

Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana

Grolamys Castillo¹, Beatriz Altuna¹, Georgina Michelena¹, José Sánchez-Bravo² & Manuel Acosta²

¹ Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA),

Vía Blanca 804 y Carretera Central, Apdo. Postal 4026, San Miguel del Padrón, CP 11000, Ciudad de la Habana, Cuba.

Email: grolamys.castillo@icidca.edu.cu

² Departamento de Biología Vegetal (Fisiología Vegetal). Facultad de Biología. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo. 30100 Murcia. España.

Resumen

Correspondencia

M. Acosta

Email: macosta@um.es

Tel.: +34 968 364940

Fax.: +34 968 363963

Recibido: 10 Octubre 2005

Aceptado: 21 Noviembre 2005

El Ácido indol acético (AIA) es una auxina natural presente en la mayoría de las plantas. Las auxinas son hormonas vegetales que regulan diversos procesos del desarrollo vegetal, por lo que su aplicación en Agricultura es muy frecuente. Frente a la actual utilización de auxinas obtenidas por síntesis química, la síntesis microbiológica de estas sustancias resulta de gran importancia ya que la aplicación de caldos de fermentación que contienen auxinas, puede constituir una alternativa viable en el contexto de una agricultura ecológica. En este trabajo se muestra el estudio realizado para cuantificar el AIA presente en caldos de fermentación obtenidos a partir de la bacteria *Rhizobium sp. 3*. Utilizando un procedimiento de análisis de fitohormonas mediante HPLC desarrollado previamente, se ha puesto a punto un método para cuantificar AIA usando Ácido indol propiónico (AIP) como estándar interno. Se ha utilizado la técnica de supresión iónica que evita la necesidad de obtener un derivado del compuesto a analizar. La detección se realizó por fluorescencia a una sensibilidad baja. Las muestras de caldos analizados mostraron un valor medio de AIA en el extracto de $29,0 \pm 1,3$ mg/mL. El método utilizado resultó ser lineal, sensible, preciso y exacto en el intervalo de concentración estudiado, por lo que se considera adecuado para la cuantificación de AIA a los niveles encontrados en los caldos fermentados.

Palabras Claves: Auxinas, Ácido indol acético, AIA, Ácido indol propiónico, AIP, Caldo de fermentación, Estándar interno, HPLC.

Abstract

Quantification of the indole acetic acid (IAA) content in a microbial fermentation broth.

The Indole acetic acid (IAA) is a endogenous auxin, present in most plants. Auxins are plant hormones that regulate many processes of the plant development and by this reason, their use in Agriculture is very frequent. As the auxins used are mainly obtained by chemical synthesis, the microbiological synthesis of these compounds is of great importance since the application of fermentation broth containing auxins can be a viable alternative in the context of an ecological agriculture. In this work we have studied the quantification of the IAA present in fermentation broth obtained from the bacteria *Rhizobium sp. 3*. Using a previously

developed HPLC procedure to analyse plant hormones, a method to measure IAA using Indole propionic acid as internal standard is proposed. The anionic suppression technique, without the necessity of derivatization, has been used. The detection was carried out by fluorescence at low sensitivity. The samples of analysed broth showed a mean IAA value of $29,0 \pm 1,3$ mg/mL in the extract. The method proposed was lineal, sensitive, precise and accurate in the studied concentration interval and therefore it is considered an appropriate method for the quantification of IAA levels found in the bacteria *Rhizobium* sp.3 fermentation broth.

Key words: Auxins, Fermentation broth, HPLC, IAA, Indole acetic acid, Indole propionic acid, IPA, Internal standard.

