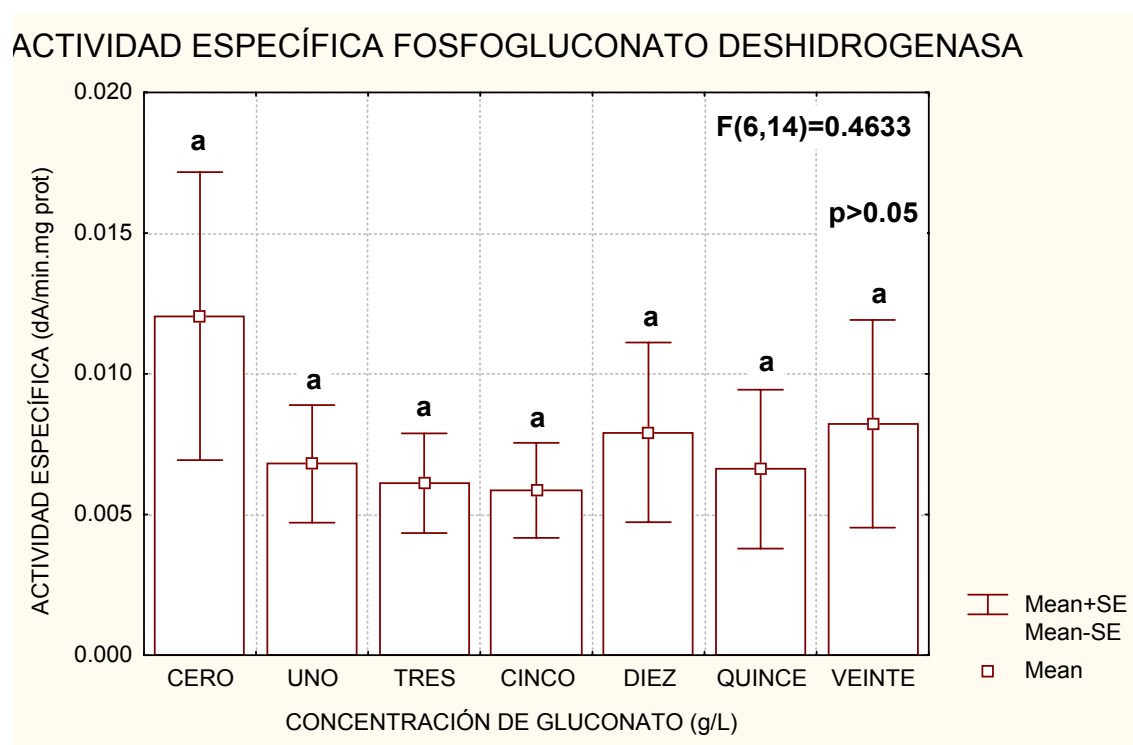
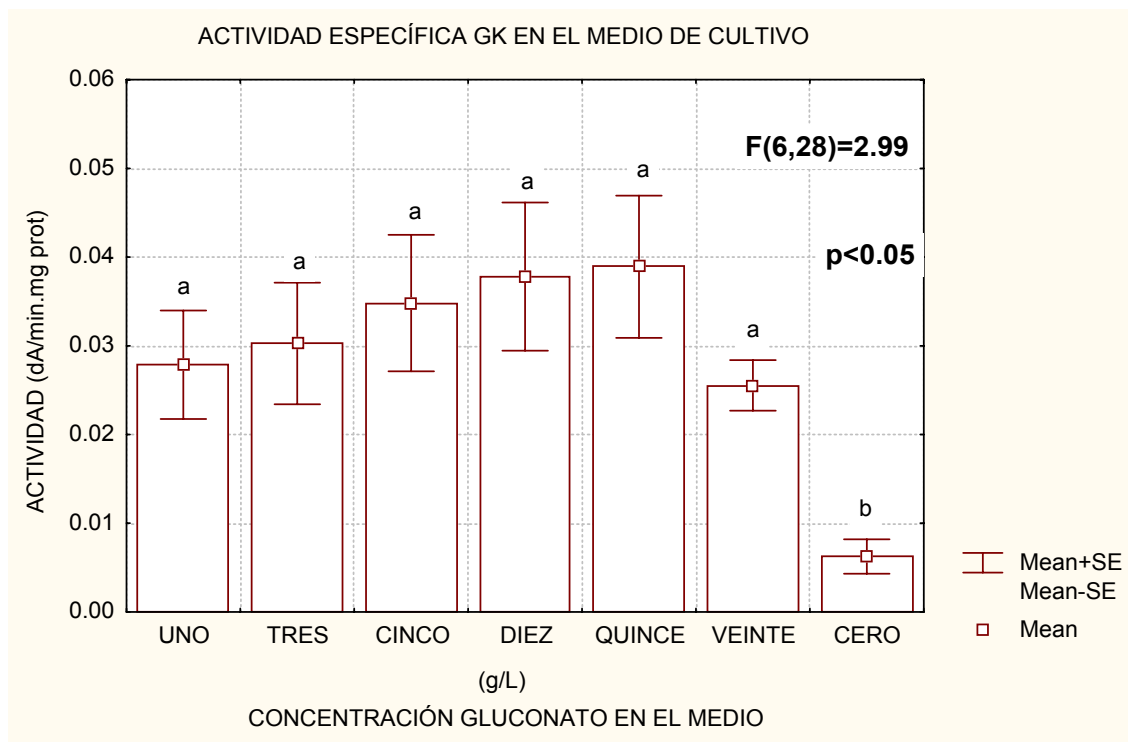


Figura 8. .- Cinéticas de la enzima fosfogluconato deshidrogenasa de los extractos de la bacteria crecida en diferentes concentraciones de gluconato en el medio de cultivo.

En los experimentos previos se trabajó solo con la enzima fosfogluconato deshidrogenasa, ya que era con la que contábamos con estándar comercial y se consideró que no era necesario cuantificar las dos, hasta conocer el comportamiento del estándar. Posterior a estos ensayos se realizaron otros similares, manejando ahora 6 concentraciones de gluconato en el medio y se midió actividad de la fosfogluconato deshidrogenasa y de la gluconoquinasa. Las concentraciones de gluconato fueron preparadas agregando gluconato al medio de cultivo. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 9 y 10. Para el caso de la deshidrogenasa el análisis estadístico no muestra diferencias significativas en la actividad de la enzima en función de la concentración de gluconato en el medio; lo que corrobora lo que se planteó en la gráfica anterior. Para la GQ si existen diferencias estadísticamente significativas de las 6 concentraciones de gluconato con respecto al extracto obtenido del medio de cultivo sin gluconato.



