



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD XOCHIMILCO**

**Casa abierta al tiempo**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**DETECCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN  
BACTERIAS ROJAS NO SULFUROSAS**

**T E S I S**

**(Idónea Comunicación de Resultados)**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**PRESENTA**

**Cristhían Sánchez Cruz**

**COMITÉ TUTORAL**

**Directora**

**Dra. María Teresa Núñez Cardona – UAM-Xochimilco**

**Co-Director**

**Dr. Luis Raúl Tovar Gálvez - Centro Interdisciplinario de  
Investigaciones y Estudios sobre Medio Ambiente y Desarrollo**

**Asesora**

**Dra. María Eugenia Gutiérrez Castillo - Centro Interdisciplinario de  
Investigaciones y Estudios sobre Medio Ambiente y Desarrollo**

**MÉXICO D. F., 03 DE MAYO, 2016**

## DEDICATORIA

*A mi mamá Eloisa por sus incansables palabras de ánimo y por ser quien me inculco los valores y la motivación de estudiar y seguir adelante y que gracias a su apoyo incondicional he podido terminar este trabajo.*

*A mis abuelos Sofía e Isabel por sus muestras de apoyo, comprensión y porque son mi orgullo.*

*A todas mis tías y tíos, primas y primos, sobrinas y sobrinos que jamás dejaron de impulsarme y motivarme para culminar este proyecto.*

*A Elba por ser una gran compañera y por su comprensión en estos últimos años de nuestras vidas.*

*Ahora me toca brindarles cada una de estas páginas con mucho cariño por el inmenso apoyo otorgado.*

## AGRADECIMIENTOS

A mi comité tutorial por su apoyo incondicional, asesorías, por la paciencia y las palabras de motivación para la culminación de la tesis.

A mi gran amigo Dr. Marco Antonio González López, por su amistad, por sus asesorías y por ser el gran maestro que me ha instruido en estos últimos 6 años.

Al Dr. José de Jesús Olivares Trejo (UACM), por su amistad y colaboración las cuales fueron de gran ayuda para el desarrollo y desenlace de este trabajo.

A mis amigos de laboratorio de la UAM-X: Fernando, Maru, Thalía, Penélope, Jazmín, Oli y Toña.

A mis amigos y compañeros de la UACM: Marlen, Domingo, Alma, Olga, Edgar, Mariana, Carlos, Dan y Helios por sus muestras de apoyo, asesorías, consejos y sugerencias brindadas en esta etapa.

A todos aquellos que directa e indirectamente estuvieron al pendiente y preguntaron por mí y mi proceso en este camino llamado maestría.

A Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haberme otorgado el financiamiento para poder cursar y culminar este trabajo.

	Pág.
Índice de figuras	i
Índice de tablas	ii
Índice de abreviaturas	iii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	2
a) Ruta biosintética de Indol-3-acetamida (IAM)	13
b) Ruta biosintética de cadena lateral de L-Trp	15
c) Ruta biosintética de la triptamina	16
Ácido Indol-3-Acético (AIA)	19
Algunas aplicaciones de AIA en la agricultura	20
Ácido 5-Aminolevulínico (AAL)	21
Aplicaciones de AAL en la agricultura	21
Valor de AIA y AAL en el mercado	22
Biofertilizantes y sus características	24
III. OBJETIVOS	28
1 Objetivo general	28
1.1 Objetivos particulares	28
IV. JUSTIFICACIÓN	29
V. HIPÓTESIS	32
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	33
1.1 Sitio de muestreo	33
1.2 Procesamiento de la muestra	33
1.2.1 Aislamiento de bacterias a partir de cultivos mixtos	34
1.2.2 Observación al microscopio de los cultivos de BRNS mediante la tinción de Gram	35
2.3 Análisis de pigmentos fotosintéticos	35
2.3.1 Análisis <i>in vivo</i>	36
2.3.2 Extracción de los pigmentos con solventes orgánicos	36
3 Enriquecimiento con L-Trp 3 mM de los cultivos puros de BRNS	37

3.1	Detección de Ácido Indolacético (AIA)	37
3.2	Cuantificación de AIA por espectrofotometría	37
3.3	Análisis de AIA mediante Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC)	38
4	Detección de AAL	39
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
VIII.	CONCLUSIONES	66
IX.	PERSPECTIVAS	67
X.	BIBLIOGRAFÍA	68
XI.	ANEXOS	83

## Índice de figuras

Figura 1	Arquitectura de las membranas intracelulares de las bacterias fotosintéticas	5
Figura 2	Rutas biosintéticas de AIA en bacterias	12
Figura 3	Síntesis de AIA a partir de L-Trp por la ruta 3-indol acetamida	15
Figura 4	Formación de AIA por bacterias a partir de L-Trp por la vía del ácido indol 3 pirúvico	16
Figura 5	Formación de AIA por bacterias, por la vía de la triptamina	16
Figura 6	Cultivos con BRNS obtenidos a partir de la fracción líquida de la macrocelda B del Bordo Poniente etapa IV	40
Figura 7	Cultivo en placa de BRNS utilizando bolsas para anaerobiosis	41
Figura 8	Cultivos puros de BRNS en viales provenientes de la fracción líquida del Bordo Poniente	41
Figura 9	Características morfológicas celulares de las BRNS aisladas del Bordo Poniente (100x)	43
Figura 10	a) Crecimiento de 13 cultivos seleccionados de BRNS. b) Cultivo masivo de BRNS	45
Figura 11	Respuesta de los sobrenadantes de cultivos de BRNS a la reacción de Salkowski	54
Figura 12	Curva patrón para cuantificar la concentración de AIA mediante el uso del reactivo de Salkowski	55
Figura 13	Cromatogramas del HPLC superpuestos con diferentes concentraciones conocidas de AIA	59
Figura 14	Cromatogramas de HPLC que indican e identifican las diferentes concentraciones de AIA y tiempo de retención	60
Figura 15	Determinación por colorimetría de la presencia de AAL en el sobrenadante de cultivos de BRNS	64

## Índice de tablas

Tabla 1	Familias y géneros de BRNS	6
Tabla 2	Precios en el mercado de AIA y AAL, laboratorios que lo fabrican y el país de origen	24
Tabla 3	Morfología celular de los 13 cultivos puros de BRNS aisladas del Bordo Poniente	44
Tabla 4	Absorbancia máxima in vivo de pigmentos de los 13 cultivos de BRNS	48
Tabla 5	Máximos de absorbancia de pigmentos bacterianos extraídos con acetona-metanol de los 13 cultivos seleccionados	51
Tabla 6	Concentración de Bchl <i>a</i> en cultivos de BRNS con y sin L-Trp, extraídos con acetona: metanol (7:2)	53
Tabla 7	Concentraciones conocidas de AIA, medidas por espectrofotometría a 535 nm	56
Tabla 8	Concentraciones de AIA por espectrometría de 11 cultivos puros de BRNS	58
Tabla 9	Concentraciones de AIA ( $\mu\text{g/mL}$ ) en el sobrenadante de seis cultivos, mediante una curva conocida, con y sin la adición de L-Trp	61

## Índice de abreviaturas

AAL	Ácido aminolevulínico
AIA	Ácido indolacético
Bchl	Bacterioclorofila a
BRNS	Bacterias rojas no sulfurosas
Ha	Hectárea
Kg	Kilogramo
L	Litro
L-Trp	L-Triptófano
M	Molar
Mg	Miligramo
Min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Ng	Nanogramos
Nm	Nanómetros
Pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador de fosfato salino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
PM	Peso Molecular
RNAse	Enzima que degrada el RNA
rpm	Revoluciones por minuto
T. A.	Temperatura Ambiente



TAE	Tris Acetato EDTA
T <sub>m</sub>	Temperatura de alineamiento
μ	Micra
μg	Microgramo
μl	Microlitro
°C	Grado centígrado
U	Unidad

## I. INTRODUCCIÓN

Las bacterias fotosintéticas son un grupo de microorganismos Gram-negativos que convierten la energía luminosa en energía química por el proceso de la fotosíntesis anoxigénica; cuentan con pigmentos fotosintéticos como carotenoides y bacterioclorofilas (Bchl) de los tipos *a*, *b*, *c*, *d*, *e* y *g*, crecen autotróficamente con CO<sub>2</sub> como única fuente de carbono (Pfennig, 1969). Estos microorganismos presentan una gran versatilidad metabólica y tienen la capacidad de crecer fotoorganotróficamente, fotolitoautotróficamente y quimioorganotróficamente. Pueden desarrollarse en ambientes extremos (exceso de sal, cálidos, fríos y alcalinos), en oscuridad o con luz (Madigan y Gest, 1979). De las bacterias fotosintéticas, las rojas no sulfurosas (BRNS), son las más versátiles (Imhoff, 1995), ya que pueden crecer fotoautotróficamente o heterotróficamente, por fermentación o por respiración aeróbica o anaeróbica; están muy bien distribuidas, en ambientes anóxicos, donde pueden utilizar como principal fuente de energía compuestos orgánicos de peso molecular bajo.

El interés científico de las BRNS se deriva de 1) arquitectura molecular simple 2) su diversidad y 3) su participación principal en los ciclos del carbono y del azufre en ecosistemas naturales (Overmann y García-Pichel, 2013).

Las especies más representativas e investigadas de las BRNS son: *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodopseudomonas palustris* y *Rubrivivax benzoatilyticus* (Madigan y Jung, 2009), las cuales producen metabolitos secundarios como el Ácido Indol-3-acético (AIA) (Koh y Song, 2007) y Ácido aminolevulínico (AAL) que son utilizados en la agricultura por su actividad como herbicidas, insecticidas y

promotores de crecimiento en plantas (Nagadomi, *et al.*, 2000), por lo anterior las BRNS son consideradas como biofertilizantes naturales (Hosny y Elbanna, 2011).

Debido a las condiciones desfavorables en que se encuentran los suelos por la aplicación de fertilizantes químicos se ha incrementado el interés por este tipo de microorganismos, dando pie a la denominada agricultura orgánica (Thanawan *et al.*, 2012). Países como Tailandia, China y Japón, son pioneros en el uso AIA y AAL sintetizados a partir de las BRNS, donde ya se comercializan a un costo alto debido a que no existe competencia, sin embargo en México, la presencia de estas bacterias aún es desconocida.

## II. MARCO TEÓRICO

La comprensión actual de las relaciones evolutivas de los procariontes, se basa principalmente en estudios sobre las secuencias del 16S rRNA, donde las bacterias fotosintéticas están ubicadas en los Dominios Archaea y Bacteria (Gupta *et al.*, 1999).

Dentro del Dominio Bacteria, están las bacterias fotosintéticas divididas de la siguiente manera: a) Bacterias Gram positivas pertenecientes a la Familia Heliobacteriaceae, b) Bacterias verdes no sulfurosas (bacterias verdes filamentosas), c) Bacterias verdes sulfurosas, d) Cianoprocariontes y e) Proteobacteria (bacterias rojas sulfurosas y no sulfurosas).

En ambientes naturales, las bacterias rojas usan el sulfuro, tiosulfato o el hidrógeno como donadores de electrones en la fotosíntesis, así mismo utilizan sub-unidades reducidas de sustratos como sulfuro de hidrógeno, hierro férrico y un número de

sustratos orgánicos simples sin que produzcan oxígeno durante la fotosíntesis (Imhoff, 2008).

Las bacterias rojas pueden ser  $\alpha$ ,  $\beta$  ó  $\gamma$  Proteobacteria que preferentemente crecen bajo condiciones fotoheterotróficas, aunque la mayoría de ellas tienen la capacidad de crecer fotoautotróficamente con hidrógeno y con varios compuestos de azufre reducido, como donadores de electrones. Sólo algunas especies de BRNS tienen la capacidad de oxidar completamente al sulfuro a sulfato (Imhoff, 2008). El aparato y los pigmentos fotosintéticos están en un extendido sistema de membranas internas las cuales proceden de una membrana citoplasmática continua (Drews e Imhoff, 1991).

La fotosíntesis de las bacterias fotótrofas está basada en sistemas con bacterioclorofilas; el primero consiste en una antena almacenadora de luz y en centros de reacción, donde la energía pasa por un gradiente redox a través de la membrana y el segundo sistema en bacteriorhodopsina está basado en el conjunto Retinal, se encuentra en el Dominio Archaea y una gran variedad de bacterias con bacterioclorofila a y b, aquí utilizan la energía de la luz para la translocación directa de protones a través de la membrana citoplasmática (Overmann y García-Pichel, 2013).

Las bacterias fotosintéticas utilizan cuatro clases de moléculas pigmentarias: porfirinas de magnesio (clorofilas y Bchls, también llamadas clorinas), tetrapirroles de cadenas abiertas o pigmentos bilinares (ficobilinas), carotenoides y retinal. Las moléculas que no forman parte de los centros de reacción, se integran a complejos captadores de luz, los cuales son componentes de las cadenas de transporte de electrones que se localizan en los sistemas de membranas intracelulares con diferentes arquitecturas

dependiendo de la especie o del grupo taxonómico (figura 1) (Overmann y García-Pichel, 2013).

**Grupo de bacterias**

**Forma de aparatos fotosintéticos**

Heliobacteriaceae



Bacterias Verdes  
Sulfurosas



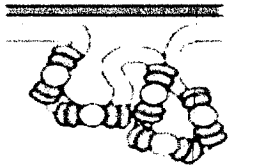
*Chloroflexus* sp.



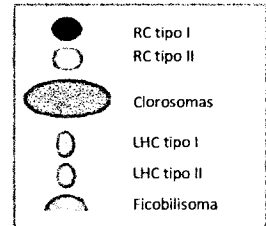
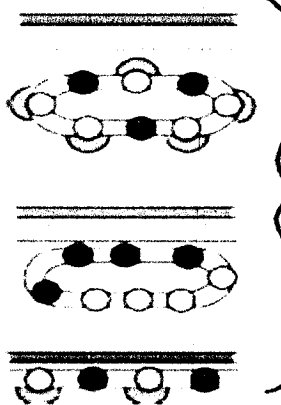
*Roseiflexus castenholzii*  
*Heliolithrix oreagonensis*



Proteobacteria



Cianobacteria



**Vesículas**

*Rhodospirillum rubrum*,  
*Rhodovibrio*, *Roseospira*,  
*Rhodospira*, *Rhodobacter*,  
*Rhodovulum*, *Rhodospira*  
most Chromatiaceae

**Apilados**

*Rhodospirillum photometricum*,  
*Rhodospirillum*,  
*Ectothiorhodospira*, *Haloerhodospira*

**Laminillas**

*Rhodothalassium*, *Rhodocista*,  
*Rhodospseudomonas*, *Blastochloris*,  
*Rhodobium*, *Rhodomerulum*

**Tubos agrupados**

*Thiocapsa pferri*

**Pocos tubos**

*Rhodocyclus*, *Rubrivivax*

**Radial**

*Microcoleus lithophiloides*

**Concéntrico**

*Synechococcus maris*

**Apilados**

*Kanachloron*, *Phormidium*,  
*Prochloron*

**Individual, al azar**

*Nostoc*, *Anabaena*

Figura 1. Arquitectura de las membranas intracelulares de las bacterias fotosintéticas. OM = membrana externa, CW = pared celular, CM = membrana citoplasmática, RC = centro de reacción, LHC = complejo de almacenamiento de luz (Overmann y García-Pichel 2013).

En la tabla 1 se presentan las familias y géneros de las BRNS conocidas.

Tabla 1. Familias y géneros de BRNS (Overmann y Garcia-Pichel 2013, <http://www.bacterio.net/index.html>)

Taxonomía/Filogenia	Género	Abreviación del género	Morfología
<b>BRNS (Familia)</b>			
<b>α-Proteobacteria</b>			
Rhodobacteraceae	<i>Rhodobaca</i>	<i>Rca</i>	Coco a pequeños bacilos
Rhodobacteraceae	<i>Rhodobacter</i>	<i>Rba.</i>	Bacilo
Rhodobacteraceae	<i>Rhodovulum</i>	<i>Rdv.</i>	Coco-bacilo
Bradyrhizobiaceae	<i>Rhodopseudomonas</i>	<i>Rps</i>	Barras en florecimiento
Bradyrhizobiaceae	<i>Rhodoblastus</i>	<i>Rbl.</i>	Barras en florecimiento
Bradyrhizobiaceae	<i>Blastochloris</i>	<i>Blc</i>	Barras en florecimiento
Hyphomicrobiaceae	<i>Rhodomicrobium</i>	<i>Rmi.</i>	Barras en florecimiento
Rhodobiaceae	<i>Rhodobium</i>	<i>Rbi.</i>	Bacilo
Hyphomicrobiaceae	<i>Rhodoplanes</i>	<i>Rpl.</i>	Bacilo
Rhodospirillaceae	<i>Rhodocista</i>	<i>Rcs</i>	Espirilos
Rhodospirillaceae	<i>Rhodospirillum</i>	<i>Rsp.</i>	Espirilos
Rhodospirillaceae	<i>Phaeospirillum</i>	<i>Phs</i>	Espirilos
Acetobacteraceae	<i>Rhodopila</i>	<i>Rpi.</i>	Coco
Rhodospirillaceae	<i>Rhodospira</i>	<i>Rsa.</i>	Espirilos
Rhodospirillaceae	<i>Rhodovibrio</i>	<i>Rhv</i>	Vibrio
Rhodobacteraceae	<i>Rhodothallasium</i>	<i>Rts.</i>	Espirilos
Rhodospirillaceae	<i>Roseospira</i>	<i>Ros.</i>	Espirilos
Rhodobiaceae	<i>Roseospirillum</i>	<i>Rss.</i>	Espirilos
<b>β-Proteobacteria</b>			
Rhodocyclaceae	<i>Rhodocyclus</i>	<i>Rcy.</i>	Bastones curvos
Comamonadaceae	<i>Rhodoferax</i>	<i>Rfx.</i>	Bacilos, Vibrio
	<i>Rubrivivax</i>	<i>Rvi.</i>	Bacilos, bacilos curvos

Las bacterias rojas se subdividen en rojas sulfurosas y rojas no sulfurosas, esto es dependiendo de la habilidad para metabolizar compuestos reducidos del azufre (Brune, 1995).

Una propiedad común de las bacterias fotosintéticas es la posesión de pigmentos fotosintéticos, los cuales permiten realizar procesos de transferencia de energía, característica que lleva a cabo en su aparato fotosintético.

Todas las bacterias que llevan a cabo la fotosíntesis anoxigénica emplean un fotosistema; la disminución en el potencial redox que puede sufrir un solo fotosistema tras la excitación parece estar limitada. Termodinámicamente, se requieren dos fotosistemas diferentes para la utilización favorable del agua como donador de electrones para la fotosíntesis, sin embargo, debido a la relativa arquitectura simple de sus fotosistemas, todas las bacterias fotótrofas anoxigénicas dependen de un donador de electrones que exhiben estándares con potencial redox más negativos que el del agua como el que tiene el sulfuro de hidrógeno, hidrógeno, acetato o compuestos de bajo peso molecular (Blankenship, 2002).

Los diferentes pigmentos fotosintéticos, se sintetizan para la transformación de la luz en energía química, dando como resultado cultivos de células de una coloración clara en función del contenido de pigmentos que van desde verde, amarillo-verde, verde-marrón, marrón, de color marrón- rojo, rojo, rosa, morado y púrpura-violeta hasta incluso azules (carotenoides mutantes de ciertas bacterias rojas los cuales contienen Bchl *a*). En particular, las bacterias verdes y rojas sulfurosas son los principales organismos en el ciclo biológico del azufre y forman florecimientos masivos bajo condiciones adecuadas, ambos grupos utilizan compuestos reducidos del azufre que se encuentran disponibles, por consiguiente no hay liberación de oxígeno (Imhoff, 2008).



La Bchl a es un pigmento que capta la luz y éste a su vez es un componente del centro de reacción de las bacterias fotótrofas (Kolber *et al.*, 2001). Uno de los objetivos de los carotenoides es captar el exceso de luz y hacer más eficientes a las células protegiéndolas de una lesión a nivel fotosintético (Lima *et al.*, 2011).

Los principales grupos de bacterias fotótrofas son diferenciadas con base en su estructura fundamental, a sus propiedades moleculares, fisiológicas y a la secuenciación de la región de la sub-unidad 16 rDNA, Estos datos han revelado las relaciones filogenéticas entre bacterias fototróficas anoxigénicas (Overmann y García-Pichel, 2013).

Como todos los seres vivos, en el metabolismo de los microorganismos se biosintetizan dos tipos de sustancias: metabolitos primarios y secundarios, los primeros se caracterizan por ser indispensables en los procesos de crecimiento y supervivencia en los organismos además de estar presentes en cantidades abundantes. Los segundos, son moléculas orgánicas con estructuras químicas que no están involucradas en el crecimiento y desarrollo de los organismos (Agostini *et al.*, 2012), por lo que son derivados del metabolismo primario y producidos por plantas y ciertas especies de microorganismos como hongos, protozoarios y bacterias (Shilpa y Lakshmi, 2010). Los metabolitos son productos naturales, a los que el ser humano ha encontrado diferentes aplicaciones para mejorar la calidad de vida; son utilizados como agentes antibacterianos, antifúngicos, antitumorales, antioxidantes, citotóxicos, antiparasitarios y antivirales (De la Rosa y Gamboa, 2004).

Se ha descubierto que diversos organismos como hongos, algas y bacterias, como las rojas no sulfurosas, producen metabolitos secundarios como el Ácido Indol Acético (AIA) el cual es la principal fitohormona que regula diversos procesos en las plantas (Koh y Song, 2007), también pueden biosintetizar AAL, un compuesto fotodinámico, que funciona como un efectivo herbicida biodegradable e insecticida en los cultivos de vegetales (Sasikala *et al.*, 1994).

Antiguamente se aceptó que las sustancias secundarias se producían sin conocer sus funciones específicas, después se encontró que muchas de estas poseen altos rendimientos y que tienen múltiples funciones en las plantas (Wink, 2007).

En el caso de las plantas, los compuestos secundarios no tienen una función aparente en el metabolismo primario pero sí tienen una implicación ecológica como defensa contra herbívoros, virus, hongos, bacterias, como sustancias alelopáticas, fitoalexinas o disuasorios nutritivos (Bourgaud *et al.*, 2001). Otros tienen una función fisiológica, por ejemplo los alcaloides, las pectinas que pueden servir para el transporte de nitrógeno tóxico y compuestos de almacenamiento, mientras los compuestos fenólicos como los flavonoides realizan una función como protectores de rayos ultravioletas (Wink, 2007). Además, son una fuente importante de principios activos de medicamentos y de valiosos productos químicos (Goossens, 2003).

Por otro lado, es claramente conocida la habilidad de los microorganismos para sintetizar fitohormonas (Mishke 1988; Costacurta y Vanderleyden, 1995; Tsakelova *et al.*, 2007), las cuales pueden ser producidas con una gran actividad e interacción con las plantas, como es el caso la simbiosis y en algunas situaciones con consecuencias patogénicas. Bacterias, micromicetos y algas producen auxinas, citoquininas o

giberelinas producto de su metabolismo secundario (Janitor, 2002). Así mismo hay microorganismos que sintetizan otras sustancias como el etileno, ácido abscísico, brasinoesteroides, oligosacarinas, ácido salicílico y ácido jásmonico (Tsakelova *et al.*, 2007).

Dentro de las auxinas, el AIA es el más reconocido, a nivel microbiano, es el principal regulador de crecimiento vegetal producido por bacterias tanto benéficas (fotosintéticas) y algunas patógenas. Se ha observado que esta fitohormona es promotora del crecimiento y madurez en frutos de aguacate a concentraciones entre 100 y 1000  $\mu\text{M}$  (Tingwa y Young, 1975).

