



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Producción de metabolitos secundarios de los aislados de
Azotobacter sp. bajo diferentes concentraciones de hierro y
su impacto en la germinación

Tesis que para obtener el título de

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

Jorge Luis Sánchez Rosas

DIRECTORA: D. C. Dalia Molina Romero

CO-DIRECTOR: D.C. Miguel Castañeda Lucio



FEBRERO, 2026

Dedicatoria

A mis padres, por apoyarme en cumplir mis sueños y enseñarme a trabajar para cumplirlos.

Agradecimientos

A mis padres, Luis Sánchez y Elisa Rosas les agradezco infinitamente, porque sin su valioso apoyo no podría seguir haciendo lo que más me gusta, investigar, los quiero mucho y espero que este logro y los que faltan los hagan sentirse orgullosos de mí, los quiero y querré siempre.

A mis hermanos, Jesús y Livia, gracias por su constante apoyo y preocupación, por acompañarme en tiempos difíciles y siempre hacerme sentir amado, los quiero muchísimo.

A mi asesora de Tesis, Dalia Molina, muchas gracias doctora, por permitirme trabajar en su equipo, por apoyarme en momentos difíciles y por confiar en que podría lograr este proyecto, nunca terminare de agradecerle.

A mi co-asesor de Tesis, el Dr. Miguel Castañeda, gracias por sus acertadas correcciones y por permitirme trabajar en su laboratorio.

A la D. C. Liliana López, por permitirme trabajar en su laboratorio, por proporcionarme equipos de trabajo y por estar pendiente de mi y ser paciente conmigo, muchas gracias.

A la D.C Lorena Milflores y la D.C. Berenice Venegas, por su confianza y apoyo brindando a lo largo de mi estancia en su laboratorio, por sus consejos, aprendizajes y los recuerdos que me brindaron, muchísimas gracias.

A los chicos del laboratorio de interacciones bioquímicas y moleculares aplicadas, o como nos gusta llamar, laboratorio 330, gracias por alegrar mis días, por escucharme y aconsejarme. En especial, le agradezco a la Bióloga Reyna y al Biólogo Tadeo por enseñarme a trabajar en el laboratorio, tenerme paciencia y apoyarme tanto en el trabajo como en lo personal. Gracias infinitas a mis amigos Ángel (MOP), Marisel, Emireth, Marco, Óscar, Daniela, Fernando, Armando, Lilian, Aramis, Noelia y Jessica, los quiero mucho y siempre tendrán un lugar en mi corazón. También a los amigos que hice a lo largo de mi recorrido en la universidad, Ruby, Daniela, Sara, Yael, Erick, Brandon, Leila, Osmar, Fernando, Moises, Isaac, Emileydy, Mónica y Cristina, fue un placer que nuestros caminos coincidieran, los quiero mucho y siempre los apreciaré. Quiero agradecer a mi amiga Kathia, gracias

por sacarme sonrisas en momentos difíciles y por ser tan autentica, nunca te lo dije, pero me enseñaste tantas cosas, me duele no poder compartir este logro contigo, pero espero que te encuentres feliz y en paz en donde te encuentres.

RESUMEN

Azotobacter vinelandii es una bacteria capaz de sintetizar metabolitos de interés biotecnológico como los sideróforos, metabolitos producidos en respuesta a la deficiencia de hierro y con alta selectividad por el Fe^{3+} , así como los alquilresorcinoles, lípidos fenólicos que componen las membranas de la bacteria en condiciones adversas, protegiéndola de la desecación. El hierro es un nutriente indispensable para las células eucariotas y procariotas debido a su participación como un cofactor en reacciones de oxidorreducción que implican procesos celulares fundamentales. El uso de sideróforos bacterianos se ha implementado como una estrategia ante la escases de hierro en las plantas, un grave problema en el rendimiento de cultivos agrícolas, debido a que este metabolito promueve la absorción de hierro hacia las plantas.

En este proyecto se evaluó la producción de sideróforos de las cepas *A. vinelandii* AEIV (cepa tipo), *A. vinelandii* S4TA y *Azotobacter chroococcum* SM3.2, cepas aisladas de la Reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán, así como la producción de alquilresorcinoles, debido a la protección que le confiere a la bacteria en condiciones adversas, a su vez, se evaluó la promoción en la germinación de semillas de rábano, al ser inoculadas cuando estas bacterias producen sideróforos. El objetivo de este trabajo fue cuantificar la producción de catecoles y azotobactinas y su efecto en la germinación, en tres condiciones de crecimiento: se cultivó a la bacteria en una condición control que presenta niveles óptimos de hierro en medio de cultivo, una condición de deficiencia y ausencia de hierro. También, se determinó la producción de los alquilresorcinoles, cuando la bacteria utilizó como fuente de carbono n-butanol.

Los resultados registrados en la condición de deficiente de hierro mostraron que *A. vinelandii* AEIV presentó la mayor producción de azotobactina, mientras que *A. vinelandii* S4TA y el aislado *A. chroococcum* SM3.2 presentaron una menor producción, sin diferencia estadística significativa. En cambio, la biosíntesis de azotobactina en medio ausente de hierro, se reportó que el aislado *A. vinelandii* S4TA tiene la mayor producción con diferencia estadísticamente significativa, respecto a la producción de *A. vinelandii* AEIV y *A. chroococcum* SM3.2.

En el caso de la producción de catecoles, en la condición deficiente de hierro, la cepa tipo *A. vinelandii* AEIV mantiene la mayor producción, los aislados *A. vinelandii* S4TA y *A. chroococcum* SM3.2 no presentan una diferencia significativa. Sin embargo, la biosíntesis de catecoles en la condición de ausencia de hierro la mayor producción fue de la cepa *A. chroococcum* SM3.2, sin diferencia estadísticamente significativa con respecto a la producción de *A. vinelandii* AEIV y *A. vinelandii* S4TA. En cuanto al porcentaje de germinación, los mejores resultados lo presentaron las semillas inoculadas con bacterias crecidas en la condición de deficiencia de hierro, el porcentaje más alto se observó en el tratamiento con *A. vinelandii* S4TA, seguido de *A. chroococcum* SM3.2, respecto a la cepa control *A. vinelandii* AEIV, en donde se observó el desarrollo de plántulas con la longitud mayor a los 14 días y un desarrollo pronunciado de raíces y cotiledones. Las semillas de la condición control presentaron porcentajes de germinación similares a los porcentajes de la condición en deficiencia de hierro y la longitud de las plántulas fue menor. En contraste, la germinación de las semillas inoculadas con las bacterias crecidas en ausencia de hierro disminuyó drásticamente el porcentaje de germinación y el desarrollo de la plántula. Este estudio nos sugiere que existe una síntesis diferencial entre catecoles y azotobactinas, donde la producción del sideróforo se vería afectada por la limitación del hierro.

Por otra parte, la determinación de alquilresorcinolos, se registró que la cepa *A. vinelandii* S4TA presento una mayor producción en comparación con las cepas *A. vinelandii* AEIV y *A. chroococcum*.

En conclusión, los aislados *A. chroococcum* SM3.2, *A. vinelandii* S4TA y *A. vinelandii* AEIV producen catecoles y azotobactinas en diferentes concentraciones de hierro. De forma similar las tres cepas producen alquilresorcinolos. Además, la inoculación de las semillas con las cepas de *Azotobacter* sp. crecidas en deficiencia de hierro, promueven la germinación y el crecimiento mayor de las plántulas.

ÍNDICE

• INTRODUCCIÓN-----	9
• Biología y generalidades de <i>Azotobacter vinelandii</i> -----	9
• Rol de <i>Azotobacter</i> en la fijación del nitrógeno-----	13
• Importancia de la producción de sideróforos y la obtención de hierro-----	14
• Estructura y clasificación de sideróforos-----	16
• Vía de biosíntesis de sideróforos-----	18
• Síntesis de alquilresorcinolos (ARs)-----	21
• ANTECEDENTES-----	24
• Producción de sideróforos en bacterias-----	24
• Importancia de la producción de sideróforos bacterianos-----	24
• Situación actual de los suelos de cultivo y el papel de sideróforos como promotores de crecimiento-----	26
• PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA-----	27
• JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS-----	27
• MATERIALES Y METODOS-----	29
• DESARROLLO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS-----	34
• Cuantificación de sideróforos producidos por cepas de <i>A. vinelandii</i> y <i>A.</i> <i>chroococcum</i> -----	34
• Cuantificación de azotobactina-----	35
• Cuantificación de catecoles-----	37
• Germinación de semillas de rábano inoculadas con <i>Azotobacter</i> sp. con producción de sideróforos-----	39
• Cualificación de alquilresorcinolos-----	45
• Cuantificación de alquilresorcinolos-----	46
• DISCUSIÓN-----	47
• CONCLUSIÓN-----	52
• PERSPECTIVAS-----	52
• BIBLIOGRAFIA-----	52

INDICE DE FIGURAS

Especificaciones

Fig. 1 Ciclo de vida de *Azotobacter vinelandii*. Modificada de Sadoff, 1975.

Fig. 2 Propiedades metabólicas de *Azotobacter vinelandii*. Imagen tomada de Barney, 2024.

Fig. 3 Fijación biológica de nitrógeno de *Azotobacter spp.*, el mecanismo de fijación del nitrógeno por parte de heterótrofos de vida libre. Imagen tomada de Aasfar *et al.*, 2021.

Fig. 4 Estructura química de los sideróforos producidos por *Azotobacter vinelandii*. (a) sideróforo fluorescente o tipo pioverdina. (b) sideróforos de tipo catecol. Imagen tomada de Baars *et al.*, 2016.

Fig. 5 Vía de síntesis de pioverdinas propuesta para *Azotobacter vinelandii*, se sugieren los intermediarios en la síntesis de azotobactina. Imagen tomada de Baars *et al.*, 2016.

Fig. 6 Vía de síntesis de catecoles propuesta para *Azotobacter vinelandii*. (A) síntesis de los monocatecoles. (B) síntesis de los bis-catecoles y tris-catecoles. Imagen tomada de Baars *et al.*, 2016.

Fig. 7 Vía de síntesis de alquilresorcinoles propuesto en *A. vinelandii* SW136, síntesis controlada por el sistema Gac-Rsm. La proteína GacA controla la síntesis de alquilresorcinoles mediante dos vías, una vía dependiente del sistema Rsm el cual regula la expresión de *arpR* y una vía que controla positivamente la expresión de los genes *ars* independientemente del sistema regulador Rsm. Imagen tomada de Romero *et al.*, 2016.

Fig. 8 Placas de medio BS sólido con cepas: (A). *A. vinelandii* AEIV, (B). *A. vinelandii* S4Ta y (C). *A. chroococcum* SM3.2.

Fig. 9 (A) Preinóculos de las cepas *A. vinelandii* AEIV. (B) *A. vinelandii* S4Ta y (C) *A. chroococcum* SM3.2 de 48 horas.

Fig.10 Inóculos de las cepas *A. vinelandii* AEIV, *A. vinelandii* S4Ta y *A. chroococcum* SM3.2 de ambos tratamientos, en 48 horas.

Fig. 11 Comparación entre los inóculos de la cepa *A. vinelandii* AEIV en dos tratamientos. (A) medio mínimo BS líquido con deficiencia de hierro. (B) medio mínimo BS líquido en ausencia de hierro.

Fig. 12 Cuantificación de azotobactina a las 48 horas de cultivo de las cepas *A. vinelandii* AEIV: AEIV, *A. vinelandii* S4TA: S4TA y *A. chroococcum* SM3.2: SM3.2 en los diferentes tratamientos. Letras diferentes representan diferencia estadísticamente significativa. $p = 0.0148$.

Fig. 13 Cuantificación de azotobactina a las 96 horas de cultivo de las cepas *A. vinelandii* AEIV: AEIV, *A. vinelandii* S4TA: S4TA y *A. chroococcum* SM3.2: SM3.2 en los diferentes tratamientos. Letras diferentes representan diferencia estadísticamente significativa. $p = 0.0588$.

Fig. 14 Cuantificación de catecoles a las 48 horas de cultivo de las cepas *A. vinelandii* AEIV: AEIV, *A. vinelandii* S4TA: S4TA y *A. chroococcum* SM3.2: SM3.2 en los diferentes tratamientos. Letras diferentes representan diferencia estadísticamente significativa. $p < 0.0001$.

Fig. 15 Cuantificación de catecoles a las 96 horas de cultivo de las cepas *A. vinelandii* AEIV: AEIV, *A. vinelandii* S4TA: S4TA y *A. chroococcum* SM3.2: SM3.2 en los diferentes tratamientos. Letras diferentes representan diferencia estadísticamente significativa. $P = 0.0148$.

Fig.16 Comparación de la germinación de las semillas inoculadas con la cepa *A. vinelandii* AEIV: AEIV, entre: (A) el medio ausente de hierro. (B) el medio deficiente de hierro. La n de cada tratamiento fue de 40 semillas.

Fig.17 Comparación de la germinación de las semillas inoculadas con la cepa *A. vinelandii* S4TA: S4TA, entre: (A) el medio ausente de hierro. (B) el medio deficiente de hierro. La n de cada tratamiento fue de 40 semillas.

Fig.18 Comparación de la germinación de las semillas inoculadas con la cepa *A. chroococcum* SM3.2: SM3.2, entre: (A) el medio ausente de hierro. (B) el medio deficiente de hierro. La n de cada tratamiento fue de 40 semillas.

Fig.19 Porcentaje de germinación de las semillas de rábano crecidas en ambos tratamientos, se analizaron 4 grupos, grupo sin inoculación: Control, la cepa *A.*

vinelandii AEIV: AEIV, *A. vinelandii* S4TA: S4TA y la cepa *A. chroococcum* SM3.2: SM3.2. La n de cada tratamiento fue de 40 semillas. $p = 0.0119$.

Fig. 20 Comparación de las semillas germinadas en el tratamiento de deficiencia de hierro. (A) Plántulas de la cepa *A. vinelandii* AEIV: AEIV, (B) plántulas del aislado *A. vinelandii* S4TA: S4TA, (C) plántulas del aislado *A. chroococcum* SM3.2 y (D) plántulas del tratamiento control (sin inocular). La n de cada tratamiento fue de 40 semillas.

Fig. 21 Longitud de las plántulas germinadas en el tratamiento control, se midieron a: (A) 7 días del lavado de semillas (B) 10 días del lavado de semillas y (C) 14 días del lavado de semillas. Se analizaron 4 grupos, grupo sin inoculación: Control, la cepa *A. vinelandii* AEIV: AEIV, *A. vinelandii* S4TA: S4TA y la cepa *A. chroococcum* SM3.2: SM3.2. La n de cada tratamiento fue de 40 semillas. $p < 0.0001$.

Fig. 22 Longitud de plántulas germinadas en medio deficiente de hierro, se analizaron 4 grupos, grupo sin inoculación: Control, la cepa *A. vinelandii* AEIV: AEIV, *A. vinelandii* S4TA: S4TA y la cepa *A. chroococcum* SM3.2: SM3.2, se midieron a: (A) 7 días (B) 10 días y (C) 14 días posteriores al inicio de la germinación. La n de cada tratamiento fue de 40 semillas. $p < 0.0001$.

Fig. 23 Comparación del crecimiento en las plántulas del tratamiento de deficiencia a los 14 días después del inicio de germinación. (A) Plántula del grupo sin inocular (Control), (B) Plántula del grupo *A. vinelandii* AEIV (AEIV), (C) Plántula del grupo *A. vinelandii* S4TA (S4TA), (D) Plántula del grupo *A. chroococcum* SM3.2 (SM3.2). La n de cada tratamiento fue de 40 semillas.

Fig. 24 Comparación del crecimiento en las plántulas del tratamiento control (bacterias crecidas con 18uM de hierro) a los 14 días después del inicio de germinación. (A) Plántula del grupo sin inocular (Control), (B) Plántula del grupo *A. vinelandii* AEIV (AEIV), (C) Plántula del grupo *A. vinelandii* S4TA (S4TA), (D) Plántula del grupo *A. chroococcum* SM3.2 (SM3.2). La n de cada tratamiento fue de 40 semillas.

Fig. 25 Comparación del crecimiento en las plántulas del tratamiento de deficiencia a los 14 días después del inicio de germinación. (A) Plántula del grupo sin inocular

(Control), (B) Plántula del grupo *A. vinelandii* AEIV (AEIV), (C) Plántula del grupo *A. vinelandii* S4TA (S4TA), (D) Plántula del grupo *A. croococcum* SM3.2 (SM3.2). La n de cada tratamiento fue de 40 semillas.

Fig. 26 Placas de medio Burk-n-Butanol, el experimento se realizó con tres repeticiones con la inoculación de la cepa por triplicado. Este resultado es el promedio de tres experimentos independientes. (A) corresponde al aislado *A. vinelandii* S4TA. (B) corresponde a la cepa *A. vinelandii* AEIV.

Fig. 27 Placas de medio Burk-n-Butanol, el experimento se realizó con la inoculación de la cepa por triplicado. Este resultado es el promedio de tres experimentos independientes. (A) Quistes de la cepa *A. vinelandii* AEIV. (B) Quistes del aislado *A. vinelandii* S4TA. (C) Quistes del aislado *A. chroococcum* SM3.2.

Fig. 28 Cuantificación de alquilresorcinolos a los 5 días de cultivo de las cepas *A. vinelandii* AEIV: AEIV, *A. vinelandii* S4TA: S4TA y *A. chroococcum* SM3.2: SM3.2, en medio de cultivo Burk-n-butanol. $p < 0.0001$.

INTRODUCCIÓN

Biología y generalidades de *Azotobacter vinelandii*

El género *Azotobacter* está compuesto por bacterias Gram negativas, aerobias estrictas, viven en suelos y aguas frescas, son células de 1.5 a 2 μm que presentan características pleomórficas. *Azotobacter* tiene un ciclo de vida complejo (Fig. 1), la forma vegetativa es bacilar, en respuesta a condiciones ambientales perjudiciales forman células metabólicamente inactivas, conocidas como quistes, que le confiere resistencia a la desecación (Jayashree, 2022). Son bacterias quimioorganotróficas que utilizan azúcares, alcoholes y ácidos orgánicos para crecer, se les observa como células individuales o formando agregados y en ocasiones cadenas de tamaños variables (Espín, 2014).

Azotobacter es una bacteria diazótrofa que produce tres complejos enzimáticos para fijar nitrógeno, como la nitrogenasa de molibdeno (Mo), nitrogenasa de vanadio (V) y nitrogenasa de hierro (Fe), estas nitrogenasas mantienen una coordinación durante el ensamblaje y regulación (Jayashree, 2022). La fijación de nitrógeno en *Azotobacter* es paradójica, puesto que la nitrogenasa, independientemente del complejo enzimático, es extremadamente sensible al oxígeno y tiene una alta tasa de respiración en comparación con otras bacterias, específicamente cuando fija nitrógeno, lo que asegura la protección respiratoria de la nitrogenasa (Aasfar *et al.*, 2021). El transporte de carbohidratos se lleva a cabo por un mecanismo de transporte activo, la glucosa se metaboliza por la vía Entner-Duodorof (ED). Las fuentes de carbono que degrada comúnmente son la sacarosa, glucosa, galactosa y fructosa (Cuesta *et al.*, 2005).