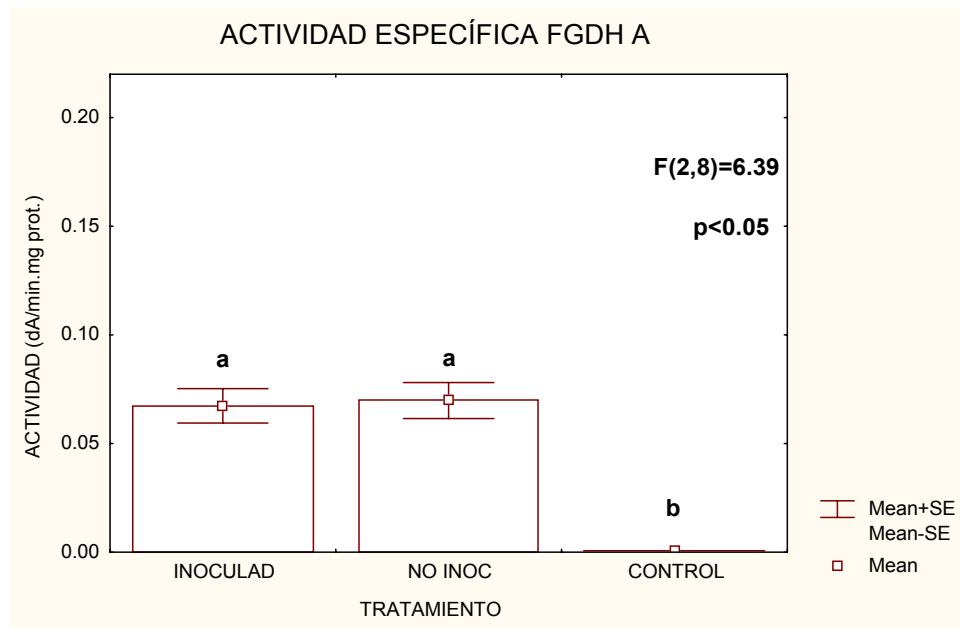
**Figura 9.-** Actividad específica de la enzima fosfogluconato deshidrogenasa de extractos de *Azospirillum brasilense* Cd, crecido en medio de cultivo TYG con seis diferentes concentraciones de gluconato.



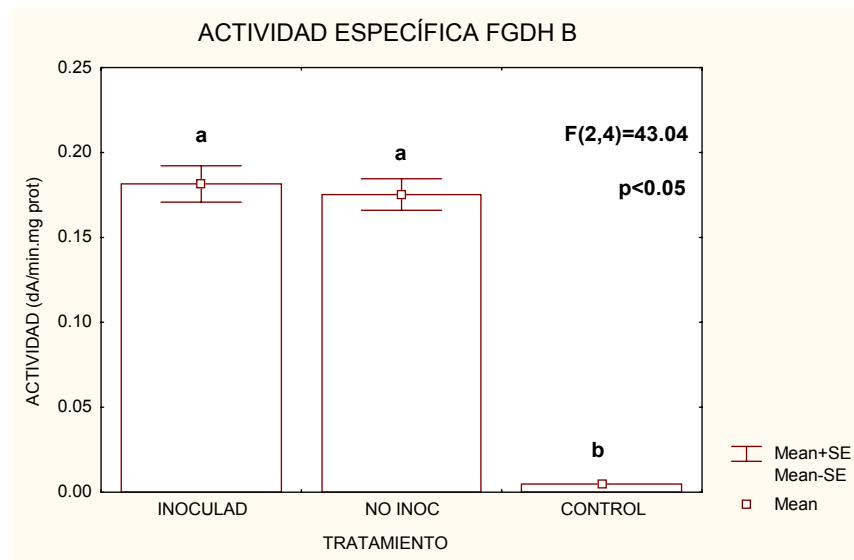
**Figura 10.-** Actividad específica de la enzima gluconoquinasa de extractos de *Azospirillum brasilense* Cd crecido en medio de cultivo TYG con seis diferentes concentraciones de gluconato.

Experimento de inoculación con *Azospirillum brasilense* de plantas de mezquite cultivadas en hidroponía:

**Fosfogluconato deshidrogenasa:** Los resultados obtenidos en los experimentos se muestran a continuación en las siguientes 2 gráficas (Figuras 11 y 12).



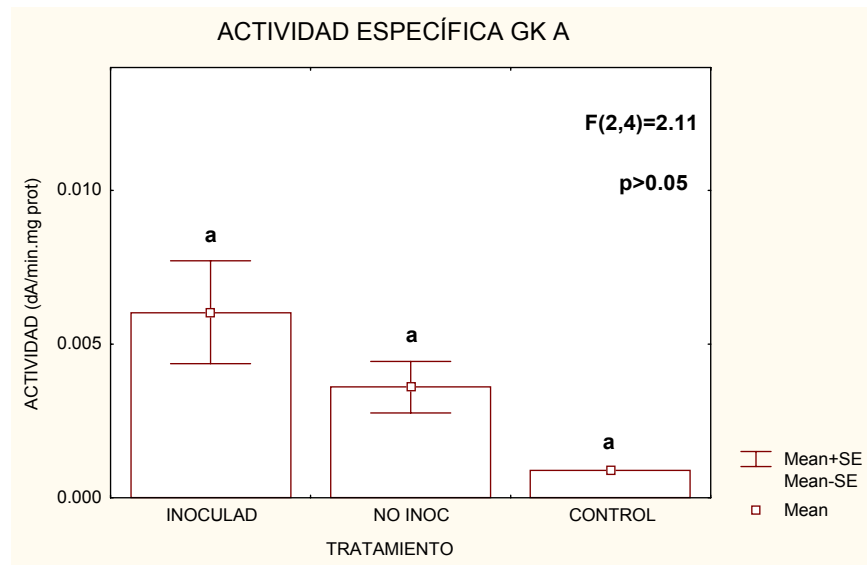
**Figura 11.** - Actividad específica de fosfogluconato deshidrogenasa en raíces de plantas de mezquite en hidroponía. Muestreo a los 15 días de inoculadas.