Se confirmó la relación inversa entre niveles endógenos de AIA y el crecimiento en la zona de elongación en cultivos de maíz, donde se observó un incremento en la longitud de 2.25 a 5 mm (Pilet y Saugy, 1987). Esta auxina, puede ser producida por BRNS como *Rhodopseudomonas sp.*, *Rubrivivax benzoatilyticus* JA2, *Rhodopseudomonas sp.* (Harada *et al.*, 2005, Koh y Song, 2007, Ranjith *et al.*, 2010).

El mecanismo de acción de AIA en raíces meristemáticas, se debe a la relación antagonista entre las auxinas y citoquininas que son esenciales para el desarrollo vegetal como lo es la división celular. El AIA activa a los genes ARR7 y ARR15 que codifican a una señal represora de citoquininas (Muller y Sheen 2007; Muller y Sheen 2008; Chapman y Marck, 2009).

Por otro lado, en los últimos años también se ha presentado un interés en el AAL, que es un precursor común de compuestos naturales como la clorofila, hemo, vitamina B<sub>12</sub> y la coenzima F<sub>430</sub>, siendo estos metabolitos esenciales para todos los organismos vivos (Jahn y Heinz, 2009).

De acuerdo con Sasikala y Ramana (1995) el modo de acción de AAL como un herbicida e insecticida depende de la conversión a tetrapirroles (magnesio mono- y divinil protoporfirina IX, sus monoésteres, y mono y divinil protoclorofilido) que conduce a la formación en exceso de dichos compuestos que actúan de este modo en los fotosensibilizadores, la conversión del triplete de oxígeno a la forma simple potencialmente oxidante

En las plantas, cuando el AIA es utilizado como herbicida, el oxígeno molecular oxida los fosfolípidos de las membranas y los radicales libres reaccionan en cadena; las membranas dañadas se agujeran, la planta pierde savia y la muerte se produce entre una y cuatro horas (Sasikala y Ramana, 1995). Además de la propiedad herbicida de AAL, también es un buen estimulador del crecimiento de plantas cuando se usa a bajas concentraciones (Tanaka *et al.*, 1992).

Actualmente diversos compuestos amigables con el ambiente y el ser humano han llamado la atención, como los fotosensibilizadores como el AAL, los cuales son dispersos en plantas y cuando estos tienen contacto con los insectos, actúan como un compuesto fotoactivo el cual es acumulado en su cuerpo y después de tener contacto con la luz solar, induce daños en la cutícula, en los tubos de Malpighi, la pared del intestino medio, inhibe la alimentación y finalmente causa la muerte del insecto (Luksiené *et al.*, 2007).

Diferentes estudios demuestran la producción de AAL en BRNS como *Rubrivivax benzoatilyticus* PS-5 (Sattayasamitsathit y Prasertsan 2013), *Rhodopseudomonas* sp., *Rhodopseudomonas palustris* KG31 (Choorit *et al.*, 2013) y *Rhodobacter sphaeroides* (Hotta *et al.*, 1997).

Se han descrito diversos metabolitos secundarios los cuales son producidos por microorganismos como hongos, protozoarios y bacterias, enfocándose sobre todo en la síntesis de AIA producido por bacterias, los estudios en éstas involucran beneficios como estimulantes o promotores de crecimiento en vegetales (Patten y Glick, 1996).

En la literatura, las vías descritas se denominan en su mayoría de acuerdo con un intermediario clave de una vía determinada (figura 2).

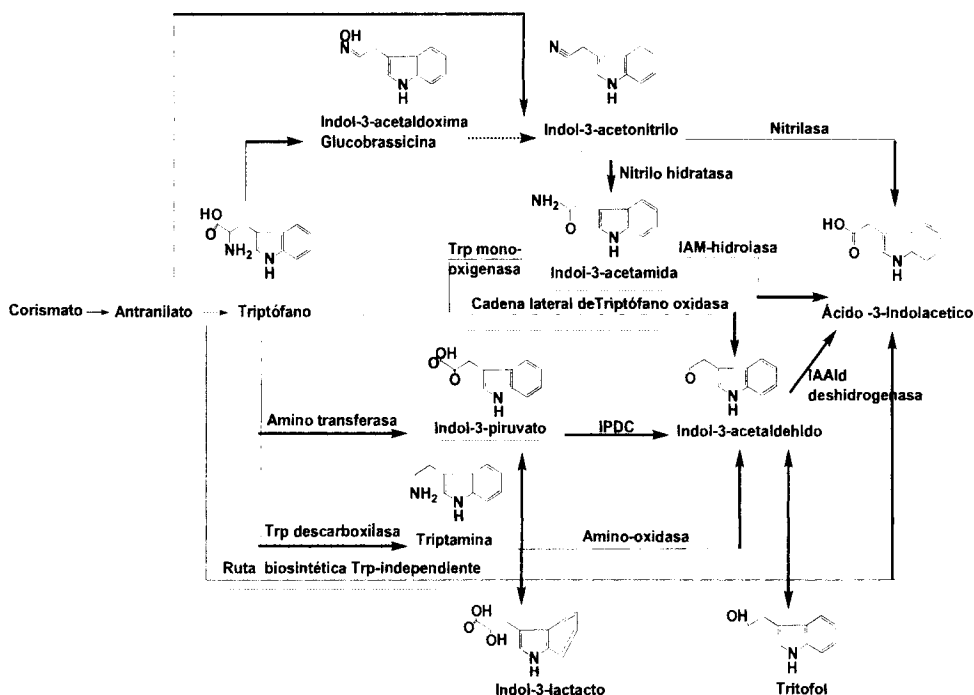


Figura 2. Rutas biosintéticas de AIA en bacterias. Las líneas continuas se refieren al nombre de las vías, en su mayoría lleva el nombre de un intermediario. IAALD, indol-3-acetaldehído; IAM, indol-3-acetamida; IPDC, indol-3-piruvato descarboxilasa; Trp, L-Trp (Spaepen *et al.*, 2007).

Investigaciones intensas han identificado más de una ruta para la producción de AIA las cuales fueron clasificadas con base en los intermediarios que participan (Patten y Glick, 1996).

El principal precursor para la síntesis de AIA es L-Trp; se ha observado que la adición de este a los cultivos de las BRNS ha llevado a una mayor producción de AIA.

La biosíntesis de L-Trp inicia desde el modo metabólico de corismato, en una reacción de cinco pasos codificada por los genes *trp*. El corismato es el compuesto de punto de ramificación que se sintetiza a partir de fosfoenolpiruvato y eritrosa 4-fosfato por la vía de Shikimato, una vía común para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos y muchos metabolitos secundarios (Dosselaere y Vanderleyden 2001; Merino *et al.*, 2008).

A partir de L-Trp, se han descrito al menos cinco rutas diferentes para la síntesis de AIA y la mayoría de ellas son similares a las descritas en plantas, aunque puede haber diferencia en los intermediarios involucrados (Patten y Glick, 1996; Woodward y Bartel 2005; Spaepen *et al.*, 2007a). Se han utilizado técnicas genéticas y bioquímicas para identificar las vías de biosíntesis de AIA, sin embargo, aún no han sido caracterizados todos los genes, enzimas codificantes o productos intermedios que intervienen en estas vías (Spaepen y Vanderleyden, 2010).

A continuación se describen las rutas biosintéticas para la síntesis de AIA.

#### **a) Ruta biosintética de Indol-3-acetamida (IAM)**

La vía de indol-3-acetamida (IAM) está presente en varios microorganismos patógenos y les confiere virulencia mediante la producción de altas cantidades de AIA (Jameson 2000; Persello-Cartieaux *et al.*, 2003); actualmente se tienen caracterizados los

genes/proteínas y su regulación, que están implicados en esta vía la cual consta de dos pasos. En el primero la L-Trp monooxigenasa (codificada por el gen *iaaM*) convierte al L-Trp a Indol-3-acetamida (IAM) y en el segundo la IAM se hidroliza a AIA y amoníaco por medio de la IAM hidrolasa (codificada por el gen *AICH*). Los genes involucrados en la síntesis de AIA, se han caracterizado a partir del estudio de muchos fitopatógenos como *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas savastanoi*, *P. syringae*, *Pantoea agglomerans*, así como de bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno pertenecientes a *Bradyrhizobium* (Sekine *et al.*, 1989; Clark *et al.*, 1993; Morris 1995; Theunis *et al.*, 2004).

En *A. tumefaciens*, los genes *iaaM* y *iaaH* se encuentran en la región de ADN-T del plásmido pTi, junto con el gen *ipt* el cual codifica para dimetilalil pirofosfato: AMP dimetilalil transferasa), involucrados en la producción de citoquinina. Esta especie bacteriana puede infectar plantas dicotiledóneas en sitios de la lesión mediante la transferencia del ADN-T dentro de las células de la planta (colonización genética), cuando se integra de forma estable en el genoma.

Varios genes codificados en el ADN-T se expresan en el núcleo de la planta provocando un desequilibrio en el estado hormonal de sus células induciendo de ese modo tumores de la corona. En *Arabidopsis*, los patógenos como *Pseudomonas. pv savastanoi* y *P. savastanoi*, producen grandes cantidades de AIA, el cual es secretado (Glickmann *et al.*, 1998; Manulis *et al.*, 1998; Buell *et al.*, 2003).

Los genes *iaaM* y *AICH* se encuentran en el plásmido pIAA1 (Comai y Kosuge 1982) ambos genes se agrupan en el operón de AIA y la pérdida del plásmido pIAA1 da como resultado la producción nula de AIA en cultivos bacterianos de vida libre. Por otro lado,

en cultivos de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium japonicum*, la producción de AIA se lleva a cabo a través de la vía de IAM, que pueden convertirlo a través del gen análogo IAM. El gen *bam* con una secuencia similar con el gen *iaaH*, puede ser aislado a partir de *B. japonicum* (Sekine *et al.*, 1988; Sekine *et al.*, 1989); más tarde la presencia de la vía de IAM también se confirmó en *Rhizobium* sp. (cepa NGR234) por medio de cromatografía líquida y espectrometría de masas de los compuestos intermediarios (Theunis *et al.*, 2004).

A través de un análisis bioquímico, Van Onckelen *et al.* (1986) confirmaron que el gen T-DNA 1, ahora conocido como *tms-1* codifica a la enzima L-Trp 2 monooxigenasa, que cataliza la síntesis de indolacetamida a partir de L-Trp. Entonces la enzima indoleacetamida hidrolasa convierte a indolacetamida en AIA (figura 3).

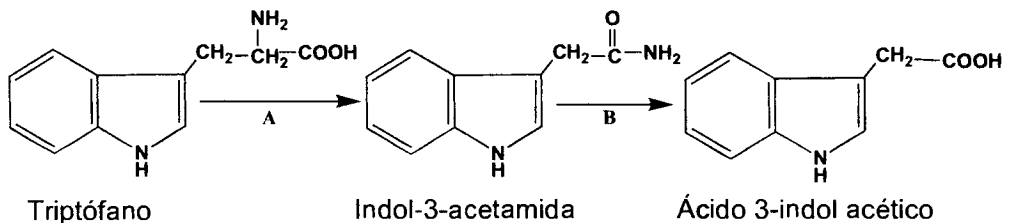


Figura 3. Síntesis de AIA a partir de L-Trp por la ruta 3-indol acetamida. A, L-Trp 2-monooxigenasa, B, indolacetamida hidrolasa (Van Onckelen *et al.*, 1986).

### b) Ruta biosintética de cadena lateral de L-Trp

Se ha demostrado en *Pseudomonas fluorescens* una ruta para la biosíntesis de IAA en la que L-Trp se convierte directamente a indol -3-acetaldehído, sin pasar a ácido indol -3- pirúvico, en ésta, el indolacetaldehído se produce a partir de L-Trp por la acción de la cadena lateral de L-Trp oxidasa y en Trp la que se oxida posteriormente a IAA por la



enzima aldehído deshidrogenasa (figura 4) (Narumiya *et al.*, 1979; Oberhänsli *et al.*, 1991).

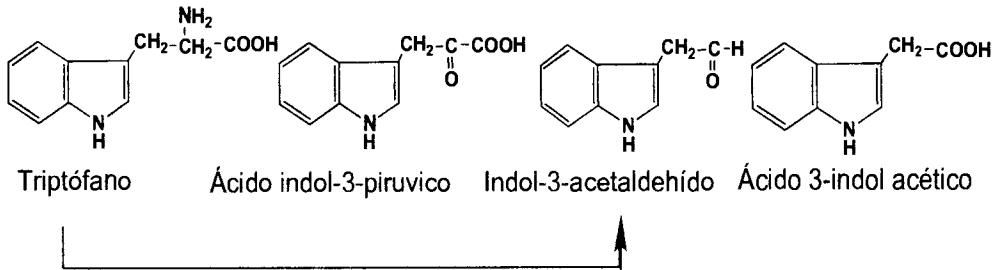


Figura 4. Formación de AIA por bacterias a partir de L-Trp por la vía del ácido indol 3 pirúvico, (A-C) y la ruta de cadena lateral de L-Trp (D). A) L-Trp transferasa; B) indol 3 pirúvato descarboxilasa; C) indol 3 acetaldehído oxidasa; D) cadena lateral de L-Trp oxidasa (Narumiya *et al.*, 1979).

### c) Ruta biosintética de la triptamina

El L-Trp puede ser convertido a indol-3-acetaldehído y después a AIA, por la vía de la triptamina (figura 5). El metabolismo inicial del L-Trp a triptamina es catalizado por la L-Trp descarboxilasa, seguido por la conversión de triptamina a indol acetaldehído por la amino oxidasa (Taiz y Zeiger, 1991).

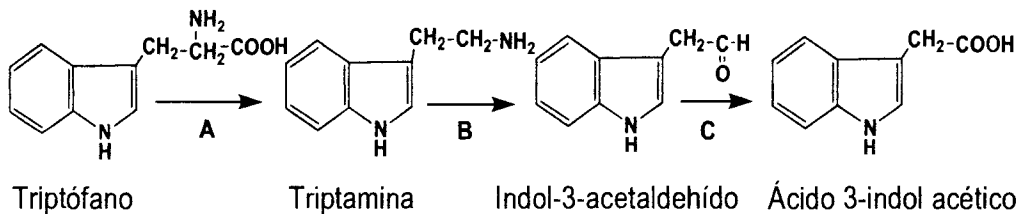


Figura 5. Formación de AIA, por la vía de la triptamina. A) L-Trp descarboxilasa; B) amino oxidasa; C) indol-3-acetaldehído oxidasa.

Para que las plantas puedan llegar a desarrollarse satisfactoriamente, es necesaria la coordinación de procesos fisiológicos como la absorción de nutrientes, mecanismos fotosintéticos y ciclos externos en el suelo y en el ambiente, de los cuales depende su correcto funcionamiento, también es necesaria la intervención de hormonas vegetales o promotores de crecimiento vegetal. Las fitohormonas o auxinas han sido reconocidas como agentes que desencadenan procesos que llevan a la germinación de semillas se ha observado que actúan en diferentes niveles celulares y moleculares en tallos y hojas adyacentes (Tanimoto, 2005).

Las funciones de las auxinas en los tejidos vegetales están estrechamente ligadas a la elongación celular, el fototropismo, el geotropismo, la dominancia apical, la iniciación de la raíz y el desarrollo de frutos. Actualmente, se conocen siete tipos de fitohormonas: auxinas, giberelinas, citoquininas, brasinoesteroide, ácido abscísico, etileno y ácido jasmónico, las cuales participan en la regulación del crecimiento de las plantas (Tanimoto, 2005). Algunas auxinas, principalmente el AIA pueden ser producidas por bacterias y hongos, así mismo como las giberelinas, los cuales tienen un rol importante en los cultivos (Bashan *et al.*, 2004).

Los promotores de crecimiento participan básicamente, en la producción de los reguladores de crecimiento vegetal, los cuales incrementan la velocidad de germinación en las semillas fortaleciendo los mecanismos naturales de defensa de la planta y estimulación del sistema radicular, además de proveer de otras ventajas y beneficios a la planta (Rojas y Ramírez, 1993). Un ejemplo de este es el AAL el cual a concentraciones bajas, tiene la capacidad de incrementar el contenido de clorofila y acelerar el crecimiento de plantas y semillas de arroz (Tanaka *et al.*, 1992).

Los reguladores de crecimiento vegetal o fitohormonas, son compuestos de peso molecular bajo que actúan a bajas concentraciones en sitios distantes de donde son producidos, interviniendo en numerosos procesos fisiológicos como el desarrollo de tejidos, crecimiento del tallo y la caída de hojas, entre otros (Purves *et al.*, 2002).

Los reguladores de crecimiento vegetal, actúan de uno u otro modo en todos los procesos de su desarrollo, estos fenómenos de regulación pueden clasificarse de acuerdo con Rojas y Ramírez (1993) en:

- a) De correlación, como multiplicación y alargamiento celular, dominancia apical, actividad de las yemas, letargo y abscisión de órganos
- b) De sensibilidad o movimiento como los tropismo y nastias
- c) De reproducción como floración, polinización y desarrollo del fruto

Dentro de los procesos fisiológicos se encuentra incluida la síntesis de sustancias como reguladores de crecimiento (auxinas, giberelinas, citocinas, etc.), los cuales son compuestos que actúan como reguladores endógenos del crecimiento y desarrollo en las plantas superiores (Rojas y Ramírez, 1993; Juárez-Hernández *et al.*, 2011).

Las auxinas son conocidas como el primer regulador de crecimiento vegetal estudiado en plantas, se les identifica como compuesto químico de alto potencial en la agricultura; su acción no solo se limita al fototropismo, sino que también las auxinas son identificadas por su participación en la elongación celular, dominancia apical, aparición de raíces adventicias, diferenciación vascular, formación de flores y frutos (Rojas y Ramírez, 1993; Juárez-Hernández *et al.*, 2011).

Las giberelinas, cumplen funciones importantes en las plantas entre las que se encuentran: inducción de síntesis enzimática, promoción de la germinación de semillas,

rompimiento de estados de dominancia o latencia de estructuras vegetativas o semillas, activación de la elongación de tallos y raíces, así como el desarrollo de frutos (Rojas y Ramírez, 1993; Juárez-Hernández *et al.*, 2011).

Las auxinas y giberelinas son por lo tanto, reguladores de crecimiento vegetal, que en plantas, modulan o afectan un amplio abanico de respuestas y que en su ausencia generaría un gran retraso o hasta inhibición del crecimiento vegetal (Rojas y Ramírez, 1993; Juárez-Hernández *et al.*, 2011).

En la naturaleza, la producción de auxinas y giberelinas no solo se lleva a cabo en el desarrollo normal de las plantas, sino también por microorganismos que generarán un impulso en el crecimiento de estas y de tal manera un mejor desarrollo para incrementar la capacidad de los cultivos (Rojas y Ramírez, 1993; Juárez-Hernández *et al.*, 2011), una de estas auxinas es el AIA.

### **Ácido Indol-3-Acético (AIA)**

El AIA es la principal hormona que regula varios procesos fisiológicos y de desarrollo en plantas, estimulando el crecimiento de raíces más largas y tallos nuevos (Tsavkelova, 2007), también es reconocido como una molécula señal de suma importancia en la relación bacteria-planta (Spaepen *et al.*, 2007).

El AIA es una de las auxinas fisiológicamente más activas, es un producto común derivado del metabolismo de L-Trp llevado a cabo por varios microorganismos, que incluyen a las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Lynch, 1985; Frankenberger y Brunner, 1983): entre estas se encuentran las BRNS (Sattayamitsathit y Prasertsan, 2013).

Debido a que el AIA es soluble en agua y de peso molecular bajo, es posible aplicarlo en áreas agrícolas *in vitro* o de forma exógena a los cultivos (Castillo *et al.*, 2005). Un ejemplo es en las semillas de jitomate que crecieron adicionando AIA producido por BRNS, observándose que la germinación de éstas fue superior al 31.8% comparada con el control y el crecimiento de la raíz fue de 104.4% más, respectivamente (Koh y Song, 2007).

Por lo que a futuro el AIA puede ser evaluado y utilizado como un biofertilizante, para mejorar la productividad de cultivos vegetales, el cual traería como beneficio un mejoramiento en la productividad a bajo costo.

### **Algunas aplicaciones de AIA en la agricultura**

De Brito *et al.* (1995) añadieron inoculantes microbianos a cuatro compostas comerciales para estimular el crecimiento del tomate y observaron un incremento de 66,7% a 73,8% en el peso seco de plantas de tomate. Maudinas *et al.* (1981) reportaron que las plantas de arroz tratadas con *Rhodopseudomonas capsulata* (BRNS) y *Azotobacter vinelandii* aumentó de hasta 257%. Koh y Song (2007) compararon sus resultados de las bacterias *Rhodopseudomonas* BL6 y KL9 con los expuestos anteriormente y considerando condiciones experimentales diferentes, confirmando que los compuestos producidos por estas bacterias son promotores de crecimiento vegetal eficientes.

## **Ácido 5-Aminolevulínico (AAL)**

El AAL es un precursor de tetrapirroles, entre los cuales se encuentran: hemo (proteína), porfirinas, clorofilas y la vitamina B<sub>12</sub>, los cuales son sintetizados por la vía del porfobilinógeno. Este ácido también es un medicamento fotodinámico en tratamientos de cáncer de piel (Dijkstra *et al.*, 2001) sin ser tóxico en el humano ni animales (Rebeiz, 1988a). El AAL puede ser producido por dos rutas principales, una de ellas es la ruta C<sub>4</sub> o de Shemin la cual está presente en mamíferos, aves, levaduras, algunos protozoarios y bacterias fotosintéticas como las rojas no sulfurosas. En esta ruta, el piridoxal 5'-fosfato depende de la enzima ALA sintasa [ALAS: succinil-CoA: glicina succinil transferasa (decarboxilación)] que cataliza la condensación de succinil-CoA y glicina para producir ALA (Jordan, 1991).

La segunda vía es la ruta C<sub>5</sub>, la cual se lleva a cabo en plantas superiores, algas y algunas bacterias entre ellas *Escherichia coli* (Li *et al.*, 1989), *Salmonella typhimurium* (Beale, 1999) y *Rubrivivax benzoatilyticus* PS-5 (Sattayasamitsathit y Prasertsan, 2013).

El AAL se puede sintetizar a partir de glutamato en tres pasos (Beale y Weinstein, 1990): los cuales se encuentran a continuación.

1) Activación del C<sub>1</sub> de glutamato requiriendo ATP y Mg<sup>2+</sup>; 2) reducción de la actividad del grupo carboxilo por NADPH para formar glutamato 1-semialdehído (GSA) y 3) transaminación de GSA para formar ALA.

### **Aplicaciones de AAL en la agricultura**

El AAL es usado de forma variable en la agricultura, no solo como herbicida e insecticida sino también como promotor de crecimiento vegetal (Sasaki *et al.*, 2002).

El AAL a una concentración de 3 a 5 mM actúa como herbicida fotodinámico ya que las plantas que son tratadas con concentraciones altas de este, acumulan un exceso de protoporfirinas IX, que al exponerse las plantas a la luz se produce oxígeno activo y de este modo daña a la planta; por ello, entonces el ALA puede ser un sustituto seguro de herbicidas altamente tóxicos (Rebeiz *et al.*, 1988a).

En cuanto al uso de ALA como factor de crecimiento, se ha demostrado que cuando se aplica a concentraciones menores de 3 mM se incrementa el contenido de clorofila y acelera el crecimiento del tejido de la planta (Tanaka, 1992; Sasaki *et al.*, 2002); además, se ha visto que puede incrementar la eficiencia de la fotosíntesis (Sasaki *et al.*, 2002).

### **Valor de AIA y AAL en el mercado**

Actualmente, el costo de producción de cada metabolito implica varios procesos los cuales son complicados, además de que resultan en un bajo rendimiento y un precio muy alto, derivando esto, en que solo los países con mayor tecnología o grandes empresas transnacionales sean quienes los producen mediante procesos químicos (Kang *et al.*, 2012). En la tabla 2 se presentan los precios de AIA y AAL consultados en las diferentes páginas de internet de cada laboratorio que lo distribuye.