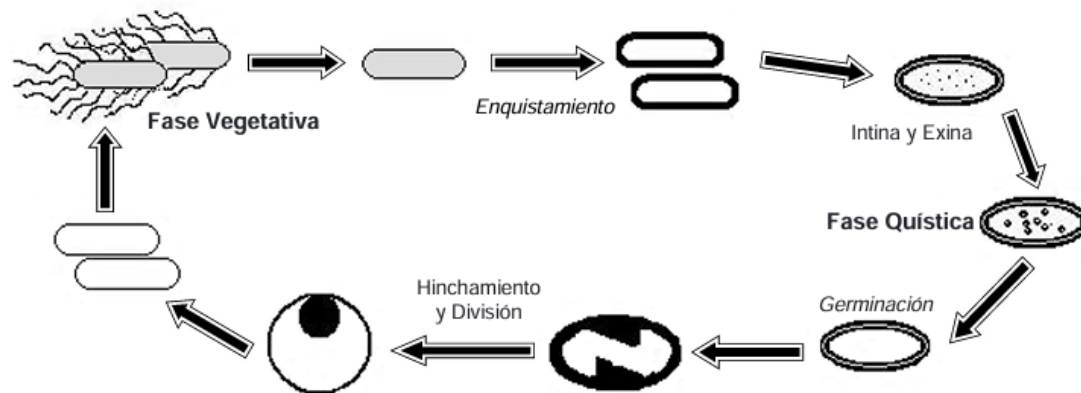


Fig. 1 Ciclo de vida de *Azotobacter vinelandii*. Modificada de Sadoff, 1975.

Azotobacter vinelandii es una bacteria poliploide, que posee hasta 80 copias de cromosoma por célula (Noar y Bruno, 2018), el número de copias varía en función del medio cultivo, las condiciones y la fase de crecimiento en la que se encuentre. *A. vinelandii* es reconocido por sus capacidades metabólicas y genéticas (Fig. 2), como fijar el nitrógeno en presencia de oxígeno y a su vez activar mecanismos de protección de nitrogenasa, sintetiza sideróforos, alquilresorcinolos y además produce polímeros de uso industrial: alginatos y polihidroxibutirato (PHB) intracelular (Espín, 2014).

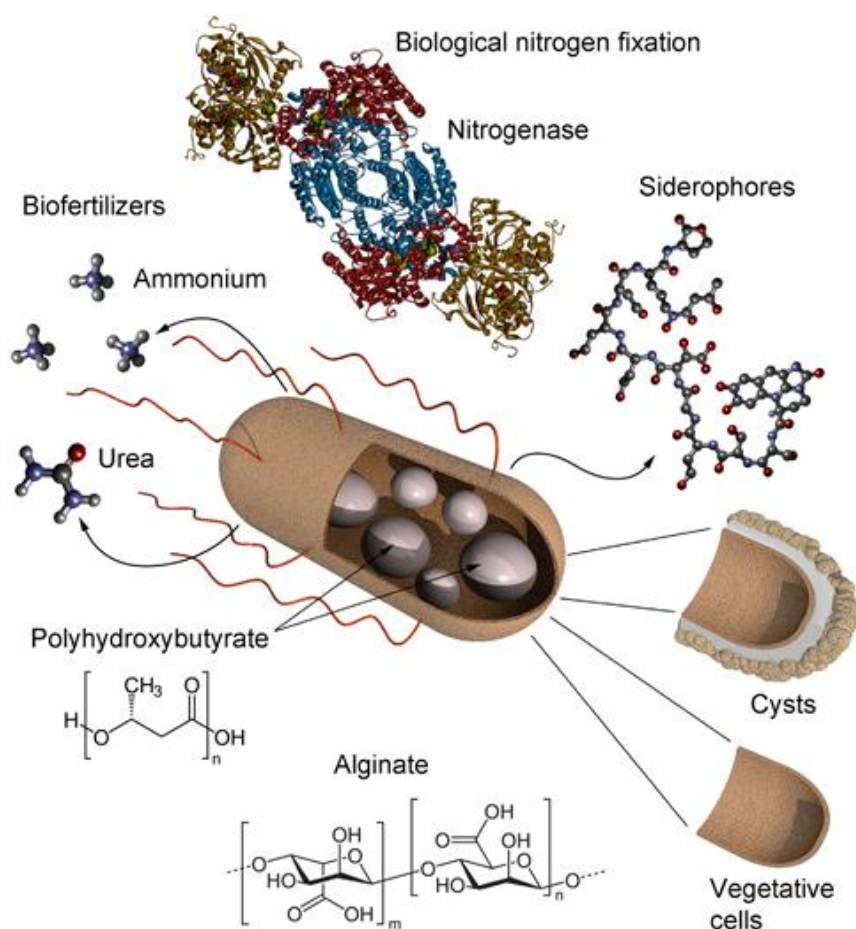


Fig. 2 Propiedades metabólicas de *Azotobacter vinelandii*. Imagen tomada de Barney, 2024.

El alginato es un polisacárido imprescindible para el enquistamiento, pues compone principalmente las dos capas que cubren a los quistes maduros, la exina y la intina, las cepas mutantes no productoras de alginato son incapaces de formar los quistes maduros; el alginato a su vez se produce en las células vegetativas, cuya función es la formación de películas que le permiten a la bacteria unirse a superficies y su acumulación extracelular puede actuar como una barrera contra la difusión de oxígeno o metales pesados (Espín, 2014).

Los alginatos se emplean como gelificantes y estabilizantes en industria farmacéutica y alimentaria, dichos polímeros se extraen principalmente de algas marinas y también se obtienen de fuentes bacterianas como *A. vinelandii* y *Pseudomonas* (Noar y Bruno, 2018). Las bacterias productoras de alginato poseen la capacidad de modificar las propiedades reológicas en los sistemas acuosos, a través de las modificaciones al medio de cultivo (Cuesta *et al.*, 2005).

El PHB es un polímero compuesto por monómeros del β -hidroxíbutirato, forma parte de la familia de polialcanoatos (PHAs), poliésteres formados por unidades de 3-hidroxiácidos y son producidos por más de 90 géneros bacterianos, incluyendo a *Azotobacter*. Este poliéster constituye un complejo grupo de elastómeros y termoplásticos naturales con propiedades parecidas a las del propileno y polietileno, que son plásticos derivados del petróleo, con la ventaja de que el PHB es biodegradable. Para *Azotobacter*, la acumulación de gránulos de PHB es importante porque constituye un material de reserva de carbono y energía, utilizado en periodos de limitación de nutrientes (Aasfar *et al.*, 2021), que no afectan la presión osmótica de la célula, además de que el PHB permite la protección respiratoria en ausencia de una fuente de carbono exógena, pues provee a la célula de una fuente de energía y carbono que se oxida rápido, manteniendo una tasa respiratoria que disminuye la concentración de oxígeno, protegiendo a la nitrogenasa. Otra función del PHB en *A. vinelandii* es que su síntesis permite regular la concentración de los reductores intracelulares NADH y NADPH; en condiciones de baja concentración de oxígeno y una alta concentración de carbono, favorece la concentración de dichos reductores, los cuales inhiben enzimas del catabolismo de glucosa y ciclo de Krebs, dando como resultado la síntesis de PHB, durante la síntesis se almacenan electrones, reduciendo la concentración de NADPH, lo que permite el funcionamiento de vías metabólicas oxidativas (Espín, 2014).

Algunos géneros de *Azotobacter*, como *Azotobacter chroococcum* se considera una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés, Plant Growth-Promoting Rhizobacteria), capaz de colonizar la rizosfera y promover la absorción de hierro a las plantas, queela iones férricos en condiciones deficientes de hierro, a través de la síntesis y liberación de sideróforos en condiciones de deficiencia de hierro biodisponible, logrando aumentar y regular la biodisponibilidad de hierro (Timofeeva *et al.*, 2022).

Al momento de colonizar la rizosfera, *Azotobacter* mejora el crecimiento y valor nutricional de las plantas, por acción de la fijación de nitrógeno y liberación de fitohormonas como el ácido indol acético (Sambul *et al.*, 2020). El efecto positivo en el crecimiento de las plantas se atribuye a una mayor tolerancia al estrés biótico,

pues *Azotobacter* puede actuar como agente de biocontrol (Nuñez *et al.*, 2023). El ácido indol acético es la principal auxina en plantas, ya que controla diversidad de procesos fisiológicos de gran importancia, como son el agrandamiento, división celular, diferenciación tisular y las respuestas a la luz y gravedad (Čolo *et al.*, 2014). Muchas bacterias promotoras del crecimiento vegetal como *Bacillus* spp, *Pseudomonas* spp y *Azotobacter* spp, poseen la capacidad de producir ácido indol acético.

Rol de *Azotobacter* en la fijación del nitrógeno

La fijación biológica de nitrógeno (N) es el proceso por el que el N_2 gaseoso se transforma en amoníaco (NH_3) por acción de la enzima nitrogenasa, conformado por la fijación simbiótica a través de la formación de nódulos y la fijación de nitrógeno por heterótrofos de vida libre (FLNF por sus siglas en inglés, Free-Living Nitrogen Fixation), donde la fijación de N ocurre en la rizosfera en simbiosis bacteria-vegetal, realizada por gran variedad de fijadores de nitrógeno conocidos como diazótrofos, que viven en comunidad, requiere de una fuente de carbono provista por el carbono orgánico disuelto en el suelo y una concentración de oxígeno que se determina por la estructura del suelo y la respiración de raíces y bacterias, los nutrientes necesarios son el fósforo (P), hierro (Fe), molibdeno (Mo) y vanadio (V), los cuales son adquiridos por el diazótrofo, que a su vez puede acceder al N del suelo (Smercina *et al.*, 2019).

Los diazótrofos como *Azotobacter* pueden sintetizar otras rutas metabólicas que sustituyen el cofactor molibdeno-hierro (Mo-nitrogenasa) cuando existen condiciones limitadas de molibdeno, por cofactores vanadio-hierro (V-nitrogenasa) y hierro-hierro (Fe-nitrogenasa), comúnmente, la nitrogenasa está formada por una proteína de hierro responsable de la síntesis de ATP y una proteína de Molibdeno (Mo-Fe), responsable del sustrato (N_2) y la reducción de protones (Halbleib y Ludden, 2000). La fijación del nitrógeno implica una alta cantidad de energía por lo tanto requiere gran suministro de fuente de carbono, la nitrogenasa necesita una alta demanda de ATP, para la conversión de una molécula de N_2 en dos moléculas de NH_3 se invierten 16 ATP y 8 electrones; su ubicación en los exudados de las

raíces, les proveen secreciones ricas en carbono, como azúcares, ácidos orgánicos y mucilagos (Fig. 3) (Smercina *et al.*, 2019).

El oxígeno es un fuerte inhibidor de la actividad de la nitrogenasa, por lo que los diazótrofos deben emplear mecanismos de protección para mantener la fijación del N cuando se presenta el oxígeno, como son el aislamiento temporal de la nitrogenasa, la producción de biopelículas que sirvan como barrera de difusión del oxígeno y el aumento del consumo de sustrato, que aumenta las tasas de respiración y disminuyen la concentración de oxígeno. Los sideróforos de tipo catecolato (azotoquelina y protoquelina) de *Azotobacter vinelandii* previenen la generación del radical hidroxilo, protegiendo del estrés oxidativo (Crowley, 2006).

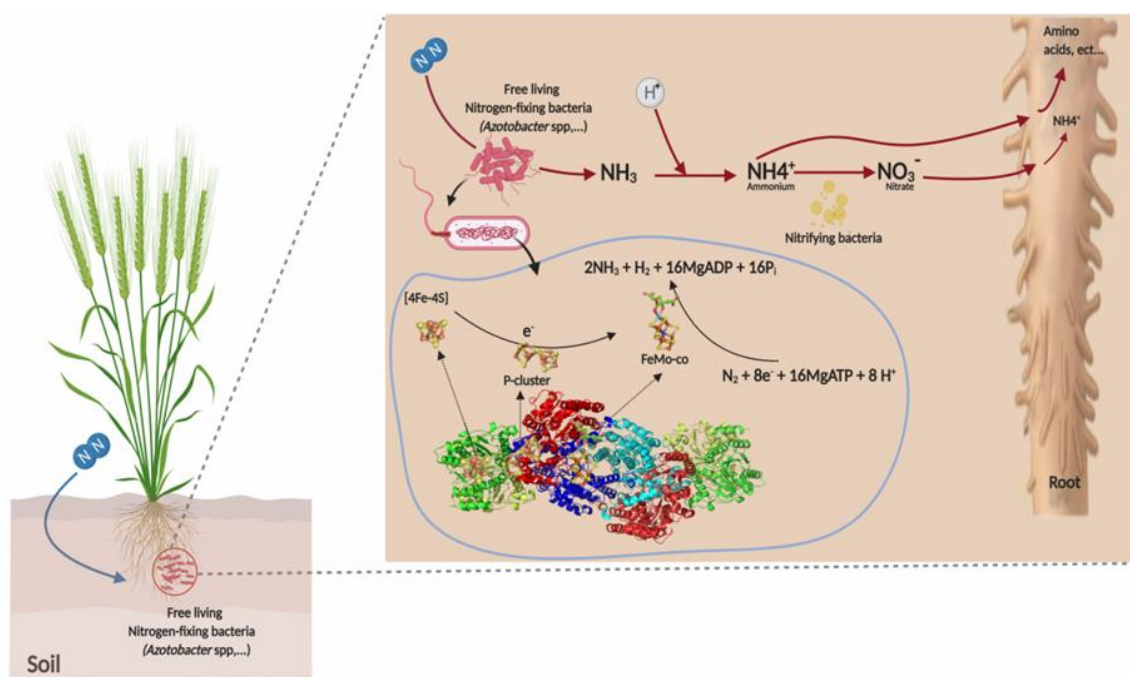


Fig. 3 Fijación biológica de nitrógeno de *Azotobacter* spp., el mecanismo de fijación del nitrógeno por parte de heterótrofos de vida libre. Imagen tomada de Aasfar *et al.*, 2021.

Importancia de la producción de sideróforos y la obtención de hierro

El hierro es un nutriente indispensable para las células eucariotas y procariotas debido a su participación como un cofactor en reacciones de oxido-reducción en procesos celulares fundamentales, como son la replicación, reparación del ADN, respiración celular, fotosíntesis, transporte de oxígeno y fijación biológica del nitrógeno (Kasheii *et al.*, 2021). Debido a la presencia de oxígeno en la atmósfera,

la biodisponibilidad del hierro ferroso (Fe^{2+}) se ve afectada por su oxidación a hierro férrico (Fe^{3+}), volviéndose insoluble al pH fisiológico (Nuñez *et al.*, 2023). La deficiencia de hierro representa el trastorno nutricional más común en humanos y plantas, afectando la salud humana y la calidad nutricional de los cultivos. Por lo anterior, la baja biodisponibilidad del hierro ha condicionado a que diversos organismos desarrollaran mecanismos especializados para adquirir hierro y gestionar su homeostasis para mantener los procesos dependientes del hierro (Romero *et al.*, 2021).

En plantas el hierro es necesario para la síntesis y funcionamiento del aparato fotosintético; en contraste, la ausencia de hierro en las plantas provoca la aparición de manchas amarillas en las hojas jóvenes como resultado de una producción deficiente de clorofila (Ferreira *et al.*, 2019), a esto se le conoce como clorosis. Como alternativas ante la clorosis se ha optado por el uso de agentes quelantes orgánicos, entre ellos los ácidos aminopolicarboxílicos, considerados agentes quelantes fuertes que no son biodegradables, lo que presenta una problemática por su persistencia en los mantos acuíferos y su capacidad para movilizar metales tóxicos (Martins *et al.*, 2018).

Recientemente, se ha implementado la búsqueda de quelantes de hierro que puedan ser degradados en el ambiente, por lo que los compuestos considerados eficientes hasta el momento han sido los sideróforos, moléculas de bajo peso, entre 500 y 1500 Da, que presentan una gran afinidad y selectividad para unirse al Fe (III), son comúnmente producidos por bacterias, hongos y plantas monocotiledóneas en respuesta al estrés por hierro (Pérez *et al.*, 2007). La afinidad de los sideróforos es tan alta que pueden eliminar el Fe presente en las moléculas de las proteínas que se unieron, convierten el Fe unido a proteínas o compuestos solubles en agua de una forma accesible para los microorganismos (Timofeeva *et al.*, 2022).

Los sideróforos se producen intracelularmente y se secretan fuera de la célula como compuestos libres de hierro, después de capturar el hierro, en forma de Fe^{3+} , el complejo hierro-sideróforo se transporta dentro de la célula a través del sistema de transporte (Mishra & Baek, 2021).

Estructura y clasificación de sideróforos

Los sideróforos se pueden clasificar según el grupo funcional con el que interactúa el hierro, en los sideróforos microbianos se clasifican como catecolatos, hidroxamatos y carboxilatos, según la naturaleza química de sus sitios de unión al hierro (Pérez *et al.*, 2007).

Los sideróforos que produce *A. vinelandii* incluye al compuesto fluorescente azotobactina, un sideróforo de tipo pioverdina que posee una cadena peptídica unida a un cromóforo, que tiene la capacidad de emitir fluorescencia (Basulto, 2020) y los sideróforos de tipo catecol: DHBA (ácido dihidroxibenzoico), azotoquelina, aminoquelina y protoquelina (Yoneyama *et al.*, 2011) (Fig.4), que en su estructura presentan el grupo catecol característico; existe la posibilidad de que *A. vinelandii* pueda secretar aún más sideróforos diferentes de los reportados, hasta el momento estos cinco sideróforos son los que se han descubierto y caracterizado a lo largo de 30 años, haciendo uso de ensayos químicos que permiten el análisis de uno o pocos sideróforos a la vez (Baars *et al.*, 2016).

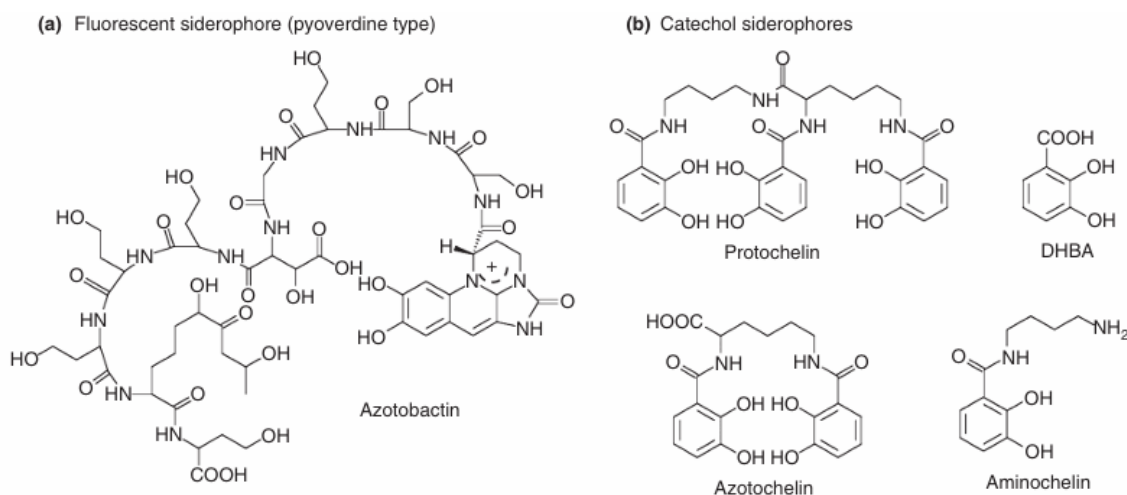


Fig. 4 Estructura química de los sideróforos producidos por *Azotobacter vinelandii*. (a) sideróforo fluorescente o tipo pioverdina. (b) sideróforos de tipo catecol. Imagen tomada de Baars *et al.*, 2016.

