



BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS

MICROBIOLÓGICAS-ICUAP

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

**Estudio de la participación de las fosfatasas en la actividad  
solubilizadora de fosfatos en *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

**ALMA ROSA PÉREZ RODRÍGUEZ**

DIRECTOR DE TESIS

**D.C. LUCÍA SOTO URZÚA**

**Febrero 2021**

## **AGRADECIMIENTOS**

Le doy gracias a mis padres y hermano por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado, y por el apoyo que he recibido en los proyectos y metas que me he trazado en la vida. Gracias por su amor y por ayudarme a sobrellevar las situaciones difíciles por las que hemos pasado.

A Jovanni por ser una parte muy importante de mi vida, por haberme apoyado en las buenas y en las malas, y sobre todo por su paciencia y amor.

A mi bebé con alas, mi angelito Yunuén que, aunque la vida no nos permitió estar juntos, siempre está en mis pensamientos. Sé que tu espíritu está en un lugar seguro desde donde me proteges y me ayudas a seguir adelante.

A la DC Lucía Soto Urzúa por la confianza que me tuvo, el apoyo y por el tiempo que me dedicó para poder hacer posible esta tesis y con ello ayudarme a crecer profesionalmente y aprender cosas nuevas.

Al DC Luis Javier Martínez Morales quien también ha sido parte de mi formación profesional gracias por sus consejos que me ayudaron en la realización de este trabajo.

A la DC Margarita Ma de la Paz Arenas H. por el equipo prestado en la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca recibida correspondiente a la convocatoria "Becas Nacional (Tradicional) 2018-2".

## **Lista de Abreviaturas**

**ADN:** Acido desoxirribonucleico

**Al<sup>3+</sup>:** Aluminio

**ANOVA:** Análisis de varianza

**ARN:** Acido ribonucleico

**ATP:** Adenosin trifosfato

**BSA:** Albúmina Sérica Bovina

**Ca<sup>2+</sup>:** Calcio

**CDS:** Secuencias codificantes

**D.O.:** Densidad óptica

**EDTA:** Acido etilendiaminotetraacético

**EPS:** Exopolisacárido

**Fe<sup>2+</sup>:** Hierro

**(Pi):**Fosforo inorgánico

**(Po):** Fosforo orgánico

**GDI:** *Gluconacetobacter diazotrophicus*

**H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:** Ácido fosfórico

**ISF:** Índice de solubilización de fosfato

**Kb:** Kilobase

**kDa:** Kilodalton

**Mb:** Megabase

**Mg<sup>2+</sup>:** Magnesio

**mM:** Milimolar

**MUB:** Buffer Universal Modificado

**N<sub>2</sub>:** Nitrógeno

**NADH:** Dinucleótido de nicotinamida y adenina forma reducida

**NADPH:** Nicotiamida Adenina Dinucleótido fosfato forma reducida

**nM:** Nanomolar

**NSAP:** Fosfatasa ácida no específica

**P:** Fosforo

**pNPP:** para-nitrofenil fosfato

**PQQ-GDH:** glucosa deshidrogenasa dependiente de pirroloquinolina quinona

**R<sup>2</sup>:** coeficiente de determinación

**SEM:** Error estándar de la media

**μM:** Micromolar

## Lista de Figuras

**Figura 1.** Gráfica de los diferentes índices de solubilización de *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5, obtenidos con las fuentes de carbono (glucosa 0.05 M, xilosa 0.06 M, sacarosa 0.029 M, fructosa 0.05 M, manitol 0.05 M, maltosa 0.027 M, lactosa 0.029 M) en medio SRS.

**Figura 2.** Análisis del efecto de diferentes pH (5, 5.5, 6 y 7) en el índice de solubilización de *G. diazotrophicus*, utilizando glucosa como fuente de carbono en placas de medio SRS. El medio contiene purpura de bromocresol, un colorante que sirve como indicador de pH, en pH ácidos es de color amarillo y a pH alcalino es de color morado.

**Figura 3.** Efecto de las diferentes fuentes de nitrógeno en el índice de solubilización de *G. diazotrophicus* Pal5 (Sulfato de amonio 0.0037 M, nitrato de sodio 0.0058 M, nitrato de calcio 0.002 M, nitrato de amonio 0.006 M, L-aspartato 0.0037 M, urea 0.0083 M y nitrato de potasio 0.0049 M), con glucosa 0.05 M como fuente de carbono y pH 5.5.

**Figura 4.** Gráfica que muestra el comportamiento con diferentes fuentes de fosfato en el índice de solubilización de *G. diazotrophicus* Pal5 (fosfato de sodio 0.032 M, hidroxapatita 0.0099 M, fosfato monobásico de potasio 0.036 M, fosfato de amonio 0.043 M, fosfato tricálcico 0.016 M), con glucosa 0.05 M, pH 5.5 y sulfato de amonio 0.0037 M.

**Figura 5.** Gráfica que muestra las concentraciones de p-nitrofenolato obtenidas al realizar el ensayo con fosfato tricálcico (0.016 M) e hidroxapatita (0.0099 M) como fuente de fosfato.

**Figura 6.** Gráfica que muestra las concentraciones de p-nitrofenolato obtenidas al realizar el ensayo de la fosfatasa en condiciones ácidas (buffer MUB pH 6.5) y alcalinas (buffer MUB pH11).

**Figura 7.** Curva de crecimiento de *G. diazotrophicus* Pal5 en medio SRS con fosfato tricálcico y sin fosfato.

**Figura 8.** Determinación en sobrenadantes de cultivo de *G. diazotrophicus* Pal5 crecidos en medio SRS (sacarosa 0.029 M como fuente de carbono, fosfato tricálcico 0.016 M y sulfato de amonio 0.0037 M) las actividades de fosfatasa ácida y alcalina.

**Figura 9.** Efecto sobre la actividad enzimática de la fosfatasa ácida y alcalina en sobrenadantes de *G. diazotrophicus* Pal5 crecido en medio SRS con diferentes concentraciones de fosfato tricálcico (0.016 M, 0.008 M, 0.004 M, 0.002 M), glucosa 0.05 M y sacarosa 0.029 M.

**Figura 10.** Determinación de la actividad enzimática de la fosfatasa ácida y alcalina en un rango de temperatura de 20°C a 90°C del sobrenadante concentrado.

**Figura 11.** Análisis por PAGE-SDS semidesnaturalizante teñido con azul de Coomassie, del sobrenadante concentrado de un cultivo de *G. diazotrophicus* de 96 horas de incubación.

**Figura 12.** Alineamiento con el programa Clustal Omega de las secuencias de fosfatasas ASL41554.1 de *Acetobacter oryzifermentans*, GAL96606.1 de *Acetobacter tropicalis* y WP012225717.1, WP012224345.1 y WP012553035.1 de *G. diazotrophicus*

**Figura 13.** Modelos de listón de las secuencias de las fosfatasas ácidas y alcalinas obtenidas con el programa Phyre 2 de las secuencias de fosfatasas ASL41554.1 de *Acetobacter oryzifermentans*, GAL96606.1 de *Acetobacter tropicalis*, y WP012225717.1, WP012224345.1, WP012553035.1 de *G. diazotrophicus*

**Figura 14.** Análisis mediante el programa MATRAS donde se hace una superposición de los modelos de las fosfatasas ASL41554.1 de *Acetobacter oryzifermentans*, GAL96606.1 de *Acetobacter tropicalis*, y WP012225717.1, WP012224345.1 y WP012553035.1 de *G. diazotrophicus*.

## Índice

1. Introducción.....	1
2. <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> .....	3
3. Fósforo.....	5
4. Antecedentes generales .....	9
5. Antecedentes específicos .....	10
6. Justificación .....	11
7. Hipótesis .....	12
8. Objetivos. ....	12
9. Esquema de trabajo .....	13
10. Metodología .....	14
11. Resultados. ....	18
12. Discusión .....	34
13. Conclusiones. ....	39
14. Perspectivas .....	40
15. Anexos .....	41
16. Bibliografía. ....	48

## Resumen

Los microorganismos endófitos son de gran importancia biológica debido a la diversidad de actividades metabólicas las cuales repercuten en el desarrollo de las plantas. Una de estas actividades que realizan estos microorganismos es la solubilización de fosfatos de baja disponibilidad en suelos con baja fertilidad. Los microorganismos logran la solubilización y reciclaje de fosfato por medio de la secreción de enzimas llamadas fosfatasa.

*Gluconacetobacter diazotrophicus* tiene la capacidad de solubilizar fosfatos, sin embargo, se le ha atribuido esta actividad a la producción de ácidos orgánicos como el ácido glucónico. En el genoma de *G. diazotrophicus* no hay genes que codifiquen para alguna fosfatasa ácida o alcalina. La búsqueda en genomas de otras acetobacterias proporcionó información acerca de la presencia de genes involucrados en la producción de fosfatasas ácida y alcalina.

En este trabajo se investigó la producción *in vitro* de fosfatasas por *G. diazotrophicus*, para ello se establecieron las condiciones en las que había un mayor índice de solubilización de fosfatos con diferentes fuentes de carbono, pH, fuentes de nitrógeno y fuentes de fosfato. En la condición de máxima solubilización de fosfato, se determinó la actividad de fosfatasa por medio de la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato. La actividad de fosfatasa fue mayor cuando se utilizó sacarosa (0.029M) como fuente de carbono, sulfato de amonio (0.0037M) como fuente de nitrógeno, fosfato tricálcico (0.016M) como fuente de fosfato, un pH de 5.5 y un tiempo de incubación de 96 horas. Posteriormente el sobrenadante se concentró y se realizó un ensayo para determinar el efecto de la temperatura en la actividad de las fosfatasas, este sobrenadante también se utilizó para identificar las proteínas existentes por medio de PAGE semidesnaturalizante y se pudo observar la presencia de una banda de aproximadamente 60 kDa. También se realizó un análisis bioinformático en el que se compararon secuencias de fosfatasas de bacterias acéticas con fosfatasas de *G. diazotrophicus* encontrando un motivo conservado de una fosfatasa de la familia HAD.

En este trabajo pudimos detectar actividad de fosfatasa en *G. diazotrophicus*, sin embargo, es necesario realizar más experimentos para caracterizar que la proteína de 60 kDa sea una fosfatasa ácida o alcalina, que podría contribuir a la solubilización de fosfatos pero se requieren de más estudios para atribuir éste papel a la presencia de las fosfatasas ácidas y alcalinas extracelulares.

# 1. Introducción.

---

Los organismos endófitos son aquellos que colonizan el interior de las plantas sin causar daño; estos microorganismos promueven el crecimiento de la planta en términos de aumento en las tasas de germinación, biomasa, en el contenido de nitrógeno asimilable (fijación biológica de nitrógeno), incremento de la longitud y tamaño de las raíces (producción de fitohormonas), tolerancia a estrés, defensa contra patógenos, solubilización de nutrientes minerales como el fosfato y el zinc entre otros (Chawla y cols., 2014). La aplicación de estos microorganismos para una agricultura sostenible tiene mucho potencial. Desde su descubrimiento *G. diazotrophicus* (GDI), se ha convertido en un microorganismo muy interesante de estudio debido a los efectos benéficos que ejerce en el crecimiento de las plantas (Ríos y cols., 2019).

*G. diazotrophicus* es una alfa proteobacteria, aislada por primera vez de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), sin embargo, con el paso del tiempo también ha sido aislada del arroz, piña, café, y ragi entre otras plantas con alto contenido de azúcares (Cavalcante y Döbereiner 1988; Muthukumarasamy y cols., 2002). *G. diazotrophicus* mejora el crecimiento de los cultivos mediante diferentes mecanismos de acción, como la fijación biológica del nitrógeno, producción de auxinas, solubilización de nutrientes minerales como fósforo y zinc, también inhibe el crecimiento de fitopatógenos, por estas características es considerada como una bacteria promotora del crecimiento vegetal (Eskin y cols., 2014; Delaporte y cols., 2016).

El fósforo (P), es un elemento indispensable para la vida de plantas, animales y microorganismos, participa en diversas rutas metabólicas, forma parte de moléculas importantes como los fosfolípidos, ADN, ARN, del ATP requerido para la transferencia de energía y catálisis celular. Es esencial en la fertilidad del suelo y la seguridad alimentaria mundial (Tapia y cols., 2013).

En el suelo el fósforo se puede encontrar en dos formas, como fosfatos orgánicos e inorgánicos. El fósforo inorgánico (Pi) se encuentra mayoritariamente como complejos

minerales insolubles, algunos de ellos aparecen después de la aplicación de fertilizantes químicos. Estas formas precipitadas no pueden ser absorbidas por las plantas (Sharma y cols., 2013). Por otro lado, el fósforo orgánico (Po) constituye del 30- 40% del fósforo total en la mayoría de los suelos, se encuentra como inositol fosfato, es sintetizado por microorganismos y plantas, es la forma más estable del Po; otras formas son fosfomonoésteres, fosfodiéster incluyendo fosfolípidos y ácidos nucleicos (Yadav y cols., 2012).

La solubilización orgánica del fosfato también llamada mineralización es la conversión microbiana del Po a  $\text{H}_2\text{PO}_4$  o  $\text{HPO}_4^{2-}$  (ortofosfato), que son formas de fósforo disponibles para las plantas, el Po puede ser mineralizado como subproducto de la mineralización de la materia orgánica del suelo o mediante la acción de enzimas fosfatasa que pueden ser sintetizadas por las raíces de las plantas, hongos y bacterias reguladas por la demanda de este nutriente (Alori y cols., 2017).

Debido a que las plantas y los microorganismos solamente pueden adquirir el P como  $\text{HPO}_4$ , necesitan de enzimas para romper las moléculas orgánicas y así liberar el fosfato. Estas enzimas son secretadas al ambiente y se conocen como exoenzimas y son específicas para cada tipo de molécula orgánica. En el caso de moléculas orgánicas que contienen P las enzimas que rompen los ésteres de fosfato y los fosfonatos se llaman fosfatasa y fosfonatasa respectivamente. Las fosfatasa las producen la gran mayoría de microorganismos y plantas, constituyen un diverso grupo de enzimas que hidrolizan fosfoéster en varios tipos de sustrato, bajo diferentes condiciones pueden ser encontradas en bacterias Gram positivas, Gram negativas y eucariontes (Gandhi y cols., 2012). La amplia distribución de las fosfatasa en la naturaleza sugiere funciones fundamentales en las células. Las fosfatasa bacterianas son necesarias para varios procesos biológicos porque ayudan a la célula a utilizar fosfoésteres orgánicos que no pueden atravesar la membrana citoplásmica, también tienen una función importante en la expresión génica, están involucradas en transducción de señales y juegan un papel importante en la patogenicidad bacteriana (Gandhi y cols., 2012., Tapia y cols., 2016).

## **2. *Gluconacetobacter diazotrophicus***

*G. diazotrophicus* es una alfa proteobacteria, es endófito de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), posee un alto potencial agrobiotecnológico, pertenece al género de la familia *Acetobacteraceae* con la capacidad de fijar N<sub>2</sub> en presencia de nitratos, excretándolo en más del 50 % directamente en el interior de los tejidos de la planta, en forma asimilable (Cojho y cols. 1993; Muthukumarasamy y cols., 2002). Fue aislada por primera vez por Cavalcante y Döbereiner (1988) de raíces y tallos de diferentes variedades de caña de azúcar. *G. diazotrophicus* se encuentra presente en el apoplasto intercelular de los tallos de la caña de azúcar y también se ha detectado en la xilema de la base del tallo (Piñón y cols., 2002). Inicialmente la bacteria recibió el nombre de *Sacharobacter nitrocaptans*, posteriormente fue renombrada *Acetobacter diazotrophicus* y finalmente después de análisis de secuencias fue denominada *G. diazotrophicus* (Cavalcante & Döbereiner., 1988; Yamada y cols., 1997).