En los últimos años se busca desarrollar alternativas que permitan disminuir el efecto nocivo de los agroquímicos y de esta manera mejorando el equilibrio biológico y la fertilidad del suelo, mediante microorganismos benéficos los cuales pueden favorecer la producción de ciertos metabolitos como el AIA y AAL; beneficiando de este modo la productividad a largo plazo con un bajo costo para los agricultores (Rosales *et al.*,

2009). La biosíntesis de AIA por bacterias ha tenido gran impacto debido a que este puede llevarse a cabo por diferentes rutas metabólicas en un solo microorganismo, además de que estos se pueden encontrar en diversos ambientes (Patten *et al.*, 2013). Investigadores como Koh (Korea), Kumavath (Singapur), Mohite, Mujahid y Sasikala (India), Shahab (Pakistán), están a la vanguardia en las investigaciones de este metabolito.

Por otro lado Sasaki *et al.*, (2002) han observado que el AAL no solo tiene aplicaciones en la agricultura, sino también en la medicina como para tratamiento de cáncer, es por esto que diversos grupos de investigadores como: Sasaki, Kantachote, (Japón), Sasikala (India), Kang, Zhang (China), Lee y Koh (Korea), Thanawan, Sattayasanitsathit y Tomorn (Tailandia), han retomado el interés de este metabolito. Por lo que se realizó una búsqueda el día 13 de mayo de 2015 en diferentes páginas de internet, con la finalidad de consultar el precio de AIA y AAL, el laboratorio de lo distribuye y el país de origen (tabla 2).



Tabla 2. Precios en el mercado de AIA y AAL, laboratorios que lo fabrican y el país de origen.

Metabolito	Lab. Productor	País	Precio por gramo
Ácido Indolacético	1.- Plantmedia	Estados Unidos	\$65.92 MN
	2.- Gold Biotechnology	Estados Unidos	\$22.50 MN
	3.- MBFerts TM.	Estados Unidos	\$22.40 MN
	4.- New Sunshine	China	\$3.20 MN
Ácido Aminolevulínico	5.-MedKoo Biosciences	Estados Unidos	1,040 MN
	6.-Cosmo Bio Co., Ltd.	Japón	\$267 MN
	7.- Xian Natural Field Bio-technique., Co.	China	\$44.80 MN
	8.- Simagchem Corp	China	\$10.88

1.- <https://www.plantmedia.com>, 2.- <https://www.golbio.com>, 3.- <https://www.mbfets.com>,  
4.- <https://www.newsunshinelic.com>, 5.- <https://www.medkoo.com>, 6.- <https://www.cosmobio.com>,  
7.-<https://www.natural-field.com>, 8.- <https://www.simagchem.com>.

### **Biofertilizantes y sus características**

Los biofertilizantes son productos que contienen uno o varios microorganismos del suelo y pueden ser aplicados a la semilla, raíz, suelo y follaje con el fin de promover el crecimiento de las plantas, pueden asociarse directa o indirectamente al sistema

radicular de las plantas, favorecer su interacción e incrementar el desarrollo vegetal y reproductivo de la planta huésped (Aguirre *et al.*, 2009).

En el suelo ocurren diversas relaciones entre grupos microbianos que estimulan o inhiben la proliferación de un grupo fisiológico de estos. La diversidad microbiana propicia la búsqueda de microorganismos con actividad fisiológica específica (Alarcón y Ferrera, 2000).

Vassilev *et al.* (2001), consideran que un inoculante biológico es una preparación de microorganismos que puede sustituir parcial o totalmente la fertilización química. Los biofertilizantes se pueden aplicar en suelos degradados y donde la presencia de microorganismos ha sido afectada negativamente por el uso inapropiado de técnicas agrícolas (exceso de agroquímicos, talas, quemas, entre otras), que han propiciado la degradación del suelo y reducido su diversidad y efectividad (Salamanca, 2002). Además, se debe inocular cuando existen poblaciones altas de microorganismos que no se asocien eficientemente con la especie de planta cultivada.

En México, la utilización de inoculantes comerciales a base de *Rhizobium* fue una práctica generalizada por los productores agrícolas, además de ser recomendada por centros de investigación (INIFAP, 1990).

Los biofertilizantes fueron recomendados en la Agenda 21, como resultado de la llamada Cumbre de la Tierra en Río de Janeiro realizada en 1992; son considerados tecnologías "apropiables", que es un término creado para las herramientas biotecnológicas que contribuyen al desarrollo sostenible de un país y proveen

beneficios tangibles a los destinatarios, además, de ser ambientalmente seguras, socioeconómica y culturalmente aceptables (Aguirre *et al.*, 2009).

En 1999, se introdujo Hortic Plus, de Plant Health Care (PHC) en el mercado y en el 2000, se incluyeron sustratos con esporas especialmente para utilizarlos en invernaderos y con ello satisfacer la demanda de hortalizas sin embargo, no existen investigaciones serias sobre el beneficio de estos inoculantes comerciales (Armenta *et al.*, 2010).

Después del 2003, se retoma el proyecto de difusión del uso de los biofertilizantes; como iniciativa particular y se lograron avances importantes, como el hecho de que en México, los gobiernos de Guerrero y Michoacán, establecieron sendos programas de biofertilización y se extendía el uso de estos productos con resultados satisfactorios para los productores, que se reflejó en el aumento de la superficie terrestre fertilizada. Por ejemplo, en el estado de Guerrero, que inició en el 2006 el programa con una superficie de suelo de 30 mil hectáreas, para 2007, dicha superficie alcanzó las 300 mil hectáreas (Morales, 2009).

Los microorganismos utilizados en los biofertilizantes son clasificados dentro de dos grupos: el primero incluye microorganismos que tienen la capacidad de sintetizar sustancias que promueven el crecimiento de la planta, fijando nitrógeno atmosférico, solubilizando hierro, fósforo inorgánico y además de ayudar a las plantas al estrés por sequía, salinidad, metales tóxicos y exceso de pesticidas: el segundo incluye microorganismos capaces de disminuir o prevenir los efectos del deterioro provocado por microorganismos patógenos (Bashan y Holguin, 1997; Lucy *et al.*, 2004). Hay

microorganismos que pueden estar en los dos grupos, esto es que además de promover el crecimiento de la planta, inhiben los efectos de microorganismos patógenos (Kloepper *et al.*, 1980).

Los microorganismos que intervienen en la fijación biológica de nitrógeno atmosférico (FBNA) que es la reducción enzimática de nitrógeno (N<sub>2</sub>) a amonio (NH<sub>4</sub>), se han agrupado en: a) microorganismos (bacterias hongos y algas) que fijan nitrógeno en forma no simbiótica o de vida libre y b) microorganismos que fijan el nitrógeno en forma simbiótica con leguminosas y no leguminosas (*Azolla*, gramíneas y otras). La mayor cantidad de nitrógeno atmosférico fijado, se realiza a través de la relación simbiótica que se da entre leguminosas y las bacterias del género *Rhizobium* (Richards, 1987). Dentro de las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, las más estudiadas son los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Beijerinckia* y *Klebsiella*, especialmente en cultivos de caña de azúcar, arroz, sorgo, trigo y pastos tropicales forrajeros, donde es importante la fijación de nitrógeno entre estas plantas y las bacterias asociadas y de vida libre (Döbereiner *et al.*, 1995).

Se conoce un gran número de bacterias de vida libre o asociadas que destacan por su potencial como biofertilizantes (Diaz *et al.*, 2001; Zago *et al.*, 2000), entre las que se encuentran el género *Pseudomonas*. Los efectos positivos que ejercen estas bacterias en las plantas radican en que producen y segregan reguladores del crecimiento de plantas como auxinas, giberelinas y citoquininas, mejorando procesos como germinación de semillas y nutrición.

### **III.- OBJETIVOS**

#### **1.- Objetivo General**

Detectar la producción de los ácidos indolacético (AIA) y aminolevulínico (AAL) en cultivos de BRNS

#### **1.1.- Objetivos particulares**

1.1.1.- Aislar BRNS a partir de muestras naturales

1.1.2.- Detectar y caracterizar químicamente Ácido indol acético (AIA) y Ácido aminolevulínico (AAL) a partir de cultivos de BRNS

#### IV.- JUSTIFICACIÓN

Los fertilizantes químicos son sustancias de origen mineral, producidas ya sea por la industria química, o bien por la explotación de yacimientos naturales como fosfatos o potasa (RAP-AL, 2010).

El proceso actual de los fertilizantes es fabricar compuestos nitrogenados a partir del nitrógeno del aire, donde el amoníaco se obtiene mediante el método Haber-Bosch y se caracteriza por requerir altas cantidades de energía para lograr fijar en materiales inertes el nitrógeno y de esta forma ser utilizada por los productores. La energía deriva de fuentes no renovables como petróleo, gas o carbón. Döbereiner (1977) consigna que la energía requerida para producir una tonelada de fertilizante nitrogenado equivale a 7 barriles de petróleo (1,113 l) y Tilak (1998) refiere que la energía necesaria para elaborar 1kg de fertilizante nitrogenado son 80 MJ ó 11.2 kWh; para fósforo 12 MJ ó 1.1 kWh y para potasio es de 8MJ ó kWh. Un ejemplo muy claro es la cantidad que para producir las 77 millones de toneladas de fertilizantes nitrogenados que se aplicaron en el mundo en 2002, se requirieron de 100 millones de toneladas de combustible para su fabricación, lo que correspondió al 1.2% de todo el combustible consumido en el planeta (Martínez *et al.*, 2007).

A nivel mundial el consumo de fertilizantes simples como los nitrogenados aumentó de 8 a 17 Kg ha<sup>-1</sup> de suelo agrícola. Se predice que su requerimiento aumentará en el futuro, sin embargo, con la tecnología actual y los fertilizantes existentes y métodos de aplicación empleados resultan poco eficientes, así como el costo y la contaminación ambiental que provocan, su uso se hace más nocivo (Cong *et al.*, 2009).

Últimamente los compuestos de origen fotosintético, han recibido atención especial como herbicidas potenciales, entre ellos se encuentran los difenil eters (DPEs), que han sido estudiados, comercializados y aplicados. Sin embargo estos DPEs pueden encontrarse en verduras, frutos, cereales, carne y leche, los cuales son consumidos por los humanos y posteriormente se manifiesta la intoxicación teniendo reacciones en la piel, ojos y mucosas, deteriorando su salud y llegando muchas veces a producir la muerte (Aguirre *et al.*, 2009).

La gran mayoría de los compuestos químicos utilizados en la agricultura, presentan un grave peligro para los ecosistemas y sus ciclos ecológicos, debido a que afectan la microbiota de los suelos, además de que estos compuestos son lixiviados hacia los mantos freáticos, ríos y tomas de agua, causando graves problemas a quienes consumen ese líquido (Morales, 2009).

Una evidencia de esta condición es la documentada por Caballero-Medallo y Martínez (1999) quienes encontraron que las aplicaciones de fertilizantes nitrogenados ocasionan la disminución de la diversidad genética de rizobios en nódulos de frijol.

La Subdirectora de Protección Vegetal de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación Berenice Osorio, expuso sobre la producción de fertilizantes a nivel mundial, donde México ocupa el trigésimo sexto lugar en producción mundial con el 1.2%, y se encuentra en el décimo quinto lugar en consumo mundial de fertilizantes con un 12%. Así como la posición número 11 con el 2.0% de las importaciones mundiales de estos compuestos (Ley General de Equilibrio Ecológico, 2010).

Se estima que 80% del territorio mexicano presenta algún grado de erosión; 80 millones de hectáreas registran erosión severa, lo que generará que en un futuro inmediato se incrementen las zonas definidas como áridas y semiáridas en el país, que de acuerdo con el estudio realizado por Morales (2009), ya suman 30% del territorio nacional.

En contraste a lo anterior, es necesario utilizar alternativas que permitan lograr una producción sostenida y fomentar el manejo adecuado de los recursos bióticos y abióticos de los agroecosistemas. Una de ellas es el estudio de microorganismos productores de promotores de crecimiento vegetal como fitohormonas, en especial destacándose el uso de bacterias productoras de compuestos como el AIA y de AAL (Morales, 2009).

El uso de BRNS y de compuestos promotores de crecimiento vegetal, es considerado como una biotecnología, la cual ayuda a contribuir al desarrollo sostenible, ya que favorecen el crecimiento de la semilla, raíz, tallos y hojas, además de que se ha descrito como ambientalmente segura (Sasikala y Ramana, 1995).

El AIA, es conocido como el mayor estimulante en el crecimiento y desarrollo de plantas ya que interviene en el desarrollo y elongación de tallos nuevos, además de incrementar el número y longitud de las raíces (Tanimoto, 2005).

Otro compuesto es el AAL, el cual es inofensivo para los seres humanos y animales, además de ser biodegradable, este también es conocido como el precursor universal para la síntesis de tetrapirroles (clorofila, hemo, vitamina B<sub>12</sub> y de la coenzima F430), los cuales son metabolitos esenciales para todos los organismos vivos (Jahn y Heinz, 2009).



A pesar de que AAL está claramente disponible, su uso es limitado en pequeña escala a la investigación bioquímica, debido a su alto costo, su aplicación en campo es muy restringida, comparada con los herbicidas químicos (Kang *et al.*, 2012).

Existen estudios sobre la capacidad de las BRNS para generar productos como AIA y AAL, en México aún este tipo de investigación es incipiente ya que falta información a nivel genético y bioquímico sobre la producción, regulación y componentes enzimáticos presentes en procesos internos de las bacterias para la generación de estos metabolitos.

## **V.- HIPÓTESIS**

Las bacterias aisladas de los lixiviados del Bordo Poniente de la Ciudad de México, pueden producir metabolitos útiles en la agricultura como lo son AIA y AAL sin la adición de precursores al medio de cultivo.

## **VI.- MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1.1 Sitio de muestreo**

Para realizar este trabajo de investigación se utilizó una muestra de la fracción líquida (lixiviados) que se produce en el Bordo Poniente Etapa IV, el único relleno sanitario con el que contaba la Ciudad de México y que fue clausurado el 19 de diciembre de 2011.

El relleno sanitario Bordo Poniente, se encuentra ubicado al oriente de la Ciudad de México, colinda al Noreste del Aeropuerto Internacional de la Ciudad de México y al Sureste del ex Lago de Texcoco, con una superficie de 1,000 ha, sus coordenadas geográficas son 19° 21' 30" latitud norte y 99° 15' 45" longitud oeste, con una altitud de 2,250 metros sobre el nivel del mar. De acuerdo con datos de la estación meteorológica del Aeropuerto, la fórmula climática para el área donde se ubica el relleno sanitario es BS1kw(w)(i')g la cual representa un clima semiárido templado, con régimen de lluvias de verano y marcha de la temperatura tipo Ganges, según la clasificación de Köppen modificada por García (1964) para la República Mexicana (Informe Preventivo, NOVA, consultores ambientales, 2004).

### **1.2 Procesamiento de la muestra**

La muestra de la fracción líquida de la Macrocelda B del Bordo Poniente se colectó el día 3 de mayo de 2012, se procesó en el laboratorio de Ecología Microbiana (Departamento de El Hombre y su Ambiente), en la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

A partir de la fracción líquida se inocularon frascos de vidrio con capacidad de 250 mL los cuales contenían medio de cultivo específico para BRNS (Núñez-Cardona 2010a). La composición de este se describe en el Anexo 1.

Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente, a una intensidad luminosa de 2400 Lux (Hanna) con un fotoperiodo de 16 horas con luz incandescente y 8 horas de oscuridad (Núñez-Cardona, 2010a).

### **1.2.1 Aislamiento de bacterias a partir de cultivos mixtos**

El aislamiento de las BRNS, se realizó empleando la técnica descrita por Núñez-Cardona (2010a), para ello se preparó medio específico para BRNS sin complementar y se le adicionó 15 g/L de agar bacteriológico; posteriormente se esterilizó y una vez frío se complementó (15 mL/L de acetato de sodio, 1 mL/L de Solución de elementos traza, 1 mL/L vitamina B<sub>12</sub>, 1 mL/L de cloruro férrico). Se adicionaron 20 mL aproximadamente en una caja Petri hasta que solidificaron.

En tubos de ensaye previamente esterilizados y conteniendo 9 mL de solución salina NaCl 0.08% se les agregó 1 mL del inóculo para realizar las diluciones seriadas ( $10^{-1}$ - $10^{-6}$ ) y de cada dilución se tomaron 100  $\mu$ L y se sembraron por estriado en placas con el medio de cultivo descrito en el anexo 1, los cultivos se colocaron en una bolsa especial para anaerobiosis (Merck), incubándose en las condiciones descritas por Núñez-Cardona (2010a).

Una vez que se observó el crecimiento de las colonias en la superficie del agar, se aislaron las colonias más separadas y se sembraron en viales de 5.0 mL de

capacidad, conteniendo medio específico para BRNS. Los cultivos se incubaron en las condiciones antes mencionadas.

### **1.2.2 Observación al microscopio de los cultivos de BRNS mediante la tinción de Gram (González López, 2013).**

Se utilizó la técnica de tinción de Gram, para observar las características morfológicas de los cultivos de las BRNS aisladas del Bordo Poniente. Para ello, con el asa bacteriológica se tomó una muestra del cultivo de BRNS, se depositó sobre un portaobjetos, se fijó con etanol, se agregó con gotero cristal violeta y se dejó reposar durante un minuto, se lavó con agua hasta eliminar el exceso del colorante, se adicionó lugol con un gotero y se dejó durante un minuto, se lavó con agua y se agregó alcohol acetona, se adicionó con un gotero safranina, se dejó reposar un minuto y se lavó con agua, se secó a temperatura ambiente y se observó al microscopio óptico, a la preparación fija y seca se le agregó una gota de aceite de inmersión y con el objetivo de 10X se localiza una zona y con el objetivo de 100X se observan los detalles y conocer la morfología celular de las BRNS.

### **2.3 Análisis de pigmentos fotosintéticos**

Para el análisis de los pigmentos fotosintéticos de los cultivos aislados de la macrocelda del Bordo Poniente se realizaron las técnicas *in vivo* (Núñez-Cardona 2010b).

### **2.3.1 Análisis *in vivo***

Para el análisis *in vivo* fueron centrifugados 10 mL de cultivo a 5,000 rpm durante 20 minutos; se eliminó el sobrenadante y se le adicionó 5 mL de glicerol puro para resuspender a las células por inversión. Cada muestra se leyó agregando 3 mL de la mezcla a las células resuspendidas en una celda de cuarzo. Se utilizó un rango de longitud de onda entre 200 y 1100 nm. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu UV160, como blanco se utilizó glicerol (Núñez-Cardona, 2010b).

### **2.3.2 Extracción de los pigmentos con solventes orgánicos**

Se centrifugaron 10 mL de cultivo a 5,000 rpm durante 20 minutos, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 5 mL de acetona/metanol (7:2). Las extracciones se obtuvieron manteniendo las muestras a 4°C durante 18 horas en obscuridad. Una vez transcurrido el tiempo de extracción, las lecturas se hicieron con el sobrenadante, previamente centrifugado evitando resuspender las células sedimentadas; como blanco se utilizó una mezcla de acetona/metanol 7:2 (Núñez-Cardona, 2003). Posteriormente, se cuantifico la Bchl a, con la siguiente formula:  $Bchl\ a\ \text{gl}^{-1} = ((A/CE) (VS/VCC))*1000$ , donde: A=absorbancia registrada a 770 nm, CE= coeficiente de extinción de la bacterioclorofila a en acetona: metanol a 770 nm=84.1, VS=volumen del solvente, VCC=volumen del cultivo centrifugado (Núñez-Cardona, 2003).

### **3. Enriquecimiento con L-Trp 3 mM de los cultivos puros de BRNS**

Para detectar la presencia de indoles en cultivos puros de BRNS, se enriqueció el medio de cultivo específico para BRNS contenido en frascos de vidrio de 250 mL de capacidad con L-Trp a 3 mM (Koh y Song, 2007), sustituyendo este por la fuente de carbono (Mujahid *et al.*, 2011), se incubaron durante 24 y 48 horas, considerando las condiciones indicadas por Núñez-Cardona (2010a), este ensayo se realizó en tres semanas diferentes.

#### **3.1 Detección de Ácido Indolacético AIA (Koh y Song 2007)**

Para detectar la presencia de indoles como el AIA, producido en los cultivos puros de BRNS, se utilizaron las técnicas descritas por Koh y Song (2007), donde se determinó la producción de indoles por el reactivo de Salkowski (Glickmann y Dessaux, 1995; Koh y Song, 2007); cada tubo con cultivo de BRNS (3mM de L-Trp) se centrifugó a 10,000 *rpm* durante 15 minutos, después se tomó 1.0 mL del sobrenadante y se le adicionaron 4.0 mL del reactivo Salkowski (150 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, 250 mL de H<sub>2</sub>O destilada, 7.5 mL de 0.5 M de FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O), se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos; y se realizaron lecturas a 535 nm con un espectrofotómetro con UV (Koh y Song, 2007), este ensayo se realizó con cultivos inoculados durante tres semanas en las condiciones antes descritas.

#### **3.2 Cuantificación de AIA por espectrofotometría (Koh y Song 2007)**

Para cuantificar el AIA producido por los cultivos de BRNS, se utilizó la metodología por espectrometría colorimétrica propuesta por Koh y Song (2007), para ello se realizó una curva estándar de AIA (grado reactivo para cromatografía), partiendo de una alícuota de

149.8 µg/mL la que fue la mayor concentración en la curva estándar, se hicieron diluciones seriadas con un factor de dilución de 1.5, con un volumen final de 1.5 mL; se tomaron 100 µl de la reacción y se pasaron a un tubo nuevo y por último, a cada dilución, se le adicionó 400 µl del reactivo Salkowski, se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos en completa oscuridad. El blanco se preparó de la misma manera pero sin AIA. Posteriormente se ajustó con el blanco, seguido de la lectura de cada dilución en el espectrofotómetro (Thermo Electron Corporation modelo Bionate 3) a 535 nm y por medio de una regresión lineal se determinó la ecuación de la recta y el  $R^2$  (tabla 7).

La determinación de la concentración de AIA producido se hizo con 11 mL de cultivo de BRNS, se centrifugaron a 10,000 rpm durante 15 min, se tomaron 100 µl del sobrenadante de cada cultivo y se pasaron a un tubo nuevo y por último se adicionó a cada tubo 400 µl del reactivo Salkowski, se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos en completa oscuridad, seguida de la lectura de cada reacción en el espectrofotómetro a 535 nm. Los datos obtenidos fueron correlacionados con la curva estándar antes indicada.

### **3.3 Análisis de AIA mediante Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) (Gutiérrez Castillo, 2014)**

La producción de AIA en cultivos de BRNS se analizó por HPLC, para lo cual se filtró la muestra por medio de acrodiscos LC PVDF con membranas de 0.45 µm de tamaño de poro, con la finalidad de evitar el paso de bacterias. Posteriormente, la muestra se inyectó a un cromatógrafo de líquidos de alta presión (Perkin Elmer 785A UV/VIS Detector), equipado con una columna de C-18 de 150 mm de largo y 4.6 mm de

diámetro interno para partículas de 5  $\mu\text{m}$  de tamaño. La fase móvil consistió en una mezcla de acetonitrilo-agua, ácido acético 30:69.75:0.25, respectivamente y el detector se ajustó a una longitud de onda de 282 nm, el volumen de inyección fue de 100  $\mu\text{l}$ . El HPLC previamente se acondicionó y calibró con concentraciones conocidas de AIA: 10, 20, 40, 80, 100 y 150 ppm (modificado de Hoffman *et al.* 2013).

En un matraz Erlenmeyer, con medio específico para BRNS fue complementado y enriquecido con succinato y glicina (15 mM de cada uno) (Koh y Song, 2007), más la adición de ácido levulínico 10 mM (Sattayasamitsathit y Prasertsan, 2013), de esta mezcla se agregaron 10 mL a diferentes tubos con capacidad de 12 mL y posteriormente se incubaron durante 24 y 48 horas de acuerdo con lo descrito por Núñez-Cardona (2010a).