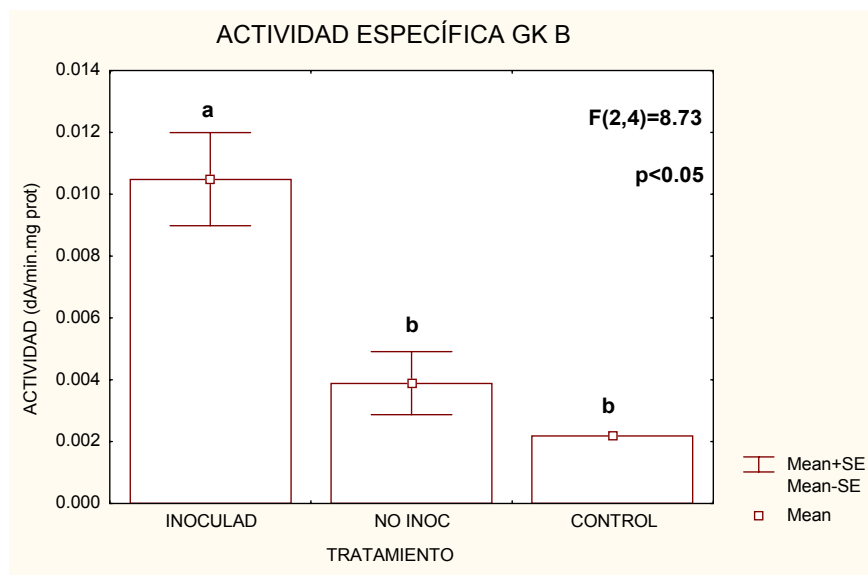
**Figura 12.-** Actividad específica de fosfogluconato deshidrogenasa en raíces de plantas de mezquite en hidroponía. Muestreo a los 23 días de inoculadas.

Como se puede apreciar de las gráficas anteriores sólo se presentan diferencias entre los tratamientos y el control, no así entre un tratamiento y otro. Comparando estas dos gráficas con los resultados de la figura 9 podemos ver que el comportamiento es similar, es decir, no existen diferencias significativas que puedan atribuirse a la presencia del gluconato en el medio.

**Gluconoquinasa:** Para esta enzima se realizaron también cuatro muestreos distribuidos de la misma forma que los de la fosfogluconato deshidrogenasa. De igual manera los rótulos corresponden a la misma terminología utilizada para la otra enzima.



**Figura 13.-** Actividad específica de gluconoquinasa en raíces de plantas de mezquite en hidroponia. Muestreo a los 15 días de inoculadas.



**Figura 14.-** Actividad específica de gluconoquinasa en raíces de plantas de mezquite en hidroponia. Muestreo a los 23 días de inoculadas.

Para el muestreo a los 15 días posteriores a la inoculación (figura 13) se puede apreciar que las medias del tratamiento inoculado son más altas que las medias del tratamiento no inoculado y que el control; sin embargo, el análisis estadístico no arroja diferencias significativas entre ellos ( $p > 0.05$ ).

En el segundo muestreo (figura 14) la actividad del extracto de las raíces de las plantas que fueron inoculadas es significativamente más alta que la de aquellas que no fueron inoculadas ( $p < 0.05$ ); presenta también diferencias estadísticamente significativas entre dicho tratamiento y el control. La actividad de las plantas no inoculadas no es significativamente mayor que el control. Cabe destacar que la suma de las actividades del control y de las plantas no inoculadas es menor que la actividad de las inoculadas, lo que supone un aumento en la actividad por la presencia del gluconato como exudado radical del mezquite y no solo un efecto aditivo.



Estos resultados son consistentes con los que se habían obtenido en la primera parte del trabajo, cuando se creció la bacteria con diferentes concentraciones de gluconato en el medio de cultivo. Si bien la cantidad de gluconato en el medio de cultivo es mucho mayor que lo que se cuantificó en los exudados de la planta, también es importante recordar que la cantidad de bacterias adheridas a las raíces es también mucho menor.

Si comparamos las figuras 10 y 14 podemos observar que la actividad sigue un comportamiento similar tanto en los experimentos *in vitro* (figura 10) como en los experimentos en presencia del mezquite. Esto puede ser una señal importante para respaldar la hipótesis planteada al iniciar este trabajo, al menos para una de las dos enzimas. Otra cosa importante, que tendrá que establecerse posteriormente, es cuál es la cantidad mínima de gluconato que se requiere para observar una diferencia significativa es la actividad de la enzima.

Los resultados obtenidos en los ensayos presentados anteriormente concuerdan con lo reportado para otras bacterias Gram negativas. Dichos trabajos mencionan que el gen que codifica para la enzima gluconoquinasa es inducible por el gluconato en diferentes organismos como *E. coli* (Cohen, 1951; Fraenkel y Levisohn, 1967; Peekhaus y Conway, 1998) y *Salmonella typhimorium* (Fraenkel y Horecker, 1964). Además, existen trabajos como el de Wang y Dykhuizen (2001) en los que se pone de manifiesto el hecho de que la fosfogluconato deshidrogenasa, no responde al aumento en la concentración de gluconato en el medio. Por otro lado, este mismo trabajo menciona que existe otra enzima (6-fosfogluconato deshidratasa) que también utiliza el producto de la reacción de la gluconoquinasa (el 6 fosfogluconato), por lo que es menos factible observar una variación en la actividad de la misma. Según el trabajo publicado por Fraenkel y Levisohn (1967) la razón por la que

la fosfogluconato deshidrogenasa no reacciona a los cambios de concentración de gluconato es porque compite por el sustrato con la deshidratasa, la cual es producto de un gen que sí es inducible. De acuerdo a Peekhaus y Conway (1998), la inducción se da mediante la unión del gluconato al producto del gen *gntR* (el cual es un represor del sistema) lo que elimina el control negativo de éste.