Las pioverdinas son sideróforos fluorescentes solubles en agua, de color amarillo verdoso, forman un fuerte complejo con Fe (III) y tienen una afinidad débil con Fe (II), adquieren Mo y V como formas alternas y pueden movilizar metales a partir de materiales de desecho en minerías o suelos contaminados, las pioverdinas pueden movilizar U (VI), Np (V) y otros residuos de minas de uranio (Ahmed & Holmstrong,

2014). Se componen por tres partes, un cromóforo de tipo dihidroquinolina, un péptido específico (de 6 a 12 aminoácidos) y una cadena lateral unida a N en la posición C-3 del cromóforo; la cadena lateral se puede tratar del ácido succínico, málico o de sus derivados amida, la cadena peptídica y lateral están conectadas al grupo carboxilo el grupo NH₂ del cromóforo (Soares, 2022).

El sideróforo azotobactina es producido solo bajo condiciones de limitación severa de Fe, por lo que se le considera el sideróforo “verdadero” de *A. vinelandii*; de forma similar la pioverdina en *Pseudomonas* ha sido ampliamente estudiada por su papel en la adquisición de hierro, mientras que en *A. vinelandii* se requiere estudios más profundos (Wichard *et al.*, 2009). Diversos estudios han demostrado que *A. vinelandii* comparte genes involucrados con la producción de sideróforos en bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *E. coli*. (Tindale *et al.*, 2000).

Los catecoles (1,2 dihidroxibenceno) son compuestos aromáticos que en la vida cotidiana se emplean como reactivos en fotografías, colorantes, producción de cauchos y plásticos (Balderas *et al.*, 2014). Los sideróforos de tipo catecol solo se encuentran en bacterias, están formados por grupos catecolato e hidroxilo, se unen al Fe³⁺ con hidroxilos adyacentes o el extremo catecol, presentan ácido dihidroxibenzoico (DHBA) acoplado a un aminoácido, algunas de sus funciones son la lipofilia, resistencia al pH ambiental y forma un complejo octaédrico hexadentado que proporciona dos átomos de oxígeno en la quelación del hierro (Khan *et al.*, 2018).

Todos los sideróforos de tipo catecol utilizan ácido salicílico o su derivado hidroxilado el 2,3 dihidroxibenzoico como precursor común, la biosíntesis implica transformaciones enzimáticas que comienzan con el corismato (Mishra & Baek, 2021). Cada tipo de sideróforo presenta diferentes configuraciones y propiedades, pero presentan una estructura conservada, consistente en una unidad funcional ligada a transferrina o lactoferrina, con un esqueleto peptídico que interactúa con receptores de membrana externa, la denticidad es crucial para la afinidad del hierro, los catecoles presentan una estructura hexadentada que interactúa con los seis

sitios de coordinación de los iones férricos, generando mayor afinidad por el Fe (III) (Balado, 2009)

Vía de biosíntesis de sideróforos.

La biosíntesis de estos metabolitos es mediada principalmente a través de dos vías bioquímicas, dependiendo de la estructura molecular que presente el sideróforo. La primera vía consiste en enzimas conocidas como Sintetasas de Péptidos No Ribosomales (NRPS), funcionan de manera de líneas de ensamblaje que se compone por módulos en donde se ensambla un sustrato específico necesario para la estructura final, los sideróforos sintetizados presentan estructuras peptídicas que presentan aminoácidos no proteinogénicos, en algunos casos el precursor se ensambla en el citoplasma y su maduración ocurre en el periplasma (Soares, 2022). La segunda vía corresponde con la vía independiente de NRPS (NIS), donde se sintetizan moléculas que no son polipeptídicas, mediante reacciones de condensación entre subunidades alternas de ácidos dicarboxílicos con diaminas o aminoalcoholes, la reacción se concreta en la formación de enlaces amida o éster (Carroll y Moore, 2018).

La biosíntesis de sideróforos representa un costo energético mayor, lo que ha llevado a que las bacterias desarrollaran mecanismos de control que aseguren la síntesis cuando sea necesario; uno de estos mecanismos es el regulador Fur, por sus siglas en inglés (Ferric Uptake Regulator), una proteína que actúa como represor de genes de la biosíntesis de sideróforos, en presencia óptima de hierro, la proteína Fur utiliza el Fe(II) en forma de co-represor para unirse a promotores de genes y bloquear la transcripción (Soares, 2022).

En el caso de la biosíntesis de pioverdinas en *A. vinelandii* es codificada por el clúster de genes pvd, incluye a los genes Avin_25560, Avin_25570, Avin_25580, Avin_25600, Avin_25640, Avin_25550, Avin_25610, importantes para la producción de azotobactina. Una parte de la estructura de dichas proteínas se compone de una cadena polipeptídica que es sintetizada por NRPS, enzimas multidominio que cumplen funciones de síntesis específicas, (Fig. 5) (Balado, 2009). El gen Avin_25560 codifica una proteína similar a PvdD, una NRPS que destaca en la producción de pioverdinas, los genes Avin_25600 y Avin_25640 codifican para

enzimas capaces de formar residuos de aminoácidos no estándar, estructuras importantes para la azotobactina, el gen *Avin_25550* codifica para un receptor de sideróforos, mientras que el gen *Avin_25610* codifica para una proteína reguladora importante en la coordinación de la producción de azotobactina (Baars *et al.*, 2016).

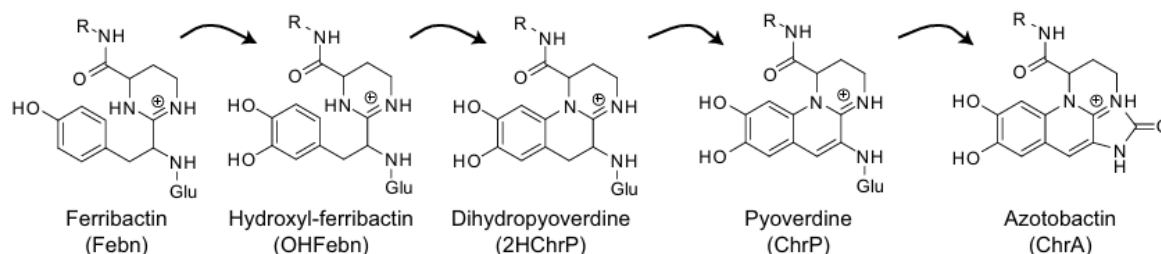


Fig. 5 Vía de síntesis de pioverdinas propuesta para *Azotobacter vinelandii*, se sugieren los intermediarios en la síntesis de azotobactina. Imagen tomada de Baars *et al.*, 2016.

Para *P. aeruginosa* se lleva a cabo por una serie de NRPS, codificada por el gen *pcdI*, la cadena polipeptídica al igual que el cromóforo se sintetiza en el citoplasma y después se traslada al periplasma donde madura y se exporta al espacio extracelular (Visca *et al.*, 2006).

En los estudios realizados por Čolo y colaboradores en 2014, trabajaron con cepas de *P. fluorescens* y *Azotobacter croococcum*, reportaron dos cepas (*Pseudomonas fluorescens* 1 y *Pseudomonas fluorescens* 2) con gran producción de sideróforos, con el método de cromo azurol agar (CAS) se observaron halos de 6.70 mm y 7.50 mm de los aislados respectivamente, mayor a los halos reportados para la cepa de *A. croococcum* (3.50 mm), estas cepas tienen la capacidad de solubilizar fosfatos y producir ácido indol acético.

Diversos estudios han demostrado que *A. vinelandii* comparte genes involucrados con la producción de sideróforos en bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *E. coli*. (Tindale *et al.*, 2000). Para la síntesis de catecoles en *A. vinelandii*, se ven involucrados los productos del clúster de genes *ent*, que contienen los genes *csbC*, *entB*, *entE*, *entA*, *vibH*, *entF*, *csbX*, importantes en la producción y diferenciación de catecoles; el producto del gen *csbC* es el que inicia la síntesis al codificar la enzima isocorismato sintasa, la cual cataliza la conversión del corismato a isocorismato, el producto de los genes *entB*, *entE*, *entA* son los responsables de la síntesis y derivación de DHBA, el producto del gen *vibH* que cataliza una enzima

VibH-similar, la cual cataliza la condensación del DHB unido a EntB con poliaminas que forman la aminoquelina, el gen *entF* codifica una NRPS que es responsable de la condensación de L-lisina con DHB que forma la azotoquelina y el gen *csbX* que codifica bombas de flujo tipo MFS para la exportación de los catecoles (Yoneyama, 2011).

La síntesis de catecoles comienza con la isocorismato sintasa que sintetiza el anillo corísmico, el cual se convierte en ácido 2,3-dihidroxibenzoico (DHBA) por la iscorismatasa (Fig. 6), enzima codificada por el gen *entB*, después se llevarán a cabo modificaciones químicas que dan lugar a la formación de los catecoles restantes (Balado, 2009).

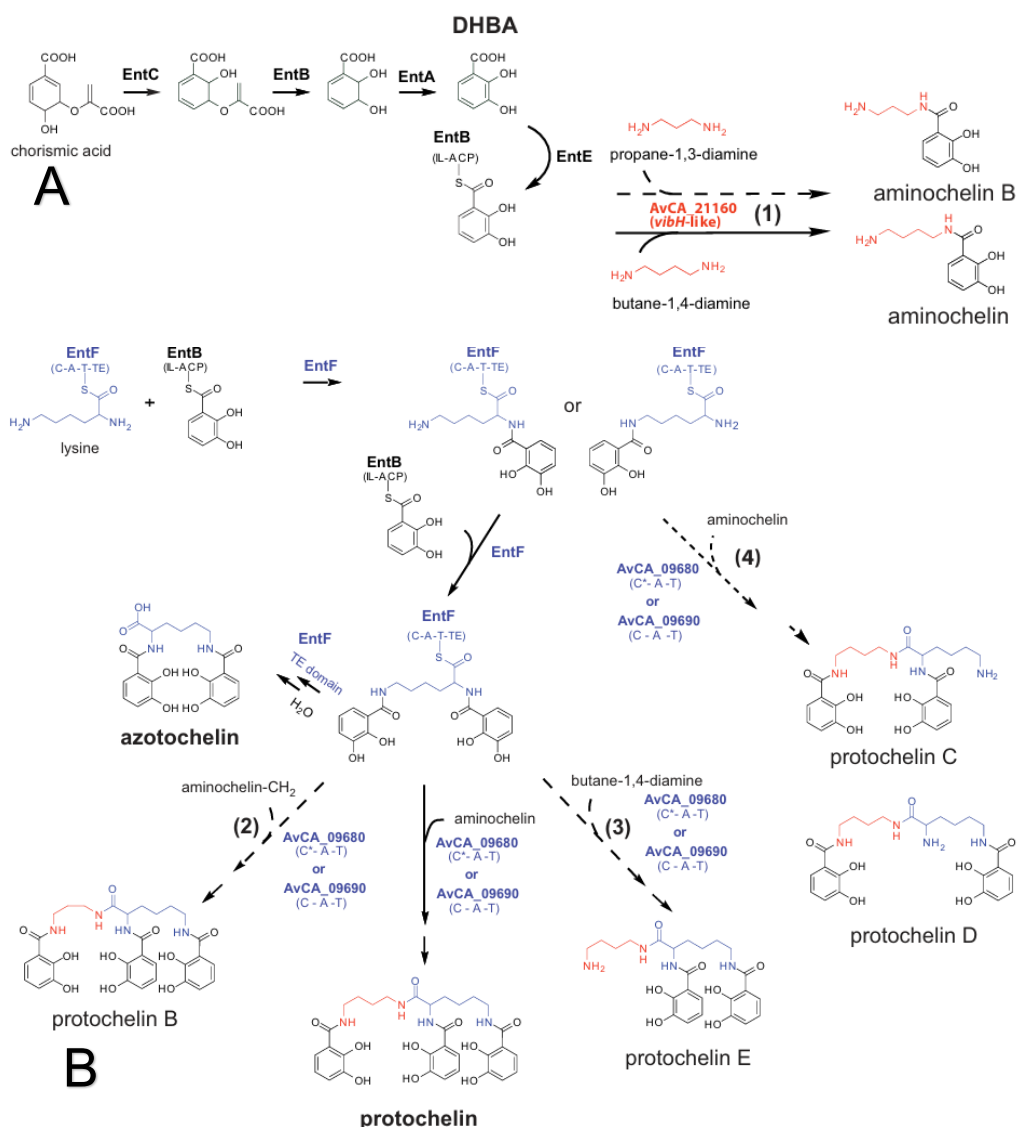


Fig. 6 Vía de síntesis de catecoles propuesta para *Azotobacter vinelandii*. (A) síntesis de los monocatecoles. (B) síntesis de los bis-catecoles y tris-catecoles. Imagen tomada de Baars *et al.*, 2016.

Síntesis de alquilresorcinoles (ARs)

Debido al particular ciclo de vida de *A. vinelandii*, esta bacteria presenta capacidades que le permite diferenciarse en quistes metabólicamente inactivos, lo que le confiere una estrategia de supervivencia eficaz, percibiendo a los quistes una gran resistencia a condiciones adversas como son la desecación y agentes químicos. El quiste maduro está compuesto por un cuerpo central, envuelto por una cápsula, que se comprende por una capa delgada externa laminada conocida como exina y una capa interna gruesa, intina. Las membranas de los quistes metabólicamente inactivos se encuentran formados por lípidos fenólicos conocidos como alquilresorcinoles (ARs), para que ocurra la formación de estos quistes maduros es importante la síntesis de alquilresorcinoles (Funa, 2006). Estos lípidos fenólicos forman parte del proceso de enquistamiento, los ARs reemplazan a los fosfolípidos en las membranas de las células vegetativas y se vuelven componentes de la exina de la envoltura del quiste (López *et al.*, 2020). Los ARs son los primeros lípidos que se sintetizan en el proceso de enquistamiento celular, al incorporarse a las biomembranas las vuelven resistentes a la peroxidación (Bitkov *et al.*, 1992).

Estos metabolitos son capaces de inhibir enzimas unidas a membrana incluidas enzimas respiratorias y suprimir la actividad metabólica de la célula bacteriana gracias a la asociación que tienen los ARs con los fosfolípidos de membrana a través de enlaces de hidrogeno, estos provocan la interrupción de la bicapa lipídica e inhibición de las enzimas respiratorias unidas a membrana; las propiedades antioxidantes permiten la protección de los quistes (Bitkov *et al.*, 1992). La presencia de ARs en la exina contribuye a la segregación de los quistes formados durante el proceso de diferenciación; aunque los ARs participan de forma estructural en la cápsula del quiste maduro, no son esenciales para la formación del quiste ni para la resistencia a la desecación (Segura *et al.*, 2009).

La síntesis de ARs, alginatos y PHB es regulada por el sistema de doble componente GacS/A y el sistema de regulación post-transcripcional de pequeños RNA (sRNA) RsmZ, RsmY y la proteína RsmA (Fig. 7); el sistema de sRNA más

estudiados es el sistema RsmZ. Se estudiaron las mutaciones en los genes *rsmZ1*-*rsmZ7* y se observó que estas mutaciones afectan la biosíntesis de alginato y de alquilresorcinoles, pero el nivel en que son afectadas es muy variable para cada gen (López *et al.*, 2018), los genes con mayor expresión al mutar son *rsmZ2*, *rsmZ6* y *rsmZ7*.

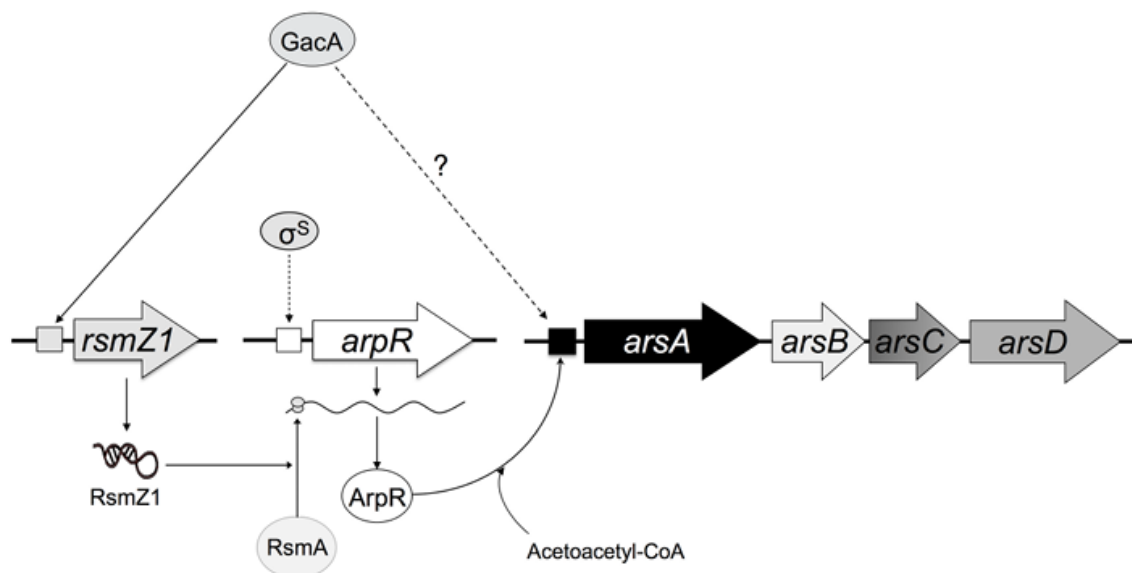


Fig. 7 Vía de síntesis de alquilresorcinoles propuesto en *A. vinelandii* SW136, síntesis controlada por el sistema Gac-Rsm. La proteína GacA controla la síntesis de alquilresorcinoles mediante dos vías, una vía dependiente del sistema Rsm el cual regula la expresión de *arpR* y una vía que controla positivamente la expresión de los genes *ars* independientemente del sistema regulador Rsm. Imagen tomada de Romero *et al.*, 2016.

Los genes *rsmY1* y *rsmY2* se encuentran en una región intergénica separada por 89 nucleótidos, la región reguladora de *rsmY1* muestra una caja de unión a GacA (Hernández *et al.*, 2012). Los resultados derivados de los ensayos de transcripción inversa PCR sugirieron que *rsmY1* y *rsmY2* constituían un solo gen, *rsmY* (Hernández *et al.*, 2012). López y colaboradores (2018) encontraron que este sRNA afecta positivamente la síntesis de ARs y alginato, además de que la expresión de *rsmY* está fuertemente influenciada por el tipo de fuente de carbono que consume la bacteria.

Se analizó la expresión de los genes *rsmZ* y la producción de ARs en diferentes fuentes glucolíticas y gluconeogénicas, las fuentes de carbono glucolíticas fueron fructuosa y glucosa, la fuente gluconeogénica fue succinato; además se utilizó al

alcohol n-butanol para monitorear la expresión de los genes, lo que provocó la acumulación de ARs de manera dependiente de *rsmZ1*. Se reportó la actividad y expresión de los genes y la acumulación de ARs a los cinco días de su incubación, obteniendo una mayor acumulación de ARs en los genes mayormente expresados (*rsmZ6* y *rsmZ7*).

Por otra parte, los principales ARs sintetizados por *A. vinelandii* son el 5-n-heneicosilresorcinol y el 5-n-tricosilresorcinol (Rosales *et al.*, 2024), su síntesis requiere de la actividad de la enzima ArsA (sintasa de ácidos grasos tipo 1), un ácido graso responsable de la síntesis y transferencia de los sustratos de acilo activos para ArsB (policétido sintasa tipo III, PKS) que culmina la síntesis de ARs (Funa *et al.*, 2006).