Introducción

Las fitohormonas son sustancias endógenas bioactivas presentes en las plantas, que controlan diversos procesos del desarrollo vegetal. Las aplicaciones prácticas de estos compuestos son muy diversas y su utilización actual en Agricultura es frecuente y en continuo aumento. La industria agroquímica proporciona un amplio repertorio de fitorreguladores que, en general, se obtienen por síntesis química. Por otra parte, la Agricultura industrial, se enfrenta a una problemática importante debido a una mayor sensibilidad de la sociedad ante los problemas medioambientales y una mayor valoración de los productos ecológicos por los consumidores de los países desarrollados. Existe por tanto, un interés creciente en desarrollar una Agricultura sostenible que sustituya la utilización masiva de plaguicidas, fertilizantes y reguladores del crecimiento sintéticos (análogos a las fitohormonas) por productos naturales.

La síntesis microbiológica de fitohormonas puede constituir una alternativa viable en el contexto de una Agricultura ecológica sostenible ya que la aplicación de caldos de fermentación que contengan estos productos reduce el impacto medioambiental y su obtención a escala industrial resulta económicamente más atractiva. La eficacia de estas fitohormonas de origen biológico se ha comprobado en diversos estudios en los que se ha demostrado que su aplicación produce un aumento en los rendimientos y la calidad de las cosechas (Frankenberger & Arshad 1995).

Las auxinas son un grupo de compuestos reguladores del desarrollo de las plantas que, entre otros efectos, influyen en el crecimiento, la división celular y la formación de raíces. Los usos de las auxinas en la esfera agrícola son muy diversos y se aplican de forma rutinaria en biofábricas, en los cultivos *in vitro* de material vegetal y en las plantaciones. La

auxina natural más importante es el ácido indolacético (AIA) aunque existen otros compuestos denominados auxinas sintéticas que producen efectos similares al AIA y se utilizan en la práctica agrícola con preferencia al AIA. Algunas auxinas, como el propio AIA, son sintetizadas por algunos microorganismos como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, etc. (Patten & Glick 1996).

Una etapa decisiva en la producción microbiológica de fitohormonas es la determinación de su rendimiento, lo que implica la puesta a punto de métodos de separación y cuantificación de la hormona presente en los caldos de fermentación. La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ha sido el método de separación más empleado en el análisis de los reguladores del crecimiento, siendo la fase reversa C18 la más usada. La mayoría de los métodos de HPLC empleados para la separación de indoles y sus derivados (como el AIA), utilizan sistemas de gradientes y mezclas de metanol, agua y ácido acético como fase móvil (Sandberg et al. 1987, Guerrero et al. 2001). Sin embargo la elución por gradiente consume tiempo y disolvente para lograr el reequilibrio de la columna después de cada inyección de muestra, lo cual puede evitarse con un sistema isocrático optimizado (Lebuhn & Hartmann 1993). También se han utilizado otros métodos cromatográficos como la Cromatografía en Placa Fina (Fuentes-Ramírez et al. 1993), Cromatografía de Gases (Sandberg et al. 1987) y sistemas cromatográficos acoplados a Espectrometría de Masas (Meuwly 1991, Prinsen et al. 1997, Numan & Danielson 2002).

Teniendo en cuenta los altos precios de los reguladores del crecimiento en el mercado internacional y las limitaciones para acceder al mismo que nos impone el bloqueo económico, el Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA) ha realizado investigaciones en-

