



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**“Metabolitos de *Azotobacter* spp. con posible aplicación
biotecnológica”**

Tesis que para obtener el título de:

LICENCIADO EN BIÓLOGIA

PRESENTA:

María Fernanda Chávez Jacobo

DIRECTORA DE TESIS:

D.C Dalia Molina Romero

CO-DIRECTORA DE TESIS:

D.C. Liliana López Pliego

Puebla, Pue

Octubre 2021



AGRADECIMIENTOS

Gracias a mi familia por su cariño, apoyo y por creer en mí siempre. A mi mamá porque me has apoyado hasta en los momentos más complicados y porque gracias a ti me di cuenta de que quería estudiar esta carrera. A mi padre por ayudarme y escucharme aun cuando no sabias de que hablaba. A mis hermanas Gabriela y Claudia por ayudarme con mis clases y estar ahí para mí.

Quiero agradecer a mi asesora de tesis la doctora Dalia Molina Romero por darme la oportunidad de trabajar con usted, por sus enseñanzas y su ayuda. Usted me inspira a esforzarme más y me alegro de haberla conocido es una gran persona le agradezco de corazón por todo.

A la doctora Liliana López Pliego quiero agradecerle por ser mi co-asesora lamento no haberla podido conocer en persona, pero gracias por dedicar su tiempo para que yo pudiera realizar este trabajo.

A las doctoras Lorena Milflores Flores y Berenice Venegas Meneses por darme parte de su tiempo y revisar mi trabajo gracias por su apoyo.

A mis amigos de la facultad Ariadna, Lucia, Dulce, Fernanda, Lupita, Karina y a mis compañeros no me alcanzan las palabras para describir lo que siento les agradezco por hacer de estos 5 años algo maravilloso, por su cariño, apoyo y ayuda muchas gracias espero logren grandes cosas.

Dedicatoria

“A mis padres y hermanas por tenerme paciencia, ser mi soporte y hacer de todo para que yo pudiera llegar aquí, los quiero mucho”

INDICE

RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO <i>Azotobacter</i>	8
1.1.1 <i>Azotobacter chroococcum</i>	10
1.1.2 <i>Azotobacter salinestris</i>	10
1.1.3 <i>Azotobacter vinelandii</i>	11
1.2 HÁBITAT	11
1.3 ENQUISTAMIENTO	12
1.4 CARACTERÍSTICAS DEL GENOMA: POLIDIPLDIA	13
2. MARCO TEÓRICO	16
2.1 ANTECEDENTES	16
2.2 NITROGENASA	18
2.3 PHB	22
2.4 ALGINATOS	25
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. OBJETIVOS	29
4.1 OBJETIVO GENERAL	29
4.2 OBJETIVO PARTICULAR	29
5. MATERIAL Y MÉTODOS	30
6. RESULTADOS	31
6.1 PRODUCCIÓN DE INDOLES: ACIDO INDOL ACÉTICO	31
6.2 SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS	34
6.3 ALQUILRESORCINOLES	36
6.4 ÁCIDO CIANHIDRICO	38

6.5 PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO.....	39
6.6 BIOCONTROL A FITOPATÓGENOS	41
6.7 <i>Azotobacter</i> spp. DOCUMENTADA COMO PGPR	43
6.8 SIDERÓFOROS.....	45
6.9 1-AMINOCICLOPROPANO-1-CARBOXILATO (ACC) DESAMINASA	48
6.10 BIOPELÍCULA.....	50
6.11 EXOPOLISACÁRIDOS	52
6.12 MELANINA.....	54
6.13 PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES.....	56
6.14 PROTECCIÓN A LA PLANTA ANTE METALES PESADOS	58
6.15 BIODEGRADACIÓN (Biorremediación)	62
6.16 RESISTENCIA A ESTRES SALINO	65
7. DISCUSIÓN	67
8. CONCLUSIONES.....	80
9. PERSPECTIVAS.....	81
10. REFERENCIAS.....	82
ANEXOS	107

RESUMEN

Las rizobacterias del género *Azotobacter* se han estudiado ampliamente por su capacidad de realizar la fijación biológica de nitrógeno, producir polibeta-hidroxibutirato (PHB) y alginatos los cuales son aplicados en diversas áreas como la agricultura y en algunos procesos industriales. Estas rizobacterias además pueden producir una gran diversidad de otros metabolitos secundarios como sideróforos, 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa, ácido cianhídrico (HCN), exopolisacáridos (EPS), y biosurfactantes entre otros.

Debido al daño ambiental provocado por las diversas actividades antropogénicas se ha incursionado en el estudio de formas de remediar el daño en los ecosistemas de manera ecológica y eficaz, como el uso de bacterias tales como *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens* que a través de la biosíntesis de diversos compuestos llevan a cabo la biorremediación. Las especies de *Azotobacter* poseen una gran versatilidad metabólica y el potencial para realizar procesos de biorremediación de sitios contaminados por metales pesados y otros compuestos xenobióticos, perfilando a este género como una alternativa para el desarrollo de herramientas biotecnológicas.

El objetivo de este trabajo fue recopilar la información de los metabolitos secundarios producidos por *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter chroococcum* y *Azotobacter salinestris* con la capacidad de participar en los procesos de remediación y con el potencial para su aplicación biotecnológica, lo cual se realizó mediante el análisis y comparación de artículos científicos en los que se detallaba la actividad de estos compuestos. Con esto se logró compilar los trabajos y estructurar tablas en las que se evidencia la producción cualitativa o cuantitativa de EPS, biosurfactantes, sideróforos, alquilresorcinoles, HCN, ACC desaminasa, ácido indol acético (AIA) y la solubilización de fosfatos además de la producción de otros metabolitos como la, melanina, y la producción de hidrogeno (H₂), así como la biopelícula, donde se mostró las características fisicoquímicas de estos compuestos y su posible aplicación para llevar a cabo biorremediación, promoción del

crecimiento vegetal, protección contra fitopatógenos y la generación de energía renovable.

El análisis de la capacidad de *Azotobacter* para producir estos metabolitos secundarios fue en la mayoría de los casos similar o superior comparando a otros géneros productores, que han sido ampliamente utilizados en los procesos de biorremediación como son *Pseudomonas* y *Bacillus*. Se evidenció que la habilidad de *Azotobacter* para producir estos metabolitos, perfila a este género como una importante herramienta biotecnológica, y un modelo prometedor en los procesos de biorremediación de metales pesados y de otros xenobióticos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO *Azotobacter*

Este género fue descrito por primera vez en 1901 por Beijerinck (Mankar *et al.*, 2020). *Azotobacter* pertenece a la familia de la *Pseudomonadaceae/Azotobacteraceae* y a la clase Gammaproteobacteria (Das, 2019). Los miembros de este género son bacterias Gramnegativas, aeróbicas, heterotróficas de vida libre (Gauri *et al.*, 2009) no simbióticas, generalmente están presentes en suelos neutros o ligeramente alcalinos y abundantes en la rizosfera y la filósfera (Gauri *et al.*, 2009). Son de naturaleza mesofílica, pero pueden desarrollarse a una temperatura mínima de 0 °C y a una máxima de 40-45 °C y su pH óptimo es de entre 7 a 7.5 aunque puede desarrollarse entre 4.5 y 9 (Mankar *et al.*, 2020). Estos organismos suelen ser móviles y pleomórficos, las células jóvenes presentan una forma alargada y ovalada que pueden encontrarse solas, en pares o en cadenas de seis a ocho células (Page & Shivprasad, 1991) varía según el estado fisiológico y las condiciones de crecimiento (figura 1) (Noar & Bruno-Bárcena, 2018). Algunas especies como *A. chroococcum*, *A. vinelandii* y *A. salinestris* producen dos pigmentos de color que van desde amarillo a verde caracterizados como sideróforos y uno marrón o negro pardusco identificado como melanina (Das, 2019).

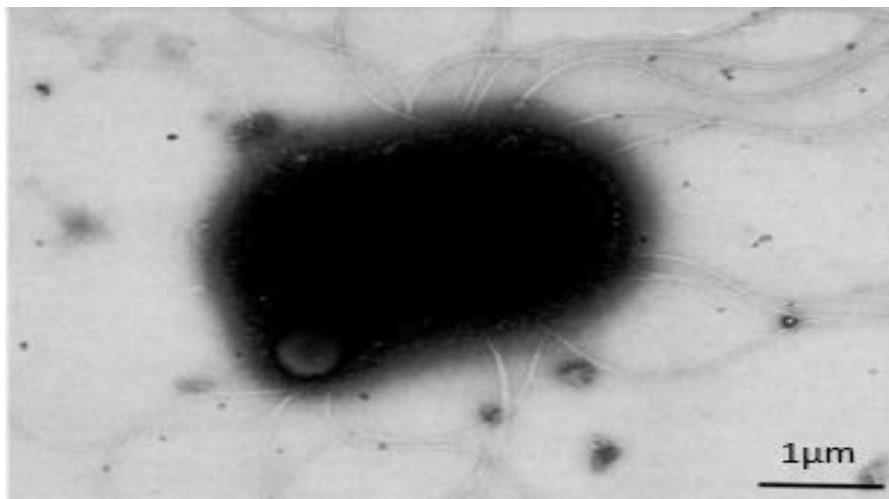


Figura 1. *Azotobacter salinestris* con tinción negativa (Page & Shivprasad, 1991)

El género comprende siete especies, estas se han integrado al género de acuerdo a la fecha de su aislamiento y caracterización: *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. beijerinckii*, *A. nigricans*, *A. paspali*, *A. armeniacus* y *A. salinestrus* (Mankar *et al.*, 2020).

Las especies de *Azotobacter* se caracterizan por ser benéficas con diversas especies de plantas, y se han incluido en el grupo de las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (por sus siglas en inglés PGPR). Este grupo bacteriano se caracteriza por promover el crecimiento de las plantas mediante la síntesis de fitohormonas, la fijación de nitrógeno (Noar & Bruno-Bárcena, 2018), la solubilización del fosfato, la mejora de la disposición de los nutrientes, la producción de sideróforos, antibióticos (Rubio *et al.*, 2013; Chennappa *et al.*, 2018), enzimas líticas y la degradación de las toxinas patógenas entre otros (Romero-Perdomo *et al.*, 2017; Surendirakumar *et al.*, 2019). Así mismo, la presencia de *Azotobacter* spp. ha demostrado ser útil como indicador de la salud del suelo y el medio ambiente (Mankar *et al.*, 2020). Más aun, las cepas de *Azotobacter* junto con hongos micorrízicos arbusculares actúan de manera sinérgica como promotores del crecimiento de una gran variedad de cultivos como la lechuga (*Lactuca sativa*) (Nadeau *et al.*, 2018), cebolla (*Allium cepa*), naga king (*Capsicum chinense*) (Surendirakumar *et al.*, 2019) y hierba desho (*Pennisetum pedicellatum*) (Chennappa *et al.*, 2018) ya que estas rizobacterias actúan como auxiliares en el desarrollo y función de las micorrizas (Kumar Bhuyan *et al.*, 2015).

Las especies del género *Azotobacter* son diazótroficas de vida libre (Nadeau *et al.*, 2018) en las especies *A. chroococcum* y *A. vinelandii* esta capacidad de fijar nitrógeno ha sido ampliamente estudiada debido a la facilidad de cultivarlas (Chennappa *et al.*, 2018). Los estudios en *Azotobacter* han ayudado a comprender la genética y bioquímica de la producción de gas hidrógeno (Xu *et al.*, 2017). *A. chroococcum* de hecho fue el primer microorganismo caracterizado como aeróbico no simbiótico capaz de fijar nitrógeno (Mankar *et al.*, 2020). *Azotobacter* fija nitrógeno en un ambiente microaerófilico y es capaz de adaptarse a condiciones

aeróbicas (Page & Shivprasad, 1995). Esta aeroadaptación puede ocurrir en ausencia de la actividad de la catalasa y la peroxidasa (Page & Shivprasad, 1991.)

También, se han generado una gran variedad de estudios sobre la producción de PHB por algunas cepas de *Azotobacter*, donde el PHB se produce en cantidades relativamente altas, cuando la bacteria es cultivada en sustratos baratos, este metabolito es de gran interés debido a su potencial para la creación de recipientes de plásticos biodegradables (Chennapa *et al.*, 2018). De igual manera el alginato ha sido muy estudiado por su papel en la formación de los quistes de *Azotobacter* y su interés biotecnológico (Galindo *et al.*, 2007). Estas bacterias también han sido modelos de estudio para la producción de sideróforos y su participación en la promoción del crecimiento vegetal (Chennapa *et al.*, 2018).

1.1.1 *Azotobacter chroococcum*

Esta fue la primera especie descrita del género *Azotobacter* por Beijerinck en 1901 (Mankar *et al.*, 2020). *A. chroococcum* es la especie más comúnmente aislada de este género y se encuentra en suelos de todo el mundo (Page & Shivprasad, 1991). Estas bacterias son de vida libre, diazótroficas y mejoran el crecimiento de las plantas mediante diversos mecanismos de promoción del crecimiento vegetal (Sharma *et al.*, 2020). Algunos de estos mecanismos son la producción de fitohormonas como auxinas y citoquinas, producción de sideróforos, su actividad amino-ciclo-propano carboxil desaminasa (ACC desaminasa) y la solubilización de fosfatos lo que le permite reemplazar parcialmente el uso de fertilizantes químicos en la agricultura (Van Oosten *et al.*, 2018). *A. chroococcum* presenta dos tipos de nitrogenasas para la fijación biológica de nitrógeno: la molibdeno nitrogenasa, que es la más convencional y una nitrogenasa alternativa con vanadio (Kumar Bhuyan *et al.*, 2015). Esta especie se desarrolla en ambientes con un pH máximo de 8.0, pasado ese rango presenta dificultades en su crecimiento (Chennappa *et al.*, 2018).

1.1.2 *Azotobacter salinestris*

Azotobacter salinestris secreta grandes cantidades de ácido indol acético (AIA), este metabolito altera mecanismos intrínsecos de la planta que promueven el crecimiento vegetal (Ahmed *et al.*, 2020). *A. salinestris* tienen una estrecha relación filogenética con *A. vinelandii* y *A. chroococcum*.

A. salinestris comparte numerosas características con *A. chroococcum*; sin embargo, éstas dependen del sodio (Na⁺) para crecer (Page & Shivprasad, 1991). Además, *A. salinestris* posee una actividad catalasa baja y una alta sensibilidad al peróxido de hidrogeno (H₂O₂) (Page & Shivprasad, 1995). Esta bacteria es capaz de sobrevivir hasta 45°C, pero su temperatura óptima para desarrollarse es de 35°C. A diferencia de *A. chroococcum* que es capaz de sobrevivir a un pH de 9.0 (Chennappa *et al.*, 2018).

1.1.3 *Azotobacter vinelandii*

A. vinelandii es una bacteria de vida libre (Setubal *et al.*, 2009), aerobio obligado usado como modelo del estudio para la capacidad de fijar nitrógeno de manera aeróbica, la fisiología microbiana, la respiración, producción y asimilación de hidrogeno entre otros (Noar & Bruno-Bárcena, 2018). Se encuentra en suelos de todo el mundo y se ha estudiado por más de 100 años en buena parte por su metabolismo de nitrógeno y su interés en la agricultura (Setubal *et al.*, 2009).

A. vinelandii es un modelo práctico para el estudio de la fijación de nitrógeno y las nitrogenasas (Noar & Bruno-Bárcena, 2018). Esta bacteria presenta la peculiaridad de poseer los tres tipos de nitrogenasas que presentan diferentes subunidades y cofactores metálicos que corresponden a la nitrogenasa de molibdeno, la nitrogenasa de vanadio y la nitrogenasa de hierro (Setubal *et al.*, 2009). Estas nitrogenasas pueden sustituirse entre ellas para permitir el crecimiento en ausencia de alguno de estos metales (Noar & Bruno-Bárcena, 2018).

1.2 HÁBITAT

Las especies del género *Azotobacter* pueden encontrarse en suelos neutros a alcalinos, en la rizosfera de las plantas y en cuerpos de agua dulce en todos los continentes independientemente del clima presente (Das, 2019). Las especies de este género se han encontrado en la rizosfera de varias plantas como el maíz, caña de azúcar, trigo, arroz, hortalizas entre otros (Gauri *et al.*, 2009; Rubio *et al.*, 2013; Mankar *et al.*, 2020). Las especies *A. chroococcum* y *A. vinelandii* son comunes en suelos tropicales y de manera general las especies de este género suelen encontrarse en suelos fértiles (Aasfar *et al.*, 2021).

1.3 ENQUISTAMIENTO

Las bacterias del género *Azotobacter* poseen la capacidad de entrar en una etapa de vida latente llamada quiste (Gawin *et al.*, 2020). Algunas especies de *Azotobacter* sufren alteraciones morfológicas en el proceso de enquistamiento (Herter *et al.*, 2011). La estructura depende de las condiciones del cultivo y la concentración de oxígeno ambiental (Gawin *et al.*, 2020).

Diversas condiciones ambientales como la desecación, calor, luz ultravioleta, déficit nutricional, o disponibilidad de iones metálicos inducen el proceso de formación de quistes (Herter *et al.*, 2011). El ion calcio (Ca) también actúa como un inductor del enquistamiento de las células (Pal Saha *et al.*, 2014).

En la forma de quiste las bacterias están encerradas en una cápsula compuesta por varios biopolímeros (Gawin *et al.*, 2020). Los quistes presentan una forma esférica compuesta por un cuerpo central y una cubierta constituida por dos capas la intina y la exina (figura 2) (Aasfar *et al.*, 2021). Los quistes se forman en medios libres de nitrógeno y presentan gránulos intracelulares de polibeta-hidroxibutirato (PHB), lípidos y polifosfato (Li *et al.*, 1991).

El enquistamiento es un proceso cíclico de diferenciación celular, en este surgen células modificadas que comprenden un cuerpo central con PHB rodeado por una pared y una membrana de tres capas (Herter *et al.*, 2011). Además del PHB el alginato también está implicado en la estructura del quiste y en el proceso de enquistamiento, este alginato forma una capa protectora (Noar & Bruno-Bárcena, 2018). Los alginatos que contienen bloques de ácido gulurónico son necesarios para la viabilidad de la célula, porque forman parte de la capa del quiste (Gawin *et al.*, 2020).

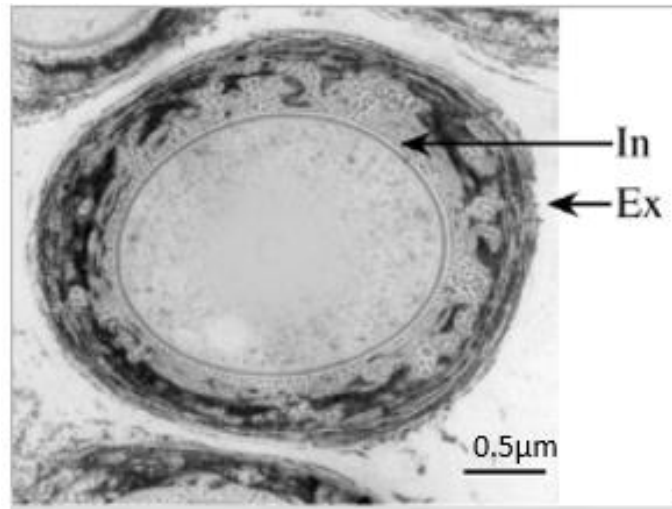


Figura 2. Micrografía electrónica de la formación de quiste en *A. vinelandii* se señalan la intina (in) y la exina (ex) (Funa *et al.*, 2006)

La capacidad de las bacterias de formar quistes les confiere resistencia a la luz ultravioleta, los ultrasonidos, la desecación, la irradiación gama y solar (Aasfar *et al.*, 2021). Los quistes producidos por las cepas de *Azotobacter* han sido estudiados ampliamente debido a su capacidad de tolerar la desecación (Martinez-Ortiz *et al.*, 2020) y además esta estructura les permite sobrevivir al menos 10 años en el suelo seco y por tanto podría funcionar como una manera de distribuir estas bacterias en el suelo con fines biotecnológicos (Noar & Bruno-Bárcena, 2018).

1.4 CARACTERÍSTICAS DEL GENOMA: POLIDIPLIIDIA

Hasta el momento están disponibles los genomas de cuatro especies del género *Azotobacter* en las bases de datos de la plataforma del del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés): el de *A. vinelandii*, *A. chroococcum*, *A. salinestris* y *A. beijerinckii*. De *A. vinelandii* se registró el ensamblaje del genoma completo de 3 cepas que son: *A. vinelandii* CA (NC_021149.1), *A. vinelandii* CA6 (NC_021150.1) y *A. vinelandii* DJ (NC_012560.1), para *A. vinelandii* DSM 279 (PRJEB17910) se ha publicado la mitad del genoma y una cuarta parte de *A. vinelandii* NBRC 13581 (PRJDB1080). El tamaño del genoma de las cepas de esta especie va desde 5.17 a 5.48 Mb y su GC% es de 65.64 en promedio.

Para *A. chroococcum* se anotaron 3 genomas completos: el de *A. chroococcum* B3 compuesto por un cromosoma (NZ_CP011835.1) y 3 plásmidos pacX50dB3a (NZ_CP011837.1), pacx50dB3b (NZ_CP011838.1) y pacX50fB3 (NZ_CP011836.1), el de *A. chroococcum* HR1 compuesto por un cromosoma (NZ_CP066310.1) y 4 plásmidos (NZ_CP066311.1, NZ_CP066312.1, NZ_CP066313.1, NZ_CP066314.1), y el de *A. chroococcum* NCIMB 8003 con un cromosoma (NZ_CP010415.1) y 6 plásmidos pAcX50a (NZ_CP010416.1), pAcX50b (NZ_CP010417.1), pAcX50c (NZ_CP010418.1), pAcX50d (NZ_CP010419.1), pAcX50e (NZ_CP010420.1) y pAcX50f (NZ_CP010421.1). También se tiene el registro de la mitad del genoma de las cepas ATCC 9043 (PRJNA523901), DSM 2286 (PRJNA520333), P207 (PRJNA523901), P204 (PRJNA523901) y P205 (PRJNA523901) y solo una cuarta parte del genoma de las cepas W5 (PRJNA610299) y P208 (PRJNA539873). El tamaño del genoma de estas cepas va de 4.62 a 5.19 Mb y su GC% es de 66.23.

En *A. beijerinckii* se ha registrado la mitad del genoma de las cepas DSM 378 (PRJEB16980), DSM 1041 (PRJEB16809), DSM 282 (PRJEB17088) y DSM 381 (PRJEB17433), y se tiene una cuarta parte de las cepas DSM 373 (PRJEB16790) y SZUA-532 (PRJNA385762). El tamaño del genoma anotado hasta el momento de estas cepas oscila de 4.91 a 5.08 Mb y su GC% es de 65.2%. Finalmente *A. salinestris* presenta un genoma de 5.29 Mb con un GC% de 65.59 y está conformado por un cromosoma (NZ_CP045302.1) y dos plásmidos: el plásmido (NZ_CP045303.1) y un segundo plásmido (NZ_CP045301.1).

El genoma de *A. chroococcum* NCIMB 8003 presenta 4628 genes de los cuales 3048 muestran 65% de identidad con los genes de *A. vinelandii*. A pesar de que en *Azotobacter* se tiene toda esta información sobre el genoma no se ha incursionado sobre el estudio de pan genoma y el Core genoma (Robson *et al.*, 2015).

A. vinelandii DJ tiene un cromosoma de 5365318 pb y no presenta plásmidos, el porcentaje de G+C es de 65,7% y su genoma presenta 5051 genes (Setubal *et al.*, 2009). El genoma de las especies del género *A. vinelandii* comprende múltiples copias de su cromosoma (Das, 2019). En un medio rico las células recién divididas

tienen una o pocas copias de su cromosoma, pero en la fase exponencial tardía presentan 10 a 50 copias o más (Noar & Bruno-Bárcena, 2018). Por otra parte, los genes *nifH*, *nifD* y *nifK* que codifican la proteína Fe o dinitrogenasa reductasa, la subunidad α de la proteína molibdeno-hierro (Mo-Fe) y la subunidad β de la proteína Mo-Fe respectivamente están presentes en aproximadamente 80 copias en el genoma durante la fase inicial de crecimiento estacionario (Das, 2019).

Algunos de los genes que codifican para proteínas potenciales muestran una mayor identidad con especies del género *Pseudomonas* (Robson *et al.*, 2015). De hecho *A. vinelandii* y *Pseudomonas stutzeri* A1501 el 46 y el 56% de sus genes codificadores de proteínas (Setubal *et al.*, 2009). Los genes de mantenimiento de *A. chroococcum*, *atpD*, *rpoB* y *trpB*, presentan el 80-98% de identidad con varias especies de *Pseudomonas* mientras que para el gen *infB* presenta una identidad del 75%. Esto nos muestra que *Azotobacter* comparte clado con las especies de *Pseudomonas* específicamente con *P. fluorescens* y *P. putida* que comparten el sesgo en el uso de codones, poseen un perfil de hidrofobicidad similar en los productos de los genes de mantenimiento (*atpD*, *rpoB*, *infB* y *trpB*) y número efectivo de codones (Nc) (Saha *et al.*, 2019).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES

La biorremediación es una tecnología que emplea organismos como las plantas, hongos y microorganismos con el fin de recuperar sitios contaminados. Uno de los procesos más comunes es la fitorremediación, la cual es el proceso de descontaminación que hace uso de plantas (Chibuike & Obiora, 2014). Diversos factores bióticos pueden afectar el desarrollo de las plantas y por ende provocar una reducción en la eficiencia de la fitorremediación al disminuir el crecimiento y la absorción de contaminantes. Los microorganismos rizosféricos ayudan a la planta a hacer frente a diversas fuentes de estrés que puedan afectar el proceso de fitorremediación (Manoj *et al.*, 2020).

Recientemente el conocimiento sobre las interacciones planta-microbios en suelos contaminados ha aumentado el interés en su posible uso en procesos de biorremediación. Por decir, en la biorremediación de sitios contaminados por metales pesados, la aplicación de microorganismos puede alterar la biodisponibilidad de los metales y su movilidad ayudando a la absorción de metales por las plantas (Jing *et al.*, 2007). Los microorganismos pueden ayudar de manera directa al proceso de fitorremediación a través de la translocación de metales y su disponibilidad en la rizosfera; también de manera indirecta, las bacterias les confieren a las plantas tolerancia ante la presencia de los metales y mejoran su crecimiento (Manoj *et al.*, 2020).

Algunos microorganismos a través de la producción de sideróforos, ácidos orgánicos, biosurfactantes y sustancias poliméricas extracelulares influyen en la absorción de los metales por las plantas, en la movilización y la biodisponibilidad de estos en el medio (Rajkumar *et al.*, 2012). Algunos microorganismos, además, por sí mismos tienen la capacidad de reducir, absorber, capturar y transformar los compuestos contaminantes (Manoj *et al.*, 2020). El uso de microorganismos capaces de tolerar y degradar contaminantes como los metales pesados representan una forma eficaz de biorremediación (Ojuederie & Babalola, 2017). Bacterias como *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida* y *Enterobacter cloacae* son

usadas para los procesos de biorremediación del cromo (Cr) para pasar de Cr (VI) a Cr (III) que es menos tóxico, siendo que estas estimulan la extracción de metales del suelo (Chibuike & Obiora, 2014). Adicionalmente se ha documentado la utilización de diversos microorganismos como *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Aspergillusniger*, *Pleurotusostreatus* y *Azotobacter* en los procesos de biorremediación de los cuerpos de agua y los suelos contaminados por metales pesados, hidrocarburos, entre otros (Gurikar *et al.*, 2016). Así mismo, estos podrían remplazar a los métodos convencionales de remediación, los cuales hacen uso de químicos que pueden tener efectos secundarios nocivos en el ambiente y en la salud de las personas.

Para su utilización en lugares altamente contaminados se han utilizado diversas estrategias: Dependiendo del sitio de origen; la utilización de microorganismos autóctonos y foráneos; y aquellos microorganismos modificados genéticamente. Dentro de los primeros, los microorganismos autóctonos no necesitan de seguimiento, mientras que los segundos si necesitan seguimiento para asegurar su crecimiento en el sitio de implantación(Ojuederie & Babalola, 2017). Por su parte, mediante la aplicación de la ingeniería genética es posible potenciar el metabolismo de biodegradación de los microorganismos y permitir su uso a largo plazo. De hecho, *Pseudomonas aeruginosa* (NRRLB-5472) y *Pseudomonas putida* (NRRLB-5473) son cepas modificadas genéticamente y patentadas que son usadas en procesos de biorremediación (Verma & Kuila 2019).

