

# Indice



1. Resumen . . . . .	1
2. Introducción . . . . .	3
2.1. Fijación biológica de nitrógeno . . . . .	3
2.2. Una nueva bacteria fijadora de nitrógeno: <i>Acetobacter diazotrophicus</i> . . . . .	5
2.3. El género <i>Acetobacter</i> . . . . .	7
2.4. Ecología de <i>A. diazotrophicus</i> . . . . .	8
2.5. Fisiología de <i>A. diazotrophicus</i> . . . . .	10
2.6. Métodos de identificación y caracterización de cepas . . . . .	13
2.7. Metabolismo de carbohidratos en bacterias . . . . .	14
2.7.1. Vías de catabolismo de glucosa . . . . .	15
2.7.2. Oxidación directa de glucosa . . . . .	19
2.7.3. Ciclo de Krebs . . . . .	22
2.7.4. Cadena de transporte de electrones . . . . .	24
2.8. Vías de asimilación de amonio . . . . .	25
2.9. Transporte de sustratos . . . . .	27
2.10. Interacción del oxígeno con la nitrogenasa . . . . .	28
2.11. Osmotolerancia . . . . .	30
2.12. Objetivos . . . . .	31
3. Material y Métodos . . . . .	34
3.1. Cepas . . . . .	34
3.2. Medios de cultivo . . . . .	34

3.2.1.	Medios de cultivo utilizados . . . . .	34
3.2.2.	Crecimiento de <i>A. diazotrophicus</i> en otros medios de cultivo . . . . .	35
3.3.	Cultivo de las bacterias en medio líquido . . . . .	38
3.4.	Perfiles de proteínas totales de <i>A. diazotrophicus</i> . . . . .	38
3.4.1.	Preparación de las muestras de proteínas totales . . . . .	38
3.4.2.	Preparación de los geles de poliacrilamida . . . . .	39
3.5.	Resistencia a antibióticos de <i>A. diazotrophicus</i> , <i>Herbaspirillum seropedicae</i> y <i>Pseudomonas rubrisuabalciana</i> . . . . .	42
3.6.	Crecimiento de <i>A. diazotrophicus</i> y <i>H. seropedicae</i> en diferentes fuentes carbonadas . . . . .	42
3.7.	Curvas de crecimiento de <i>A. diazotrophicus</i> . . . . .	43
3.8.	Preparación de extractos bacterianos de <i>A. diazotrophicus</i> . . . . .	43
3.9.	Determinaciones de actividad enzimática . . . . .	45
3.9.1.	Condiciones generales de los ensayos . . . . .	45
3.9.2.	Preparación de sustratos para ensayos enzimáticos . . . . .	46
3.9.3.	Ensayos enzimáticos . . . . .	46
3.9.3.1.	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa . . . . .	46
3.9.3.2.	6-Fosfogluconato deshidrogenasa . . . . .	47
3.9.3.3.	Transcetolasa . . . . .	47
3.9.3.4.	Aldolasa . . . . .	48
3.9.3.5.	6-Fosfofructoquinasa . . . . .	48
3.9.3.6.	1-Fosfofructoquinasa . . . . .	49
3.9.3.7.	6-Fosfogluconato deshidratasa y 2-ceto-3-deoxifosfogluconato (KDPG) aldolasa . . . . .	49
3.9.3.8.	Manitol deshidrogenasa . . . . .	50
3.9.3.9.	Manitol-1-fosfato deshidrogenasa . . . . .	50



3.9.3.10. Glucoosa deshidrogenasa . . . . .	51
3.9.3.11. Glucosa deshidrogenasa (particulada) . . . . .	51
3.9.3.12. Gluconato deshidrogenasa . . . . .	52
3.9.3.13. 2-cetogluconato reductasa . . . . .	52
3.9.3.14. 5-cetogluconato reductasa . . . . .	53
3.9.3.15. Gluconato deshidrogenasa (particulada) . . . . .	53
3.9.3.16. 5-cetogluconato deshidrogenasa . . . . .	54
3.9.3.17. 2-cetogluconato deshidrogenasa . . . . .	54
3.9.3.18. 2-cetogluconato deshidrogenasa (particulada) . . . . .	54
3.9.3.19. 5-cetogluconato deshidrogenasa (particulada) . . . . .	55
3.9.3.20. NADH deshidrogenasa . . . . .	55
3.9.3.21. NADPH deshidrogenasa . . . . .	56
3.9.3.22. Transhidrogenasa . . . . .	56
3.9.3.23. Fosfoglucoosa isomerasa . . . . .	57
3.9.3.24. Fructosa quinasa . . . . .	57
3.9.3.25. Glucoquinasa . . . . .	58
3.9.3.26. Gluconato quinasa . . . . .	58
3.9.3.27. Complejo de la piruvato deshidrogenasa . . . . .	58
3.9.3.28. Citrato sintasa . . . . .	59
3.9.3.29. Aconitasa . . . . .	60
3.9.3.30. Isocitrato deshidrogenasa . . . . .	60
3.9.3.31. Complejo de la 2-oxoglutarato deshidrogenasa . . . . .	61
3.9.3.32. Succinato deshidrogenasa . . . . .	61
3.9.3.33. Fumarasa . . . . .	62
3.9.3.34. Malato deshidrogenasa . . . . .	62
3.9.3.35. Malato deshidrogenasa (actividad inversa) . . . . .	62
3.9.3.36. Malato deshidrogenasa o enzima mállica . . . . .	





4.3. Resistencia a antibióticos de <i>A. diazotrophicus</i> , <i>H. seropedicae</i> y <i>P. rubrisubalbicans</i> . . . . .	78
4.4. Crecimiento de <i>A. diazotrophicus</i> y <i>H. seropedicae</i> en diferentes fuentes carbonadas . . . . .	81
4.5. Curvas de crecimiento de <i>A. diazotrophicus</i> . . . . .	83
4.6. Respiración en células enteras de <i>A. diazotrophicus</i> . . . . .	87
4.7. Principales vías para el catabolismo de carbohidratos . . . . .	91
4.8. Oxidación directa de glucosa . . . . .	94
4.9. Método para aislar mutantes en glucosa dehidrogenasa . . . . .	100
4.10. Respiración en fracciones de membrana . . . . .	102
4.11. Ciclo de los ácidos tricarboxílicos y ciclo del glioxilato . . . . .	111
4.12. Transporte de sustratos . . . . .	114
4.13. Vías de asimilación de amonio . . . . .	117
4.14. Curvas de osmotolerancia . . . . .	120
4.15. Transporte de sacarosa . . . . .	125
4.16. Determinación de invertasa extracelular . . . . .	127
4.17. Discusión general . . . . .	130
5. Conclusiones . . . . .	133
6. Bibliografía . . . . .	135