#### **4. Detección de AAL (Mauzerall y Granick 1955)**

Para la detección de AAL producido por BRNS, se utilizó la técnica descrita por Mauzerall y Granick (1955); para ello se centrifugaron 5.0 mL del cultivo de BRNS de dos días de edad a 10,000 *rpm* durante 15 minutos. A 500  $\mu\text{l}$  de sobrenadante se le adicionaron 500  $\mu\text{l}$  de acetato de sodio 1 M (pH 4.7) y 50  $\mu\text{l}$  de acetilacetona. Las muestras se mantuvieron a baño María durante 15 minutos y se dejaron enfriar para agregarles 3.5 mL del reactivo de Ehrlich modificado [1 g p-dimetilaminobenzaldehído, 42 mL de ácido acético glacial y 8 mL de ácido perclórico al 70% (v/v)]. Posteriormente se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos y se midió la absorbancia de la mezcla con un espectrofotómetro (Thermo Scientific BioMate 3S), a 556 nm (Koh y Song, 2007).



## VII.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de la muestra de la fracción líquida de la Macrocela B del Bordo Poniente etapa IV, (colectada a 20 cm de profundidad), se inocularon botellas de vidrio con medio de cultivo específico de BRNS, después de 15 días de incubación en las condiciones señaladas, se observó la presencia de BRNS, evidenciado por el cambio de color de transparente a rojo, rosa, rosado y café (figura 6).

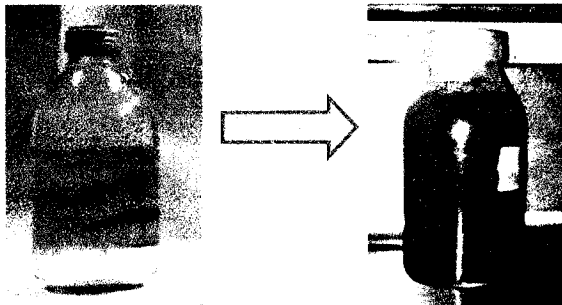


Figura 6. Cultivos con BRNS obtenidos a partir de la fracción líquida de la macrocela B del Bordo Poniente etapa IV.

Una vez observada la presencia de BRNS en medio líquido, estas fueron crecidas en medios de cultivo sólidos con la finalidad de aislar este tipo de bacterias, donde posteriormente se observaron colonias rojas, rosas y cafés, colores característicos de las BRNS, las cuales crecieron en condiciones anaerobias (figura 7).



Figura 7. Cultivo en placa de BRNS utilizando bolsas para anaerobiosis

A partir de la técnica en placa, se obtuvieron 50 cultivos puros, de los cuales solo 13 fueron seleccionados para su aislamiento y de esta manera mantener su crecimiento y posteriormente detectar la presencia de AIA y AAL en los cultivos (figura 8).

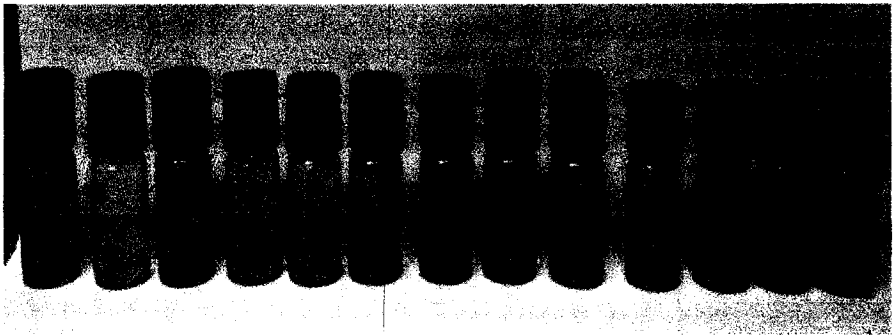


Figura 8. Cultivos puros de BRNS en viales provenientes de la fracción líquida del Bordo Poniente.

A 13 cultivos puros (1, 2, 4, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 24 y 25), se les aplicó la tinción de Gram para determinar sus características morfológicas y su uniespecificidad. Se observó que los cultivos tenían formas de cocos y bacilos cortos, los cuales presentaron una respuesta negativa a la tinción de Gram, lo que las identifica como miembros de Proteobacteria (figura 9, Tabla 4).

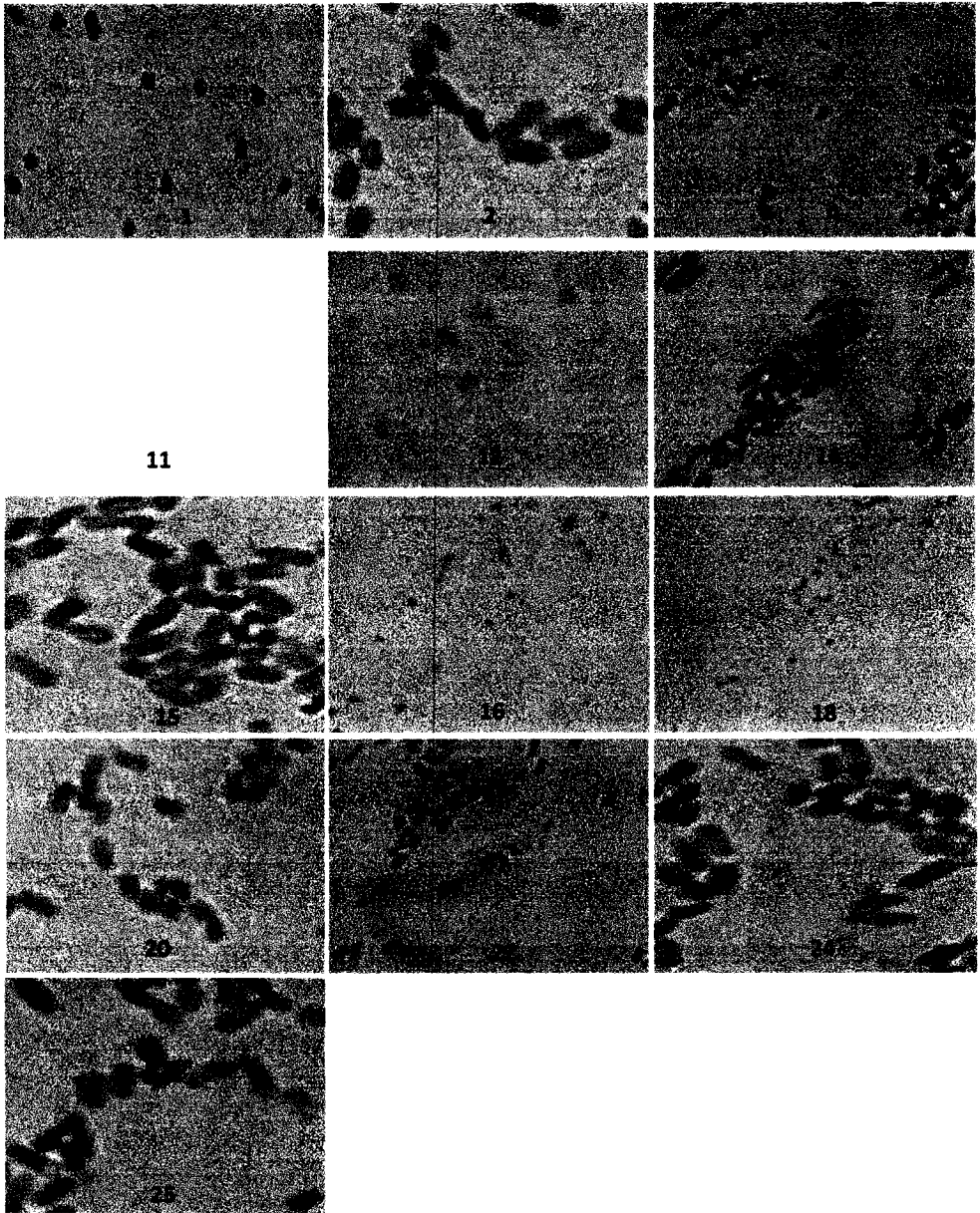


Figura 9. Características morfológicas celulares de los cultivos puros de BRNS aisladas del Bordo Poniente (100x).

Características morfológicas de 13 cultivos puros de BRNS, aislados de la fracción líquida del Bordo Poniente (tabla 3).

Tabla 3. Morfología celular de los 13 cultivos puros de BRNS aisladas del Bordo Poniente.

Cultivo	Morfología	Color de los cultivos líquidos
1	Coco	Rosa
2	Bacilos	Rosa
4	Bacilos	Roja
11	Bacilos	Rosa
12	Coco	Rosa
14	Bacilos	Rosa
15	Bacilos	Roja
16	Coco	Rosa
18	Coco	Rosa
20	Bacilos	Roja
22	Bacilos	Rosa
24	Bacilos	Roja
25	Bacilos	Rosa

Con la finalidad de contar con cultivos masivos, de los aislados puros de BRNS, los cuales fueron incubados para inocularlos en tubos de ensaye con medio específico para BRNS. Se observó su crecimiento y un cambio de color en el medio de cultivo de transparente a diferentes tonalidades; rojo, rosa y rosadas (figura 10 a), esta coloración es variable entre los cultivos, indicando la presencia de los principales tipos de carotenoides en estas bacterias (Imhoff y Trüper, 1992) y por lo consiguiente el

crecimiento del cultivo celular fue en aumento y este fue colocado en botellas más grandes (figura 10 b).

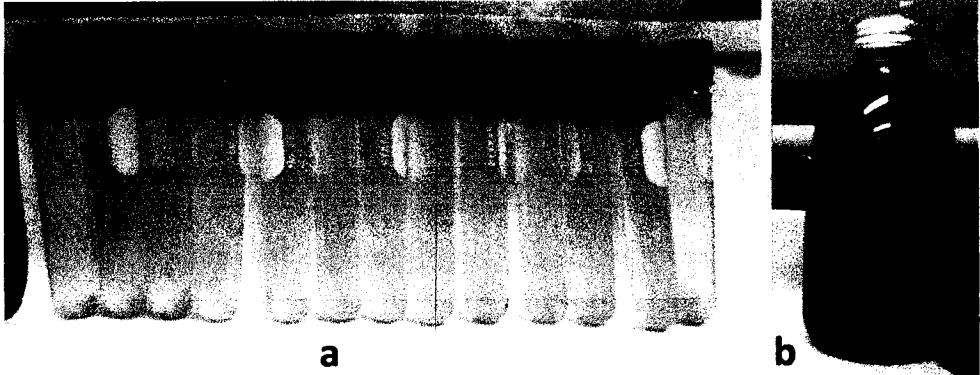


Figura 10. a) Crecimiento de 13 cultivos seleccionados de BRNS en tubos de ensaye en medio específico. b) Cultivo masivo de BRNS.

Las BRNS se han localizado en ambientes acuáticos, sobre todo se ha reportado su presencia en lugares que se dedican a la siembra con grandes cantidades de agua como los sembradíos de arroz, en sedimentos con lodos activados y en plantas de aguas residuales (Montano *et al.*, 2009, Hougardy *et al.*, 2000).

Actualmente, Núñez-Cardona y colaboradores (2014) han descrito la presencia o el aislamiento de BRNS de un relleno sanitario o de un tiradero a cielo abierto como lo es el Bordo Poniente etapa IV, el cual contiene toda clase de residuos orgánicos, basura y desechos tóxicos. Con este trabajo se ratificó lo mencionado anteriormente, que las BRNS son habitantes comunes en los lixiviados como en los cárcamos del Bordo Poniente. Por otro lado, Okubo *et al.* (2006) refieren que aislaron géneros de BRNS como *Rhodobacter* y *Rhodopseudomonas* de una laguna donde hay descargas de desechos de agua de una granja porcina en la provincia de Kosai, Japón, así mismo

Kantachote *et al.* (2005) aislaron 92 cultivos, de una planta de aguas residuales de la hoja de goma del sur de Tailandia, pero solo uno (DK6) se adaptó mejor a las condiciones de laboratorio: de igual forma Montano *et al.* (2009) obtuvieron un aislado de BRNS de sedimentos de sembradío de arroz en San José del Monte, Filipinas. Por otro lado Koh y Song (2007) aislaron dos cepas de *Rhodopseudomonas* (KL9 y BL6) a partir de sedimentos del río Gongii-cheon en Korea. Mujahid *et al.* (2011) aislaron a la BRNS *Rubrivivax benzoatilyticus* JA2 de un sedimento de suelo anegado en un sembradío de arroz y de igual forma Sattayasamitsathit y Prasertsan (2013) aislaron a *Rubrivivax benzoatilyticus* PS-5 a partir de sedimentos de sembradíos de arroz de la provincia de Songkhala en Tailandia, esto concuerda con lo referido por Okubo *et al.* (2006), quienes mencionan que debido a su gran versatilidad metabólica, al poco oxígeno disponible, la tensión, la gran disponibilidad de luz y de nutrientes orgánicos simples, como es el caso de nutrientes ricos en cuerpos de aguas estancadas los cuales pueden ser utilizados como fuentes alternativas de carbono, estos factores son importantes para la promoción y proliferación de bacterias como las rojas no sulfurosas (Kim *et al.*, 2004).

Tres géneros de BRNS como lo son *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodopseudomonas* sp. y *Rubrivivax benzoatilyticus* JA2, han sido investigadas por su potencial en la aplicación de estrategias de remediación y en la producción de compuestos para uso agrícola, debido a que presentan habilidades para crecer en condiciones aerobias y anaerobias, ante la presencia o ausencia de luz (Italiano *et al.*, 2012). Siendo estas bacterias las más estudiadas en diversos grupos de investigación, sin que se tenga

conocimiento sobre otro tipo de géneros que se hayan estudiado para determinar su capacidad de producir compuestos útiles para la agricultura.

Los espectros de absorbancia del análisis de pigmentos *in vivo* de los 13 cultivos obtenidos en el medio específico para BRNS mostraron máximos de 276, 463, 489, 591, 803, 869, y 973 nm (tabla 4), los cuales son muy parecidos a los reportados por Pfennig y Trüper, 1982; Núñez-Cardona, 2003; 588-591, 796-798 y 800-892 nm (*in vivo*), por lo que los picos que se encuentran entre los rangos de 364-367 indican la presencia de Bchl a, esto concuerda con la reportado por Pacheco (2007) quien obtuvo cultivos de BRNS cuyos máximos de absorbancia *in vivo* para las BRNS fueron: 375, 590, 803 y 883 nm.



Tabla 4. Absorbancia máxima *in vivo* de pigmentos de los 13 cultivos de BRNS.

Cultivo	Absorbancia máx. Bchl a nm	Pigmentos accesorios carotenoides nm	Grupo de microorganismos
1	869, 803, 591	463	<i>Rhodopseudomonas</i> spp.
2	869, 803	_____	<i>Rhodoblastus sphagnicola</i> sp.
4	869, 803	490	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
11	869, 803	490	<i>Rhodoblastus</i> sp.
12	869, 803	463	<i>Rhodopseudomonas</i> sp.
14	868, 802	491	<i>Rhodoplanes elegans</i>
15	869, 803	463	<i>Rhodopseudomonas</i>
16	868, 803	463	<i>Rhodobacter Sphaeroides</i>
18	869, 803, 592, 377	490, 463, 278	<i>Rhodopseudomonas viridis</i>
20	868, 803	490	<i>Rhodospirillum molischianum</i>
22	869, 803, 591	490, 463	<i>Rhodopseudomonas</i> <i>Rhenobacensis</i> sp.
24	868, 803, 591	_____	<i>Rhodopseudomonas</i> <i>Rhenobacensis</i> sp.
25	868, 803	_____	<i>Rhodospirillum</i>

Xu *et al.* (2013), observaron diferentes espectros de absorbancia de *R. palustris* en diversos medios de cultivo (medio sintético más Triptófano, Trp solo, extracto de *Stevia* más cloruro de amonio, medio sintético más cloruro de amonio y extracto de *Stevia* extraído a 95° C suplementado con L-Trp), los picos de 375, 590, 805 y 865 nm, los cuales se producen debido a una mezcla de pigmentos y de Bchl a siendo este el principal pigmento fotosintético producido por bacterias fotosintéticas rojas no sulfurosas (Madigan *et al.*, 2000). La producción de Bchl a, puede ser directa o

indirectamente afectada por las variaciones de la temperatura, iluminación, compuestos químicos, iones, sales y disolventes (Bhosale, 2004; Ponsano *et al.*, 2008).

En esta investigación se identificó un caso muy característico en los pigmentos extraídos *in vivo*, del cultivo 18, donde se observó la presencia de diferentes picos máximos de absorbancia; 869, 803, 592, 490, 463, 377, 278 nm (tabla 5), de acuerdo a Núñez-Cardona (2006); Pacheco González (2007), refieren que los picos 375, 590 indican la presencia de Bchl *a*. Por otro lado Hougardy *et al.* (2000) describen que *Rhodopseudomonas rhenobacensis* sp. presentó absorbancias máximas de 805 y 878 nm, lo cual indica la presencia de Bchl *a*.

Las bacterias aisladas presentan Bchl *a* y carotenos con diferentes máximos de absorbancia mediante la técnica *in vivo*, los cuales pueden deberse en parte, a los complejos que forman éstos con diferentes proteínas, originando diversos espectros de absorbancia que son de gran utilidad para la caracterización de los microorganismos (Pacheco, 2007).

Otro aspecto en el que este estudio coincide es en lo reportado por Montano *et al.* (2009), quienes observaron en cultivos de *Rhodopseudomonas* sp. un pico a 475 nm, mismos que se encuentran en las cepas 12 y 25 en la condición base, de igual manera en la condición con L-Trp 3mM los cultivos 1, 11, 12 y 24 mostraron un pico idéntico de absorbancia, el cual reporta dicho autor y que corresponde a la presencia de carotenoides como la zeaxantina, sin embargo, en éste caso no concuerda con lo que se conoce sobre la presencia del L-Trp y AIA en el sobrenadante de los cultivos en que ambos compuestos ayudan a mantener el crecimiento celular, ya que con la adición de

L-Trp al medio, los cultivos mantuvieron una fase de crecimiento, lo que se traduce en un aumento en la cantidad de Bchl (tabla 6).

Después de las absorbancias obtenidas del análisis de pigmentos, se realizó una búsqueda bibliográfica de las absorbancias reportadas en BRNS, las cuales nos podrían indicar con que género posiblemente comparten las absorbancias máximas de nuestros aislados (tabla 5).

Tabla 5. Máximos de absorbancia de pigmentos bacterianos extraídos con acetona-metanol de los 13 cultivos seleccionados, también de muestran las cepas reportadas con estas características.

Cultivo	Máximo de absorbancia acetona-metanol <i>Bchl a</i>	Pigmentos (Carotenos) nm	Organismo reportado	Referencia
1	771	503, 476	<i>Rhodopseudomonas rhenobacensis</i> sp.	Hougardy <i>et al.</i> , 2000
2	771	477	<i>Rubrivivax benzoatilyticus</i> sp.	Ramana <i>et al.</i> , 2006
4	771	481	<i>Rhodospirillum molischianum</i>	Tretiak, 2000
11	771	477	<i>Rhodopseudomonas rhenobacensis</i> sp.	Hougardy <i>et al.</i> , 2000
12	771	503, 475	<i>Rhodopseudomonas rosea</i>	Hiraishi y Ueda, 1994
14	771	502, 485	<i>Rhodoblastus sphagnicola</i> sp.	Kulichevskaya <i>et al.</i> , 2006
15	771	478	<i>Rhodopseudomonas rosea</i>	Hiraishi y Ueda, 1994
16	770	478	<i>Rhodobium</i>	Pacheco, 2007
18	889	504, 474, 448		
20	771	504, 476	<i>Rhodoblastus sphagnicola</i> sp.	Kulichevskaya <i>et al.</i> , 2006
22	771	504, 476		
24	771	504, 476	<i>Rhodopseudomonas rhenobacensis</i> sp.	Hougardy <i>et al.</i> , 2000
25	771	503, 475		

Por otro lado, los 13 cultivos fueron incubados bajo la condición con el medio específico para BRNS más la adición de L-Trp como fuente carbono y como donador de electrones, donde los espectros de absorbancia observados con acetona-metanol oscilaron entre 363, 475, 503, 597 y 771 nm, los cuales son muy parecidos a las absorbancias máximas que indican la presencia de *Bchl a* sin la adición de L-Trp, por lo que se identificaron pequeños cambios en la concentración de *Bchl a* entre ambas

condiciones. Posteriormente, se realizó el cálculo de Bchl *a*, en los cuales se observaron diferencias en los cultivos; 4, 12, 14, 18 y 25 en la condición con L-Trp con respecto a la condición sin este aminoácido, donde estas concentraciones fueron mayores, como fue el caso del cultivo 4 con una concentración siete veces mayor comparada a su condición sin este compuesto, de la misma forma el cultivo 18 presentó una concentración única, ya que no presentó ningún dato en ausencia de este aminoácido (tabla 6).

Durante su crecimiento estas bacterias requieren de nutrientes y elementos esenciales que las ayudan a llevar a cabo sus funciones vitales, uno de estos elementos es el L-Trp, que por sus características químicas es un aminoácido que se puede encontrar en el ambiente natural, producto de la degradación de desechos orgánicos de raíces y de diversos alimentos como el maíz (Arkhipchenko *et al.*, 2006), en este trabajo se incubaron todos los cultivos con y sin la adición de L-Trp a 3 mM y se obtuvieron diferentes absorbancias por la técnica de acetona: metanol, mostrando de este modo la presencia de Bchl *a*, (771, 588-591 y 364-367 nm).

Tabla 6. Concentración de Bchl a en cultivos de BRNS con y sin L-Trp, extraídos con acetona: metanol (7:2).

Cultivo	Sin L-Trp	L-Trp
1	1.54	1.45
2	0.76	1.06
4	0.24	1.91
11	0.96	1.22
12	1.31	2.03
14	0.90	2.07
15	0.71	0.00
16	1.30	1.19
18	0.00	0.96
20	1.50	1.50
22	1.42	1.27
24	1.90	1.15
25	1.06	2.02

La presencia de AIA en el sobrenadante de los cultivos de BRNS se observó después de adicionarles el reactivo de Salkowski, donde las que fueron positivas a la prueba, formaron una reacción de cambio de color lo cual se debe, de acuerdo con Grolamys *et al.* (2005), a la oxidación de anillos tetrapirrólicos presentes en el sobrenadante de cada muestra, la tonalidad de la coloración de la reacción es directamente proporcional a la cantidad de indol presente (Bric *et al.*, 1991), el cual puede tornarse de un color fucsia a una tonalidad púrpura intensa (figura 11). De acuerdo con lo anterior los cultivos 2, 4, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 20, 22 y 25 resultaron positivos a la producción de indol y los cultivos 1 y 24 fueron de color amarillo tomándose estos como negativos para la producción de este ácido. Como control negativo, se utilizó a *E. coli* (tubo Ec) y como control de carga fue el medio sin algún contenido de sobrenadante bacteriano (tubo B).

Este resultado se puede comparar a lo reportado por Koh y Song (2007), quienes describen la presencia de AIA en sobrenadantes de *Rhodopseudomonas* KL9 a 24 y 48 horas de incubación con L-Trp además de que esta producción fue superior a la control con *Pseudomonas putida* GR12-2, en condiciones anaerobias. Así mismo Koh y Song (2007), reportan la producción de AIA en sobrenadantes de BRNS con una concentración de 3 mM de L-Trp como precursor, bajo las condiciones aquí estudiadas se observó la presencia con la misma concentración del precursor, caso contrario es lo reportado por Mujahid *et al.* (2011) quienes mencionan que añadieron una concentración de 1 mM del precursor y la presencia de AIA fue mayor a las 24 horas. Por lo que estudios realizados por Ona *et al.* (2005) indican que la presencia de AIA en sobrenadantes de *R. benzoatilyticus* JA2 es independiente a factores como la concentración del precursor y del tiempo de incubación, refiriendo que la producción de AIA puede ser una propiedad común entre las BRNS.