Algunos microorganismos como *Pseudomonas* pueden promover el crecimiento de las plantas a través de la producción de fitohormonas, solubilización de fosfato y la enzima amino-ciclopropano-carboxilato desaminasa (ACC desaminasa) lo cual le brinda a la planta resistencia al estrés ambiental (Rajkumar *et al.*, 2012).

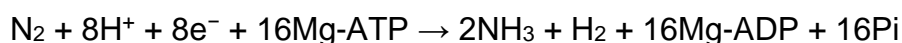
En un trabajo previo Sumbul y colaboradores (2020) destacan la importancia de la aplicación de *Azotobacter* como un potencial elemento en el desarrollo de un sistema agrícola sostenible ya que promueve el crecimiento de las plantas a través de varios mecanismos como la fijación de nitrógeno, la producción de hormonas del crecimiento como ácido indol acético y la liberación de sideróforos.

Asimismo, estas características ayudan a mantener la fertilidad del suelo, facilitan el acceso del hierro a las plantas, muestran actividades anti fitopatógenas y en general mitigan diversas fuentes de estrés permitiendo el desarrollo de las plantas. Además, *Azotobacter* es capaz de disimilar una gran variedad de sustratos por lo cual puede ser de utilidad en la biorremediación de sitios contaminados por petróleo, metales pesados, compuestos aromáticos, fenoles entre otros (Gurikar *et al.*, 2016). Estas características demuestran el papel de *Azotobacter* como un biofertilizante eficiente y un microorganismo biorremediador.

2.2 NITROGENASA

La nitrogenasa es una proteína constituida por dos complejos una dinitrogenasa enzimáticamente activa y una dinitrogenasa reductasa (DNR) (Sippel *et al.*, 2017). Esta enzima requiere de ATP y un entorno anaeróbico para mantener la actividad catalítica (Das, 2019). La dinitrogenasa reductasa es una sola unidad codificada por el gen *vnfH*, mientras que la dinitrogenasa está constituida por lo menos de dos subunidades (α y β) que forman un tetrámero (Noar & Bruno-Bárcena, 2018). Cada subunidad de la dinitrogenasa tiene un peso molecular promedio de 56 kDa mientras que las subunidades de dinitrogenasa reductasa tienen un peso molecular de 34kDa (Das, 2019).

La nitrogenasa se encuentra en el citoplasma, no asociada con la membrana celular y constituye aproximadamente el 10% de la proteína celular total cuando las células fijan nitrógeno (Noar & Bruno-Bárcena, 2018). Esta enzima es la responsable de catalizar la reducción del nitrógeno atmosférico (N_2) a amoníaco (NH_3) (Mankar *et al.*, 2020). La reacción es:



El proceso de fijación biológica de nitrógeno aumenta la disponibilidad de nitrógeno soluble en el suelo haciéndolo disponible para otros organismos como las plantas (Romero-Perdomo *et al.*, 2017). Mediante un proceso de transferencia de electrones el nitrógeno se convierte en una molécula de amoníaco (Mankar *et al.*, 2020). El proceso comienza con la transferencia de un electrón desde un portador de electrones hacia la dinitrogenasa reductasa. Posteriormente este electrón se

transfiere a la dinitrogenasa donde se une una molécula de nitrógeno (N_2). Esto se repite al menos siete veces dando como resultado la adición de seis electrones y protones a la molécula de N_2 y la reducción de dos protones a una molécula de H_2 (Noar & Bruno-Bárcena, 2018). La transferencia de electrones de la dinitrogenasa reductasa a la dinitrogenasa requiere de la mediación de Mg-ATP (figura 3) (Das, 2019).

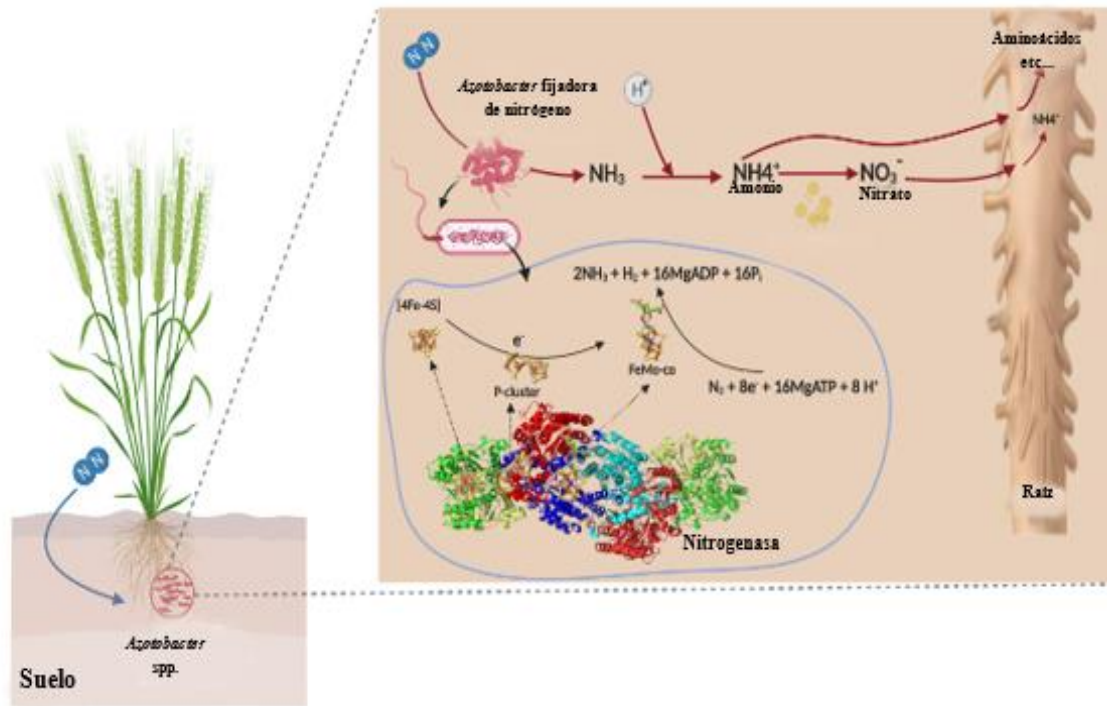


Figura 3. Proceso de fijación biológica de nitrógeno realizada por las nitrogenasas presentes en *Azotobacter* spp. (Modificado de Aasfar *et al.*, 2021).

La capacidad para fijar nitrógeno se presenta en diversas especies procariontas. Se han caracterizado diversos organismos diazótrofos principalmente en los filos taxonómicos: Actinobacteria, Cyanobacteria, Firmicutes y Proteobacteria (Dos santos *et al.*, 2012). Como el género *Pseudomonas* en el cual han encontrado diversas especies con la capacidad de fijar nitrógeno como *P. putida*, *P. fluorescens*, y *P. mendocina* entre otras (Karagoz *et al.*, 2012). En *Pseudomonas* la fijación de nitrógeno se da entre 0.46 a 9.28 $\mu\text{g/mL}$ N- NH_3 . El género *Azotobacter* también presenta la capacidad de fijar nitrógeno en un rango de entre 9.54 a 11.79 $\mu\text{g/mL}$

(Tabla 1) (Florez-Márquez *et al.*, 2017). *Azotobacter* en un año puede producir hasta 20 kg N₂/hectárea (ha) lo cual lo convierte en un valioso recurso (Mankar *et al.*, 2020).

Tabla 1. Capacidad de la fijación biológica del nitrógeno por las rizobacterias *Pseudomonas* y *Azotobacter*.

Rizobacteria	Fijación de nitrógeno (µg/mL) N-NH ₃	Referencia
<i>Pseudomonas</i>	0.46 - 9.28	Florez-Márquez <i>et al.</i> , 2017
<i>Azotobacter</i>	9.54 – 11.79	

Cuantificación de la fijación de nitrógeno según la metodología de Micro-kjeldhal (Kuss *et al.*, 2007)

Se han descrito tres tipos de nitrogenasas encontradas en *A. vinelandii*, la diferencia entre estas radica en los genes que las codifican y en sus metales constituyentes asociados con el cofactor Fe-S (Mankar *et al.*, 2020). Una contiene un átomo de molibdeno (Mo), otra con vanadio (V) y una tercera con hierro (Fe). Las nitrogenasas V y Fe en la dinitrogenasa reductasa presentan una subunidad δ (Noar & Bruno-Bárcena, 2018). La nitrogenasa molibdeno-hierro esta codificada por *nifHDK*, la vanadio-hierro por *vnfHGDK* y la de hierro por *anfHGDK* (Natzke *et al.*, 2018). Todas convierten el nitrógeno atmosférico en amoníaco, sin embargo, presentan una variación con respecto a las velocidades catalíticas y la especificidad del sustrato (Mankar *et al.*, 2020). Por ejemplo, la V-nitrogenasa tiene actividad catalítica más baja que la Mo-nitrogenasa a una temperatura ambiente, pero en temperaturas más bajas esta presenta una mayor actividad (Sippel *et al.*, 2017).

La presencia de Mo activa a la Mo-nitrogenasa, y reprime a las nitrogenasas V y Fe. Cuando Mo está ausente, la presencia de V reprime a la Fe nitrogenasa y activa la V-nitrogenasa, si ninguno de los metales está presente entonces el crecimiento depende de la Fe nitrogenasa (Noar & Bruno-Bárcena, 2018).

El ensamblaje y la regulación de la nitrogenasa dependiente de molibdeno se lleva por el producto de los genes *nifL* y *nifA* (Setubal *et al.*, 2009). El producto del gen

nifA activa la transcripción de los genes que codifican la proteína Mo-Fe, aumenta su expresión y por ende se incrementa la fijación de nitrógeno. Por otro lado, *nifL* codifica una flavoproteína que modula negativamente la expresión de los genes que codifican la nitrogenasa al modular la actividad del producto del gen *nifA* en respuesta a la presencia de oxígeno y nitrógeno combinados (Mankar *et al.*, 2020). Las bacterias diazótrofes pertenecientes al género *Azotobacter* promueven el crecimiento de diferentes cultivos bajo diferentes condiciones climáticas y tipos de suelo (Romero-Perdomo *et al.*, 2017). De hecho, la producción de amoníaco no se ve afectada por la presencia de diferentes concentraciones de metales pesados como cobre (Cu) y plomo (Pb) (Rizvi & Khan, 2018). Las nitrogenasas son capaces de reducir otros sustratos como el monóxido de carbono (CO) que se reduce a etileno y otros hidrocarburos. A pesar de ser capaz de reducir otros sustratos como el CO, óxido nitroso (N₂O) y en cierto punto el cianuro, estos compuestos inhiben la capacidad de las células para fijar nitrógeno (Noar & Bruno-Bárcena, 2018). Esto se debe a que estos compuestos como el CO compiten con el N₂ por el sitio activo de la nitrogenasa provocando una reducción en la producción de amonio (Natzke & Bruno-Bárcena 2020).

La nitrogenasa es lábil al oxígeno (O₂), por lo cual los organismos diazótrofes deben crear una condición microaeróbica o anaeróbica para poder llevar a cabo esta actividad bioquímica (Mankar *et al.*, 2020). *Azotobacter* es un organismo aeróbico capaz de llevar a cabo la fijación de nitrógeno debido a que presenta un sistema muy estructurado de protección para las nitrogenasas (Espin, 2001). *A. vinelandii* posee al menos tres mecanismos de protección de la nitrogenasa (Wu *et al.*, 2019). La protección conformacional es un mecanismo producido por el aumento de O₂ y desencadena la inactivación de la nitrogenasa, la protección la aporta una proteína conocida como FeSII o Shetna que se une no covalentemente a Fe y MoFe (Espin, 2001). Otro mecanismo es la protección respiratoria en el cual las células se adaptan a un ambiente con alta concentración de O₂ y como protección exhibe una alta actividad respiratoria (Wu *et al.*, 2019). El oxígeno en el interior de las células se consume rápido, dando como consecuencia una concentración intracelular de oxígeno baja, ideal para la actividad de la nitrogenasa (Das, 2019). Además, es

posible que *Azotobacter* emplee la melanogénesis para mejorar el uso de oxígeno y así mantener las condiciones microaerófilas necesarias para la fijación de nitrógeno (Banerjee *et al.*, 2014). Los grupos catecol de la melanina reducen el Fe y promueven la reacción de Fenton y la unión posterior del Fe a la melanina inhibe la reacción de tal manera que ejerce un papel protector ante la reacción de Fenton que podría impedir el proceso de aeroadaptación (Page & Shivprasad, 1995). La agregación celular también juega un papel en la protección de la nitrogenasa (Das, 2019) de forma similar que, en la autoprotección, si la concentración de la nitrogenasa es significativamente más alta que la concentración de O₂ celular, la nitrogenasa reductasa puede reducir O₂ a H₂O₂ reduciendo así el O₂ circundante (Espin, 2001). En las cepas de *Azotobacter* que producen alginato se lleva a cabo otro mecanismo de protección ya que este polisacárido también ayuda en la protección de las nitrogenasas al limitar la exposición de las células al oxígeno (Noar & Bruno-Bárcena, 2018).

La fijación biológica de nitrógeno ha adquirido importancia en la industria agrícola ya que el uso de microorganismos capaces de fijar nitrógeno a través de la acción de la nitrogenasa podría permitir reducir el uso de fertilizantes de nitrógeno químicos que pueden llegar a provocar daños en los ecosistemas (Romero-Perdomo *et al.*, 2017).

2.3 PHB

El polihidroxiбутирато (PHB) es un miembro de los polihidroxiálcanoatos (PHA) (Pal Saha *et al.*, 2014). El PHB es un polímero de almacenamiento útil en el proceso de enquistamiento (figura 4) (Noar & Bruno-Bárcena, 2018). El PHB se acumula como reserva interna de carbono y energía en condiciones de nutrientes limitantes usualmente en la fase exponencial tardía (Parshad *et al.*, 2001). La limitación de nutrientes como nitrógeno, el fósforo o el oxígeno provoca la acumulación de PHB en un entorno enriquecido con compuestos de carbono (Pal Saha *et al.*, 2014). La limitación de oxígeno induce la producción de PHB en *Azotobacter* pero cuando las condiciones de oxígeno dejan de ser limitantes las células reasimilan el PHB (Noar

& Bruno-Bárcena, 2018). En *A. salinestris* la formación de PHB se da durante el crecimiento exponencial y se ve limitada por la fijación de nitrógeno; sin embargo, la producción de este polímero se incrementa en condiciones de fijación de nitrógeno y si las bacterias pueden acceder a nitrógeno orgánico (Page *et al.*, 1997).

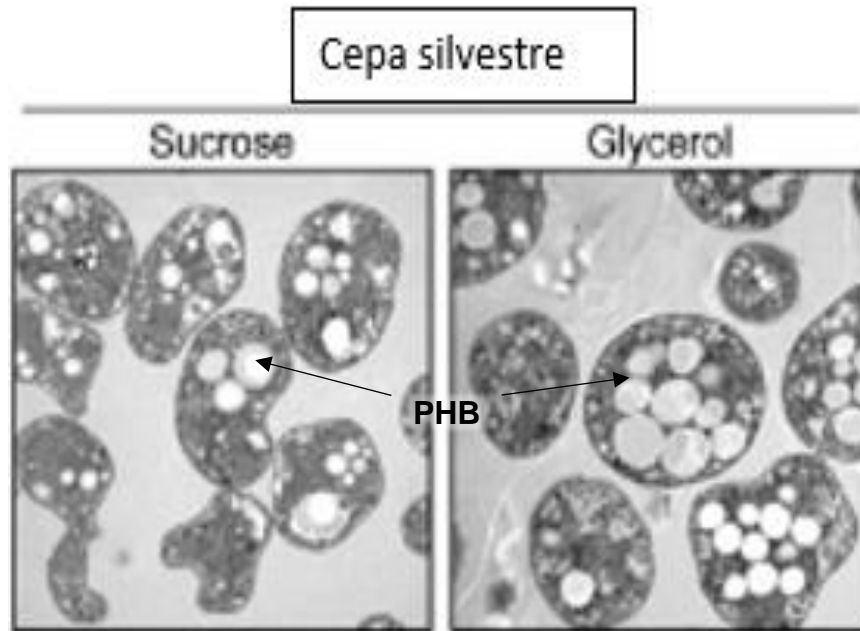


Figura 4. Producción de PHB en *Azotobacter vinelandii* en cultivo con sacarosa y glicerol (Yoneyama *et al.*, 2015).

El PHB como reserva puede proporcionar carbono para la síntesis y asimilación de nitrógeno (Parshad *et al.*, 2001). La depolimerización del metabolito podría ser aprovechada en condiciones diazótroficas bajo condiciones limitantes de nutrientes simples o complejos como en suelos con concentraciones altas de compuestos orgánicos, fosfatos insolubles y condiciones limitantes de oxígeno durante la fijación biológica de nitrógeno (Pal Saha *et al.*, 2014).

La producción de PHB alivia el estrés provocado por la limitación de oxígeno al actuar como un reservorio de electrones (Noar & Bruno-Bárcena, 2018). Además, a los organismos productores de PHB en altas cantidades, éste metabolito les confiere la resistencia al choque osmótico, temperatura, desecación y la tolerancia a compuestos tóxicos (Pal Saha *et al.*, 2014).

En *Azotobacter* la producción y degradación de PHB está regulada mediante la proteína PhbR que regula al operón productor de PHB (*phbBAC*), el factor sigma de la fase estacionaria y el sistema de dos componentes GacS/GacA, también el gen *arrFEI* que codifica un ARN regulador ArrF, que regulan este proceso (Noar & Bruno-Bárcena, 2018).

Algunos de los organismos que producen PHB con interés para la industria son *Alcaligenes eutrophus*, *Alcaligenes latus*, *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Azospirillum* spp., *Escherichia coli* y *Azotobacter* spp. (Parshad *et al.*, 2001). Estas bacterias utilizan los poliésteres, como el PHB, como una fuente de energía y carbono a través de la acción la enzima despolimerasa intracelular en condiciones de carbono limitadas (Pal Saha *et al.*, 2014). La producción de PHA en *Pseudomonas putida* KT2440 con uso de glucosa y sin suministro de oxígeno es de aproximadamente el 32% del peso seco celular (Davis *et al.*, 2015). En *Pseudomonas putida* KT2440 haciendo uso de glicerol la producción de PHA es de 1.6% el peso seco celular (Wang & Nomura, 2010). En *P. fluorescens* A2a5 cultivado en licor de caña de azúcar puede producir hasta 70% de PHB del peso seco celular (Jiang *et al.*, 2008). En *Azotobacter vinelandii* cultivada en glicerol exento de nitrógeno produjo PHB en un 33% del peso seco (Yoneyama *et al.*, 2015). *A. chroococcum* MAL-201 en un medio con exceso de glucosa exento de nitrógeno produce PHB aproximadamente al 75% del peso seco celular (tabla 2) (Pal *et al.*, 1997).

Tabla 2. Producción de polihidroxicanoatos por especies de *Azotobacter* y *Pseudomonas*.

Rizobacteria	PHA (% del peso seco celular)	Condiciones	Referencia
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	32	Glucosa sin suministro de oxígeno	Davis <i>et al.</i> , 2015
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	1.65	Glicerol	Wang & Nomura, 2010
<i>P. fluorescens</i> A2a5	70	Licor de caña de azúcar	Jiang <i>et al.</i> , 2008
<i>Azotobacter vinelandii</i>	33	Glicerol, exento de nitrógeno	Yoneyama <i>et al.</i> , 2015
<i>A. chroococcum</i> MAL-201	75	Glucosa, exento de nitrógeno	Pal <i>et al.</i> , 1997

La determinación de los polibeta-hidroxicanoatos: PHA se realizó mediante el análisis de cromatografía de gases.

El PHB es un polímero con potencial biotecnológico, algunas de las aplicaciones que tiene este compuesto son la producción de películas de embalaje, bolsas y envases biodegradables, como material para administración de fármacos, vendajes, remplazo de vasos sanguíneos entre otros (Parshad *et al.*, 2001).

2.4 ALGINATOS

El alginato es un copolímero lineal constituido de residuos de azúcar β -D-manurónico y ácido α -L-gulurónico unidos por un enlace β (1-4). Este es el polisacárido más abundante en las algas pardas; sin embargo, también puede ser producido por algunas bacterias (Gawin *et al.*, 2020). El alginato se sintetiza a partir de la isomerización de la fructosa-6-fosfato mediante actividad de la enzima fosfomanosa isomerasa (PMI-GMP-*algA*) a manosa-6-fosfato, este se convertirá en manosa-1-fosfato por la enzima fosfomanomutasa (PMM-*algC*), el siguiente paso es la conversión de la manosa-1-fosfato a GDP-manosa por la enzima fosfomanosa isomerasa (PMI-GMP-*algA*), posteriormente se genera una reacción para la formación del ácido GDP-manurónico por la oxidación de la enzima GDP-manosa deshidrogenasa (GMD-*algD*) siendo el sustrato directo y el punto crucial de control

cinético para la biosíntesis del alginato. La enzima glicosil-transferasa y c-di-GMP participan en la polimerización y transporte del ácido GDP-manurónico que es el sustrato que se polimeriza a nivel de membrana interna para formar ácido polimanurónico (Galindo *et al.*, 2007).

En último lugar el ácido polimanurónico sufre una serie de modificaciones post-polimerización por un complejo de acetilasas que comprende AlgI, AlgV, AlgF y los residuos de manuronato no acetilados se epimerizan a guluronato por una epimerasa de manuronato AlgG o ME y finalmente se exporta a través de la membrana externa por una proteína con actividad de canal iónico AlgE, el polímero exportado es convertido finalmente a alginato por una familia de siete epimerasas homologas AlgE1-7 (Gawin *et al.*, 2020).

Las especies bacterianas de la familia *Pseudomonadaceae* incluidos los géneros *Pseudomonas*, *Azomonas* y *Azotobacter* producen alginato (Noar & Bruno-Bárcena, 2018). En las especies de *Pseudomonas* como *P. fluorescens* la producción de alginato oscila entre 2.9 a 4.7 g de alginato/L de medio de cultivo, por otra parte, en *P. putida* produce aproximadamente entre 3 a 3.5 g/L de alginato (Conti *et al.*, 1994). En *A. vinelandii* la producción de alginato oscila entre 4.88 a 5.26 g de alginato/L (tabla 3) (Aasfar *et al.*, 2021).

Tabla 3. Producción de alginato por las rizobacterias *Pseudomonas* y *Azotobacter*.

Rizobacterias	Alginato (g/L)	Referencia
<i>P. fluorescens</i>	2.9 – 4.7	Conti <i>et al.</i> , 1994
<i>P. putida</i>	3 – 3.5	
<i>A. vinelandii</i>	4.88 – 5.26	Aasfar <i>et al.</i> , 2021

Determinación de alginato mediante el método de Kennedy y Bradshaw 1984.

Las células productoras de alginato extracelular forman una cápsula que rodea a la célula evitando la difusión de oxígeno al interior de esta (Wu *et al.*, 2019). El alginato producido por *A. vinelandii* es necesario para el proceso de enquistamiento. Esto les permite a las bacterias adaptarse a diferentes condiciones ambientales como la

deseccación (Noar & Bruno-Bárcena, 2018). Para hacer posible la adaptación metabólica el flujo de carbono se dirige al metabolismo respiratorio o a la síntesis de alginato (Wu *et al.*, 2019).

La tasa de producción y propiedades de los alginatos varía según el nivel de oxígeno del entorno implicando una función de protección ante el exceso de oxígeno (Noar & Bruno-Bárcena, 2018). Las propiedades fisicoquímicas del alginato dependen de la cantidad y distribución de los residuos del ácido (1,4)- β -D-manurónico y del ácido α -L-gulurónico (Gawin *et al.*, 2020).

Los alginatos son compuestos de interés industrial debido a su uso como agentes estabilizantes, gelificantes o espesantes útiles para diversos procesos de la industria farmacéutica, alimentaria, cosmética entre otras (Wu *et al.*, 2019). Sin embargo, los alginatos destinados a la aplicación farmacéutica necesitan de un contenido de más del 50% de (1,4)- β -D-manurónico. Debido a esto el desarrollo y uso de materiales en estas industrias se ha visto limitado. No obstante, la epimerización *in vitro* podría aumentar el contenido de (1,4)- β -D-manurónico mediante las manuronano C-5 epimerasas que producen algunas especies de *Azotobacter* (figura 5) (Gawin *et al.*, 2020).

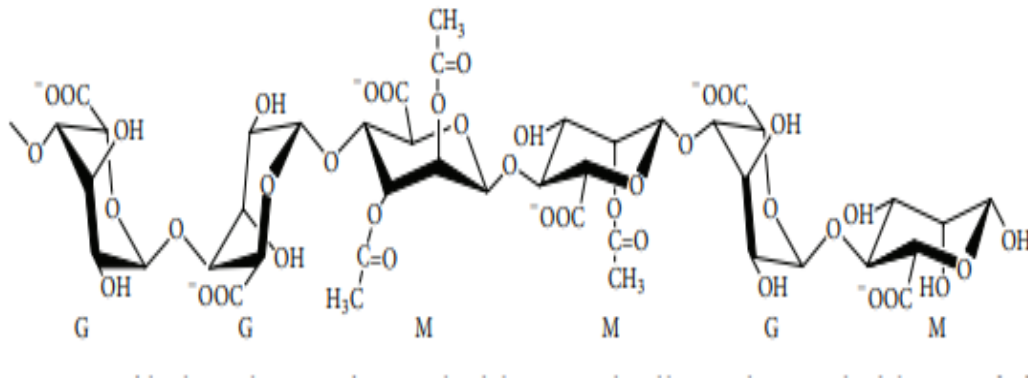


Figura 5. Estructura química de los alginatos producidos por *Azotobacter vinelandii* se representan los residuos del ácido gulurónico (G) y el ácido manurónico (M) (Pacheco-Leyva *et al.*, 2016)

3. JUSTIFICACIÓN

La actividad antropogénica ejerce un impacto negativo al medio ambiente que afecta al aire, el agua y el suelo. La contaminación producida por las diversas actividades como la minería, la fundición, la industria petrolera y los desechos domésticos, entre otros han generado una gran presión ambiental y mayor concentración de metales pesados que afecta seriamente a los ecosistemas; además, puede tener un serio impacto en la industria agrícola y la salud humana afectando diversos órganos como son los pulmones, células sanguíneas y el sistema nervioso; también, provoca el aumento de la producción de radicales libres y mutaciones, así como el desarrollo de distintos tipos de cáncer.

La contaminación por metales pesados es uno de los mayores problemas ambientales debido a su persistencia a largo plazo. Entre los metales pesados más peligrosos se encuentra el plomo, cromo y el cadmio. En el caso del plomo se genera por el reciclaje de baterías, impresión de libros, síntesis de pigmentos o pinturas entre otros; el cadmio se produce por combustión de minerales que contienen este metal, combustibles fósiles o por la industria de galvanoplastia; y el cromo se origina por la descarga de líquidos industriales, el riego de aguas residuales y la aplicación excesiva de pesticidas y fertilizantes químicos entre otros (Priyadarshane & Das, 2021).

De manera convencional se ha empleado el uso de procesos fisicoquímicos para el tratamiento de los metales; sin embargo, los productos secundarios de estos procesos causan contaminación ambiental, por lo cual es necesario encontrar maneras prácticas, amigables con el ambiente y rentables para remediar la presión ambiental que ejerce la contaminación por metales pesados. En este sentido la biorremediación tiene el potencial de solventar el daño de los ecosistemas de manera eficaz, ecológica y económica. Las bacterias del género *Azotobacter* poseen una gran versatilidad metabólica al producir una variedad de compuestos como sideróforos, ACC desaminasa, HCN, exopolisacáridos, biosurfactantes entre otros, que las hace candidatas para el desarrollo de herramientas biotecnológicas y la biorremediación de sitios contaminados por metales pesados.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Describir los metabolitos producidos por las especies de *Azotobacter* (*A. vinelandii*, *A. chroococcum* y *A. salinestrus*) con posibles aplicaciones biotecnológicas.