*G. diazotrophicus* es una bacteria aerobia fijadora de nitrógeno, no forma esporas, no produce nódulos, es un bacilo Gram negativo, aerobio obligado, mide 0.7-0.9 µm de largo por 2 µm. Vista bajo el microscopio se pueden observar células solas, en parejas y en cadenas. Cuenta con 1-3 flagelos laterales o peritricos. Su crecimiento óptimo es a pH 5.5 a una temperatura de 30°C. Puede utilizar glucosa, fructosa o sacarosa, produciendo ácido a partir de estos sustratos; con excepción de la sacarosa no usa otros disacáridos y no crece con ácidos dicarboxílicos como única fuente de carbono. Produce y secreta una proteína con actividad levansacarasa que se expresa de forma constitutiva y es una fructosiltransferasa que produce un polímero de fructosa a partir de sacarosa, cataliza la transfructosilación de la sacarosa a una variedad de aceptores incluyendo agua, glucosa, fructano y sacarosa. Cuando la levansacarasa hidroliza la sacarosa, da origen a oligofructanos y levana, los que pudieran favorecer la colonización de la bacteria (Ríos y cols., 2007). La oxidación extracelular de la glucosa a gluconato es el primer paso del metabolismo de la glucosa en *G. diazotrophicus*. Esta reacción de oxidación se produce en el periplasma por acción de una glucosa deshidrogenasa ligada a la pirroloquinolina quinona (PQQ-GDH) (Molinari y cols., 2013).

Además de la caña de azúcar *G. diazotrophicus* también ha sido encontrada en diversos cultivos como el café, piña, mijo, arroz, camote, té, plátano, ragi y en insectos que infestan la caña de azúcar (Muthukumarasamy y cols., 2002; Saravanan y cols., 2008). La interacción de *G. diazotrophicus* con la caña de azúcar promueve el crecimiento de la planta, esta estimulación del crecimiento de la planta ha sido atribuida no solo a la fijación de nitrógeno si no también a la producción de las fitohormonas como el ácido indol-3-acético y las giberelinas A1 y A3; al biocontrol de fitopatógenos ya que impide el crecimiento de *Xantomonas albilineans* y también posee actividad antifúngica contra *Fusarium spp* y *Helminthosporium spp*; la solubilización de los nutrientes minerales como el fósforo y el zinc y la resistencia a las enfermedades como la escaldadura de la hoja (Luna y cols., 2012; Eskin y cols., 2014).

Dentro de sus principales características fisiológicas, destacan su capacidad de fijar nitrógeno en condiciones microaerófilas a pH ácido incluso debajo de 3.0, así como en presencia de altas concentraciones de nitratos (10 mM) debido a la ausencia de la enzima nitrato reductasa, posee la capacidad de oxidar etanol, crece en concentraciones altas de azúcar (30%), crecen en presencia de nitrato como única fuente de nitrógeno y la fijación de nitrógeno es parcialmente inhibida por la presencia de iones amonio (Saravanan y cols., 2008; Bertalan y cols., 2009).

El genoma de *G. diazotrophicus* Pal5 está compuesto por un cromosoma circular de 3.9 Mb con un contenido G+C de 66.19% y dos plásmidos de tamaño de 16.6 y 38.8 Kb respectivamente. Tiene un total de 3,938 secuencias codificantes (CDS), además cuenta con 190 elementos transponibles, cantidad mayor que la que posee alguna otra bacteria endófito (Bertalan y cols., 2009).

### **3. Fósforo**

El fósforo es esencial para la vida, es el componente primario de biomoléculas importantes como el ATP, ADN, nucleótidos, fosfolípidos entre otros. Los requerimientos de fósforo para las plantas es en promedio 0.2-0.4% del peso seco de la planta. El ciclo del fósforo en el suelo tiene componentes abióticos y biológicos. Los componentes abióticos son principalmente obtenidos de la disolución de minerales que contienen fósforo inorgánico (Pi), dan lugar a la formación de fosfatos de  $Al^{3+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ . El componente biológico está compuesto principalmente de la mineralización de fosfato orgánico (Po) y que está constituido por los desechos vegetales, animales y una gran variedad de proteobacterias, liberando una gran proporción de ácidos nucleicos, fosfolípidos y ésteres, lo que representa una parte importante del fósforo total y la mineralización es la forma por la cual la regresa al suelo en la forma de ortofosfato inorgánico (Pi) para ser utilizado en el metabolismo microbiano. La transformación biológica del P en el suelo es importante para su absorción por las plantas. En la agricultura se requiere frecuentemente la adición de P para mejorar la producción de plantas y granos, este proceso se conoce como fertilización. Sin embargo, la frecuente aplicación de fertilizantes fosfatados incrementa la cantidad de Pi en el ambiente impactando los campos agrícolas, generando con el paso de los años, contaminación de suelos y aguas superficiales más allá del sistema de producción agrícola. Un problema ambiental por exceso de Pi es la eutroficación que fomenta el aumento de la cantidad de algas y biomasa que reduce el contenido de oxígeno de los cuerpos de agua, alterando el desarrollo de flora y fauna (Mullen., 2005).

#### **Mineralización e inmovilización del Fosfato**

Los componentes clave del ciclo biológico del P en el suelo son la mineralización, es decir: la transformación del P orgánico en Pi, y la solubilización: la transformación del P inorgánico en formas orgánicas. Estas reacciones son catalizadas por la fracción de biomasa microbiana activa en el suelo, y son en gran medida consecuencia de procesos catabólicos y anabólicos de los microorganismos autótrofos y heterótrofos. Para adquirir energía, los

compuestos orgánicos se oxidan y reducen para producir energía. A medida que estos compuestos son hidrolizados, se liberan los nutrientes inorgánicos (Mullen 2005).

La mineralización es la liberación enzimática del ortofosfato durante la descomposición de materiales orgánicos que contienen P. El grupo de enzimas fosfatasa es responsable de la hidrólisis de los ésteres y los anhídridos del ortofosfato. Se observan varias enzimas de fosfatasa diferentes en el medio ambiente del suelo. Las fosfatasas del suelo que se miden con más frecuencia son las fosfomonoesterasas, que hidrolizan los enlaces de fosfomonoester. Se han estudiado ampliamente dos fosfomonoesterasas: la fosfatasa ácida y la fosfatasa alcalina (Nannipieri y cols., 2010).

### **3.2 Fosfatasas**

Las fosfatasas constituyen un grupo diverso de enzimas que hidrolizan los fosfoésteres en diversos tipos de sustratos en diferentes condiciones. Sobre la base de criterios como la especificidad y el pH óptimo, las fosfatasas pueden clasificarse en varias familias, una de las cuales es la familia de las fosfohidrolasas ácidas inespecíficas bacterianas o fosfatasas (Non-Specific Acid Phosphatases, NSAP por sus siglas en inglés). Las NSAP están ampliamente distribuidas entre muchas especies de bacterias Gram positivas, Gram negativas y también en eucariotas. Se considera que las NSAP son fisiológicamente importantes porque ayudan a la célula a utilizar los fosfoésteres orgánicos que no pueden atravesar la membrana citoplasmática y que, por lo tanto, proporcionan a la célula los nutrientes esenciales o tienen importancia funcional en la expresión de los genes (Gandhi y cols., 2012). Algunas de estas enzimas pueden ser secretadas fuera de la célula, donde se liberan en forma soluble o se retienen como proteínas ligadas a la membrana, donde pueden defosforilar una amplia gama de sustratos de fosfoester estructuralmente no relacionados y mostrar una actividad catalítica óptima a valores de pH de ácidos a neutros (Rossolini y cols., 1998). Además de su función en la adquisición de P, las fosfohidrolasas regulan el metabolismo celular, participan en la transducción de señales y también pueden ser fundamentales para la patogenicidad de las bacterias (Relly y cols., 1996).

### **3.3 Fosfatasa alcalina**

La fosfatasa alcalina es una enzima hidrolasa que funciona a pH alcalino. La metaloenzima contiene dos iones de zinc que participan en la catálisis, mientras que el ión magnesio es importante en la estabilización estructural. La fosfatasa alcalina hidroliza los fosfatos de muchos tipos de moléculas como los nucleótidos, las proteínas, los alcaloides, los ésteres de fosfato y los anhídridos del ácido fosfórico. Las fosfatasas alcalinas desempeñan una función indispensable en el metabolismo de los fosfatos y la producción de fosfatasa alcalina está regulada por los compuestos de fósforo disponibles en el medio ambiente. Los iones metálicos equivalentes son necesarios para la actividad de la fosfatasa alcalina, mientras que los quelantes como el EDTA inhiben la actividad de la fosfatasa alcalina (Nalini y cols., 2015).

### **3.4 Fosfatasa ácida**

Las fosfatasas ácidas son una clase de enzimas ubicuas que catalizan la hidrólisis de los fosfomonoésteres a un pH ácido. En todas las bacterias, estas enzimas catalizan la hidrólisis de una amplia variedad de fosfomonoésteres y catalizan las reacciones de transfosforilación transfiriendo un grupo fosforilo al alcohol en presencia de ciertos aceptores de fosfato. Las bacterias poseen enzimas fosfatasa ácidas localizadas en la pared celular bacteriana y en la sustancia polimérica extracelular (EPS) que la rodea (Behera y cols., 2017).

### **3.5 Importancia de las fosfatasas**

Aproximadamente, entre el 95 y el 99% del fósforo es insoluble, ya sea de forma orgánica o inorgánica, y por lo tanto no está disponible para el crecimiento de las plantas. La cantidad de fósforo disponible es muy limitante en muchos suelos y requiere la aplicación de fertilizantes. Sin embargo, los microorganismos del suelo realizan la mineralización de los compuestos de fósforo orgánicos y la solubilización de los compuestos minerales insolubles, poniéndolos a disposición de las plantas. Este mecanismo depende de las condiciones ambientales y los procesos biológicos que tienen lugar en el suelo (Shukla., 2019).

El contenido de fósforo orgánico oscila entre el 30 y el 50% del total de P del suelo (Mullen 2005). Varias enzimas hidrolíticas desempeñan un papel importante en los procesos de mineralización de los sustratos de P orgánico. Los compuestos orgánicos, que aparecen como ésteres de fosfato, son hidrolizados por fosfatasas para liberar fosfato, que luego puede ser asimilado por las plantas (Cabugao y cols., 2017). Estas enzimas son secretadas por las plantas y los microorganismos cuando el contenido de fosfato soluble en el suelo es bajo. Cuando el contenido de fósforo es alto, estas enzimas son reprimidas. La desrepresión ocurre cuando los niveles de fosfato se vuelven limitantes (George y cols 2017). Además de las concentraciones de fosfato, la actividad de las fosfatasas también puede ser controlada por otros factores como la concentración de sustratos y la presencia o ausencia de metales entre otros (Nahas E., 2015).

## 4. Antecedentes generales

López y cols., en 2013 estudiaron un grupo de bacterias diazotróficas (*Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium* y *Klebsiella*) las cuales fueron evaluadas como bacterias solubilizadoras de fosfato y productoras de ácido indol-3-acético, así como sus efectos sobre el crecimiento de maíz encontrando que estas bacterias incrementaron la biomasa de las plantas por encima del 39% y de la acumulación del fósforo en un 10% (López y cols 2013).

Pallavi y cols., en 2013 evaluaron el efecto de diferentes fuentes de C a una relación de 10 g/L de maltosa, sacarosa, xilosa y galactosa, así como diferentes fuentes de nitrógeno 0.1 g/L como cloruro de amonio, nitrato de sodio, nitrato de potasio y urea, en la solubilización de fosfato en *Pseudomonas lurida*. Observaron una mayor solubilización a los 7 días con glucosa y sulfato de amonio en medio NBRIP con fosfato tricálcico (Pallavi y cols., 2013).

Mahesh y cols., en 2015 optimizaron la producción de fosfatasa alcalina en *Proteus mirabilis*. Sus resultados muestran que la producción óptima de fosfatasa fue a pH 7-8 a 35°C durante 28 horas de incubación. Una vez que ya tenían sus condiciones óptimas purificaron la fosfatasa mediante precipitación con sulfato de amonio, filtración en gel y cromatografía de intercambio iónico. Posteriormente realizaron un PAGE-SDS para estimar el peso de la proteína y obtuvieron un peso de 56KDa (Mahesh y cols., 2015).

En 2017 Behera y cols caracterizaron la fosfatasa ácida extracelular de *Serratia* sp. La actividad de la fosfatasa ácida se determinó mediante el ensayo de p-nitrofenilfosfato (pNPP) en el sobrenadante de cultivo de caldo bacteriano. Posteriormente realizaron una purificación parcial y sus resultados mostraron que las condiciones de máxima producción de fosfatasa fueron a una temperatura de 45 °C, agitación constante de 100 rpm, pH 5.0, glucosa 0.05 M como fuente de carbono y sulfato de amonio 0.0007 M como fuente de nitrógeno (Behera y cols., 2017).

## 5. Antecedentes específicos

En 1999 Maheshkumar y cols. reportaron la capacidad de *G. diazotrophicus* de solubilizar compuestos de fosfato inorgánico (Pi) como consecuencia de la producción de ácido glucónico, por lo que se le consideró parte del grupo de bacterias Pi-solubilizadoras (Maheshkumar y cols., 1999).

En 2011 Crespo y cols., observaron la habilidad de *G. diazotrophicus* de solubilizar hidroxiapatita y fosfato tricálcico. Realizaron ensayos cualitativos en placas de medio NBRIP utilizando fosfato tricálcico (0.016M) observando halos de solubilización alrededor de la colonia. En cultivos líquidos con hidroxiapatita (0.0049 M) como fuente de P y glucosa como fuente C, se observó que más del 98% del P insoluble fue solubilizado (Crespo y cols., 2011).

En 2016 Quintana y cols., evaluaron la capacidad solubilizadora de diferentes fuentes de fosfatos insolubles (fosfato dicálcico 0.036 M, fosfato tricálcico 0.016 M, hidroxiapatita 0.0049 M, y fosfato férrico 0.033 M) en *G. diazotrophicus*. Utilizaron mutantes obtenidas por inserción del transposón Tn5 (que le confiere una resistencia a kanamicina). Las mutantes fueron seleccionadas bajo condiciones específicas relacionadas con la oxidación de la glucosa en la producción de ácido glucónico, la mutante K416 relacionada con la enzima clave para la oxidación de la glucosa, la 16G6 relacionada con una subunidad de NADH quinona oxidoreductasa y 16D10 una proteína putativa transmembrana con función desconocida. Observaron que las mutantes tienen una menor capacidad de solubilizar fosfatos en comparación con la cepa tipo silvestre, el análisis de HPLC mostró que todas las cepas produjeron ácido glucónico en diferentes concentraciones (Quintana y cols., 2016).