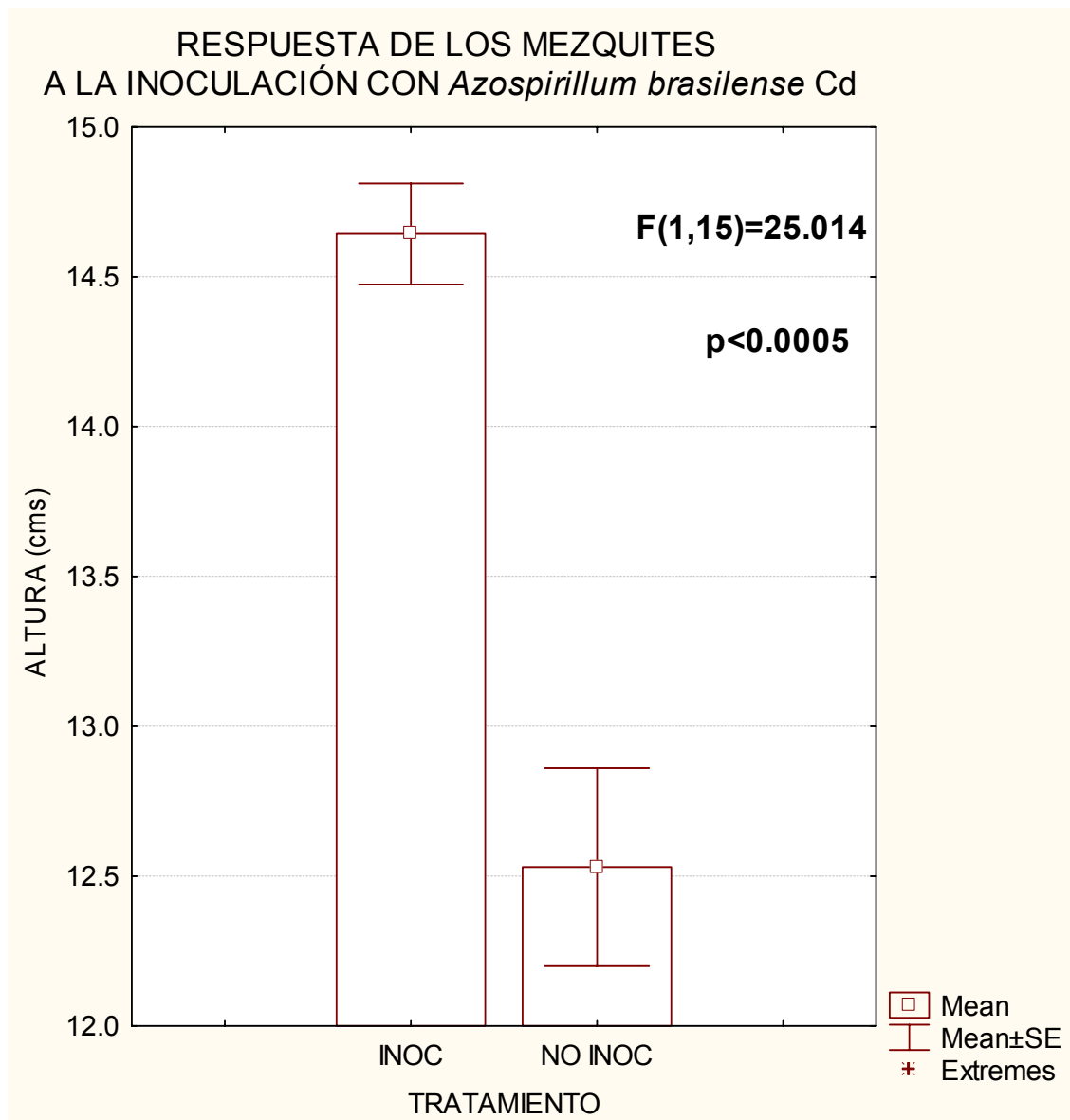
A pesar de que *Azospirillum* es probablemente la PGPB no simbiótica más estudiada (Bashan, y col., 2004), es muy poco lo que se conoce de su metabolismo de gluconato. Dentro de los pocos trabajos relacionados con el metabolismo del gluconato por parte de *Azospirillum* se encuentran los de Westby y col. (1983), Hartmann y Zimmer (1994) y Rodelas y col. (1994), donde se menciona que la mayoría de las cepas de *A. lipoferum* y *A. brasilense* pueden utilizar diferentes ácidos orgánicos como fuente de carbono (tales como málico, succínico, cetoglutárico, láctico y glucónico). Pero según Rodríguez y col. (2004) algunas cepas de *A. brasilense* (Cd y 8l) pueden producir ácido glucónico cuando crecen en medio de cultivo con fructosa, y utilizando glucosa como inductor para la producción del ácido. La importancia de la producción de ácidos orgánicos como el glucónico en una bacteria como *Azospirillum* reside en el hecho de que se considera un mecanismo importante en la solubilización de minerales como el fósforo (Rodríguez y Fraga, 1999). De acuerdo a Carrillo y col. (2002) la inoculación con *Azospirillum brasilense* aumenta la liberación de protones y ácidos orgánicos al medio por parte de plántulas de cardón, lo que resulta en un crecimiento más rápido de las plántulas. De esta forma puede cerrarse un círculo benéfico para ambos organismos (planta y bacteria), ya que a mayor producción de ácidos orgánicos la bacteria puede tener una mayor fuente de carbono disponible y de esta forma seguir produciendo sustancias benéficas para la planta.

El microorganismo más estudiado en este tema, al igual que en la mayoría de los temas relacionados a la genética bacteriana, es *E. coli*. En el metabolismo intermedio de los carbohidratos, existen dos rutas constitutivas muy importantes, la de Embden-Meyerhoff-Parnas y la de las pentosas fosfato, y en 1952 se descubrió una tercera conocida como Entner-Doudoroff. Esta ruta ha sido estudiada, además de en *E. coli*, en *Zymomonas mobilis* y *Pseudomonas aeruginosa* y se ha visto que es inducida por la presencia de gluconato en el periplasma de bacterias Gram-negativas (Fliege y col., 1992).

La inducción por el gluconato de los genes del sistema GntI, junto con los genes *edd* y *eda* de la ruta de Entner-Doudoroff, los cuales codifican para una 6-fosfogluconato deshidratasa y una 2-ceto,3-deoxi,6-fosfogluconato aldolasa, es regulada negativamente por el producto de *gntR*, mapeado a los 77 minutos (Tong y col., 1996). Estas dos enzimas son las que compiten con la fosfogluconato deshidrogenasa.

### Respuesta de las plantas a la inoculación con *Azospirillum brasilense* Cd: Altura:

Se midió la altura de las plantas como un parámetro de evaluación del efecto de la inoculación.



**Figura 15.-** Altura de las plantas en el experimento de inoculación de mezquite (*Prosopis articulata*) con la bacteria *Azospirillum brasilense* Cd en hidroponía, a los 23 días de inoculadas. Los valores son el promedio de dos experimentos. INOC= Plantas que fueron inoculadas, NO INOC= Plantas que no fueron inoculadas

Las plantas que se midieron son las que se utilizaron para obtener los extractos y medir la actividad, fueron 15 plantas inoculadas y 15 no inoculadas en cada experimento. Como se describió anteriormente, se realizaron dos muestreos en cada experimento para la cuantificación de la actividad, sin embargo, en relación a la altura solo se tomaron los datos del último muestreo, ya que se requería de tiempo para que la planta creciera un poco más (unos tres centímetros aproximadamente) para visualizar mejor el efecto.