4.2 OBJETIVO PARTICULAR

- Documentar los metabolitos secundarios producidos por *A. vinelandii*, *A. chroococcum* y *A. salinestrus* con aplicación biotecnológica.
- Compilar los metabolitos secundarios producidos por *A. vinelandii*, *A. chroococcum* y *A. salinestrus* que promueven el crecimiento vegetal.
- Evidenciar los metabolitos secundarios producidos por *A. vinelandii*, *A. chroococcum* y *A. salinestrus* con posible impacto positivo en los procesos de protección a las plantas ante metales pesados.
- Fundamentar la posible aplicación de los metabolitos secundarios producidos por *A. vinelandii*, *A. chroococcum* y *A. salinestrus* en los procesos de biorremediación.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó la búsqueda de artículos científicos sobre la producción de metabolitos secundarios en las especies de *Azotobacter*: *A. vinelandii*, *A. chroococcum* y *A. salinestrís*, en las plataformas internacionales de Pubmed del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), en las bases de datos que tienen los recursos electrónicos BUAP : Annual reviews, Nature, CABI (centro de biociencia agrícola internacional), JSTOR (abreviatura de Journal storage almacén de publicaciones periódicas), Science, Springer y Wiley online library.

De la búsqueda se obtuvieron 263 artículos entre los cuales se incluyeron artículos originales y de revisión, fueron analizados, resumidos y con la información más relevante se estructuró una tabla comparativa que se empleó como herramienta para la redacción de los resultados y la discusión de este trabajo. Esta herramienta permitió establecer el criterio de inclusión de los artículos que se utilizaron para la redacción de los rubros de resultados y discusión, este criterio se sustentó en proveer la información bioquímica de los diferentes metabolitos documentados, además de las determinaciones de estos a nivel cuantitativo y cualitativo, producidos por los géneros *Azotobacter*, *Pseudomonas* y *Bacillus* de tal manera que finalmente se usaron 158 artículos. Con los 158 artículos seleccionados, además, se permitió la construcción de tablas donde se muestra información cuantitativa o cualitativa de la producción de los metabolitos analizados en los 3 géneros bacterianos, estas tablas forman parte de los resultados generados en este trabajo bibliográfico.

6. RESULTADOS

Metabolitos secundarios del género *Azotobacter* con aplicación biotecnológica:

6.1 PRODUCCIÓN DE INDOLES: ACIDO INDOL ACÉTICO

El ácido indol acético (AIA) es una auxina vegetal producida por diversas bacterias del suelo, entre las que se encuentran: algunas rizobacterias, algunas bacterias patógenas, simbióticas y de vida libre (Chennappa *et al.*, 2019). La producción de compuestos indólicos como la fitohormona AIA es muy relevante en las interacciones bacteria-planta, esta fitohormona está implicada tanto en la patogénesis y en la fitoestimulación (Souza *et al.*, 2015). La AIA es sintetizado por vías diferentes que reciben el nombre de acuerdo al intermediario clave de la vía, estas incluyen la vía del ácido indol pirúvico, la vía del indol acetamida, la vía del indol acetaldoxima/ indolacetonitrilo, la vía del indol acetaldehído y la vía de la triptamina (figura 6) (Olanrewaju *et al.*, 2017).

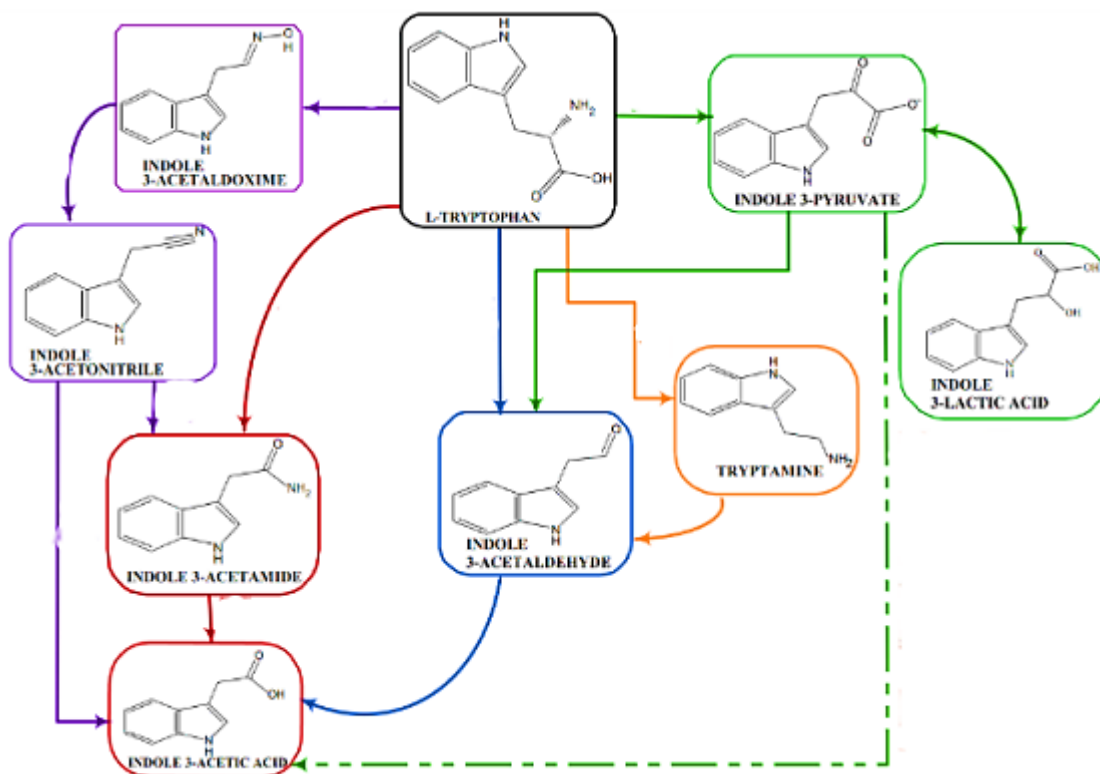


Figura 6. Vías para la síntesis del ácido indol acético y su configuración bioquímica (Modificado de: Olanrewaju *et al.*, 2017)

Las bacterias benéficas sintetizan AIA de manera predominante a través de la vía del ácido indo-3-pirúvico, esta vía es dependiente de L-triptófano; en contraste, las bacterias fitopatógenas producen este metabolito a través de la vía indol-acetamida (Souza *et al.*,2015).

La liberación de ácido indol acético esta mejor documentada en las bacterias que colonizan las plantas debido a su efecto benéfico en muchos procesos fisiológicos de las plantas (Rizvi & Khan, 2018) como en el geotropismo, fototropismo, diferenciación de tejido vascular, dominancia apical, división celular y en la elongación del tallo y raíz (Olanrewaju *et al.*, 2017). Los géneros bacterianos productores de AIA más estudiadas que promueven el crecimiento vegetal son *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Azotobacter*. En *Pseudomonas* se ha encontrado una producción de 10.2 a 31.2 µg de ácido indol acético /mL (Malik & Sindhu, 2011), como *P. fluorescens* Sasm05 es capaz de generar cantidades de entre 15 a 50 µg AIA /mL (Chen *et al.*, 2017). Por otra parte, las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* como *B. subtilis* MNU16 biosintetizan aproximadamente 56.95 µg AIA /mL (tabla 4) (Upadhyay *et al.*, 2017).

En el caso de *Azotobacter* se sabe que pueden producir entre 2.09 a 33.28 µg /mL de AIA (Chennappa *et al.*, 2019). La bacteria *A. chroococcum* SP1 biosintetiza 20 µg/mL de AIA aproximadamente (Pandey *et al.*, 2019). *A. salinestris* es capaz de producir 112.25 µg/mL de AIA a una concentración salina del 0.6% de NaCl, en concentraciones de 0.8% y el 1% produce 100.5 y 92.21 µg/mL de AIA, respectivamente (Omer *et al.*, 2016). En estas bacterias la producción de AIA se incrementa en presencia de triptófano (Das, 2019). *Azotobacter* puede producir AIA cantidades entre 16.5 a 34 µg/mL, en medios suplementados con triptófano (tabla 4) (Jain *et al.*, 2021).

Tabla 4. Producción de ácido indol acético por especies de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Azotobacter*.

Rizobacteria	AIA ($\mu\text{g/mL}$ de sobrenadantes)	Condición ambiental	Referencia
<i>Pseudomonas</i>	10.2 a 31.2	Optima	Malik & Sindhu, 2011
<i>P. fluorescens</i> Sasm05	15 a 50	Optima	Chen <i>et al.</i> , 2017
<i>Bacillus subtilis</i> MNU16	56.95	Optima	Upadhyay <i>et al.</i> , 2017
<i>Azotobacter</i>	2.09 a 33.28	Optima	Chennappa <i>et al.</i> , 2019
<i>A. chroococcum</i> SP1	20	Optima	Pandey <i>et al.</i> , 2019
<i>A. salinestris</i>	112.25	Concentración salina de 0.6%	Omer <i>et al.</i> , 2016
<i>A. salinestris</i>	100.5	Concentración salina de 0.8%	Omer <i>et al.</i> , 2016
<i>A. salinestris</i>	92.21	Concentración salina de 1%	Omer <i>et al.</i> , 2016
<i>Azotobacter</i>	16.5 a 34	Medio suplementado con triptófano	Das, 2019

Determinación de la producción de AIA a través de cuantificación colorimétrica empleando reactivo de Salkowski

El AIA potencia la promoción del crecimiento de las plantas afectando positivamente a la embriogénesis, organogénesis, la diferenciación vascular y mediante el desarrollo de raíces y brotes (Rajabi-Khamseh *et al.*, 2020). Las cepas productoras de AIA aumentan la longitud de la raíz derivando en una mayor superficie radicular que permite a las plantas acceder a más nutrientes del suelo (Chennappa *et al.*, 2019). El AIA producido por las bacterias promotoras del crecimiento vegetal estimula el desarrollo de las raíces, bajo condiciones de concentración subóptima de AIA en la planta; en contraste, cuando la concentración es óptima se inhibe el desarrollo radicular (Olanrewaju *et al.*, 2017).

El plomo tiene un gran impacto negativo en la producción de AIA en las bacterias y puede reducir su producción, pero su síntesis continua incluso en concentraciones altas de metales como el cobre y el plomo (Rizvi & Khan, 2018).

6.2 SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS

El fósforo es un nutriente esencial para las plantas por ser un componente estructural de los ácidos nucleicos, fosfolípidos, y ATP, además este elemento participa en la fotosíntesis, la fijación biológica del nitrógeno y en diversas vías metabólicas. Las plantas absorben el fósforo como iones fosfato en dos formas químicas solubles: la dibásica (H_2PO_4^-) y la monobásica (HPO_4^{2-}) (Souza *et al.*, 2015). Sin embargo, las principales fuentes de fósforo orgánico en el suelo generalmente no están disponibles para las plantas debido a su insolubilidad o rápida inmovilización (Pal Saha *et al.*, 2014).

La disponibilidad de fósforo entonces depende de la solubilidad de este elemento y está influida por la actividad de las raíces de las plantas y de los microorganismos presentes en el suelo, los cuales representan del 1 al 50% del total de organismos cultivables, y que representan entre el 0.001 al 10 % de la diversidad total (Souza *et al.*, 2015). Las bacterias que solubilizan fósforo se les llama bacterias solubilizadoras de fosfato (Olanrewaju *et al.*, 2017), estas bacterias son importantes en la biotransformación del fosfato a la forma de fósforo soluble y pueden hidrolizar fósforo orgánico e inorgánico a partir de compuestos insolubles (Chennapa *et al.*, 2019).

Las bacterias solubilizadoras de fosfatos solubilizan fosfatos inorgánicos como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 y AlPO_4 mediante la producción de ácidos orgánicos, iones hidroxilo y sideróforos, estos metabolitos quelan los cationes o disminuyen el pH generando la liberación de fosfatos solubles (Souza *et al.*, 2015), esta actividad bioquímica genera la disponibilidad de fósforo en el suelo conducido por la secreción bacteriana de ácidos orgánicos, fosfatos ácidos y agentes quelantes (Romero-Perdomo *et al.*, 2017). Estas bacterias solubilizadoras producen y excretan ácidos como el glucónico o el cetogluconico provocando la acidificación de las células y su entorno derivando en la liberación de iones fosfato.

Los mejores solubilizadores de fosfatos pertenecen a los géneros de *Bacillus*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Azospirillum* y *Azotobacter* (Olanrewaju *et al.*, 2017). Especies como *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *Arthobacter ilicis*, *E. coli*,

P. aeruginosa, *E. aerogenes*, *Micrococcus luteus* y *Azotobacter chroococcum* son bacterias solubilizadoras de fosfato (Chennapa *et al.*, 2019). Estas rizobacterias metabolizan el fosfato orgánico e inorgánico insoluble en la forma soluble que es más accesible para las plantas (Olanrewaju *et al.*, 2017). En el género *Pseudomonas* se ha estudiado ampliamente esta capacidad de solubilizar fosfatos y algunos de los solubilizadores de fosfato más eficientes pertenecen a este género (Vyas & Gulati, 2009).

Tabla 5. Capacidad de solubilizar fosfatos por *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Azotobacter*.

Rizobacteria	Solubilización de fosfatos (µg/mL de fosfato tricálcico por mililitro)	Referencia
<i>Pseudomonas putida</i>	20	Teng <i>et al.</i> , 2019
<i>P. fluorescens</i> BIHB	768.3	Vyas & Gulati, 2009
<i>Bacillus subtilis</i>	81.75	Upadhyay <i>et al.</i> , 2017
<i>Azotobacter</i>	1.5-1.7	Das, 2019

Determinación de la solubilización de fosfatos en medio con fosfato de calcio por 7 días a 28 °C

En *Pseudomonas putida* la solubilización de fosfatos se da en cantidades aproximadas de 20 µg fosfato tricálcico /mL de sobrenadante (Teng *et al.*, 2019). Por otra parte, *Pseudomonas fluorescens* BIHB 740 es capaz de solubilizar aproximadamente 768.3 µg/mL de fosfatos (Vyas & Gulati, 2009). Asimismo, se ha descrito la solubilización de fosfatos por especies de *Bacillus* tal como *B. subtilis* que es capaz de solubilizar aproximadamente 81.75 µg/mL tras 24 horas de interacción con la fuente insoluble (Upadhyay *et al.*, 2017). Las especies del género *Azotobacter* son capaces de solubilizar aproximadamente entre 1.5 a 1.7 µg/mL de fosfatos insolubles presentes en el suelo (tabla 5) (Das, 2019). Estas bacterias solubilizadoras de fosfatos sintetizan la enzima fosfatasa alcalina (APasa), en *Azotobacter* se ha visto que esta enzima solubiliza fosfatos bajo condiciones propensas a la sequía o en la presencia de pesticidas organofosforados (Pal Saha *et al.*, 2014).

6.3 ALQUILRESORCINOLES

Los alquilresorcinoles son lípidos fenólicos que se encuentran ampliamente distribuidos en bacterias, hongos, plantas y animales, estos desempeñan diversas funciones relacionadas con la bioquímica celular y la química de las membranas (figura 7) (Funa *et al.*, 2006). En general los alquilresorcinoles han sido más estudiados en las plantas como constituyentes secundarios en cebada, arroz, trigo (Ciccoritti *et al.*, 2014). También se ha observado su producción en diversos microorganismos como metabolitos extracelulares (Bitkov *et al.*, 1992).

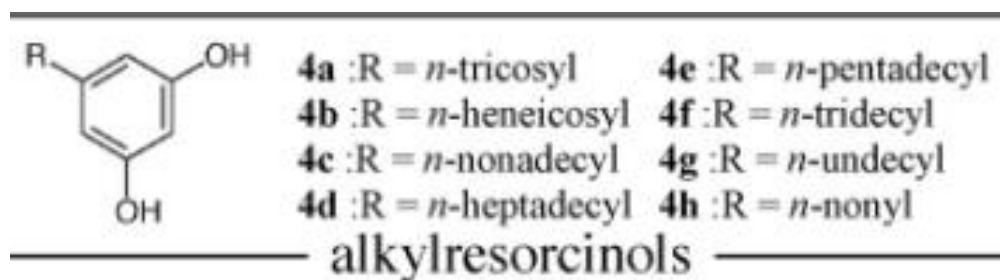


Figura 7. Estructura general de los alquilresorcinoles (Funa *et al.*, 2006)

Los 5-*n*-alquilresorcinoles producidos por las plantas poseen actividad antifúngica como la inhibición de la germinación de las esporas y el crecimiento de hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizoctonia* y *Fusarium* (Ciccoritti *et al.*, 2014). En las bacterias no se conoce mucho acerca de su acción; sin embargo, son producidos por una gran variedad de bacterias. Los géneros *Pseudomonas* y *Azotobacter* tienen la capacidad de producir alquilresorcinoles (Kozubek *et al.*, 1996). *Azotobacter* spp. producen alquilresorcinoles que junto con las alquipironas conforman los lípidos fenólicos. (Bitkov *et al.*, 1992). Estos alquilresorcinoles se incorporan fácilmente en las bicapas de los fosfolípidos y en las membranas biológicas, y estos metabolitos son capaces de producir cambios estructurales importantes (Funa *et al.*, 2006).

Los 5-*n*-alquilresorcinoles pueden acelerar la oxidación de succinato, además afectan la permeabilidad iónica de la membrana ya que producen modificaciones

estructurales en la bicapa lipídica y tiene la capacidad de afectar la actividad de las enzimas unidas a la membrana (Bitkov *et al.*, 1992).

Los alquilresorcinoles son componentes de la cápsula del quiste en bacterias como *Azotobacter* (Segura *et al.*, 2009). En algunas bacterias estos compuestos se sintetizan en la formación preanabiotica de quistes y remplazan a otros lípidos de la membrana (Kozubek *et al.*, 1996). Los alquilresorcinoles junto con las alquilpironas remplazan los fosfolípidos de la membrana y forman parte de la exina (Segura *et al.*, 2009; Romero *et al.*, 2016).

La cantidad de alquilresorcinoles producidos por las bacterias depende del material bacteriano existente. En *Pseudomonas* spp. la producción de alquilresorcinoles es aproximadamente 1 µmg/ mg de células. La producción de alquilresorcinoles por cepas de *A. chroococcum* va desde 2.3 a 56.2 µmg/ mg de células (tabla 6) (Kozubek *et al.*, 1996).

Tabla 6. Producción de alquilresorcinoles en *Pseudomonas* y *Azotobacter*

Rizobacteria	Alquilresorcinoles (µmg/ mg de células)	Referencia
<i>Pseudomonas</i> spp.	1	Kozubek <i>et al.</i> , 1996
<i>Azotobacter chroococcum</i>	2.3 – 56.2	

Determinación de la producción de alquilresorcinoles con el empleo del método fast blue B.

Los principales alquilresorcinoles sintetizados en *A. vinelandii* son el 5-n-heneicosilresocinol y el 5-n-tricosilresocinol. La síntesis de alquilresorcinoles requiere de la actividad de la enzima ArsA, un ácido graso sintasa responsable de la síntesis y transferencia de los sustratos de acilo activos de ArsB (Segura *et al.*, 2009). ArsB es una policétido sintasa (PKS) tipo III con propiedades catalíticas que son responsables de la síntesis de alquil resorcinoles (Funa *et al.*, 2006).

Los alquilresorcinoles son esenciales en la formación de la capa de exina y su presencia contribuye a la segregación de los quistes (Segura *et al.*, 2009). Los alquilresorcinoles también actúan como moduladores de la oxidación de membranas liposomales y ácidos grasos (Funa *et al.*, 2006).

6.4 ÁCIDO CIANHIDRICO

El cianuro de hidrogeno o ácido cianhídrico (HCN por sus siglas en inglés) es un metabolito secundario (Laville *et al.*, 1998) sintetizado a partir de la descarboxilación oxidativa de la glicina (Blumer & Haas, 2000). Este proceso es catalizado por la HCN sintasa una oxidasa de aminoácidos (Laville *et al.*, 1998). El HCN inhibe el citocromo c oxidasa y diversas metaloenzimas (Blumer & Haas, 2000).

El HCN es producido por diferentes géneros bacterianos incluidos *Bacillus*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Azotobacter* y *Chromobacterium* entre otros (Laville *et al.*, 1998). En *Pseudomonas fluorescens* CHA0 por ejemplo se producen aproximadamente 107 µM de HCN/L de medio (Rijavec & Lapanje, 2016).

Entre diez especies de *Bacillus* y nueve especies de *Pseudomonas* la producción de HCN se da en aproximadamente el 50 y 80% de las especies respectivamente (Ahmad *et al.*, 2008). En 15 cepas aisladas de *Azotobacter* el 33.3% de estos aislados producción HCN (tabla 7) (Altaf & Malik, 2019).

Tabla 7. Especies productoras de HCN en los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Azotobacter*.

Rizobacteria	Numero de aislados	% de cepas productoras de HCN	Referencia
<i>Pseudomonas</i>	9	80	Ahmad <i>et al.</i> , 2008
<i>Bacillus</i>	10	50	
<i>Azotobacter</i>	15	33.3	Altaf & Malik, 2019

Determinación de la producción de HCN por el metodo de Lorck.1948. En la columna de porcentaje se representa el porcentaje de cepas de un género bacteriano con la capacidad de producción de HCN

La producción de HCN en *P. fluorescens* de manera cualitativa fue califica como alta (Alström & Burns, 1989). La producción de HCN por *A. chroococcum* se describió como moderada (tabla 8) (Maheshwari *et al.*, 2012).

Tabla 8. Producción cualitativa de HCN por especies de *Pseudomonas* y *Azotobacter*.

Rizobacteria	HCN	Referencia
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Alta	Alström & Burns, 1989
<i>Azotobacter chroococcum</i>	Moderada	Maheshwari <i>et al.</i> , 2012

Determinación de la producción de HCN basado en el cambio de color del papel filtro de amarillo a marrón claro, marrón o marrón rojizo representándose como producción débil, moderada o fuerte respectivamente.

En *Azotobacter vinelandii* se ha estudiado su actividad antifúngica contra fitopatógenos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Rhizoctonia* y especies como *Fusarium oxysporum* entre otros (Ahmad *et al.*, 2008).

La producción de HCN en *Pseudomonas fluorescens* CHA0 se ha documentado con la actividad predominante de agente complejante de metales en el sustrato e incrementa la disponibilidad de nutrientes para las plantas, en comparación a la capacidad de inhibir el desarrollo de fitopatógenos. El HCN interactúa con el hierro formando complejos Fe-CN. El secuestro de metales por este metabolito aumenta la disponibilidad del fosfato para las rizobacterias y las plantas hospedadas (Rijavec & Lapanje, 2016).

6.5 PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO

Actualmente el gas hidrogeno (H_2) es considerado como un nuevo recurso energético (Xu *et al.*, 2017). Este gas presenta combustión neutra y posee la capacidad de aplicarse para generar celdas de combustible. El H_2 se produce principalmente de las reservas de combustibles fósiles de gas natural, este es un recurso no renovable (Knutson *et al.*, 2018). El H_2 es un subproducto de muchos procesos biológicos que puede intercambiarse en las dinámicas comunitarias en consorcios microbianos (Barney, 2020). El H_2 generado biológicamente representa un recurso renovable y ecológico que podría ser de utilidad industrial (Knutson *et al.*, 2018).

Usualmente se han documentado dos vías de producción de hidrógeno biológico, la primera ruta está asociada a especies fotoautótrofas y la segunda se basa en la fermentación oscura (Barney, 2020). Ambas vías usan la nitrogenasa o la hidrogenasa para generar el gas (Knutson *et al.*, 2018). En el caso de las especies

fotoautótrofas las algas verdes usan la hidrogenasa mientras que las cianobacterias pueden usar esta enzima y la nitrogenasa, generalmente este proceso ocurre en condiciones anaeróbicas. Por otro lado, la fermentación oscura se asocia con *Clostridium*, *Enterobacter* y especies relacionadas que producen el H₂ a través de diferentes clases de hidrogenasas en condiciones anaeróbicas. Ambas clases de enzimas utilizan cofactores susceptibles a daño por O₂ (Barney, 2020).

En la fijación biológica de nitrógeno catalizada por la nitrogenasa se produce H₂ como un subproducto, durante la reducción de N₂ (atmosférico) a amoníaco. La hidrogenasa por otra parte cataliza la oxidación reversible del gas H₂ para reducir los costos energéticos de la fijación biológica de nitrógeno (Knutson *et al.*, 2018). La hidrogenasa endógena recicla el H₂ producido, por lo cual este se encuentra solo de manera transitoria en la célula. Sin embargo, en ausencia de esta hidrogenasa cualquier H₂ producido podría convertirse en un producto terminal (Barney, 2020)

Las bacterias del género *Azotobacter* son fáciles de manejar, por lo que se han utilizado como modelo para la investigación de procesos bioquímicos. *Azotobacter* realiza fijación biológica de nitrógeno y producen H₂ en medios que no contienen N₂ (Xu *et al.*, 2017). Estas bacterias no realizan fermentación oscura debido a su estilo de vida aeróbico; sin embargo, mantienen un ambiente celular que protege a la nitrogenasa del O₂.

La capacidad de *Azotobacter* para producir H₂ de forma aerobia, le permite generar este gas en diversas condiciones, a diferencia de otras bacterias productoras de H₂ que podrían verse limitadas en esta condición (Barney, 2020).

Las bacterias del género *Azotobacter* son heterótrofas que no necesitan luz y aerobias estrictas que podrían modificarse genéticamente para soportar fuentes de nitrógeno fijo, lo que las convierte en candidatas para producir este gas a partir de diversos desechos. La producción máxima de H₂ por nitrogenasa dependiente de molibdeno y es de 2200 nmol min⁻¹ de H₂ (Knutson *et al.*, 2018). La nitrogenasa molibdeno puede producir un mol de H₂ por N₂ fijado mientras que las nitrogenasas alternativas que contiene vanadio producen de 3 a 5 moles de H₂ por N₂ fijado y la

nitrogenasa de hierro genera entre 3 y 11 moles de H₂ por N₂ (Noar & Bruno-Bárcena, 2016).

En *Azotobacter* la nitrogenasa solo se expresa durante el crecimiento rápido en condiciones de nitrógeno limitado (Barney, 2020). La fijación de nitrógeno de *Azotobacter* es inhibida por NH₄, en un entorno limitado de NH₄ podría fácilmente permitir la producción continua de H₂ (Knutson *et al.*, 2018).

Azotobacter produce hidrógeno; sin embargo, la coinoculación con algas como *Clamidium reinhardtii* que también produce H₂, se obtuvieron rendimientos máximos de producción de este gas, generaron una cantidad aproximada de 149 L mol mg⁻¹ H₂. *A. chroococum* es capaz de provocar un incremento en el crecimiento de las algas, pero además es responsable de generar una menor concentración de O₂ en el cultivo y aumentar el contenido de almidón lo que permitió un aumento en la producción de hidrogeno por parte de *Clamidium reinhardtii* (Xu *et al.*, 2017).

La cepa modificada tolerante al tungsteno *A. vinelandii* CA6 es capaz de producir 37.21 mmol H₂/ mol sacarosa en cultivos de quimiostato (Noar *et al.*, 2015). Esta cepa produce nitrogenasas alternativas insensibles al tungsteno y al cultivarse en un medio con tungsteno es capaz de producir aproximadamente 120 mmol H₂ /mol sacarosa (Noar & Bruno-Bárcena, 2016).

La producción de H₂ en *A. vinelandii* puede aumentar hasta 5.6 μmol /hora / mg de proteína total mediante la modificación de *nifL* (*nifL* :: Kan R) lo que desregula la nitrogenasa, al incorporar una mutación cercana al sitio activo de la nitrogenasa (*nifD* V70I) genera una preferencia de la nitrogenasa por la reducción de H⁺ sobre la reducción de N₂, y la eliminación del complejo de captación de la hidrogenasa (Δ *hyd*) que se encarga de reciclar el H₂ (Knutson *et al.*, 2018).