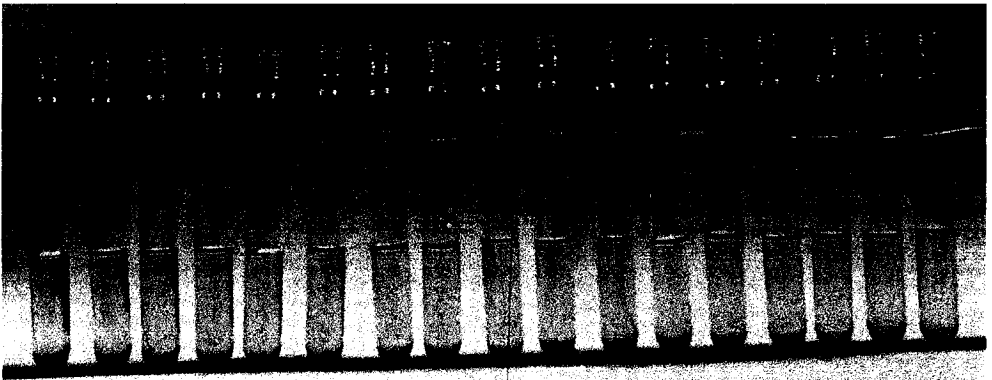


Figura 11. Respuesta de los sobrenadantes de cultivos de BRNS a la reacción de Salkowski; Rosa = positivo a indol y amarillo = negativo a la producción de indol, *Escherichia coli* (Ec) y blanco (B) controles de carga.

Para la detección y cuantificación de AIA producido por los cultivos, se realizó una curva patrón con el reactivo Salkowski, a diferentes concentraciones de patrón de AIA comercial Sigma - Aldrich (figura 12), para determinar la ecuación de la recta y el valor  $R^2$ , confirmando que los valores de la pendiente y  $R^2$  coincidieran con los estandarizados previamente para la detección óptima de AIA (Tabla 7).

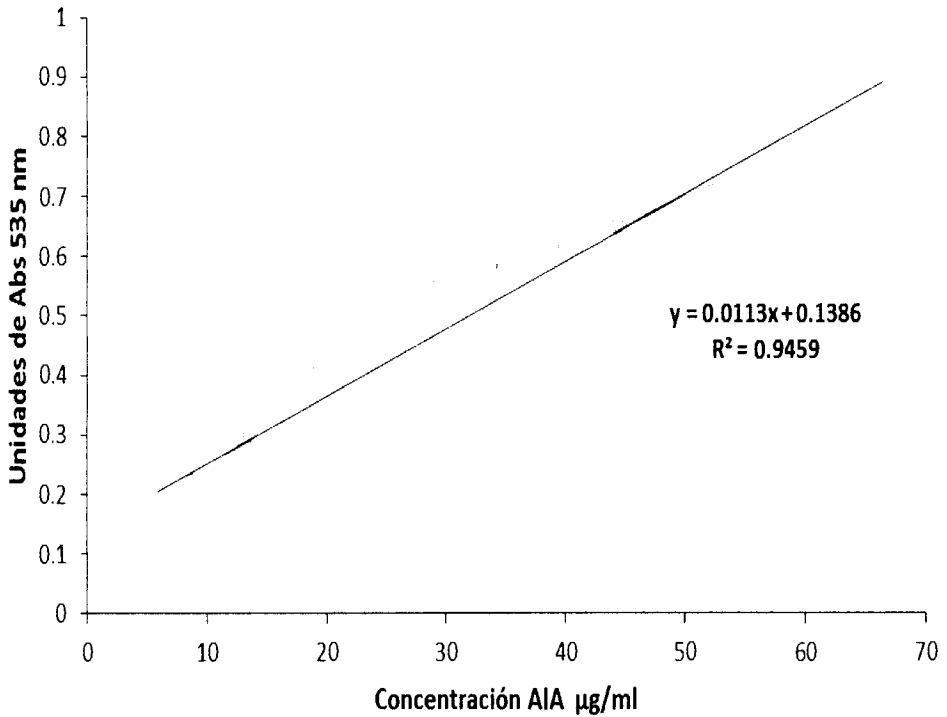


Figura 12. Curva patrón para cuantificar la concentración de AIA mediante el uso del reactivo de Salkowski.



Tabla 7. Concentraciones conocidas de AIA, medidas por espectrofotometría a 535 nm.

Tubo de dilución	Concentración de AIA (µg/mL)	Absorbancia nm
Original	149.8	1.167
1	99.86	0.934
2	66.57	0.839
3	44.38	0.649
4	29.60	0.553
5	19.73	0.429
6	13.15	0.286
7	8.77	0.217
8	5.85	0.121
9	3.9	0.083
10	2.6	0.055
11	1.73	0.031
12	1.15	0.029
13	0.77	0.013

De esta forma, la cuantificación del AIA presente en el sobrenadante de los cultivos de BRNS, se utilizaron los datos obtenidos de la curva patrón (figura 13, tabla 8).

Posteriormente, se realizaron tres repeticiones en diferentes semanas a (24 y 48 horas) para determinar la producción de AIA en el sobrenadante de los cultivos de las BRNS, donde a 24 horas la concentración de AIA en cada cultivo fue menor en relación a las 48 horas, con excepción del cultivo 18, el cual presentó una concentración mayor a las 24 horas (Tabla 9), por lo que a las 24 horas, el cultivo con menor producción fue el 2 con 7.81 µg/mL y por el contrario, el que presentó concentración mayor fue el 12 con 23.79 µg/mL. Por otra parte, se observó que a las 48 horas el cultivo 14 fue el que

presentó mayor concentración con 47.74 µg/mL y por el contrario el que menor concentración presentó fue el cultivo 18 con 18.39 µg/mL. Hernández *et al.* (2008) refiere que la presencia de AIA en los sobrenadantes de *A. brasilense* fue mayor a las 24 horas y que a las 48 de incubación esta disminuyó, por lo que se difiere, ya que las concentraciones detectadas en las BRNS del Bordo Poniente fueron mayores a las 48 horas, sin embargo, solo la concentración de AIA del cultivo 18 presento esta característica antes mencionada. Mutluru y Konada (2007), mencionan que la producción de AIA por bacterias puede variar en diferentes concentraciones debido a la especie y a la cepa, además de la influencia de las condiciones del cultivo, fase en la que se encuentra este y la disponibilidad del sustrato. Por lo que comparando los resultados con Mujahid *et al.* (2011) quienes utilizaron una concentración de 1 mM de L-Trp así como el tiempo de exposición de luz y temperatura a 30°C a la que se tienen los cultivos, periodo de incubación y una agitación de 150 rpm, quienes refieren que esta es la condición óptima para una producción de AIA por *R. benzoatilyticus* JA2, sin embargo estos cultivos presentaron mayor concentración de AIA a las 48 horas con una concentración de 3mM de L-Trp, en cuanto a las mediciones realizadas a los sobrenadantes de las reacciones de Salkowski con espectrofotómetro.

Tabla 8. Concentraciones de AIA por espectrometría de 11 cultivos puros de BRNS.

Cultivo	Concentración de AIA $\mu\text{g/mL}$ a 24 h	Concentración de AIA $\mu\text{g/mL}$ a 48 h
2	7.81	30.98
4	18.72	40.21
11	16.00	38.13
12	23.79	27.87
14	15.48	47.74
15	21.71	39.30
16	23.14	27.61
18	22.88	18.39
20	16.90	28.52
22	14.96	42.67
25	19.24	43.19

Así mismo el L-Trp es considerado como precursor en la síntesis de AIA (Patten y Glick, 1996), por lo que los altos niveles de L-Trp inducen la secreción de AIA, esto es generalmente producido cuando el L-Trp se encuentra disponible en exceso. Algunas bacterias pueden utilizar L-Trp pero la producción de AIA es menor cuando es adicionado al medio de cultivo o de forma externa (Ryu y Patten, 2008).

En este estudio se realizó el análisis del sobrenadante de los cultivos de BRNS, donde se observó la presencia y producción de AIA en 10 de los 13 cultivos, mediante el uso de una curva estándar utilizando concentraciones de 10, 20, 30, 40, 50 y 70  $\mu\text{g/mL}$  de AIA, como se observa en la figura 13, se ratificó la presencia de AIA en un solo pico a un tiempo de retención de 5.9 min.

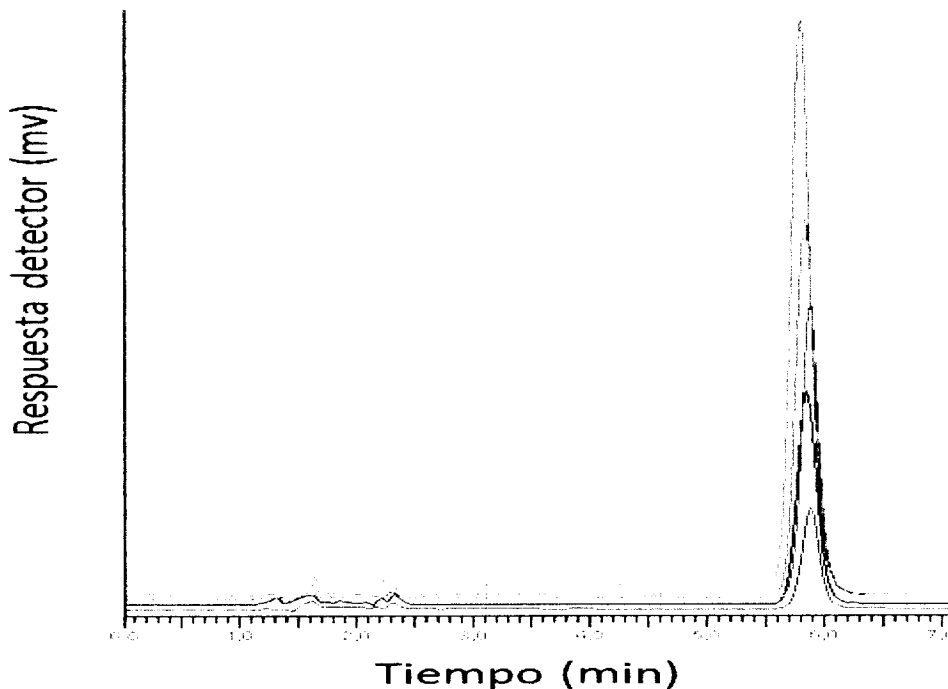


Figura 13. Cromatogramas del HPLC superpuestos con diferentes concentraciones conocidas de AIA y tiempo de retención de este compuesto (5.9 minutos).

En cuanto al análisis de indoles producidos por los cultivos de BRNS por HPLC, en los cromatogramas se observó su presencia en el mismo tiempo de retención, el cual correspondió al previamente estandarizado, donde la concentración de la producción de AIA para cada cultivo fueron: 2 (10.88), 4 (21.41), 11 (16.60), 12 (18.70), 14 (10.81), 25 (20.85)  $\mu\text{g/mL}$  (figura 14) donde se observó que los cultivos que produjeron mayor concentración de AIA fueron el 4 y el 25; sin embargo en los cromatogramas, también se detectaron otros picos de retención a 3.5 minutos aproximadamente, los cuales son originados por el L-Trp (Szkop y Bielawski, 2013).

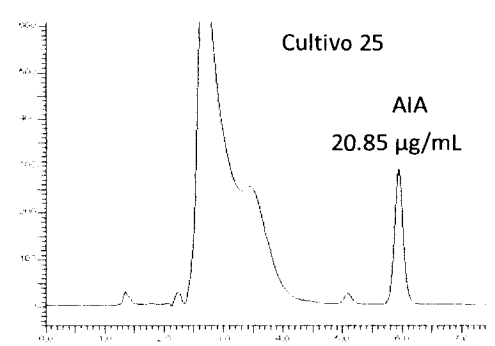
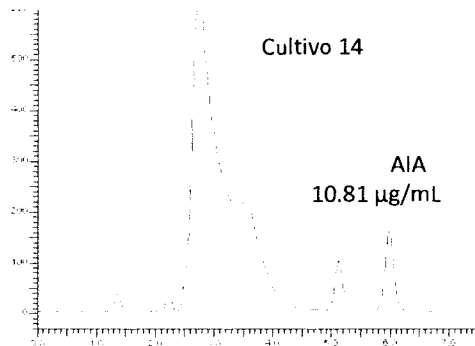
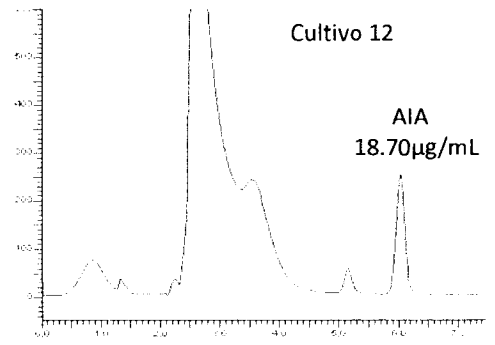
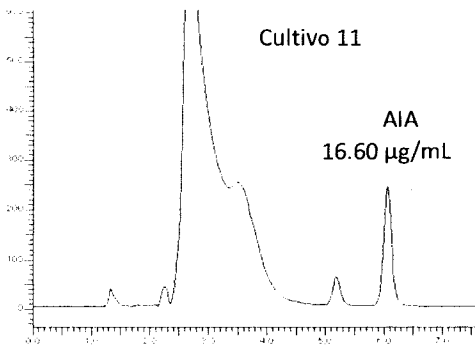
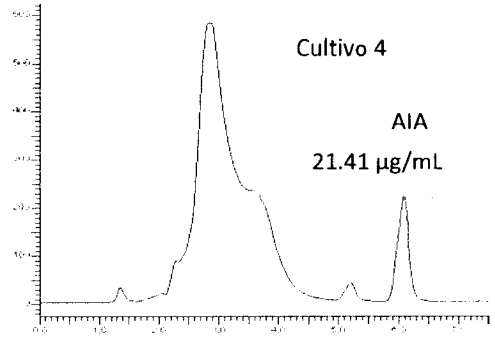
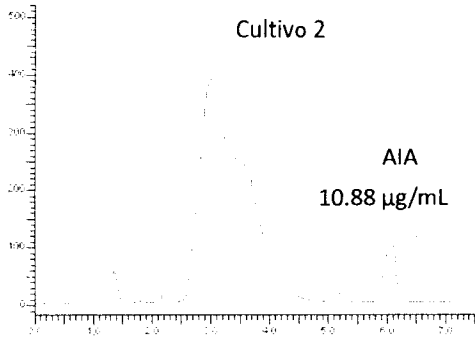


Figura 14. Cromatogramas de HPLC que indican e identifican las diferentes concentraciones de AIA y tiempo de retención presentes en los sobrenadantes de los cultivos: 2, 4, 11, 12, 14 y 25 de BRNS.

De la misma manera se determinó mediante HPLC la presencia de AIA en el sobrenadante de los cultivos de BRNS, sin la adición de L-Trp, se observó la producción de AIA a concentraciones muy bajas comparadas a la condición con L-Trp como precursor, donde el sobrenadante del cultivo que presentó una concentración mayor fue el número 11 con 5  $\mu\text{g/mL}$  y el cultivo 12 fue quien produjo una concentración de 1  $\mu\text{g/mL}$  (Tabla 9).

Tabla 9. Concentraciones de AIA ( $\mu\text{g/mL}$ ) en el sobrenadante de seis cultivos, mediante una curva conocida, con y sin la adición de L-Trp.

Cultivo	Medio de cultivo sin L-Trp (AIA $\mu\text{g/mL}$ )	Medio de cultivo con L-Trp 3Mm (AIA $\mu\text{g/mL}$ )
2	4	10.88
4	4	21.41
11	5	16.60
12	1	18.70
14	3	10.81
25	2.5	20.85

Por lo que al mismo tiempo en esta investigación se compararon los resultados, donde se demostró que los aislados bacterianos del Bordo Poniente, produjeron una cantidad mínima de AIA sin la adición de L-Trp, esto difiere con la investigación de Tsavkelova *et al.* (2007) en la cual ellos refieren que la producción y concentración de AIA en sus aislados bacterianos fue idéntica en las condiciones con y sin L-Trp.

Por otro lado, se observaron diferencias en las concentraciones de AIA de los diferentes cultivos, tanto por el método colorimétrico del reactivo de Salkowski como por la determinación de HPLC, esto se confirma con los resultados de Tsavkelova *et al.* (2007) donde refieren que con la determinación por Salkowski fue dos veces más elevado que por la determinación por HPLC.

Dicho resultado también fue observado por autores como Glickmann y Dessaux (1995); Ivanova *et al.*, (2001); Mordukhova *et al.*, (1991), quienes indican que las diferencias se deben a la acumulación de diversos compuestos de origen indólico en el sobrenadante bacteriano, los cuales también pueden reaccionar con el reactivo Salkowski; se sabe que este reactivo es también útil para detectar AIA, ácido indol propiónico (AIP) y ácido indol 3 acetamida (AIM), (Glickmann y Dessaux 1995; Patten y Glick 2002). Se ha documentado que la presencia de L-Trp conduce a la disminución de la sensibilidad de este método. Un ejemplo de ello, lo refiere Tsavkelova *et al.* (2007) quienes observaron que en un cultivo de *Microbacterium*, la concentración de AIA por la reacción con Salkowski fue 19 veces mayor que la determinada por HPLC, sin duda un caso parecido se observó en algunas lecturas de los sobrenadantes, donde las concentraciones por el método de Salkowski fueron más elevadas en relación a la determinada por el método de HPLC, donde el promedio de las concentraciones del cultivo 12 fueron de 78.76 µg/mL por Salkowski y 18.70 µg/mL en HPLC, en el cultivo 14; el promedio por Salkowski fue de 71.23 µg/mL y por HPLC fue de 10.81 µg/mL y en el sobrenadante del cultivo 25; el promedio de la concentración por Salkowski fue de 80.93 µg/mL y en HPLC fue de 20.85 µg/mL.

Con relación a los microorganismos productores de AIA, se sabe que entre los parámetros que afectan a la producción de este metabolito, se encuentran el estrés a los que están expuestas las bacterias como lo son el agotamiento de la fuente de carbono, un exceso en la concentración del precursor, la tensión del oxígeno, la fase estacionaria del cultivo (Ona *et al.*, 2005); sin embargo, en los resultados obtenidos diferimos a lo reportado con dicho autor y coinciden con lo reportado por Mujahid *et al.* (2011) quienes demostraron que en *Rubrivivax benzoatilyticus* la producción de AIA no depende de estos factores, ya que obtuvo una concentración de 58 µg/mL bajo diferentes condiciones fisiológicas, por lo que considera que la producción de AIA puede ser una propiedad común de las BRNS; sin embargo, esta concentración se encuentra 2.7 veces por encima del registrado en el cultivo 25 de la BRNS el cual fue de 20.85 µg/mL, esto se podría deber a que este aislado no está adaptado a las condiciones de laboratorio como *R. benzoatilyticus*.

Por otro lado, también se ha reportado sobre los efectos de AIA en cultivos, donde éste ayuda al crecimiento bacteriano; Tsavkelova *et al.*, (2007), observaron en cultivos que el crecimiento bacteriano dependía de la concentración de AIA en el medio y que una concentración de 100 µg/mL estimuló el aumento de la biomasa en cultivos de *Mycobacterium* sp. y *Sphingomonas* sp. registraron aumentos de 1.3 y 1.5 veces más respectivamente en comparación con la condición control.

Sin duda es un resultado el cual se puede fortalecer con el que dichos autores reportan ya que el número de células en los cultivos con una concentración de 3 mM de L-Trp fue aumentado en relación con el periodo de incubación que fue de 24 a 48 horas,



donde se hizo evidente en todos los cultivos que el crecimiento celular fue exponencial en relación al periodo de incubación, donde Tsavkelova *et al.*, 2007, refieren que la auxina estimula el crecimiento y acumulación de biomasa, por lo que se piensa que ésta actúa como un promotor de crecimiento bacteriano.

De los 13 cultivos analizados, solo se observó la presencia de AAL en el sobrenadante del cultivo 25, lo que se evidencio mediante la formación de un anillo rosa en la superficie del sobrenadante, que es el resultado de la oxidación de un anillo tetrapirrólico, tanto en los sobrenadantes de los cultivos incubados a 24 y a 48 horas, no se observó la presencia del anillo, asimismo se utilizó como control positivo a *Klebsiella oxygen* y como control negativo a *Escherichia coli* (figura 15).

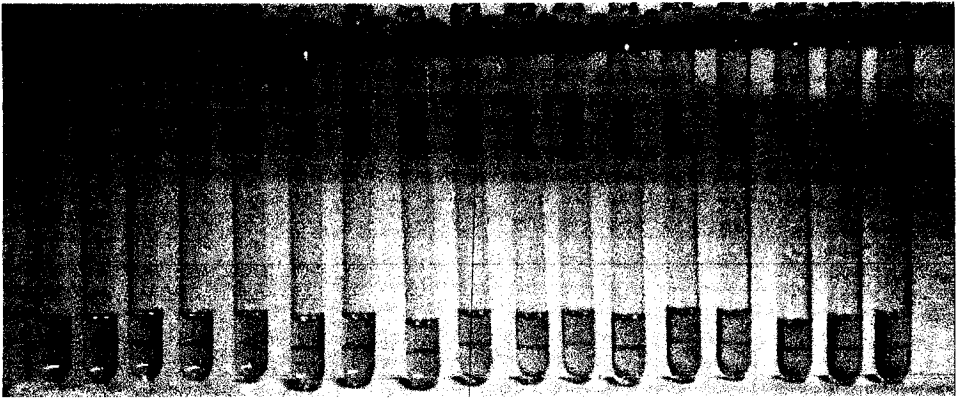


Figura 15. Determinación por colorimetría de la presencia de AAL en el sobrenadante de cultivos de BRNS, donde se puede observar en el sobrenadante del cultivo 25 con el anillo tetrapirrólico *Klebsiella Oxygen* y *Escherichia coli* como controles de carga.

Cabe señalar que a los 13 cultivos, se les adicionó 15 mM de succinato, 15 mM de glicina y 10 mM de ácido levulinico, a las 24 y 48 horas. Así después de este tiempo de

incubación y tras aplicar la técnica colorimétrica se observó que en el sobrenadante del cultivo 25 hubo producción de AAL esto coincide, en gran medida, con lo reportado con Sattayasamitsathit y Prasertsan (2013), quienes identificaron a *Rubrivivax benzoatilyticus* PS-5 y observaron que esta es capaz de producir AAL y que esta bacteria metabolizó el ácido levulínico a acetato y propionato bajo condiciones anaerobias con luz (Okayama *et al.*, 1990), por lo que se piensa que el ácido levulínico puede ser incorporado dentro de su metabolismo, el cual debe de pasar primero a través de la glucólisis para formar piruvato y acetil-CoA (Yaremko y Yu, 2011). Otro aspecto importante, es que el ácido levulínico es estructuralmente similar al AAL excepto por la ausencia del grupo amino, donde se piensa que el cultivo 25 puede estar utilizando la ruta metabólica C<sub>4</sub> o la ruta de Shemin la cual es muy común en bacterias fotosintéticas como las rojas no sulfurosas (Sasaki *et al.*, 1990).

Koh y Song (2007) reportaron que *Rhodopseudomonas* sp. KL9 y *Rhodopseudomonas* sp. BL6, fueron capaces de producir AIA y AAL, un reporte poco común donde se identifica a la misma cepa, pero en cultivos diferentes que producen dos compuestos diferentes en un periodo de incubación de 24 y 48 horas.

## VIII.- CONCLUSIONES

Se ratificó que la fracción líquida contenida en cárcamos del Bordo Poniente presenta BRNS.

La adición de L-Trp al medio de cultivo de BRNS es necesaria para incrementar la producción de AIA.

Las concentraciones de AIA registradas en ambos análisis difieren entre sí; ya que en espectrometría se observaron concentraciones superiores y en HPLC se identificaron que estas fueron menores.

