

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**EVALUACIÓN DE ACTINOBACTERIAS DE CUATRO CIENEGAS,
COAHUILA, COMO PROMOTORAS DE CRECIMIENTO EN PLANTAS**

**POR
KARLA ALEJANDRA SOTO MARFILEÑO**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

DICIEMBRE, 2019

EVALUACIÓN DE ACTINOBACTERIAS DE
CUATRO CIENEGAS, COAHUILA, COMO
PROMOTORAS DE CRECIMIENTO EN PLANTAS

Comité de tesis



Dr. Hamlet Áviles Arnaut

Presidente



Dra. Susana de la Torre Zavala

Secretario



Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal

Vocal



Dr. José María Viader Salvadó

Vocal



Dra. Aida Rodríguez García

Vocal

EVALUACIÓN DE ACTINOBACTERIAS DE
CUATRO CIENEGAS, COAHUILA, COMO
PROMOTORAS DE CRECIMIENTO EN PLANTAS

Dirección de tesis



Dr. Hamlet Áviles Arnaut

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer principalmente al Instituto de Biotecnología, laboratorio L9, en especial al Dr. Hamlet Aviles, por las instalaciones prestadas y por darme la oportunidad de llevar a cabo este trabajo de investigación para obtener mi grado de Maestro en Ciencias.

Al Dr. Max Apolinar por brindarme su apoyo en todo momento, por la ayuda recibida en este trabajo, tanto académicamente como personalmente, como amigo y como persona, ya que me ayudó a crecer profesionalmente en esta etapa de mi vida.

A mi familia, por siempre apoyarme y estar presentes en todas las decisiones y etapas de mi vida.

A mis amigos, en especial a Annie Huizar, Magali Mendoza, Mónica Perez, Perla Solis y Glenda Espinoza por siempre estar a mi lado en las situaciones difíciles, felices y en todo momento. Gracias infinitas.

A mis compañeros de maestría y el cuerpo académico de posgrado por todas las enseñanzas en estos dos años.

DEDICATORIA

*Dedicada a toda mi familia, amigos y compañeros que hicieron posible este trabajo,
gracias infinitas.*

“Andábamos sin buscarnos, pero sabiendo que andábamos para encontrarnos”, gracias.

ÍNDICE

Índice	i
Índice de tablas	iv
Índice de figuras	v
Lista de símbolos y abreviaturas	viii
Resumen	ix
Abstract	x
Introducción	1
Antecedentes	3
1. El suelo y sus componentes microbianos	3
2. Actinobacterias	2
2.1 Características generales	2
2.2 Importancia	5
3. Actinobacterias y su actividad promotora de crecimiento en plantas	7
3.1 Producción de reguladores de crecimiento	6
3.1.1 Producción de ácido indolacético (AIA).....	6
3.1.2 Producción de sideróforos	7
3.1.3 Solubilización de fosfatos	7
3.1.4 Producción de quitinasas, lipasas, celulasas y proteasas	8
4. Actinobacterias de Cuatro Ciénegas, Coahuila	10
5. <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudio	11
Justificación	12
Hipótesis.....	13

Objetivo del trabajo	14
1.1 Objetivo general	14
1.2 Objetivos particulares	14
Materiales y métodos	15
2.1 Aislados	15
2.1.1 Reactivación de aislados	15
2.2 Evaluación de solubilización de fosfatos	15
2.3 Evaluación de producción de sideróforos	16
2.4 Fijación de Nitrógeno	16
2.5 Producción de auxinas	17
2.6 Evaluación de promoción de crecimiento en plantas	18
2.7 Pruebas enzimáticas	18
2.7.1 Producción de celulasas	18
2.7.2 Producción de quitinasas	19
2.7.3 Producción de lipasas	19
2.7.4 Producción de proteasas	20
2.8 Análisis estadístico	20
Resultados	21
1. Actinobacterias de Cuatro Ciénegas, Coahuila solubilizadoras de fosfato	21
2. Actinobacterias de Cuatro Ciénegas, Coahuila productoras de Sideróforos	22
3. Fijación de nitrógeno asimbiótico por actinobacterias de Cuatro	

Ciénegas, Coahuila	24
4. Actinobacterias de Cuatro Ciénegas, Coahuila productoras de ácido indolacético	25
5. Resultados globales	26
6. Cinéticas de producción de ácido indolacético	26
7. Promoción de crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	28
8. Ensayos enzimáticos	39
Discusión	41
1. Solubilizadores de fosfato	41
2. Producción de sideróforos	42
3. Fijación de Nitrógeno	42
4. Producción de Acido indolacético	43
5. Promoción de crecimiento	44
6. Ensayos enzimáticos	45
Conclusión	47
Perspectivas	48
Bibliografía	49
Anexos	58
Anexo 1. Listado de Actinobacterias	58
Anexo 2. Listado de aislados positivos y negativos para ensayos de solubilización de fosfato, producción de sideróforos, fijación de nitrógeno y producción de auxinas	67