## 6. Justificación

---

El uso excesivo de fertilizantes fosforados para mejorar los rendimientos óptimos de los cultivos se considera un problema ambiental importante ya que el 75-90% de los fertilizantes de P aplicados al suelo se inmovilizan rápidamente y deja de estar disponible para las plantas (Mihalache y cols., 2016). Debido a que la disponibilidad del P depende de ácidos orgánicos y de las enzimas liberadas por los microorganismos para solubilizarlos. *Gluconacetobacter diazotrophicus* es un organismo que lleva a cabo la solubilización de fosfatos produciendo ácidos orgánicos y producción de enzimas extracelulares. En este microorganismo de interés agroeconómico no se han descrito estudios relacionados al tipo de enzimas extracelulares que pudieran estar participando en la solubilización de los fosfatos, por lo que es importante establecer los parámetros de máxima producción de la o las fosfatasa (s) presente (s) y en estudios posteriores purificarla, caracterizarla y enviar a secuenciar para esclarecer que tipo de fosfatasa se encuentra en este microorganismo que tiene un amplio potencial como biofertilizante y además pueda tener en un futuro cercano un uso industrial o aplicaciones biotecnológicas para disminuir la cantidad de fertilizantes aplicados en el suelo (Nalini P y cols., 2015).

## 7. Hipótesis

---

*Gluconacetobacter diazotrophicus* produce fosfatasas relacionadas con el fenotipo de solubilización de fosfatos que presenta esta bacteria.

## 8. Objetivos.

---

### 8.1. General.

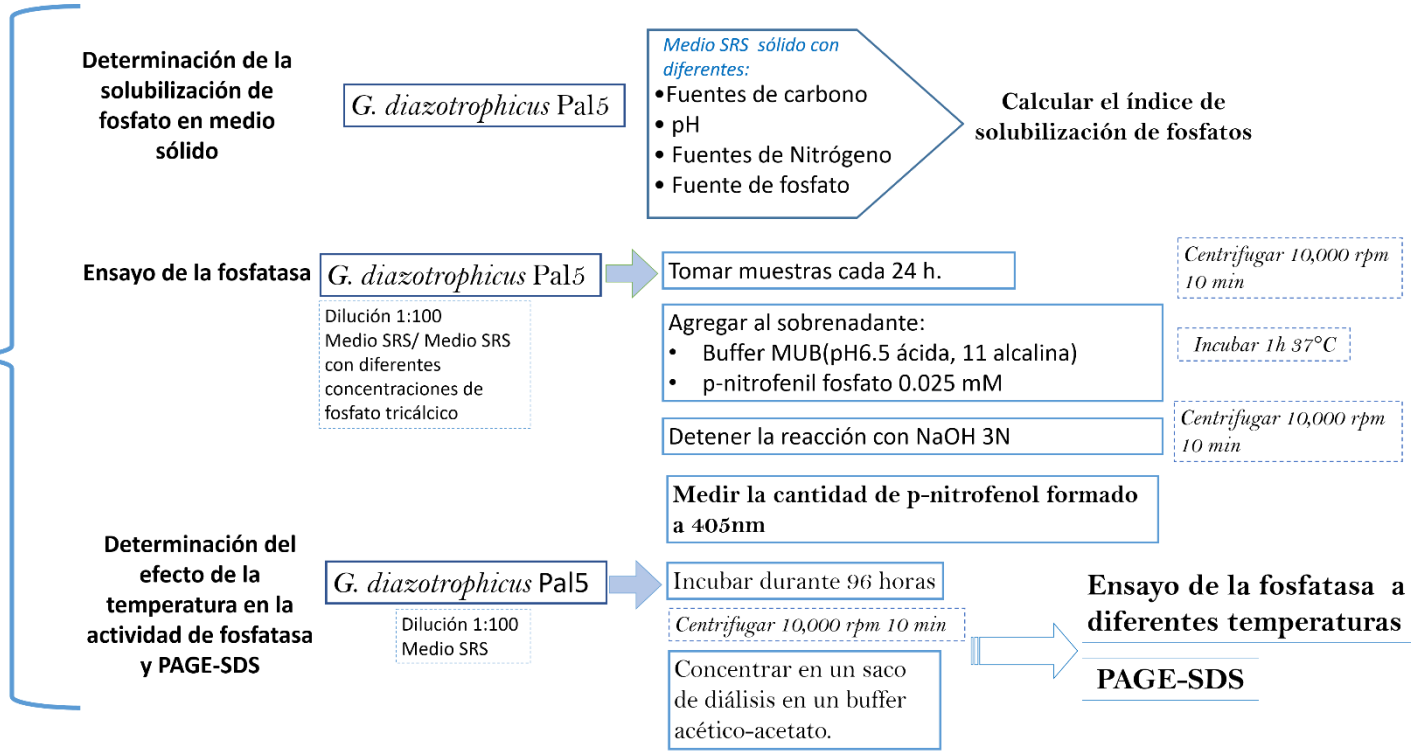
Determinar la presencia de las fosfatasas en la actividad solubilizadora de fosfatos en *G. diazotrophicus*.

### 8.2. Objetivos específicos.

- 1) Establecer las condiciones óptimas de solubilización de fosfatos en la cepa *G. diazotrophicus* Pal5 a diferentes pHs, fuentes de carbono, fosfatos y nitrógeno, en el medio SRS.
- 2) Determinar la presencia de las fosfatasas mediante el ensayo del  $p$ -nitrofenilfosfato
- 3) Realizar una curva de crecimiento de *G. diazotrophicus* en medio SRS con fosfato y sin fosfato.
- 4) Evaluar el efecto de la temperatura en la actividad fosfatasa en sobrenadantes de *G. diazotrophicus*.
- 5) Realizar análisis bioinformáticos con secuencias de fosfatasas de acetobacterias y compararlas con secuencias de fosfatasas en *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

## 9. Esquema de trabajo

### ESQUEMA DE TRABAJO



## **10. Metodología**

### **10.1 Determinación de la solubilización de fosfato en medio SRS sólido.**

A partir de un precultivo de *G. diazotrophicus* Pal5 en medio LGIE (ver anexo 2); se tomaron 3 ml de este precultivo, se centrifugó y el paquete celular se lavó 3 veces con medio LGIE centrifugando a 8,000 rpm por 10 min a temperatura ambiente (TA), se descartó el sobrenadante y el paquete celular obtenido se resuspendió en medio LGIE hasta obtener una densidad celular de 0.2 a  $DO_{600}$  de, de la cual se tomaron y depositaron 30  $\mu$ l a un disco de papel filtro estéril de 0.5 cm de diámetro y se colocaron en medio SRS sólido por triplicado en la misma caja de Petri, se incubaron a 30°C durante 7 días. La solubilización de fosfato se observó como zonas claras alrededor de la colonia, estos halos de solubilización se midieron obteniendo así el índice de solubilización de fosfato (ISF), el cual se midió cada 24 horas y se calculó mediante fórmula  $ISF = \text{Diámetro de la colonia} + \text{halo de solubilización} / \text{diámetro de la colonia}$ , un mayor índice de solubilización nos indica una mayor solubilización (Premono y cols. 1996). Este ensayo se realizó por triplicado.

Para probar el efecto de solubilización de fosfatos con cada una de las diferentes fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato se siguió la metodología mencionada anteriormente, y en el medio SRS (ver anexo 1) las fuentes de carbono fueron: glucosa 0.05 M, xilosa 0.06 M, sacarosa 0.029 M, fructosa 0.05 M, manitol 0.05 M, maltosa 0.027 M, lactosa 0.029 M; con diferentes pH 5.5, 6 y 7; diferentes fuentes de nitrógeno: Sulfato de amonio 0.0037 M, nitrato de sodio 0.0058 M, nitrato de calcio 0.002 M, nitrato de amonio 0.006 M, L-aspartato 0.0037 M, urea 0.0083 M y nitrato de potasio 0.0049 M; y con diferentes fuentes de fosfatos: fosfato tricálcico 0.016 M, fosfato de amonio 0.043 M, fosfato de sodio 0.032 M, hidroxapatita 0.0099 M y fosfato monobásico de potasio 0.036 M.

### **10.2 Ensayo de la fosfatasa**

A partir de un precultivo de *G. diazotrophicus* Pal5 en medio LGIE a 150 rpm durante 48 horas, se inoculó una dilución 1:100 a un volumen de 15 ml de medio SRS líquido en un matraz de 30 ml y se incubó a 30°C durante 7 días con 150 rpm, se tomaron 250  $\mu$ l del cultivo cada 24 horas, se centrifugó, se tomaron 0.240 ml del sobrenadante se mezclaron con 0.630 ml de buffer MUB pH 6.5 para fosfatasa ácida y pH 11 para fosfatasa alcalina y

se le agregó p-nitrofenilfosfato 0.025 mM a un volumen final de 1 ml. Se incubó 1 hora a 37°C, se detuvo la reacción con hidróxido de sodio 3 N, ésta se centrifugó por 10 min a 10,000 rpm y se midió la cantidad de p-nitrofenolato formado a una DO de 405 nm. Para determinar la concentración de p-nitrofenolato se utilizó una curva de calibración la cual se describe en el apartado 10.5.

### **10.3 Concentración del sobrenadante para la determinación de fosfatasa**

Partiendo de un precultivo de *G. diazotrophicus* Pal5 se inoculó una dilución 1:100 en un volumen de 250 ml de medio SRS en un matraz de 500 ml, se incubó durante 96 horas a 30°C 150 rpm, se centrifugó a 10,000 rpm por 30 min. El sobrenadante obtenido se concentró en un saco de diálisis (límite de exclusión de 12,000 D) y posteriormente se dializó en un buffer acético-acetato pH6.

### **10.4 Efecto de la temperatura en la actividad de la fosfatasa de *G. diazotrophicus* Pal5**

Se tomaron 100 µl del sobrenadante concentrado en un saco de diálisis (25 µg/ml de proteína) se mezclaron con buffer MUB pH 6.5 para el ensayo de la fosfatasa ácida y pH 11 para la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina. Se preincubaron 10 min en estos buffers a 20, 30, 40, 50, 70, 80 y 90°C en presencia de p-nitrofenilfosfato 0.025 mM, y se incubó 1 hora a 37°C, se detuvo la reacción con hidróxido de sodio 3N, después de éste periodo se centrifugó por 10 min a 10 000 rpm y se midió la cantidad de p-nitrofenolato formado a de 405 nm, como blanco se utilizó buffer MUB 6.5 para fosfatasa ácida y pH 11 para fosfatasa alcalina; como control se usó el sobrenadante el cual no se preincubó.

### **10.5 Curva de calibración p-nitrofenol**

A partir de un stock de 0.625 mM de p-nitrofenol fosfato se realizaron diluciones para obtener concentraciones finales de 0.39 µM, 0.78 µM, 1.5 µM, 3.1 µM y 6.25 µM. Se mezclaron agua (cbp), buffer, p-nitrofenol, NaOH 0.3 N. y se midió la absorbancia a 405 nm. Los resultados fueron graficados y se calculó la R<sup>2</sup> que nos sirvió para determinar la confiabilidad de nuestra curva al extrapolar con los datos obtenidos experimentalmente.

## 10.6 Curva de calibración BSA

La curva de calibración con BSA se realizó partir de un stock de 1 mg/ml de BSA se realizaron diluciones para obtener concentraciones de 1.25, 2.5, 3.0, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0 y 20 µg/ml. El ensayo se realizó de acuerdo con las especificaciones del reactivo de Bradford. En un tubo se pusieron 800 µl de cada concentración de BSA, y 200 µl del reactivo de Bradford. Se incubó por 5 minutos y se midió la absorbancia a 595nm. Los resultados fueron graficados y se calculó la  $R^2$ . (Bio-Rad Protein Assay). Esta curva se utilizó como referencia para determinar la concentración de proteínas presentes en las alícuotas utilizadas para medir la actividad de fosfatasa.

## 10.7 Análisis bioinformático

Para el análisis bioinformático se utilizó la base de datos de proteínas NCBI donde se buscaron las secuencias de aminoácidos de las proteínas fosfatasas de bacterias secuencias de fosfatasa de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Se utilizaron las secuencias de fosfatasas ácidas: ASL41554.1 de *Acetobacter oryzafermentans* y GAL96606.1 de *Acetobacter tropicalis*, y de *G. diazotrophicus* se utilizaron las secuencias de fosfatasas WP012225717.1, WP012224345.1 y WP012553035.1.

Estas secuencias se introdujeron en el programa CDC (Conserved Domain Database) para saber a que familia pertenecían estas fosfatasas, y posteriormente se introdujeron en el programa Phyre 2 que es un servidor de modelado por homología de estructuras de proteínas. Los modelos obtenidos fueron posteriormente introducidos en el programa MATRAS MARKovian TRAnSition, of protein Structure para empalmar las estructuras obtenidas y así observar si existía alguna homología entre estos modelos.

## **10.8 Análisis estadístico**

Todos los ensayos fueron realizados 3 veces en ensayos independientes; para el análisis estadístico se calculó el SEM y se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas. Para el análisis de las curvas de calibración se calculó el coeficiente de determinación  $R^2$ .

Se utilizó el programa Excel para la captura de datos y el programa Graph Pad Prism para el análisis estadístico.

## 11. Resultados.

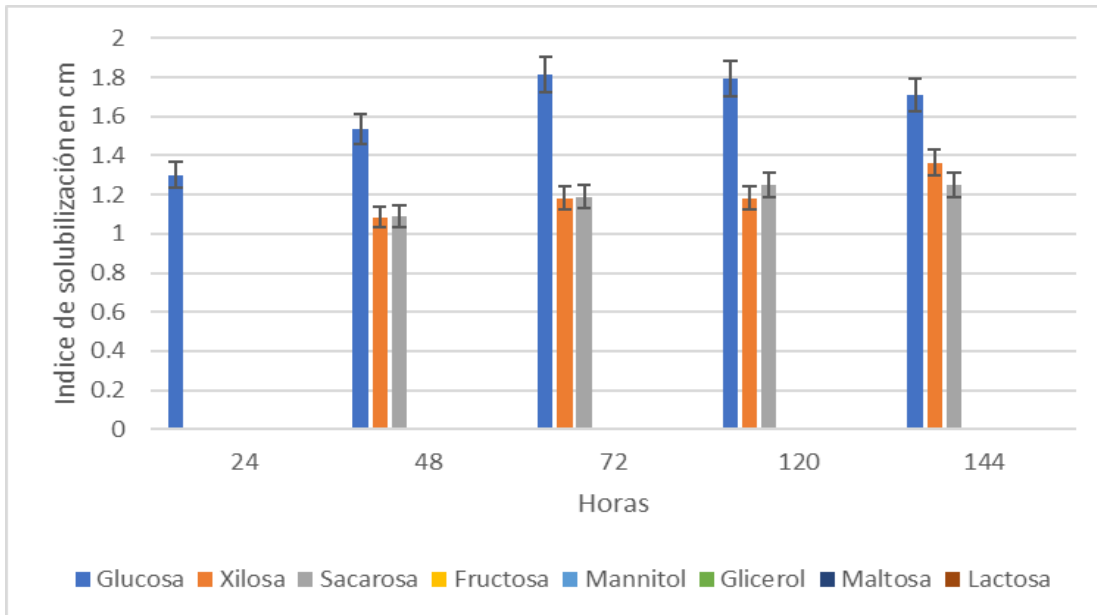
---

### 11.1 Determinación de las condiciones óptimas para la solubilización de fosfatos

#### 11.1.1 Solubilización de fosfatos en medio SRS sólido con diferentes fuentes de carbono

Los índices de solubilización obtenidos con las diferentes fuentes de carbono se muestran en la figura 1, donde se puede observar que el índice de solubilización de fosfatos varió con las diferentes fuentes de carbono, de las 8 diferentes fuentes de carbono probadas sólo se observó con glucosa, sacarosa y xylosa. A las 24 horas solo se obtuvo solubilización con glucosa con un índice de solubilización de 1.3 cm. A las 48 horas el índice de solubilización de glucosa aumentó a 1.5 cm, y también fue a las 48 horas que se observó solubilización con xilosa y sacarosa con 1.08 cm y 1.09 cm respectivamente. El índice de solubilización fue aumentando y a las 72 horas se observaron halos de 1.8 cm con glucosa, 1.18 con xilosa y 1.19 con sacarosa. El índice de solubilización obtenido a las 120 horas fue de 1.8 cm con glucosa, 1.18 cm con xilosa y 1.25 cm con sacarosa. A las 144 horas los índices de solubilización obtenidos fueron 1.7 cm con glucosa, 1.3 cm con xilosa y 1.2 con sacarosa.