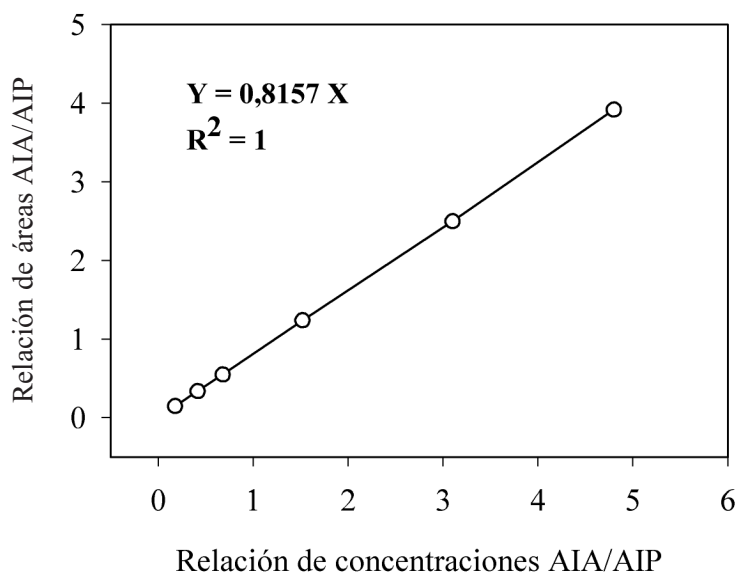


Figura 1. Recta de Calibrado para la cuantificación de AIA con estándar interno. A partir de disoluciones de AIA y AIP, se prepararon muestras conteniendo distintas proporciones de AIA/AIP que fueron analizadas por HPLC. Se representa la relación de áreas frente a la relación de concentraciones del AIA y AIP (AIA/AIP). Se indica la ecuación de la recta obtenida mediante ajuste lineal por mínimos cuadrados.

Figure 1. Calibrated Straight line for the quantification of AIA with internal standard.

caminadas a desarrollar nuevas tecnologías de producción de fitohormonas. Con el fin de estudiar la síntesis microbiana de AIA por *Rhizobium sp.*, recientemente se desarrolló una técnica isocrática de HPLC para la separación de indoles (como AIA; ácido indol propiónico, AIP; ácido indol butírico y el éster etílico del ácido indol acético), basada en la supresión iónica, ya que los indoles son ácidos débiles (Castillo 2004). El objetivo del presente trabajo es establecer una metodología analítica para cuantificar el contenido de AIA en los caldos de fermentación microbiana. El método que se propone consiste en el análisis de extractos de los caldos utilizando HPLC con detector de fluorescencia y AIP como estándar interno.

Materiales y Métodos

Los caldos de fermentación se obtuvieron a partir de la cepa de la bacteria *Rhizobium sp.* 3, procedente de la colección de microorganismos de la facultad de Biología de la Universidad de la Habana. Las características del medio de cultivo y las condiciones de fermentación empleadas fueron descritas por Castillo (2004).

Preparación de las muestras

El caldo de fermentación se centrifugó en frío (4-10°C) a 8000 rpm durante 20 min. Una alícuota del

sobrenadante de 2 mL se ajustó a pH 2,8 con HCl 1 M y se extrae 3 veces con 2 ml de acetato de etilo de forma consecutiva. Posteriormente, el extracto se lleva a sequedad con corriente de nitrógeno y se redissuelve en 1 mL de fase móvil. Inmediatamente antes de la extracción, a la muestra se adicionó AIP (utilizado como estándar interno en la cuantificación de AIA) hasta alcanzar una concentración final de 30 mg/mL.

Cromatografía por HPLC del extracto

La separación cromatográfica se realizó en forma isocrática en una columna de fase reversa C18. Como fase móvil se utilizó una mezcla de metanol-ácido acético 0,5% en una proporción 60:40 (v/v), previamente desgasificada, a una velocidad de flujo de 0,7 mL/min y a temperatura ambiente. La detección se realizó por fluorescencia usando una λ de excitación de 280 nm y una λ de emisión de 340 nm. El detector se mantiene a una sensibilidad baja, con una respuesta de 3, ganancia x4 y una frecuencia de muestreo de 500 ms. En estas condiciones, los picos correspondientes a los patrones de AIA y AIP aparecen claramente separados en el cromatograma (Figura 2).