6.6 BIOCONTROL A FITOPATÓGENOS

Algunas bacterias y hongos son los patógenos responsables de más del 60% de las enfermedades de las plantas (Chennappa *et al.*, 2018). Las bacterias pertenecientes al género *Azotobacter* controlan enfermedades fúngicas, bacterianas y la infestación por nematodos en las plantas (Das, 2019). Algunas

cepas de *Azotobacter* inhiben el crecimiento de los hongos al disminuir la germinación de las esporas, alteran la arquitectura de las hifas, reducen el peso de las células y la expresión de genes que codifican proteínas metabólicas (Kumar Bhuyan *et al.*, 2015).

Azotobacter spp., puede disminuir la incidencia de la enfermedad del carbón de bandera del trigo mediante la producción de ácido indol acético (AIA) (Das, 2019). La inoculación con *Azotobacter*, *Bacillus* y *Pseudomonas* puede ejercer un impacto negativo sobre las bacterias entéricas Gram negativas, como *Listeria monocytogenes*, que están presentes en el suelo de los cultivos y pueden provocar enfermedades en los humanos (Sharma *et al.*, 2020). Estas bacterias del género *Azotobacter* también reducen la infestación de *Poronospora arborescens* (mildíu veloso) en *Papaver somniferum* (adormidera) y la eclosión de huevos de nematodos y penetración de larvas de *Meloidogyne incógnita* (Das, 2019).

Entre los mecanismos que emplean las especies de *Azotobacter* para actuar como agentes de biocontrol está la producción de antibióticos y antifúngicos (Chennappa *et al.*, 2019). *Azotobacter* spp., produce agelasinas las cuales poseen propiedades antimicrobianas y citotóxicas; también, estas bacterias sintetizan compuestos que poseen anillo de piperonilo que poseen propiedades antiproliferativas y anticonvulsivas, que pueden actuar contra virus y amebas (Sharma *et al.*, 2020).

El género *Azotobacter* también produce compuestos antifúngicos como la aminoquelina, azotoquelina, protoquelina, azotobactina y ácido 2,3-dihidroxibenzoico que inhiben el crecimiento de hongos fitopatógenos como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Curuyularia*, *Alternaria*, *Sclerotium* y *Helminthosporium* (Chennappa *et al.*, 2019). *Azotobacter* spp. además, producen cianuro de hidrogeno (HCN), el cual es un metabolito secundario que actúa como agente de control contra muchos patógenos (Rizvi & Khan, 2018). El HCN suprime el crecimiento de microorganismos e influye en el crecimiento de las plantas (Chennappa *et al.*, 2019).

En *A. salinestrus* la producción de HCN se ha demostrado que contribuye en la inhibición de la colonización de agentes patógenos a las raíces (Chennappa *et al.*, 2018). La inhibición del desarrollo de fitopatógenos también puede atribuirse a la

exclusión competitiva por los nutrientes disponibles en el medio (Sharma *et al.*, 2020). La producción de sideróforos por *Azotobacter* disminuye la proliferación de patógenos debido a que reduce el hierro disponible debido a su capacidad de quelación de Fe^{3+} (Olanrewaju *et al.*, 2017).

La inoculación de *A. salinestris* en cultivos de cereales genera protección a la planta contra hongos como *Fusarium* spp. que inhiben el crecimiento vegetal, este beneficio se debe a la capacidad de esta bacteria para producir diferentes tipos de compuestos fungicidas. Además, la inoculación de esta rizobacteria permite reducir el uso de fertilizantes y plaguicidas (Chennappa *et al.*, 2018).

Las bacterias PGPR como *Azotobacter* producen una respuesta sistémica inducida (RSI) en las plantas, que consiste en la producción de ácido jasmónico, ácido salicílico y benzoxazinoides implicados en la regulación de las defensas de las plantas contra el estrés biótico y abiótico como el control de los fitopatógenos (Choudhary *et al.*, 2007). La inoculación de *Azotobacter* spp., así como el uso reducido de fertilizantes nitrogenados afectan la asimilación y reasignación de recursos de nitrógeno en los tejidos de las plantas lo que altera a las sustancias químicas de defensa secundarias y provoca las respuestas de defensa en las plantas (Song *et al.*, 2020).

6.7 *Azotobacter* spp. DOCUMENTADA COMO PGPR

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) tienen la capacidad de colonizar la rizosfera y de esta manera aportan nutrientes como fósforo y nitrógeno a los vegetales (Rizvi & Khan, 2018). Las bacterias PGPR pertenecientes a géneros como *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Azotobacter* aumentan la accesibilidad de los minerales a las plantas (Nadeau *et al.*, 2018). La promoción del crecimiento realizada por las PGPR se lleva a cabo mediante mecanismos como la producción de ACC desaminasa, fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, mineralización de nutrientes, síntesis de fitohormonas y producción de sideróforos (Romero- Perdomo *et al.*, 2017).

La rizobacteria identificada como *Azotobacter* spp. presentan la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y lo reducen a amonio y este es oxidado a dióxido de nitrógeno, producen sideróforos, ACC desaminasa y hormonas del crecimiento como auxinas, giberelinas y citoquinas que favorecen el crecimiento de las raíces y desarrollo de las plantas de forma directa (Song *et al.*, 2020). *Azotobacter* spp., con la producción de ácido indol acético (AIA) promueve el crecimiento vegetal ya que este compuesto afecta la división celular, el agrandamiento celular, la elongación de las raíces y el dominio apical de las plantas (Rizvi & Khan, 2018). Los metabolitos de esta bacteria distribuyen a la distribución de los recursos vegetales de tal forma que permite el aumento de la biomasa y el rendimiento de las plantas, no solo mediante la producción de fitohormonas que en exceso pueden inhibir el crecimiento (Song *et al.*, 2020).

Azotobacter spp. produce sideróforos que quelan el hierro haciéndolo no disponible para otros integrantes de la microbiota, mientras que con la ACC desaminasa modulan los niveles de etileno en las plantas, con estos metabolitos *Azotobacter* promueve de manera indirecta el crecimiento vegetal (Rizvi & Khan, 2018). Otros mecanismos que emplea para promover el crecimiento de las plantas incluyen la producción de enzimas hidrolíticas que interactúan con los fitopatógenos de la planta, la producción de antibióticos que aumenta la competencia de la planta, la síntesis de vitaminas como niacina, tiamina y biotina que le brindan resistencia mejorada a la planta bajo estrés, y también *Azotobacter* interfiere con las señales de *quorum sensing* de organismos dañinos (Romero- Perdomo *et al.*, 2017)

La especie *A. salinestris* es considerada como una excelente PGPR debido a su alta actividad de nitrogenasa; su capacidad de producir sideróforos, ACC desaminasas y fitohormonas como las auxinas y giberelinas en niveles variables. La inoculación con esta bacteria permite aumentar el número de raíces seminales en plántulas de trigo (Rubio *et al.*, 2013). También se ha visto que ejerce un efecto positivo en el crecimiento del tomate (*Solanum lycopersicum*) (Ahmed *et al.*, 2020) y el sorgo (*Sorghum vulgare*) (Omer *et al.*, 2016).

La co-inoculación de algodón con las cepas de *A. chroococcum* AC10 y AC1 permiten la reducción de la fertilización química de nitrógeno hasta en un 50% y aun así producir un aumento en la biomasa de los cultivos de *Gossypium hirsutum*, la biomasa es mayor en comparación al uso de fertilizantes únicamente (Romero-Perdomo *et al.*, 2017).

También, se ha documentado que *Azotobacter* promueve el crecimiento vegetal en el cilantro (*Coriandrum sativum*) (Rabiei *et al.*, 2020), arroz (*Oryza sativa*) (Sahoo *et al.*, 2014), sésamo (*Sesamum indicum*) (Ferreira *et al.*, 2019), pepino (*Cucumis sativus*), avena (*Avena sativa*), cebada (*Hordeum vulgare*), zanahoria (*Daucus carota*), cebolla (*Allium cepa*), papas (*Solanum tuberosum*), berenjena (*Solanum melongena*) entre otros (Das, 2019).

Metabolitos secundarios del género *Azotobacter* con posible efecto de protección a la planta ante metales pesados y en procesos de biorremediación

6.8 SIDERÓFOROS

Los sideróforos son moléculas de péptidos con cadenas laterales y grupos funcionales a los que se pueden unir iones férricos (Olanrewaju *et al.*, 2017). Estas moléculas son de menos de 1000 Da con alta afinidad para quelar o unir iones férricos (Fe^{3+}) (figura 8) (Souza *et al.*, 2015). Estos compuestos secuestran el hierro volviéndolo no disponible para otros microorganismos (Rizvi & Khan, 2018). En suelos ácidos y anaeróbicos las altas concentraciones de iones ferrosos (Fe^{2+}) generados por la reducción de iones férricos (Fe^{3+}) provoca la toxicidad del hierro debido a su absorción excesiva (Souza *et al.*, 2015). Los sideróforos son producidos por bacterias y hongos como agentes quelantes en respuesta a la deficiencia de hierro en suelos de pH neutro a alcalino (Chennappa *et al.*, 2019).

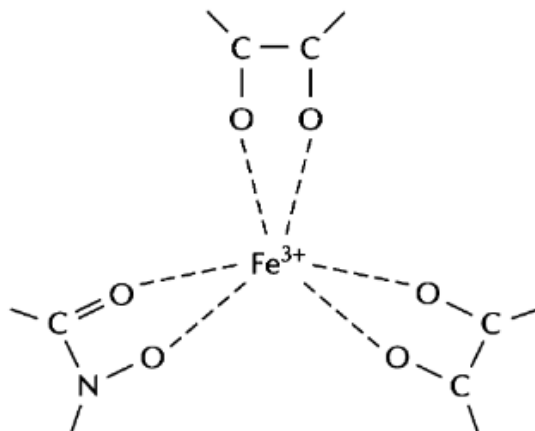


Figura 8. Representación de la unión a hierro por los sideróforos a través de sus grupos funcionales (Olanrewaju *et al.*, 2017)

El hierro es un micronutriente esencial para plantas y microorganismos, el cual participa en procesos biológicos importantes como la fotosíntesis, la respiración, la síntesis de clorofila y la fijación biológica de nitrógeno (Souza *et al.*, 2015). Los sideróforos ayudan de manera indirecta en el crecimiento de las plantas aumentando la disponibilidad de nutrientes para la fotosíntesis (Rajabi-Khamseh *et al.*, 2020).

Los sideróforos forman complejos con el Fe^{3+} extracelulares, una vez que el Fe^{3+} es capturado por el sideróforo está disponible para la absorción celular de dos formas, en una vía el hierro es reducido y liberado del sideróforo en la superficie extracelular y se absorbe como ion férrico, en la segunda ruta el complejo de Fe^{3+} -sideróforo se internaliza, este es absorbido por transportadores de quelato férrico, también el Fe^{3+} es reducido a Fe^{2+} por la actividad de las reductasas de quelato férrico, esta enzima puede estar en membrana o en el medio extracelulares. El hierro es liberado del complejo hierro-sideróforo en el citosol, mediante la actividad de las reductasas del sideróforo férrico intracelulares o hidrolasas de sideróforo férrico (Miethke & Marahiel, 2007).

. Si bien, la función canónica de los sideróforos es eliminar el hierro insoluble, estos también pueden unirse a otros metales con diversas afinidades; sin embargo, los complejos sideróforo-metal no pueden ingresar a las células bacterianas lo que

reduce las concentraciones de metales tóxicos libres en el medio (Hesse *et al.*, 2018). Este papel de biorremediador puede ser adaptativo y regulado en respuesta a la contaminación (Kramer *et al.*, 2020).

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal que producen sideróforos ayudan a prevenir o disminuir la proliferación de patógenos al reducir la cantidad de hierro disponible para los fitopatógenos. Esto lo logran al quelar la mayor parte de Fe³⁺ presente en la rizósfera de las plantas evitando que los patógenos proliferen debido a la falta de hierro, lo que provoca que pierdan la capacidad de actuar como patógenos (Olanrewaju *et al.*, 2017). Otras aplicaciones de los sideróforos basados en su actividad quelante son como agentes de administración de fármacos y en los procesos de remediación de suelos (Chennappa *et al.*, 2019).

Diversas especies bacterianas son capaces de producir sideróforos. Por ejemplo, *Pseudomonas fluorescens* DSM 50090 produce el sideróforo pioverdina en cantidades de entre 20 y 25 µmol sideróforos /L de cultivo (Vindeirinho *et al.*, 2021). La especie *Bacillus subtilis* por su parte es capaz de producir hasta 100 µmol/L de sideróforos tipo catecol (Ferreira *et al.*, 2019) (tabla 9). Las especies del género *Azotobacter* excretan sideróforos cuando el hierro es limitante. La bacteria *A. chroococcum* es capaz de producir tres clases de sideróforos: vibrioferrina, anfibibactinas y crochelin A (Mankar *et al.*, 2020). Por su parte, *A. vinelandii* produce cinco sideróforos diferentes que son ácido 2,3-dihidroxibenzoico, azotobactina, aminoquelina, azotoquelina y protoquelina (Chennappa *et al.*, 2019). En cambio *A. salinestris* produce compuestos tipo hidroxamato (HDX) que actúan como sideróforos (Page & Shivprasad, 1995). *A. vinelandii* produce entre 80 a 140 µmol/L de sideróforos tras 72 horas de incubación (Jain *et al.*, 2021) (tabla 9).

Tabla 9. Producción de sideróforos por *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Azotobacter*.

Rizobacteria	Sideróforos (µmol/L)	Referencia
<i>Pseudomonas fluorescens</i> DSM 50090	20 – 25	Vindeirinho <i>et al.</i> , 2021
<i>Bacillus subtilis</i>	100	Ferreira <i>et al.</i> , 2019
<i>Azotobacter vinelandii</i>	80 - 140	Jain <i>et al.</i> , 2021

Determinación de la producción de sideróforos mediante el ensayo de cromo azurol S (CAS).

6.9 1-AMINOCICLOPROPANO-1-CARBOXILATO (ACC) DESAMINASA

El etileno es una hormona presente en todas las plantas superiores que modula el desarrollo celular normal y el crecimiento de las plantas (Olanrewaju *et al.*, 2017). Sin embargo, bajo estrés abiótico y biótico como el daño por patógenos, sequía, inundación, altas concentraciones salinas y presencia de contaminantes, se acelera la producción de etileno endógeno lo que afecta negativamente el crecimiento de la planta (Souza *et al.*, 2015). La producción de etileno es realizada por la enzima l-aminociclopropano-l-carboxilato oxidasa (ACC oxidasa), la producción de este metabolito más allá de su umbral provoca estrés por etileno en las plantas (Olanrewaju *et al.*, 2017).

Uno de los mecanismos que permite reducir los niveles de etileno en las plantas es la actividad de la enzima bacteriana l-aminociclopropano-l-carboxilato (ACC) desaminasa (Souza *et al.*, 2015). La ACC desaminasa producida por bacterias promotoras del crecimiento vegetal contribuye a la modulación del nivel de etileno endógeno en las plantas y facilita indirectamente su crecimiento (Rizvi & Khan, 2018). Esta enzima metaboliza al precursor de la biosíntesis de etileno, el l-aminociclopropano-l-carboxilato, y lo metaboliza en ácido cetobutírico y amoníaco, consiguiendo así la reducción en la producción del etileno en las plantas y estos metabolitos pueden ser consumidos por las plantas (Tittabutr *et al.*, 2013).

La colonización de la rizosfera de plantas con estrés por etileno, con las bacterias promotoras del crecimiento vegetal productoras de ACC desaminasa pueden restaurar el desarrollo normal de la planta (Olanrewaju *et al.*, 2017). Además, estos microorganismos pueden tener un mejor crecimiento en comparación con otros microorganismos no productores debido a que pueden usar l-aminociclopropano-l-carboxilato como fuente de nitrógeno (Souza *et al.*, 2015). Otra ventaja de los microorganismos productores de esta enzima es la capacidad de absorber parte del triptófano que exudan las plantas y lo convierten en AIA que luego secretan, de esta forma las plantas pueden absorber esta fitohormona y promover el crecimiento vegetal (Olanrewaju *et al.*, 2017). La enzima ACC desaminasa facilita el

crecimiento de las plantas en ambientes hostiles, al mejorar la longitud y densidad de las raíces (Romero-Perdomo *et al.*, 2017).

La producción de esta enzima se ha descrito en diversos géneros bacterianos como *Bacillus* y *Pseudomonas*. *B. cereus*, en estas bacterias la actividad de ACC desaminasa es de aproximadamente 21000 nmol de α -cetobutarico/mg de proteína/hora por otra parte en *Pseudomonas* sp. la actividad ACC desaminasa es de aproximadamente 23000 nmol de α -cetobutarico/mg de proteína/hora respectivamente (Grobelak *et al.*, 2018). En otros como *P. aeruginosa* y *B. subtilis* la actividad de ACC desaminasa es de 1607 y 1710 nmol de α -cetobutarico/mg de proteína/hora respectivamente (tabla 10) (Pandey *et al.*, 2019). Especies del género *Azotobacter* también producen ACC desaminasa; *A. chroococcum* es capaz de producir ACC desaminasa incluso bajo estrés por la presencia de metales como cobre (Cu) y plomo (Pb) (Rizvi & Khan, 2018).

Azotobacter salinestris produce 60.4 nmol de α -cetobutarico/mg/hora de ACC desaminasa, la cual actúa como una sustancia osmoprotectora (Omer *et al.*, 2016). En *A. chroococcum* SP1 produce aproximadamente 941.496 nmol de α -cetobutarico/mg de proteína/hora (tabla 10) (Pandey *et al.*, 2019).

Tabla 10. Producción de ACC desaminasa por bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Azotobacter*.

Rizobacteria	ACC desaminasa (nmol de α -cetobutarico/mg de proteína/hora)	Referencia
<i>Bacillus cereus</i>	21000	Grobelak <i>et al.</i> , 2018
<i>Pseudomonas</i> sp.	23000	Grobelak <i>et al.</i> , 2018
<i>P. aeruginosa</i>	1607	Pandey <i>et al.</i> , 2019
<i>B. subtilis</i>	1710	Pandey <i>et al.</i> , 2019
<i>Azotobacter salinestris</i>	60.4	Omer <i>et al.</i> , 2016
<i>A. chroococcum</i> SP1	941.496	Pandey <i>et al.</i> , 2019

La determinación de ACC desaminasa fue realizado con el método de Penrose & Glick, 2003.

6.10 BIOPELÍCULA

La biopelícula hace referencia a una estructura conformada por poblaciones microbianas que se adhieren a una superficie y están incrustadas dentro de un material de matriz polimérica autoproducido por los microorganismos (Souza *et al.*, 2015). Esta matriz se compone de exopolisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y otras sustancias (Davey & O'toole, 2000). La formación de biopelícula es exhibida por bacterias y hongos, que al crecer adheridas a las superficies y emplean a los flagelos, fimbrias, liposacáridos y proteínas de membrana para la generación de esta estructura (Velmourougane *et al.*, 2017).

La formación de biopelícula se establece en cinco etapas que son: la adherencia reversible a la superficie, la adherencia irreversible que involucra pérdida de motilidad y producción de sustancias exopoliméricas, la primera maduración en el cual se desarrolla la arquitectura de la biopelícula, la segunda etapa es de maduración, donde ya está bien formada y la última etapa implica la dispersión de las células individuales (figura 9) (Sauer, 2003).



Figura 9. Etapas de la formación de biopelícula (Modificada de: Toyofuku *et al.*, 2015).

La agregación microbiana es necesaria en la formación de la biopelícula y depende de las interacciones entre los microorganismos (Velmourougane *et al.*, 2017). La biopelícula puede estar compuesta por una población de una sola especie o una comunidad derivada de múltiples especies microbianas (Davey & O'toole, 2000). Se da la autoagregación cuando las bacterias pertenecen a la misma cepa o la

coagregación cuando dos o más especies están involucradas (Velmourougane *et al.*, 2017). Por otro lado, la estructura de la biopelícula depende de los parámetros ambientales y de la biología microbiana, pero de manera general forman parches de agregados celulares intercalados en una matriz de exopolisacáridos y con canales de agua que permiten el acceso a los nutrientes (Davey & O'toole, 2000).

Las bacterias producen biopelícula en respuesta a condiciones de estrés ambiental (Ahmed *et al.*, 2020). La formación de biopelícula por los microorganismos permite superar el estrés generado por cambios de pH, limitación de nutrientes o la presencia de radicales de oxígeno, antibióticos y desinfectantes (Velmourougane *et al.*, 2017). Las bacterias alcanzan un cierto grado de refugio y homeostasis al formar parte de la biopelícula (Davey & O'toole, 2000).

Los microorganismos prefieren el modo de vida de biopelícula en entornos naturales sobre las formas planctónicas (Ahmed *et al.*, 2020), porque la formación de esta estructura representa una ventaja reproductiva y de supervivencia en comparación con las células planctónicas (Davey & O'toole, 2000). La transferencia de material genético entre microorganismos que forman la biopelícula es más rápida en comparación con las células planctónicas haciendo que las células difieran genotípica y metabólicamente (Velmourougane *et al.*, 2017).

La biopelícula posee una alta tolerancia frente a compuestos tóxicos incluso a niveles letales para los cultivos planctónicos (Sharma *et al.*, 2018). De hecho, la producción de biopelícula en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 le permite incrementar la protección contra metales pesados en comparación con las células planctónicas en al menos el doble en el caso del plomo, y en seiscientos veces la resistencia a cobre (Teitzel & Parsek, 2003). A medida que los contaminantes fluyen a través de la biopelícula microbiana se da la biofiltración que consiste en la absorción y biodegradación de estos contaminantes (Davey & O'toole, 2000).

En *Pseudomonas* la formación de la biopelícula permite la protección de las células bacterianas dentro de la matriz, por lo anterior la biopelícula es útil en procesos de biorremediación debido a que los polímeros extracelulares de esta son capaces de acumular iones metálicos (Igiri *et al.*, 2018). El proceso de biorremediación por

biopelículas puede darse de dos maneras: en primer lugar, actúan como biosorbentes de metales pesados en la superficie y en segundo lugar las sustancia exopoliméricas que conforman la matriz contienen moléculas con propiedades tensioactivas o emulsionantes que mejoran la biodisponibilidad de los contaminantes (Sharma *et al.*, 2018).

Azotobacter también tiene la capacidad de formar biopelícula ante condiciones estresantes. En *A. chroococcum* W5 la producción de biopelícula permite hacer frente al estrés provocado por nanopartículas de óxido de zinc (ZnO), esta estructura actúa como una barrera (Boddupalli *et al.*, 2017). En *A. salinestrus* a través la formación de biopelícula estimuló el crecimiento vegetal y protegió a la planta contra el efecto tóxico de especies metálicas (Ahmed *et al.*, 2020). La conformación de las biopelículas ayuda en la colonización de las plantas (Souza *et al.*, 2015). El uso de biopelículas microbianas en la agricultura ha ganado interés debido a que mejoran el crecimiento y rendimiento de los cultivos, la salud del suelo y la absorción de nutrientes (Velmourougane *et al.*, 2019). En los microorganismos rizosféricos la formación de la biopelícula permite el mantenimiento de la interacción con las plantas al evitar que se desprendan debido a diversos procesos naturales que ocurren en el suelo (Velmourougane *et al.*, 2017). Los microorganismos que forman biopelícula utilizan mecanismos de señalización que promueven las interacciones tripartitas, modulan el metabolismo y transcripción de genes involucrados en el crecimiento y activan la maquinaria de defensa y antioxidante de las plantas (Velmourougane *et al.*, 2019).

6.11 EXOPOLISACÁRIDOS

Los exopolisacáridos (EPS) son sustancias poliméricas producidas por microorganismos como material protector ante condiciones de estrés (Rizvi *et al.*, 2019). Los EPS se pueden encontrar de dos maneras: como polisacáridos capsulares unidos covalentemente a la superficie celular y como polisacáridos limosos que están débilmente unidos a la superficie o se encuentran en el medio extracelular (Poli *et al.*, 2010). Los EPS brindan protección a las células contra la desecación y la depredación por parte de protozoos o el ataque de fagos (Gauri *et*

al., 2009). Además, los exopolisacáridos brindan protección a las bacterias ante condiciones ambientales extremas como las altas temperaturas, la inanición, el pH, tensiones iónicas y antibióticos. (Rizvi *et al.*, 2019).

Estos polisacáridos también protegen a la enzima dinitrogenasa reductasa en los ambientes con alta concentración de oxígeno, y a la célula de la penetración de iones metálicos tóxicos gracias a su capacidad de quelar y atrapar metales pesados (Gauri *et al.*, 2009). Los EPS forman un complejo al unirse con las formas iónicas de los metales pesados haciendo que estos metales se vuelvan inaccesibles para los organismos, estos metabolitos son de gran utilidad en la bioadsorción y eliminación de metales de los sitios contaminados (Rizvi *et al.*, 2019). Los EPS pueden enmascarar los efectos de las nanopartículas y limitar las interacciones físicas o químicas intensas con las plantas (Ahmed *et al.*, 2020).

Los EPS son susceptibles a la biodegradación en la naturaleza y menos dañinos que los polímeros sintéticos, lo que los hace una mejor opción como materia prima. Se han encontrado múltiples aplicaciones para los EPS microbianos en la industria alimentaria, farmacéutica, entre otras (Gauri *et al.*, 2009).

Se ha caracterizado la producción de EPS por varios microorganismos como *Pseudomonas* y *Azotobacter* (tabla 11). En *P. fluorescens* psd se da la producción de EPS en aproximadamente 10 µg EPS/mL de cultivo; sin embargo, al exponerse a cantidades mayores de metales como el Zn²⁺ la producción de EPS incrementa, siendo que a una concentración de 5mM de Zn²⁺ se producen aproximadamente 60 µg/mL (Upadhyay & Srivastava, 2014). *Azotobacter* produce EPS que le permite combatir el estrés generado por los metales pesados, la desecación, los antibióticos y el estrés iónico principalmente. *A. chroococcum* CAZ3 produce EPS en cantidades máximas de hasta 580 µg/mL. Puede producirlo aun en presencia de metales pesados teniendo una producción de 260 µg/mL en presencia de 25 µg/mL de cadmio (Rizvi *et al.*, 2019).

Tabla 11. Producción de EPS en *Pseudomonas* y *Azotobacter*.

Rizobacteria	EPS (µg/mL)	Condiciones	Referencia
<i>Pseudomonas fluorescens</i> psd	10	Optimas	Upadhyay & Srivastava, 2014
<i>Pseudomonas fluorescens</i> psd	60	Con 5mM de Zn ²⁺	
<i>Azotobacter chroococcum</i> CAZ3	580	Optimas	Rizvi <i>et al.</i> , 2019
<i>Azotobacter chroococcum</i> CAZ3	260	Con 25 µg/mL de cadmio	

La determinación de la producción de exopolisacáridos se empleó el método de filtración (Bitton & Freihofer, 1977; Mody *et al.*, 1989)

6.12 MELANINA

Las melaninas son sustancias poliméricas sintetizadas por muchos organismos procariontes incluidos los fijadores de nitrógeno (Rizvi *et al.*, 2019). En la síntesis de la melanina participa el catecol, este es sustrato de la enzima fenol oxidasa (Herter *et al.*, 2011). Estos metabolitos están ampliamente dispersos en el reino animal y vegetal, además se les puede encontrar en diversas bacterias y hongos; las melaninas se caracterizan por ser amorfas, heterogéneas, insolubles y resistentes a la cristalización.

Debido a la naturaleza insoluble de estos metabolitos su estudio se ha visto obstaculizado al contar con técnicas limitadas que permitan su investigación (Banerjee *et al.*, 2014). Estos pigmentos están formados a partir de polímeros de compuestos fenólicos (Plonka & Grabacka, 2006). Las melaninas pueden clasificarse en eumelanina, alomelanina, feomelanina, piomelanina y neuromelanina (Banerjee *et al.*, 2014). La clasificación más general solo toma en cuenta a los primeros tres:

- Eumelanina: Pigmento marrón a negro producido por la oxidación de la tirosina a o-dihidroxifenilalanina (DOPA) y dopaquinona que se somete a ciclación a 5,6-dihidroxiindol o ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico.
- Feomelaninas: Pigmento amarillo a rojo que se sintetiza inicialmente como eumelaninas, pero DOPA sufre cisteinilación dando lugar a cisteinil-DOPA

que se polimeriza en derivados de las benzotiazinas (Plonka & Grabacka, 2006).