La diferencia es estadísticamente significativa ( $p < 0.0005$ ), lo que indica que la inoculación de las plantas de mezquite con la Bacteria PGPB *Azospirillum brasilense* Cd, se puede considerar benéfica para la planta. De acuerdo al trabajo presentado publicado por Bashan, y col., (2004), uno de los más completos en cuanto al tema de la inoculación, existen más de 150 especies de plantas e incluso una microalga unicelular (Gonzalez y Bashan, 2000) que han respondido exitosamente a la inoculación con *Azospirillum brasilense* por lo que esta bacteria se considera que no es planta específica. Sin embargo, todavía en la actualidad, el principal problema que la inoculación encuentra es la inconsistencia de los resultados en campo, una forma práctica para la aplicación, así como un portador comercial con características adecuadas (Bashan y col., 2002).

Entre las muchas plantas que han sido cultivadas además del trigo, el maíz, el mijo (*Pennisetum purpureum*) y *Digitaria decumbes* (Caballero-Mellado y col., 2000) se encuentran especies tan dispares como la *Setaria italica*, conocida comúnmente como mijo cola de zorra (Bhaskara Rao y Charyulu, 2005) y el chile habanero (*Capsicum chinense* Jacquin) (Canto-Martin y col. 2004). Existen incluso otras plantas menos comunes que han sido inoculadas con éxito, algunas son: la halófito *Salicornia bigelovii* (Bashan y col., 2000), el mangle *Avicennia germinans* (Puente y col., 1999), el

cardón gigante *Pachycereus pringlei* (Puente y Bashan, 1993; Puente y col., 2004; Carrillo-García y col., 2000) y la microalga *Chlorella sorokiniana* (Hernández y col., 2006).

A pesar de tantas especies inoculadas, no se encuentran reportes acerca de la inoculación de especies de *Prosopis* con *Azospirillum brasilense* Cd. Lo más cercano a los mezquites han sido algunas leguminosas como acacias y *Vigna unguiculada*, obteniendo resultados de aumento en la biomasa, altura de la planta y de la fijación de nitrógeno en las raíces (Bashan y col., 2004).

La razón por la que sólo se evaluó el crecimiento de la planta con el parámetro altura es debido a que el mezquite es un árbol que crece lento. Felker y Guevara (2003) encontraron un crecimiento máximo del diámetro del tallo de 2.6 cm/año para plantas seleccionadas, siendo mucho menor para plantas crecidas de manera natural. Debido a esto, en el tiempo que duraron los experimentos con las enzimas, las diferencias en otros parámetros como el peso seco serían menos evidentes. Una estrategia que se está llevando a cabo para lograr un crecimiento más rápido en mezquites destinados a la explotación de su madera, es el uso de mini-injertos; así se puede obtener una producción de árboles a gran escala (Ewens y Felker., 2003).

Considerando todos los resultados anteriores, podemos decir que la presencia constante de ácido glucónico en el medio hidropónico en el que se llevaron a cabo los experimentos puede estar activando los genes que codifican para la enzima gluconoquinasa. El aumento en la actividad de esta enzima puede ser un indicador del beneficio que la bacteria recibe por estar adherida a las raíces de la planta; la bacteria obtiene energía y carbono del gluconato, manteniendo un estado fisiológico activo y ayudando a la planta en el crecimiento.

## CONCLUSIONES

1. El cultivo de mezquite (*Prosopis articulata*) en hidroponía es viable, incluso siendo una planta de crecimiento lento, y facilita el análisis enzimático bajo las condiciones manejadas en este trabajo.
2. Las plantas de mezquite producen ácido glucónico como exudado radical. La cuantificación del ácido glucónico mediante el análisis por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas (GC-MS) es una opción viable, confiable y muy sensible, presentándose como una buena alternativa al método más común que es la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).
3. *Azospirillum brasilense* Cd presenta actividad de las dos enzimas consideradas en este trabajo (Gluconoquinasa y Fosfogluconato deshidrogenasa) y es posible cuantificarla con los métodos que se han ensayado.
4. La enzima fosfogluconato deshidrogenasa no es activada mediante la adición de gluconato al medio de cultivo de la bacteria.
5. La gluconoquinasa es una enzima activada por el gluconato agregado al medio de cultivo, presentando diferencias estadísticamente significativas con el medio de cultivo sin gluconato.
6. La fosfogluconato deshidrogenasa no responde a la presencia de los exudados de la planta y su actividad no se ve significativamente afectada.

7. La gluconoquinasa aumenta su actividad específica de manera significativa en presencia del ácido glucónico exudado por las raíces del mezquite.
8. Las plantas de mezquite responden positivamente a la inoculación con *Azospirillum brasilense* Cd, lo que se refleja en un aumento en la altura de las plántulas.
9. El aumento de la actividad de la gluconoquinasa de *Azospirillum brasilense* Cd en presencia de los exudados radicales del mezquite puede ser una señal de un mecanismo mediante el cual la bacteria se beneficia de su asociación con las plantas.



## PERSPECTIVAS

Falta mucho por hacer en este tema que apenas va iniciando pero estoy convencido que los datos obtenidos en este trabajo serán de ayuda para quienes aborden este tema en el futuro. Considero que se deben realizar más estudios en este campo ya que es una parte un tanto olvidada en la investigación con *Azospirillum brasilense*. Se podrían realizar algunos experimentos para monitorear la producción de ácido glucónico en el mezquite de forma constante y de esta manera saber si la inoculación puede ser en cualquier momento del crecimiento de la planta o sólo en su etapa de plántula. No se evaluaron algunos parámetros como el peso seco o la producción de pigmentos por cuestiones de tiempo, pero podrían ser datos útiles si se desea conocer más acerca de la promoción de crecimiento por la inoculación.

También sería importante el uso del microscopio de fluorescencia para evaluar las zonas de colonización en las raíces por parte de las bacterias, lo que se pudiera hacer inoculando la planta con la bacteria portadora del gen de la Proteína Verde Fluorescente (gfp). También se pudieran hacer inoculaciones mixtas con alguna cepa de *Rhizobium* y saber si eso favorece la formación de nódulos fijadores de nitrógeno.