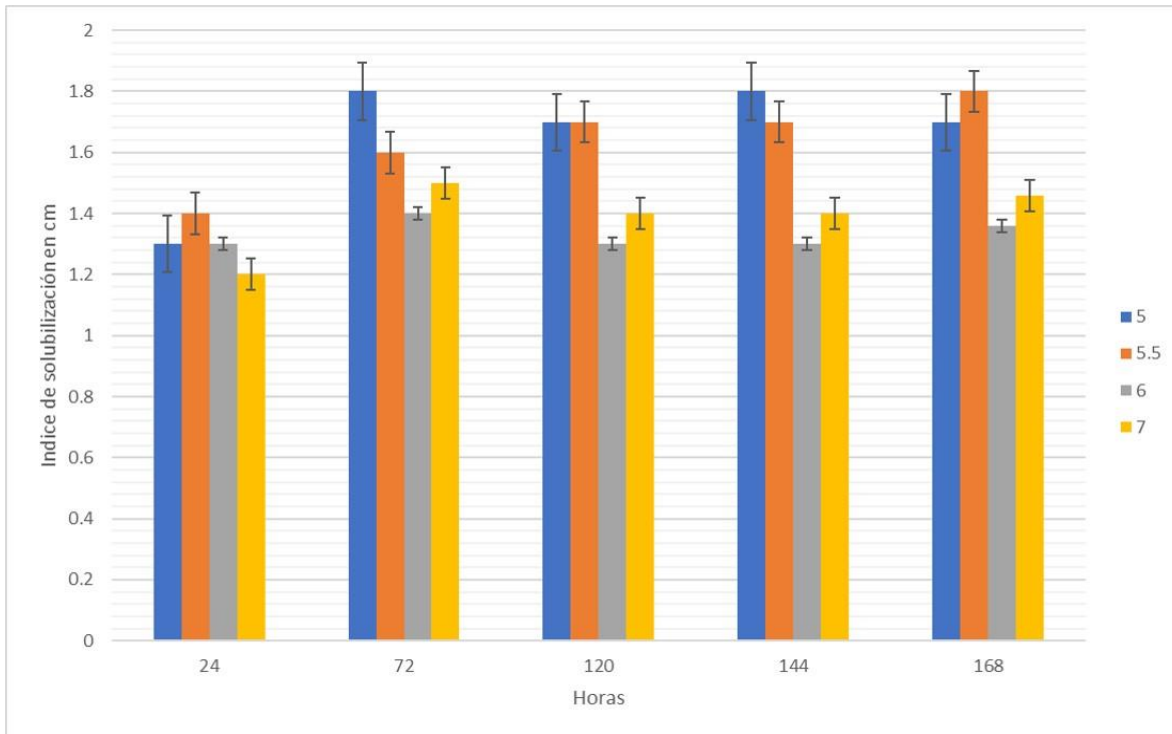
Estas diferencias en los índices de solubilización de fosfatos mencionadas anteriormente podrían deberse a la excreción de diferentes ácidos orgánicos sintetizados por *G. diazotrophicus* en presencia de diferentes fuentes de carbono.



**Figura 1.** Gráfica de los diferentes índices de solubilización obtenidos con las fuentes de carbono, glucosa 0.05 M, xilosa 0.06 M, sacarosa 0.029 M, fructosa 0.05 M, manitol 0.05 M, maltosa 0.027 M, lactosa 0.029 M en medio SRS. SEM  $\rho=0.005$ .

### 11.1.2 Solubilización de fosfatos en medio SRS sólido con diferentes pH

Para probar el efecto del pH en la solubilización de fosfatos se analizó un rango de pHs de 5, 5.5, 6 y 7 en el medio SRS sólido con glucosa (0.05 M) como fuente de carbono donde se observó en mejor resultado. En la figura 2 se muestran los índices de solubilización obtenidos bajo estas condiciones. A las 24 horas se obtuvieron índices de solubilización de 1.3 cm con pH 5 y 6, 1.4 cm con pH 5.5 y 1.2 con pH 7. A las 48 horas los índices de solubilización obtenidos fueron 1.6 cm con pH 5, 1.5 con pH 5.5, 1.3 con pH 6 y con pH 7. A las 72 horas los índices de solubilización fueron aumentando, 1.8 cm con pH 5, 1.6 con pH 5.5, 1.4 con pH 6 y 1.5 con pH 7. Estos índices de solubilización se mantuvieron hasta las 144 horas. En este ensayo el pH con el que obtuvimos los mejores índices de solubilización fue el de 5.5.

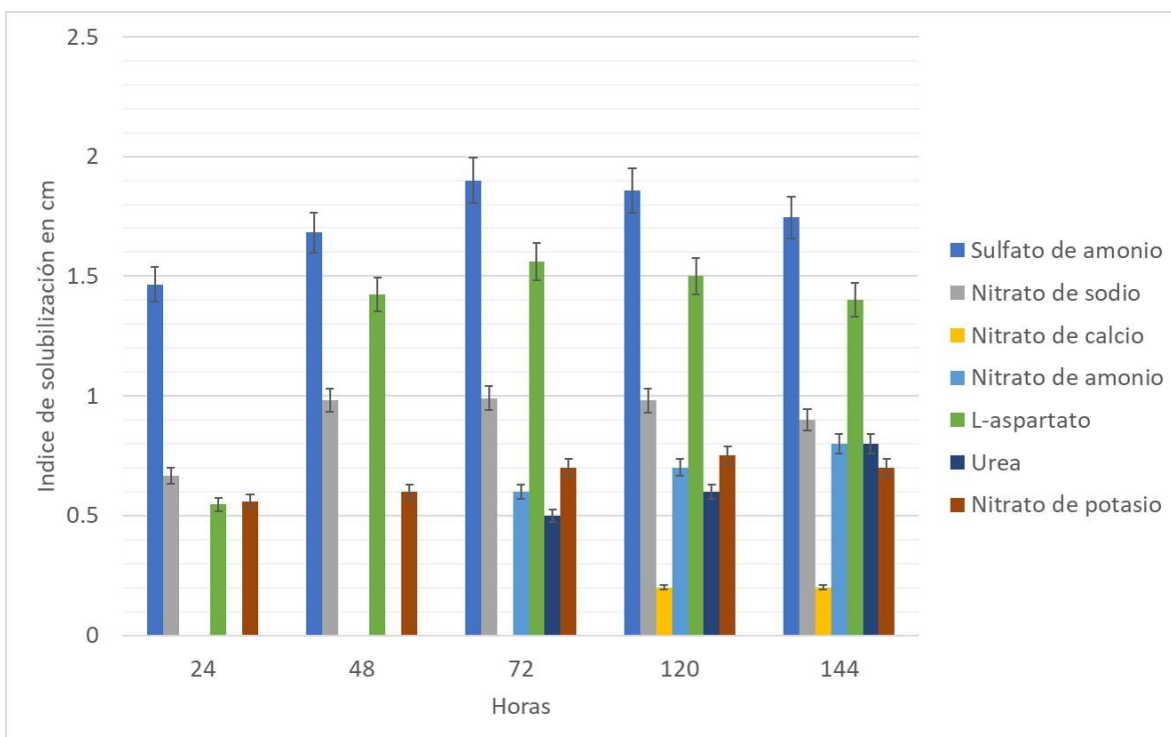


**Figura 2.** Gráfica de los diferentes índices de solubilización obtenidos con diferentes pH. Glucosa 0.05 M como fuente de carbono en placas de medio SRS. Los pH utilizados fueron 5, 5.5, 6 y 7. A las 24, 48, 72, 120 y 144 horas. SEM  $\rho=0.005$ .

### 11.1.3 Efecto de las diferentes fuentes de nitrógeno en la solubilización de fosfatos en la cepa *G. diazotrophicus* Pal5 en medio SRS sólido

El efecto de la solubilización de fosfatos con las diferentes fuentes de nitrógeno mencionadas anteriormente en material y métodos se observa en la figura 3, con glucosa 0.05 M, un pH de 5.5. En la gráfica se observa que el sulfato de amonio (0.0037 M) muestra un índice de solubilización de fosfatos de 1.4 cm a las 24 horas y un incremento en el diámetro de 1.9 cm a las 72 horas, con el L-aspartato se puede observar un índice de solubilización a las 24 horas de 0.5 cm con un incremento de 1.56 cm a las 72 horas, al utilizar nitrato de sodio se obtuvo un índice de solubilización de 0.6 cm a las 24 horas y de 0.99 cm a las 72 horas que ya no varió significativamente a lo largo del experimento. Con el nitrato de potasio los índices de solubilización obtenidos fueron de 0.5 cm a las 24 horas, 0.6 cm a las 48 horas, y a partir de las 72 horas hasta las 144 horas el índice de solubilización se mantuvo en 0.7cm. Se puede notar que usando las fuentes nitrogenadas:

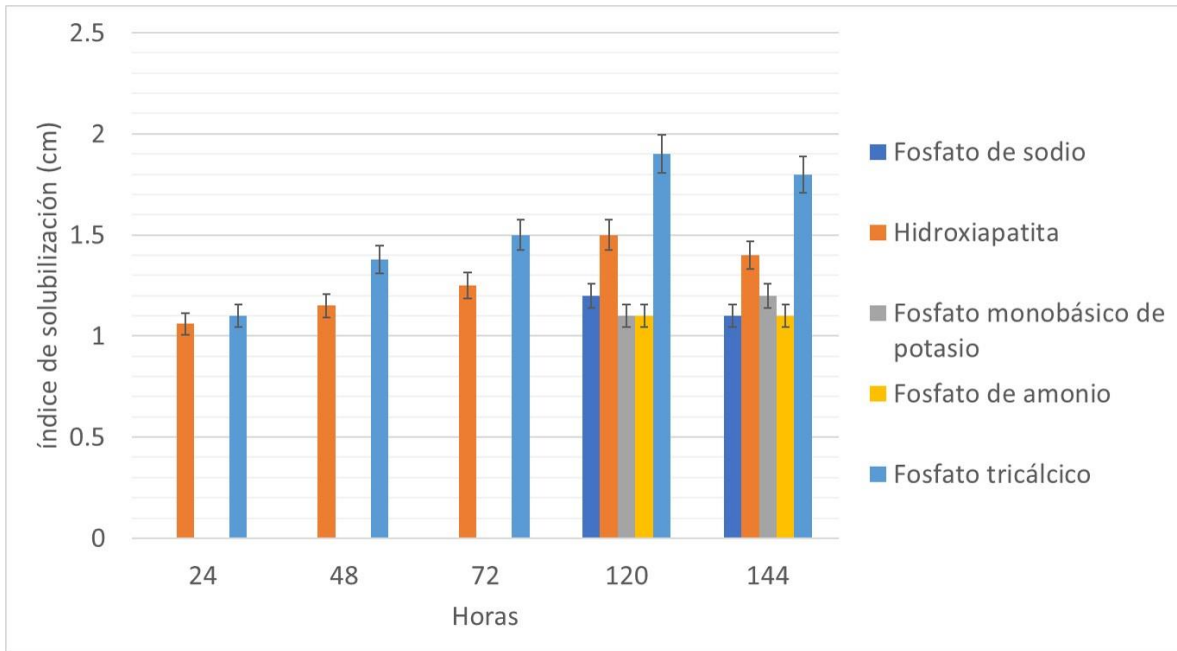
nitrate de calcio, nitrate de amonio y urea no se observó índice solubilización a las 24 horas, sin embargo, se puede observar que con el nitrate de calcio un índice de solubilización con 0.2 cm hasta las 120 horas, con nitrate de amonio y con urea fueron de 0.6 cm y de 0.5 cm a las 72 horas respectivamente, aumentando ambos casos a 0.8 cm al final del experimento (144 horas).



**Figura 3.** Gráfica de los índices de solubilización con diferentes fuentes de nitrógeno Sulfato de amonio (0.0037 M), nitrato de sodio (0.0058 M), nitrato de calcio (0.002 M), nitrato de amonio (0.006 M), L-aspartato (0.0037 M), urea (0.0083 M) y nitrato de potasio (0.0049 M) con glucosa (0.05 M) como fuente de carbono y a pH 5.5. SEM  $\rho=0.005$ .

#### **11.1.4 Análisis del efecto sobre la solubilización de fosfatos en medio SRS sólido con diferentes fuentes de fosfato**

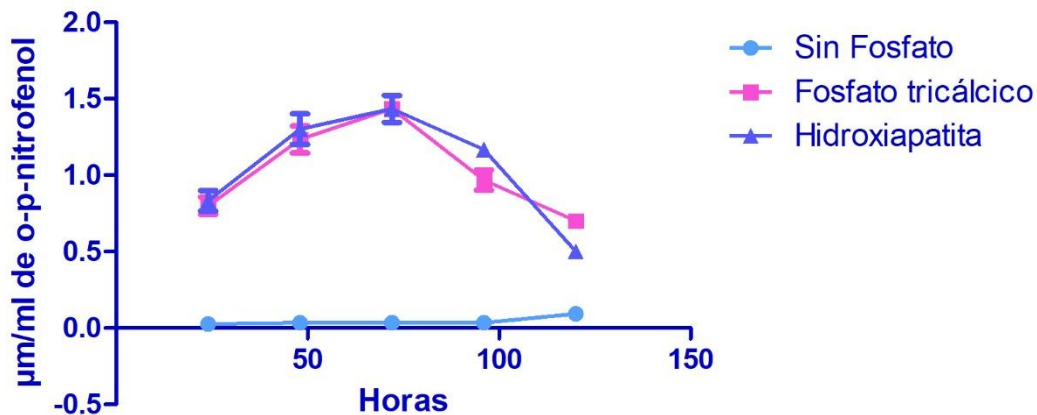
El ensayo se realizó con la fuente de carbono (glucosa 0.05 M) nitrógeno (sulfato de amonio 0.0037 M) y pH óptimo (5.5), para determinar la fuente de fosfatos óptima. En la figura 4 se observa que solo con hidroxiapatita y fosfato tricálcico se presentan halos de solubilización a partir de las 24 horas, la hidroxiapatita con un índice de solubilización de 1.06 y el fosfato tricálcico con 1.1 cm. A las 48 horas el índice de solubilización con hidroxiapatita fue de 1.15 cm y con fosfato tricálcico fue de 1.38 cm, y a las 72 horas con hidroxiapatita el índice siguió aumentó a 1.25 cm y el de fosfato tricálcico 1.5 cm. A las 96 horas que se observa solubilización con todas las fuentes de fosfato, siendo el fosfato tricálcico el que muestra un mayor índice de solubilización con 1.9 cm, seguido de hidroxiapatita con 1.5 cm, 1.2 cm con fosfato de sodio y los que mostraron un menor índice de solubilización a las 96 hora fueron fosfato de amonio y fosfato monobásico de potasio con 1.1 cm. A las 144 horas los índices de solubilización obtenidos fueron 1.1 cm con fosfato de sodio y fosfato de amonio, 1.2cm con fosfato monobásico de potasio, 1.4cm con hidroxiapatita y 1.8 cm con fosfato tricálcico. De las fuentes de fosfato utilizadas el fosfato tricálcico fue con la que se obtuvo una mejor solubilización de fosfatos, ya que la solubilización se comienza a ver a partir de las 24 horas y va aumentando, llegando a un máximo de solubilización a las 96 horas.