- Alomelaninas: Grupo heterogéneo que surgen de catecol en presencia de polifenol oxidasa (Banerjee *et al.*, 2014).

La melanina tiene la capacidad de absorber un amplio espectro de ondas electromagnéticas por lo que puede brindar protección a las células bacterianas contra las radiaciones ultravioleta (Rizvi *et al.*, 2019).

Estos pigmentos también pueden proteger a los microorganismos frente a tensiones químicas, térmicas y bioquímicas (Banerjee *et al.*, 2014). Además, estos metabolitos protegen a los microorganismos de las especies reactivas de oxígeno, las altas temperaturas y la toxicidad de los metales pesados (figura 10) (Rizvi & Khan, 2018).

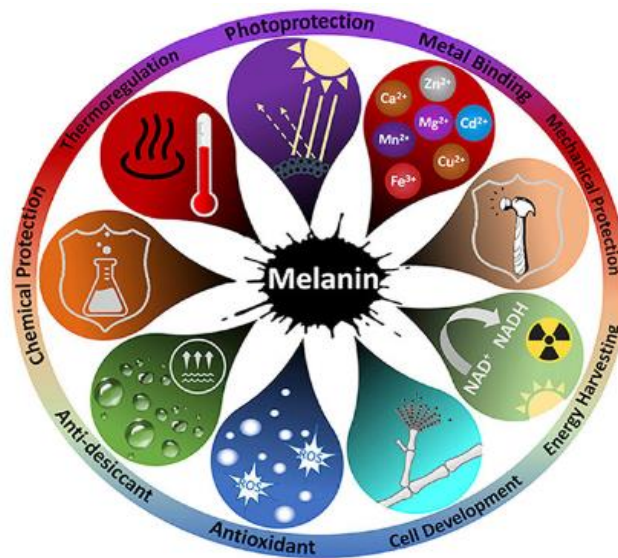


Figura 10. Protección de la melanina ante fuentes de estrés físico y químico (Cordero & Casadevall, 2017)

La melanina presenta una alta afinidad por los iones metálicos y los secuestran, además, tiene la capacidad de recolectar iones metálicos permitiendo el almacenamiento, liberación y el intercambio iónico (Hong & Simon, 2004). Los

grupos carboxílico, fenólico, hidroxilo y amina de este metabolito proporcionan sitios de unión potenciales para los iones metálicos (Nosanchuk & Casadevall, 2006).

La melanina juega un papel importante en la quelación de metales, por lo que permite proteger a las células del estrés oxidativo bajo la contaminación con metales (Contreras-Moreno *et al.*, 2020). Debido a este potencial de secuestro de metales de este metabolito se ha incrementado en el uso de microorganismos en la biorremediación de metales pesados (Cordero & Casadevall, 2017). A pesar de que las melaninas fúngicas han sido ampliamente estudiadas en los procesos de biorremediación como protector para unir de metales, en otros microorganismos como las bacterias, la investigación es escasa (Nosanchuk & Casadevall, 2006). En *A. chroococcum* la melanina realiza la adsorción de metales como el Cr, cadmio (Cd) y níquel (Ni) (Rizvi *et al.*, 2019).

Otros usos potenciales de la melanina la involucran como un semiconductor que forme parte de circuitos electrónicos, baterías y celdas solares; además se ha utilizado como plantilla para la síntesis de las nanoestructuras y nanopartículas de plata u oro con uso como vehículos en la industria alimentaria y de la salud (Martínez *et al.*, 2019).

6.13 PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES

Los biosurfactantes o tensioactivos son un grupo diverso de sustancias tensoactivas anfifílicas que constan de un residuo polar (hidrófilo) compuesto por péptidos, proteínas o sacáridos y un grupo no polar (hidrófobo) compuesto por ácidos grasos saturados, hidroxilados o alcoholes grasos (Pacwa-Plociniczak *et al.*, 2011). Los microorganismos elaboran estos productos extracelulares que son capaces de reducir la tensión superficial y facilitar la absorción, emulsificación y dispersión de los hidrocarburos. Además, mejoran la biodisponibilidad de hidrocarburos para las células microbianas (Thavasi *et al.*, 2009). Esto lo logran al aumentar la superficie de las sustancias hidrófobas insolubles en agua (Pacwa-Plociniczak *et al.*, 2011).

Los biotensioactivos presentan características como menor toxicidad, síntesis a partir de materias primas renovables y mayor biodegradabilidad, y pueden sustituir a los tensioactivos químicos en diversos procesos que implican emulsificación,

detergencia, humectación, solubilización de compuestos hidrófobos, formación de espuma entre otros (Thavasi *et al.*, 2009).

Los biosurfactantes tienen un amplio uso en industrias como la agricultura, la cosmética, en la producción de alimentos, y la farmacéutica entre otras (Pacwa-Plociniczak *et al.*, 2011). Sin embargo, su uso en la industria depende del costo y la facilidad de su producción. Una gran limitante para la producción rentable es su bajo rendimiento (Thavasi *et al.*, 2009). Una posible solución al elevado coste de producción de estos compuestos es que los microorganismos tengan condiciones de crecimiento óptimas con sustratos renovables baratos (tabla 12) (Pacwa-Plociniczak *et al.*, 2011).

Tabla 12. Producción de biosurfactantes bajo distintas fuentes de carbono en *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Azotobacter*.

Rizobacteria	Biosurfactante (mg/mL)	Condición	Referencia
<i>Pseudomonas</i>	4.3	En aceite de motor usado	Thavasi <i>et al.</i> , 2011
<i>Pseudomonas</i>	8.6	En pastel de aceite de cacahuete	Thavasi <i>et al.</i> , 2011
<i>Bacillus sp. HIP3</i>	5.35	En aceite de cocina	Md Badrul Hisham <i>et al.</i> , 2019
<i>Bacillus megaterium</i>	10.5	En pastel de aceite de cacahuete	Thavasi <i>et al.</i> , 2007
<i>Azotobacter chroococcum</i>	0.98- 2.97	En petróleo crudo	Thavasi <i>et al.</i> , 2009
<i>Azotobacter chroococcum</i>	8.7	En pastel de aceite de cacahuete	Thavasi <i>et al.</i> , 2009
<i>Azotobacter chroococcum</i>	5.12	En aceite de motor usado	Thavasi <i>et al.</i> , 2009

Para la determinación de la producción de biosurfactantes fueron empleado los métodos de precipitación ácida y la extracción con solventes (cloroformo y metanol).

Pseudomonas es capaz de producir biosurfactantes a partir de diversos sustratos. En *P.aeruginosa* la producción de biosurfactantes en aceite de motor usado es

aproximadamente de 4.3 mg/mL mientras que en pastel de aceite de cacahuete produce 8.6 mg/mL (Thavasi *et al.*, 2011).

En *Bacillus* sp. HIP3, su cultivo con el aceite de cocina le permite producir 5.35 mg/mL de biosurfactante, el cual es capaz de eliminar metales pesados como plomo, cromo, cadmio y zinc debido a la capacidad del metabolito de quelar metales (Md Badrul Hisham *et al.*, 2019). *Bacillus megaterium* cultivado en pastel de aceite de cacahuete bajo condiciones de crecimiento en el fermentador produce hasta 10.5 mg/mL de biosurfactantes (Thavasi *et al.*, 2007).

Utilizando como sustrato el petróleo crudo para el cultivo de *A. chroococcum*, esta bacteria produce entre 0.98 a 2.97 mg/mL, bajo condiciones de fermentación y usando fuentes de carbono como el pastel de aceite de cacahuete pueden producir hasta 8.7 mg/mL y 5.12 mg/mL en aceite de motor usado, respectivamente (Thavasi *et al.*, 2009). Los biosurfactantes producidos por *Azotobacter vinelandii* permiten la eliminación del aceite crudo del medio hasta en un 48.8% (Devianto *et al.*, 2020).

6.14 PROTECCIÓN A LA PLANTA ANTE METALES PESADOS

Los metales pesados causan un grave peligro ambiental ya que alteran el estado ecológico de la biota (Lenart, 2012). Estos además pueden provocar daños serios en las plantas afectando su crecimiento y rendimiento (Rizvi & Khan, 2018)

El aumento en la concentración de metales como calcio (Ca), nitrógeno (N), hierro (Fe) y potasio (K) en las raíces de las plantas provoca un daño en el crecimiento de la planta afectando la biomasa (Nadeau *et al.*, 2018). El cadmio (Cd) y el cromo (Cr) son metales pesados que llegan a los suelos agrícolas a través de los fertilizantes, pesticidas y aguas residuales, estos metales ejercen un efecto nocivo sobre la biota (Joshi & Juwarkar, 2009). Los metales como plomo (Pb) y cobre (Cu) en cantidades excesivas dañan a la planta ya que generan especies reactivas de oxígeno, ralentizan la tasa de germinación, afectan la altura de la planta y su biomasa, disminuyen la división celular, provocan desequilibrio osmótico, alteran la fotosíntesis, alteran la absorción de nutrientes y la actividad enzimática, así como desequilibrio hormonal (Rizvi & Khan, 2018).

Las cepas de *Azotobacter* presentan resistencia a metales pesados como el Cd, Cu, manganeso (Mn), Pb y zinc (Zn) (Lenart, 2012). *A. chroococcum* en general presentó concentraciones mínimas inhibitorias (MIC por sus siglas en ingles) de cadmio de aproximadamente 200 µg/mL, pero algunas cepas son capaces de tolerar hasta 1600 µg/mL. Además, presentan una concentración mínima inhibitoria de 12.5 µg/mL para mercurio (Hg), 100 µg/mL para níquel (Ni), 200 µg/mL para Cr (III), 200 µg/mL para Cu, 100 µg/mL para Pb y 100 µg/mL para zinc (Aleem *et al.*, 2003).

Azotobacter muestra una concentración mínima inhibitoria de entre 200 a 300 µg/mL de Cr (VI) (Kaushik *et al.*, 2008), también esta bacteria es capaz de resistir a concentraciones máximas de 200 µg/mL de Hg, 1600 µg/mL de Ni, Cu, Cd, Cr (III), Cr (VI) y Zn (Aleem *et al.*, 2003). *Azotobacter* además es capaz de tolerar hasta 1800 µg/mL de Pb (Rizvi *et al.*, 2020).

A.chroococcum CAZ3 es capaz de tolerar concentraciones de 100 µg/mL de Cd, 1000 µg/mL de Cr y hasta 1200 µg/mL de Ni (Rizvi *et al.*, 2019), esta especie también presenta una cantidad mínima inhibitoria de 0.4 mM para Hg, 3.7 mM para Pb, 2.2 mM para Cd, 4.7 mM para Cu, 5.1 mM para Cr (III), 8.1 mM para cobalto (Co), 5.9 mM para Zn y 6.2 mM para Ni. Algunas cepas de *Azotobacter* pueden eliminar la concentración de metales del medio como *A. chroococcum* WA20 que, a una concentración de 4 mM de Co, Zn, Ni y Cu elimina el metal en un 90%, 70%, 80% y un 60%, respectivamente (Abo-amer *et al.*, 2014).

Especies de *Azotobacter* mejoran el crecimiento y rendimiento de las plantas cultivadas en presencia de metales como son el Cu y Pb (Rizvi & Khan, 2018). También pueden minimizar las concentraciones de magnesio (Mg) y calcio (Ca) en la planta (Nadeau *et al.*, 2018). Las PGPR como *Azotobacter* confieren protección a las plantas mediante procesos como la quelación de metales de la rizosfera, la producción de exopolisacáridos, de las moléculas quelantes y el bombeo de iones metálicos fuera de la célula (Gauri *et al.*, 2009). Otros mecanismos incluyen la degradación enzimática/solubilización de metales o la quelación de metales al interior de la célula (Rizvi & Khan, 2018). Previo a su entrada en la célula los iones

metálicos entran en contacto con sustancias poliméricas extracelulares que son producidas por *Azotobacter* y que actúan como la primera barrera que quela los iones metálicos (Joshi & Juwarkar, 2009).

Los exopolisacáridos interactúan con los metales, formando un complejo que evita la entrada del metal en el sistema radicular de la planta, reduciendo así la toxicidad de los metales para las bacterias y las plantas (Gauri *et al.*, 2009). Por otra parte, la melanina producida por *Azotobacter* spp., tiene la capacidad de quelar los metales pesados permitiendo la desintoxicación de suelos contaminados lo que ayuda a la producción de cultivos (Rizvi & Khan, 2018).

Azotobacter elimina la toxicidad de los metales empleando mecanismos de exclusión, secuestro extracelular e intracelular o transformación de metales (Rizvi & Khan, 2018), mediante la producción de metabolitos como el HCN que pueden llevar a cabo el secuestro de los metales, y estructuras como la formación de biopelícula que permiten la exclusión de los metales pesados (Rizvi *et al.*, 2019).

Un ejemplo de la eliminación de la toxicidad de metales es el estudio de *Chlorella vulgaris*, esta es una microalga que tiene la capacidad de eliminar compuestos de nitrógeno y fosforo presentes en las aguas residuales, por lo cual se ha utilizado a esta microalga en el tratamiento de aguas residuales. La combinación de *C. vulgaris*. con *A. chroococcum* aumenta la capacidad de esta alga para eliminar los metales pesados, debido a que *A. chroococcum* promueve su crecimiento, la producción de pigmentos protectores y además produce polisacáridos capsulares que quela a los metales pesados (Ali *et al.*, 2012).

La presencia de *Azotobacter* en suelos contaminados por Cd y Cr reduce la concentración de estos metales en las plantas como el trigo (Joshi & Juwarkar, 2009). La especie *A. salinestrís* tiene la capacidad de eliminar el Pb hasta en un 61.54% tras 72 horas, a través de la producción de exopolisacáridos, la adsorción en su capa externa y la producción de sideróforos (Dhevagi *et al.*, 2021). El uso de *Azotobacter* spp. como una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal en las plantaciones de *Lepidium sativum* actúa de manera benéfica promoviendo el

crecimiento de la planta y le confiere una mayor tolerancia al Cr y Cd aún bajo altas concentraciones de estos metales pesados (Sobariu *et al.*, 2017).

La interacción de los microorganismos benéficos como *Azotobacter* spp. en la superficie de las plantas juega un papel importante en el crecimiento y fortificación de los cultivos en presencia de metales tóxicos (Gauri *et al.*, 2009). Las cepas de *Azotobacter* poseen mecanismos de promoción del crecimiento vegetal como la producción de ácido indol acético, sideróforos, amoníaco y ACC desaminasa aún bajo condiciones estresantes por presencia de metales (Rizvi & Khan, 2018). De hecho, el AIA es capaz de mediar las reacciones morfológicas de las plantas en respuesta al estrés mediante el aumento del crecimiento de las raíces. La producción de este metabolito permite compensar la disminución en el crecimiento de las plantas especialmente en la raíz provocadas por la contaminación con metales. El crecimiento de las raíces mediado por el efecto del AIA puede mejorar el potencial de fitoextracción de metales contaminantes (Fässler *et al.*, 2010). También, las especies de *Azotobacter* presentan la capacidad de fijar nitrógeno, así como producir sustancias fungicidas, fitohormonas y vitaminas que contribuyen al crecimiento de la planta bajo condiciones de estrés (Lenart, 2012). La inoculación de *Azotobacter* reduce la acumulación de metales como el Fe en las hojas de las plantas, y en algunos casos esta bacteria establece asociación con hongos como *Cadophora finlandia* y *Tricholoma sculpturatum* (Nadeau *et al.*, 2018). En suelos contaminados por metales también provoca la reducción de los niveles de prolina sobre las plantas debido a que se mitiga el estrés oxidativo generado por dichos metales (Rizvi & Khan, 2018). Por otra parte, *Azotobacter* spp. en interacción con el hongo *Cadophora finlandia* en sitios contaminados por metales, esta PGPR es capaz de aumentar la concentración de potasio (K) en las raíces debido a la sinergia entre los microorganismos, generando un aumento en el acceso a estos minerales. Los hongos micorrícicos permiten aumentar la absorción de agua y extraer formas insolubles de nutrientes, que en otro caso no estarían disponibles y de igual manera algunas bacterias PGPR como *Azotobacter* aumentan la accesibilidad de los minerales a las plantas (Nadeau *et al.*, 2018).

6.15 BIODEGRADACIÓN (Biorremediación)

Los xenobióticos y otros compuestos químicos pueden afectar el crecimiento y desarrollo de las bacterias del suelo, así como el de las plantas y la salud de los organismos eucariontes (Lenart, 2012). Los derivados fenólicos son un componente importante de la materia orgánica del suelo, pero en cantidades excesivas afectan a la cantidad de nitrógeno disponible y a la dinámica de nutrientes (Gauri *et al.*, 2012).

Los xenobióticos son sustancias químicas extrañas para los organismos, y estos que pueden acumularse en el medio ambiente dañándolo significativamente. Los pesticidas, combustibles, disolventes, metales pesados, antibióticos entre otros son ejemplos de xenobióticos (Lenart, 2012). El aminofenol es un producto químico empleado en diversas industrias, cuyas aguas residuales que contienen o-aminofenol (OAP) provocan una grave contaminación ambiental y pueden afectar la salud humana (Tian *et al.*, 2019). Los clorofenoles son otras sustancias ampliamente usadas como desinfectante y conservante debido a sus efectos bactericidas y fungicidas. El 2,4,6-triclorofenol (TCP) que puede ser un precursor de otros clorofenoles puede causar daños en el medio ambiente además de provocar riesgos en la salud humana (Li *et al.*, 1991).

Algunas bacterias poseen mecanismos que les permiten sobrevivir ante la presencia de los compuestos tóxicos, como *Azotobacter* spp. que es capaz de crecer bajo la acción de ciertos pesticidas como el herbicida linuron en concentraciones de hasta 450 mg/mg, bajo la contaminación por metales pesados como el hierro; además, esta puede presentar resistencia a la presencia de antibióticos como cefoxitina hasta 8 µg/mg (Lenart, 2012), cloranfenicol, nitrofurantoína, cotrimoxazol y tetraciclina a 30 mg; así como estreptomina hasta 10 mg y amoxicilina hasta 25 mg (Abo-amer *et al.*, 2014). También presentan una alta resistencia a otros como polimixina-B (Aleem *et al.*, 2003).

A. chroococcum, *A. vinelandii* y *A. salinestrus* pueden biodegradar clorpirifos un tipo de insecticida organofosforado (Chennappa *et al.*, 2019). La producción de sideróforos les permite a estas especies quelar metales; por otra parte, con la

producción de exopolisacáridos inmovilizan los metales e impiden su entrada a la célula en especial de plomo, cadmio y uranio. También, la formación de biopelícula, producción de melanina y biosurfactantes son algunos de los mecanismos que emplean las bacterias de este género para realizar la biorremediación (Lenart, 2012).

Además, *Azotobacter* contribuye a la degradación de plaguicidas, gracias a que posee genes que expresan enzimas capaces de degradar estos compuestos químicos (Chennappa *et al.*, 2019). El hexaclorociclohexano (HCH) también conocido como lindano es un tipo de plaguicida organoclorado, este es comúnmente utilizado en países en desarrollo por su bajo costo y su efectividad; sin embargo, su uso prolongado e indiscriminado lleva a la creación de sitios contaminados que pueden causar daños en la salud. El uso de *A. chroococcum* para la biorremediación de sitios contaminados con lindano representa una solución factible a este problema, debido a su capacidad de degradar casi el 95% del lindano aplicado en el suelo (Anupama & Paul, 2010).

También, se ha evidenciado que *A. chroococcum* y *A. salinestrus* son útiles para la biodegradación de pesticidas como el glifosfato, forato y la pendimetalina en concentraciones de 5, 3 y 1 por ciento, respectivamente. De hecho *A. salinestrus* es capaz de degradar hasta el 61.5% de la pendimetalina del suelo en condiciones de campo (Chennappa *et al.*, 2018).

Por otra parte, el cianuro es ampliamente usado en diversas industrias y resulta ser altamente tóxico para los organismos, especialmente en el sistema respiratorio, por lo cual las aguas residuales que contienen cianuro son tratadas generalmente mediante el uso de métodos de oxidación química. *Azotobacter vinelandii* presentó una alta resistencia al cianuro (150 mg/L) y eliminó entre el 70 al 90% del cianuro presente en los cuerpos de agua (Kaewkannetra *et al.*, 2009). El uso de microorganismos como *A. vinelandii* es una alternativa de bajo costo y menos riesgo, debido a que la enzima dinitrogenasa reductasa de esta bacteria tiene la capacidad de reducir el cianuro, en forma de cianuro de hidrogeno (HCN), este compuesto actúa como un sustrato de la dinitrogenasa (Koksunan *et al.*, 2013).

Para el tratamiento de aguas residuales que contienen OAP se emplea el uso de reactor de biopelícula aireado por membrana (MABR) y representa una herramienta eficaz. Dentro de la comunidad bacteriana involucrada en este proceso de degradación de OAP, *Azotobacter* cataliza el 2-oxopent-4-enoato a 4-hidroxi-2-oxopentanoato y acetaldehído, y finalmente a acetil CoA, en interacción con otras bacterias *Azotobacter* contribuye considerablemente a la degradación de OAP (Tian *et al.*, 2019).

Algunos microorganismos presentes en el suelo pueden transformar diversas sustancias químicas orgánicas, estas son metabolizadas como fuente de carbono y energía (Gauri *et al.*, 2012). Entre estas las bacterias de *Azotobacter* pueden utilizar TCP y fenol como sustratos de crecimiento. Estas bacterias tienen una alta especificidad por el TCP y en altas densidades celulares conducen la degradación de monoclorofenoles a la conversión parcial de 2,6-diclorofenol y 2,3,6-triclorofenol. La degradación de los mono y diclorofenoles comienza mediante la oxidación de clorocatecoles y posterior a la escisión del cloro para producir la decoloración. La degradación de TCP en esta bacteria se da a través de la vía de la hidroquinona mientras que el fenol se hidroxila a catecol (Li *et al.*, 1991).

Azotobacter puede tolerar el 2,4-dicloro-fenoxiacético (2,4-D), en concentraciones hasta 1000 µg/mL (Abo-amer *et al.*, 2014). *Azotobacter* spp. utilizaron este derivado fenólico (2,4-D), como fuente de carbono y electrones, este es un herbicida de uso común en la agricultura. La degradación de este compuesto implica la eliminación de la cadena lateral del ácido acético y la ruptura del anillo para producir ácidos alifáticos. *Azotobacter* spp., puede degradar este compuesto a ácido 4-clorofenoxiacético, 4-clorofenol y 4-clorocatecol ya sea por una vía oxidativa o una vía no oxidativa (Gauri *et al.*, 2012). *Azotobacter* también presentó una alta tolerancia al fungicida oxiclورو de cobre en dosis máximas de 350 mg x µg (Lenart, 2012).

La acción conjunta de bacterias degradadoras de aceite y bacterias fijadoras de nitrógeno como *Azotobacter* eliminaron de manera efectiva y eficiente el diésel en los suelos contaminados. *A. vinelandii* no solo ayudó aportando nitrógeno a las

bacterias capaces de asimilar los hidrocarburos del diésel; también, esta bacteria pudo degradar el diésel y lo eliminó hasta el 20.5% en un periodo de 40 días (Chaudhary *et al.*, 2019).

6.16 RESISTENCIA A ESTRES SALINO

La salinidad junto con la erosión del suelo y la desertificación son limitaciones ambientales que aumentan gradualmente con el paso de los años en especial en la regiones áridas y semiáridas (Chaudhary *et al.*, 2013). La salinización se produce tanto por procesos naturales como antropogénicos. La salinidad afecta a la producción agrícola a nivel mundial debido a que induce el estrés osmótico mediante la reducción del potencial hídrico del suelo (Van Oosten *et al.*, 2018).

El estrés salino afecta el establecimiento, el desarrollo y disminuye la tasa de germinación de las plantas. Una alternativa que se ha considerado es el uso de microorganismos tolerantes a la sal que al asociarse a las raíces de las plantas puedan mejorar su resistencia y promover el crecimiento de la planta (Chaudhary *et al.*, 2013). En este sentido algunas bacterias del género *Azotobacter* podrían mejorar la tolerancia de las plantas al estrés salino. Dentro de este género se han caracterizado bacterias tolerantes a la desecación y halotolerantes como *A. chroococcum* y *A. salinestrís* que al formar asociación con las raíces de las plantas ejercen actividades de promoción del crecimiento (Van Oosten *et al.*, 2018). *A. salinestrís* ha sido encontrada en regiones áridas y semiáridas, y esta bacteria presentó una resistencia al estrés salino y a la sequía, estimuló el desarrollo de las raíces y aumentó la concentración de algunos elementos como el fósforo y el potasio (Shirinbayan *et al.*, 2018).

Un estudio documentó el aislamiento de bacterias provenientes de cuatro suelos salinos diferentes, se identificaron veintisiete cepas bacterianas que pertenecieron a *A. chroococcum* y *A. vinelandii*, estas cepas presentaron una tolerancia al sodio de hasta el 8% y al usarse como inóculo en plantas de trigo mejoraron la biomasa vegetal y el rendimiento del grano (Chaudhary *et al.*, 2013). La especie *A. salinestrís* presenta un crecimiento máximo en una concentración de 8% de NaCl, pero es capaz de desarrollarse en un 10%, esta bacteria es considerada como un PGPR

idónea para su aplicación en suelos salinos (Chennappa *et al.*, 2018). Por otra parte, la cepa 76A de *A. chroococcum* tolerante a la sal es capaz de mejorar el peso fresco de brotes, peso seco de raíces y de los frutos del tomate. Además, tiene la capacidad de aumentar el calcio citosólico de las plantas que permite la activación de la vía de la sal demasiado sensible (SOS por sus siglas en inglés) para la eliminación de Na⁺ del citoplasma reduciendo así la toxicidad (Van Oosten *et al.*, 2018). La producción de biopelícula por *Azotobacter* además redujo la pérdida de agua por evaporación y aumentó la retención de esta en el suelo lo cual estimuló el crecimiento de la planta (Gauri *et al.*, 2012).

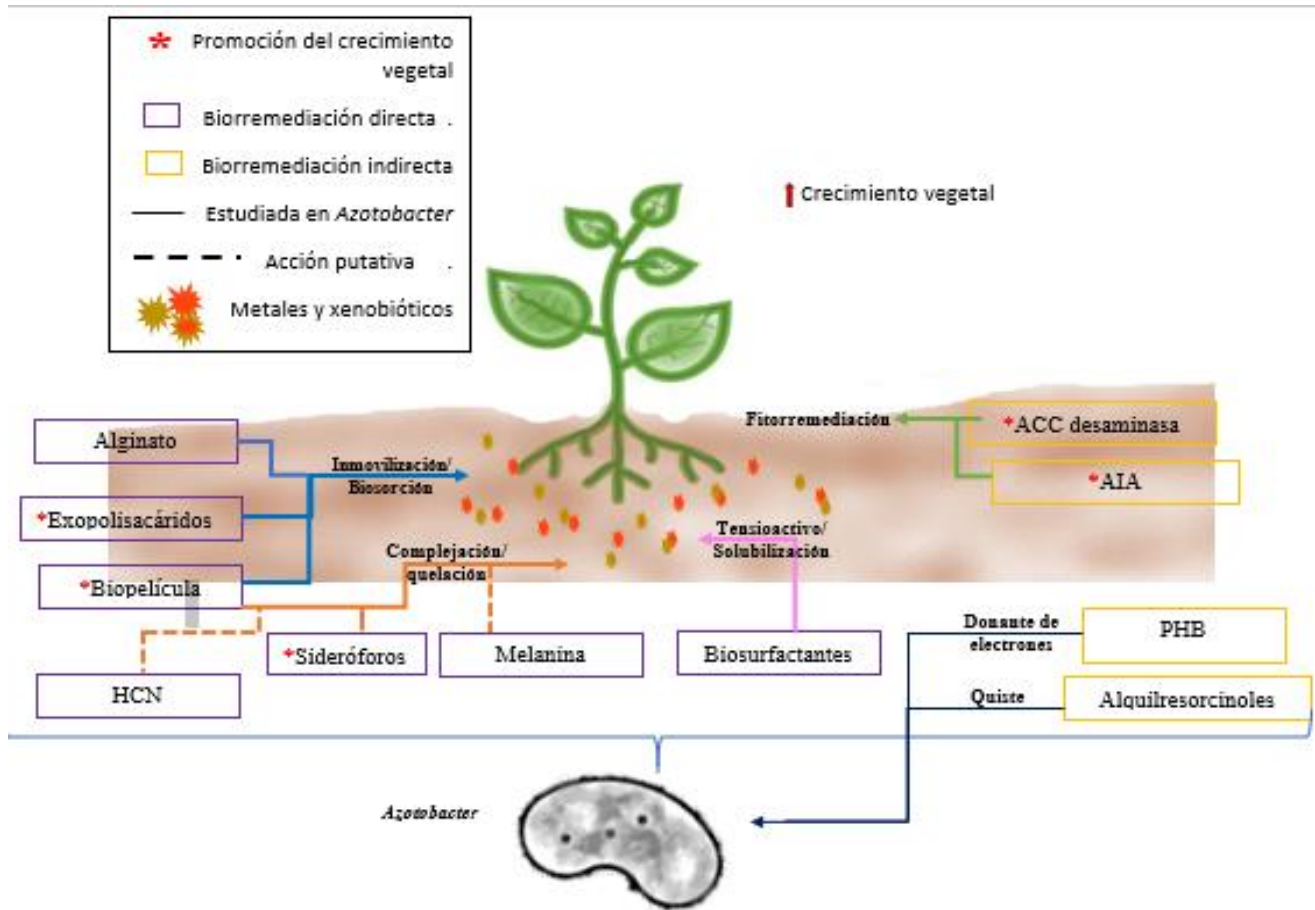


Figura 11. Representación de la participación de los metabolitos secundarios producidos por *Azotobacter* en el proceso de biorremediación.