En cuanto a las enzimas se podrían realizar experimentos *in vitro* con gluconato como fuente única de carbono, realizando evaluaciones de actividad para conocer más a detalle el papel de las enzimas en cuanto al beneficio por parte de la planta hacia la bacteria y poder establecer, de forma mucho más precisa, el papel del gluconato en este sentido. Se realizaron algunos avances al respecto, encontrándose que la bacteria podía crecer en un medio mineral con gluconato como única fuente de carbono, sólo que no se hizo la medición de la actividad correspondiente, ya que en ese momento no contaba con la enzima comercial para hacer las evaluaciones;

además, también se presentó un problema de contaminación de las cajas de cultivo, lo que dificultó hacer un conteo preciso y confiable. En base a esos datos, creo que los resultados de un experimento de este tipo pueden ser valiosos en la investigación.

Una última recomendación sería evaluar también la actividad de la enzima fosfogluconato deshidratasa (EC 4.2.1.12) que es una enzima que compite por el sustrato con la fosfogluconato deshidrogenasa y que pudiera darnos una mejor idea acerca de la rutas que sigue el gluconato en la bacteria.

## REFERENCIAS

Albrecht, S.L., Gaskins, S.H., Milam, J.R., Smith, R.L. (1983) "Ecological factors affecting survival and activity of *Azospirillum* in the rhizosphere", in ***Azospirillum II: Genetics, Physiology, Ecology***, Klingmüller, W., Ed., Birkhäuser-Verlag, Basel, p. 138

Bashan, Y., Hernandez, J.P., Leyva, L.A. Bacilio, M. (2002). "Alginate microbeads as inoculant carrier for plant growth-promoting bacteria", ***Biology and Fertility of Soils***. No. 35, p. 359-368.

Bashan, Y., and de-Bashan, L.E. (2005) "Bacteria/Plant growth-promotion" In: ***Encyclopedia of soils in the environment***. (Ed.) D. Hillel, Elsevier, Oxford, U.K. Volume 1. p.103-115.

Bashan, Y. y Holguín, G. (1997) "Azospirillum/plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996)", ***Canadian Journal of Microbiology***. Vol. 43, p. 103-121.

Bashan, Y., Holguin, G., de-Bashan, L.E. (2004) "Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003)", ***Canadian Journal of Microbiology***. Vol. 50, p. 521-577.

Bashan, Y., Moreno, M., Troyo, E. (2000) "Growth promotion of the seawater-irrigated oilseed halophyte *Salicornia bigelovii* inoculated with mangrove rhizosphere bacteria and halotolerant *Azospirillum* spp." ***Biology and Fertility of Soils***. Vol. 32, p. 265-272.

Bhaskara Rao, K.V. y Charyulu, P.B. (2005) "Evaluation of effect of inoculation of *Azospirillum* on the yield of *Setaria italica* (L.)", ***African Journal of Biotechnology***. Vol. 4, p. 989-995.

Bottini, R., Fulchieri, M., Pearce, D., Pharis, R.P. (1989) "Identification of giberellins A1, A3, and iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*", ***Plant Physiology***, Vol. 90, p. 45-53.

Burkart, A. (1976) "A monograph of the genus *Prosopis* (Leguminosae subfam. Mimosoideae) (Part 1 and 2). Catalogue of the recognized species of *Prosopis*", ***Journal of Arnold Arboretum*** Vol. 57, p. 219–249, 450–525.

Bradford, M. (1976) "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", ***Analytical Biochemistry***. Vol. 72, p. 248-254.

Caballero-Mellado, J., Von Scheven-Cordero, E., González-Cu, G.R., Aguirre, J.F. (2000) "Azospirillum inoculation and its agronomic application in Mexico", ***Fourth European Nitrogen Fixation Conference***. Sevilla, Spain. p. 45.

Canto-Martin, J.C., Medina-Peralta, S. Morales-Avelino, D. (2004) "Effect of *Azospirillum* sp. Inoculation in habanero chile plants (*Capsicum chinense* Jacquin)", ***Tropical and Subtropical Agroecosystems***. Vol. 4, p. 21-27.

Carrillo-García, A., Bashan, Y., Bethlenfalvay, G.J. (2000) "Resource-island soils and the survival of the giant cactus, cardon, of Baja California Sur", ***Plant and Soil*** . Vol. 218, p. 207-214.

Carrillo-García, A., Leon de la Luz, J.L., Bashan, Y., Bethlenfalvay, G. (1999) "Nurse Plants, Mycorrhizae, and Plant Establishment in a Disturbed Area of the Sonoran Desert", **Restoration Ecology** Vol. 7, p. 321-335.

Carrillo, A.E., Li, C.Y., and Bashan, Y. (2002) "Increased acidification in the rhizosphere of cactus seedlings induced by *Azospirillum brasilense*" **Naturwissenschaften**. Vol. 89, p. 428-432.

Cohen, S. (1951) "Gluconokinase and the oxidative path of glucose & phosphate utilization". **Journal of Biological Chemistry**, Vol. 189, p. 617-628.

De Coninck, K., Horemans, S., Randonbage, S., Vlassak, K. (1988) "Occurrence and survival of *Azospirillum* spp. in temperate regions", **Plant and Soil**, Vol. 110, p. 213-1988.

Del Gallo. M., and Fendrik, I. (1994) "The rhizosphere and *Azospirillum*", in: **Azospirillum/plant associations**, Okon, Y., Ed., CRC Press, Boca Raton, Florida USA., p. 57-65.

Döbereiner, J. 1983. Ten years *Azospirillum*, in **Azospirillum II: Genetics, physiology, and ecology**. W. Klingmüller Ed., Birkhauser, Basel Switzerland. p. 9-23.

Döbereiner, J., Marriel, I.E., Nery, M., (1976) "Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck", **Canadian Journal of Microbiology**, Vol. 22, p. 1464-1473.

Ewens, M. y Felker, P. (2003) "The potential of mini-grafting for large-scale production of *Prosopis alba* clones", **Journal of Arid Environments**. Vol. 55, p. 379-387.

Felger, R.S. (1977). "Mesquite in Indian cultures of the Southwestern North America". In B.B. Simpson (ed.), **Mesquite: Its biology in two desert scrub ecosystems**. Dowden, Hutchinson & Ross, Stroudsburg, PA. p. 150-176. Citado en <http://v1.winrock.org/forestry/factpub/sppubs.htm>

Felker, P., Cannell, G.H., Clark, P.R., Osborn, J.F., Nash, P. (1983) "Biomass production of *Prosopis* species (mesquite), *Leucaena*, and other leguminous trees grown under heat/drought stress", **Forest Sciences**. Vol. 19, p. 592-606.