Cuantificación del AIA

La cantidad de AIA presente en la muestra se determinó a partir de la relación de áreas de los picos del

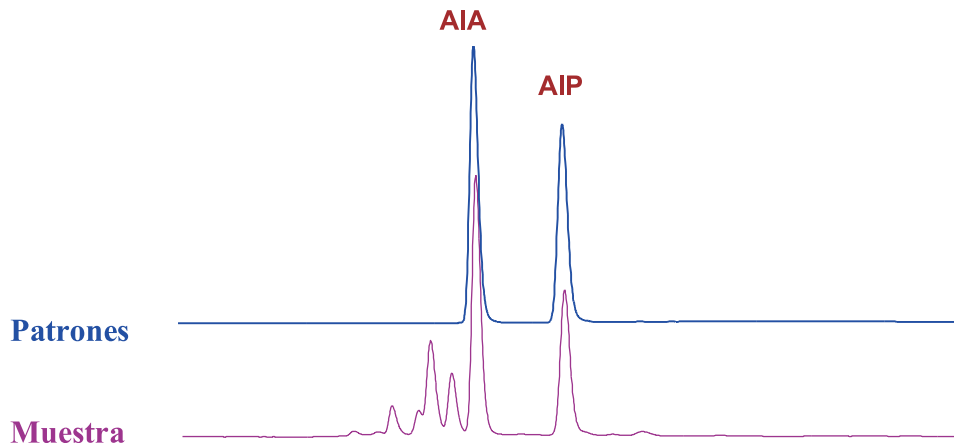


Figura 2. Cromatogramas superpuestos de los patrones y la muestra. Cromatogramas obtenidos a partir de una disolución de patrones de AIA y AIP (patrones) y de una muestra de caldo después de adicionar AIP (muestra).
Figure 2. Superimposed Chromatograms of the standards and the sample.

cromatograma correspondientes a AIA y AIP, utilizando una recta de calibrado.

Para determinar si el sistema de detección proporciona una correlación lineal entre la relación de áreas y la relación de concentraciones, se preparó una recta de calibrado de 6 puntos. Para ello, a partir de disoluciones de AIA de concentraciones 0,25; 0,5; 1; 2; 4 y 6 mg/mL y de una disolución de AIP de concentración 2 mg/mL, se obtuvieron disoluciones con las siguientes relaciones de concentración AIA/AIP: 0,125; 0,25; 0,5; 1,2 y 3. Cada disolución se inyectó por duplicado. La linealidad del sistema en el intervalo de concentración estudiado se comprobó mediante un análisis de regresión por el método de mínimos cuadrados. Para calcular los límites de detección y cuantificación, se inyectó por triplicado un "blanco" (fase móvil) y disoluciones diluidas de patrones. El cálculo se realizó utilizando la ecuación

$$S/N = 2H/h$$

Donde:

S/N = relación señal/ruido

H = altura del pico de la disolución patrón desde la línea base.

h = ruido de la línea base causada por el blanco (fase móvil) medido en la posición del pico del patrón, en un intervalo que corresponde a 20 veces la anchura que presenta el pico en la mitad de su altura.

Se consideró como límite de detección la concentración de la disolución patrón a la cual la relación S/N fue igual a 3 y como límite de cuantificación, la concentración de la solución patrón a la cual la relación S/N fue igual a 10.

Estudio de la precisión de la medida de AIA

a) Repetibilidad

El estudio de repetibilidad del sistema instrumental, se realizó inyectando en el cromatógrafo alícuotas de un mismo extracto 10 veces consecutivas. En los cromatogramas obtenidos se calculó la media del área del pico de interés, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

b) Precisión Intermedia

Alícuotas de la misma muestra de caldo se extrajeron 5 veces y cada extracto se inyectó por duplicado durante tres días consecutivos. En los cromatogramas obtenidos se calculó la media del área de picos, la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada día, a fin de estudiar la influencia del día en el área. Análogamente se calcularon estos parámetros (la media del área, la desviación estándar y el coeficiente de variación total) en las diferentes extracciones a fin de evaluar la influencia de la extracción líquido-líquido. Se tuvo en cuenta, como criterio de aceptación, el cumplimiento de los parámetros de precisión previstos en la Norma Cubana 2001 para los valores de concentración empleados.