7. DISCUSIÓN

Los elementos cadmio y plomo son algunos de los metales más tóxicos que inhiben el crecimiento de mamíferos, plantas y microorganismos (González & Ghneim-Herrera, 2021). Los microorganismos que se desarrollan en sitios contaminados presentan diversos mecanismos que les permiten resistir al estrés generado por compuestos tóxicos producto de manera natural o por acción antropogénica (Abo-amer *et al.*, 2014).

En *Azotobacter* se han estudiado ampliamente la fijación biológica de nitrógeno con la actividad de las nitrogenasas, los metabolitos secundarios como el PHB y el alginato. Como ya se ha documentado las nitrogenasas aumentan la disponibilidad de nitrógeno soluble en el suelo para otros organismos como las plantas en las cuales promueve el crecimiento (Wang *et al.*, 2018). *Azotobacter* presenta una alta fijación de nitrógeno siendo que puede fijar hasta un 22% más en comparación con *Pseudomonas* (Florez-Márquez *et al.*, 2017). Considerando su capacidad de fijación de nitrógeno y la versatilidad de las nitrogenasas de especies como *A. vinelandii* (Mankar *et al.*, 2020) algunas áreas como la agricultura podrían beneficiarse con la implementación de esta bacteria.

El PHB se ha descrito como una fuente de carbono para *Azotobacter* en condiciones limitantes de nutrientes y alivia el estrés provocado por la limitación de oxígeno (Pal Saha *et al.*, 2014). También, este metabolito posee un gran interés en la industria manufacturera de materiales plásticos biodegradables, como excipiente para la administración de fármacos y vendas entre otros (Parshad *et al.*, 2001). *Azotobacter* produjo altas cantidades de PHB dependiendo del medio, siendo que *A. chroococcum* MAL-201 cultivada en glucosa (Pal *et al.*, 1997) produjo hasta el doble de PHB en comparación a la producción de *P. putida* KT2440 (Davis *et al.*, 2015) y hasta un 5 % más que *P. fluorescens* A2a5 en un medio formulado con licor de caña de azúcar (Jiang *et al.*, 2008). De igual manera *A. vinelandii* crecida en glicerol puede producir hasta veinte veces más PHB que *P. putida* KT2440 (Wang & Nomura, 2010). Debido a esto *Azotobacter* podría ser la bacteria más idónea para la producción de PHB con fines industriales.

Por otra parte, el alginato es un metabolito secundario necesario en el proceso de enquistamiento de este género bacteriano. En *Azotobacter* la producción de alginato es cuantitativamente mayor que *Pseudomonas* (Aasfar *et al.*, 2021) siendo que *A. vinelandii* produce hasta un 11% más de alginato que *P. fluorescens* y hasta un 48% más que *P. putida* (Conti *et al.*, 1994). Este polímero es usado como agente gelificante o estabilizante en diversas industrias como la cosmética y la alimentaria (Noar & Bruno-Bárcena, 2018) por lo cual el uso de *Azotobacter* puede ser una buena una opción para la producción de este metabolito.

Asimismo, estos metabolitos son útiles en los procesos de biorremediación, como se ha documentado la actividad del alginato producido por las algas, que ayuda a la biosorción de metales como el cromo debido a que los ácidos gulorónicos de los alginatos atrapan cationes divalentes como Cu, Zn, Pb, Cd y Ni (Bertagnolli *et al.*, 2014). Por otra parte, un estudio in vitro ha documentado que el PHB actúa como donante de electrones en los procesos de biorremediación de hidrocarburos clorados y evita la formación de carbono residual que pueda estropear la calidad del agua (Pierro *et al.*, 2017).

La fijación biológica de nitrógeno permite hacer frente a la limitación de nitrógeno en los procesos de biorremediación, debido a que en estos procesos de biodegradación se requiere la suplementación de nutrientes como el nitrógeno (Onwurah, 2004). De hecho, se ha visto que la remediación de hidrocarburos de petróleo por *Pseudomonas* sp. es de un 28% al 40% y que al añadir a *A. vinelandii* como fijador de nitrógeno, esta remediación aumentó a un 52-83% (Onwurah, 2004). De igual forma, la fijación de nitrógeno realizada por los microorganismos en sitios contaminados mejora el crecimiento de las plantas que llevan a cabo la fitorremediación (Ullah *et al.*, 2015), y este proceso de cooperación entre plantas y bacterias basada en la estimulación mutua para la degradación de los contaminantes en suelos se conoce como fito-rizorremediación (Vergani *et al.*, 2017).

Las bacterias adoptan un cambio en la morfología como una estrategia para hacer frente a las tensiones ambientales (Giovanella *et al.*, 2017). En *Azotobacter* este

cambio de morfología corresponde a la formación de quistes. Las endosporas como las producidas por *Bacillus* corresponden a células en reposo especializadas (Wyss *et al.*, 1961). Las endosporas al igual que los quistes le brindan a las células la resistencia al calor, los rayos UV, la exposición a compuestos tóxicos y a la desecación (Checinska *et al.*, 2015). Pero los quistes a diferencia de las endosporas son enzimáticamente activos (Wyss *et al.*, 1961).

Por otra parte, *Pseudomonas* no presenta este cambio de morfología correspondiente a la formación de quistes o endosporas, aunque algunas especies como *P. putida* G7 producen una cápsula de exopolisacáridos que les permite hacer frente a la limitación de nutrientes y puede ofrecer un sitio de unión a iones metálicos como cadmio o plomo (Kachlany *et al.*, 2001). La formación de quistes por *Azotobacter* le confiere una gran ventaja sobre *Pseudomonas*, porque esta estructura le confiere a *Azotobacter* tolerancia a diversas condiciones adversas y le permite ser viable por más tiempo, similar a la producción de endosporas por *Bacillus*; por lo cual *Azotobacter* tienen un alto potencial para su aplicación biotecnológica.

Los quistes producidos por *Azotobacter* se han estudiado particularmente por su capacidad de tolerar a la desecación (Martinez-Ortiz *et al.*, 2020). La capacidad de enquistamiento de *Azotobacter* le permite sobrevivir al menos 10 años en el suelo (Noar & Bruno Bárcena, 2018). Esta capacidad de diferenciación a células metabólicamente latentes junto con la producción de diversos metabolitos secundarios y mecanismos de resistencia muestran a *Azotobacter* como una gran candidata para los procesos de biorremediación.

Como ya se ha descrito la capacidad de *Azotobacter* para la biosíntesis de PHB, alginatos y la fijación biológica de nitrógeno; sin embargo, es importante resaltar que también esta bacteria produce diversos metabolitos secundarios, que poseen un alto potencial para su aplicación biotecnológica y en los procesos de biorremediación. Entre estos destacamos la producción de ácido indol acético, solubilización de fosfatos, alquilresorcinoles, ácido cianhídrico (HCN), producción

de hidrogeno, sideróforos, ACC desaminasa, biopelícula, exopolisacáridos, melanina y biosurfactantes.

De manera general se sabe que la producción de AIA en *Azotobacter* estimula el crecimiento de las plantas, además, está implicado en la fitoestimulación y permite el control de fitopatógenos. Por otra parte, se ha estudiado que este compuesto en *Pseudomonas* estimula la fitoextracción en suelos contaminados por metales pesados (Chen *et al.*, 2017). Las cepas de *Azotobacter* pueden producir altas concentraciones de AIA en especial en medios suplementados con triptófano (Jain *et al.*, 2021), esta capacidad de biosíntesis es similar a las producidas por el género *Pseudomonas* (Malik & Sindhu, 2011); sin embargo, *Azotobacter* produce menor cantidad de AIA si se compara con *P. fluorescens* Sasm05 (Chen *et al.*, 2017) y con algunas cepas de *Bacillus* como es el caso de *B. subtilis* MNU16 (Upadhyay *et al.*, 2017). Sin embargo, es importante enfatizar que *A. salinestris* pueden llegar a producir hasta el doble de AIA comparado con la producción de *Pseudomonas* y *Bacillus* (Omer *et al.*, 2016), lo cual podría ser útil en las prácticas agrícolas y los procesos de biorremediación de suelos.

Como ya se ha mencionado *Azotobacter* puede solubilizar fosfatos insolubles y proveer a las plantas de fosfatos biodisponible bajo condiciones estresantes como la sequía o la contaminación con pesticidas. *Azotobacter* presenta una baja solubilización de fosfatos (Das, 2019) en comparación con *Pseudomonas putida* que presenta una solubilización de fosfatos aproximadamente diez veces mayor (Teng *et al.*, 2019). En *Pseudomonas fluorescens* BIHB 740 solubiliza fosfatos hasta un 450% más que *Azotobacter* (Vyas & Gulati, 2009). De igual manera *Bacillus subtilis* solubiliza hasta 48 veces más fosfatos que *Azotobacter* (Upadhyay *et al.*, 2017). De manera general *Azotobacter* presenta una baja solubilización de fosfatos en comparación con otros géneros bacterianos como *Pseudomonas* y *Bacillus*, sin embargo, la construcción de transformantes de *Azotobacter* podrían solubilizar una mayor cantidad de fosfatos tal como se describió en las transformantes PMMB206, PMMBEPS1 y PMMBEGS1 de *A. vinelandii* (Sashidhar & Podile, 2009).

Las bacterias del género *Azotobacter* como *A. vinelandii* producen HCN que estimula el crecimiento vegetal y presenta actividad antifúngica contra fitopatógenos de los géneros *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Aspergillus*. La producción de HCN por *Azotobacter* se produce en un menor porcentaje de especies en comparación con *Pseudomonas* y *Bacillus* (Ahmad *et al.*, 2008). Además, la producción es moderada (Maheshwari *et al.*, 2012) a diferencia de *Pseudomonas* que presenta una alta producción de HCN (Alström & Burns, 1989); sin embargo, estos datos son cualitativos y para establecer una comparación adecuada se requiere determinar la cantidad de HCN producido.

Bacillus spp. produce HCN, que actúa como un promotor del crecimiento vegetal (Radhakrishnan *et al.*, 2017). En general la actividad del HCN contra fitopatógenos también se ha documentado en *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Alcaligenes faecalis* (Ndeddy Aka & Babalola, 2016). En *P. fluorescens* CHA0 se ha observado que el HCN destaca su actividad como agente complejante de metales y aumentó la disponibilidad del fosfato, induciendo el crecimiento vegetal, y con menor relevancia el HCN presentó la actividad para inhibir el crecimiento de fitopatógenos (Rijavec & Lapanje, 2016). En *Azotobacter* se ha estudiado ampliamente el papel del HCN contra los fitopatógenos y su impacto en la promoción del crecimiento vegetal; sin embargo, hay poca información sobre su posible papel como un agente complejante de metales y su capacidad de aumentar la disponibilidad de nutrientes para las plantas.

La inoculación de *Azotobacter* spp. en plantas, permitió reducir el uso de fertilizantes químicos, aumentó el rendimiento de nitrógeno en los cultivos, además de mantener el estado ambiental sin perturbaciones (Song *et al.*, 2020). Es relevante destacar que el género *Azotobacter* ha sido ampliamente estudiado como una PGPR en vegetales como: maíz, chícharo, arroz, pepino, algodón, tomate, trigo, sorgo, cilantro, avena, sésamo, cebada, zanahoria, cebolla, papa, berenjena entre otros, incluso bajo condiciones de estrés para la planta inoculada, esta caracterización como PGPR es similar a los géneros de *Pseudomonas* y *Bacillus*, sin embargo, los

metabolitos que produce *Azotobacter* que impactan en el crecimiento vegetal también pueden ser aplicados en otros ámbitos biotecnológicos.

También se ha documentado que *Azotobacter* ayuda en el control de diversos fitopatógenos tales como hongos pertenecientes a *Fusarium*, *Aspergillus* (Ahmad *et al.*, 2008), *Alternaria*, *Sclerotium* entre otros (Chennappa *et al.*, 2019). Además, actúa contra nemátodos como *Meloidogyne incógnita* (Das, 2019) y contra bacterias como *Listeria monocytogenes* (Sharma *et al.*, 2020). Esta protección conferida por *Azotobacter* podría permitir la reducción del uso de pesticidas, fungicidas y otros compuestos químicos que son usados con el fin de controlar las plagas de los cultivos.

En *Pseudomonas putida* CSV86 se ha documentado que los genes implicados en la resistencia a metales pesados CSV86 como cadmio, cobalto, arsénico, cromo y zinc se encuentran en su genoma, y también en plásmidos (Paliwal *et al.*, 2014), además se ha descrito que estos genes de resistencia pueden localizarse en transposones (Aleem *et al.*, 2003), como se ha reportado en *Pseudomonas fluorescens* SM1, esta bacteria presentó el plásmido pSM1, que participa en la desintoxicación de Cr (VI) (Wasi *et al.*, 2008). En *A. chroococcum* se han encontrado seis plásmidos; sin embargo, ninguno está involucrado en la resistencia a metales pesados, antibióticos o luz UV (Robson *et al.*, 1984). Debido a esto podemos sugerir que la resistencia a metales pesados en *A. chroococcum* está localizada en su genoma, lo cual evita la pérdida de la información para la resistencia a metales confiriéndole cierta ventaja sobre algunas *Pseudomonas*.

A. chroococcum generó EPS eficientes para unir plomo, cadmio y uranio y evitó la entrada de metales al interior de las células (Lenart, 2012). Además, *A. chroococcum* CAZ3 produjo altas cantidades de EPS en condiciones óptimas (Rizvi *et al.*, 2019) cuya producción fue 26 veces superior a la presentada por *Pseudomonas fluorescens* psd (Upadhyay & Srivastava, 2014).

La producción de EPS se puede ver afectada por la presencia de metales pesados siendo que *Azotobacter chroococcum* CAZ3 disminuyó la producción de EPS hasta un 50% en presencia de metales como el cadmio (Rizvi *et al.*, 2019) a diferencia de

Pseudomonas fluorescens psd cultivada con zinc, en esta la producción de EPS es seis veces mayor (Upadhyay & Srivastava, 2014). En *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 la producción de EPS contribuye al aumento de la resistencia a metales y actúa a través de la quelación o secuestro de cationes de metales divalentes (Teitzel & Parsek, 2003). De la misma manera en *P. putida* C50A la síntesis de EPS protegió a las células del efecto tóxico del mercurio (Giovanella *et al.*, 2017). En *Bacillus* spp. se ha observado que la producción de EPS recubre las raíces de las plantas y restringió el flujo pasivo de Na⁺, lo cual permitió mitigar los efectos del estrés salino (Radhakrishnan *et al.*, 2017).

Como se describió previamente *Azotobacter* tiene la capacidad de producir biopelícula. Esta estructura promueve las interacciones bacteria- planta y es capaz de estimular el crecimiento vegetal (Velmourougane *et al.*, 2019). Además, la producción de biopelícula brindó protección a *Azotobacter* y a las plantas en contra del daño provocado por especies metálicas como se ha documentado en *A. chroococcum* W5 (Boddupalli *et al.*, 2017) y *A. salinestris* (Ahmed *et al.*, 2020).

En otras bacterias como *P. aeruginosa* la formación de la biopelícula les genera resistencia a los iones de cobre, plomo y zinc (Igiri *et al.*, 2018). La producción de biopelícula en *P. aeruginosa* PAO1 incrementó la protección contra metales pesados en comparación con las células planctónicas, como las células de la biopelícula resisten el doble de la concentración de plomo en comparación a las planctónicas y en presencia de cobre la resistencia es seiscientos veces mayor (Teitzel & Parsek, 2003). Si bien en *Azotobacter* no se ha caracterizado muy bien la capacidad de protección contra especies metálicas, como se ha documentado en *Pseudomonas*, sin embargo, se sugiere que la producción de biopelícula en *Azotobacter* puede ser de gran interés biotecnológico en especial en el campo de la agricultura, además, puede ser de gran interés para la biorremediación de sitios contaminados con estos metales.

Como se ha documentado *Azotobacter* produce distintas clases de sideróforos, unos ejemplos son: *A. chroococcum* produce tres tipos que son la vibrioferrina, anfibiactina y crochelin A, en el caso de *A. salinestris* produce compuestos tipo

hidroxamato y finalmente en *A. vinelandii* se han descrito hasta cinco tipos de sideróforos como el ácido 2,3-dihidroxibenzoico, la azotobactina, la aminoquelina, la azotoquelina y la protoquelina. Recientemente se han identificado en el genoma de *A. vinelandii* los genes para la síntesis de la vibroferrina y otros sideróforos tipo catecol (Baars *et al.*, 2015).

En el caso de *Pseudomonas* producen una menor variedad de sideróforos. Todas las *Pseudomonas* fluorescentes producen el sideróforo pioverdina (Matthijs *et al.*, 2007). Y algunas especies como *P. putida* producen un sideróforo secundario como la piridina-2,6- ácido ditiocarboxílico (PTDC por sus siglas en inglés), además de la pioverdina (Lewis *et al.*, 2004). *P. fluorescens* produce dos sideróforos la pioverdina y la quinolobactina (Matthijs *et al.*, 2007). En caso contrario, *Bacillus subtilis* produce una mayor variedad de sideróforos tal como el ácido itoico, bacilibactina, shizokinen, petrobactina, corinebactina enantio-eterobactina entre otros (Khan *et al.*, 2016). Además, la producción de sideróforos y de los exopolisacáridos de *Bacillus* spp. permitió restringir el flujo de iones tóxicos, ajustó el equilibrio iónico y el transporte de agua en el tejido vegetal (Radhakrishnan *et al.*, 2017). Sin embargo, en cuanto a la producción de sideróforos *A. vinelandii* es capaz de producir hasta 1.4 veces más sideróforos que *Bacillus subtilis* (Ferreira *et al.*, 2019) y hasta siete veces más sideróforos que *Pseudomonas fluorescens* DSM 50090 (Vindeirinho *et al.*, 2021).

Como se ha aludido previamente, la síntesis de ACC desaminasa permite disminuir el estrés de las plantas provocado por la producción de etileno. *Azotobacter* produce cantidades considerables de ACC desaminasa y particularmente *A. chroococcum* es capaz de producir esta enzima aún bajo estrés por metales pesados (Rizvi & Khan, 2018). La producción de ACC desaminasa también es generada por *Pseudomonas* y *Bacillus*; sin embargo, la producción de esta enzima en *A. chroococcum* fue un 56 % menor en comparación con *Bacillus cereus*, y un 60% menos que la producción de *Pseudomonas* sp. (Grobela *et al.*, 2018) y un 45% menor a la producida por *P. aeruginosa* (Pandey *et al.*, 2019).

Por otra parte, se ha reportado que *A. salinestris* produjo 95 veces más ACC desaminasa que *Bacillus* y en comparación con la producción *Pseudomonas* fue

mayor (Omer *et al.*, 2016). En *Pseudomonas* spp. y en algunas cepas de *Bacillus* se ha documentado que la producción de ACC desaminasa permitió la acumulación de metales en el tejido vegetal y mejoró la fitoextracción en sitios contaminados (Grobela *et al.*, 2018), la capacidad de *Azotobacter* para producir esta enzima aun en cantidades menores, posiblemente también ayude en el proceso de fitorremediación como sucede en *Pseudomonas* y *Bacillus*. La síntesis de ACC desaminasa por *A. chroococcum* bajo estrés por metales es de interés agronómico ya que podría permitir mejorar la producción de los cultivos en suelos contaminados (Rizvi & Khan, 2018).

Como ya se señaló la melanina producida por *A. chroococcum* está involucrada en la protección y la adsorción de metales como el Cr, Cd y Ni, esto sugiere que este metabolito podría actuar como un agente quelante de metales pesados (Rizvi *et al.*, 2019). La capacidad de quelación de metales se ha estudiado ampliamente en las melaninas fúngicas en las cuales se ha observado una alta afinidad y capacidad de unir iones metálicos (Cordero & Casadevall, 2017). Sin embargo, esta capacidad de quelación de metales no ha sido muy estudiada en *Azotobacter*.

Azotobacter produce alquilresorcinoles en altas concentraciones, la producción de *A. chroococcum* fue hasta 55 veces superior que en *Pseudomonas* (Kozubek *et al.*, 1996). Estos metabolitos han sido ampliamente estudiados en plantas, la producción de alquilresorcinoles juega un papel importante en el control de patógenos en estas (Ciccoritti *et al.*, 2014). Sin embargo, en las bacterias no se conoce mucho acerca de su acción; aunque son producidos por una gran variedad de géneros como *Pseudomonas* y *Azotobacter*, estos metabolitos pueden ser de gran interés industrial.

Azotobacter es capaz de utilizar una gran variedad de compuestos xenobióticos como clorofenoles, herbicidas, insecticidas organofosforados, plaguicidas organoclorados como el lindano, compuestos fenólicos e hidrocarburos como fuente de carbono (Aleem *et al.*, 2003; Lenart, 2012; Abo-amer *et al.*, 2014). A través de la producción de biosurfactantes *Azotobacter* posee la capacidad de remediar los sitios contaminados con los compuestos derivados del petróleo (Thavasi *et al.*,

2009). La producción de otros compuestos como sideróforos, EPS, melanina, ACC desaminasa y la solubilización de fosfatos les permite a estas bacterias desarrollarse en sitios contaminados por compuestos xenobióticos y eliminarlos. La capacidad metabólica que presenta *Azotobacter* es similar e incluso superior a otras bacterias como *Pseudomonas putida* CSV86 que utiliza compuestos aromáticos como el naftaleno, ácido fenilacético, alcohol bencílico, benzoato, salicilato y el ácido p-hidroxifenilacético como fuente de carbono preferencial sobre la glucosa (Paliwal *et al.*, 2014). *Azotobacter* tiene la capacidad de eliminar una gran variedad de compuestos xenobióticos lo cual puede ser útil para llevar a cabo procesos de biorremediación y como ventaja adicional de esta bacteria es su capacidad de fijar nitrógeno, este es un recurso que suele ser limitante.

En *Azotobacter chroococcum* la información genética para la degradación de xenobióticos, esta albergada en el plásmido pMSB1, este expresa genes involucrados en la disimilación del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (Balajee & Mahadevan, 1989). En el caso de *P. putida* CSV86 la capacidad de degradación de naftaleno y otros compuestos aromáticos está integrada en el cromosoma (Paliwal *et al.*, 2014); y para *P. putida* KT2440 el plásmido PaW le brinda a la cepa la tolerancia a altas concentraciones de tolueno (Kivisaar, 2020).

Azotobacter tiene la capacidad de producir biosurfactantes usando fuentes de carbono económicas como el pastel de aceite de cacahuete y el aceite de motor usado, estos son 2 y 3 veces más eficiente, respectivamente, en comparación al uso de petróleo crudo como fuente de carbono (Thavasi *et al.*, 2009).

En *Azotobacter* la producción de biosurfactantes es mayor que en *Pseudomonas* siendo aproximadamente 20% más utilizado el aceite de motor usado como fuente de carbono y un 1% más que el pastel de aceite de cacahuete (Thavasi *et al.*, 2011). *Azotobacter* produjo un 21% menos biosurfactantes en comparación con *Bacillus*, usando como fuente de carbono el pastel de aceite de cacahuete (Thavasi *et al.*, 2007). En otros medios suplementados con el aceite de cocina usado *Bacillus* produce cantidades similares a *Azotobacter* y también con aceite de motor usado (Md Badrul Hisham *et al.*, 2019).

A pesar de lo anterior, *Azotobacter* es útil en la eliminación de la contaminación del aceite y en su biorremediación como se ha evidenciado en *Azotobacter vinelandii* (Devianto *et al.*, 2020), también es posible que los biosurfactantes participen en la eliminación de metales pesados como se ha descrito en *Bacillus* sp. HIP3 (Md Badrul Hisham *et al.*, 2019); sin embargo, los estudios sobre los biosurfactantes producidos por *Azotobacter* son escasos.

Azotobacter se ha documentado como productor de gas de H₂, el cual puede ser utilizado como una fuente de energía alternativa a los combustibles fósiles. La producción de hidrógeno puede actuar como fuente de combustible para diversos procesos, además puede intercambiarse en las dinámicas comunitarias de los consorcios bacterianos (Barney, 2020). *Azotobacter* puede producir H₂ de manera individual (Knutson *et al.*, 2018) y en conjunto con algas o cianobacterias logrando una producción alta de este gas (Xu *et al.*, 2017). Actualmente son pocos los estudios que abordan la producción de H₂ por *Azotobacter*, sin embargo, estas bacterias podrían ser una gran alternativa para producir este gas con aplicación en la industria química, metalúrgica entre otras (Barney, 2020).

En este trabajo encontramos una gran cantidad de artículos que demuestran que *Azotobacter* produce diversos metabolitos secundarios que juegan un papel importante en la remediación de sitios contaminados con metales pesados. Además, este género presenta una gran resistencia ante diversos metales pesados como Hg²⁺, Pb²⁺, Cd²⁺, Cu²⁺, Cr³⁺, Cr⁶⁺, Co²⁺, Zn²⁺ y Ni²⁺ (Lenart, 2012).

Por otra parte, *Bacillus* spp. alivió el estrés por metales pesados mediante la reducción de la peroxidación de lípidos, aumentó el agua y los nutrientes disponibles, empleando la producción de pigmentos y la regulación de la producción de antioxidantes como la enzima superóxido dismutasa, que promovió el crecimiento de las plantas en suelos contaminados por metales (Radhakrishnan *et al.*, 2017).

Especies como *A. chroococcum* son capaces de resistir concentraciones más altas de metales pesados en comparación con *Pseudomonas* y *Bacillus*, como *A. chroococcum* que fue capaz de tolerar (con una mínima inhibición) concentraciones

de Cr^{6+} cuatro veces superior (Kaushik *et al.*, 2008) en comparación con *P. putida* NPS, es importante enfatizar que estas concentraciones ejercen un efecto tóxico en esta bacteria (Yang *et al.*, 2019). En cuanto a tolerancia a Hg^{2+} *Azotobacter* tolera concentraciones hasta once veces más que *P. fluorescens* (Zhang *et al.*, 2019).

La resistencia de *Azotobacter* a metales pesados es superior en comparación con *B. subtilis*, como el caso de la tolerancia a Cr^{3+} que fue más del doble para *Azotobacter* y 10 veces mayor para Cd^{2+} , para Zn^{2+} fue el doble, y para Cu^{2+} fue el triple de resistencia en comparación a *Bacillus*. En cuanto a la resistencia de *B. subtilis* a Hg^{2+} , este presentó una resistencia del 30% más que *Azotobacter* (Upadhyay *et al.*, 2017). En *Pseudomonas* sp. también se observó mayor tolerancia a Hg^{2+} y Ni^{2+} , esta fue del doble (Giovanella *et al.*, 2017) en comparación con *A. chroococcum* (Abo-amer *et al.*, 2014).