**Figura 4.** Gráfica de los índices de solubilización con diferentes fuentes de fosfato (fosfato de sodio 0.032 M, hidroxiapatita 0.0099 M, fosfato monobásico de potasio 0.036 M, fosfato de amonio 0.043 M, fosfato tricálcico 0.016 M), con glucosa (0.05M), pH 5.5 y sulfato de amonio (0.0037 M). SEM  $\rho=0.005$ .

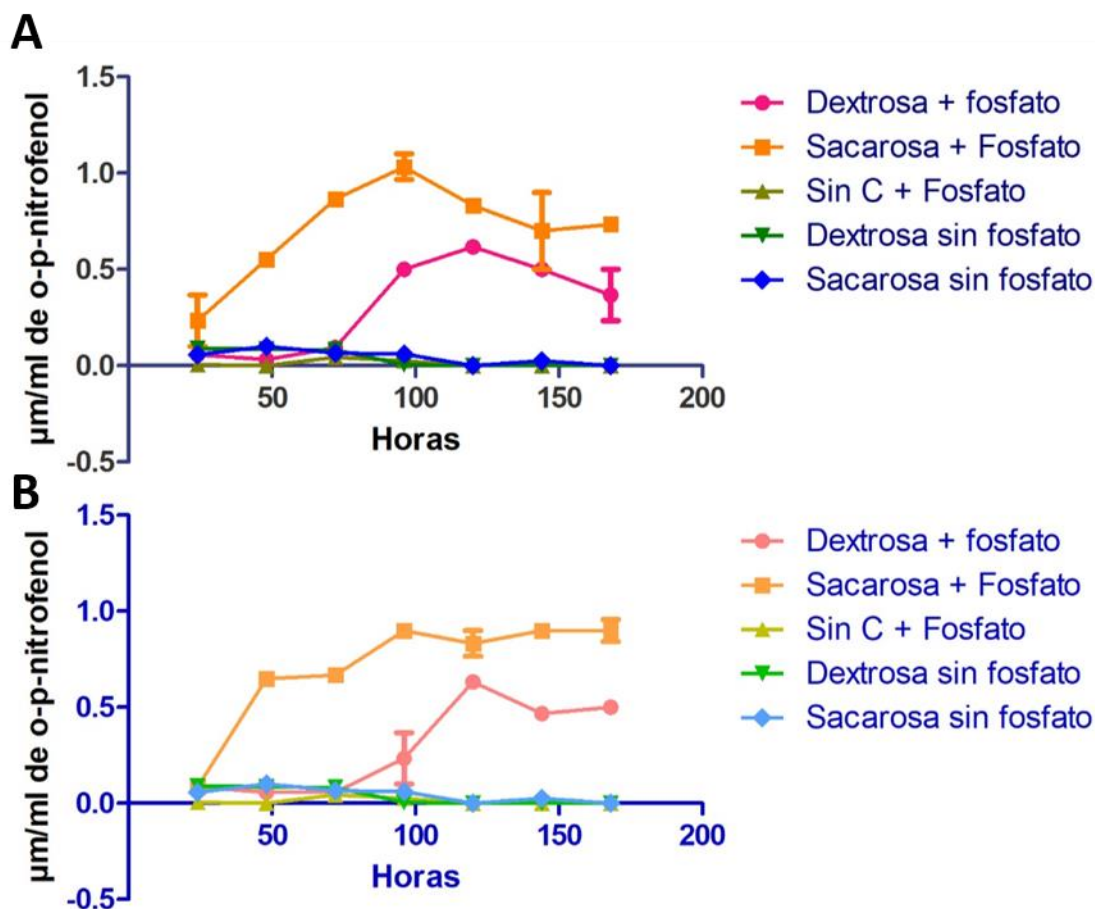
## 11.2 Determinación de la actividad enzimática de fosfatasa en sobrenadantes de *G. diazotrophicus* Pal5

Se determinó la actividad enzimática de fosfatasas en sobrenadantes de cultivos de *G. diazotrophicus* Pal5 mediante el ensayo del p-nitrofenilfosfato (Behera y cols., 2017) como se describe en el anexo 3. En la figura 5 se muestran los resultados obtenidos realizando el ensayo de la fosfatasa obtenida de sobrenadantes de cultivos crecidos con fosfato tricálcico (0.016 M) e hidroxiapatita (0.0099 M) a una temperatura de 30°C durante 144 horas por separado con fuente de fosfatos y sin ello. Con este ensayo pudimos confirmar que en el sobrenadante de los cultivos de *G. diazotrophicus* si había actividad de fosfatasa cuando se usaba fosfato tricálcico e hidroxiapatita.



**Figura 5.** Grafica que muestra la actividad de fosfatasa en tres diferentes condiciones (fosfato tricálcico, hidroxiapatita como fuente de fosfato y sin fuente de fosfato), utilizando como sustrato al p-nitrofenilfosfato. . SEM  $\rho=0.005$ .

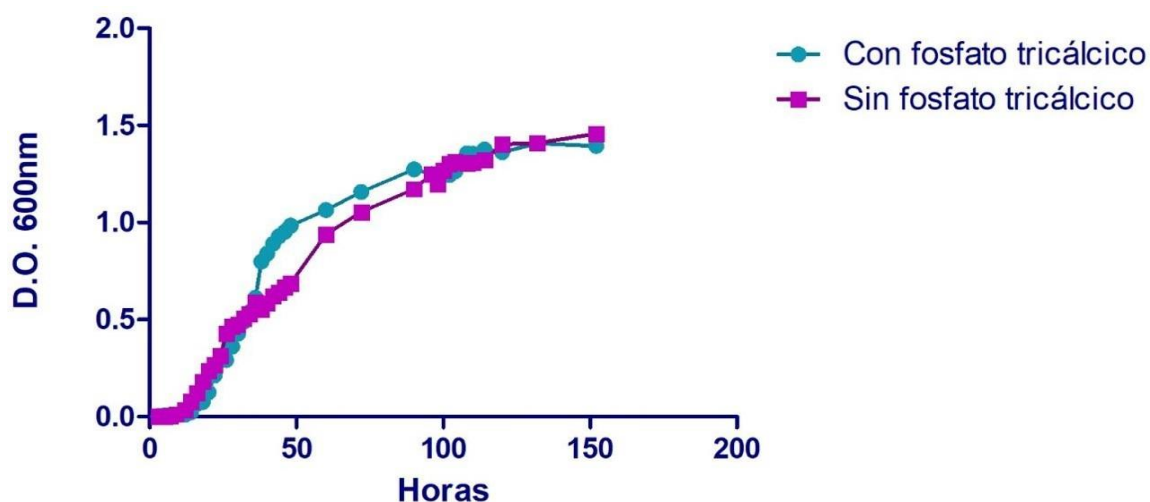
La actividad enzimática de la fosfatasa ácida y alcalina se muestra en la figura 6. En la figura 6A se muestra la actividad enzimática de la fosfatasa ácida y en la figura 6B la de fosfatasa alcalina, observándose una mayor cantidad de p-nitrofenolato cuando la fuente de carbono es la sacarosa, alcanzando 1.03  $\mu\text{m/ml}$  de p-nitrofenolato con fosfatasa ácida y 0.9  $\mu\text{m/ml}$  de p-nitrofenolato con fosfatasa alcalina a las 96 horas en ambos casos. Mientras que con glucosa al mismo tiempo de 96 horas se obtuvo 0.5  $\mu\text{m/ml}$  de p-nitrofenolato con fosfatasa ácida y 0.56  $\mu\text{m/ml}$  de p-nitrofenolato con fosfatasa alcalina.



**Figura 6.** Grafica que muestra las concentraciones de p-nitrofenolato obtenidas al realizar el ensayo de la fosfatasa en condiciones ácidas (buffer MUB pH 6.5) y alcalinas (buffer MUB pH11) A. Ensayo de la determinación de fosfatasa en condiciones ácidas con glucosa (0.05M) y sacarosa (0.029) como fuente de carbono. B. Ensayo de la determinación de fosfatasa en condición alcalina. . SEM  $\rho=0.005$ .

### 11.3 Curva de crecimiento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* con y sin fosfato.

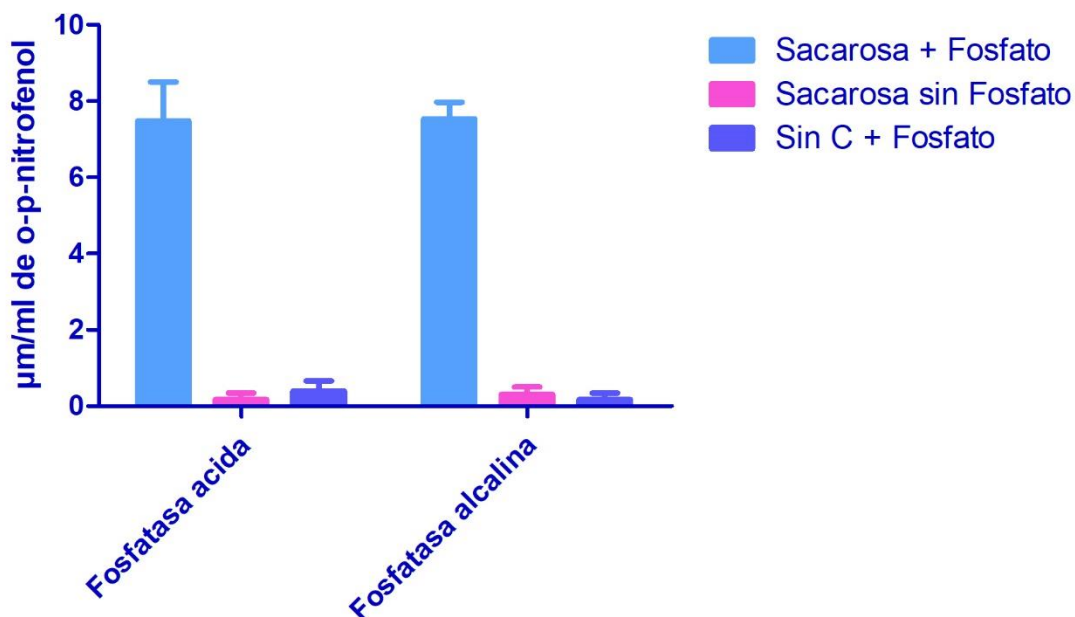
Para descartar la posibilidad de que al utilizar medio SRS sin fosfato estuviera afectando el crecimiento de *G. diazotrophicus* y por esta razón no se observará formación de p-nitrofenolato en los ensayos presentados en las figuras 5 y 6 en el medio sin fosfato; se realizó una curva de crecimiento en medio SRS con y sin fosfato, la cual se muestra en la figura 7 donde se puede observar un crecimiento similar bajo las dos condiciones de crecimiento descartando que la ausencia de fosfato altera la curva de crecimiento.



**Figura 7.** Curva de crecimiento de *G. diazotrophicus* en medio SRS con fosfato (azul) y sin fosfato (morado).

#### 11.4 Concentración del sobrenadante del cultivo de *G. diazotrophicus* en medio SRS

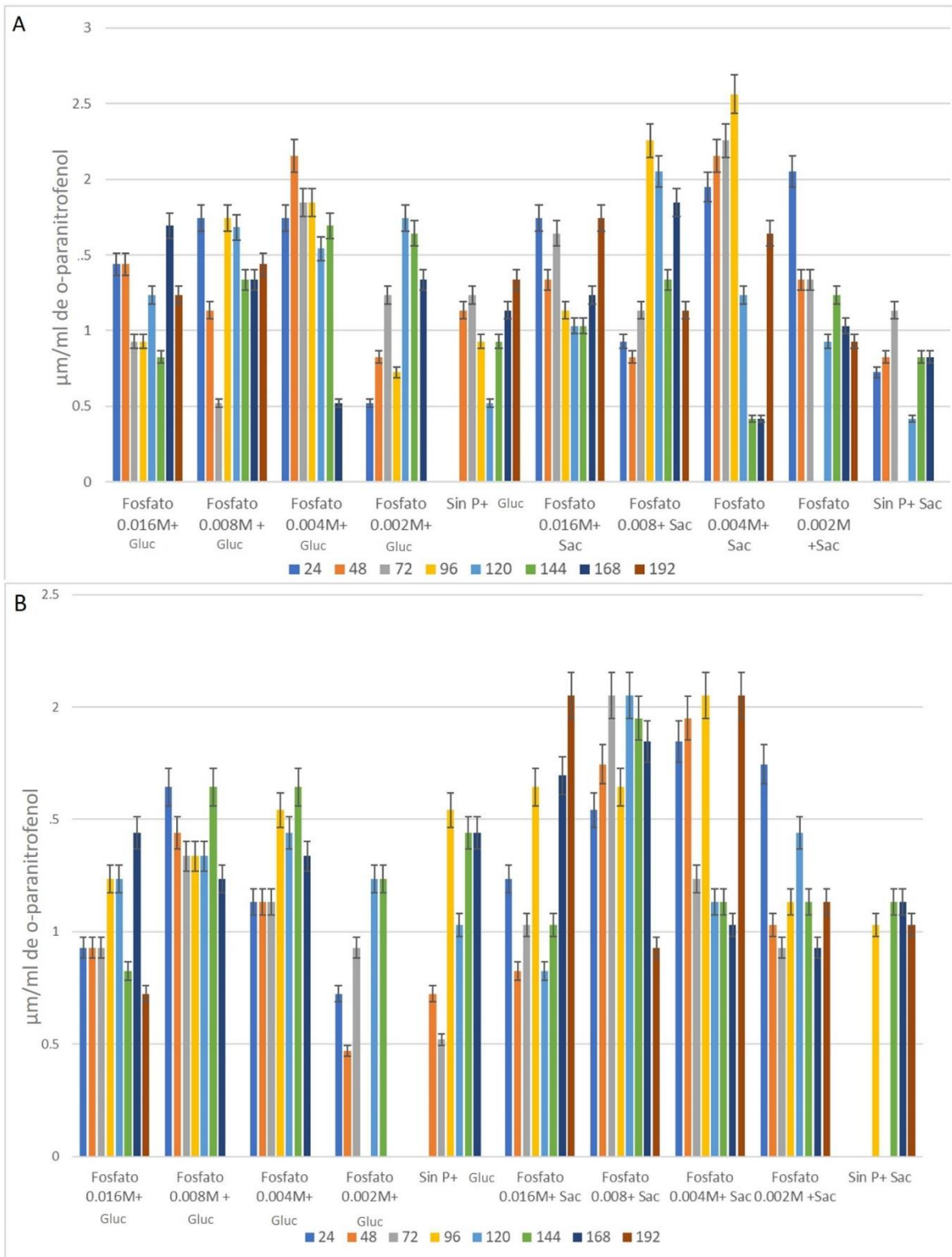
Para obtener una mayor actividad de fosfatasa con menor cantidad de sobrenadante se decidió concentrar el sobrenadante de un cultivo de 250 ml incubado durante 96 horas en un saco de diálisis con un límite de exclusión de 12,000 D, a un volumen final de 10 ml; de este concentrado que tenía 25  $\mu\text{g/ml}$  de proteína y se tomaron 100  $\mu\text{l}$  para realizar el ensayo de actividad de fosfatasa. El ensayo se realizó en tres condiciones que fueron el medio SRS con sacarosa y fosfato, el medio SRS con sacarosa sin fosfato y el medio SRS sin sacarosa con fosfato. Estas tres condiciones se usaron tanto para el ensayo con fosfatasa alcalina y con fosfatasa ácida. Los resultados se muestran en la Figura 8 donde se puede observar que la actividad de fosfatasa alcalina y ácida en la condición donde el medio SRS tenía sacarosa y fosfato fue de 7.48  $\mu\text{m/ml}$  para la fosfatasa ácida y 7.52  $\mu\text{m/ml}$  para la fosfatasa alcalina, mientras que en las otras dos condiciones como se esperaba, la actividad de fosfatasa fue mínima, con 0.17  $\mu\text{m/ml}$  con la fosfatasa ácida y 0.3  $\mu\text{m/ml}$  con el ensayo de sacarosa sin fosfato y finalmente al realizar el ensayo sin sacarosa con fosfato se obtuvo 0.4  $\mu\text{m/ml}$  con la fosfatasa ácida y 0.17  $\mu\text{m/ml}$  en la fosfatasa alcalina.