Para *Azotobacter chroococcum* se ha reportado una gran variedad de homólogos de ARs, con cadenas laterales que varían de C₁₃ a C₂₇, estos compuestos también se han aislado de *Pseudomonas carboxydoflava*. Se ha reportado que las cadenas de alquilo de estas bacterias están saturadas, se especula que la naturaleza anfifílica de los ARs les permite incorporarse a la membrana celular y por tanto cambiar sus propiedades. Las células vegetativas de *A. vinelandii* se diferencian a quistes latentes, los fosfolípidos de membrana se sustituyen por 5-n-alquilresorcinoles y 6-n-alkilpironas, estas células en reposo son mucho más resistentes a factores químicos y físicos, sirven como compuestos anabióticos endógenos, dichos compuestos son secretados igualmente en el medio de crecimiento por varias cepas bacterianas (Rejman & Kozubek, 2004).

Por otra parte, se han estudiado ciertos mecanismos bioquímicos, donde la disponibilidad del hierro es participe en la síntesis de alquilresorcinoles (Targońska *et al.*, 2023), esto se debe a que las concentraciones de hierro afectan la síntesis de lípidos y metabolitos secundarios, ocasionando que el hierro ejerza una influencia sobre la composición lipídica general de la célula bacteriana y la posible dependencia del hierro para la formación de quistes (Segura, 2009). Se mencionan la actividad enzimática y la expresión génica, donde el hierro influye en enzimas clave que pueden mejorar o inhibir funciones catalíticas, como un control regulador en las etapas transcripcionales y postranscripcionales. Además de que la

disponibilidad del hierro podría modular la actividad de la alquilresorcinol sintasa y su expresión génica, pues se presenta una catálisis enzimática y una regulación transcripcional al presentar condiciones óptimas de hierro, mientras que la deficiencia o exceso afectan la síntesis (Targońska, 2023).

ANTECEDENTES

Importancia de la producción de alquilresorcinoles bacterianos

Los ARs se caracterizan por tener una larga cadena de alquilo hidrofóbico y un anillo de resorcinol hidrofílico, estructuras que les confiere diversas funciones biológicas, así como en otros poliquétidos aromáticos sintetizados por PKS (Zabolotneva, 2022), funciones antiinflamatorias, antitumorales y antimicrobianas, también se ha sugerido que podrían ayudar a regular los niveles de lípidos en la sangre y proteger contra enfermedades cardiovasculares. También se han utilizado como biomarcadores en la ingesta de cereales integrales en estudios dietéticos y pueden servir como tratamiento para la diabetes tipo 2 al mejorar la sensibilidad del cuerpo a la insulina (Boulebd & Spiegel, 2023).

Los ARs presentan un potencial como inmunomoduladores y agentes anticancerígenos y antimicrobianos, el mecanismo antitumoral comprende la destrucción del ADN de células tumorales y en prevenir la reparación del ADN, aumentando la tasa de mortalidad celular por toxicidad genética, deteniendo la formación de nuevas células cancerosas (Zabolotneva, 2022). Los mecanismos de estas propiedades siguen sin estar del todo aclarados debido a los múltiples objetivos que tienen los ARs y las complejas relaciones entre las acciones bioquímicas, al parecer los ARs afectan la morfología de la célula mediante la fragmentación del ADN y condensación de los núcleos, lo que conlleva a la apoptosis en células dañadas por agentes genotóxicos. Aunque estas propiedades anticancerígenas se evidencien, son necesarios más estudios que den respuesta a los mecanismos moleculares exactos que realizan los ARs.

Una de las propiedades más estudiadas en los ARs son las propiedades antioxidantes que se presentan en la reducción de cantidad de ROS y en la inhibición de enzimas que se ven involucradas en la producción de radicales libres en condiciones fisiológicas (Luis *et al.*, 2016).

Importancia de la producción de sideróforos bacterianos

La bacteria *A. vinelandii* es considerada un organismo modelo en producción de sideróforos, a través del complejo Fe-sideróforo, su captación se da por los receptores unidos a la membrana de *A. vinelandii*, obteniendo Fe soluble, dichos complejos no son disponibles para los organismos competidores y exhibe actividades inhibitoras para el crecimiento de fitopatógenos (Baars *et al.*, 2016), además los sideróforos pueden unir metales distintos al Fe y permitir la absorción de metales adicionales requeridos en los complejos de nitrogenasas (Mo, V) o incluso secuestrar metales pesados tóxicos, como el tungsteno (W) y zinc (Zn) (Aasfar *et al.*, 2021).

Otros géneros de bacterias incluyen a las bacterias del género *Pseudomonas*, conocidas por su producción de pioverdinas y que representan competencia en el medio; además hay otros géneros que sintetizan sideróforos afines a los géneros, incluye a los géneros *Bacillus*, *Rhizobium*, *Escherichia* y *Salmonella*. Los sideróforos se han aprovechado como mecanismo de control biológico contra fitopatógenos, puesto que la biodisponibilidad de hierro para los patógenos en plantas disminuye puesto que los sideróforos se unen fuertemente al hierro (Ghosh, 2020).

Recientemente, una de las cualidades importantes de los sideróforos que se está estudiando es su capacidad para evadir la resistencia a los fármacos asociada a la membrana utilizando la capacidad de transporte de hierro para administrar fármacos a las células, a través de agentes antibacterianos conjugados con sideróforos (Khasheii *et al.*, 2021), donde la molécula de antibiótico se acopla al sideróforo como un transportador de "caballo de Troya" e ingresa a la célula microbiana utilizando el complejo de recolección Fe-sideróforo. Una vez que el complejo está en el interior de la célula, el complejo fármaco-sideróforo mata a la célula liberando el fármaco y actúa como un agente antibacteriano completo o impide una mayor absorción de hierro (Nagoba & Vedpathak, 2011).

Otras líneas de investigación se han llevado a cabo en el uso de sideróforos en terapias contra el cáncer, debido a la importancia del hierro en la iniciación y metástasis tumoral, se ha encontrado que la reprogramación del metabolismo del hierro es crucial para la supervivencia de la célula tumoral; es por esto que los

sideróforos se pueden usar como terapia para atacar las vías de metabólicas de hierro, llegando a suprimir células cancerosas por apoptosis y sin inhibir el crecimiento de células no cancerosas (Fan & Fang, 2021).

Situación actual de los suelos de cultivo y el papel de sideróforos como promotores de crecimiento.

En la actualidad se ha presentado una degradación continua del suelo causada principalmente por el uso inadecuado a través de la contaminación por productos químicos, con consecuencias sobre la productividad. Además, el uso excesivo de agroquímicos y las prácticas de riesgo intensivo han acelerado dicha degradación, volviendo los suelos fértiles en áreas sin producción (Muñoz, 2024).

El enfoque que se le da a *A. vinelandii* se basa en su importancia como modelo de regulación en la biodisponibilidad de hierro y su relevancia agronómica y ambiental, puesto que *Azotobacter* está distribuido globalmente y contribuye a la fijación biológica de nitrógeno en una amplia gama de condiciones.

Para este proyecto se trabajó con cepas de la bacteria *Azotobacter* sp. con la cepa silvestre *A. vinelandii* AEIV (donada por el Dr. Miguel Castañeda Lucio CICM-ICUAP-BUAP), así como las cepas *A. vinelandii* S4TA y *A. chroococcum* SM3.2, las cuales se aislaron a partir de los muestreos en la Reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán; posterior a su procesamiento por tamizados, se aisló a partir de muestras de suelo de tetecho (*A. vinelandii* S4TA) y muestras de suelo de la mesquitera (*A. vinelandii* SM3.2) empleando el uso de medios de cultivo Burk-Sacarosa (BS), tanto en medio líquido como en medio sólido (García-Gonzáles 2019). Los aislados fueron caracterizados para evidenciar su capacidad de producción de alginatos, donde la cepa *A. vinelandii* S4T produjo mayor cantidad del metabolito en comparación con la cepa tipo *A. vinelandii* AEIV, sin embargo, la cepa *A. chroococcum* SM3 obtuvo la mayor producción en comparación con la cepa tipo *A. vinelandii* AEIV y *A. chroococcum* S6R (García-Gonzáles 2019).

Los dos aislados *A. vinelandii* S4TA y *A. chroococcum* SM3.2 se caracterizaron bioquímicamente para cuantificar la producción de indoles totales, se registró que la cepa *A. chroococcum* SM3.2 produjo mayor AIA, y superó al control (*Pseudomonas putida* KT2440), la cepa S4T produjo el metabolito de forma similar

al control, la cepa *A. chroococcum* S6R produjo la menor cantidad de AIA (Aguilar-Bello 2023).

Otra característica bioquímica que se determinó a los aislados fue su capacidad de solubilización de fosfatos siendo las cepas *A. chroococcum* SM3.2 y *A. vinelandii* S4T las que generaron mayor halo de solubilización y semejante al control (*P. putida* KT2440) (Aguilar-Bello 2023).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Es bien conocido que los sideróforos son producidos bajo condiciones limitantes de hierro, específicamente en condiciones de baja biodisponibilidad (Ahmed & Holmstrom, 2014), además se ha descrito que las bacterias generan una síntesis diferencial en la producción de sideróforos en *Azotobacter vinelandii*. A su vez, anteriormente se ha trabajado con la germinación de semillas en consorcio de inoculación de *Azotobacter* sp. con bacterias promotoras del crecimiento vegetal. La importancia de los alquilresorcinoles en los últimos años por sus capacidades en la etapa del quiste, han llevado a nuevas líneas de investigación que permiten vislumbrar la síntesis de alquilresorcinoles y sus propiedades con nuevos enfoques en el uso de estos. Es por todo esto que se pretende realizar este estudio en el que se evalúen tres condiciones de una cantidad óptima de hierro, de baja biodisponibilidad de hierro y en ausencia de hierro, se compare cual es la condición más beneficiosa en la producción de sideróforos y que se compare la capacidad de promoción de germinación de las cepas, además de que se evalúe la producción de alquilresorcinoles en estas cepas.

JUSTIFICACIÓN

La baja biodisponibilidad de hierro en los suelos agrícolas representa un grave problema global, ya que limita a las plantas absorber el hierro los suelos, especialmente en suelos calcáreos, que representan el 30% de los suelos para cultivo en el planeta. La falta de hierro en las plantas conduce a patologías como la clorosis, producción menor de biomasa y rendimiento bajo de flores y frutos, conduciendo al fracaso del cultivo. Los sideróforos son producidos por

microorganismos como estrategia para obtener hierro no biodisponible del ambiente; estos compuestos contienen grupos catecolato, hidroximato y carboxilato, que son potenciales quelantes de hierro para la nutrición de la bacteria y de la planta, si establece una interacción microorganismo-planta. Debido a que la deficiencia de hierro es un factor limitante para el desarrollo de la planta y de su rendimiento, la producción de sideróforos bacterianos se plantea como una estrategia biotecnológica para mejorar el rendimiento de los cultivos cuando son inoculadas con bacterias productoras de sideróforos. Las capacidades de los alquilresorcinoles junto a su papel estructural con las alquilpironas, que reemplazan a los fosfolípidos en membrana, les brindan mayor resistencia a los quistes en condiciones como la desecación, forman parte de la exina en el quiste y se ven inmersas en el acoplamiento metabólico e inhibición de enzimas respiratorias en la transición a un estado hipometabólico, las ha catapultado como metabolitos secundarios con un gran potencial biotecnológico, debido a su naturaleza y las propiedades que exhibe.

HIPÓTESIS

Las diferentes concentraciones de hierro influirán en la producción de los diferentes sideróforos producidos por *Azotobacter sp.*, se incrementará la síntesis de sideróforos en las condiciones de crecimiento bacteriano con ausencia de hierro. Se espera también una notable promoción de crecimiento en las semillas inoculadas con las cepas bacterianas. Por otra parte, en los aislados se espera la producción de alquilresorcinoles en una fuente de carbono no glucolítica.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Evidenciar la producción de sideróforos y alquilresorcinoles en los aislados de *Azotobacter vinelandii* S4TA, *Azotobacter chroococcum* SM3.2 y la cepa tipo *A. vinelandii* AEIV en diferentes concentraciones de hierro y su efecto en la germinación.

Objetivos Particulares

1. Cuantificar la producción de sideróforos en los aislados de *Azotobacter vinelandii* S4TA, *Azotobacter chroococcum* SM3.2 y la cepa tipo AEIV *A. vinelandii* en tres condiciones de crecimiento: una óptima cantidad de hierro, con baja concentración y con carencia de hierro.
2. Valorar la producción cualitativa y cuantitativa de alquilresorcinoles en los aislados de *Azotobacter vinelandii* S4TA, *Azotobacter chroococcum* SM3.2 y la cepa tipo *A. vinelandii* AEIV en la fuente de carbono n-butanol.
3. Evaluar el efecto de la inoculación de *Azotobacter* sp con producción de sideróforos sobre la germinación de semillas de rábano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Medios de cultivo

Medio mínimo Burk Sacarosa (BS)

Es un medio de cultivo utilizado comúnmente para el crecimiento de bacterias del género *Azotobacter*, para formular el medio es necesario prepara el stock de las sales que componen al medio y esterilizarlas para asegurar un óptimo crecimiento, se mezclan los componentes dependiendo del volumen final que se requiera para preparar el medio de cultivo.

El 10% del volumen final se compone de:

- Sacarosa 2% proveniente de una solución stock de sacarosa al 20% (20 g/l)
- Solución de buffer fosfatos (8 g/l de K_2HPO_4 y 2 g/l de KH_2PO_4)

El 1% del volumen final que requiere de:

- Na_2SO_4 en una concentración de 18 g/l
- $CaCl_2$ en una concentración de 7.3 g/l

El 0.00001% del volumen final se compone de:

- $FeSO_4$ en una concentración de 5 g/l
- $MgCl_2$ en una concentración de 160 g/l
- $NaMoO_4$ en una concentración de 0.2 g/l

El 80% restante se compone de agua destilada al volumen final que sea requerido.

Medio mínimo Burk Sacarosa (BS) líquido deficiente en hierro.

Este medio BS líquido con deficiencia de hierro (DFe) contiene las mismas soluciones utilizadas en la preparación del medio mínimo BS, difiriendo del último en que las soluciones se preparan con agua destiladas sin Fe y el FeSO₄ se utiliza a una concentración de 0.0045 mM con el propósito de inducir la producción de sideróforos en *A. vinelandii* y *A. chroococcum*.

Medio Burk Butanol (BBOH)

En este medio se modifica la fuente de carbono, cambiando la fuente por butanol al 2%, contiene las mismas soluciones utilizadas en la preparación del medio mínimo BS, para 1000 ml del medio se agregan 20.12 ml de butanol al volumen total.

Cepas bacterianas utilizadas

Para realizar este estudio se utilizaron las cepas *A. vinelandii* AEIV, *A. vinelandii* S4TA y *A. chroococcum* SM3.2, se utilizó medio mínimo BS sólido para resembrar las cepas bacterianas hasta obtener una morfología colonial característica, las colonias presentan un fenotipo mucoso y blanquecino (Fig.8). Para la cepa *A. vinelandii* AEIV se aislaron y purificaron cepas con fenotipo mucoide, la cepa *A. chroococcum* SM3.2 presenta colonias puntiformes y blanquecinas, para la cepa *A. vinelandii* S4TA se aisló un fenotipo mucoide y brillante, ya que las pioverdinas presentan cierta fluorescencia que les da ese aspecto brillante a las colonias.

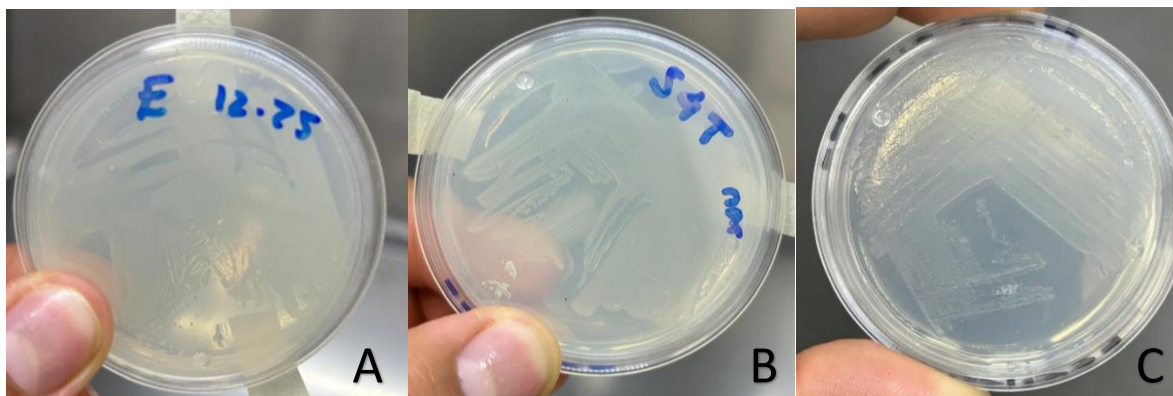


Fig. 8 Placas de medio BS sólido con cepas: (A). *A. vinelandii* AEIV, (B). *A. vinelandii* S4Ta y (C). *A. chroococcum* SM3.2.

Crecimiento de preinóculos e inóculos

Se inicio con el crecimiento de las cepas de *A. vinelandii* AEIV, *A. vinelandii* S4TA y *A. chroococcum* SM3.2 en medio BS sólido, se incubaron por 48 horas a 30°C y se reservaron las cepas en refrigeración para detener el crecimiento; posteriormente

se tomaron colonias de cada cepa y se inocularon en 25 ml de medio líquido BS deficiente de Hierro, realizando duplicados de cada cepa, los preinóculos se incubaron en agitación de 160 rpm a 30°C por 24 horas, una vez crecidos los preinóculos (Fig.9), se tomaron muestras de 14 ml, se centrifugaron a 8000 rpm por 6 min, se decantó el sobrenadante y se obtuvo el paquete celular de cada muestra, se agregó 1 ml de MgSO₄ 10mM y se resuspendió en un vórtex, para nuevamente centrifugar y retirar el sobrenadante, nuevamente se resuspendió en 1 ml de MgSO₄ 10 mM y de esta suspensión se tomó 100 µl para inocular en los triplicados de la cepa, en este caso las cepas presentaron dos tratamientos, en cada cepa se evaluaron triplicados de medio líquido BS deficiente de hierro y medio líquido BS carente de hierro (BS SFe), se inoculo cada matraz que contiene los medios antes mencionados y se incubaron en agitación de 160 rpm a 30°C por 48 horas (Fig.10).

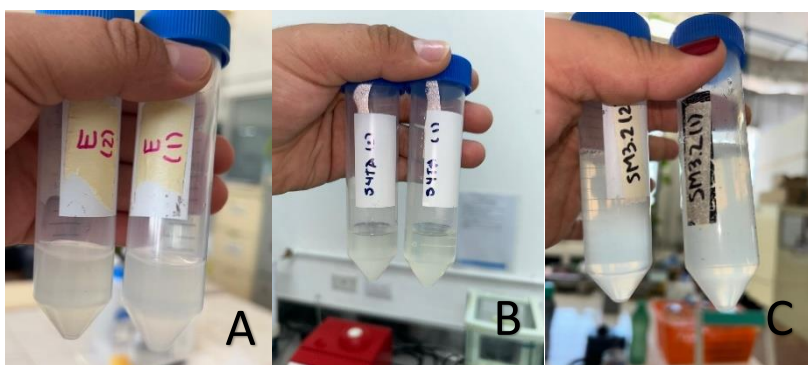


Fig. 9 (A) Preinóculos de las cepas *A. vinelandii* AEIV. (B) *A. vinelandii* S4Ta y (C) *A. chroococcum* SM3.2 de 48 horas.



Fig.10 Inóculos de las cepas *A. vinelandii* AEIV, *A. vinelandii* S4Ta y *A. chroococcum* SM3.2 de ambos tratamientos, en 48 horas.