Estudio de la Exactitud de la medida de AIA

La exactitud se evaluó por el método de adición del patrón y se utilizó una muestra representativa del

caldo con concentración similar al valor medio declarado. Se tomaron tres alícuotas de la misma y a dos de ellas se añadieron concentraciones conocidas de un patrón de AIA y se analizaron en paralelo.

El porcentaje de recuperación del patrón añadido se calculó de acuerdo con la ecuación

$$\% \text{ Recuperación} = [(ce - com)/ca] \times 100$$

Donde:

ce = cantidad ensayada (muestra con patrón añadido)

com = cantidad original en la muestra (sin patrón añadido)

ca = cantidad de patrón añadido

Reactivos

Acetato de etilo 99,6 %, agua HPLC y Metanol HPLC 99,8 % fueron suministrados por J. T. Baker, el Ácido acético glacial 99,8% por Scharlau y los patrones de AIA y AIP por SIGMA.

Equipamiento

Se utilizó un cromatógrafo líquido SHIMADZU con bombas LC-10 AD VP, autoinyector SIL-10 AD VP, un controlador del sistema SCL-10 A VP y un detector de fluorescencia RF-10AXL. Se empleó una columna KROMASIL 100 C18 5 mm (25 x 0,4), con un lazo de inyección de 20 ml. Se utilizó el software CLASS-VP (5.03) para la adquisición y procesamiento de los datos.

Resultados y Discusión

Para la cuantificación del contenido de AIA presente en caldos de fermentación, se utilizó un método de HPLC desarrollado previamente (Castillo 2004), en el que se usa la técnica de supresión iónica, sin necesidad de obtener un derivado de la sustancia que se pretende analizar. La elección del AIP como estándar interno se basa en la similitud estructural y funcional que este compuesto tiene con respecto al AIA. También se comprobó que en la muestra del caldo de fermentación no está presente el AIP según un estudio cualitativo previo realizado por HPLC-Masas (datos no mostrados). Teniendo en cuenta que los compuestos indólicos emiten fluorescencia al ser iluminados, la detección se realizó por fluorimetría utilizando las λ de excitación y emisión indicadas en Material y Métodos. A fin de confirmar su idoneidad como procedimiento para el análisis cuantitativo del AIA, se estudió la linealidad, la sensibilidad y la pre-

cisión del método utilizado según la Norma Cubana 2001.

Linealidad

Se obtuvo una recta de calibrado con la siguiente ecuación: $Y = 0,8157 X$ ($R^2=1$), donde Y representa la relación de áreas AIA/AIP y X la relación de concentraciones AIA/AIP. El error típico del ajuste fue de $5,5 \times 10^{-16}$ y el del valor de la pendiente fue de $6,5 \times 10^{-17}$. La figura 1 muestra la recta de calibrado obtenida.

Sensibilidad

Los límites de detección y cuantificación del AIA que presenta el método se determinaron a partir de la relación señal-ruido. El límite de detección fue de 60 pg y el límite de cuantificación de 300 pg (0,3 ng) de AIA inyectados.

Precisión

Se realizó el estudio de repetibilidad para una muestra que se extrajo y se inyectó 10 veces consecutivas, obteniéndose un coeficiente de variación (CV) del 1%. La influencia del día se evaluó inyectando el mismo extracto por duplicado durante 3 días diferentes, obteniéndose valores de CV entre 1,9 y 2,8%.

La influencia de la extracción líquido-líquido como método de preparación de la muestra, se estudió realizando extracciones de 5 alícuotas de una misma muestra de caldo y cada extracto se inyectó por duplicado consecutivamente. Se evaluó la media del área, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Se obtuvo un CV medio del 6%.

Exactitud

La exactitud del método se evaluó calculando el porcentaje de recuperación de las muestras con sobrecarga del patrón AIA, obteniéndose un valor medio de recuperación de $76 \pm 4\%$.

La figura 2 muestra los cromatogramas superpuestos de los patrones y la muestra (con AIP añadido), donde se identifica el AIA (analito de interés) y el AIP (estándar interno).