La producción de IAA puede ser una propiedad común entre las BRNS, ya que la mayoría de las cepas aisladas fueron capaces de producir AIA lo cual se confirmó por HPLC.

Los cultivos evaluados produjeron AIA aún sin la adición de L-Trp, lo cual indica que no son dependientes de este precursor para la producción de este compuesto.

Se detectó la producción de AAL a las 24 y 48 horas en una sola cepa (25), utilizando ácido levulínico como precursor en el medio de cultivo.

La cepa 25 fue la más eficiente, ya que pudo producir AIA y AAL con la adición de precursores y sin la adición de estos.

## IX.- PERSPECTIVAS

Se propone realizar más estudios sobre el cultivo número 25, el cual es el productor de AIA y AAL, además de que se sugiere identificarla y caracterizarla molecularmente, para tener una certeza de que género y especie se trata.

Una vez conocidos estos datos, se propone realizar más pruebas con diferentes concentraciones de cada precursor para determinar cuál de ellas es la ideal para una mayor producción y concentración de cada metabolito en un menor periodo de incubación.

Se sugiere realizar diferentes métodos para escalar el cultivo 25 a cantidades intensivas, debido a que este presenta la producción de AIA y AAL.

También se propone realizar diversas pruebas para determinar que ruta metabólica es la óptima para la producción de AAL, ya que Sattayasamitsathit y Prasertsan (2013) proponen que la ruta C<sub>5</sub> en *R. benzoatilyticus* PS-5 es la ideal para este compuesto, además de que esto determinaría un mecanismo preciso para disminuir los costos de producción de este metabolito.

Realizar ensayos con AIA y AAL producidos por estas bacterias, además de utilizarlas directamente en los cultivos de prueba, ya que se ha observado que ambos tratamientos combinados (aspersión e inoculación) son más eficientes que separados.

Concientizar a la población sobre los beneficios que otorgan las BRNS, las cuales fueron aisladas de un sitio de residuos sólidos urbanos como el Bordo Poniente, siendo este catalogado como un lugar de desperdicios o de basura, donde se piensa que no hay nada rescatable o de interés para el hombre.

El resultado de este estudio puede ser un precedente en el aislamiento de BRNS provenientes del Bordo Poniente con un potencial uso en la agricultura, ya que la producción de AIA y AAL, metabolitos secundarios de estas bacterias puede ayudar a prevenir la contaminación ambiental a causa de aplicaciones excesivas de fertilizantes químicos en los cultivos.

## X.- BIBLIOGRAFÍA

Agostini, T., Vieira R., Bizzo H., Silveira D., Gimenes M. (2012). Secondary Metabolites. En: Chromatography and Its Applications. Sasikumar Dhanarasu (Eds.). In Tech, Croacia, pp. 131-164.

Aguirre, J., Irizar M., Durán A., Grajeda O., Peña M., Loredó C., y Gutiérrez A. (2009). Los biofertilizantes microbianos: alternativa para la agricultura en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Campo experimental El Rosario Izapa, Tuxtla Chico, Chiapas, México, Folleto Técnico No. 5.

Alarcón, A., y Ferrera R. (2000). Biofertilizantes: Importancia y utilización para la agricultura. Agricultura Técnica en México 26 (2): 191-203.

Arhipchenko, I., Shaposhnikov, A., Kravchenko, L. (2006). Tryptophan concentration of animal wastes and organic fertilizers. Applied Soil Ecology 34: 62-64.

Armenta, D., García C., Camacho R., Apodaca M., Montoya L., y Nava E. (2010). Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. Ra Ximhai Revista de Sociedad Cultura y Desarrollo Sustentable 6(1): 51-56.

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

Bashan, Y., Holguin G. (1997). *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). Canadian Journal of Microbiology 43:103-121.

Beale, S. I., Weinstein, D. J. (1990). Tetrapyrrole metabolism in photosynthetic organisms. En: Biosynthesis of Heme and Chlorophylls. Dailey H. A. (Eds.). McGraw-Hills, New York, pp. 287-291.

Beale, S. I. (1999). Enzymes of chlorophyll biosynthesis. Photosynthetic Resume 60:43-73.

Bhosale, P. (2004). Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. Applied Microbiology and Biotechnology 63: 351–361.

- Blankenship, R. E. (2002). Molecular mechanisms of photosynthesis. Blackwell Science. Oxford, Malden, MA, p. 321.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161: 839-851.
- Bric, J. M., Bostock, R. M., Silvestone, S. E. (1991). Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *applied and environmental microbiology* 57 (2): 535-538.
- Brune, D. (1995). Sulfur compounds as photosynthetic electron donors. En: *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* (Eds.). R. E. Blankenship, M. T. Madigan and C. E. Bauer, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht Holland, pp. 847-870.
- Buell, C. R., Joardar, V., Lindeberg, M., Selengut, J., Paulsen, I. T., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Deboy, R. T., Durkin, A. S., Kolonay, J. F. (2003). The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000. *Proceeding of the National Academy Sciences* 100: 10181-10186.
- Caballero-Medallo, J., Martínez-Romero, E. (1999). Soil fertilization limits the genetic diversity of *Rhizobium* in bean nodules. *Symbiosis* 26: 111-121.
- Castillo, G., Altuna, B., Michelena, G., Sánchez-Bravo, J., Acosta, M. (2005). Cuantificación de AIA por HPLC utilizando el método del estándar interno. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 2: 51-55.
- Chapman, E. J., Mark. E. (2009). Mechanism of auxin-regulated gene expression in Plants. *Annual Review of Genetics* 43: 265-285.
- Choorit, W., Saikur, A., Chodok, P., Prasertsan, P., Kantachote, D. (2013). Production of biomass and extracellular 5-aminolevulinic acid by *Rhodospseudomonas palustris* KG31 under light and dark conditions using volatile fatty acid. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 111(6): 658-664.
- Clark, E., Manulis, S., Ophir, Y., Barash, I., Gafni, Y. (1993). Cloning and characterization of *iaaM* and *iaaH* from *Erwinia herbicola* pathovar *gypsophillae*. *Phytopathology* 83: 234-240.
- Comai, L., Kosuge, T. (1982). Cloning and characterization of *iaaM*, a virulence determinant of *Pseudomonas savastanoi*. *Journal of Bacteriology* 149: 40-46.

- Cong, P., Dung, T., Hien, T., Hien, N., Choudhury, A., Kecskés, M., Kennedy, I. (2009). Inoculant plant growth-promoting microorganisms enhance utilization of urea-N and grain yield of paddy rice in southern Vietnam. *European Journal of Soil Biology* 45: 52-61.
- Costacurta, A., Vanderley, J. (1995). Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Critical Reviews Microbiology* 21: 1-18.
- De Brito, M., Gagne, S., Antoun H. (1995). Effect of compost on rhizosphere microflora of the tomato and on the incidence of plant growth-promoting rhizobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 194-199.
- De la Rosa, S., Gamboa, M. (2004). Microorganismos acuáticos: una farmacia por visitar. *Ciencia Ergo Sum* 11 (2): 186-190.
- Díaz, P., Ferrera-Cerrato, R., Almaraz-Suárez, J., Alcántara, G. (2001). Inoculation of Plant Growth Promoting Bacteria in Lettuce. *Terra* 19: 327-33.
- Dijkstra, A. T., Majoie, I. M., Van Dongen, J. W. (2001). Photodynamic therapy with violet light and topical 5-aminolaevulinic acid in the treatment of actinic keratosis, Bowen's disease and basal cell carcinoma. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 5: 550-504.
- Döbereiner, J., Urquiaga, S., Boddey, R. (1995). Alternatives for nitrogen nutrition of crops in tropical agriculture. *Fertilizer Research* 42: 339-346.
- Döbereiner, J. (1977). Present and future opportunities to improve the nitrogen nutrition of crops through biological fixation. En *Biological nitrogen fixation in farming systems of the tropics*. A. Ayanaba, and P. Dart (Eds.). John Wiley and Sons. U. S. A., pp. 3-12.
- Dosselaere, F., Vanderleyden J. (2001). A metabolic node in action: Chorismate-utilizing enzymes in microorganisms. *Critical Reviews in Microbiology* 27: 75–131.
- Drews, G., Imhoff, J. F. (1991). Phototrophic purple bacteria. En: *Variations in Autotrophic life*. J. M. Shively and L. L. Barton (Eds.). Academic Press. London. pp 51–97.
- Frankenberger, WT., Brunner, W. (1983). Methods of detection of auxinindole acetic acid in soil by high performance liquid chromatography. *Soil Science Society America Journal* 47: 237-241.

Glickmann, E., Gardan, L., Jacquet, S., Hussain, S., Elasri, M., Petit, A., Dessaux, Y. (1998). Auxin production is a common feature of most pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* 11: 156–162.

Glickmann, E., Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 793-796.

González López, M. A. (2013). Identificación de proteínas de membrana de *Helicobacter pylori* que unen hemoglobina humana. Tesis de Doctorado. Doctorado en Ciencias Genómicas. Pp. 34.

Goossens, A., Häkkinen, S., Laakso, I., Seppänen-Laakso, T., Biondi, S., De Sutter, V., Lammertyn, F., Nuutila, A. M., Söderlund, H., Zabeau, M., Inze, D., Oksman-Caldentey, K. M. (2003). A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (14): 8595-8600.

Grolamys, B., Michelena, G., Sánchez, J., y Acosta, M. (2005). Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. *Anales de Biología* 27: 137-142.

Gupta, R. S., Mukhtar, T., Singh, B. (1999). Evolutionary relationships among photosynthetic prokaryotes (*Helicobacterium chlorum*, *Chloroflexus aurantiacus*, cyanobacteria, *Chlorobium tepidum* and Proteobacteria): implications regarding the origin of photosynthesis. *Molecular Microbiology* 32(5): 893-906.

Harada, N., Nishiyama, M., Otsuka, K. and Matsumoto, S. (2005). Effects of inoculation of phototrophic purple bacteria on grain yield of rice and nitrogenase activity of paddy soil in a pot experiment. *Soil Science & Plant Nutrition* 51 (3): 361-367.

Hernández-Mendoza, J., Quiroz-Velásquez, J., Moreno-Medina, V., Mayek-Pérez, N. (2008). Biosíntesis de ácido antranílico y ácido indolacético a partir de L-Triptófano en una cepa de *Azospirillum brasilense* nativa de Tamaulipas, México. *Avances en Investigación Agropecuaria* 12(1): 57-67.

Hiraishi, A., Ueda, Y. (1994). *Rhodoplanes* gen. nov., a New Genus of Phototrophic Including *Rhodopseudomonas rosea* as *Rhodoplanes roseus* comb. nov. and *Rhodoplanes elegans* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 665-673.



- Hoffman, M. T., Gunatilaka, M. K., Wijeratne, K., Gunatilaka, L., Arnold, A. E. (2013). Endohyphal Bacterium Enhances Production of Indole-3-Acetic Acid by a Foliar Fungal Endophyte. *PLoS ONE* 8(9): e73132.
- Hosny, G., Elbanna, K. (2011). Field Evidence for the Potential of *Rhodobacter capsulatus* as Biofertilizer for Flooded Rice. *Current Microbiology* 62: 391-395.
- Hotta, Y., Tanaka, T., Takaoka, H., Takeuchi, Y., Konnai M. (1997). New physiological effects of 5-aminolevulinic acid in plants: the increase of photosynthesis, chlorophyll content and plant growth. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 61: 2025-2028.
- Hougardy, A., Tindall, B., Jobst-H, K. (2000). *Rhodopseudomonas rhenobacensis* sp. nov., a new nitrate-reducing purple non-sulfur bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 985-992.
- Imhoff, J. (2008). Systematics of anoxygenic phototrophic bacteria. En: *Sulfur Metabolism in Phototrophic Organisms*. Rudiger Hell (Eds.). Institut für Meereswissenschaften IFM-GEOMAR, Düsternbrooker Weg, Kiel, Germany, pp. 269-287.
- Imhoff, J., Bias-Imhoff, U. (1995). Lipids, quinones and fatty acids of anoxygenic phototrophic bacteria. En: *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. R. E. Blankenship, M. T. Madigan & C. E. Bauer (Eds.). Kluwer Dordrecht, The Netherlands, pp. 179-205
- Imhoff, J., Trüper, H. (1992). The genus *Rhodospirillum* and related genera. En: *the Prokaryotes*. A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K. H. Schleifer (Eds.). Springer 2<sup>nd</sup> ed, Berlin, Heidelberg, pp. 2141-2155.
- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). (1990). Soya para grano. Guía para la Asistencia Técnica Agrícola Valle del Fuerte. México. 160-172.
- Italiano, F., Rinalducci, S., Agostiano, A., Zolla, L., De Leo, F., Ceci, L. R., Trotta, M. (2012). Changes in morphology, cell wall composition and soluble proteome in *Rhodobacter sphaeroides* cells exposed to chromate. *Biometals* 25: 939-949.
- Ivanova, E., Doronina, N., Trotsenko, I. (2001). Aerobic methylobacteria are capable of synthesizing auxins. *Mikrobiologia* 70: 452-458

Jahn, D., Heinz, D. (2009). Biosynthesis of 5-Aminolevulinic Acid. Chapter 2. En: Tetrapyrroles: Birth, Lift and Death. J. Martin, G. Warren and A. Smith (Eds.). Landes Bioscience and Springer Science + Business Media, New York, pp. 29-42.

Jameson, P. E. (2000). Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions - An overview. *Plant Growth Regulation* 32: 369-380.

Janitor, A. (2002). Growth of Mycelia of Phytopathogenic Fungi after Application of Abscisic Acid in *in vitro* Conditions. *Plant Protection Science* 38 (3): 94-97.

Jordan, P. M. (1991). Biosynthesis of tetrapyrroles. En: *New Comprehensive Biochemistry*. A. Neuberger and L. L. Van Deenen (Eds.). Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 1-24.

Juárez-Hernández, Ma. De Jesús; Martínez-Solís, J., Curiel-Rodríguez, A., Gracia-Santos, A. (2011). Producción de plántulas de alcatraz amarillo (*Zantedeschia elliotiana* Engl.) en diferentes sustratos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3: 495-507.

Kang, Z., Zhang, J., Zhou, J., Qi, Q., Du, Q., Chen, J. (2012). Recent advances in microbial production of  $\delta$ -aminolevulinic acid and vitamin B<sub>12</sub>. *Biotechnology Advances* 30(6): 1533-1542.

Kantachote, D., Torpee, S., Umsakul, K. (2005). The potential use of anoxygenic phototrophic bacteria for treating latex rubber sheet wastewater. *Electronic Journal of Biotechnology* 3 (8): 314-323.

Kim, M. K., Choi, K. M., Yin, C. R., Lee, K. Y., Im, W. T., Lim, J. H., Lee, S. T. (2004). Odorous swine wastewater treatment by purple non-sulfur bacteria, *Rhodopseudomonas palustris* isolated from eutrophicated ponds. *Biotechnology Letters* 26 (10): 819-822.

Kloepper, J., Schroth, M., Miller, T. (1980). Effects of Rhizosphere by plant growth-promoting *Rhizobacteria* on potato plant development and yield. *Phytopathology* 70 (11): 1078-1082.

Koh, R., Song, H. (2007). Effects of Application of *Rhodopseudomonas* sp. on seed germination and growth of tomato under axenic conditions. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 17(11): 1805-1810.

Kolber, Z., Plumley, F., Lang, A., Beatty, J., Blankenship, R., VanDover C. (2001). Contribution of aerobic photoheterotrophic bacteria to the carbon cycle in the ocean. *Science* 292: 2492–2495.

Kulichevskaya, S. I., Guzev, V. S., Gorlenko V. M., Liesack W., Dedys S. N. (2006). *Rhodoblastus sphagnicola* sp. nov., a novel acidophilic purple non-sulfur bacterium from *Sphagnum* peat bog. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 1397-1402.

Kumavath, R., Sasikala, Ch., Venkata, Ch. (2007). Rhodethrin: a novel indole terpenoid ether produced by *Rhodobacter sphaeroides* has cytotoxic and phytohormonal activities. *Biotechnology Letters* 29: 1399-1402.

Ley de General de Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente. Última Reforma DOF 06-04 -2010. Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión, consultada 15 de marzo de 2015.

Li J-M., Brathwaite, O., Cosloy, S. D., Rusell, C. S. (1989). 5-Aminolevulinic acid synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 171: 2547–2552.

Lima, L., Ponsano, E., Pinto, M. (2011). Cultivation of *Rubrivivax gelatinosus* in fish industry effluent for depollution and biomass production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27: 2553–2558.

Lucy, M., Reed, E., Glick, B. (2004). Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 86: 1-25.

Luksiené, Z., Kulicik, N., Jursėnas, S., Radziutė, S., Būda, V. (2007). Towards environmentally and human friendly insect pest control technologies: Photosensitization of leafminer flies *Liriomyza bryoniae*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 89: 15–21.

Lynch, J. M. (1985). Origin, nature and biological activity of aliphatic substances and growth hormones found in soil. En: *Soil Organic Matter and Biological Activity*. D. Vaughan, R. E. Malcom (Eds.). Martinus Nijhoff /Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster, pp. 151-174.

Madigan, M., Gest, H. (1979). Growth of the photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas capsulata* chemoautotrophically in darkness with H<sub>2</sub> as the energy source. *Journal of Bacteriology* 137: 524–530.

- Madigan, M., Jung, O. (2009). An Overview of Purple Bacteria: Systematics, Physiology, and Habitats. En: *The Purple Phototrophic Bacteria*. N. Hunter, F. Daldal, M. C. Thurnauer, J. Thomas (Eds.). Springer Science-Business Media B. V., pp. 1–15.
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., Clark, D. (2009). Brock, *Biología de los microorganismos*. M. Madigan, J. Martinko, P. Dunlap, D. Clark (Eds.). Pearson Education Inc., España, pp 31-32.
- Madigan, M., Jung, D., Woese, C., Achenbach, L. (2000). *Rhodofera antarcticus* sp. nov., a moderately psychrophilic purple nonsulfur bacterium isolated from an Antarctic microbial mat. *Archives of Microbiology* 173: 269–277.
- Manulis, S., Haviv-Chesner, A., Brand, M. T., Lindow, S. E., Barash, I. (1998). Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophylae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* 11: 634–642.
- Martínez, R., López, M., Brossard, M., Tejada, G., Pereira, H., Parra, C., Rodríguez, J. (2007). Procedimientos para el estudio y fabricación de biofertilizantes bacterianos. INIA 11, pp.88.
- Maudinas, B., Chemardin, M., Yovanovitch, M., Gadal, G. (1981). Gnotobiotic cultures of rice plants up to ear stage in the absence of combined nitrogen source but in the presence of free living nitrogen fixing bacteria *Azotobacter vinelandii* and *Rhodopseudomonas capsulata*. *Plant and Soil* 60: 85-97.
- Mauzerall, D., Granick, S. (1955). The occurrence and determination of aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. *The Journal of Biological Chemistry* 219: 435-446.
- Merino, E., Jensen, R. A., Yanofsky, C. 2008. Evolution of bacterial trp operons and their regulation. *Current Opinion in Microbiology* 11: 78–86.
- Mishke, I. V. (1988). Mikrobnye fitogormony v rastenievodstve. *Microbial Phytohormones in Plant Cultivation*.
- Mohite, B. (2013). Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 13(3): 638-649.

- Montano, G., Jackson, C., Rome, I E., Pastor, A., Edison, T. (2009). Isolation and characterization of purple nonsulfur bacteria (pnsb) from a rice paddy soil in Bulacan, Philippines. *Philippine Journal of Systematic Biology* 5 (3): 57-67.
- Morales, M. (2009). Los biofertilizantes. Una alternativa productiva, económica y sustentable. *Estudios Agrarios de la Procuraduría Agraria México* pp. 1-28.
- Mordukhova, E., Skvortsova, N., Kochetkov, V., Dubeikovskii, A., Boronin, M. (1991). Synthesis of the phytohormone indole-3-acetic acid by rhizosphere bacteria of the genus *Pseudomonas*. *Mikrobiologia* 60: 494–500.
- Morris, R. O. (1995). Genes specifying auxin and cytokinin biosynthesis. En: prokaryotes, In *Plant hormones*. P. J. Davies (Eds.). Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, pp. 318–339.
- Mujahid, M., Sasikala, Ch., Ramana, V. (2011). Production of indole-3-acetic acid and related indole derivatives from L-tryptophan by *Rubrivivax benzoatilyticus* JA2. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89: 1001-1008.
- Muller, B., Sheen, J. (2007). Advances in cytokinin signaling. *Science* 318: 68-69.
- Muller, B., Sheen, J. (2008). Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature* 453:1094–97.
- Mutluru, S., Konada, V. M. (2007). Bioproduction of indole acetic acid by Rhizobium strains isolated from root nodules of green manure crop, *Sesbania sesban* (L.) Merr. *Iranian Journal of Biotechnology* 5 (3): 178-182.
- Nagadomi, H., Takahasi, T., Sasaki, K., Yang, H. (2000). Simultaneous removal of chemical oxygen demand and nitrate in aerobic treatment of sewage wastewater using an immobilized photosynthetic bacterium of porous ceramic plates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16: 57-62.
- Narumiya, S., Takai, K., Tokuyama, T., Noda, Y., Ushiro, H., Hayaishi, O. (1979). A new metabolic pathway of tryptophan initiated by tryptophan side chain oxidase. *Journal of Biological Chemistry* 254: 7007-7015.
- NOVA. Consultores Ambientales. Julio, (2004). Informe Preventivo (Cierre de la Etapa IV del Relleno Sanitario Bordo Poniente). Secretaría de Obras y Servicios. Dirección General de Servicios Urbanos, pp. 61.

Núñez-Cardona, M. T., Gutiérrez, M., Tovar, L. (2014). Detección de bacterias benéficas (fotosintéticas) en la fracción líquida de Bordo Poniente Etapa IV. The Fourth International Symposium on Environmental Biotechnology and Engineering. CINVESTAV, México city, México. 9 septiembre de 2014. ISBN 978-607-9023-24-9.

Núñez-Cardona, M. T., Signoret-Poillon, M. (compiladora), Castilla, P., Rivera, F., ViCon, J. y Mier, T. (2010a). Crecimiento y Aislamiento de Bacterias Fotótrofas Anoxigénicas. En: Métodos y técnicas de laboratorio aplicables al estudio de ecosistemas; Xochimilco, CBS Manual 31, Universidad Autónoma Metropolitana Metropolitana-Xochimilco, México, pp. 20-26.

Núñez-Cardona, M. T., Signoret-Poillon, M. (compiladora), Castilla, P., Rivera, F., Vicon, J. y Mier, T. (2010b). Análisis *in vivo* de pigmentos fotosintéticos de microorganismos. En: Métodos y técnicas de laboratorio aplicables al estudio de ecosistemas; Xochimilco, CBS Manual 31, Universidad Autónoma Metropolitana Metropolitana-Xochimilco, México, pp. 14-19.

Núñez-Cardona, M. T., Pacheco-González, V. y García-Mena, J. (2006). Avances en el estudio de la familia *Rhodospirillaceae* en el Golfo de México. VII Congreso de Ciencias del Mar, MarCuba 2006. 4-8 de Diciembre, La Habana, Cuba.

Núñez-Cardona, M. T. (2003). Aislamiento y caracterización pigmentaria de las bacterias rojas del azufre de la Laguna de Tampamachoco, Veracruz, *Hidrobiológica* 13(3): 171-76.

Oberhänsli, T., DCFago, G., Haas, D. (1991). Indole-3-acetic acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHAO of *Pseudomonas fluorescens*: role of tryptophan side chain oxidase. *Journal of General Microbiology* 137: 2273-2279.

Okayama, A., Fuji, S., Miura, S. (1990). Optimized fluorometric determination of urinary 5-aminolevulinic acid by using pre-columne derivatization and identification of the derivative. *Clinical Chemistry* 36:1494-1497.