Técnicas

Metodologías para la cuantificación de sideróforos

Cuantificación de pioverdinas (Page y Huyer, 1984)

Para realizar la cuantificación se incubaron los preinóculos de las cepas a 18 horas y en agitación de 160 rpm y 30°C, al terminar la incubación se lavaron las células con MgSO_4 al 10 mM y se tomaron 100 μl para realizar los inóculos e incubarlos a las mismas condiciones, al terminar el tiempo de incubación, se continuo con la determinación, se tomaron muestras de 5 ml y se centrifugaron a 8000 rpm por 6 minutos, se transfirió el sobrenadante de las muestras a un nuevo tubo para posteriormente acidificar las muestras con HCl 5N hasta que el pH disminuya a 2, por último, estas muestras se leyeron en un espectrofotómetro y se midió su absorbancia a 380 nm para la determinación de pioverdinas.

Cuantificación de catecoles (Barnum, 1977)

Para realizar la cuantificación se incubaron los preinóculos de las cepas a 18 horas y en agitación de 160 rpm y 30°C, al terminar la incubación se lavaron las células con MgSO_4 y se tomaron 100 μl para realizar los inóculos e incubarlos a las mismas condiciones, al terminar el tiempo de incubación, se continuó con la cuantificación de catecoles, se tomaron muestras de 5 ml y se centrifugaron a 8000 rpm por 6 minutos, se tomaron muestras de 400 μl de los sobrenadantes obtenidos de los inóculos crecidos de los triplicados de cada medio evaluado, a cada muestra se le adiciono 200 μl de buffer acetatos 3M y 200 μl de solución Nitrito-Molibdato 0.1 M, se dejó incubar a temperatura ambiente por 30 minutos y por último se midió la absorbancia de las muestras a 508 nm para la determinación de catecoles.

Cuantificación de proteínas por el método de Lowry

Para poder manejar los datos obtenidos de los sideróforos es necesario obtener las absorbancias de proteína de cada muestra, por lo que se tomó 1 ml de los inóculos, dichas muestras se centrifugaron a 12000 rpm por 2 min, se retiró el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió con 1 ml de MgSO_4 10 mM, posterior a esto se tomó 10 μl de cada muestra y se llevó a un volumen final de 200 μl con agua tridestilada, a su vez se corrió una curva de calibración con albumina, a cada muestra de albumina se llevó a un volumen de 200 μl con su respectiva cantidad de albumina sérica; después se añadió 1 ml de solución reactiva, se vórtexeo cada muestra y se dejaron en reposo por 10 min, al terminar el reposo se agregaron 100

μl de reactivo folín y se dejó reposar 30 minutos cada muestra, por último se midió la absorbancia de las muestras a 625 nm para la determinación de proteínas.

Metodologías para la determinación de alquilresorcinoles

Cualificación de alquilresorcinoles

Para esta metodología se realizan preinóculos e inóculos antes mencionados, una vez crecidos se centrifugaron los inóculos y se lavó el paquete celular con MgSO_4 10 mM, lavando y retirando el exceso de sacarosa, después cada muestra se resuspende en 1 ml de MgSO_4 10 mM, se toman 10 μl de las muestras para realizar la cuantificación de proteína por el método de Bradford, una vez obtenidas las absorbancias se realizaron cálculos para obtener las diluciones correspondientes para que todas las cepas presenten una absorbancia similar, a partir de estos cálculos se tomó lo requerido y se inocularon en las placas de medio Burk-n-butanol (BBOH), en cada placa se ubicó una de las cepas con sus duplicados y se colocaron 3 repeticiones de la dilución sobre un filtro High bond previamente esterilizado, estas placas se incubaron por 5 días a 30 °C, al concluir los 5 días se tiñeron las placas con sales Fast Blue B formulado ese mismo día, se esperó a que se seque y se realizara la reacción.

En este trabajo se implementaron técnicas espectrofotométricas para la cualificación y cuantificación de alquilresorcinoles, se usaron sales de diazono como el Fast Blue B, que le proporciono una coloración rojo oscuro que es medido espectrofotométricamente, la intensidad del color fue proporcional a la concentración de alquilresorcinol encontrada en la muestra. Para realizar la técnica lo primero que se realizó fue extraer este lípido mediante la adición de acetona. Al momento de cualificar se usó la técnica de cribado de colonias productoras de alquilresorcinoles, se visualizó el viraje a color rojo, la coloración se extendió a las capas externas del quiste.

Cuantificación de alquilresorcinoles

En la siguiente metodología se realizaron los preinóculos e inóculos antes mencionados, una vez crecidos los inóculos se lavan las células con MgSO_4 10Mm hasta retirar toda la sacarosa del medio, se resuspende en 1 ml de MgSO_4 10Mm y se toma 100 μl de la muestra para inocular en matraces con medio BBOH líquido y

se incubaba durante 5 días en agitación de 160 rpm a 30 °C, al término de los 5 días se colectan las células y se resuspenden en 1 ml de MgSO₄ 10Mm, con una muestra de 50 µl se cuantifica las proteínas por el método de Lowry y el resto se centrifuga a 13000 rpm por 5 min, se retira el sobrenadante de cada muestra dejando la pastilla, a la cual se le agrega 1 ml de acetona para extraer los primeros alquilresorcinoles, se resuspende con la pipeta y se deja reposar por 1 hora en la oscuridad a temperatura ambiente, después del tiempo se centrifuga a 13000 rpm por 5 min, se colecta la acetona y se añade otro ml de acetona para extraer nuevamente los alquilresorcinoles, se resuspende y se deja toda la noche a temperatura ambiente en la oscuridad, al día siguiente se centrifuga a 14000 rpm por 5 min y se recolecta la acetona, de los extractos resultantes se mezclan y se llevan a la centrífuga de vacío para concentrar el extracto, se espera hasta que se evapore por completo, se añaden 200 µl de acetona y se resuspende, para el siguiente paso se toman 100 µl de cada muestra y se pone a secar en la centrífuga de vacío. A cada muestra se le añade 1 ml de solución azul rápido B-propanol, se deja reaccionando por 1 hora en la oscuridad, al término de la hora se leen las muestras a una longitud de onda de 520 nm y se corre simultáneamente una curva estándar de 4-(4 Nitrofenilazo) resorcinol en acetona (4,10,20 y 40 µg/ml).

Desinfección e inoculación de semillas

El protocolo que se siguió fue la desinfección total de las semillas, se escoge una cantidad de semillas suficientes y se lava con agua tridestilada, posteriormente con hipoclorito de sodio al 7% y por último lavadas con etanol al 70%. Posteriormente se ubican en un medio de agar, con un total de 40 semillas en cada placa, una vez ubicadas las semillas se inocula la placa con 1 ml de la cepa bacteriana crecida en un medio determinado a 48 horas.

DESARROLLO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

Cuantificación de sideróforos producidos por cepas de *A. vinelandii* y *A. chroococcum*

Las cepas *A. vinelandii* AEIV, *A. vinelandii* S4TA y *A. chroococcum* SM3.2, fueron sembradas en placas con medio mínimo BS y posteriormente inoculadas en

condiciones de control ($18 \mu\text{M Fe}_2\text{SO}_4$), deficiencia ($4.5 \mu\text{M Fe}_2\text{SO}_4$) y ausencia de hierro para estimular la producción de azotobactina.

De las cepas cultivadas en medio BS líquido en ausencia de hierro, a las 24 horas se observa la presencia de azotobactina por su evidente fluorescencia emitida por la población bacteriana (Fig. 11 B), mientras que las cepas cultivadas en medio BS líquido con deficiencia de hierro presentaron crecimiento celular, con una mínima fluorescencia emitida (Fig. 11 A).

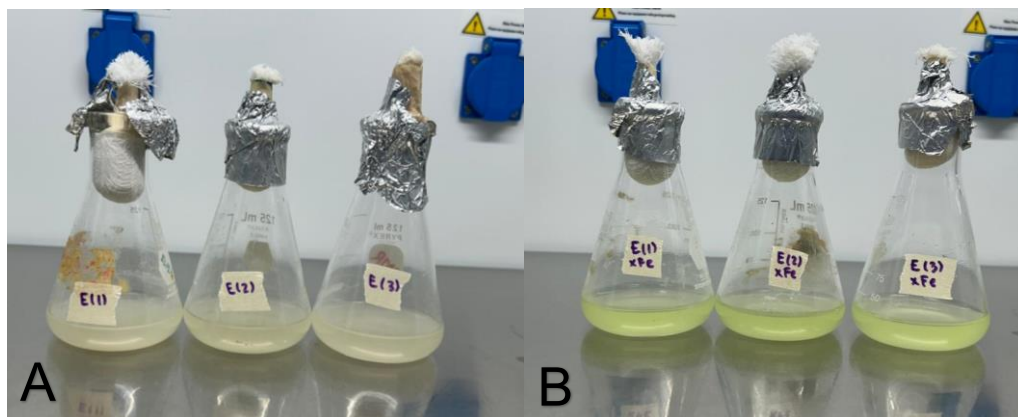


Fig. 11 Comparación entre los inóculos de la cepa *A. vinelandii* AEIV en dos tratamientos. (A) medio mínimo BS líquido con deficiencia de hierro. (B) medio mínimo BS líquido en ausencia de hierro.

Cuantificación de azotobactina

Para la cuantificación de azotobactina determinada a las 48 horas, se registró una mayor producción de las tres cepas bacterianas en la condición ausente de hierro, seguida por la condición deficiente de hierro ($4.5 \mu\text{M de Fe}_2\text{SO}_4$) y la condición control con una cantidad óptima de hierro ($18 \mu\text{M de Fe}_2\text{SO}_4$), en esta condición la producción de azotobactina es menor.

La producción de azotobactina en la condición ausente de hierro para la cepa tipo *A. vinelandii* AEIV fue de $1.229 \mu\text{g azotobactina/mg proteína}$, en cambio, la producción en la condición control (cantidad óptima de hierro) fue de $0.134 \mu\text{g azotobactina/mg proteína}$, con una diferencia estadísticamente significativa entre ambas condiciones. La producción de azotobactina en la condición ausente de hierro para el aislado *A. vinelandii* S4TA fue de $1.333 \mu\text{g azotobactina/mg proteína}$, mientras que la producción en la condición control (cantidad óptima de hierro) fue de $0.138 \mu\text{g azotobactina/mg proteína}$, con una diferencia estadísticamente significativa entre ambas condiciones; se registró la producción de azotobactina en

la condición ausente de hierro para el aislado *A. chroococcum* SM3.2 y fue de 1.254 μg azotobactina/mg proteína, en comparación con la producción en la condición control (cantidad óptima de hierro) que fue de 0.150 μg azotobactina/mg proteína, con una diferencia estadísticamente significativa entre ambas condiciones (Fig.12).

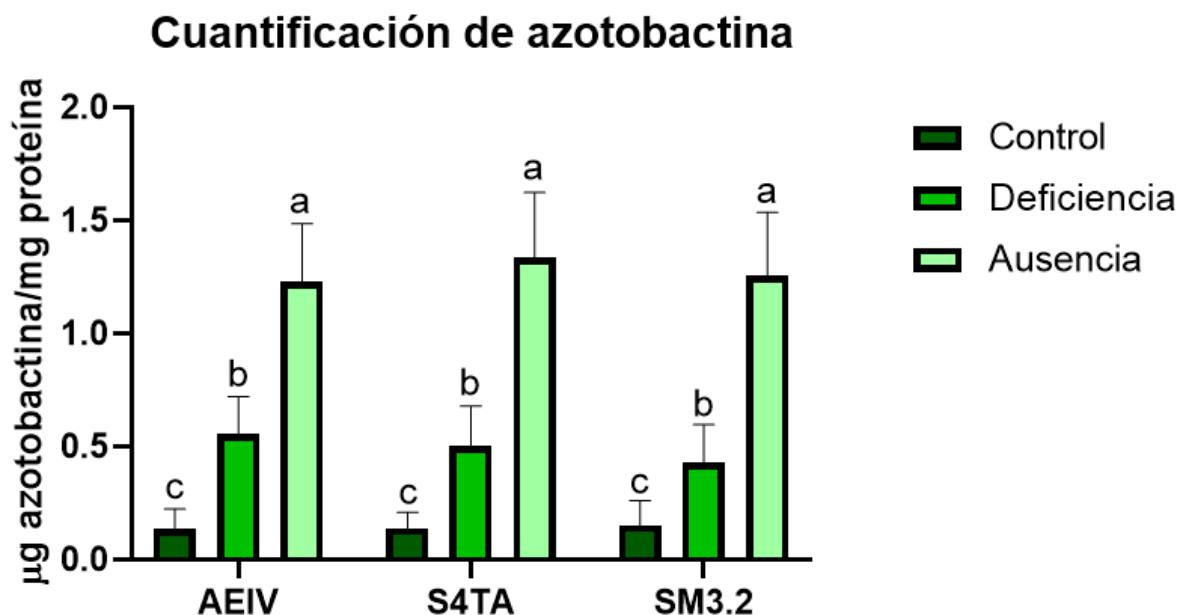


Fig. 12 Cuantificación de azotobactina a las 48 horas de cultivo de las cepas *A. vinelandii* AEIV: AEIV, *A. vinelandii* S4TA: S4TA y *A. chroococcum* SM3.2: SM3.2 en los diferentes tratamientos. Letras diferentes representan diferencia estadísticamente significativa. $p = 0.0148$.

Se realizó una segunda cuantificación de azotobactina a las 96 horas de cultivo, se registró una tendencia similar en las cepas con respecto a la producción a las 48 horas, con una mayor producción de azotobactina en este periodo de 96 horas, en las tres cepas. Cabe resaltar, que la biosíntesis de este sideróforo en la condición de deficiencia de hierro superó la producción en comparación con la condición control, pero la producción de azotobactina en la condición ausente de hierro fue superior a las condiciones restantes para las tres cepas estudiadas.

Para la cepa tipo *A. vinelandii* AEIV, la producción de azotobactina (ausencia de hierro) fue de 2.440 μg azotobactina/mg proteína, mientras que la producción del metabolito en la condición control con una cantidad óptima de hierro fue de 0.258 μg azotobactina/mg proteína, con una diferencia estadísticamente significativa entre ambas condiciones de crecimiento. La producción de azotobactina en la condición ausente de hierro para el aislado *A. vinelandii* S4TA fue de 2.046 μg

azotobactina/mg proteína, en cambio, la producción del metabolito en la condición control con una cantidad optima de hierro fue de 0.221 μg azotobactina/mg proteína, con una diferencia estadísticamente significativa entre ambas condiciones; se registró la producción del metabolito en la condición ausente de hierro para el aislado *A. chroococcum* SM3.2 y fue de 2.003 μg azotobactina/mg proteína, sin embargo, la producción del metabolito en la condición control con una cantidad optima de hierro fue de 0.327 μg azotobactina/mg proteína, con una diferencia estadísticamente significativa entre ambas condiciones de crecimiento (Fig.13).

Cuantificación de azotobactina

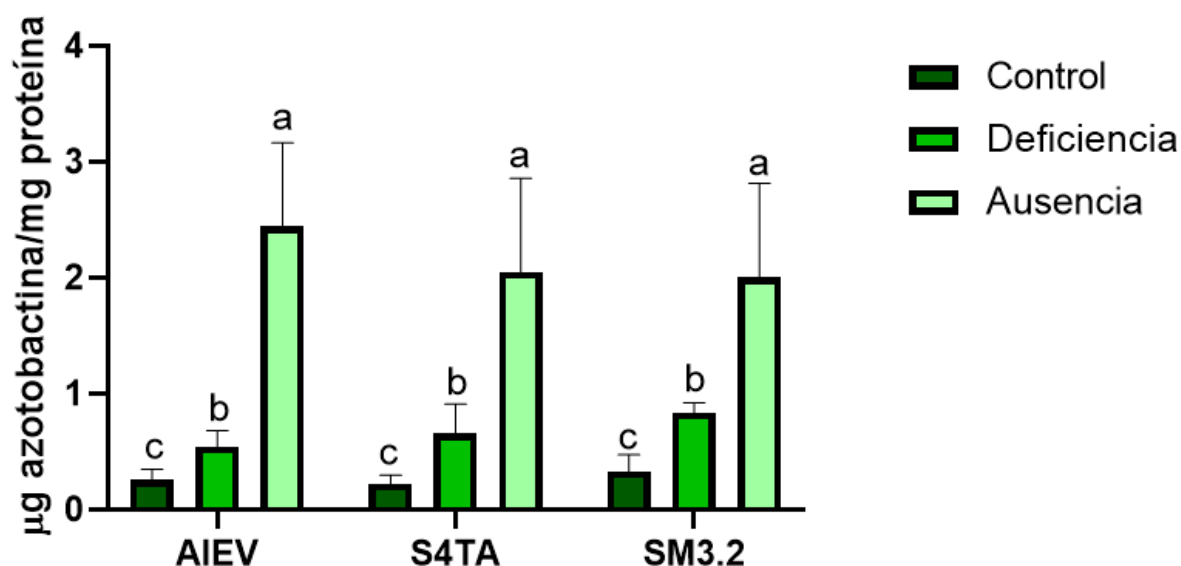


Fig. 13 Cuantificación de azotobactina a las 96 horas de cultivo de las cepas *A. vinelandii* AEIV: AEIV, *A. vinelandii* S4TA: S4TA y *A. chroococcum* SM3.2: SM3.2 en los diferentes tratamientos. Letras diferentes representan diferencia estadísticamente significativa. $p = 0.0588$.

Cuantificación de catecoles

Para la cuantificación de catecoles determinada a las 48 horas, se registró la producción mayor de catecoles en las cepas *A. vinelandii* AEIV y *A. vinelandii* S4TA en las condiciones de ausencia de hierro y deficiencia de hierro (4.5 μM de Fe_2SO_4) y una menor producción en la condición control con una cantidad optima de hierro (18 μM de Fe_2SO_4).

La producción superior de catecoles en *A. vinelandii* AEIV fue en la condición deficiente de hierro con 2.004 μg catecol/mg proteína, mientras que la menor producción ocurrió en la condición control (cantidad optima de hierro) que fue de

0.334 $\mu\text{g catecol/mg proteína}$, con una diferencia estadísticamente significativa entre ambas condiciones. De forma similar, el aislado *A. vinelandii* S4TA produjo la mayor cantidad de catecoles en la condición ausente de hierro (1.719 $\mu\text{g catecol/mg proteína}$), sin embargo, la producción en la condición control (cantidad optima de hierro) fue de 0.251 $\mu\text{g catecol/mg proteína}$, con una diferencia estadísticamente significativa entre ambas condiciones.

Para el aislado *A. chroococcum* SM3.2 la mayor producción de catecoles se observó en la condición ausente de hierro con 2.077 $\mu\text{g catecol/mg proteína}$, seguida por la condición de deficiencia de hierro (1.575 $\mu\text{g catecol/mg proteína}$) y para el caso de la producción en la condición control (cantidad optima de hierro) fue de 0.227 $\mu\text{g catecol/mg proteína}$, con una diferencia estadísticamente significativa entre las tres condiciones (Fig. 14).

