

CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA EN UNA CEPA DE *BURKHOLDERIA cepacia*

Hilda Rodríguez, Onaydis Torres, Tania Gonzalez, Gloria Bueno

Instituto Cubano de Investigaciones de la Caña de Azúcar, Apdo. 4026, CP 11 000, Ciudad de La Habana, Cuba, Fax:
53 7 338236 Email: hrodri@cibnor.mx

Rhizobacterias., PGPR, solubilización de fósforo

Introducción. Un mecanismo por el cual algunas rizobacterias pueden ejercer un efecto promotor del crecimiento de las plantas es la solubilización del fósforo del suelo. Particularmente el fósforo orgánico puede ser solubilizado por medio de enzimas fosfatasa (1). La cepa de *Burkholderia cepacia* IS-16 es utilizada actualmente en Cuba como biofertilizante, de ahí la necesidad de un mayor conocimiento de los aspectos bioquímicos involucrados en la producción de enzimas fosfatasa, con vistas además, a su manipulación genética para incrementar sus potencialidades de uso agrícola.

El objetivo de este trabajo ha sido el estudio de las características bioquímicas y fisiológicas de la actividad fosfatasa ácida en esta cepa de importancia económica.

Metodología. La cepa de *B. cepacia* IS-16 fue cultivada en zaranda rotatoria a 175 rpm en caldo nutriente. El crecimiento se siguió por la absorbancia del cultivo a 600 nm.. La actividad fosfatasa fue determinada empleando pNPP como sustrato, y el fenotipo Pho + fue observado en placas conteniendo un medio indicador (2). La enzima fue separada empleando electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y detectada por una técnica de zimograma empleando fenoltaleína difosfato en el gel de corrida (2).

Resultados y Discusión. Se encontró que preincubar las muestras 30 min aumenta los niveles detectados de actividad. Para conocer los tipos de fosfatasa presentes en nuestras cepas con respecto a su pH de acción, se estudió la influencia del pH en la actividad de cultivos de 24 h en caldo nutriente. La cepa IS-16 produjo un sólo pico de actividad con un máximo a pH 6.2, por lo que debe tratarse de una enzima del tipo fosfatasa ácida. La cinética de producción de la actividad enzimática a diferentes temperaturas mostró que aunque a la temperatura de 30 °C se detectó la óptima velocidad de crecimiento, un mayor crecimiento total se produjo a 25 °C, alcanzado a las 16 horas de cultivo. Los niveles máximos de actividad enzimática fueron obtenidos en fase estacionaria, y 30 °C resultó la temperatura óptima para la producción de la enzima.

.A 25 y 30 °C la actividad fosfatasa en esta cepa se comporta como una producción parcialmente asociada al crecimiento.

La enzima se localizó unida a la célula, principalmente en el espacio periplásmico. Sin embargo, en la fase estacionaria la cantidad de enzima liberada al sobrenadante aumenta

rápidamente, particularmente a temperaturas de crecimiento de 25 y 30 °C.

La técnica de zimograma mostró una banda de actividad fosfatasa compuesta de un polipéptido de 27 kDa, similar a la descrita para *Escherichia. coli* y *Salmonella typhimurium* (2).

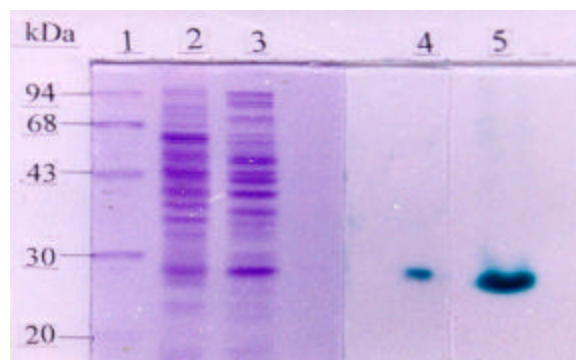


Fig. 1 Análisis de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS – PAGE) 1-Marcador de peso molecular, 2-Proteínas totales de la cepa IS-16, 3-Proteínas totales de la cepa PM9, 4-Zimograma para actividad fosfatasa, cepa IS-16, 5-Zimograma para actividad fosfatasa, cepa PM9

La enzima mostró un amplio espectro de actividad frente a diferentes ésteres de fosfatos fenólicos y otros sustratos.

Conclusiones. La cepa de *B. cepacia* IS-16 produce actividad fosfatasa ácida con un óptimo a pH 6.2 y 30 °C, la cual está localizada principalmente en el periplasma. La movilidad electroforética de la enzima corresponde a un polipeptido de 27 kD, con actividad frente a un amplio grupo de sustratos.

Bibliografía

(1)Rodríguez H., Fraga R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* 17: 319-339

(2)Thaller, M. C., Berlutti F., Schippa S., Jori P., Passariello C, y Rossolini, G.M. 1995. Heterogeneous patterns of acid phosphatases containing low-molecular-mass polypeptides in members of the family *Enterobacteriaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*45: 225-261