**Figura 8.** Ensayo de determinación de la actividad enzimática de las fosfatasa ácida y alcalina en sobrenadantes de cultivos crecidos en tres diferentes condiciones en el medio SRS. Con sacarosa y fosfato barras azul claro, medio SRS con sacarosa sin fosfato barras rosa y medio SRS sin sacarosa con fosfato barras azul rey. Las concentraciones utilizadas fueron sacarosa (0.029 M) como fuente de carbono, fosfato tricálcico (0.016 M), pH 5.5 y sulfato de amonio (0.0037 M). . SEM  $\rho=0.005$ .

### 11.5 Efecto de la concentración de fosfato tricálcico sobre la actividad de fosfatasa ácida y alcalina.

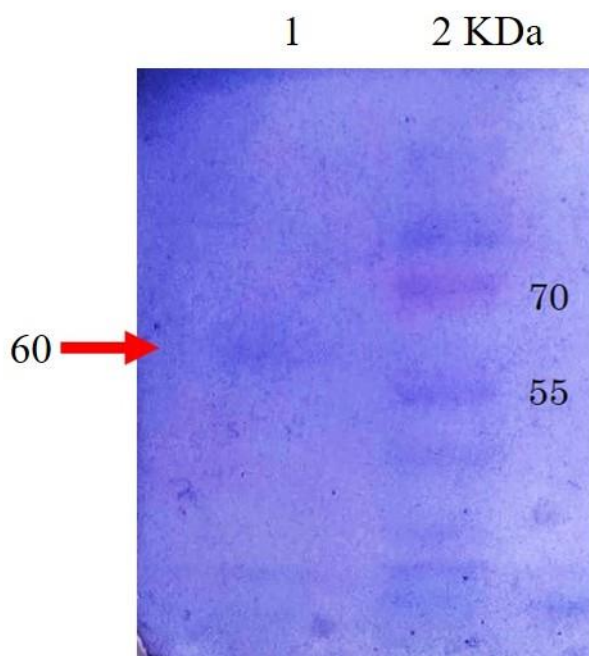
Se desconocía si la actividad de la fosfatasa está relacionada con la cantidad de fosfato presente en el medio por ello se planteó un ensayo con diferentes concentraciones de fosfato tricálcico (0.016 M, 0.008 M, 0.004 M, 0.002 M), con sacarosa (0.029 M) y glucosa (0.05 M) con sulfato de amonio (0.0037M) a pH 5.5. Se observó que con 0.004 M de fosfato tricálcico y sacarosa a las 96 horas las actividades de la fosfatasa ácida y alcalina fueron de 2.52  $\mu\text{m/ml}$  2.05  $\mu\text{m/ml}$  respectivamente. Sin embargo, cuando se utilizó la misma concentración de fosfato tricálcico, pero utilizando glucosa los resultados obtenidos fue una disminución en la actividad de fosfatasa ácida de 1.8  $\mu\text{m/ml}$  y de fosfatasa alcalina de 1.5  $\mu\text{m/ml}$  al mismo tiempo de estudio. Los resultados se muestran en la figura 9A y B.



**Figura 9.** Determinación de las actividades enzimáticas de la fosfatasa ácida (panel A) y alcalina (panel B) en sobrenadantes obtenidos de cultivos de *G. diazotrophicus* Pa15 crecidos con diferentes concentraciones de fosfato tricálcico con glucosa (0.05 M) y sacarosa (0.029 M) en ensayos independientes. . SEM  $\rho=0.005$ .

### 11.7 Análisis por gel de poliacrilamida en condiciones semidesnaturalizantes.

Una vez concentrado el sobrenadante (25 µg/ml) se corrió en un PAGE al 10% semidesnaturalizante (ver anexo 5) que puede preservar la actividad de la fosfatasa, para ello las muestras se prepararon en tampón Tris que contiene un 2% de SDS, pero sin adición de β-mercaptoetanol y sin calentamiento antes de la migración. En la figura 11 se muestra PAGE-SDS teñido con azul de Coomassie donde se observa la presencia de una banda de aproximadamente 60 kDa, sin embargo, es necesario obtener una mayor cantidad de proteína para poder obtener una banda más marcada en concentración.



**Figura 11.** PAGE-SDS semidesnaturalizante teñido con azul de Coomassie, del sobrenadante concentrado a las 96 horas. Carril 1: muestra del sobrenadante concentrado; carril 2: marcador de proteínas preteñidas Fermentas.

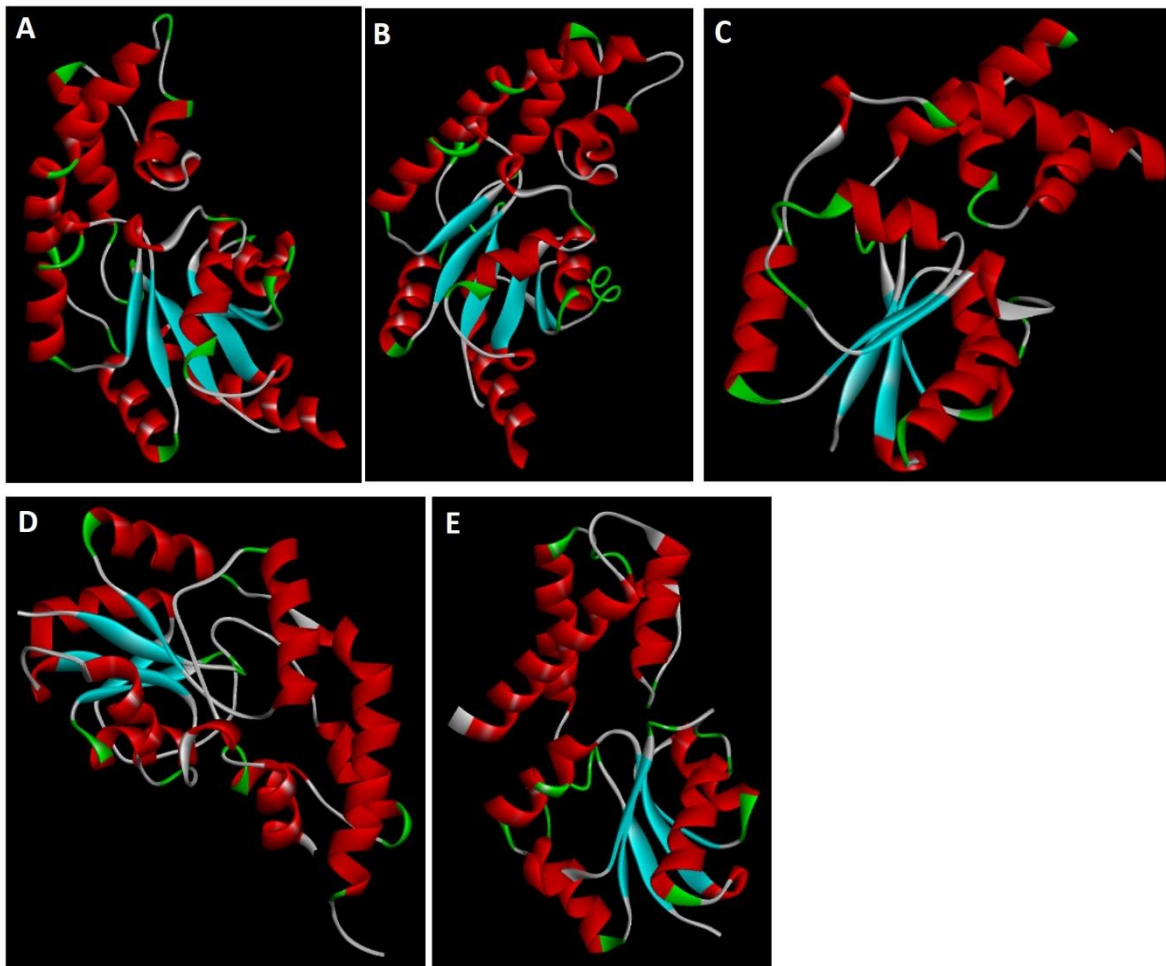
### **11.8 Análisis *in silico* de fosfatasa de bacterias acéticas.**

Se utilizó la base de datos de proteínas NCBI para buscar las secuencias de aminoácidos de las proteínas fosfatasa de bacterias acéticas y posteriormente compararlas con las secuencias de fosfatasa de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, para saber si alguna fosfatasa presente en *G. diazotrophicus* pudiera tener la función de fosfatasa ácida o alcalina por la homología entre las secuencias comparadas. El análisis de secuencias se realizó con las secuencias de fosfatasa ácida de ASL41554.1 de *Acetobacter oryzafermentans* y GAL96606.1 de *Acetobacter tropicalis*, y de *G. diazotrophicus* se utilizaron las secuencias WP012225717.1, WP012224345.1 y WP012553035.1. El análisis de estas secuencias al introducirse en el programa CDC (Conserved Domain Database) nos mostró que las fosfatasas pertenecían a la familia HAD (haloácido deshalogenasa). Se realizó un alineamiento el cual se muestra en la figura 12 en el cual se pueden observar los aminoácidos conservados; marcados con un punto amarillo son los aminoácidos hidrofóbicos conservados, y con un punto verde los aminoácidos alifáticos. En un recuadro rojo se muestra un motivo DxD que es altamente conservado en la familia de las fosfatasas HAD.

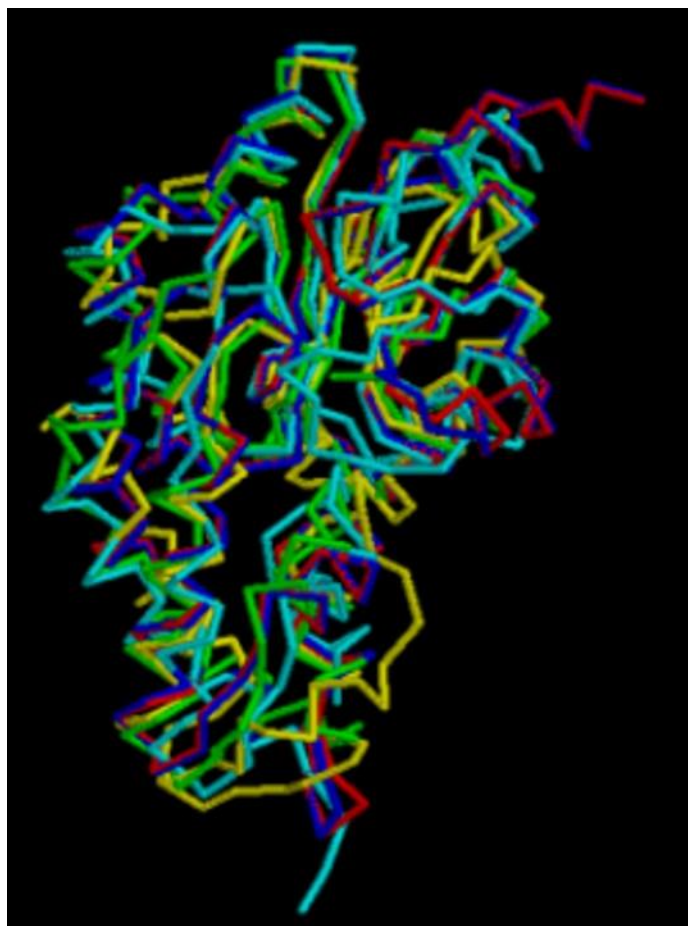


**Figura 12.** Alineamiento de las secuencias de fosfatasa ASL41554.1 de *Acetobacter oryzafermentans* y GAL96606.1 de *Acetobacter tropicalis*, y de *G. diazotrophicus* WP012225717.1, WP012224345.1 y WP012553035.1. Con un punto amarillo son los aminoácidos hidrofóbicos conservados (AFILV), con un punto verde los aminoácidos alifáticos conservados (ILV). En un recuadro rojo se muestra el motivo DxD altamente conservado.

Estas secuencias se introdujeron en el programa Phyre 2 que es un servidor de modelado por homología de estructuras de proteínas. Los modelos obtenidos se muestran en la figura 13, estos modelos fueron posteriormente introducidos en el programa MATRAS MArkovian TRAnSition, of protein Structure (Kawabata T., 2000, 2003). que permite empalmar diferentes modelos de proteínas para observar si sus estructuras son homólogas. El programa utilizado fue La superposición de los modelos obtenidos se muestran en la figura 14, y puede observarse que los modelos de las fosfatasa son similares en algunas regiones de la secuencia, por lo que es necesario realizar más estudios que nos pudieran indicar si estas fosfatasa pudieran ser ácidas o alcalinas.



**Figura 13.** Modelos de listón de las secuencias de fosfatasas. **A.** ASL41554.1 de *Acetobacter oryzafermentans* **B.** GAL96606.1 de *Acetobacter tropicalis* y de *G. diazotrophicus* **C.** WP012225717.1, **D.** WP012224345.1 y **E.** WP012553035.1.



**Figura 14.** Superposición de los modelos de las fosfatasas ASL41554.1 de *Acetobacter oryzafermentans* (azul), GAL96606.1, de *Acetobacter tropicalis* (rojo), de *G. diazotrophicus* WP012225717.1 (verde), WP012224345.1 (azul claro) y WP012553035.1 (amarillo)

## 12. Discusión

Los microorganismos edáficos han demostrado cumplir funciones que mantienen el equilibrio del suelo y ayudan el crecimiento vegetal mediante diversos mecanismos, entre ellos la solubilización de fosfatos, por el cual se logra liberar el ion fosfato accesible para la planta. Este elemento se encuentra limitado en el suelo y es un nutriente vital después del nitrógeno para el desarrollo de la planta (Corrales y cols., 2014).