Cuantificación de catecoles

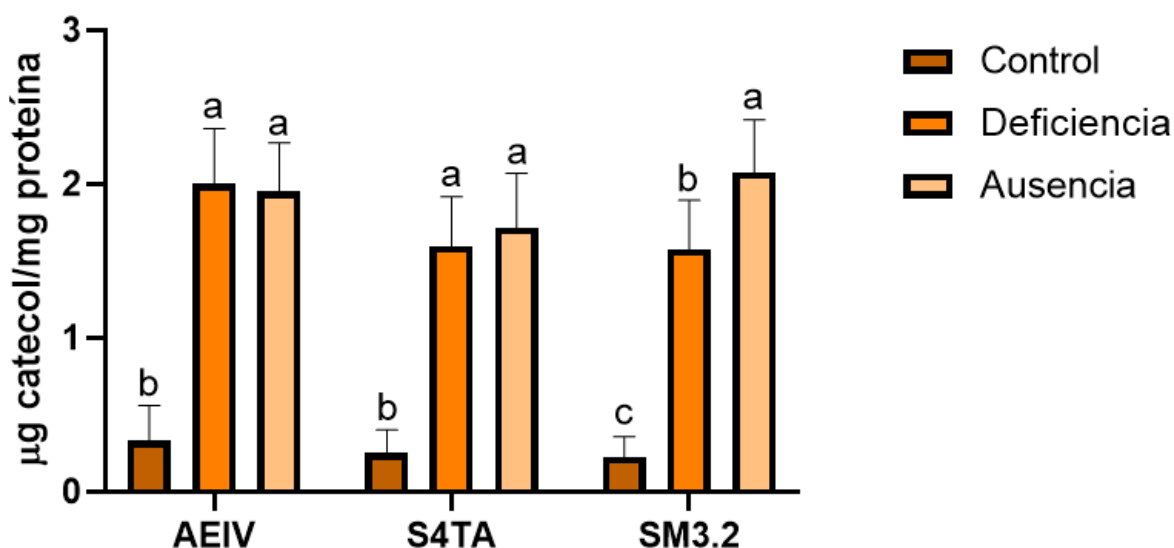


Fig. 14 Cuantificación de catecoles a las 48 horas de cultivo de las cepas *A. vinelandii* AEIV: AEIV, *A. vinelandii* S4TA: S4TA y *A. chroococcum* SM3.2: SM3.2 en los diferentes tratamientos. Letras diferentes representan diferencia estadísticamente significativa. $p < 0.0001$.

Se realizó una segunda cuantificación de catecoles a las 96 horas de cultivo y se registró que la mayor producción del metabolito en las tres cepas bacterianas ocurrió en la condición de deficiencia de hierro y con una menor producción en las condiciones control; se observó una producción mínima de catecoles en la condición ausencia de hierro para las tres cepas estudiadas.

La mayor producción de catecoles de la cepa *A. vinelandii* AEIV ocurrió en la condición de deficiencia de hierro y fue de 1.688 µg catecol/mg proteína, seguida de la condición control (cantidad optima de hierro) con 0.207 µg catecol/mg proteína, con una diferencia estadísticamente significativa entre ambas condiciones. La producción de catecoles en la condición deficiente de hierro para el aislado *A. vinelandii* S4TA fue de 1.688 µg catecol/mg proteína, al contrario, la producción del metabolito en la condición control (cantidad optima de hierro) fue de 0.202 µg catecol/mg proteína, con una diferencia estadísticamente significativa entre ambas condiciones. La producción de catecoles en la condición deficiente de hierro para el aislado *A. chroococcum* SM3.2 fue de 1.768 µg catecol/mg proteína, sin embargo, la producción del metabolito en la condición control (cantidad optima de hierro) fue de 0.147 µg catecol/mg proteína, con una diferencia estadísticamente significativa entre ambas condiciones de crecimiento (Fig. 15).

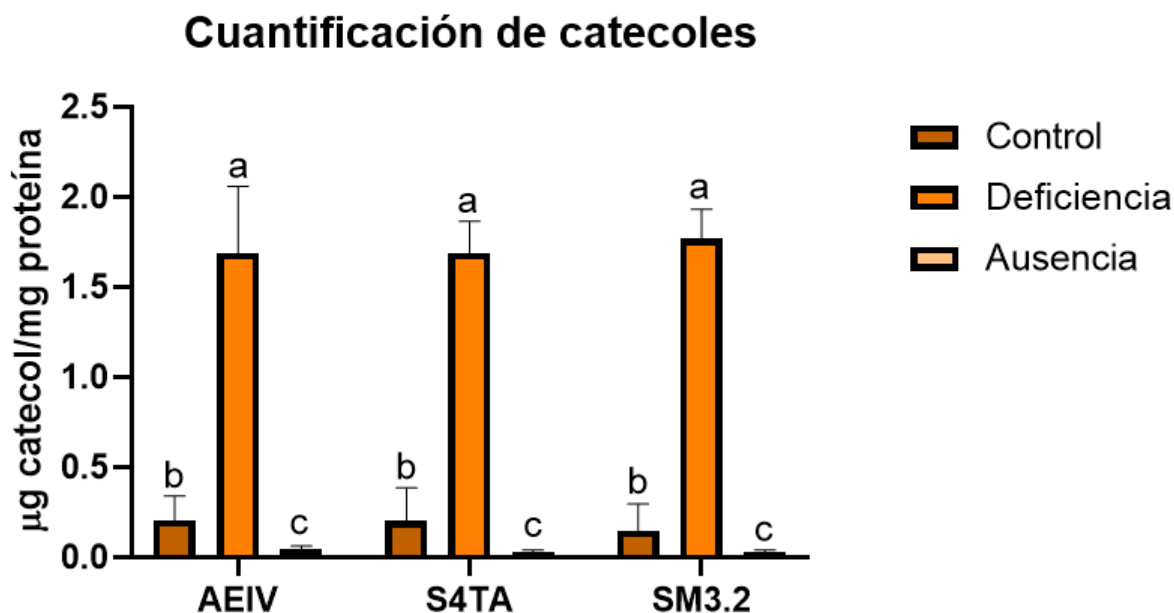


Fig. 15 Cuantificación de catecoles a las 96 horas de cultivo de las cepas *A. vinelandii* AEIV: AEIV, *A. vinelandii* S4TA: S4TA y *A. chroococcum* SM3.2: SM3.2 en los diferentes tratamientos. Letras diferentes representan diferencia estadísticamente significativa. $p = 0.0148$.

Germinación de semillas de rábano inoculadas con *Azotobacter* sp con producción de sideróforos

Los porcentajes de germinación de semillas de rábano se obtuvieron de aquellas semillas inoculadas con los cultivos bacterianos crecidos a las 48 horas, tanto en

medio con deficiencia y ausencia de hierro, y se tomó como control a los cultivos bacteriano crecidos con $18 \mu\text{M Fe}_2\text{SO}_4$ (que representa el 100% de hierro que se le agrega al medio).

La germinación de semillas de rábano fue mayor en aquellas semillas inoculadas con cultivos bacterianos crecidos en medio deficiente de hierro, fue menor en las semillas inoculadas con cultivos bacterianos crecidos en medio ausente de hierro (Fig. 16, Fig. 17 y Fig. 18).

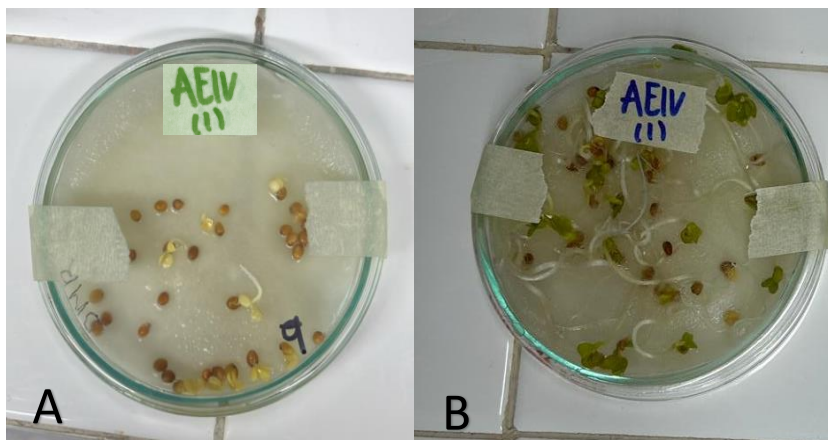


Fig.16 Comparación de la germinación de las semillas inoculadas con la cepa *A. vinelandii* AEIV: AEIV, entre: (A) el medio ausente de hierro. (B) el medio deficiente de hierro. La n de cada tratamiento fue de 40 semillas.

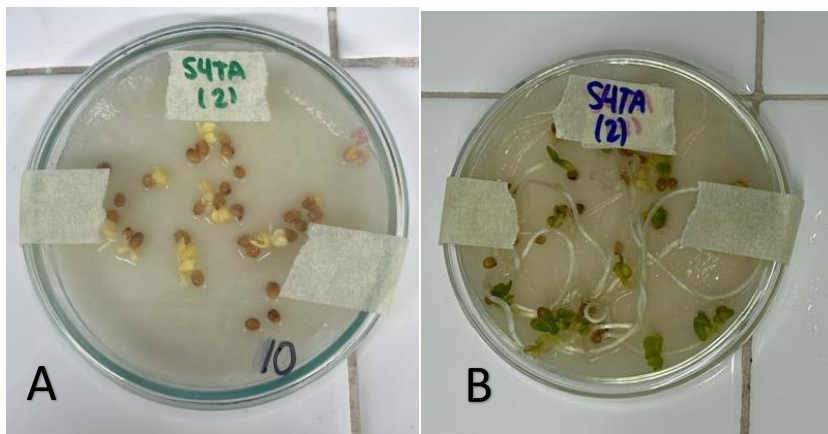


Fig.17 Comparación de la germinación de las semillas inoculadas con la cepa *A. vinelandii* S4TA: S4TA, entre: (A) el medio ausente de hierro. (B) el medio deficiente de hierro. La n de cada tratamiento fue de 40 semillas.

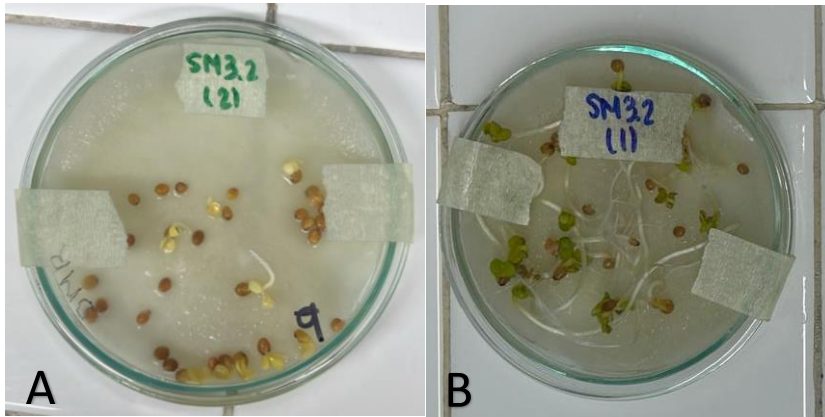


Fig.18 Comparación de la germinación de las semillas inoculadas con la cepa *A. chroococcum* SM3.2: SM3.2, entre: (A) el medio ausente de hierro. (B) el medio deficiente de hierro. La n de cada tratamiento fue de 40 semillas.

Se registró un mayor porcentaje de germinación con la inoculación de cultivo bacteriano a las semillas, con el aislado *A. vinelandii* S4TA crecido en un medio de cultivo deficiente de hierro, el porcentaje de germinación fue similar con la inoculación de las cepas *A. chroococcum* SM3.2, *A. vinelandii* AEIV y el control, sin diferencia estadísticamente significativa (Fig.19).

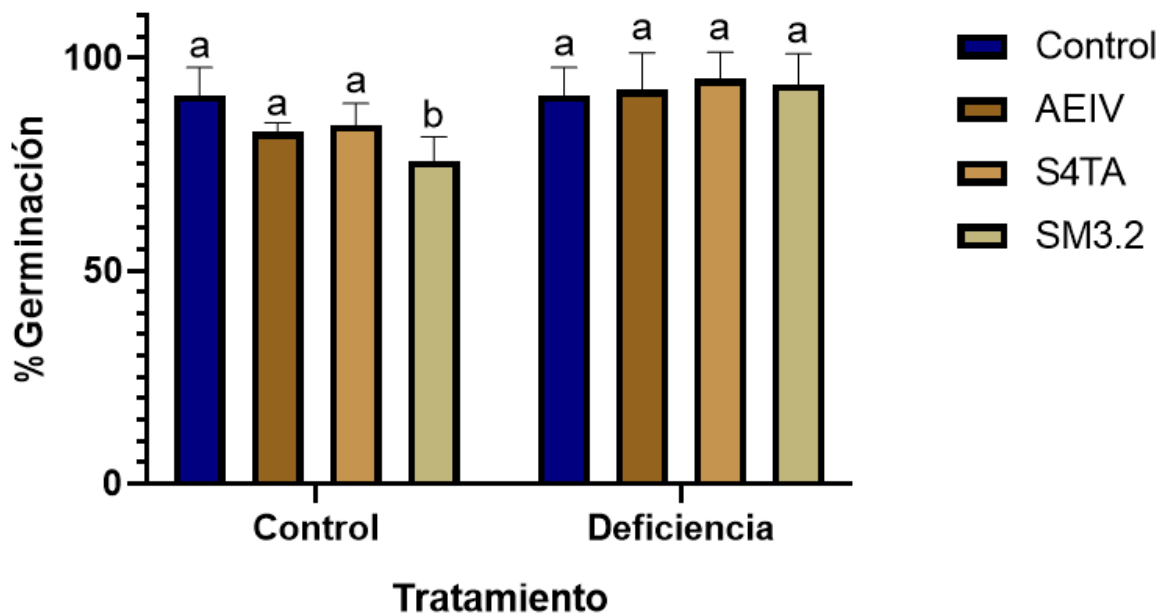


Fig.19 Porcentaje de germinación de las semillas de rábano crecidas en ambos tratamientos, se analizaron 4 grupos, grupo sin inoculación: Control, la cepa *A. vinelandii* AEIV: AEIV, *A. vinelandii* S4TA: S4TA y la cepa *A. chroococcum* SM3.2: SM3.2. La n de cada tratamiento fue de 40 semillas. $p = 0.0119$.



Fig. 20 Comparación de las semillas germinadas en el tratamiento de deficiencia de hierro. (A) Plántulas de la cepa *A. vinelandii* AEIV: AEIV, (B) plántulas del aislado *A. vinelandii* S4TA: S4TA, (C) plántulas del aislado *A. chroococcum* SM3.2 y (D) plántulas del tratamiento control (sin inocular). La n de cada tratamiento fue de 40 semillas.

En la condición control, las bacterias fueron crecidas en condiciones óptimas de hierro ($18 \mu\text{M}$ de Fe_2SO_4) y se registraron las medidas de las plántulas en tres días diferentes posterior al inicio de la germinación. A los 7 días, las semillas inoculadas con el aislado *A. vinelandii* S4TA presentaron la longitud mayor (13.2 cm), seguida de las plántulas inoculadas con el aislado *A. chroococcum* SM3.2, la cepa tipo *A. vinelandii* AEIV, las plántulas con menor longitud fueron las del grupo control (Fig. 21 A) (sin contacto con bacterias). A los 10 días, las plántulas inoculadas con las tres bacterias presentaron promedios de longitud superior con diferencia estadísticamente significativa respecto a las plántulas sin inocular. A los 14 días, todos los tratamientos de las plántulas crecidas con las cepas *A. vinelandii* AEIV, *A. vinelandii* S4TA y *A. chroococcum* SM3., presentaron una longitud mayor respecto al control en medio BS sin presencia de organismos. Sin embargo, entre los tratamientos, no se encuentran diferencias significativas.

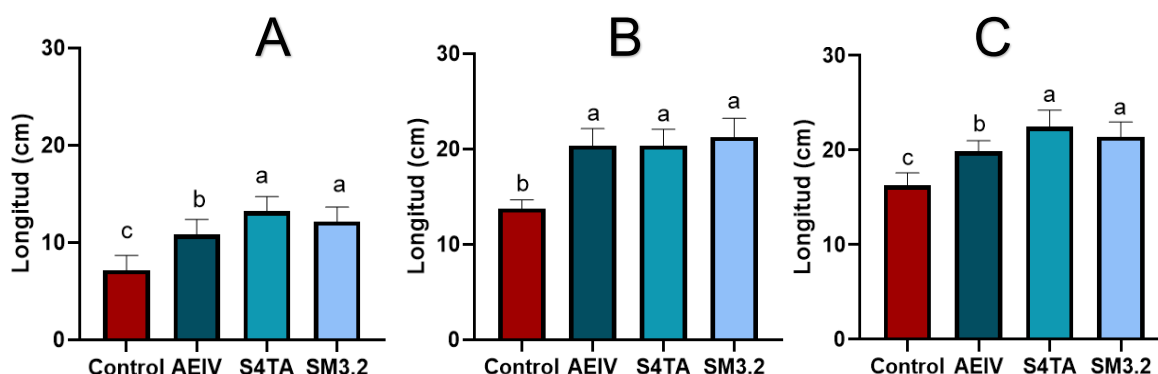


Fig. 21 Longitud de las plántulas germinadas en el tratamiento control, se midieron a: (A) 7 días del lavado de semillas (B) 10 días del lavado de semillas y (C) 14 días del lavado de semillas. Se analizaron 4 grupos, grupo sin inoculación: Control, la cepa *A. vinelandii* AEIV: AEIV, *A. vinelandii* S4TA: S4TA y la cepa *A. chroococcum* SM3.2: SM3.2. La n de cada tratamiento fue de 40 semillas. $p < 0.0001$.

En la condición deficiente de hierro, las bacterias se crecieron en medio de cultivo con deficiencia de hierro ($4 \mu\text{M}$ de Fe_2SO_4), y se utilizaron para inocular las semillas; a los 7 días posterior al inicio de la germinación se evaluó la longitud de las plántulas, se registró que la longitud de las plántulas inoculadas con las tres cepas bacterianas fue similar entre los tres tratamientos y superior con respecto a las plántulas control con diferencia estadísticamente significativa. A los 10 días, la longitud mayor la presentaron las plántulas inoculadas con el aislado *A. vinelandii* S4TA (23.3 cm), con diferencia estadística con respecto a las plántulas tratadas con *A. vinelandii* AEIV y *A. chroococcum* SM3.2, las longitudes menores las registraron las plántulas control (sin inocular). A los 14 días, las plántulas tratadas con *A. vinelandii* S4TA registraron el promedio mayor de longitud: 29.13 cm, con diferencia estadística respecto a las plántulas inoculadas con *A. chroococcum* SM3.2 y *A. vinelandii* AEIV y las plántulas sin inocular presentaron la menor longitud.

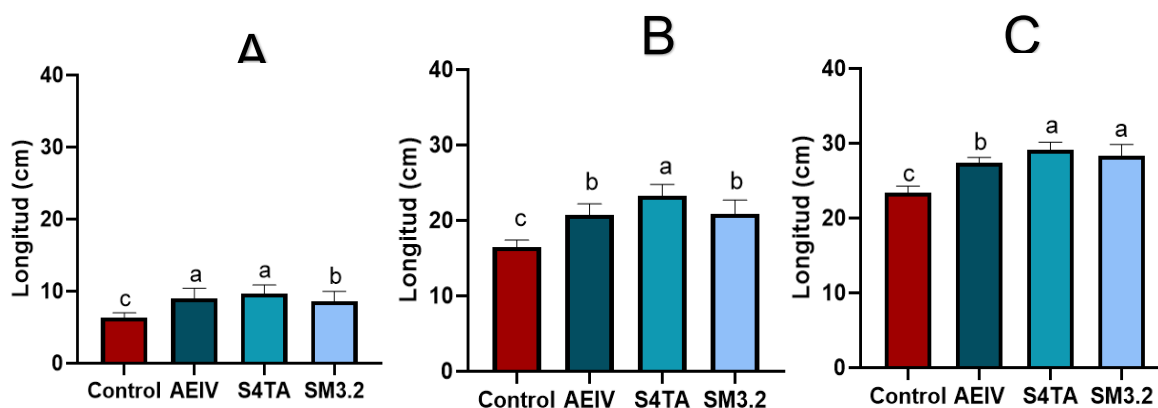


Fig. 22 Longitud de plántulas germinadas en medio deficiente de hierro, se analizaron 4 grupos, grupo sin inoculación: Control, la cepa *A. vinelandii* AEIV: AEIV, *A. vinelandii* S4TA: S4TA y la cepa *A. chroococcum* SM3.2: SM3.2, se midieron a: (A) 7 días (B) 10 días y (C) 14 días posteriores al inicio de la germinación. La n de cada tratamiento fue de 40 semillas. $p < 0.0001$.