Felker, P. y Guevara, J.C. (2003) "Potential of commercial hardwood forestry plantations in arid lands-an economic analyses of *Prosopis* lumber production in Argentina and the United States", **Forest Ecology and Management**. Vol. 186, p. 271-286.

Fliege, R., Tong, S., Shibata, A., Nickerson, K.W. Conway, T. (1992) "The Entner-Doudoroff Pathway in *Escherichia coli* Is Induced for Oxidative Glucose Metabolism via Pyrroloquinoline Quinone-Dependent Glucose Dehydrogenase", **Applied and Environmental Microbiology**. Vol. 58, p. 3826-3829.

Fraenkel, D.G. y Horecker, B.L. (1964) "Pathways of D-glucose metabolism in *Salmonella tiphimum*. A study of a mutant lacking phosphoglucose isomerase". **Journal of Biological Chemistry** Vol. 239, p. 2765-2771.

Fraenkel, D.G. y Levisohn, S.R. (1967) "Glucose and gluconate metabolism in an *Escherichia coli* mutant lacking phosphoglucose isomerase". **Journal of Bacteriology**. Vol. 93, p. 1571-1578.

Glick, B. (1995) "The enhancement of plant growth by free-living bacteria", **Canadian Journal of Microbiology**. Vol. 41, p. 109-117.

Gonzalez, L.E., and Bashan, Y. (2000) "Increased growth of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized and cocultured in alginate beads with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*". **Applied and Environmental Microbiology**. Vol. 66, p. 1527-1531.

Hartmann, A. and Zimmer, W. (1994) "Physiology of *Azospirillum*", in *Azospirillum/Plant associations*, Okon, Y., Ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, p. 15-39.

Hernandez, J-P., de-Bashan, L.E., and Bashan, Y. (2006) "Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalgae *Chlorella* spp. co-immobilized with *Azospirillum brasilense*". **Enzyme and Microbial Technology**. Vol. 38, p. 190-198.

Herrmann, U., Merfort, M., Jeude, M., Bringer-Meyer, S., Sahm, H. (2004) "Biotransformation of glucose to 5-keto-D-gluconic acid by recombinant *Gluconobacter oxydans* DSM 2343". **Applied Microbiology and Biotechnology**, Vol. 64, p. 86-90.

Holguín, G., Patten, C. Glick, B. (1999) "Genetics and molecular biology of *Azospirillum*", **Biology and Fertility of Soils**. Vol. 29, p. 10-23.

Katzy, E.I., Iosipenko, A.D., Egorenkov, D.A., Zhuravleva, E.A., Panasencko, V.I., Ignatov, V.V. (1990) "Involvement of the *Azospirillum brasilense* plasmid in the indol acetic acid production", **FEMS Microbiology Letters**, Vol. 72, pag. 1-4.

Krieg, N.R. y Hold, S.G., (1984) "Bergey's Manual of Sistematic Micribiology", Ed. Williams & Wilkins, p. 94-103.

Landeras, G., Alfonso, M., Pasiecznik, N.M., Harris, P.J.C., Ramírez, L. (2005) "Identification of *Prosopis juliflora* and *Prosopis pallida* accessions using molecular markers", ***Biodiversity and Conservation***. Publicado en linea el 13 de junio del 2005.

Mathews, K., van Holde, K., Ahern, K. (2000) "Biochemistry". ***Addison Wesley Longman***, tercera ed. USA. 1186 p.

Matsushita, K., Fujii, Y., Ano, Y., Toyama, H., Shinjoh, M., Tomiyama, N., Miyazaki, T., Sugisawa, T., Hoshino, T. Adachi, O. (2003) "5-keto-d-gluconate production is catalyzed by a quinoprotein glycerol dehydrogenase, major polyol dehydrogenase in *Gluconobacter* Species" ***Applied and Environmental Microbiology***. Vol 69, p. 1959–1966.

Peekhaus, N., Conway, T. (1998) "What's for Dinner?: Entner-Doudoroff Metabolism in *Escherichia coli*" ***Journal of Bacteriology***, Vol. 180, p. 3495-3502.

Pereg, L., Gilchrist, K. Kennedy, I. (2000) "Mutants with enhanced nitrogenase activity in hidroponic *Azospirillum brasilense*-wheat associations", ***Applied and Environmental Microbiology***, Vol. 66, p. 2175-2184.



Piccoli, P., Masciarelli, O., Bottini, R. (1999) "Gibberellin production by *Azospirillum lipoferum* cultured in chemically defined medium as affected by oxygen availability and water status", **Symbiosis**. Vol. 27, p. 135–145.

Puente, M.-E. and Bashan, Y. (1993) "Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* strains on the germination and seedlings growth of the giant columnar Cardon cactus (*Pachycereus pringlei*)". **Symbiosis** Vol. 15, p. 49-60.

Puente, M.E., Bashan, Y., Li, C.Y., and Lebsky, V.K. (2004) "Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants, II. Growth promotion of cactus seedling". **Plant Biology**. Vol. 6, p. 643-650.

Puente, M.E., Holguin, G., Glick, B.R. and Bashan, Y. (1999) "Root-surface colonization of black mangrove seedlings by *Azospirillum halofraferens* and *Azospirillum brasilense* in seawater", **FEMS Microbiology Ecology**. Vol. 29, p. 283-292.

Reinder, J. M. (1955) "Induction of gluconokinase in *Escherichia coli*", Vol. 70, p. 224-232.

Rodelas, B., Salmeron, V., Martinez-Toledo, M.V., Gonzalez-Lopez, J. (1994) "Production of amino acids by *Azospirillum brasilense* in chemically-defined medium amended with malate, gluconate or fructose for use as a nitrogen-fixation bacterial fertilizer inoculum", **Soil Biology and Biochemistry**. Vol. 26, p. 301–303.

Rodriguez, H. y Fraga, R. (1999) "Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion" ***Biotechnology Advances***. Vol. 17, p. 319– 339.

Rodriguez, H., Gonzalez, T., Goire, I., Bashan, Y. (2004) "Gluconic acid production and phosphate solubilization by plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp." ***Naturwissenschaften***. Vol. 91, p. 552-555.