Los microorganismos solubilizadores de fosfatos necesitan una fuente de carbono y energía tanto para la síntesis de nuevo material celular como para la oxidación de compuestos de carbono. Cuando los azúcares están disponibles en el medio, son absorbidos por la célula, pero su utilización depende de un sistema enzimático que es constitutivo en algunos organismos e inducible en otros (Nahas., 2003). En este trabajo se observó la solubilización de fosfatos con diferentes fuentes de carbono. Los ácidos orgánicos de bajo peso molecular provienen del metabolismo de compuestos de alto peso molecular, como carbohidratos, péptidos y lípidos. Estos ácidos orgánicos solubilizan fosfato resultado de la acidificación del espacio periplásmico, debida a la oxidación directa de la glucosa o de otra aldosa por acción de la quinoproteína glucosa deshidrogenasa (PQQGDH) (Paredes y cols., 2009). Los resultados que obtuvimos con las fuentes de carbono utilizadas podrían deberse a la forma en que son metabolizadas las fuentes de carbono. Por ejemplo, en *G. diazotrophicus* la glucosa deshidrogenasa dependiente de pirroloquinolina quinona (PQQ), perteneciente al grupo de las quinoproteínas, es la responsable de la conversión periplasmática de glucosa a gluconato. Esta glucosa deshidrogenasa junto con la gluconato deshidrogenasa de membrana (GaDH) constituyen la ruta de oxidación directa de la glucosa en GDI (Atwood y cols 1991). Por otro lado, GDI no cuenta con un sistema de transporte de sacarosa hacia el interior de la célula, para utilizar la sacarosa, GDI secreta una proteína con actividad de levansacarasa (sacarosa 6-fructosiltransferasa), la cual se expresa en forma constitutiva. Esta enzima hidroliza la sacarosa y transfiere el residuo fructosilo a otra sacarosa para formar fructanos intermediarios que luego se polimerizan (Molinari y cols., 2013). Esto podría explicar porque se observa solubilización de fosfato con glucosa a partir de las 24 horas y con sacarosa a partir de las 48 horas.

La acidez tiene un efecto directo en la actividad de los microorganismos del suelo que permite su participación en diversos procesos, como la descomposición de la materia orgánica, la mineralización, la inmovilización, la amonificación, la nitrificación, la volatilización, la fijación biológica del nitrógeno y la solubilización del fosfato inorgánico insoluble. Por lo tanto, la acidez desempeña un papel central en la agricultura (Marra y cols., 2015)

Al realizar los ensayos de solubilización en placa a diferentes pH se observó una mejor solubilización al utilizar pH 5 y 5.5 que al utilizar pH 6 y 7; el pH del medio de cultivo influye directamente en el crecimiento de los microorganismos y en los procesos bioquímicos que realizan. En muchos casos, la acidificación es el principal mecanismo que interviene en la solubilización de los fosfatos, además de promover una disminución del pH del medio, los ácidos orgánicos de bajo peso molecular también quelan los metales en solución, lo que aumenta el fósforo disponible para las plantas. El grado de quelación depende del tipo de ácido orgánico involucrado, el número y la proximidad de los grupos carboxilos, el tipo de metal y el pH de la solución (Marra y cols., 2015).

En GDI se han realizado ensayos mediante HPLC para observar cuáles ácidos orgánicos se producen durante el metabolismo de los azúcares y dentro de los ácidos producidos por GDI se encuentran: ácido glucónico, ácido ceto glucónico y ácido acético (Stephan y cols., 1991; da Silva y cols., 2009). Es por ello por lo que posiblemente observamos una mejor solubilización con pH ácidos debido a que GDI crece mejor en pH ácidos, además de que ya se ha demostrado que produce ácido glucónico.

Al realizar el ensayo de solubilización de fosfato con diferentes fuentes de nitrógeno, nuestros resultados muestran que hay un cambio en la solubilización de fosfatos con las diferentes fuentes de nitrógeno usadas, siendo el sulfato de amonio con la que se observó que desde las 24 horas hubo una mayor solubilización y se mantuvo así hasta las 144 horas. Esto debido a que la solubilización de fosfatos está relacionada con la excreción de protones ( $H^+$ ) que acompaña la respiración o la asimilación del  $NH_4^+$  (Mardad y cols., 2014). Se ha reportado que la diferencia en la solubilización de los fosfatos al utilizar diferentes fuentes de nitrógeno es debido al uso de diferentes mecanismos de generación de

acidez en el cultivo. Siendo el amonio la fuente de nitrógeno que mejores resultados ha dado (Kumari y cols., 2013).

En los ensayos donde se utilizaron diferentes fuentes de fosfato pudimos observar que el fosfato tricálcico y la hidroxiapatita mostraron halos de solubilización a partir de las 24 horas. Estos resultados coinciden con los presentados por Crespo y cols., 2011 y los reportados por Delaporte 2017, donde realizan ensayos con fosfato tricalcico e hidroxiapatita y GDI fue capaz de crecer en estas fuentes de fosfato y de solubilizar el fosfato tanto en medio liquido como en medio sólido.

Para los ensayos en los que se midió la actividad de fosfatasa en medio líquido se utilizó p-nitrofenilfosfato (p-NFF). El sustrato p-nitrofenilfosfato es hidrolizado por la fosfatasa presente en la muestra, produciendo fosfato y p-nitrofenol. El p-nitrofenol producido es amarillo, con un máximo de absorción a 405 nm. Al realizar los ensayos de actividad de fosfatasa observamos el efecto de las fuentes de carbono sacarosa y glucosa en el medio de cultivo al realizar la actividad de fosfatasa en los sobrenadantes, de manera diferente a los resultados obtenidos en los ensayos realizados en placa donde con glucosa se obtuvieron mayores índices de solubilización dado que ahí se veía el efecto producido por presencia de los ácidos orgánicos. En los ensayos de fosfatasa observamos que con sacarosa había una mayor actividad de fosfatasa tanto fosfatasa ácida como alcalina. Estos resultados podrían deberse a que la sacarosa constituye la principal fuente de carbono que la bacteria tiene disponible en su principal hábitat natural, el apoplasto de la caña de azúcar (Molinari y cols., 2013).

Estos ensayos en los que se midió la actividad de fosfatasa en el sobrenadante de GDI nos sirvieron para poner en evidencia que además de la producción de ácidos orgánicos producidos por GDI, las fosfatasas pudieran también participar en la solubilización de fosfato. Por esta razón y con el fin de tener una muestra más concentrada, el sobrenadante se concentró en un saco de diálisis. Las membranas de diálisis que se utilizaron fueron de 12,400 MWCO; la MWCO se refiere típicamente a la masa molecular promedio más pequeña de una molécula estándar que no difundirá a través de la membrana durante la diálisis. Se utilizó esta medida de membrana debido a que diversos autores han reportado

que el peso de las fosfatasa ácida y alcalina varía entre un rango de 30 a 66 kDa (Patel y cols., 2016; Mori y cols., 1999; Nalini y cols., 2017; Sharma y cols., 2018).

La actividad de las enzimas extracelulares también puede verse directamente afectada por factores como la temperatura, humedad, pH etc; principalmente la temperatura tiene un impacto fundamental en la actividad de los microorganismos, el metabolismo y las actividades enzimáticas (Sinsabaugh y col., 2008; Baldrian y col., 2012). Por ello se realizó un ensayo utilizando el concentrado del sobrenadante para observar el efecto de la temperatura en la actividad de las fosfatasa. Como resultado observamos que para la fosfatasa ácida y alcalina soportaron altas temperaturas siendo 50°C la temperatura más alta a la que aún se observó actividad de fosfatasa. Estos resultados son similares a los reportados por Kumari y cols donde observaron que la actividad de la fosfatasa ácida de los suelos aumentó con la temperatura de 20°C a 70°C y disminuyó constantemente con el aumento de la temperatura a 90°C (Kumari y cols., 2018). En otros estudios donde han investigado la temperatura óptima de la fosfatasa han encontrado que la temperatura óptima varía entre 30-47°C (Parhamfar y cols., 2016; Bhattacharjee y cols 2018; Sharma y cols., 2018), pudiendo sugerir que la fosfatasa presente en GDI es más estable a temperaturas más altas.

El P es un compuesto que limita el crecimiento en varios organismos cuando su disponibilidad es baja. La inducción de la actividad de la fosfatasa en respuesta a una baja concentración de P es un fenómeno común entre los organismos que adquieren P del medio ambiente (Dick y cols., 2011). Por ello se realizó el ensayo de la fosfatasa con diferentes concentraciones de fosfato, y lo que observamos fue que tal como se reporta en la literatura con concentraciones menores de fosfato obtuvimos una mayor actividad de fosfatasa tanto ácida como alcalina. En el caso de la fosfatasa ácida a las 96 horas con la concentración de 0.004 M de fosfato tricálcico. La actividad de fosfatasa obtenida con 0.004 M a las 96 horas fue 2.2 veces mayor que la que se obtuvo con una concentración de 0.016 M. Con la fosfatasa alcalina la actividad a las 96 horas con 0.004 M de fosfato tricálcico fue 1.2 veces mayor que la actividad obtenida con 0.016 M de fosfato tricálcico. Con estos resultados podemos decir que en GDI la síntesis de las fosfatasa fue reprimida en altas concentraciones de fosfato y desreprimida en las bajas concentraciones de fosfato.

El sobrenadante concentrado analizado en un gel de poliacrilamida en condiciones semidesnaturalizantes para preservar la actividad de la fosfatasa, mostró una banda de aproximadamente de 60 Kd. Para este ensayo es necesario obtener una mayor cantidad de proteína para confirmar tanto la presencia de la banda como el peso de la banda. El peso que se llega a apreciar de 60 kDa corresponde a lo reportado por otros autores que han purificado la fosfatasa y han obtenido tamaños entre un rango de 30 a 66 kDa (Patel y cols., 2016; Mori y cols., 1999; Nalini y cols., 2017; Sharma y cols., 2018).

En el genoma de GDI no se han encontrado genes de fosfatasas ácidas o alcalinas, sin embargo, se han encontrado diversas fosfatasas inespecíficas que se comparan con secuencias de genes que son de fosfatasas ácidas presentes en otros organismos; al revisar en el genoma de otras bacterias acéticas pudimos encontrar genes que codifican para estas enzimas. Al hacer el alineamiento varios aminoácidos se encontraban conservados como, por ejemplo, los aminoácidos hidrofóbicos (AFILV) y los aminoácidos alifáticos (ILV) además de que el motivo DxD también se encontró conservado. El motivo DxD es importante ya que se encuentra en el sitio activo y actúa como ácido-base protonando al grupo saliente del sustrato y desprotonando al nucleófilo (Borroughs y cols., 2006). De acuerdo con el resumen del alineamiento de las secuencias de fosfatasas ácidas los aminoácidos conservados fueron 44, el porcentaje de identidad fue de 17.7%. Al realizar la superposición de los modelos obtenidos se puede observar que las estructuras son similares. Los análisis bioinformáticos realizados con algunas secuencias de fosfatasas WP012225717.1, WP012224345.1 y WP012553035.1 presentes en el genoma de GDI con secuencias de fosfatasas ácidas ASL41554.1 de *Acetobacter oryzafermentans* y GAL96606.1 de *Acetobacter tropicalis* sugieren que podría ser alguna o varias enzimas que estuvieran participando en el proceso de solubilización de fosfatos.

### 13. Conclusiones.

---

- Las condiciones para un mayor índice de solubilización fueron sacarosa (0.029 M) como fuente de carbono, pH 5.5, sulfato de amonio (0.0037 M) como fuente de nitrógeno y fosfato tricálcico (0.016 M) fuente de fosfato en el medio SRS.
- Los extractos libres de células tienen actividad enzimática de fosfatasa ácida y alcalina.
- *G. diazotrophicus* contiene una(s) proteína(s) de 60kDa con probable actividad de fosfatasa.
- La fosfatasa ácida y alcalina presentes en los extractos libres de células concentrados muestran un óptimo de actividad a temperaturas de 50°C.
- Los alineamientos realizados con las fosfatasas de *Gluconacetobacter diazotrophicus* con las secuencias de las fosfatasas de las acetobacterias *Acetobacter oryzafermentans* y *Acetobacter tropicalis* sugieren que esta bacteria podría tener fosfatasas de la familia HAD.

## 14. Perspectivas

---

- Optimizar las condiciones para estabilizar la actividad de fosfatasa.
- Mandar a secuenciar la banda proteica obtenida.
- Purificar la o las fosfatasas presentes en los extractos solubles (sobrenadantes).
- Realizar ensayos con la fosfatasa purificada a diferentes pH, fuentes de fosfatos y diferentes temperaturas para caracterizar la fosfatasa obtenida.

## 15. Anexos

---

### Anexo 1: Buffers y medios de cultivo

#### Medio LGIE 1 L

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.02g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.6g
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	0.2g
CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O	0.02g
NaMoO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O	0.002g
FeCl <sub>3</sub> -6H <sub>2</sub> O	0.01g
Peptona de caseína	1g
Extracto de levadura	0.2g
Dextrosa	50g para medio líquido, 5g para placas.
Glicerol	1%

Ajustar 5.5. Esterilizar 10 Lb/ 30 min

#### Medio SRS 1L

(NH <sub>4</sub> ) <sup>2</sup> SO <sub>4</sub>	0.5g
KCl	0.2g
MgSO <sub>4</sub>	0.3g
MnSO <sub>4</sub>	0.004g
FeSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	0.002g
NaCl	0.2g
Sacarosa	10g
Extracto de levadura	0.5g
Púrpura de bromocresol	0.1g
Fosfato tricálcico	5g

Ajustar pH 6. Esterilizar 10 Lb 20 min

**Nota:** el púrpura de bromocresol solo se añade para medio sólido

**Buffer MUB 1L**

Tris 2.42g

Ácido maleico 2.3g

Ácido cítrico 2.8g

Ácido bórico 1.26g

Ajustar pH 6.5 con NaOH 10 M

**Buffer p-nitrofenil 1L**

Glicina 7.51 g

MgCl<sub>2</sub> 203 mg

ZnCl<sub>2</sub> 136 mg

Ajustar pH 10.4 con NaOH 19 M

**Buffer acetato 0.05M pH 5.6 1L**

Acetato de sodio 3.861 g

Ácido acético glacial 0.176 g

## **Anexo 2**

### **Determinación cuantitativa de la solubilización de P**

1. Realizar un precultivo de *Gluconacetobacter diazotrophicus* en medio LGIE, incubar a 30°C hasta obtener una D.O de 1.2.
2. Centrifugar 3ml del cultivo 10,000 rpm durante 5min y descartar el sobrenadante
3. Realizar 3 lavados al pellet con medio esteril LGIE, centrifugar 8,000 rpm durante 10 min.
4. Resuspender en medio LGIE hasta obtener una D.O a 600 de 0.2
5. Inocular 30µl de la suspensión anterior a un disco de papel filtro estéril de 0.5 mm de diámetro colocados en placas de medio SRS.
6. Incubar a 30°C y tomar medidas de la solubilización cada 24 horas.

## Anexo 3

### Ensayo de la fosfatasa

1. Realizar un precultivo de *Gluconacetobacter diazotrophicus* en medio LGIE, incubar a 30°C hasta obtener una D.O de 1.2.
2. Inocular a 15 ml de medio SRS líquido una dilución 1:100 del precultivo.
3. Incubar a 30°C 150rpm
4. Tomar 250 µl del cultivo y centrifugar 10,000 rpm.
5. Tomar 0.240 ml del sobrenadante y agregarle 0.630 ml de buffer MUB y 0.170 ml p-nitrofenilfosfato 0.025 mM
6. Incubar 1 hora a 37°C. Detener la reacción con hidróxido de sodio 3N
7. Centrifugar por 10 min a 10,000 rpm
8. Medir la cantidad de p-nitrofenolato formado a de 405 nm.