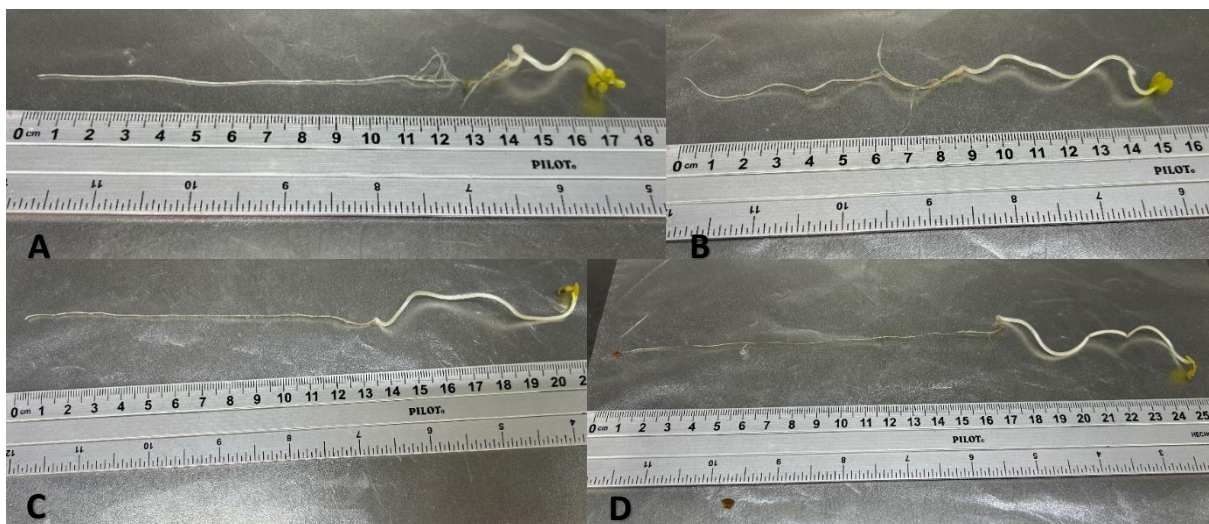


Fig.23 Comparación del crecimiento en las plántulas del tratamiento de deficiencia a los 14 días después del inicio de germinación. (A) Plántula del grupo sin inocular (Control), (B) Plántula del grupo *A. vinelandii* AEIV (AEIV), (C) Plántula del grupo *A. vinelandii* S4TA (S4TA), (D) Plántula del grupo *A. crococcum* SM3.2 (SM3.2). La n de cada tratamiento fue de 40 semillas.

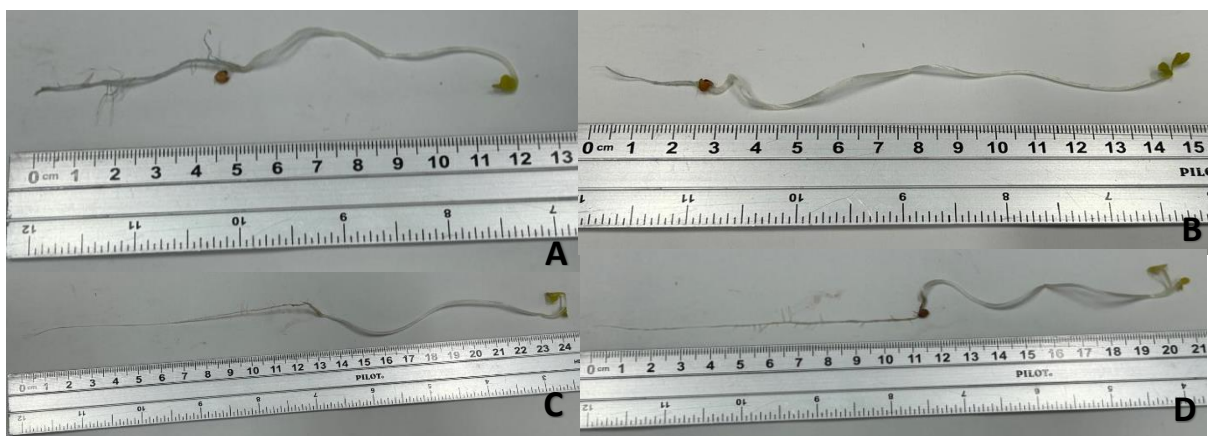


Fig.24 Comparación del crecimiento en las plántulas del tratamiento control (bacterias crecidas con 18uM de hierro) a los 14 días después del inicio de germinación. (A) Plántula del grupo sin inocular (Control), (B) Plántula del grupo *A. vinelandii* AEIV (AEIV), (C) Plántula del grupo *A. vinelandii* S4TA (S4TA), (D) Plántula del grupo *A. crococcum* SM3.2 (SM3.2). La n de cada tratamiento fue de 40 semillas.

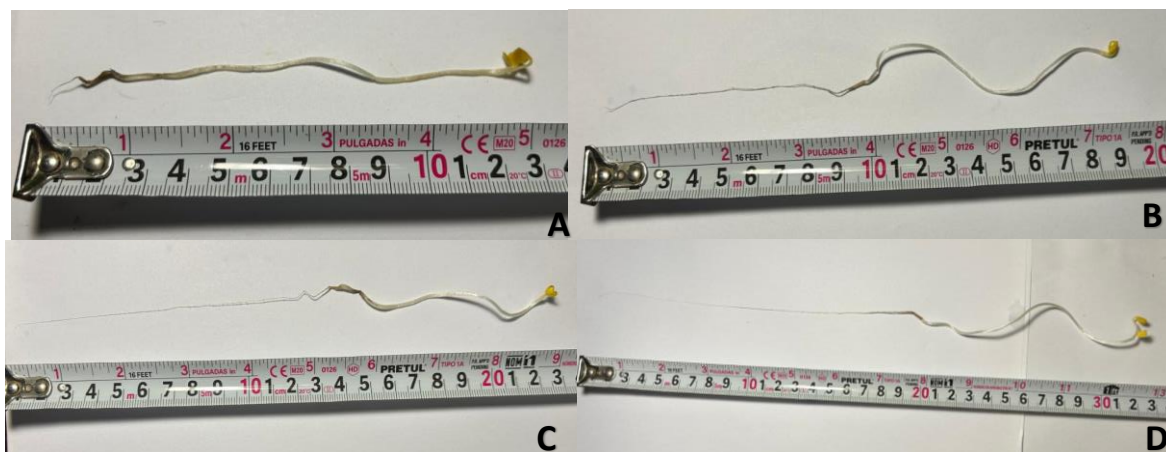


Fig.25 Comparación del crecimiento en las plántulas del tratamiento de deficiencia a los 14 días después del inicio de germinación. (A) Plántula del grupo sin inocular (Control), (B) Plántula del grupo *A. vinelandii* AEIV (AEIV), (C) Plántula del grupo *A. vinelandii* S4TA (S4TA), (D) Plántula del grupo *A. croococcum* SM3.2 (SM3.2). La n de cada tratamiento fue de 40 semillas.

Cualificación de alquilresorcinoles

Por otro lado, para la determinación cualitativa de ARs se ajustó la misma cantidad de proteína en las tres cepas, permitió visualizar que el aislado *A. vinelandii* S4Ta presenta la mayor síntesis de ARs seguida de la cepa *A. vinelandii* AEIV, mientras que el aislado *A. vinelandii* SM3.2 presentó la menor producción de este metabolito (Fig.26).

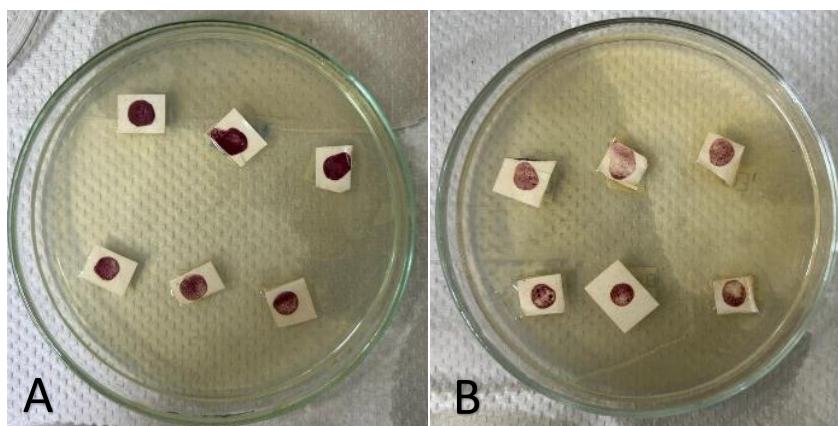


Fig. 26 Placas de medio Burk-n-Butanol, el experimento se realizó con tres repeticiones con la inoculación de la cepa por triplicado. Este resultado es el promedio de tres experimentos independientes. (A) corresponde al aislado *A. vinelandii* S4TA. (B) corresponde a la cepa *A. vinelandii* AEIV.

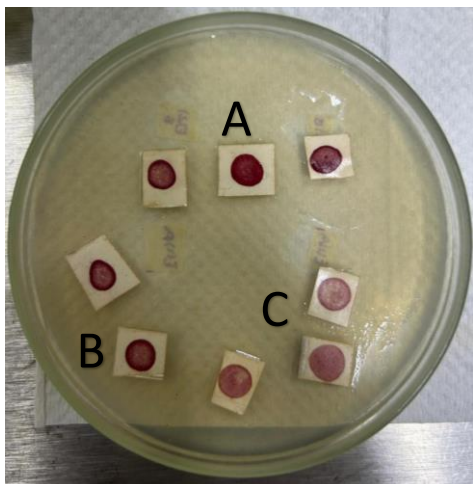


Fig.27 Placas de medio Burk-n-Butanol, el experimento se realizó con la inoculación de la cepa por triplicado. Este resultado es el promedio de tres experimentos independientes. (A) Quistes de la cepa *A. vinelandii* AEIV. (B) Quistes del aislado *A. vinelandii* S4TA. (C) Quistes del aislado *A. chroococcum* SM3.2.

Cuantificación de alquilresorcinoles

En la determinación cuantitativa de los alquilresorcinoles, se encontró que la cepa *A. vinelandii* S4TA registro un valor de 9.51 μg alquilresorcinoles/mg proteína, siendo la mayor producción de ARs y con diferencia estadísticamente significativa en comparación con las cepas bacterianas restantes, *A. vinelandii* AEIV y *A. chroococcum* SM3.2, estas dos cepas no presentaron diferencia estadísticamente significativa entre sí.

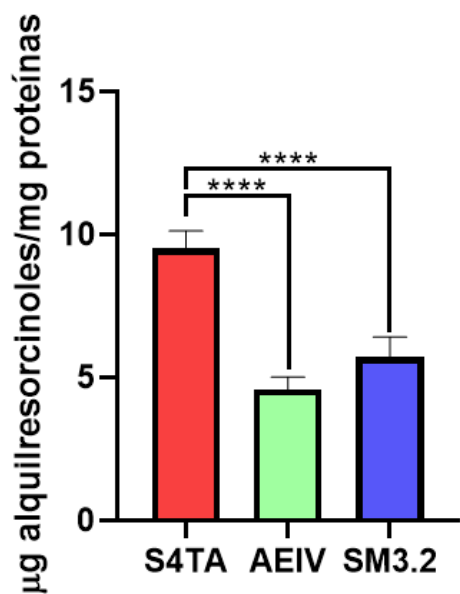


Fig. 28 Cuantificación de alquilresorcinolos a los 5 días de cultivo de las cepas *A. vinelandii* AEIV: AEIV, *A. vinelandii* S4TA: S4TA y *A. chroococcum* SM3.2: SM3.2, en medio de cultivo Burk-n-butanol. $p < 0.0001$.

DISCUSIÓN

En este trabajo se caracterizaron bioquímicamente tres cepas del género *Azotobacter* y se determinó su capacidad para producir metabolitos secundarios: sideróforos y alquilresorcinolos, los primeros se han documentado como un mecanismo de promoción del crecimiento vegetal, observado en la elongación y desarrollo de las plántulas de la plántula de rábano.

Para esta investigación se trabajó con tres condiciones de crecimiento bacteriano para determinar la producción de sideróforos de las tres cepas estudiadas, se exploró el medio de cultivo BS o condición control, que presenta una cantidad de hierro ($18 \mu\text{M Fe}_2\text{SO}_4$) adecuada para el crecimiento óptimo de las bacterias, un tratamiento con deficiencia de hierro ($4 \mu\text{M Fe}_2\text{SO}_4$) y un tratamiento con ausencia de hierro.

En este trabajo se reportó que las cepas *A. vinelandii* S4TA, *A. vinelandii* AEIV y *A. chroococcum* SM3.2 produjeron de forma simultánea azotobactina y catecoles (dos tipos de sideróforos) en las tres condiciones de crecimiento, este resultado es similar al estudio donde caracterizaron el metaboloma de los sideróforos, este hallazgo permite entender la fuerte interacción microbiana con el hierro y otros metales en el ambiente, como el hallazgo significativo realizado por Baars (2016), donde encontraron que *A. vinelandii* produce vibrioferrina que es un tipo de sideróforos que se asocia a bacterias marinas, confirmando que *A. vinelandii* produce gran variedad de sideróforos, incluyendo las azotobactinas (tipo pioverdina) y catecoles como protoquelina, aminoquelina y azotoquelina.

En la condición de control (concentración de hierro óptimo) se registró una producción mínima de catecoles y azotobactina, que es superada por las condiciones de deficiencia y ausencia de hierro. En este estudio se encontró que las tres cepas producen la mayor cantidad de azotobactina en la condición de crecimiento con ausencia de hierro, como lo reportado por Page y Tigerstrom (1988) donde se menciona que la producción de estos sideróforos se ve estimulada en condiciones limitantes de hierro, la azotobactina es sintetizada en presencia del

3 μM de hierro, mientras que la síntesis de catecoles ocurre en presencia de 10 μM ; de forma similar, se observó en las cepas de este estudio que la producción de catecoles es mayor en la condición de crecimiento en deficiencia de hierro.

Se encontró, que las bacterias *A. vinelandii* S4TA y *A. chroococcum* SM3.2 producen azotobactina en deficiencia de hierro, que representa la mitad de la cantidad de azotobactina en comparación con la cantidad sintetizada en ausencia de hierro. Además, se registró que hay una producción mínima de azotobactina en condiciones normales de hierro. Es importante destacar que la producción de azotobactina evaluada a las 96 horas (en la condición de ausencia de hierro) superó en cantidad a la producción registrada a las 48 horas. También, se observó que la producción del azotobactina en las condiciones control y deficiencia de hierro, se mantiene la cantidad del sideróforo constante a las 48 horas y en las 96 horas de cultivo en cada condición.

Para el caso de la producción de los catecoles en las cepas *A. vinelandii* AEIV y el aislado *A. vinelandii* S4TA, los datos obtenidos en este estudio a las 48 horas de cultivo sugieren que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre la producción de catecoles en ausencia de hierro y en deficiencia de hierro, a excepción de la cepa *A. chroococcum* SM3.2 que presenta mayor producción de catecoles en la condición de crecimiento ausencia de hierro en comparación con la condición de deficiencia.

Mientras que en la condición control, la producción del sideróforo es mínima en comparación a las dos condiciones de cultivo restantes sin importar el tiempo de cultivo. La mayor producción de catecoles en las tres cepas se registró a las 48 horas cultivo y se observó una disminución del sideróforo a las 96 horas, particularmente en la condición de ausencia de hierro se observó un desplome de la cantidad de catecoles.

Para el caso de las cepas *A. vinelandii* AEIV y *A. vinelandii* S4TA se sugiere que la concentración de hierro no representa una condición determinante para la expresión de los genes que codifican catecoles, como lo reportado por Tindale (2000), que propuso que la síntesis de catecoles en *A. vinelandii* ocurre bajo condiciones de regulación dual, lo que lleva a pensar que la síntesis de estos sideróforos es

regulada por otros factores en los que no se ve involucrado el homólogo de la proteína Fur (represor de captación férrica). La expresión del gen *csbC* involucrado en la síntesis, es reprimido por el homólogo de la proteína Fur y al mismo tiempo activado por el estrés oxidativo por acción de la proteína similar SoxS, esta doble regulación podría explicar por qué la producción de catecoles continua incluso en concentraciones de hierro donde otros sideróforos se reprimen, brindando a su vez protección a las células contra daño oxidativo cuando el hierro es limitado.

Ahora bien, existe una clara diferencia entre la producción de los dos sideróforos a las 96 horas, los catecoles se producen en mayor cantidad, aproximadamente el doble, con respecto a la azotobactina, en condiciones de deficiencia de hierro.

A las 96 horas de cultivo, la producción de azotobactina en ausencia de hierro es mayor que la producción de catecoles, este resultado es sustentado por lo reportado por Basulto (2020), que estudió cepas mutantes de *A. vinelandii* AEIV(JGDEE*pvdS*), cepas modificadas que no produjeron alginato, la cepa control no presentó producción de azotobactina debido a que se trata de una cepa mutante no productora de este sideróforo, donde se observó una síntesis diferencial entre catecoles y azotobactina, con una producción compensatoria, donde la mutante *gacA* mostró una producción mínima de azotobactinas y un aumento considerable en la producción de catecoles de casi ocho veces más.

En trabajos de Yoneyama 2011, confirman que en *Azotobacter vinelandii* ocurre una síntesis diferencial entre catecoles y azotobactinas, donde la producción del sideróforo se vería afectada por la limitación del hierro, donde la ausencia del hierro enriquece la síntesis de azotobactina.

Es importante destacar, que los sideróforos se caracterizan por la adquisición de hierro y también actúan como metaloforos que facilitan la captación de cofactores de la nitrogenasa (molibdeno y vanadio), a su vez secuestran metales tóxicos como tungsteno y zinc. El mismo Baars (2016) propone el mecanismo “brigada de cubo” donde la unión de hierro es mediada por la vibrioferrina en el medio y es intercambiado por la azotoquelina que entrega el hierro a la célula, ocurre una producción sinérgica mediada por un sideróforo hidrofílico (vibrioferrina) y un sideróforo hidrofóbico (azotoquelina), esta estrategia sugiere una contribución a la

promoción del crecimiento vegetal, que resalta el potencial biotecnológico de los sideróforos de *A. vinelandii*.

Con respecto a la germinación de las semillas de rábano, se encontró que las semillas que fueron inoculadas con cepas en condición de crecimiento de deficiencia de hierro presentaron un mayor porcentaje de germinación, seguido por aquellas semillas inoculadas con cepas cultivadas en condiciones óptimas de hierro (condición control), mientras que las semillas que fueron inoculadas con cepas en condición de ausencia presentaron un porcentaje muy bajo de germinación, lo que concuerda con la producción diferencial de sideróforos encontrados en estas condiciones, una mayor producción de catecoles (azotoquelina) en la condición de deficiencia respecto a la condición de ausencia de hierro. Es posible que la movilización del hierro por parte de los sideróforos les proporcione una disponibilidad adecuada de hierro a las semillas, que es esencial para procesos enzimáticos y metabólicos en las etapas de germinación y desarrollo de la plántula. Además, es bien conocido el rol de *A. vinelandii*, como productor de fitohormonas, como el ácido indol acético, giberelinas y citoquininas, hormonas exógenas que estimulan la elongación y división celular, acciones que impactan en el desarrollo radicular y crecimiento de la plántula emergente (Aasfar *et al.*, 2021).