Okubo, Y., Futamata, H., Hiraishi, A. (2006). Characterization of Phototrophic Purple Nonsulfur Bacteria Forming Colored Microbial Mats in a Swine Wastewater Ditch. *Applied and Environmental Microbiology* 6: 6225–6233.

Ona, O., Impe, J., Prinsen, E., Vanderleyden, J. (2005). Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. *FEMS Microbiology Letters* 246: 125-130.

- Overmann, J., García-Pichel, F. (2013). The phototropic way of life. En: The Prokaryotes – Prokaryotic Communities and Ecophysiology. E. Rosenberg *et al.*, (Eds.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 203-246.
- Pacheco González, V. (2007). Aislamiento y caracterización de bacterias fotótrofas de la familia *Rhodospirillaceae* a partir de muestras de agua obtenidas del Golfo de México. Informe de Servicio Social. Licenciatura en Biología, Pp. 54.
- Patten, C., Glick, B. Coulson, T. (2013). Activity, distribution and function of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in bacteria. *Critical Reviews in Microbiology* 39 (4): 395-415.
- Patten, C., Glick, B. (2002). Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (8): 3795-3801.
- Patten, C., Glick, B. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology* 42: 207-220.
- Persello-Cartieaux, F., Nussaume, L., Robaglia, C. (2003). Tales from the underground: molecular plant-*Rhizobacteria* interactions. *Plant Cell & Environment* 26: 189–199.
- Pfennig, N., Trüper, H. G. (1982) The family Chromatiaceae. (Eds.) A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K. H. Schleifer. New York: Springer pp. 3584–3592.
- Pfennig, N. (1969). *Rhodopseudomonas acidophila*, sp. n., a new species of the budding purple nonsulfur bacteria. *Journal of Bacteriology* 99: 597–602.
- Pilet, P., Saugy, M. (1987). Effect on Root Growth of Endogenous and Applied IAA and ABA. *Journal of Plant Physiology* 83: 33-38.
- Ponsano, E., Paulino, C., Pinto, M. (2008). Phototrophic growth of *Rubrivivax gelatinosus* in poultry slaughterhouse wastewater. *Bioresource Technology* 99: 3836–3842.
- Purves, W., Sadava, D., Orians, G., Heller, C. (2002). Vida: La ciencia de la biología. 6ta Edición. Panamericana, México, pp. 200.
- Ramana, Ch., Sasikala, Ch., Arunasri, K., Anil Kumar, P., Srinivas, T., Shivaji, S., Gupta, P., Süling, J., Imhoff, J. (2006). *Rubrivivax benzoatilyticus* sp. nov., an

aromatic, hydrocarbon-degrading purple betaproteobacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 2157-2164.

Ranjith, N., Kumavath, Ch., Ramana, V., Sasikala Ch. (2010). L-Tryptophan catabolism by *Rubrivivax benzoatilyticus* JA2 occurs through indole 3-pyruvic acid pathway. *Biodegradation* 21:825-832.

RAP-AL (2010). Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina RAP-AL. Contaminación y eutrofización del agua. Impactos del modelo de la agricultura industrial, pp. 38.

Rebeiz, C., Montazer-Zouhoora, A., Hoppen, H., Wu, S. (1988a). Photodynamic herbicides: 1. Concept and phenomenology *Enzyme Microbiology and Technology* 6: 390-401.

Richards, B. N. 1987. *The microbiology of terrestrial ecosystems*. John Wiley and Sons. Inc., New York, pp. 327-329.

Rojas, G. M. y Ramírez H. (1993). *Control hormonal del desarrollo de las plantas: fisiología, tecnología, experimentación*. 2<sup>ed</sup>. Limusa, México, pp. 263.

Rosales, F., Pocasangre, L., Trejos, J., Serrano, E., Acuña, O., Segura, A. *et al.* (2009). *Guía para el diagnóstico de la calidad y salud de suelos bananeros*.

Ryu, R. J., Patten, C. L. (2008). Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. *Journal of Bacteriology* 190: 7200–7208.

Salamanca, C. (2002). La biofertilización: Una alternativa económica para la nutrición de la soya en el Piedemonte Llanero. Programa Nacional de Transferencia de Tecnología Agropecuario. Boletín Técnico No. 31: 1-25.

Sasaki, K., Watanabe, M., Tanaka, T., Tanaka, T. (2002). Biosynthesis, biotechnological production and applications of 5-aminolevulinic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58: 23-29.

Sasaki, K., Tanaka, T., Nishizawa, Y., Hayashi, Y. (1990). Production of herbicide, 5-aminolevulinic acid by *Rhodobacter sphaeroides* using the effluent of swine wastes from an anaerobic digester. *Applied Microbiology and Biotechnology* 32: 727-731.



Sasikala, Ch., Ramana, Ch. (1995). Biotechnological Potentials of Anoxygenic Phototrophic Bacteria. II. Biopolyesters, Biopesticide, Biofuel, and Biofertilizer. *Advances in Applied Microbiology* 1; 227-278.

Sasikala, Ch., Ramana, Ch., Rao, P. (1994). 5-Aminolevulinic acid: A potential herbicide/insecticide from microorganism. *Biotechnology Progress* 10: 451-459.

Sattayasamitsathit, S., Prasertsan, P. (2013). Characterization of a newly isolated *Rubrivivax benzoatilyticus* PS-5 with self-flocculation property and optimization pathway for 5-aminolevulinic acid production. *African Journal of Biotechnology* 12: 2069-2081.

Sekine, M., Watanabe, K., Syono, K. (1989). Molecular cloning of a gene for indole-3-acetamide hydrolase from *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology* 171: 1718-1724.

Sekine, M., Ichikawa, T., Kuga, N., Kobayashi, M., Sakurai, A., Syono, K. (1988). Detection of the IAA biosynthetic pathway from tryptophan via indole-3-acetamide in *Bradyrhizobium* spp. *Plant and Cell Physiology* 29: 867-874.

Shahab, S., Nuzhat, A., Nasreen, S. (2009). Indole acetic acid production and enhanced plant growth promotion by indigenous PSBs. *Full Length Research Paper* 4: 1312-1316.

Shilpa, K., Lakshmi, K. (2010). An alternate of natural drug production: eliciting secondary metabolite production using plant cell culture. *Journal of Plant Sciences* 5: 222-247.

Spaepen, S. Vanderleyden, J. (2010). Auxin and plant-microbe interactions. M. Estelle, D. Weijers, O. Leyser, and K. Ljung (Eds.), *Auxin Signaling*, DOI 10.1101/cshperspect.a001438, Cold Spring Harbor, Belgium. pp 1-13.

Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R. (2007a). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews* 31: 425-448.

Szkop, M., Bielawski W. (2013). A simple method for simultaneous RP-HPLC determination of indolic compounds related to bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Antonie van Leeuwenhoek* 103: 683-691.

Taiz, L., Zeiger, E. (1991). *Plant physiology*. 2<sup>nd</sup> ed. Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc., Redwood City, Calif. pp. 298-425.

- Tanaka, T., Takahashi, K., Hotta, T., Takeuchi, Y., Konnai, M. (1992). Promotive effects of 5-aminolevulinic acid on yield of several crops. In: Proceedings of the 19th Annual Meeting of Plant Growth Regulator Society of America, San Francisco, July 17-20, 1992. Plant Growth Regulator Society of America, Washington DC, pp 237–241.
- Tanimoto, E. (2005). Regulation of Root Growth by Plant Hormones-Roles for Auxin and Gibberellin. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24:249–265.
- Thanawan, K., Chaiyavat, C., Duangporn, K., Suchada, S., Amorntip, M. (2012). Synergistic growth of lactic acid bacteria and photosynthetic bacteria for possible use as a bio-fertilizer. *Full Length Research Paper* 6 (3): 504-511.
- Theunis, M., Kobayashi, H., Broughton, W. J., Prinsen, E. (2004). Flavonoids, NodD1, NodD2, and nod-box NB15 modulate expression of the *y4wEFG* locus that is required for indole-3-acetic acid synthesis in *Rhizobium* sp. Strain NGR234. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* 17: 1153–1161.
- Tilak, K. V. (1998). Free-living nitrogen fixers: Its role in crop production. En: *Microbes for Health. Wealth and Sustainable Environment*. A. K. Verma (Eds.). Malhotra Publ. Co, New Delhi, pp. 25-64.
- Tingwa, P. O., Young, R. E. (1975). Effect of indole-3-acetic acid and other growth regulators on the ripening of avocado fruits. *Plant Physiology* 55: 937-940.
- Tomorn, N., Duangporn, K., Teruhiko, N., Hiroshi, K. (2012). The use of rice straw broth as an appropriate medium to isolate purple nonsulfur bacteria from paddy fields. *Electronic Journal of Biotechnology* 15: 1-12.
- Tsavkelova, E., Cherdynitseva, T., Klimova, S., Shestakov, A., Botina, S., Netrusov, A. (2007). Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin. *Archives of Microbiology* 188: 655-664.
- Van Onckelen, H., Prinsen, E., InzC, D., Riidelsheim, R., Van, Lijsebettens, M., Follin, A., Schell, J., Van Montagu, M., De Greef, J. (1986). *Agrobacterium* T-DNA gene 1 codes for tryptophan 2 monooxygenase activity in tobacco crown gall cells. *FEBS Letters* 198: 357-360.
- Vassilev, N., Vassileva, M., Fenice, M., Federici, F. (2001). Immobilized cell technology applied in solubilization of insoluble inorganic rock phosphates and P plant acquisition. *Bioresource Technology* 79: 263-271.

Wink, M. (2007). Bioprospecting: The search for bioactive lead structures from nature. En: Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application. O. Kayser and W. Quax (Eds.). WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp. 97-116.

Woodward, A.W., Bartel, B. (2005). Auxin: Regulation, action, and interaction. *Annals of Botany* 95: 707–735.

Xu, Y., Feng, Y., Wang, Y., Lin, X. (2013). Characteristics of purple nonsulfur bacteria grown under *Stevia* residue extractions. *Letters in Applied Microbiology* 1-7.

Yaremko, M., Yu, J. (2011). The initial metabolic conversion of levulinic acid in *Cupriavidus necator*. *Journal of Bacteriology* 155 (3): 293-298.

Zago, V., De-Polli, H., Rumjanek, N. (2000). *Pseudomonas* spp. Fluorescentes - Bacterias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola. Seropédica: EMBRAPA Agrobiologia. EMBRAPA-CNPAB, pp. 32.

Zhang, L., Chen, J., Chen, N., Sun, J., Zheng, P., Ma, Y. (2013). Cloning of two 5-aminolevulinic acid synthase isozymes HemA and HemO from *Rhodospseudomonas palustris* with favorable characteristics for 5-aminolevulinic acid production. *Biotechnology Letters* 35: 763-768.

## XI.- ANEXOS

Soluciones para preparar medio enriquecido para medio de cultivo para BRNS (Núñez-Cardona 2010a)

### 1.- Solución de Cloruro férrico

1,000 mL	Agua destilada
1.2 g	Cloruro férrico

Esterilizar por autoclave a 115 libras de presión o 120 °C durante 20 minutos. Posteriormente se agregará 1.0 mL de esta solución por cada 1,000 mL de medio base, la solución, una vez fría se conserva a 4 °C.

### 2.- Solución vitamina B<sub>12</sub>

100 mL	Agua destilada
2.0 mg	Cianocobalamina (Vitamina B <sub>12</sub> )

Esterilizar por filtración utilizando un acrodisco LC PVDF que cuenta con una membrana con poros de 0.45 µm de diámetro. Se agregará 1.0 mL de esta solución por cada 1000 mL de medio base, conservar a 4 °C.

### 3.- Solución de elementos traza (SL7, Núñez-Cardona 2010)

1,000 mL	Agua destilada
10 mg	ZnSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O
3.0 g	MnCl <sub>2</sub> • 4 H <sub>2</sub> O
30 mg	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
2.0 mg	CoCl <sub>2</sub> • 6 H <sub>2</sub> O
1.0 mg	CuCl <sub>2</sub> • 2 H <sub>2</sub> O
2.0 mg	NiCl <sub>2</sub> • 6H <sub>2</sub> O
3.0 mg	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> • 2H <sub>2</sub> O

Se esterilizará por autoclave a 115 libras de presión o 120 °C durante 20 minutos.

Se agregará 1.0 mL de esta solución por cada 1,000 mL de medio base. Conservar a 4 °C.

#### **Medio de cultivo base pH 7**

1,000 mL	Agua destilada
0.50 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1.5 g	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O
1.0 g	NaCl
0.40 g	NH <sub>4</sub> Cl
0.05 g	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O

Se ajustará pH a 7.0 y se esterilizará en autoclave a 121 °C o 15 libras de presión durante 20 minutos. Conservar a 4 °C.

1.0 g	Succinato de sodio (pH 7.0)
1.0 mL	Solución de cloruro férrico

Posteriormente cuando el medio este tibio y en condiciones estériles se le adicionará succinato de sodio (fuente de carbono), 1.0 mL de cloruro férrico, 1.0 mL de vitamina B12 y 1.0 mL de solución de elementos traza SL7.

## Anexo 2

### Técnica para la tinción de Gram (Madigan *et al.*, 2009)

#### Cristal violeta-oxalato de amonio

##### Solución A

200.0 ML Alcohol etílico 96%

0.2 g Cristal violeta

##### Solución B

80.0 mL Agua destilada

0.8 g Oxalato de amonio

Combinar ambas soluciones y filtrar, dejar reposar durante 24 horas

#### Lugol

##### Solución 1

240.0 mL Agua destilada

1.0 g Yodo (cristales)

1.0 g Yoduro de potasio

##### Solución 2

60.0 mL NaHCO<sub>3</sub> al 5%

Combinar las soluciones 1 y 2; filtrar con papel filtro y dejar y dejar reposar durante 24 horas en obscuridad antes de ser utilizado.

#### Safranina

100.0 mL Alcohol etílico (96%)

1.0 g Polvo de safranina

Agitar hasta que se disuelva y dejar reposar durante 24 horas antes de ser utilizado.

# SELECCIÓN DE BACTERIAS ROJAS NO SULFUROSAS PRODUCTORAS DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO (AIA) Y ÁCIDO AMINOLEVULÍNICO (AAL) LOCALIZADAS EN LIXIVIADOS DEL BORDO PONIENTE

Sánchez Cruz Cristhían<sup>1</sup>, Tovar Gálvez Luis Raúl<sup>2</sup>, Gutiérrez Castillo María Eugenia<sup>2</sup>,  
Núñez Cardona María Teresa<sup>1</sup>

## RESUMEN

Las bacterias rojas no sulfurosas (BRNS) son microorganismos Gram negativos que poseen una extraordinaria versatilidad metabólica convirtiendo la energía luminosa en energía química y pueden realizar la fotosíntesis anoxigénica utilizando bacterioclorofila (Bchl) *a* o *b*. Las BRNS han recibido mucha atención, ya que tienen la habilidad de producir metabolitos secundarios como AIA y AAL los cuales son utilizados en la agricultura promoviendo el crecimiento de plantas y como herbicidas, siendo estos inocuos para el humano y el medio ambiente. Por lo que el objetivo de este trabajo fue aislar BRNS de un cárcamo del Bordo Poniente de la ciudad de México y de este modo determinar si sintetizaban dichos metabolitos. Se aislaron diversas colonias en medio específico para BRNS, a las cuales se realizó un análisis de pigmentos *in vivo*, se observó su morfología por tinción Gram, para su posterior crecimiento masivo se seleccionaron 13 cultivos de BRNS incubándose con precursores como L-Trp para AIA y glicina, succinato y ácido levulínico para AAL en 24 y 48 h. Se aislaron diversas colonias de la muestra del Bordo Poniente, observándose morfologías de bacilos cortos y cocos, en el análisis de pigmentos se obtuvieron absorbancias máximas entre: 364, 477, 485, 590-591, 803-869 características de Bchl *a*. Para AIA se determinó su presencia por el reactivo de Salkowski cuantificándose por espectrofotometría y analizándose por HPLC, para AAL solo se evidenció su presencia por la técnica de Mauzarell y Granick (1955), de los cuales cultivos 11 fueron productores de AIA y solo un cultivo fue el productor de AAL, observándose que el cultivo 25 fue el único productor de ambos metabolitos a 24 y 48 horas. Por lo que se sugiere identificar a la BRNS mediante estudios moleculares y de esta forma optimizar la producción de ambos metabolitos.

## PALABRAS CLAVE

Bacterias rojas no sulfurosas (BRNS), 3-Ácido indolacético (AIA), Ácido aminolevulínico (AAL), L- Triptófano (trp), Metabolito, Síntesis

## INTRODUCCIÓN

Las bacterias rojas no sulfurosas (BRNS) son microorganismos Gram negativos, tienen la habilidad de producir metabolitos secundarios de bajo peso molecular (<3,000 daltons), los cuales son producidos por la presencia de precursores (Strohl, 2000). Las BRNS poseen una extraordinaria versatilidad metabólica, convierten la energía luminosa en energía química, pueden realizar la fotosíntesis anoxigénica utilizando bacterioclorofila (Bchl) *a* o *b* y carotenoides como pigmentos fotosintéticos, su color característico es rojo, marrón, café, o rosa. En las bacterias fotosintéticas, este es el grupo más diverso (Imhoff y Trüper, 1989). Actualmente se conocen 21 géneros de BRNS, que son estudiadas debido a que algunas habitan ambientes extremófilos (Madigan y Jung, 2009). Estas bacterias han recibido mucha atención, ya que en diversas investigaciones se reportan efectos benéficos en la agricultura, como la producción de fitohormonas las cuales son producidas y utilizadas de forma exógena como un mecanismo de crecimiento por las plantas (Rajasekhar *et al.* 1999). Algunos reportes mencionan a los metabolitos secundarios como reguladores de crecimiento para mejorar la producción en horticultura y agricultura (Gianfagna, 1995) y también como herbicidas y control de plagas (Sterling y Hall, 1997; Grossmann, 2003; Fedtke y Duke, 2009), el Ácido indol acético (AIA); es la principal auxina promotora de crecimiento en plantas, generalmente regula la división celular, elongación y procesos de desarrollo en tejidos vasculares y la diferenciación en el meristemo floral, iniciación de hojas, filotaxia, senescencia, dominancia apical y formación de raíces (Grossman, 2010). El Ácido aminolevulinico (AAL) el cual es un precursor de tetrapirroles clave en la biosíntesis de porfirinas como la clorofila y hemo (Balestrasse *et al.* 2010). Diversas BRNS como *Rhodospseudomonas capsulata*, *Rhodospseudomonas palustris*, *Rhodobacter sphaeroides* y *Rubrivivax benzoatilyticus* han sido empleadas para la producción de AIA y AAL; debido a sus



aplicaciones la síntesis de estos compuestos han cobrado mayor interés en países como Tailandia, China y Japón, ya que la gran mayoría de fertilizantes químicos utilizados en la agricultura contaminan los ecosistemas, afectando la microbiota de los suelos y pueden ser lixiviados a mantos freáticos, ríos y tomas de agua, causando graves problemas de salud a quienes consumen ese líquido, por esta razón es necesario identificar nuevas estrategias para la biosíntesis de AIA y AAL de manera natural que permitan lograr una producción sostenida y fomentar el manejo adecuado de los recursos bióticos y abióticos de los agroecosistemas. Una de estas alternativas es el estudio de BRNS que biosintetizan AIA y AAL. En respuesta a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue aislar BRNS de un cárcamo del Bordo Poniente de la ciudad de México y determinar si sintetizan los metabolitos AIA y AAL.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se tomó una muestra de la fracción líquida que se genera en la planta de composta de Bordo Poniente de la ciudad de México, almacenada en cárcamos, se incubó en medio de cultivo específico para BRNS (mg/l: 1.0 gr  $C_2H_3NaO_2$ , 1.0 ml de citrato férrico al 1%, 0.50 gr  $KH_2PO_4$ , 0.40 gr  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 0.40 gr NaCl, 0.40 gr  $NH_4Cl$ , 0.05  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 1 ml vitamina  $B_{12}$ , 1 ml Solución de Elementos Traza), a temperatura ambiente con luz incandescente (2,400 lux) con 16 h iluminación y 8 h oscuridad, hasta observar el cambio de color en el medio de cultivo (Núñez-Cardona, 2010), posteriormente se tomó 1 ml de este cultivo y se inoculó en 10 ml medio, después se realizó el aislamiento con diluciones seriadas utilizando la técnica de placa en medio de cultivo sólido para BRNS (Archana *et al.* 2004) y se colocaron en una bolsa para anaerobiosis (Merck) incubándose como lo describió Núñez-Cardona (2010). Posteriormente, se seleccionaron

colonias y se escalaron a un crecimiento masivo en tubos de 11 ml con medio específico para BRNS.

Se realizó análisis de los pigmentos fotosintéticos, por espectro de absorbancia *in vivo* para lo cual las bacterias se crecieron en dos condiciones; en medio específico para BRNS con y sin L-Triptófano (L-Trp) 3mM. Los tubos con cultivo, fueron centrifugados a 5,000 rpm durante 20 min, posteriormente se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 5 ml de glicerol, como blanco se utilizó medio de cultivo de este modo determinando la presencia de Bchl *a*. Para el análisis de pigmentos con solventes orgánicos se utilizaron 11 ml de cultivo y se centrifugaron a 5,000 rpm 20 min, se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 5 ml de acetona: metanol (7:2) incubándose en obscuridad a 4°C 18 h. Posteriormente las muestras se centrifugaron y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Shimadzu UV160, como blanco se usó la mezcla de acetona: metanol (Stal *et al.* 1984; Núñez-Cardona, 2003).

Para la determinación de AIA se incubaron 24 y 48 h. los cultivos en medio específico para BRNS con L-Trp 3mM como fuente de carbono. (Koh y Song, 2007), utilizando a *E. coli* como control negativo en la producción de AIA, posteriormente se centrifugaron a 10,000 rpm durante 15 min, 1 ml del sobrenadante fue mezclado con 4 ml del reactivo de Salkowski (150 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, 250 ml de H<sub>2</sub>O destilada, 7.5 ml de 0.5 M FeCl<sub>3</sub>•6H<sub>2</sub>O) e incubado a temperatura ambiente en obscuridad por 20 min. La producción de AIA se determinó por el cambio de coloración de la mezcla de blanco a rojo y por absorbancia a 535 nm en un espectrofotómetro (Thermo Electron Corporation), previamente se preparó una curva estándar con diluciones seriadas de AIA grado molecular (0.77, 1.15, 2.6, 3.9, 5.85, 8.77, 13.15, 19.73, 29.60, 44.38 µg/ml). Se determinó la presencia de AIA por cromatografía líquida de alta presión

(HPLC) Perkin Elmer 785A UV/VIS Detector, de un método modificado de Hoffman (2013), utilizando una columna C18, de 150 mm de largo y 4.6 mm de diámetro interno para partículas de 5  $\mu\text{m}$  de tamaño. La fase móvil fue una mezcla de acetonitrilo-agua, ácido acético 30:69.75:0.25 y el detector se ajustó a 282 nm, el volumen de inyección de la muestra fue de 100  $\mu\text{l}$ , previamente se acondicionó y calibró con concentraciones conocidas de AIA: 10, 20, 40, 80, 100 y 150 ppm.

Para producir AAL en los cultivos de BRNS, se adicione al medio, succinato y glicina 15 mM, y ácido levulínico 10 mM como fuente de carbono; incubándose 24 y 48 h (Sattayasamitsathit y Prasertsan, 2013); posteriormente para la determinación de AAL se utilizó el método colorimétrico de Mauzerall y Granick (1955), las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm 15 min, a 0.5 ml de sobrenadante se le adicionó 0.5 ml de buffer de acetato de sodio 1M (pH 4.7) y 50  $\mu\text{l}$  de acetyl-acetona incubándose en baño María 15 min, se dejaron enfriar y a cada muestra se le adicionó 3.5 ml de reactivo de Ehrlich (Koh y Song, 2007). La presencia de ALA se determinó por la formación de un anillo de color rosa o rosado en la parte superior de la muestra, como control negativo para la producción de AAL se utilizó a la bacteria *E. coli*.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

Aislamiento, selección e identificación de bacterias fotosintéticas.