Azotobacter además de presentar tolerancia a distintos metales pesados puede ayudar en la biorremediación de estos contaminantes. Al compararse la capacidad de eliminación de estos metales, se observó mayor eficiencia de *Azotobacter* que en *P. putida*, además, *Azotobacter* spp. eliminó hasta un 20% más de cobalto, un 30% más de níquel, y un 10% más de cobre; y en comparación con *B. licheniformis*, este redujo un 40% más de zinc (Kamika & Momba, 2013); sin embargo, en *P. fluorescens* la eliminación de zinc fue similar (Upadhyay & Srivastava, 2014).

Las concentraciones de metales pesados que toleran los organismos pueden variar dependiendo de la especie, la cepa y las condiciones en las que se desarrollen las bacterias (Joshi & Juwarkar, 2009), a pesar de lo antes mencionado, es evidente que *Azotobacter* tiene la facultad de tolerar concentraciones altas de estos metales y llevar a cabo la eliminación de estos contaminantes de manera similar o incluso superior que *Pseudomonas* y *Bacillus*, estos géneros suelen aplicarse en procesos de biorremediación para la eliminación de metales pesados. La aplicación de *Azotobacter* y sus metabolitos secundarios podría ser de gran utilidad para la remediación eficiente de sitios contaminados con metales pesados provocados por el desarrollo industrial.

La resistencia a grandes concentraciones salinas representa otra de las ventajas ya descritas de *Azotobacter*, de manera general estas bacterias se desarrollan bien a concentraciones salinas del 1% de NaCl; sin embargo, la mayoría de los aislados presentó tolerancia a concentraciones de 2 y 4% de sal (Abo-amer *et al* 2014). Lo cual es relativamente mayor a *Pseudomonas putida* NP5, quien es capaz de resistir como máximo del 2% de NaCl (Yang *et al.*, 2019). Es importante resaltar que algunas especies de *Azotobacter* han presentado resistencia a 8% y 10% de sal. Lo anterior avala a este género bacteriano como un gran recurso para hacer frente a la salinidad que afecta a los suelos y coadyuvar en diversas actividades como la agricultura, donde puede promover el crecimiento vegetal y brindar protección a la planta aun en condiciones muy salinas.

Por otra parte, el uso inadecuado de productos fitosanitarios puede provocar un daño sobre la microbiota del suelo y las plantas, debido a la acumulación de estos compuestos en el medio ambiente (Lenart, 2012). Es por esto, que las bacterias del género *Azotobacter* suelen emplearse como biofertilizantes en la agricultura, y también pueden ser un buen recurso para la remediación ambiental (Gauri *et al.*, 2012). El uso de *Azotobacter* spp., permite reducir el uso de fertilizantes químicos, aumentar el rendimiento de nitrógeno en los cultivos y mantener el estado ambiental sin perturbaciones (Song *et al.*, 2020). De hecho *A. chroococcum* ya se vende como biofertilizante (Gawin *et al.*, 2020).

Es importante destacar que el género *Azotobacter* se ha documentado ampliamente como una bacteria promotora de crecimiento vegetal (a lo largo de 100 años de estudio), y es uno los productores más eficientes de PHB y alginato, sin embargo, en este trabajo, se ha presentado las potencialidades de este género como un importante modelo bacteriano para la biorremediación de metales pesados y xenobióticos, así como un prometedor agente de biocontrol.

8. CONCLUSIONES

1. Se investigó y compiló la capacidad metabólica de *A. vinelandii*, *A. chroococcum* y *A. salinestrís* para la biosíntesis de los metabolitos secundarios: sideróforos, melanina, ácido indol acético, ácido cianhídrico, PHB, alginato, ACC desaminasa, exopolisacáridos, alquilresorcinoles, biosurfactantes, así como la formación de biopelícula, solubilización de fosfato y fijación de nitrógeno, estos productos metabólicos tienen amplia aplicación en diversas industrias y representan una alternativa biotecnológica a los compuestos químicos.
2. Los metabolitos secundarios producidos por *A. vinelandii*, *A. chroococcum* y *A. salinestrís* brindan protección contra fitopatógenos, aumentan el acceso a los nutrientes y estimulan la división celular en las plantas con las que interacciona este género, promoviendo el crecimiento vegetal.
3. La capacidad de *A. vinelandii*, *A. chroococcum* y *A. salinestrís* para producir sideróforos, melanina, ácido indol acético, ácido cianhídrico, PHB, alginato, ACC desaminasa, exopolisacáridos, biosurfactantes, biopelícula, solubilización de fosfato y fijación brindan a las plantas protección a metales pesados a través de la quelación, captación y transformación de estos compuestos.
4. Los metabolitos secundarios producidos por *A. vinelandii*, *A. chroococcum* y *A. salinestrís* les confiere resistencia a xenobióticos y estos compuestos permiten a las bacterias neutralizar o transformar estas sustancias tóxicas en sustancias menos tóxicas; además estos metabolitos son útiles para los procesos de biorremediación como se ha documentado en otros géneros bacterianos.

9. PERSPECTIVAS

- Realizar la evaluación experimental de la actividad de resistencia de *Azotobacter* ante metales pesados y xenobióticos, conferida por los metabolitos producidos tanto en cepas tipo como en las cepas silvestre aún no estudiadas.
- Determinar en *Azotobacter* la producción cuantitativa de los metabolitos secundarios con aplicación en procesos de biorremediación.
- Evaluar la aplicación de los metabolitos secundarios en estudios in vitro y en campo sobre la capacidad de biorremediación

10. REFERENCIAS

Aasfar, A., Bargaz, A., Yaakoubi, K., Hilali, A., Bennis, I., Zeroual, Y., & Meftah Kadmiri, I. (2021). Nitrogen Fixing *Azotobacter* Species as Potential Soil Biological Enhancers for Crop Nutrition and Yield Stability. *Frontiers in microbiology*, 12, 628379. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628379>

Abo-amer Aly E., Abu-gharbia Magdy A., Soltan, E.-S. M., & Abd El-Raheem, W. M. (2014). Isolation and Molecular Characterization of Heavy Metal-Resistant *Azotobacter chroococcum* from Agricultural Soil and Their Potential Application in Bioremediation. *Geomicrobiology Journal*, 31(7), 551–561. doi:10.1080/01490451.2013.850561

Ahmad, F., Ahmad, I., & Khan, M. S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 163(2), 173–181. doi:10.1016/j.micres.2006.04.001

Ahmed, B., Syed, A., Rizvi, A., Shahid, M., Bahkali, A.H., Khan, M.S., Musarrat, J., (2020) Impact of Metal-Oxide Nanoparticles on Growth, Physiology and Yield of Tomato (*Solanumlycopersicum* L.) Modulated by *Azotobacter salinestris* strain ASM, *Environmental Pollution*, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116218>.

Aleem A, Isar J, Malik A. (2003). Impact of long-term application of industrial wastewater on the emergence of resistance traits in *Azotobacter chroococcum* isolated from rhizospheric soil. *Bioresource Technology*, 86(1), 7–13. doi:10.1016/s0960-8524(02)00134-7

Ali, S. M., Nasr, H. S., & Abbas, W. T. (2012). Enhancement of *Chlorella vulgaris* growth and bioremediation ability of aquarium wastewater using diazotrophs. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 15(16), 775–782. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2012.775.782>

Alström, Sadhna & Burns, Richard. (1989). Cyanide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. *Biology and Fertility of Soils*. 7. 232-238. 10.1007/BF00709654.

Altaf, M., & Malik, A. (2019). Detection of plant growth promoting activities among *Azotobacter* sp. isolated from the soil receiving pulp and paper mill effluents. *Acta Scientific Microbiology*, 2(3), 36-45.

Anupama, K. S., & Paul, S. (2010). Ex situ and in situ biodegradation of lindane by *Azotobacter chroococcum*. *Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes*, 45(1), 58–66. <https://doi.org/10.1080/03601230903404465>

Baars, O., Zhang, X., Morel, F. M., & Seyedsayamdost, M. R. (2015). The Siderophore Metabolome of *Azotobacter vinelandii*. *Applied and environmental microbiology*, 82(1), 27–39. <https://doi.org/10.1128/AEM.03160-15>

Balajee, S., & Mahadevan, A. (1989). Evidence for a dissimilatory plasmid in *Azotobacter chroococcum*. *FEMS microbiology letters*, 53(1-2), 223–227. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(89\)90395-9](https://doi.org/10.1016/0378-1097(89)90395-9)

Banerjee, A., Supakar, S., & Banerjee, R. (2014). Melanin from the nitrogen-fixing bacterium *Azotobacter chroococcum*: a spectroscopic characterization. *PloS one*, 9(1), e84574. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084574>

Barney, Brett. (2020). Aerobic nitrogen-fixing bacteria for hydrogen and ammonium production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 104. [10.1007/s00253-019-10210-9](https://doi.org/10.1007/s00253-019-10210-9)

Bertagnolli, C., Uhart, A., Dupin, J. C., da Silva, M. G., Guibal, E., & Desbrieres, J. (2014). Biosorption of chromium by alginate extraction products from *Sargassum filipendula*: investigation of adsorption mechanisms using X-ray photoelectron spectroscopy analysis. *Bioresource technology*, 164, 264–269. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.103>

Bitkov, V. V., Nenashev, V. A., Pridachina, N. N., & Batrakov, S. G. (1992). Membrane-structuring properties of bacterial long-chain alkylresorcinols. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1108(2), 224–232. doi:10.1016/0005-2736(92)90029-I

Bitton, G., & Freihof, V. (1977). Influence of extracellular polysaccharides on the toxicity of copper and cadmium toward *Klebsiella aerogenes*. *Microbial Ecology*, 4(2), 119–125. doi:10.1007/bf02014282

Blumer, C., & Haas, D. (2000). Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Archives Of Microbiology*, 173(3), 170-177. doi: 10.1007/s002039900127

Boddupalli, A., Tiwari, R., Sharma, A., Singh, S., Prasanna, R., & Nain, L. (2017). Elucidating the interactions and phytotoxicity of zinc oxide nanoparticles with agriculturally beneficial bacteria and selected crop plants. *Folia microbiologica*, 62(3), 253–262. <https://doi.org/10.1007/s12223-017-0495-x>

Chaudhary, D. K., Bajagain, R., Jeong, S.-W., & Kim, J. (2019). Development of a bacterial consortium comprising oil-degraders and diazotrophic bacteria for elimination of exogenous nitrogen requirement in bioremediation of diesel-contaminated soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(7). doi:10.1007/s11274-019-2674-1

Chaudhary, D., Narula, N., Sindhu, S. S., & Behl, R. K. (2013). Plant growth stimulation of wheat (*Triticum aestivum* L.) by inoculation of salinity tolerant *Azotobacter* strains. *Physiology and molecular biology of plants: an international journal of functional plant biology*, 19(4), 515–519. <https://doi.org/10.1007/s12298-013-0178-2>

Checinska, A., Paszczyński, A., & Burbank, M. (2015). *Bacillus* and other spore-forming genera: variations in responses and mechanisms for survival. *Annual review of food science and technology*, 6, 351–369. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030713-092332>

Chen, B., Luo, S., Wu, Y., Ye, J., Wang, Q., Xu, X., Pan, F., Khan, K. Y., Feng, Y., & Yang, X. (2017). The Effects of the Endophytic Bacterium *Pseudomonas fluorescens* Sasm05 and IAA on the Plant Growth and Cadmium Uptake of *Sedum alfredii* Hance. *Frontiers in microbiology*, 8, 2538. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02538>

Chennappa, G., Sreenivasa, MY y Nagaraja, H. (2018). *Azotobacter salinestris*: A Novel Pesticide-Degrading and Prominent Biocontrol PGPR Bacteria. *Microorganisms for Green Revolution*, 23–43. doi: 10.1007 / 978-981-10-7146-1_2

Chennappa, G., Udaykumar, N., Vidya, M., Nagaraja, H., Amaresh, Y. S., & Sreenivasa, M. Y. (2019). *Azotobacter*—A Natural Resource for Bioremediation of Toxic Pesticides in Soil Ecosystems. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, 267–279. doi:10.1016/b978-0-444-64191-5.00019-5

Chibuike, G.U. & Obiora, Smart. (2014). Heavy Metal Polluted Soils: Effect on Plants and Bioremediation Methods. *Applied and Environmental Soil Science*. 2014. 1-12. 10.1155/2014/752708.

Choudhary, DK, Prakash, A. y Johri, BN (2007). Resistencia sistémica inducida (ISR) en plantas: mecanismo de acción. *Indian Journal of Microbiology*, 47 (4), 289-297. doi: 10.1007 / s12088-007-0054-2

Ciccoritti, R., Pasquini, M., Sgrulletta, D., & Nocente, F. (2014). Effect of 5-n-Alkylresorcinol Extracts from Durum Wheat Whole Grain on the Growth of *Fusarium* Head Blight (FHB) Causal Agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(1), 43–50. doi:10.1021/jf5054518

Conti, E., Flaibani, A., O'Regan, M., & Sutherland, I. W. (1994). Alginate from *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*: production and properties. *Microbiology*, 140(5), 1125–1132. doi:10.1099/13500872-140-5-1125

Contreras-Moreno, F. J., Muñoz-Dorado, J., García-Tomsig, N. I., Martínez-Navajas, G., Pérez, J., & Moraleta-Muñoz, A. (2020). Copper and Melanin Play a Role in *Myxococcus xanthus* Predation on *Sinorhizobium meliloti*. *Frontiers in microbiology*, 11, 94. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00094>

Cordero, R. J., & Casadevall, A. (2017). Functions of fungal melanin beyond virulence. *Fungal biology reviews*, 31(2), 99–112. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.12.003>

Das H. K. (2019). *Azotobacters* as biofertilizer. *Advances in applied microbiology*, 108, 1–43. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2019.07.001>

Davey, M. E., & O'toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR, 64(4), 847–867. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000>

Davis, R., Duane, G., Kenny, S. T., Cerrone, F., Guzik, M. W., Babu, R. P., Casey, E., & O'Connor, K. E. (2015). High cell density cultivation of *Pseudomonas putida* KT2440 using glucose without the need for oxygen enriched air supply. *Biotechnology and bioengineering*, 112(4), 725–733. <https://doi.org/10.1002/bit.25474>

Devianto, L & Latunussa, Cynthia & Helmy, Qomarudin & Kardena, Edwan. (2020). Biosurfactants production using glucose and molasses as carbon sources by *Azotobacter vinelandii* and soil washing application in hydrocarbon-contaminated soil. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 475. 012075. [10.1088/1755-1315/475/1/012075](https://doi.org/10.1088/1755-1315/475/1/012075).

Dhevagi, Periasamy & Priyatharshini, s & Ramya, A. & Sudhakaran, M.. (2021). Biosorption of lead ions by exopolysaccharide producing *Azotobacter sp.*. *Journal of Environmental Biology*. 42. 40-50. [10.22438/jeb/42/1/MRN-1231](https://doi.org/10.22438/jeb/42/1/MRN-1231).

Dos Santos, P. C., Fang, Z., Mason, S. W., Setubal, J. C., & Dixon, R. (2012). Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes. *BMC genomics*, 13, 162. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-162>

Espin,G. 2001. Biología de *Azotobacter vinelandii*. Martínez-Romero,E. *Microbios en línea*. Coordinación de la Investigación Científica. pags. 91-108. Recuperado de <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/index.html>

Fässler, E., Evangelou, M. W., Robinson, B. H., & Schulin, R. (2010). Effects of indole-3-acetic acid (IAA) on sunflower growth and heavy metal uptake in combination with ethylene diamine disuccinic acid (EDDS). *Chemosphere*, 80(8), 901–907. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.04.077>

Ferreira, C. M. H., Soares, H. M. V. M., & Soares, E. V. (2019). Promising bacterial genera for agricultural practices: An insight on plant growth-promoting properties and microbial safety aspects. *Science of The Total Environment*. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.04.2

Ferreira, C., Vilas-Boas, Â., Sousa, C. A., Soares, H., & Soares, E. V. (2019). Comparison of five bacterial strains producing siderophores with ability to chelate iron under alkaline conditions. *AMB Express*, 9(1), 78. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0796-3>

Florez-Márquez, Jessica D. y Leal-Medina, Gloria I. y Ardila-Leal, Leidy D. y Cárdenas-Caro, Diana M. (2017). Aislamiento y caracterización de rizobacterias asociadas a cultivos de arroz (*Oryza sativa* L.) del norte de Santander (Colombia). *Agrociencia*, 51 (4), 373-391. ISSN: 1405-3195

Funa, N., Ozawa, H., Hirata, A., & Horinouchi, S. (2006). Phenolic lipid synthesis by type III polyketide synthases is essential for cyst formation in *Azotobacter vinelandii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(16), 6356–6361. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511227103>

Galindo, E., Peña, C., Núñez, C., Segura, D., & Espín, G. (2007). Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microbial cell factories*, 6, 7. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-7>

Gauri, Dr. Samiran & Mandal, Santi M & Mondal, Keshab & Dey, Satyahari & Pati, Bikas. (2009). Enhanced production and partial characterization of an extracellular polysaccharide from newly isolated *Azotobacter* sp. SSB81. *Bioresource technology*. 100. 4240-3. 10.1016/j.biortech.2009.03.064.

Gauri, S. S., Mandal, S. M., & Pati, B. R. (2012). Impact of *Azotobacter* exopolysaccharides on sustainable agriculture. *Applied microbiology and biotechnology*, 95(2), 331–338. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4159-0>

Gauri, S. S., Mandal, S. M., Dey, S., & Pati, B. R. (2012). Biotransformation of p-coumaric acid and 2,4-dichlorophenoxy acetic acid by *Azotobacter* sp. strain SSB81.

Bioresource technology, 126, 350–353.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.097>

Gawin, Agnieszka & Tietze, Lisa & Aarstad, Olav & Aachmann, Finn & Brautaset, Trygve & Ertesvåg, Helga. (2020). Functional characterization of three *Azotobacter chroococcum* alginate-modifying enzymes related to the *Azotobacter vinelandii* AlgE mannuronan C-5-epimerase family. *Scientific Reports*. 10. 10.1038/s41598-020-68789-3.

Giovanella, P., Cabral, L., Costa, A. P., de Oliveira Camargo, F. A., Gianello, C., & Bento, F. M. (2017). Metal resistance mechanisms in Gram-negative bacteria and their potential to remove Hg in the presence of other metals. *Ecotoxicology and environmental safety*, 140, 162–169.

González Henao, S., & Ghneim-Herrera, T. (2021). Heavy Metals in Soils and the Remediation Potential of Bacteria Associated With the Plant Microbiome. *Frontiers In Environmental Science*, 9, 15. doi: 10.3389/fenvs.2021.604216

Grobelak, Anna & Kokot, Paulina & Świątek, Jakub & Jaskulak, Marta & Rorat, Agnieszka. (2018). Bacterial ACC Deaminase Activity in Promoting Plant Growth on Areas Contaminated with Heavy Metals. *Journal of Ecological Engineering*. 19. 150-157. 10.12911/22998993/89818.

Gurikar C., Naik M.K., Sreenivasa M.Y. (2016) *Azotobacter*: PGPR Activities with Special Reference to Effect of Pesticides and Biodegradation. In: Singh D., Singh H., Prabha R. (eds) *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*. Springer, New Delhi. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5_13

Herter, S., Schmidt, M., Thompson, M. L., Mikolasch, A., & Schauer, F. (2011). A new phenol oxidase produced during melanogenesis and encystment stage in the nitrogen-fixing soil bacterium *Azotobacter chroococcum*. *Applied microbiology and biotechnology*, 90(3), 1037–1049. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3093-x>

Hesse, E., O'Brien, S., Tromas, N., Bayer, F., Luján, A. M., van Veen, E. M., Hodgson, D. J., & Buckling, A. (2018). Ecological selection of siderophore-producing

microbial taxa in response to heavy metal contamination. *Ecology letters*, 21(1), 117–127. <https://doi.org/10.1111/ele.12878>

Hong, L., Liu, Y., & Simon, J. D. (2004). Binding of metal ions to melanin and their effects on the aerobic reactivity. *Photochemistry and photobiology*, 80(3), 477–481. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2004\)080<0477:BOMITM>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2004)080<0477:BOMITM>2.0.CO;2)

Igiri, B. E., Okoduwa, S., Idoko, G. O., Akabuogu, E. P., Adeyi, A. O., & Ejiogu, I. K. (2018). Toxicity and Bioremediation of Heavy Metals Contaminated Ecosystem from Tannery Wastewater: A Review. *Journal of toxicology*, 2018, 2568038. <https://doi.org/10.1155/2018/2568038>

Jain, Devendra & Sharma, Jyoti & Kaur, Gunnjeet & Bhojiya, Ali & Chauhan, Surya & Sharma, Vimal & Suman, Archana & Mohanty, Santosh & Maharjan, Elina. (2021). Phenetic and Molecular Diversity of Nitrogen Fixating Plant Growth Promoting *Azotobacter* Isolated from Semiarid Regions of India. *BioMed Research International*. 2021. 1-9. 10.1155/2021/6686283.

Jiang, Y., Song, X., Gong, L., Li, P., Dai, C., & Shao, W. (2008). High poly(β -hydroxybutyrate) production by *Pseudomonas fluorescens* A2a5 from inexpensive substrates. *Enzyme and Microbial Technology*, 42(2), 167–172. doi:10.1016/j.enzmictec.2007.09.

Jing, Y. D., He, Z. L., & Yang, X. E. (2007). Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 8(3), 192–207. <https://doi.org/10.1631/jzus.2007.B0192>

Joshi, P. M., & Juwarkar, A. A. (2009). In Vivo Studies to Elucidate the Role of Extracellular Polymeric Substances from *Azotobacter* in Immobilization of Heavy Metals. *Environmental Science & Technology*, 43(15), 5884–5889. doi:10.1021/es900063b

Kachlany, S. C., Levery, S. B., Kim, J. S., Reuhs, B. L., Lion, L. W., & Ghiorse, W. C. (2001). Structure and carbohydrate analysis of the exopolysaccharide capsule of *Pseudomonas putida* G7. *Environmental Microbiology*, 3(12), 774–784. doi:10.1046/j.1462-2920.2001.00248.x

Kaewkannetra, P., Imai, T., Garcia-Garcia, F. J., & Chiu, T. Y. (2009). Cyanide removal from cassava mill wastewater using *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 with mixed microorganisms in activated sludge treatment system. *Journal of hazardous materials*, 172(1), 224–228. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.06.162>

Kamika, I., & Momba, M. N. (2013). Assessing the resistance and bioremediation ability of selected bacterial and protozoan species to heavy metals in metal-rich industrial wastewater. *BMC microbiology*, 13, 28. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-28>

Karagoz, Kenan & ateş, Fadime & Karagöz, Halit & Çakmakçı, Ramazan. (2012). Characterization of plant growth-promoting traits of bacteria isolated from the rhizosphere of grapevine grown in alkaline and acidic soils. *European Journal of Soil Biology*. 50. 144–150. 10.1016/j.ejsobi.2012.01.007.

Kaushik, S., Juwarkar, A., Malik, A., & Satya, S. (2008). Biological removal of Cr (VI) by bacterial isolates obtained from metal contaminated sites. *Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering*, 43(4), 419–423. <https://doi.org/10.1080/10934520701795665><https://doi.org/10.1080/10934520701795665>

Kennedy, J. F., & Bradshaw, I. J. (1984). A rapid method for the assay of alginates in solution using polyhexamethylenebiguanidinium chloride. *British Polymer Journal*, 16(2), 95–101. doi:10.1002/pi.4980160210

Khan, A., Doshi, H. V., & Thakur, M. C. (2016). *Bacillus* spp.: A Prolific Siderophore Producer. *Bacilli and Agrobiotechnology*, 309–323. doi:10.1007/978-3-319-44409-3_13

Kivisaar M. (2020). Narrative of a versatile and adept species *Pseudomonas putida*. *Journal of medical microbiology*, 69(3), 324–338. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001137>

Knutson, C. M., Plunkett, M. H., Liming, R. A., & Barney, B. M. (2018). Efforts toward optimization of aerobic biohydrogen reveal details of secondary regulation of

biological nitrogen fixation by nitrogenous compounds in *Azotobacter vinelandii*. Applied microbiology and biotechnology, 102(23), 10315–10325. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9363-0>

Koksunan, S., Vichitphan, S., Laopaiboon, L., Vichitphan, K., & Han, J. (2013). Growth and cyanide degradation of *Azotobacter vinelandii* in cyanide-containing wastewater system. Journal of microbiology and biotechnology, 23(4), 572–578. <https://doi.org/10.4014/jmb.1209.09026>

Kozubek, A., Pietr, S., & Czerwonka, A. (1996). Alkylresorcinols are abundant lipid components in different strains of *Azotobacter chroococcum* and *Pseudomonas* spp. Journal of bacteriology, 178(14), 4027–4030. <https://doi.org/10.1128/jb.178.14.4027-4030.1996>

Kramer, J., Özkaya, Ö., & Kümmerli, R. (2020). Bacterial siderophores in community and host interactions. Nature reviews. Microbiology, 18(3), 152–163. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0284-4>

Kumar Bhuyan, S., Bandyopadhyay, P., Kumar, P., Kumar Mishra, D., Prasad, R., Kumari, A., Chandra Upadhvava, K., Varma, A., Kumar Yadava, P. (2015). Interaction of *Piriformospora indica* with *Azotobacter chroococcum*. Scientific Reports, 5(1). doi:10.1038/srep13911

Kuss A. V, V. V. Kuss, T. Lovato, e M. Lovato. 2007. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. Pesq. Agropec. Bras. 42: 1459-1465.

Laville, J., Blumer, C., Von Schroetter, C., Gaia, V., Défago, G., Keel, C., & Haas, D. (1998). Characterization of the *hcnABC* gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Journal of bacteriology, 180(12), 3187–3196. <https://doi.org/10.1128/JB.180.12.3187-3196.1998>

Lenart A. M. (2012). In Vitro effects of various xenobiotics on *Azotobacter chroococcum* strains isolated from soils of southern Poland. Journal of

environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes, 47(1), 7–12. <https://doi.org/10.1080/03601234.2012.601942>

Lewis, T. A., Leach, L., Morales, S., Austin, P. R., Hartwell, H. J., Kaplan, B., Forker, C., & Meyer, J. M. (2004). Physiological and molecular genetic evaluation of the dechlorination agent, pyridine-2,6-bis(monothiocarboxylic acid) (PDTC) as a secondary siderophore of *Pseudomonas*. *Environmental microbiology*, 6(2), 159–169. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00558.x>

Li, D. Y., Eberspächer, J., Wagner, B., Kuntzer, J., & Lingens, F. (1991). Degradation of 2,4,6-trichlorophenol by *Azotobacter* sp. strain GP1. *Applied and environmental microbiology*, 57(7), 1920–1928. <https://doi.org/10.1128/AEM.57.7.1920-1928.1991>

Lorck, H. (1948). Production of Hydrocyanic Acid by Bacteria. *Physiologia Plantarum*, 1(2), 142–146. doi:10.1111/j.1399-3054.1948.tb07118.x

Maheshwari, D. K., Dubey, R. C., Aeron, A., Kumar, B., Kumar, S., Tewari, S., & Arora, N. K. (2012). Integrated approach for disease management and growth enhancement of *Sesamum indicum* L. utilizing *Azotobacter chroococcum* TRA2 and chemical fertilizer. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(10), 3015–3024. doi:10.1007/s11274-012-1112-4

Malik, D. K., & Sindhu, S. S. (2011). Production of indole acetic acid by *Pseudomonas* sp.: effect of coinoculation with *Mesorhizobium* sp. Cicer on nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum*). *Physiology and molecular biology of plants : an international journal of functional plant biology*, 17(1), 25–32. <https://doi.org/10.1007/s12298-010-0041-7>

Mankar Mangesh Kumar, Sahay Sanjay, Gothawal Ragini. (2020) Potential of *Azotobacter* in sustainable agriculture. *dv Sci Res*, 11 (6), 01-09

Martínez, L. M., Martínez, A., & Gosset, G. (2019). Production of Melanins With Recombinant Microorganisms. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 285. doi:10.3389/fbioe.2019.00285

Martínez-Ortiz, I. C., Ahumada-Manuel, C. L., Hsueh, B. Y., Guzmán, J., Moreno, S., Cocotl-Yañez, M., Waters, C. M., Zamorano-Sánchez, D., Espín, G., & Núñez, C. (2020). Cyclic di-GMP-Mediated Regulation of Extracellular Mannuronan C-5 Epimerases Is Essential for Cyst Formation in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of bacteriology*, 202(24), e00135-20. <https://doi.org/10.1128/JB.00135-20>

Matthijs, S., Tehrani, K. A., Laus, G., Jackson, R. W., Cooper, R. M., & Cornelis, P. (2007). Thioquinolobactin, a *Pseudomonas* siderophore with antifungal and anti-Pythium activity. *Environmental microbiology*, 9(2), 425–434. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01154.x>

Md Badrul Hisham, N. H., Ibrahim, M. F., Ramli, N., & Abd-Aziz, S. (2019). Production of Biosurfactant Produced from Used Cooking Oil by *Bacillus* sp. HIP3 for Heavy Metals Removal. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(14), 2617. <https://doi.org/10.3390/molecules24142617>

Miethke, M., & Marahiel, M. A. (2007). Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 71(3), 413–451. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00012-07>

Mody, B., Bindra, M., & Modi, V. (1989). Extracellular polysaccharides of cowpea rhizobia: compositional and functional studies. *Archives of Microbiology*, 153(1), 38–42. doi:10.1007/bf00277538

Nadeau MB, Laur J and Khasa DP. (2018) Mycorrhizae and rhizobacteria on precambrian rocky gold mine tailings: ii. mine-adapted symbionts alleviate soil element imbalance for a better nutritional status of white spruce seedlings. *Front. Plant Sci.* 9:1268. doi:10.3389/fpls.2018.01268

Natzke, J., & Bruno-Bárcena, J. M. (2020). Two-Stage Continuous Conversion of Carbon Monoxide to Ethylene by Whole Cells of *Azotobacter vinelandii*. *Applied and environmental microbiology*, 86(11), e00446-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.00446-20>

Natzke, J., Noar, J., & Bruno-Bárcena, J. M. (2018). *Azotobacter vinelandii* Nitrogenase Activity, Hydrogen Production, and Response to Oxygen Exposure.