Sadasivan, L., Neyra, C.A. (1985) "Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum*: exopolisaccharides and Cyst formation", ***Journal of Bacteriology***, Vol. 163, p. 716-723.

Sadasivan, L., Neyra, C.A. (1987) "Cyst production and brown pigment formation in aging cultures of *Azospirillum brasilense* ATCC 29145", ***Journal of Bacteriology***. Vol. 169, p. 1670-1677.

Steenhoudt, O., Vanderleiden, J. (2000) "*Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects", ***FEMS Microbiology Reviews***. Vol. 24, p. 487-506.

Tarrand, J.J., Krieg, N.R., Döbereiner, J. (1979) "A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov.", ***Canadian Journal of Microbiology***. Vol. 24, p. 967-980.

Tetaud, E., Hanau, S., Wells, J., Le Page, R., Adams, M., Arkinson, S. Barret, M. (1999) "6-Phosphogluconate dehydrogenase from *Lactococcus lactis*: a role for arginine residues in binding substrate and coenzyme", **Biochemical Journal** Vol. 338, p. 55-60.

Tien, T.M., Gaskins, M.H., Hubbell, D.H. (1979) "Plant growth substances produced by *A. brasilense* and their effect on growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.)", **Applied and Environmental Microbiology**. Vol. 37, p. 1016-1024.

Tilak K., y Annapurna K. (1993) "Role of *Azospirillum* in the improvement of crop production and plant nutrition". **Proceedings of the Indian National Academy of Science**. Vol. 59, p. 315-324.

Tong, S., Porco, A., Isturiz, T. Conway, T. (1996) "Cloning and molecular genetic characterization of the *Escherichia coli* *gntR*, *gntK*, and *gntU* Genes of GntI, the main system for gluconate metabolism", **Journal of Bacteriology**. Vol. 178, p. 3260-3269.

Tsunedomi, R., Izu, H., Kawai, T., Matsushita, K., Ferenci, T., Yamada, M. (2003) "The activator of *GntII* Genes for gluconate metabolism, GntH, exerts negative control of GntR-Regulated *GntI* genes in *Escherichia coli*", **Journal of Bacteriology**. Vol. 185, p. 1783-1795.

Velarde, M., Felker, P. Degano, C. (2003) "Evaluation of Argentine and Peruvian *Prosopis* germplasm for growth at seawater salinities", **Journal of Arid Environments**, Vol. 55, p. 515-531.

Wang, I. y Dykhuizen, D. E. (2001) "Variation of enzyme activities at a branched pathway involved in the utilization of gluconate in *Escherichia coli*". ***Evolution***, Vol. 55, p. 897–908.

Westby, C.A., Cutshall, D.S. Galina, V. (1983) "Metabolism of various carbon sources by *Azospirillum brasilense*". ***Journal of Bacteriology***, Vol. 156, p. 1369-1372.

Xie, C.-H., Yokota, A. (2005) "*Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*" ***International Journal of Systematic and Evolution Microbiology***, Vol. 55, p. 1435-1438.

Yum, D., Lee, Y., Pan, J. (1997) "Cloning and expression of a gene cluster encoding three subunits of membrane-bound gluconate dehydrogenase from *Erwinia cyripedii* ATCC 29267 in *Escherichia coli*", ***Journal of Bacteriology***. Vol. 179, p. 6566-6572.

Zelic, B., Pavlovic, N., Dilic, V. Vasic-Rocki, D. (2002) "Optimization of pH and temperature in the process of bioconversion of glucose to 2,5-diketo-D-gluconic acid", ***Chemical and Biochemical Engineering Quarterly***. Vol. 16, p. 7-11.

**BOLETINES CITADOS:**

“Mezquite spp. Cultivo alternativo para las zonas áridas y semiáridas de México”. Septiembre de 1994. Editado por Instituto Nacional de Ecología.

“Especies Forestales No Maderables y Maderables No Tradicionales de Zonas Áridas y Semiáridas en los Estados de Durango, Chihuahua, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca” (2001). Editado por SEMARNAT

Laboratorio de Entomología, CIBNOR, 2006. Biólogo Carlos Palacios. Identificación de *Acanthoscelides obtectus* (Say)

Laboratorio de Microalgas, CIBNOR, 2005. M. en C. Laura Carreón Palau. Método para análisis de ácido glucónico por Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas.

[http://www.semarnat.gob.mx/pfnm3/fichas/prosopis\\_glandulosa.htm](http://www.semarnat.gob.mx/pfnm3/fichas/prosopis_glandulosa.htm)

## ANEXO 1

### MEDIO DE CULTIVO TYG PARA BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS

El medio fue publicado por Prabhu y col. (2000) y modificado por Bashan y col. (2002)

REACTIVO	PESAR (g) PARA 1 LITRO
Cloruro de Sodio	1.2
Sulfato de Magnesio.7H <sub>2</sub> O	0.25
Fosfato de potasio dibásico	0.13
Cloruro de calcio	0.22
Sulfato de potasio	0.17
Sulfato de Sodio	2.4
Bicarbonato de Sodio	0.5
Carbonato de Sodio	0.09
EDTA	0.07
TRIPTONA	5
EXTRACTO DE LEVADURA	5
GLUCOSA	5

En ocasiones se puede agregar 1 gramo de cloruro de amonio como fuente de nitrógeno para acelerar el crecimiento de las bacterias, sin embargo en casos de aislamientos es preferible usarlo sin nitrógeno para estar seguros de la capacidad fisiológica de la bacteria.

Ajustar pH a 7 con NaOH 1N o con HCL 1N después de esterilizar (121°C, 15 psi)

## ANEXO 2

Solución nutritiva para plantas, modificada de la solución Hoagland presentada por Taiz y Zenger (1998)

SUSTANCIA	NUTRIENTE PROPORCIONADO	CANTIDAD (g/L)
Nitrato de potasio	Nitrógeno, Potasio	0.5
Nitrato de calcio	Nitrógeno, Calcio	0.82
Fosfato de potasio monobásico	Potasio, Fósforo	0.1051
Sulfato de Magnesio	Magnesio, Azufre	0.241
EDTA, sal de fierro	Quelante	0.036
Ácido bórico	Boro	0.003
Cloruro de manganeso tetrahidratado	Manganeso	0.002
Sulfato de zinc heptahidratado	Zinc	0.0002
Sulfato de cobre pentahidratado	Cobre	0.00008
Molibdato de amonio	Molibdeno	0.00002

El primer grupo de sustancias corresponde a los macronutrientes y el segundo son los micronutrientes.