Nota: El p-nitrofenilfosfato se toma de un stock 0.025M el cual se prepara disolviendo el p-nitrofenilfosfato en el buffer p-nitrofenil (anexo 1). Una vez preparado almacenar a -20°C.

### Efecto de la temperatura en la actividad de fosfatasa (Modificado de Parhamfar y cols 2016)

1. Realizar un precultivo de *Gluconacetobacter diazotrophicus* en medio LGIE, incubar a 30°C hasta obtener una D.O de 1.2.
2. Inocular a 250 ml de medio SRS líquido con sacarosa una dilución 1:100 del precultivo.
3. Incubar a 30°C 150rpm durante 96 horas
4. Concentrar el sobrenadante en un saco de diálisis.
5. Tomar 100 µl del concentrado
6. Agregarle 0.730 ml de buffer MUB y 0.170 ml p-nitrofenilfosfato 0.025 mM y incubar 1 h a las diferentes temperaturas (20, 30, 40, 50, 70, 80 y 90°C)
7. Detener la reacción con hidróxido de sodio 3N
8. Centrifugar por 10 min a 10,000 rpm
9. Medir la cantidad de p-nitrofenolato formado a de 405 nm.

## Anexo 4 Curvas de calibración

### Curva de calibración de p-nitrofenol

A partir de un stock de 0.625Mm de p-nitrofenol fosfato se realizaron diluciones para obtener concentraciones finales de 0.39  $\mu$ M, 0.78  $\mu$ M, 1.5  $\mu$ M, 3.1  $\mu$ M y 6.25  $\mu$ M.

Mezclar

Buffer carbonato bicarbonato 20Mm pH10.5	Agua	pNF 0.625 mM	NaOH	Concentración final
0.5	0.3994 ml	0.0006 ml	0.1	0.39 $\mu$ M
0.5	0.3987 ml	0.00125 ml	0.1	0.78 $\mu$ M
0.5	0.3975 ml	0.0025 ml	0.1	1.5 $\mu$ M
0.5	0.395 ml	0.005 ml	0.1	3.1 $\mu$ M
0.5	0.390 ml	0.01 ml	0.1	6.25 $\mu$ M

Medir la absorbancia a 405 nm.

### Curva de calibración BSA con el reactivo de Bradford

A partir de un stock de 1mg/ml de BSA se realizaron diluciones para obtener concentraciones de 1.25, 2.5, 3.0, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0 y 20  $\mu$ g/ml.

Mezclar en un tubo 800  $\mu$ l de cada concentración de BSA, y 200  $\mu$ l del reactivo de Bradford.

Incubar por 5 minutos y medir la absorbancia a 595nm

## **Anexo 5 Electroforesis en gel de poliacrilamida**

### **Gel separador 10%**

H<sub>2</sub>O

Acrilamida al 30%

Tris 1.5 M pH 8.8

Persulfato de amonio al 10% (PSA)

Dodecil Sulfato de Sodio al 10% (SDS)

N,N,N,N-tetrametil etilendiamina (TEMED)

### **Gel concentrador**

H<sub>2</sub>O

Acrilamida al 30%

Tris 1.0 M pH 6.8

Persulfato de amonio al 10% (PSA)

Dodecil Sulfato de Sodio al 10% (SDS)

N,N,N,N-tetrametil etilendiamina (TEMED)

### **Buffer de cámara**

Tris 250 mM

Glicina 192 mM

### **Buffer de carga**

Tris HCl 1M pH 6.8      2.5 ml

SDS	2%
Glicerol	20%
Azul de bromofenol	0.005g
Agua cbp	10 ml

### **Tinción con azul de Coomassie**

#### **Material**

Solución de tinción azul brillante de Coomassie R-250 (0.125% de azul de Coomassie; 50% de metanol; 10% ácido acético).

#### **Método:**

- 1.-Sumergir el gel de poliacrilamida en una solución de tinción de azul de Coomassie por 30 minutos en agitación.
- 2.- Desteñir con 20% de ácido acético hasta que las bandas sean notorias.

## 16. Bibliografía.

---

Alori E, Glick B, Babaloba O. 2017. Microbial Phosphorus Solubilization and It's Potential for Use in Sustainable Agriculture. *Front. Microbiol.*, 8:971.

Attwood M, van Dijken J, Pronk J. 1991. Glucose metabolism and gluconic acid production by *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal Ferment Bioeng.* 72(2), 101–105.

Baldrian P, Snajdr J, Merhautova V, Dobiasova P, Cajthaml T, Valaskova V. 2012. Responses of the extracellular enzyme activities in hardwood forest to soil temperature and seasonality and the potential effects of climate change. *Soil Biol Biochem*, 56, 60-68.

Bhattacharjee M, Banerjee M, Mitra P, Ganguly A. 2018. Investigation of alkaline phosphatase enzyme of a novel *Bacillus* species isolated from rhizospheric soil of potato field. *Res. J. Life Sci. Bioinform. Pharm. Chem. Sci.* 4(2).

Beacham IR. 1979. Periplasmic enzymes in gram-negative bacteria. *Int J Biochem.* 10: 877-883.

Behera B, Yadab H, Singh S, Mishra R, Sethi B, Dutta S, Thatoi H. 2017. Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* sp. isolated from mangrove soil of Mahanadi river delta, Odisha, India. *J Genet Eng Biotechnol.* 15(1), 169–178.

Bertalan M, Albano R, de Pádua V, Rouws L, Rojas C, Hemerly A, Pádua V, Rouws L, Rojas C, Hemerly A, Teixeira K, Schwab S, Araujo J, Oliveira A, Franca L, Magalhaes V, Alquéres S, Cardoso A, Almeida W, Martins M, Nogueira E, Cidade D, Oliveira D, Simao T, Macedo J, Valadao A, Dreschel M, Freitas F, Vidal M, Guedes H, Rodrigues E, Meneses C, Brioso P, Pozzer L, Figueiredo D, Montano H, Junior J, Souza G, Quintana V, Ferreira B, Branco A, Gonzalez P, Guillobel H, Lemos M, Seibel L, Macedo J, Alves M, Sachetto G, Coelho A, Santos E, Amaral G, Neves A, Pacheco A, Carvalho L, Bisch P, Rössle S, Ürményi T, Rael A, Silva R, Rondinelli E, Küüger W, Martins O, Ivo J, Ferreira P. 2009. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. *BMC Genomics*, 10(1), 450.

Burroughs A, Allen K, Dunaway-Mariano D, Aravind L. 2006. Evolutionary Genomics of the HAD Superfamily: Understanding the Structural Adaptations and Catalytic Diversity in a Superfamily of Phosphoesterases and Allied Enzymes. *J. Mol. Biol.* 361(5), 1003–1034.

Cabugao K, Timm C, Carrell A, Childs J, Lu T, Pelletier D, Norby R. 2017. Root and Rhizosphere Bacterial Phosphatase Activity Varies with Tree Species and Soil Phosphorus Availability in Puerto Rico Tropical Forest. *Front. Plant. Sci.* 8,1-14.

8Cavalcante V, Döbereiner J. 1988. A new acid tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant soil* 108:23-31.

Cojho E, Reis V, Schenberg A, Döbereiner J. 1993. Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amyolytic yeast in nitrogen-free batch culture. *FEMS Microbiology Letters*, 106(3), 341–346.

Corrales L, Arévalo Z, Moreno V. 2014. Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *Nova*, 12(21), 67-79

Chawla N, Phour M, Suneja S, Sangwaan S, Goyal S. 2014. *Gluconacetobacter diazotrophicus*: An overview. *Res. Environ. Life Sci.* 7(1) 1-10.

Delaporte P, Grillo M, Lovaisa N, Rapisarda V, Pedraza R. 2016. Solubilization of different sources of insoluble phosphate by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Rev. Agron. Noreste Argent.* 36(1). 33-35.

Dick F, Dos-Santos A, Meyer-Fernandes R. 2011. Inorganic phosphate as an important regulator of phosphatases. *Enzyme Res.* 2011, 103980.

Eskin N, Vessey K, Tian L. 2014. Research progress and perspectives of nitrogen fixing bacterium, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, in Monocot Plants. *Int J Agron.* 1-13

Gandhi N, Chandra S. 2012. A comparative analysis of the three classes of bacterial non-specific acid phosphatases and archeal phosphoesterases: evolutionary perspective. *Acta Inform Med.* 20(3):167-173.

- George T, Giles C, Menezes-Blackburn D, Condron L, Gama-Rodrigues A, Jaisi D, ... Almeida D. 2017. Organic phosphorus in the terrestrial environment: a perspective on the state of the art and future priorities. *Plant Soil*, 427(1-2), 191–208.
- Kumari P, Prakash G. 2013. Effect of different carbon and nitrogen sources on solubilization of insoluble inorganic phosphate by psychrotolerant bacterial strains. *The bioscan*. 8(4): 1299-1302.
- Kumari J, Rao P, Padmaja G, Madhavi M. 2018. Effect of Temperature on Soil Enzyme Acid Phosphatase. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*. 7(9): 2830-2845.
- Luna M, Aprea J, Crespo J, Boiardi J. 2012. Colonization and yield promotion of tomato by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Appl Soil Ecol*, 61, 225–229.
- Mahesh M, Somashekhar R, Preenon B. 2015. Optimization for the Production of Extracellular Alkaline Phosphatase from *Proteus mirabilis*. *J Bioproc Biotech*. 5:3
- Maheshkumar K, Krishnaraj P, Alagawadi A. 1999. Mineral phosphates solubilizing activity of *Acetobacter diazotrophicus*: a bacterium associated with sugarcane. *Curr Sci* 76: 874–875.
- Mardad I, Serrano A, Soukri A. 2014. Effect of Carbon, Nitrogen Sources and Abiotic Stress on Phosphate Solubilization by Bacterial Strains Isolated from a Moroccan Rock Phosphate Deposit. *J Adv Chem Eng* 1: 102.
- Marra L, Oliveira-Longatti S, Soares C, Lima J, Olivares F, Moreira F. 2015. Initial pH of medium affects organic acids production but do not affect phosphate solubilization. *Braz J Microbiol*. 46(2), 367–375
- Mihalache B, Mihasan M, Zamfirache M, Stefan M, Raus L. 2016. Phosphate solubilizing bacteria from runner bean rhizosphere and their mechanism of action. *Rom Biotechnol Lett*. 23(4), 13853-13861.
- Molinari M, Bioardi J. 2013. Levans production by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Electron. J. Biotechnol*. 16(3).

- Mori S, Okamoto M, Nishibori M, Ichimura M. 1999. Purification and characterization of alkaline phosphatase from *Bacillus stearothermophilus*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29, 235–239
- Mullen D, Sylvia M, Hartel P, Fuhrmann J, Zuberer D. 2005. Phosphorus and other elements. Principles and applications of soil microbiology. New Jersey: Pearson Prentice Hall. p. 463-488.
- Muthukumarasamy R, Revathi G, Loganathan P. 2002. Effect of inorganic N on the population, in vitro colonization and morphology of *Acetobacter diazotrophicus* (*syn. Gluconacetobacter diazotrophicus*). *Plant soil.* 243: 91-102.
- Nahas E. 2013. Phosphate solubilizing microorganisms: Effect of carbon, nitrogen, and phosphorus sources. *Dev Plant Soil Sci.* 111-115.
- Nahas E. 2015. Control of Acid Phosphatases Expression from *Aspergillus niger* by Soil Characteristics. *Braz Arch Biol Tech.* 58(5), 658–666.
- Nalini P, Ellahia P, Prabhakar T, Girijasankar G. 2015. Microbial alkaline phosphatases in bioprocessing. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 4(3): 384-396.
- Nannipieri P, Giagnoni L, Landi L, Renella G. 2010. Role of Phosphatase Enzymes in Soil. *Phosphorus in Action*, 215–243.
- Patel N. 2016. Purification and characterization of alkaline phosphatase from a halotolerant facultative alkaliphile *Bacillus flexus* FPB17. *Int J Pharm Sci Res*, 2016; Vol. 7(6): 2641-2647.
- Paredes M, Espinoza D. 2009. Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fósforo: una revisión crítica. *Terra Latinoam.* 28(1), 61-70.
- Parhamfar M, Badoei A, Parhamfar M, Fahimi S. 2016. Purification and Characterization of an Extracellular Phosphatase Enzyme from *Bacillus spp.* *J Cell Mol Res.* 8(2), 90-97

- Piñón D, Casas M, Blanch M, Fontaniella B, Blanco Y, Vicente C, Legaz M. 2002. *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugar cane endosymbiont, produces a bacteriocin against *Xanthomonas albilineans*, a sugar cane pathogen. *Res Microbiol*, 153(6), 345–351.
- Premono M, Edi A, Moawad A, Vleck P. 1996. Effect of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere, *Indones.J. Crop Sci* 11:13-23.
- Rios Y, Sánchez M, Dibut B, Ortega M, Tejeda G, Rodríguez J, Rojas M. 2019. The culture medium effect in plant growth promotion activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in carrot and sugar beet. *Rev Bio*.6(470),1-14.
- Rodriguez H, Fraga R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion-a negative control of transcription mediated by cyclic AMP. *Biotechnol Adv*. 17(4-5), 319-339.
- Rodriguez H, Fraga R, Gonzalez T, Bashan Y. 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant Soil* 287:15–21
- Rossolini G, Schippa S, Riccio M, Berlutti F, Macaskie L, Thaller M. 1998. Bacterial nonspecific acid phosphatases: physiology, evolution and use as tools in microbial biotechnology. *Cell Mol Life Sci* 54:833–850.
- Saravanan V, Madhaiyan M, Osborne J, Thangaraju M, Sa T. 2007. Ecological Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and Nitrogen-fixing Acetobacteraceae Members: Their Possible Role in Plant Growth Promotion. *Microbial Ecol*, 55(1), 130–140.
- Sharma S, Sayyed R, Trivedi M, Gobi T. 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2:587.
- Sharma R, Thakur R, Kaur M. 2018. Purification and characterization of Alkaline Phosphatase from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from apple rhizosphere. *International J. Chem. Stud*. 6(6): 1156-1159.

- Shukla A. 2019. Ecology and Diversity of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Landscape. PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture, 1–15.
- Sinsabaugh R, Lauber C, Weintraub M, Ahmed B, Allison S, Crenshaw C, Gartner T. 2008. Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. *Ecol lett*, 11(11), 1252-1264.
- Stephan M, Oliveira M, Teixeira K, Martinez-Drets G, Döbereiner J. 1991. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiology Letters*, 77(1), 67–72.
- Tapia Y, García F. 2013. La disponibilidad del fósforo es un producto de la actividad bacteriana en el suelo en ecosistemas oligotróficos: una revisión crítica. *Tierra Latinoam*. 31(3), 231-242.
- Thaller M, Schippa S, Rossolini G. 1998. Conserved sequence motifs among bacterial, eukaryotic and archael phosphatases that define a new phosphohydrolase superfamily. *Protein Sci* 7:1647–1652
- Yadab B, Verma A. 2012. Phosphate Solubilization and Mobilization in Soil Through Microorganisms Under Arid Ecosystems. *The Functioning of Ecosystems SN*, 978-953.
- Yamada Y, Hoshino K, Ishikawa T. 1997. The Phylogeny of Acetic Acid Bacteria Based on the Partial Sequences of 16S Ribosomal RNA: The Elevation of the Subgenus *Gluconoacetobacter* to the Generic Level. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 61(8), 1244–1251.