Applied and environmental microbiology, 84(16), e01208-18.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01208-18>

NC_012560.1 (2009) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA16>

NC_021149.1 (2013) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA186698>

NC_021150.1 (2013) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA186699>

Ndeddy Aka, R. J., & Babalola, O. O. (2016). Effect of bacterial inoculation of strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes feacalis* and *Bacillus subtilis* on germination, growth and heavy metal (Cd, Cr, and Ni) uptake of *Brassica juncea*. International journal of phytoremediation, 18(2), 200–209.
<https://doi.org/10.1080/15226514.2015.1073671>

Noar, J. D., & Bruno-Bárcena, J. M. (2016). Protons and pleomorphs: aerobic hydrogen production in *Azotobacters*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 32(2). doi:10.1007/s11274-015-1980-5

Noar, J. D., & Bruno-Bárcena, J. M. (2018). *Azotobacter vinelandii*: the source of 100 years of discoveries and many more to come. Microbiology (Reading, England), 164(4), 421–436. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000643>

Noar, J., Loveless, T., Navarro-Herrero, J. L., Olson, J. W., & Bruno-Bárcena, J. M. (2015). Aerobic Hydrogen Production via Nitrogenase in *Azotobacter vinelandii* CA6. Applied and Environmental Microbiology, 81(13), 4507–4516. doi:10.1128/aem.00679-15

Nosanchuk, J. D., & Casadevall, A. (2006). Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. Antimicrobial agents and chemotherapy, 50(11), 3519–3528. <https://doi.org/10.1128/AAC.00545-06>

NZ_CP010415.1 (2014) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NZ_CP010415.1

NZ_CP010416.1 (2014) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NZ_CP010416.1

NZ_CP010417.1 (2014) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NZ_CP010417.1

NZ_CP010418.1 (2014) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NZ_CP010418.1

NZ_CP010419.1 (2014) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NZ_CP010419.1
NZ_CP010420.1 (2014) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NZ_CP010420.1
NZ_CP010421.1 (2014) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NZ_CP010421.1
NZ_CP011835.1 (2015) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NZ_CP011835.1
NZ_CP011836.1 (2015) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NZ_CP011836.1
NZ_CP011837.1 (2015) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NZ_CP011837.1
NZ_CP011838.1 (2015) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NZ_CP011838.1
NZ_CP045301.1 (2019) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NZ_CP045301.1
NZ_CP045302.1 (2019) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NZ_CP045302.1
NZ_CP045303.1 (2019) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NZ_CP045303.1
NZ_CP066310.1 (2020) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NZ_CP066310.1
NZ_CP066311.1 (2020) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NZ_CP066311.1
NZ_CP066312.1 (2020) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NZ_CP066312.1
NZ_CP066313.1 (2020) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NZ_CP066313.1
NZ_CP066314.1 (2020) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NZ_CP066314.1

Ojuederie, O. B., & Babalola, O. O. (2017). Microbial and Plant-Assisted Bioremediation of Heavy Metal Polluted Environments: A Review. *International journal of environmental research and public health*, 14(12), 1504. <https://doi.org/10.3390/ijerph14121504>

Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World journal of microbiology & biotechnology*, 33(11), 197. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9>

Omer, Amal & Emara, Hassan & Zaghloul, Rashed & Abdel-Monem, Mohamed & Dawwam, G. E.. (2016). Potential of *Azotobacter Salinestr*is as Plant Growth Promoting Rhizobacteria under Saline Stress Conditions. 7.

Onwurah, I. N. E. (2004). Technical communication: modelling the rates of biodegradation, nitrogen fixation and uptake of fixed nitrogen during bioremediation of crude oil-contaminated environments. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 20(8), 833–836. doi:10.1007/s11274-004-8711-7

Pacheco-Leyva, I., Guevara Pezoa, F., & Díaz-Barrera, A. (2016). Alginate Biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*: Overview of Molecular Mechanisms in Connection with the Oxygen Availability. *International Journal of Polymer Science*, 2016, 1–12. doi:10.1155/2016/2062360

Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G. A., Piotrowska-Seget, Z., & Cameotra, S. S. (2011). Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *International journal of molecular sciences*, 12(1), 633–654. <https://doi.org/10.3390/ijms12010633>

Page, W. J., & Shivprasad, S. (1991). *Azotobacter salinestris* sp. nov., a Sodium-Dependent, Microaerophilic, and Aeroadaptive Nitrogen-Fixing Bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(3), 369–376. doi:10.1099/00207713-41-3-369

Page, W. J., & Shivprasad, S. (1995). Iron binding to *Azotobacter salinestris* melanin, iron mobilization and uptake mediated by siderophores. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 8(1), 59–64. <https://doi.org/10.1007/BF00156159>

Page, WJ, Bhanthumnavin, N., Manchak, J. y Ruman, M. (1997). Production of poly(b-hydroxybutyrate-b-hydroxyvalerate) copolymer from sugars by *Azotobacter salinestris*. *Aplicate Microbiology y biothecnology* , 48 , 88-93.

Pal Saha, S., Bhattacharyya, S., & Chakraborty, H. (2014). Solubilization of tricalcium phosphate by P(3HB) accumulating *Azotobacter chroococcum* MAL-201. *World journal of microbiology & biotechnology*, 30(5), 1575–1582. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1580-1>

- Pal, S., Manna, A., & Paul, A. K. (1997). Induction of Encystment and Poly-beta-Hydroxybutyric Acid Production by *Azotobacter chroococcum* MAL-201. *Current microbiology*, 35(6), 327–330. <https://doi.org/10.1007/s002849900263>
- Paliwal, V., Raju, S. C., Modak, A., Phale, P. S., & Purohit, H. J. (2014). *Pseudomonas putida* CSV86: a candidate genome for genetic bioaugmentation. *PloS one*, 9(1), e84000. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084000>
- Pandey, S., Gupta, S., & Ramawat, N. (2019). Unravelling the potential of microbes isolated from rhizospheric soil of chickpea (*Cicer arietinum*) as plant growth promoter. *3 Biotech*, 9(7), 277. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1809-2>
- Parshad, J., Suneja, S., Kukreja, K., & Lakshminarayana, K. (2001). Poly-3-hydroxybutyrate production by *Azotobacter chroococcum*. *Folia microbiologica*, 46(4), 315–320. <https://doi.org/10.1007/BF02815620>
- Penrose, Donna & Glick, Bernard. (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia plantarum*. 118. 10-15. 10.1034/j.1399-3054.2003.00086.x.
- Pierro, L., Maturro, B., Rossetti, S., Sagliaschi, M., Sucato, S., Alesi, E., Bartsch, E., Arjmand, F., & Papini, M. P. (2017). Polyhydroxyalkanoate as a slow-release carbon source for in situ bioremediation of contaminated aquifers: From laboratory investigation to pilot-scale testing in the field. *New biotechnology*, 37(Pt A), 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.11.004>
- Plonka, P. M., & Grabacka, M. (2006). Melanin synthesis in microorganisms--biotechnological and medical aspects. *Acta biochimica Polonica*, 53(3), 429-443
- Poli, A., Anzelmo, G., & Nicolaus, B. (2010). Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: production, characterization and biological activities. *Marine drugs*, 8(6), 1779–1802. <https://doi.org/10.3390/md8061779>
- Priyadarshane, M., & Das, S. (2021). Bioremediation potential of biofilm forming multi-metal resistant marine bacterium *Pseudomonas chengduensis* PPSS-4

isolated from contaminated site of Paradip Port, Odisha. Journal Of Earth System Science, 130(3). doi: 10.1007/s12040-021-01627-w

PRJDB1080 (2016) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJDB1080>

PRJEB16790 (2016) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJEB16790>

PRJEB16809 (2016) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJEB16809>

PRJEB16980 (2016) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJEB16980>

PRJEB17088 (2016) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJEB17088>

PRJEB17433 (2016) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJEB17433>

PRJEB17910 (2016) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJEB17910>

PRJNA385762 (2018) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA385762>

PRJNA520333 (2019) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA520333>

PRJNA523901 (2019) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA523901>

PRJNA523901 (2019) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA523901>

PRJNA539873 (2019) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA539873>

PRJNA610299 (2020) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA610299>

Rabiei, Z., Hosseini, S. J., Pirdashti, H., & Hazrati, S. (2020). Physiological and biochemical traits in coriander affected by plant growth-promoting rhizobacteria under salt stress. *Heliyon*, 6(10), e05321. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05321>

Radhakrishnan, R., Hashem, A., & Abd Allah, E. F. (2017). *Bacillus*: A Biological Tool for Crop Improvement through Bio-Molecular Changes in Adverse Environments. *Frontiers in physiology*, 8, 667. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00667>

Rajabi-Khamseh, S., Danesh-Shahraki, A., & Rafieiolhossaini, M. (2020). Stress tolerance in flax plants inoculated with *Bacillus* and *Azotobacter* species under deficit

irrigation. *Physiologia plantarum*, 170(2), 269–279.
<https://doi.org/10.1111/ppl.13154>

Rajkumar, M., Sandhya, S., Prasad, M. N. V., & Freitas, H. (2012). Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1562–1574. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.04.011

Rijavec, T., & Lapanje, A. (2016). Hydrogen Cyanide in the Rhizosphere: Not Suppressing Plant Pathogens, but Rather Regulating Availability of Phosphate. *Frontiers in Microbiology*, 7. doi:10.3389/fmicb.2016.01785

Rizvi, A., & Khan, M. S. (2018). Heavy metal induced oxidative damage and root morphology alterations of maize (*Zea mays* L.) plants and stress mitigation by metal tolerant nitrogen fixing *Azotobacter chroococcum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 157, 9–20. doi:10.1016/j.ecoenv.2018.03.063

Rizvi, A., Ahmed, B., Zaidi, A., & Khan, M. S. (2019). Bioreduction of toxicity influenced by bioactive molecules secreted under metal stress by *Azotobacter chroococcum*. *Ecotoxicology (London, England)*, 28(3), 302–322.
<https://doi.org/10.1007/s10646-019-02023-3>

Rizvi, A., Ahmed, B., Zaidi, A., & Khan, M. S. (2020). Biosorption of heavy metals by dry biomass of metal tolerant bacterial biosorbents: an efficient metal clean-up strategy. *Environmental monitoring and assessment*, 192(12), 801.
<https://doi.org/10.1007/s10661-020-08758-5>

Robson, R. L., Chesshyre, J. A., Wheeler, C., Jones, R., Woodley, P. R., & Postgate, J. R. (1984). Genome Size and Complexity in *Azotobacter chroococcum*. *Microbiology*, 130(7), 1603–1612. doi:10.1099/00221287-130-7-1603

Robson, R. L., Jones, R., Robson, R. M., Schwartz, A., & Richardson, T. H. (2015). *Azotobacter* Genomes: The Genome of *Azotobacter chroococcum* NCIMB 8003 (ATCC 4412). *PloS one*, 10(6), e0127997.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127997>

Romero, Yanet & Guzmán, Josefina & Moreno, Soledad & Cocotl-Yañez, Miguel & Vences-Guzmán, Miguel & Castañeda, Miguel & Espín, Guadalupe & Segura, Daniel. (2016). The GacS/A-RsmA Signal Transduction Pathway Controls the Synthesis of Alkylresorcinol Lipids that Replace Membrane Phospholipids during Encystment of *Azotobacter vinelandii* SW136. *PloS one*. 11(4). e0153266. 10.1371/journal.pone.0153266.

Romero-Perdomo, F., Abril, J., Camelo, M., Moreno-Galván, A., Pastrana, I., Rojas-Tapias, D., & Bonilla, R. (2017). *Azotobacter chroococcum* as a potentially useful bacterial biofertilizer for cotton (*Gossypium hirsutum*): Effect in reducing N fertilization. *Revista Argentina de microbiología*, 49(4), 377–383. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.04.006>

Rubio, E. J., Montecchia, M. S., Tosi, M., Cassán, F. D., Peticari, A., & Correa, O. S. (2013). Genotypic characterization of *Azotobacteria* isolated from Argentinean soils and plant-growth-promoting traits of selected strains with prospects for biofertilizer production.

Saha, J., Saha, B. K., Pal Sarkar, M., Roy, V., Mandal, P., & Pal, A. (2019). Comparative Genomic Analysis of Soil Dwelling Bacteria Utilizing a Combinational Codon Usage and Molecular Phylogenetic Approach Accentuating on Key Housekeeping Genes. *Frontiers in microbiology*, 10, 2896. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02896>

Sahoo, R. K., Ansari, M. W., Dangar, T. K., Mohanty, S., & Tuteja, N. (2014). Phenotypic and molecular characterization of efficient nitrogen-fixing *Azotobacter* strains from rice fields for crop improvement. *Protoplasma*, 251(3), 511–523. <https://doi.org/10.1007/s00709-013-0547-2>

Sashidhar, B., & Podile, A. R. (2009). Transgenic expression of glucose dehydrogenase in *Azotobacter vinelandii* enhances mineral phosphate solubilization and growth of sorghum seedlings. *Microbial biotechnology*, 2(4), 521–529. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00119.x>

Sauer, K. (2003). The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biology*, 4(6), 219. doi:10.1186/gb-2003-4-6-219

Segura, D., Vite, O., Romero, Y., Moreno, S., Castañeda, M., & Espín, G. (2009). Isolation and characterization of *Azotobacter vinelandii* mutants impaired in alkylresorcinol synthesis: alkylresorcinols are not essential for cyst desiccation resistance. *Journal of bacteriology*, 191(9), 3142–3148. <https://doi.org/10.1128/JB.01575-08>

Setubal, J. C., dos Santos, P., Goldman, B. S., Ertesvåg, H., Espin, G., Rubio, L. M., Valla, S., Almeida, N. F., Balasubramanian, D., Cromes, L., Curatti, L., Du, Z., Godsy, E., Goodner, B., Hellner-Burris, K., Hernandez, J. A., Houmiel, K., Imperial, J., Kennedy, C., Larson, T. J., ... Wood, D. (2009). Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *Journal of bacteriology*, 191(14), 4534–4545. <https://doi.org/10.1128/JB.00504-09>

Sharma, R., Gal, L., Garmyn, D., Bisaria, V. S., Sharma, S., & Piveteau, P. (2020). Evidence of Biocontrol Activity of Bioinoculants Against a Human Pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Frontiers in microbiology*, 11, 350. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00350>

Sharma, V., Harjai, K., & Shukla, G. (2018). Effect of bacteriocin and exopolysaccharides isolated from probiotic on *P. aeruginosa* PAO1 biofilm. *Folia microbiologica*, 63(2), 181–190. <https://doi.org/10.1007/s12223-017-0545-4>

Shirinbayan, Shima & Khosravi, Houshang & Malakouti, Mohammad. (2018). Alleviation of drought stress in maize (*Zea mays*) by inoculation with *Azotobacter* strains isolated from semi-arid regions. *Applied Soil Ecology*. 133. 10.1016/j.apsoil.2018.09.015.

Sippel, D., Schlesier, J., Rohde, M., Trncik, C., Decamps, L., Djurdjevic, I., Spatzal, T., Andrade, S. L., & Einsle, O. (2017). Production and isolation of vanadium nitrogenase from *Azotobacter vinelandii* by molybdenum depletion. *Journal of*

biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry, 22(1), 161–168. <https://doi.org/10.1007/s00775-016-1423-2>

Sobariu, D. L., Fertu, D. I. T., Diaconu, M., Pavel, L. V., Hlihor, R.-M., Drăgoi, E. N., ... Gavrilescu, M. (2017). Rhizobacteria and plant symbiosis in heavy metal uptake and its implications for soil bioremediation. *New Biotechnology*, 39, 125–134. doi:10.1016/j.nbt.2016.09.002

Song, Y., Liu, J., & Chen, F. (2020). *Azotobacter chroococcum* inoculation can improve plant growth and resistance of maize to armyworm, *Mythimna separata* even under reduced nitrogen fertilizer application. *Pest Management Science*. 76 doi:10.1002/ps.5969

Souza, R. d., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and molecular biology*, 38(4), 401–419. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>

Sumbul, A., Ansari, R. A., Rizvi, R., & Mahmood, I. (2020). *Azotobacter*: A potential bio-fertilizer for soil and plant health management. *Saudi journal of biological sciences*, 27(12), 3634–3640. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.08.004>

Surendirakumar, K., Pandey, R., & Muthukumar, T. (2019). Influence of indigenous arbuscular mycorrhizal fungus and bacterial bioinoculants on growth and yield of *Capsicum chinense* cultivated in non-sterilized soil. *The Journal of Agricultural Science*, 157(1), 31-44. doi:10.1017/S0021859619000261

Teitzel, G. M., & Parsek, M. R. (2003). Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and environmental microbiology*, 69(4), 2313–2320. <https://doi.org/10.1128/aem.69.4.2313-2320.2003>

Teng, Z., Shao, W., Zhang, K., Huo, Y., & Li, M. (2019). Characterization of phosphate solubilizing bacteria isolated from heavy metal contaminated soils and their potential for lead immobilization. *Journal of environmental management*, 231, 189–197. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.10.012>

Thavasi, R., Jayalakshmi, S., Balasubramanian, T., & Banat, I. M. (2007). Production and characterization of a glycolipid biosurfactant from *Bacillus megaterium* using economically cheaper sources. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(7), 917–925. doi:10.1007/s11274-007-9609-y

Thavasi, R., Subramanyam Nambaru, V. R., Jayalakshmi, S., Balasubramanian, T., & Banat, I. M. (2009). Biosurfactant production by *Azotobacter chroococcum* isolated from the marine environment. *Marine biotechnology (New York, N.Y.)*, 11(5), 551–556. <https://doi.org/10.1007/s10126-008-9162-1>

Thavasi, R., Subramanyam Nambaru, V. R., Jayalakshmi, S., Balasubramanian, T., & Banat, I. M. (2011). Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* from Renewable Resources. *Indian journal of microbiology*, 51(1), 30–36. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0076-7>

Tian, H., Hu, Y., Xu, X., Hui, M., Hu, Y., Qi, W., Xu, H., Li, B. (2019). Enhanced wastewater treatment with high o-aminophenol concentration by two-stage MABR and its biodegradation mechanism. *Bioresource Technology*, 289, 121649. doi:10.1016/j.biortech.2019.121649

Tittabutr, Panlada & Piromyou, Pongdet & Longtonglang, Aphakorn & Noisangiam, Rujirek & Boonkerd, Nantakorn & Teaumroong, Neung. (2013). Alleviation of the effect of environmental stresses using co-inoculation of mungbean by *Bradyrhizobium* and rhizobacteria containing stress-induced ACC deaminase enzyme. *Soil Science and Plant Nutrition*. 59. 10.1080/00380768.2013.804391.

Toyofuku, Masanori & Inaba, Tomohiro & Kiyokawa, Tatsunori & Obana, Nozomu & Yawata, Yutaka & Nomura, Nobuhiko. (2015). Environmental factors that shape biofilm formation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 80. 1-6. 10.1080/09168451.2015.1058701.

Ullah, A., Heng, S., Munis, M. F. H., Fahad, S., & Yang, X. (2015). Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: A review. *Environmental and Experimental Botany*, 117, 28–40. doi:10.1016/j.envexpbot.2015.05.001

Upadhyay, A., & Srivastava, S. (2014). Mechanism of zinc resistance in a plant growth promoting *Pseudomonas fluorescens* strain. *World journal of microbiology & biotechnology*, 30(8), 2273–2282. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1648-6>

Upadhyay, N., Vishwakarma, K., Singh, J., Mishra, M., Kumar, V., Rani, R., Mishra, R. K., Chauhan, D. K., Tripathi, D. K., & Sharma, S. (2017). Tolerance and Reduction of Chromium(VI) by *Bacillus* sp. MNU16 Isolated from Contaminated Coal Mining Soil. *Frontiers in plant science*, 8, 778. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00778>

Van Oosten, M. J., Di Stasio, E., Cirillo, V., Silletti, S., Ventorino, V., Pepe, O., Raimondi, G., & Maggio, A. (2018). Root inoculation with *Azotobacter chroococcum* 76A enhances tomato plants adaptation to salt stress under low N conditions. *BMC plant biology*, 18(1), 205. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1411-5>

Velmourougane, K., Prasanna, R., & Saxena, A. K. (2017). Agriculturally important microbial biofilms: Present status and future prospects. *Journal of basic microbiology*, 57(7), 548–573. <https://doi.org/10.1002/jobm.201700046>

Velmourougane, K., Prasanna, R., Chawla, G., Nain, L., Kumar, A., & Saxena, A. K. (2019). *Trichoderma*-*Azotobacter* biofilm inoculation improves soil nutrient availability and plant growth in wheat and cotton. *Journal of basic microbiology*, 59(6), 632–644. <https://doi.org/10.1002/jobm.201900009>

Vergani, L., Mapelli, F., Zanardini, E., Terzaghi, E., Di Guardo, A., Morosini, C., Raspa, G., & Borin, S. (2017). Phyto-rhizoremediation of polychlorinated biphenyl contaminated soils: An outlook on plant-microbe beneficial interactions. *The Science of the total environment*, 575, 1395–1406. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.218>

Verma, S., & Kuila, A. (2019). Bioremediation of heavy metals by microbial process. *Environmental Technology & Innovation*, 100369. doi:10.1016/j.eti.2019.100369

Vindeirinho, João & Soares, Helena & Soares, Eduardo. (2021). Modulation of Siderophore Production by *Pseudomonas fluorescens* Through the Manipulation of the Culture Medium Composition. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 193. 10.1007/s12010-020-03349-z.

Vyas, P., & Gulati, A. (2009). Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. *BMC microbiology*, 9, 174. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-174>

Wang, H., Li, H., Zhang, M., Song, Y., Huang, J., Huang, H., Shao, M., Liu, Y., & Kang, Z. (2018). Carbon Dots Enhance the Nitrogen Fixation Activity of *Azotobacter Chroococcum*. *ACS applied materials & interfaces*, 10(19), 16308–16314. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b03758>

Wang, Q., & Nomura, C. T. (2010). Monitoring differences in gene expression levels and polyhydroxyalkanoate (PHA) production in *Pseudomonas putida* KT2440 grown on different carbon sources. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(6), 653–659. doi:10.1016/j.jbiosc.2010.08.001

Wasi, S., Jeelani, G., & Ahmad, M. (2008). Biochemical characterization of a multiple heavy metal, pesticides and phenol resistant *Pseudomonas fluorescens* strain. *Chemosphere*, 71(7), 1348–1355. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.11.023>

Wu, Chao & Herold, Ryan & Knoshaug, Eric & Wang, Bo & Xiong, Wei & Laurens, Lieve. (2019). Fluxomic Analysis Reveals Central Carbon Metabolism Adaptation for Diazotroph *Azotobacter vinelandii* Ammonium Excretion. *Scientific Reports*. 9. 10.1038/s41598-019-49717-6.

Wyss, O., Neumnn, M. G., & Socolofsky, M. D. (1961). Development and germination of the *Azotobacter* cyst. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*, 10(4), 555–565. <https://doi.org/10.1083/jcb.10.4.555>

Xu, Lili & Cheng, Xianglong & Wu, Shuangxiu & Wang, Quanxi. (2017). Co-cultivation of *Chlamydomonas reinhardtii* with *Azotobacter chroococcum* improved H₂ production. *Biotechnology Letters*. 39. 10.1007/s10529-017-2301-x.

Yang, L., Wang, X.-H., Cui, S., Ren, Y.-X., Yu, J., Chen, N., ... Wang, R.-H. (2019). Simultaneous removal of nitrogen and phosphorous by heterotrophic nitrification-

aerobic denitrification of a metal resistant bacterium *Pseudomonas putida* strain NP5. *Bioresource Technology*, 285, 121360. doi:10.1016/j.biortech.2019.12136

Yoneyama, F., Yamamoto, M., Hashimoto, W., & Murata, K. (2015). Production of polyhydroxybutyrate and alginate from glycerol by *Azotobacter vinelandii* under nitrogen-free conditions. *Bioengineered*, 6(4), 209–217. <https://doi.org/10.1080/21655979.2015.1040209>

Zhang, Q., Song, Y., Amor, K., Huang, W. E., Porcelli, D., & Thompson, I. (2019). Monitoring Cr toxicity and remediation processes - Combining a whole-cell bioreporter and Cr isotope techniques. *Water Research*. doi:10.1016/j.watres.2019.01.009

ANEXOS

Tabla de abreviaturas

Abreviatura	Significado
2,4-D	2,4-dicloro-fexiacético
ACC	Amino-ciclo-propano carboxil
AIA	Ácido indol acético
AIPO₄	Fosfato de aluminio
APasa	Fosfatasa alcalina
ATP	Adenosín trifosfato
Ca	Calcio
Ca₃(PO₄)₂	Fosfato de calcio
Cd	Cadmio
CO	Monóxido de carbono
Co	Cobalto
Cr	Cromo
Cu	Cobre
Da	Dáltones
DNR	Dinitrogenasa reductasa
DOPA	o-dihidroxifenilalanina
EPS	Exopolisacáridos
Fe	Hierro
Fe²⁺	Ion ferroso
Fe³⁺	Ion férrico
FePO₄	Fosfato de hierro (III)
H₂	Gas hidrogeno
H₂O₂	Peróxido de hidrogeno
ha	Hectárea
HCH	Hexaclorociclohexano
HCN	Acido cianhídrico
HDX	Hidroxamato
Hg	Mercurio
K	Potasio
kDa	Kilodaltons
Kg	Kilogramo
Mg	Magnesio
Mo	Molibdeno
N₂	Nitrógeno atmosférico
N₂O	Óxido nitroso
Na⁺	Sodio
NH₃	Amoniaco
NH₄	Amonio
Ni	Níquel
O₂	Oxigeno
OAP	o-aminofenol

Pb	Plomo
PGPR	Rizobacteria promotora del crecimiento vegetal
PHA	polihidroxiclcanoatos
PHB	Polibeta-hidroxibutirato
PKS	Policétido sintasa
TCP	2,4,6-triclorofenol
V	Vanadio
Zn	Zinc
ZnO	Oxido de zinc