Se observó un incremento en la germinación de las semillas cuando son inoculadas con la cepa *A. vinelandii* S4TA, seguido de la cepa *A. vinelandii* AEIV y en menor medida la cepa *A. chroococcum* SM3.2, dichas cepas crecidas en condiciones de deficiencia de hierro, los datos de este estudio concuerdan con lo reportado por Sumbul y colaboradores en 2020, reportaron que la co-inoculación de *Azotobacter* con *Azospirillum* mejoró significativamente el porcentaje de germinación en *Dodonea viscosa* bajo estrés salino. Diversos estudios reportaron las respuestas de las semillas al ser inoculadas con *Azotobacter* sp, desde el aumento en las tasas de germinación, desarrollo de raíces, número y área de hojas, así como la mejora en la absorción de nutrientes (Wani *et al.*, 2016).

Este estudio permitió explorar el efecto de la inoculación bacteriana en el desarrollo de las plántulas de rábano, se observó el incremento en la longitud de las plántulas de rábano cuando son monoinoculadas con las cepas de *A. chroococcum* SM3.2,

así como las cepas de *A. vinelandii* AEIV y *A. vinelandii* S4TA, estos resultados concuerdan con los reportados por Zayadan (2014), donde observaron que la inoculación con el consorcio entre *Azotobacter* sp y la microalga *Chl. vulgaris*, presentaron una mayor tasa de germinación del arroz y un aumento en la longitud de los brotes en comparación al control, sugiriendo que la mejora se debe al aumento en la actividad de fijación de nitrógeno, se postula que la fijación de nitrógeno por parte de *A. vinelandii* proporciona una fuente directa de nitrógeno asimilable para las semillas y plántulas, que optimiza el crecimiento celular; de forma similar, la producción de la fitohormona ácido indol acético promueve la elongación de la plántula y el desarrollo de raíces como se observó en este proyecto. La estimulación del desarrollo de la plántula posterior a la germinación concuerda con lo observado en este trabajo, las plántulas que fueron inoculadas con las cepas de *Azotobacter* sp presentaron un desarrollo más pronunciado en comparación con las plántulas del tratamiento control, dicho desarrollo radica en una longitud mayor tanto de la raíz como del desarrollo prominente de los cotiledones.

Para los resultados de la determinación cualitativa de alquilresorcinoles, se documentaron fotos en donde se observa que el aislado *A. vinelandii* S4TA presentan una coloración con mayor intensidad con respecto a las células de las cepas *A. vinelandii* AEIV y *A. chroococcum* SM3.2, en trabajos como Segura 2009, igualmente se tiñeron quistes crecidos en dos medios, colonias crecidas en medio con butanol y colonias crecidas en medio BS y se observó que la coloración rojiza se distribuyó por la parte más externa (exina) de la membrana celular, como ocurrió en este estudio. Los resultados de la determinación cuantitativa de alquilresorcinoles, el aislado *A. vinelandii* S4TA presenta la mayor producción (9.51 µg alquilresorcinoles/mg proteína) con diferencia estadísticamente significativa con respecto a las cepas *A. vinelandii* AEIV y *A. chroococcum* SM3.2. Los resultados en ambas determinaciones de alquilresorcinoles, tanto cualitativa y cuantitativa, concuerdan entre sí, puesto que la coloración intensa de la cepa *A. vinelandii* S4TA confirma la producción mayor del metabolito en comparación a las cepas restantes.

CONCLUSIÓN

Los aislados *A. chroococcum* SM3.2 y *A. vinelandii* S4TA producen catecoles y azotobactina de forma similar a la producción de la cepa *A. vinelandii* AEIV, en condiciones de crecimiento con niveles óptimos de hierro, en deficiencia y ausencia de hierro. De forma similar las tres cepas producen alquilresorcinolos, siendo la mayor productora el aislado *A. vinelandii* S4TA.

La inoculación de las semillas con cepas *Azotobacter* sp. crecidas en deficiencia de hierro, promueven la germinación y el crecimiento superior de las plántulas.

PERSPECTIVAS

Se plantean como las perspectivas de este estudio:

1. Evaluación de la promoción de crecimiento de las plantas del rábano cuando es mono inoculado con las cepas *A. vinelandii* AEIV, *A. vinelandii* S4TA y *A. chroococcum* SM3.2; así como todas las combinaciones de co-inoculaciones con estas cepas, cuando las bacterias son crecidas en condición de producción de sideróforos.
2. Evaluación del potencial de los sideróforos producidos por estas cepas de *Azotobacter* spp. como agentes de biorremediación para disminuir la contracción de metales pesados.

BIBLIOGRAFIA

1. Aasfar A, Bargaz A, Yaakoubi K, Hilali A, Bennis I, Zeroual Y. & Meftah I. (2021). Nitrogen Fixing *Azotobacter* Species as Potential Soil Biological Enhancers for Crop Nutrition and Yield Stability. *Front. Microbiol.* 12:628379. doi: 10.3389/fmicb.2021.628379
2. Aguilar Bello, M. (2023) Características Bioquímicas tipo PGPR de los aislados de *Azotobacter* spp. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
3. Ahmed E. & Holmström S. (2014) Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial Biotechnology*, 7, 196-208.
4. Baars O, Zhang X, Morel F.M.M & Seyedsayamdost M.R. (2016). The siderophore metabolome of *Azotobacter vinelandii*. *Appl Environ Microbiol*, 82:27–39.

5. Balado M. (2009). Caracterización de un nuevo sistema de asimilación de hierro mediante sideróforos en *Vibrio anguillarum*. [Tesis doctoral, Universidad de Santiago de Compostela] <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=107605>
6. Barney B. M. (2024). *Azotobacter vinelandii*. *Trends in Microbiology*, 32, 1034–1035. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2024.07.006>
7. Barney B.M, Eberhart L.J, Ohlert J.M, Knutson C.M. & Plunkett M.H. (2015). Gene Deletions Resulting in Increased Nitrogen Release by *Azotobacter vinelandii*: Application of a Novel Nitrogen Biosensor. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 4316–4328.
8. Basulto Almeida, M. (2020). Estudio de la regulación ejercida por GacA y RsmA en la síntesis de sideróforos en *Azotobacter vinelandii*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla <https://hdl.handle.net/20.500.12371/9788>
9. Bitkov V, Nenashev V, Pridachina N & Batrakov S. (1992). Membrane-structuring properties of bacterial long-chain alkylresorcinols. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1108, 224-232.
10. Carroll C.S & Moore M.M. (2018) Ironing out siderophore biosynthesis: a review of non-ribosomal peptide synthetase (NRPS)-independent siderophore synthetases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 53:356 381. <https://doi.org/10.1080/10409238.2018.1504092>
11. Cocotl M, Sampieri A, Moreno, S., Núñez, C., Castañeda, M., Segura, D., & Espín, G. (2011). Roles of RpoS and PsrA in cyst formation and alkylresorcinol synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology*, 157(6), 1685-1693.
12. Čolo, J., Hajnal, T., Đuric, S., Stamenov, D. & Hamidovic, S. (2014). Plant Growth Promotion Rhizobacteria in Onion Production. *Polish Journal of Microbiology*, 63, 83-88.
13. Cornish, A. & Page, W. (1998). The catecholate siderophores of *Azotobacter vinelandii*: their affinity for iron and role in oxygen stress management. *Microbiology*, 144, 1747-1754.

14. Crowley D.E. (2006) Microbial siderophores in the plant rhizosphere. In: Barton L.L, Abadía J. (eds) Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms. *Springer, Dordrecht, The Netherlands*, pp 169–198
15. Cuesta, A., Monsalve, J., Mesa, M., Zapata, A., Trujillo, M. (2005). Estrategias de cultivo en la producción de alginatos por *Azotobacter vinelandii*.
16. Espín, G. (2014). *Biología de Azotobacter vinelandii*. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
17. Fan D, Fang Q (2021) Siderophores for medical applications: imaging, sensors, and therapeutics. *Int J Pharm* 597:120306. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120306>.
18. Ferreira, C., Vilas, Á., Sousa, C., Soares, H., Soares, E. (2019) Comparison of five bacterial strains producing siderophores with ability to chelate iron under alkaline conditions. *AMB Express*, 9:78.
19. 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*, 103, 6356-6361.
20. García González, D. (2019). Aislamiento y caracterización de cepas de *Azotobacter* spp. y el efecto de la sobreexpresión de los sRNA: RsmZ1 y RsmZ6 sobre la producción de alginato. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla <https://hdl.handle.net/20.500.12371/4820>
21. Ghosh S.K, Bera T, Chakrabarty A.M. (2020). Microbial siderophore – a boon to agricultural sciences. *Biol Control* 144:104214. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104214>.
22. Halbleib, C. & Ludden, P. (2000) Regulation of Biological Nitrogen Fixation. *J Nutr.* 130, 1081-1084. doi: 10.1093/jn/130.5.1081.
23. Hamilton, T., Ludwig, M., Dixon, R., Boyd, E., Dos Santos, P., Setubal, J., Bryant, D., Dean, D. & Peters, J. (2011) Transcriptional Profiling of Nitrogen Fixation in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 193, 4477-4486. doi:10.1128/JB.05099-11

24. Hernández, A., Moreno, S., Castellanos, M., Castañeda, M., Núñez, C., Muriel, L. F. (2012). RsmA post transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology*, 158, 1953–1963.
25. Jayashree, S. (2022). *Evaluation of Azotobacter vinelandii growth in Continuous Culture* (Doctoral dissertation, RMIT University).
26. Kasheii, B., Pezhman M., Abdolmajid M. (2021). Siderophores: Importance in bacterial pathogenesis and applications in medicine and industry. *Microbiological Research*, 250, 126790, ISSN 0944-5013.
27. Khan, A., Singh, P. & Srivastava, A. (2018). Synthesis, nature and utility of universal iron chelator – Siderophore: A review. *Microbiological Research*, 212-213, 103-111. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2017.10.012>
28. Kramer J, Oezkaya O, Kuemmerli R (2020) Bacterial siderophores in community and host interactions. *Nat Rev Microbiol* 18:152 163. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0284-4>
29. López, L., García, L., Cruz, E., Dominguez, P., López, A., Fuentes, L., Nuñez, C., & Castañeda, M. (2018). Transcriptional Study of the RsmZ-sRNAs and Their Relationship to the Biosynthesis of Alginate and Alkylresorcinols in *Azotobacter vinelandii*. *Molecular Biotechnology*, 60(9), 670-680.
30. López, L., Mena, G., Terán, J., Fuentes, L., Nuñez, C., & Castañeda, M. (2019). Study of the sRNA RsmY involved in the genetic regulation of the synthesis of alginate and alkyl resorcinols in *Azotobacter vinelandii*. *Archives of Microbiology*, 201 (10), 1335-1345.
31. Lozano J.M, Valverde S, Montoya M, Martín M, Rivilla R, Lucena J.J, López S. (2023). Evaluation of Siderophores Generated by *Pseudomonas* Bacteria and Their Possible Application as Fe Biofertilizers. *Plants*, 12, 4054. <https://doi.org/10.3390/plants12234054>
32. Luis A, Domingues F & Duarte A. P. (2016). Biological properties of plant-derived alkylresorcinols. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 16, 851–854.
33. Martins, J., Martin, C., Hernandez, L., Barros, M., Monteiro, H. & Lucena, J. (2018). Azotochelin and N-dihydroxy-N,N'-diisopropylhexanediamide as Fe

- sources to cucumber plants in hydroponic cultures. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 30, 65-76.
34. Muñoz, J., Capilla, M., Gordillo, X. & Muñoz, J. (2024). El impacto del uso inadecuado de agroquímicos y riego intensivo en la degradación del suelo: del cultivo al yermo. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. <http://doi.org/10.5281/zenodo.12510276>
 35. Nadal-Jimenez, Koch G, Reis C, Muntendam R, Raj H, Jeronimus-Stratingh C, Cool RH, Quax WJ. (2014). PvdP Is a Tyrosinase That Drives Maturation of the Pyoverdine Chromophore in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 196: <https://doi.org/10.1128/jb.01376-13>
 36. Nagoba, B. & Vedpathak, D. (2011). Medical Applications of Siderophores. *European Journal of General Medicine*, 8, 229-235.
 37. Noar, J. & Bruno, J. (2018). *Azotobacter vinelandii*: the source of 100 years of discoveries and many more to come. *Microbiology*, 164, 421-436. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000643>
 38. Page, W., & Von Tigerstrom, M. (1978). Induction of transformation competence in *Azotobacter vinelandii* iron-limited cultures. *Canadian Journal of Microbiology*, 24(12), 1590–1594.
 39. Page, W., Collinson, S., Demange, P., Dell, A. & Abdallah, M. (1991) *Azotobacter vinelandii* strains of disparate origin produce azotobactin siderophores with identical structures. *Biology of Metals*, 4, 217-222.
 40. Page, W., Kwon, E., Cornish, A. & Tindale, A. (2003). The *csbX* gene of *Azotobacter vinelandii* encodes an MFS efflux pump required for catecholate siderophore export. *FEMS Microbiology Letters*, 228, 211-216.
 41. Patten, C. L., & Glick, B. R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3795–3801.
 42. Pérez, S., Cabirol, N., George, R., Zamudio, L., Fernández, F. (2007). O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of Microbiological Methods*. 70, 127-131.

43. Plunkett, M. H., Knutson, C. M., & Barney, B. M. (2020). Key factors affecting ammonium production by an *Azotobacter vinelandii* strain deregulated for biological nitrogen fixation. *Microbial Cell Factories*, 19(107).
44. Raza, W., Hongsheng, W., & Qirong, S. (2010). Response of *Paenibacillus polymyxa* to Iron: Alternations in Cellular Chemical Composition and the Production of Fusaricidin Type Antimicrobial Compounds. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53 (5), 1145-1154.
45. Rejman, J., & Kozubek, A. (2004). The Effect of Alkylresorcinol on Lipid Metabolism in *Azotobacter chroococcum*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 59(5-6), 393-398.
46. Romero Y, Guzmán J, Moreno S, Cocotl Yañez M, Vences-Guzmán MÁ, Castañeda M, Espín, G & Segura, D. (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,. doi:10.1371/journal.pone.0153266
47. Romero, A. M., Martínez-Pastor, M. T., & Puig, S. (2021). Iron in Translation: From the Beginning to the End. *Microorganisms*, 9(5), 1058. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051058>.
48. Rosa, E., Echavarri, C., Armas, A., Escudero, V., Poza, C., Rubio, L., González, M. (2023) Iron Homeostasis in *Azotobacter vinelandii*. *Biology*, 12, 1423.
49. Rosales, A., Reyes, J., Minto, E., Meneses, A., Mondragón, C., López, L. & Castañeda, M. (2024). A Homology of the Histidine Kinase RetS Controls the Synthesis of Alginates, PHB, Alkylresorcinols, and Motility in *Azotobacter vinelandii*. *Current Microbiology*, 81, 311. <https://doi.org/10.1007/s00284-024-03835-1>
50. Rosazza, J., Kelleher, W., & Schwarting, A. (1967). Production of Lysergic Acid Derivates in Submerged Culture IV. Inorganic Nutrition Studies with *Claviceps paspali*. *Applied Microbiology*, 15(6), 1270-1283.

51. Schalk, I. & Guillon, L. (2013). Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for metal homeostasis. *Environmental Microbiology*, 15, 1661-1673. doi:10.1111/1462-2920.12013
52. 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 Dessication Resistance. *Journal of Bacteriology*, 191, 9, pp. 3142-3148.
53. 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, 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.
54. Smercina, D., Evans, S., Friesen, M. & Tiemann, L. (2019). To fix or not to fix: controls on free-living nitrogen fixation in the rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* 85:e02546-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.02546-18>.
55. Soares, E. (2022) Perspectives on the biotechnological production of bacterial siderophores and their use. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106, 3985-4004. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11995-y>
56. Sumbul, A., Ali, R., Rizvi, R. & Mahmood, I. (2020). *Azotobacter*: A potential bio-fertilizer for soil and plant health management. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27, 3634-3640. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.08.004>
57. Sun, Y., Wu, J., Shang, X. (2022). Screening of Siderophore-Producing Bacteria and Their Effects on Promoting the Growth of Plants. *Curr Microbiol* 79, 150.
58. Targońska, M., Kwiatek, M., Groszyk, J., Walczewski, J., Kowalczyk, M., Pawelec, S., Boczkowska, M. & Rucińska, A. (2023). Characteristic of the gene candidate SecARS encoding alkylresorcinol synthase in *Secale*. *Molecular Biology Reports*, 50, 8373-8383. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08684-y>

59. Timofeeva, A., Galyamova, M. & Sedykh, S. (2022). Bacterial Siderophores: Classification, Biosynthesis, Perspectives of Use in Agriculture. *Plants*, 11, 3065. <https://doi.org/10.3390/plants1122306>
60. Tindale, A., Mehrotra, M., Ottem, D. & Page, W. (2000). Dual regulation of catecholate siderophore biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* by iron and oxidative stress. *Microbiology*, 146, 1617-1626.
61. Trejo, A., Moreno, S., & Cocotl, M. & Espín, G. (2017). GacA regulates the PTSNtr-dependent control of cyst formation in *Azotobacter vinelandii*. *FEMS Microbiology Letters*, 364(2), 278.
62. Valenzuela, D., Henríquez, C., Donoso, R., Lavín, P., Ringel, M., Brüser, T. Campos, J. (2021). An unusual overrepresentation of genetic factors related to iron homeostasis in the genome of the fluorescent *Pseudomonas* sp. ABC1. *Microbial Biotechnology*, 14, 1060-1072.
63. Visca, P., Imperi, F. & Lamont, I. (2006) Pyoverdine siderophores: from biogénesis to biosignificance. *TRENDS in Microbiology*, 15, 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.11.004>
64. Wani, S., Chand, S., Wani, M., Ramzan, M. & Hakeem, K. (2016). *Azotobacter chroococcum* – A potential Biofertilizer in Agriculture: An Overview. *Soil Science: Agricultural and Environmental Perspectives*. DOI 10.1007/978-3-319-34451-5_15
65. Wichard, T., Bellenger, J., Morel, F. & Kraepiel, A. (2009) Role of the Siderophore Azotobactin in the Bacterial Acquisition of Nitrogenase Metal Cofactors. *Environmental Science & Technology*, 43, 7218-7224.
66. Yoneyama, F., Yamamoto, M., Hashimoto, W., & Murata, K. (2011). *Azotobacter vinelandii* gene clusters for two types of peptidic and catechol siderophores produced in response to molybdenum. *Journal of Applied Microbiology*, 111, 932–938. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05109.x>
67. Zabolotneva, A., Shatova, O., Sadova, A., Shestopalov, A., & Roumiantsev, S. (2022). An Overview of Alkylresorcinols Biological Properties and Effects. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2022.

68. Zarzycki, M., Kwiatek, M. T., Kwiatek, M., Gorczyca, J., Wójtowicz, J., Mikolajczyk, K., Popielnicka, A., & Ryba, A. (2023). Cloning and characterization of the alkylresorcinols synthase (ScARS) gene in *Secale cereale*. *Molecular Biology Reports*, 50(10), 8373-8383.
69. Zayadan, B., Matorin, D., Baimakhanova, G., Bolathan, K., Oraz, G. & Sadanov, A. (2014). Promising Microbial Consortia for Producing Biofertilizers for Rice Fields. *Microbiology*, 83, 391-397