Las muestras de caldos analizados mostraron un valor medio de AIA en el extracto de $29,0 \pm 1,3$ mg/mL.

Los contenidos habituales de AIA de algunos materiales vegetales son del orden de 20 ng por g de

peso fresco (esquejes de clavel, Garrido et al. 2002) y 400 ng por gramo de peso fresco (hipocótilos de altramuz, Guerrero et al. 2001). Por tanto, el rendimiento obtenido en los caldos de fermentación permite disponer de disoluciones más concentradas de AIA que pueden diluirse o mezclarse con otros principios activos antes de su aplicación agrícola.

Conclusiones:

El método puesto a punto para cuantificar el contenido de AIA por HPLC resultó ser lineal, sensible, preciso y exacto en el intervalo de concentración estudiado y permite obtener recuperaciones mayores al 70%, por lo cual se considera un método adecuado para la cuantificación de AIA a los niveles encontrados en los caldos fermentados a partir de la bacteria *Rhizobium sp.* 3.

Agradecimientos:

Agradecemos al personal del Servicio de Apoyo a las Ciencias Experimentales (SACE) de la Universidad de Murcia la ayuda prestada en la realización de análisis. Este trabajo es una contribución al proyecto de investigación AGL-2004-07902 concedido por la CICYT (España).

Referencias

- Castillo G. 2004. Desarrollo de Métodos Cromatográficos para la Determinación de Giberelinas y Auxinas para el estudio de su Biosíntesis. Tesis de Maestría. Facultad de Química. Universidad de la Habana.
- Franhenberger Jr WT & Arshad M. 1995. Phytohormones in soils. Microbial production and function. New York: Marcel Dekker, Inc..
- Fuentes-Ramírez LE, Jimenez-Salgado T, Abarca-Ocampo IR & Caballero-Mellado J. 1993. *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of México. *Plant and Soil* 154: 145-150.
- Garrido G, Guerrero JR, Cano EA, Acosta M & Sánchez-Bravo J. 2002. Origin and basipetal transport of the IAA responsible for rooting of carnation cuttings. *Physiologia Plantarum* 114: 303-312.
- Guerrero JR, García P, Sánchez-Bravo J, Acosta M & Arnao M. 2001. Quantitation of Indole-3-acetic acid by LC with electrochemical detection in etiolated hypocotyls of *Lupinus Albus*. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 24 (20): 3095-3104.
- Lebuhn M & Hartmann A. 1993. Method for the determination of Indole-3-acetic acid and related compounds of L-tryptophan catabolism in soils. *Journal of Chromatography* 629: 255-266.
- Meuwly P & Pilet PE. 1991. Simultaneous Gas Chromatography-Mass Spectrometry quantification of endogenous ¹²C- and ¹³C Indole-3yl-acetic acid levels in growing maize roots. *Plant Physiology* 95: 179-183.
- Norma Cubana Experimental. 2001. Guía para la Validación de Métodos de Ensayos Químicos para Alimentos. Proyecto para circular. 7ª Revisión. 1ª Edición. Oficina Nacional de Normalización (NC).
- Numan A & Danielson ND. 2002. On-line photo-derivatization with flow injection and liquid chromatography-atmospheric pressure electrospray mass spectrometry for the identification of indoles. *Analytica Chimica Acta* 460: 49-60.
- Patten ChL. & Glick BR. 1996. Bacterial biosynthesis of Indole-3-acetic acid (review). *Canadian Journal of Microbiology* 42: 207-220.
- Prinsen E, Van Dongen W, Esmans E & Van Onckelen H. 1997. HPLC Linked electrospray tandem mass spectrometry: a rapid and reliable method to analyze indole-3-acetic acid metabolism in bacteria. *Journal of Mass Spectrometry* 32: 12-22.
- Sandberg G, Crozier A & Ernstsén A. 1987. Indole-3-acetic acid and related compounds. In *Principles and Practice of Plant Hormone Analysis*. London: Academic Press Inc., pp 169-301.