A partir de la muestra tomada de la macrocelda del Bordo Poniente en la ciudad de México, se identificaron 13 colonias con morfologías celulares de cocos y bacilos curvos Gram negativas, lo cual coincide confirmado por Madigan y Jung, quienes refieren que las BRNS pueden presentar dichas morfologías, esto concuerda a lo reportado por Soon *et al.*, (2014) quienes aislaron de un sistema acuático en Malasia, diversas colonias de BRNS, siendo estas Gram

negativas y con morfologías de bacilos. Así mismo los cultivos presentaron coloraciones rosa, rosada y rojiza, la diferencia en la coloración que presentan los cultivos indican la presencia de los principales carotenoides que se encuentran en estas bacterias (Imhoff, y Trüper 1992), los cultivos se clasificaron como: 1, 2, 4, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 24 y 25. Aunque la mayoría de las especies son capaces de crecer fotoheterotróficamente en condiciones anóxicas con luz, otras pueden ser sensibles al oxígeno y habitar en la oscuridad (Imhoff, 2008), este resultado fue muy interesante, ya que hasta el momento, no se han encontrado reportes donde se mencione el aislamiento de BRNS de un tiradero a cielo abierto, como el Bordo Poniente en la Ciudad de México, Okubo et al., (2006) refieren que aislaron géneros de BRNS como *Rhodobacter* y *Rhodospseudomonas* de una laguna con descargas de desechos de agua de una granja porcina en la provincia de Kosai, Japón, así mismo Kantachote et al. (2005) aislaron 92 cultivos, de una planta de aguas residuales de la hoja de goma del sur de Tailandia, pero solo uno (DK6) se adaptó mejor a las condiciones de laboratorio y con estos resultados confirmamos la presencia de BRNS en medios acuáticos.

Los máximos de absorbancia de los pigmentos fotosintéticos analizados *in vivo* en los 13 cultivos de BRNS sin L-Trp, fueron: 364, 477, 485, 590-591, 803-869 nm, todos estos son característicos de Bchl *a*, estos resultados son similares a los registrados por Nuñez-Cardona *et al.*, 2011, de unos aislados de BRNS provenientes de un humedal en Veracruz, donde coincidimos que estos pigmentos son característicos de estas bacterias.

Los espectros del análisis con acetona/metanol de los 13 cultivos, en la condición con L-Trp 3mM presentaron máximos de absorbancia que se encuentran entre 363, 475, 503, 597 y 771 nm, los cuales son muy parecidos a los observados a la condición sin L-Trp, por lo que no se

identificaron cambios en estos espectros, por lo que los rangos se encuentran entre 364-367 y 769-771 nm los que indican la presencia de Bchl *a* (Pfennig y Trüper, 1977), de la misma forma Bustillos *et al.* (2000) reportaron máximos de absorbancia entre 450 y 476 nm los cuales son característicos de carotenoides, un caso muy similar es reportado por Xu *et al.* (2013) donde observaron diferentes máximos de absorbancia en diversos medios complementados con L-Trp, los cuales son producidos por carotenoides y/o Bchl *a* que es el principal pigmento producido por las bacterias fotosintéticas (Madigan *et al.* 2000). La presencia de éstos pigmentos, los cuales forman complejos con diversas proteínas, dan lugar a diferentes absorbancias que son de gran utilidad para la caracterización de estos microorganismos (Núñez-Cardona, 1999; Pacheco, 2007).

#### Producción de AIA

Las bacterias poseen diversas rutas para la producción de metabolitos como el AIA y AAL, se identificó la producción por colorimetría en donde el sobrenadante vió de transparente a rosa, 11 de 13 sobrenadantes (2, 4, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 20, 22 y 25) fueron positivos al reactivo Salkowski a 24 y 248 h, este resultado comparable a lo reportado por Koh y Song (2007), quienes describen la presencia de AIA en sobrenadantes de *Rhodospseudomonas* KL9 en el mismo periodo de incubación con L-Trp 3mM, además de que nuestra producción fue superior a la control que ellos reportan con *Pseudomonas putida* GR12-2, en condiciones anaerobias. Las concentraciones de AIA por espectrofotometría indican una gran concentración de este compuesto a 48 h (Cuadro 1) comparada a la reportada por Mujahid *et al.*, (2011) quienes utilizaron una concentración de 1mM de L-Trp así como la exposición de luz e incubación a 30°C y una agitación de 150 rpm, refieren que éstas son las condiciones óptimas para la producción de AIA por *R. benzoatilyticus*

JA2 en 24 h. Mutluru y Konada (2008), mencionan que la producción de AIA por bacterias puede variar en diferentes concentraciones debido a la especie y a la cepa, además de la influencia de las condiciones del cultivo, fase estacionaria y disponibilidad del sustrato. Patten y Glick (1996) refieren que L-Trp es considerado como precursor en la síntesis de AIA, por lo que las altas concentraciones de L-Trp inducen la secreción de AIA, este es generalmente producido cuando el L-Trp se encuentra disponible en exceso. Algunas bacterias pueden utilizar L-Trp pero la producción de AIA es menor cuando es adicionado al medio de cultivo o de forma externa (Ryu y Patten, 2008).

Cuadro 1. Concentración  $\mu\text{g/ml}$  por espectrofotometría de AIA en 11 sobrenadantes de cultivos de BRNS a 24 y 48 h.

Cultivo	24 h	48 h
	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$
2	17.72	80.93
4	34.00	85.56
11	28.63	85.91
12	78.76	39.98
14	71.23	83.66
15	75.78	50.11
16	29.54	59.41
18	28.24	46.08
20	71.53	75.91

22	28.20	47.59
25	80.93	83.70

---

De la misma manera, los 13 cultivos se incubaron sin adición de L-Trp y los resultados de la prueba colorimétrica de Salkowski, indicaron la presencia de AIA pero a concentraciones muy bajas (datos no presentados), por lo que se puede confirmar lo descrito por Patten y Glick (1996) quienes refieren que altos niveles o un exceso de triptófano en el medio, inducen a la secreción de AIA. Por otro lado, nuestros resultados difieren a lo publicado por Ryu y Patten (2008) quienes describen que algunas bacterias pueden utilizar L-Trp; pero la producción de AIA puede ser menor cuando este es adicionado de forma externa el medio de cultivo.

#### Determinación de AIA por HPLC

Se eligieron seis sobrenadantes (2, 4, 11, 12, 14 y 25) los cuales se analizaron bajo una curva estándar en HPLC, donde se obtuvo un pico a 282 nm con un tiempo de retención de 5.9 minutos, el cual todas las muestras lo presentaron indicándonos la presencia de este metabolito, de la misma manera se observó la concentración de AIA en cada cultivo la cual fue de: 2 (10.88), 4 (21.41), 11 (16.60), 12 (18.70), 14 (10.81), 25 (20.85)  $\mu\text{g/ml}$ , estos resultaron evidenciaron que los cultivos 4 y 25 produjeron mayor concentración de AIA. De la misma manera el análisis de HPLC se realizó a los dichos cultivos, pero sin la adición de L-Trp, donde los cromatogramas indicaron la producción de AIA en concentraciones bajas (Cuadro 2). Por lo que en nuestros se observó que la adición de L-Trp a 3 mM, aumentó considerablemente la producción de AIA en comparación a la condición sin éste aminoácido. Mujahid *et al.*, 2011 refieren que la producción de AIA en *R. benzoatilycus* aumentó de (12 a 20  $\mu\text{g/ml}$ ) al adicionarle L-Trp al medio de cultivo.

Mutluru y Konada (2008) reportan que la producción de AIA en diferentes bacterias y especies está influenciada por las condiciones del cultivo, fase de crecimiento y disponibilidad del sustrato, sin duda este trabajo fue un caso evidente, ya que en los seis cultivos sin la adición de triptófano al medio; la producción de AIA fue menor, pero cuando se les agregó L-Trp la producción de AIA fue mucho mayor (Cuadro 2). Halda y Alija, 2003; Ahmad *et al.* (2008) refieren que los altos niveles de AIA secretado es debido al L-Trp el cual se encuentra generalmente disponible en exceso. Sin embargo, en esta investigación se difiere a lo publicado por Tsavkelova *et al.* (2007) ya que ellos mencionan que la producción y concentración de AIA de sus aislados bacterianos fue la misma en las condiciones con y sin L-Trp.

Cuadro 2. Concentraciones  $\mu\text{g/ml}$  de AIA en el sobrenadante en seis cultivos de BRNS, mediante una curva estándar, sin y con la adición de L-Trp.

Cultivo	Concentración de AIA en medio de cultivo sin L-Trp	Concentración de AIA en medio de cultivo complementado con L-Trp 3Mm
2	4 $\mu\text{g/ml}$	10.88 $\mu\text{g/ml}$
4	4 $\mu\text{g/ml}$	21.41 $\mu\text{g/ml}$
11	5 $\mu\text{g/ml}$	16.60 $\mu\text{g/ml}$
12	1 $\mu\text{g/ml}$	18.70 $\mu\text{g/ml}$
14	3 $\mu\text{g/ml}$	10.81 $\mu\text{g/ml}$
25	2.5 $\mu\text{g/ml}$	20.85 $\mu\text{g/ml}$



Por otro lado se observaron diferencias en las concentraciones de AIA en los cultivos en ambos métodos (Salkowski y HPLC), esto se confirma por lo publicado por Tsakelova *et al.* (2007) donde refieren que la determinación por Salkowski fue dos veces más elevada que la determinación por HPLC. En este trabajo, solo cuatro de seis sobrenadantes de BRNS presentaron esta característica 4, 11, 14 y 25 (Cuadro 3). Dicho resultado también fue observado por Mordukhova *et al.* (1991); Glickmann y Dessaux (1995); Ivanova *et al.* (2001); quienes mencionan que esto es debido a la acumulación de diversos compuestos de origen indólico en el sobrenadante bacteriano, los cuales también pueden reaccionar con el reactivo Salkowski. Se sabe que el reactivo es específico para ácido indol acético (AIA), ácido indol propiónico (AIP) y ácido indol 3 acetamida (AIM) y no solo para AIA (Glickmann y Dessaux 1995; Patten y Glick 2002). También es conocido que la presencia de L-Trp conduce a la disminución de la sensibilidad de este método. Un ejemplo de ello, lo refiere Tsavkelova *et al.* (2007) quienes observaron diferentes concentraciones de un cultivo de *Microbacterium*, donde la concentración con Salkowski fue 19 veces mayor que la determinada por HPLC, sin duda un caso parecido se observó en algunas lecturas de los sobrenadantes, donde las concentraciones por el método de Salkowski fueron más elevadas en relación a la determinación por HPLC (Cuadro 3).

Cuadro 3. Comparación de las concentraciones  $\mu\text{g/ml}$  de AIA en seis sobrenadantes de cultivos de BRNS por el método de Salkowski y HPLC.

Cultivo	Concentración de AIA $\mu\text{g/ml}$ por Salkowski	Concentración de AIA $\mu\text{g/ml}$ por HPLC
2	30.98	10.93
4	18.72	13.27
11	46.96	17.36
12	171.76	19.89
14	38.65	19.63
25	56.70	20.85

Con relación a los microorganismos productores de AIA se sabe que entre los parámetros que afectan a la producción de este metabolito, se encuentran el estrés a los que está expuesta la bacteria como lo son el agotamiento de la fuente de carbono, un exceso en la concentración del precursor, la tensión del oxígeno, la fase estacionaria del cultivo (Ona *et al.* 2005), sin embargo, nuestros resultados difieren a lo reportado con dicho autor y coinciden a lo reportado por Mujahid *et al.* (2011) demostrando que la producción de AIA es independiente a estos factores en *Rubrivivax benzoatilyticus*, ya que obtuvieron una concentración de 58  $\mu\text{g/ml}$  bajo diferentes condiciones fisiológicas, por lo que considera que la producción de AIA puede ser una propiedad en común de las BRNS, sin embargo esta concentración se encuentra 2.7 veces por encima de lo que nosotros reportamos del cultivo 25 con 20.85  $\mu\text{g/ml}$ , esto se podría deber a que nuestras

muestras son aisladas de una muestra natural y el cultivo de dicho autor es una cepa ya adaptada a las condiciones de laboratorio.

#### Presencia de ALA en cultivos de BRNS

La presencia de AAL se observó únicamente en el sobrenadante del cultivo 25, mediante la evidencia de la oxidación de un anillo tetrapirrólico, el cual cambió de transparente a un color rosado en la parte superior de este a 24 y 48 horas, debido la presencia de ácido levulínico (AL), el cual es un compuesto estructuralmente similar al 5-ácido aminolevulínico, excepto por la ausencia del grupo amino, donde Sasikala *et al.* (1995) recomiendan la adición esté en la fase logarítmica del cultivo para incrementar la concentración de ALA. Sin embargo en este estudio solo se determinó la presencia de ALA a 24 y 48 h, coincidiendo a lo reportado por Sattayasamitsathit y Prasertsan (2013) que indican que la bacteria fotosintética *Rubrivivax benzoatilycus* PS-5 produjo ALA en una concentración mayor con la adición de AL sin que se observará la presencia de este compuesto en el sobrenadante de los otros doce cultivos. Un caso muy particular es el reportado por Koh y Song (2007) donde mencionan dos cepas de BRNS *Rhodopseudomonas sp.* KL9 y *Rhodopseudomonas sp.* BL6, las cuales tienen la capacidad de producir AIA y AAL, un aporte poco común donde se identifica a la misma cepa que produce dos compuestos diferentes en un periodo de incubación de 24 y 48 horas.

#### CONCLUSIONES.

Los lixiviados del Bordo Poniente es un medio del cual se aislaron BRNS, las cuales tienen una importancia de tipo biotecnológica, ya que se aislaron 13 cultivos de BRNS de las cuales 11 tienen la habilidad de producir AIA, donde se demostró además que seis de ellas lo pueden biosintetizar sin la adición L-Trp. Se observó que el cultivo 25 es el más eficiente, ya que produjo

ambos metabolitos (AIA y ALA) a 24 y 48 h, lo cual sugiere que esta bacteria cuenta con diversas rutas involucradas en la síntesis de estos compuestos, los cuales son de importancia en la agricultura.

#### LITERATURA CITADA

Ahmad F., Ahmad I., Khan M. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 163 (2): 173–181.

Archana A., Sasikala CH., Ramana V., and Arunasri K. 2004. “Paraffin wax-overlay of pour plate”, a method for the isolation and enumeration of purple non-sulfur bacteria. *Journal of Microbiology Methods* 59: 423-425.

Balestrasse KB., Tomaro ML., Batlle A., Noriega GO. 2010. The role of 5-aminolevulinic acid in the response to cold stress in soybean plants. *Phytochemistry*. 71: 2038-2045.

Fedtko C., and Duke S., O. Herbicides, in *Plant Toxicology*, in *Physiology of herbicide action*. ed. by Hock B and Elstner EF. Marcel Dekker, New York, NY, pp. 247–330 (2005).

Gianfagna T., J. Natural and synthetic growth regulators and their use in horticultural and agronomic crops, in *Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, ed. by Davies PJ. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 751–773 (1995).

Glickmann E., and Dessaux Y. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 793-796.

Grossmann K. Mediation of herbicide effects by hormone interactions. *Journal of Plant Growth Regulation* 22 (1):109–122 (2003).

Grossman K. 2010. Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. *Pesticide Management Science* 66 (2): 113-120.

Halda-Alija L. 2003. Identification of indole-3-acetic acid producing freshwater wetland rhizosphere bacteria associated with *Juncus effusus* L. *Canadian Journal of Microbiology* 49 (12): 781–787.

Imhoff J. 2008. Systematics of anoxygenic phototrophic bacteria. Institut für Meereswissenschaften IFM-GEOMAR, Düsternbrooker Weg 20, 24105 Kiel, Germany. Rudiger Hell et al., (eds.), *Sulfur Metabolism in Phototrophic Organisms*, pp. 269-287.

Imhoff J., and Trüper H. 1992. The genus *Rhodospirillum* and related genera. In *The Prokaryotes*, 2nd edn, pp. 2141–2155. Edited by A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K.-H. Schleifer. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.

Imhoff J., and Trüper H. 1989. Purple nonsulfur bacteria. In: Staley JT, Bryant MP, Pfennig N, Holt JG (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, pp 1658–1682.

Ivanova E., Doronina N., and Trotsenko I. 2001. Aerobic methylobacteria are capable of synthesizing auxins. *Mikrobiologia* 70: 452–458.

Kantachote D., Torpee S., and Umsakul K. 2005. The potential use of anoxygenic phototrophic bacteria for treating latex rubber sheet wastewater. *Electronic Journal of Biotechnology* 3 (8): 314-323.

Kende H. and J. A. D. Zeevaart. 1997. The five “classical” hormones. *The Plant Cell* 9: 1197-1210.

Kim MK., Choi KM., Yin CR., Lee KY., Im WT., and Lee ST. 2004. Odorous swine wastewater treatment by purple non sulfur bacteria *Rhodospseudomonas palustris*, isolated from eutrophicated ponds. *Biotechnology Letters* 26 (10): 819-822.

Koh R., and Song H. 2007. Effects of Application of *Rhodospseudomonas* sp. on seed germination and growth of tomato under axenic conditions. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 17(11): 1805-1810.

Madigan M., and Jung O. 2009. An Overview of Purple Bacteria: Systematics, Physiology, and Habitats. Neil Hunter, Fevzi Daldal, Marion C. Thurnauer and J. Thomas Beatty (eds): *The Purple Phototrophic Bacteria*, Springer Science-Business Media B. V. pp. 1–15.

Madigan M., Jung D., Woese C., and Achenbach L. 2000. *Rhodoferax antarcticus* sp. nov., a moderately psychrophilic purple nonsulfur bacterium isolated from an Antarctic microbial mat. *Archives of Microbiology* 173: 269–277.

Mauzerall D. and Granick S. 1955. The occurrence and determination of  $\delta$ -aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. *The Journal of Biology Chemistry* 219: 435-446.

Mordukhova E., Skvortsova N., Kochetkov V., Dubeikovskii A., and Boronin M. 1991. Synthesis of the phytohormone indole-3-acetic acid by rhizosphere bacteria of the genus *Pseudomonas*. *Mikrobiologia* 60: 494–500.

Mujahid M., Sasikala Ch., and Ramana ChV. 2011. Production of indole-3-acetic acid and related indole derivatives from L-tryptophan by *Rubrivivax benzoatilyticus* JA2. *Applied Microbiological and Biotechnology* 89: 1001-1008.

Mutluru S. and Konada M. 2008. Factors effecting chitinase activity of *Rhizobium* sp. from *Sesbania sesban*. *Section Cellular and Molecular Biology* 63 (3): 307-312.

Núñez-Cardona M. T., Chávez M., y Signoret M. 2011. Aislamiento y caracterización de bacterias rojas no sulfurosas provenientes del humedal de la Mixtequilla, Veracruz (México). *ECIPERU* 8 (2): 33-38.

Núñez-Cardona M. T., Signoret-Poillon M., (compiladora), Castilla P., Rivera F., Vicon, J., y Mier T. 2010. Análisis in vivo de pigmentos fotosintéticos de microorganismos. En: *Métodos y técnicas de laboratorio aplicables al estudio de ecosistemas*; Xochimilco, CBS Manual 31, Universidad Autónoma Metropolitana Metropolitana-Xochimilco, México. pp 14-19, ISBN 978-607.477-297-5.

Núñez-Cardona M. T. 2003. Aislamiento y caracterización pigmentaria de las bacterias rojas del azufre de la Laguna de Tampamachoco, Veracruz, *Hidrobiológica* 13(3): 171-76.

Okubo Y., Futamata H., and Hiraishi A. 2006. Characterization of Phototrophic Purple Nonsulfur Bacteria Forming Colored Microbial Mats in a Swine Wastewater Ditch. *Applied and Environmental Microbiology* 06: 6225–6233

Ona O., Impe J., Prinsen E., and Vanderleyden, J. 2005. Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. FEMS Microbiology Letters 246: 125-130.

Pacheco V. (2007). Aislamiento y caracterización de bacterias fotótrofas de la familia Rhodospirillaceae a partir de muestras de agua obtenidas del Golfo de México. Informe de Servicio Social. pp 54.

Patten C., and Glick B. 2002. Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. Applied and Environmental Microbiology 68 (8): 3795-3801.

Patten C., and Glick B. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. Canadian Journal of Microbiology 42: 207-220.

Pfennig N., and Trüper H. 1977. The *Rhodospirillales* (phototropic or photosynthetic bacteria). In: Laskin AI and Kechevalier HA, eds. Practical Handbook of Microbiology. 2nd ed. USA: CRC PRESS (1):p 119-125.

Rajasekhar N., Sasikala Ch. and Ramana V. 1999. Photoproduction of indole 3-acetic acid by *Rhodobacter sphaeroides* from indole and glycine. Biotechnology Letters 21: 543-545.

Roze L. Chanda A. and Linz J. 2011. Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: a new understanding of established cellular processes. Fungal Genetics and Biology, Vol. 48 (1): 35–48.



Ryu R., and Patten C., 2008. Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. *Journal of Bacteriology* 190: 7200–7208.

Sasikala Ch., and Ramana Ch. 1995. Biotechnological Potentials of Anoxygenic Phototrophic Bacteria. II. Biopolyesters, Biopesticide, Biofuel, and Biofertilizer. *Advances in Applied Microbiology*, Vol. 1; 227-278.

Sattayasamitsathit S. and Prasertsan, P. 2013. Characterization of a newly isolated *Rubrivivax benzoatilyticus* PS-5 with self-flocculation property and optimization pathway for 5-aminolevulinic acid production. *African Journal of Biotechnology* 12 (16): 2069-2081.

Soon T., Al-Azad S., and Ransangan J. 2014. Isolation and Characterization of Purple Non-Sulfur Bacteria, *Aifella marina*, Producing Large Amount of Carotenoids from Mangrove Microhabitats. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 24(8): 1034-1043.

Stal L., Van Gernerden H., and Krumbein W. 1984. Simultaneous assay of chlorophyll and bacteriochlorophyll in natural communities. *Journal of Microbiology Methods* 2: 295-306.

Sterling TM and Hall JC, Mechanism of action of natural auxins and the auxinic herbicides, in *Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology*, ed. by Roe RM, Burton JD and Kuhr RJ. IOS Press, Amsterdam, The Netherlands, pp. 111–141 (1997).

Strohl WR 2000. The role of natural products in a modern drug discovery program. *Natural Products Drug Discovery - Microbiology* 5 (2):39–41.

Tanaka Y., Tanaka A., Tsuji H., 1992. Stabilization of apoproteins of light-harvesting chlorophyll-a/b protein complex by feeding 5-aminolevulinic acid under intermittent illumination. *Plant Physiology and Biochemistry*, 30: 365–370.

Tsavkelova E., Cherdyntseva T., Klimova S., Shestakov A., Botina S., and Netrusov A. 2007. Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin. *Archives of Microbiology* 188: 655-664.

Xu Y., Feng Y., Wang Y., and Lin, X. 2013. Characteristics of purple nonsulfur bacteria grown under Stevia residue extractions. *Letters in Applied Microbiology* 1-7.

El jurado asignado por la Comisión Académica de la Maestría en Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis titulada:

**Detección de metabolitos secundarios en bacterias rojas no sulfurosas**

Que presento:

**Cristhian Sánchez Cruz**

El día 03 de mayo de 2016 en la Ciudad de México para obtener el Grado de Maestro en Ciencias Agropecuarias

**JURADO DE EXAMEN**

Dra. María Eugenia Gutiérrez Castillo  
Presidenta

\_\_\_\_\_

Dr. José de Jesús Olivares Trejo  
Secretario

\_\_\_\_\_

Dra. Aida Hamdan Partida  
Vocal

\_\_\_\_\_