INDICE DE TABLAS Y ANEXOS

Tabla 1.	Lista de aislados positivos para cada uno de los ensayos para determinar candidatos para promoción de crecimiento en plantas y su representación en porcentaje	26
Anexo 1.	Listado de Aislados	58
Anexo 2.	Listado de aislados positivos y negativos para ensayos de solubilización de fosfato, producción de sideróforos, fijación de nitrógeno y producción de auxinas	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Índice de solubilización de fosfato (mm) de actinobacterias provenientes de Cuatro Ciénegas, Coahuila	21
2.	Imagen de halos formados en medio O-CAS (producción de sideróforos) por aislados de Cuatro Ciénegas, Coahuila, después de 5 días de incubación	22
3.	Producción de sideróforos (diámetro en mm) por colonias de actinobacterias de Cuatro Ciénegas, en el ensayo O-CAS	23
4.	Crecimiento de los aislados en medio NFB después de 10 días	24
5.	Concentración de ácido indolacético después de 5 días de cultivo	25
6.	Curva de crecimiento del aislado 108	27
7.	Curva de crecimiento del aislado 696-1	27
8.	Curva de crecimiento del aislado 198	28
9.	Longitud de raíces después de 10 de germinación de semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	29
10.	Imagen de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> después de 10 días de germinación	30
11.	Longitud de raíces de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> (cm) tratadas con sobrenadantes de actinobacterias (0.5 μ M)	31

12.	Longitud de raíces de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> (cm) tratadas con sobrenadantes de actinobacterias (0.05 μ M)	32
13.	Longitud de raíces de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> (cm) tratadas con sobrenadantes de actinobacterias (0.01 μ M)	32
14.	Imagen de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> después de 10 días de germinación a una concentración 0.5 μ M	33
15.	Imagen de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> después de 10 días de germinación en estereoscopio (concentración 0.5 μ M)	33
16.	Imagen de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> después de 10 días de germinación a una concentración 0.05 μ M	34
17.	Imagen de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> después de 10 días de germinación en estereoscopio (concentración 0.05 μ M)	34
18.	Imagen de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> después de 10 días de germinación a una concentración 0.01 μ M	35
19.	Imagen de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> después de 10 días de germinación en estereoscopio (concentración 0.01 μ M)	35
20.	Imagen de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> (10 días después de germinación) tratadas con sobrenadantes a 0.05 μ M	36
21.	Imagen de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> (10 días después de germinación) tratadas con sobrenadantes a 0.05 μ M.en estereoscopio	36
22.	Peso fresco de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> (mg), 0.5 μ M	37
23.	Peso fresco de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> (mg), 0.05 μ M	38
24.	Peso fresco de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> (mg), 0.01 μ M	38
25.	Imagen de producción de celulasas por los aislados de Cuatro Ciénegas, Coahuila después de 5 días de incubación	39

26.	Imagen de producción de quitinasas por los aislados de Cuatro Ciénegas, Coahuila después de 5 días de incubación	39
27.	Imagen de producción de lipasas por los aislados de Cuatro Ciénegas, Coahuila después de 72 horas de incubación	40
28.	Imagen de producción de proteasas por los aislados de Cuatro Ciénegas, Coahuila después de 72 horas de incubación	40

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

PGPB	Plant Growth Promoting Bacteria – Bacteria Promotora de Crecimiento en Plantas
Fe	Fierro
N	Nitrógeno
H	Hidrogeno
O	Oxigeno
K	Potasio
CO₂	Dióxido de Carbono
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
μM	Micromolar
μg	Microgramos
IAA/IAA	Ácido Indolacético
Da	Daltons
O-CAS	Overlayer Crome Azurol S
NFB	Nitrógeno Free Bromotimol
CMC	Carboximetil celulosa
MM9	Medio Mínimo 9
D.O.	Densidad Óptica

RESUMEN

Actualmente, el uso de consorcios microbianos en forma de biofertilizantes para la reducción en la aplicación de fertilizantes químicos, sin comprometer la producción de plantas, es un área importante de investigación en la agricultura, microbiología y biotecnología. El uso de bacterias que promueven el crecimiento de plantas (PGBP) para el beneficio de la agricultura ha recibido mayor aceptación y atención. Las actinobacterias han sido ampliamente investigadas debido a su importancia económica y ecológica, y a su potencial biotecnológico. En años recientes, investigadores se han enfocado en grupos minoritarios de actinobacterias, incluyendo las que son difíciles de aislar y cultivar, debido a que las condiciones presentes en ese ambiente hacen que su metabolismo sea versátil y único. A escala regional, se seleccionó a Cuatro Ciénegas, Coahuila, ya que no solo presenta una biodiversidad ecológica endémica, si no también condiciones climáticas particulares. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de actinobacterias aisladas de Cuatro Ciénegas, Coahuila, para promover el crecimiento de *Arabidopsis thaliana in vitro*. Para lo anterior se evaluaron los aislados para solubilización de fosfato, producción de sideróforos, fijación de nitrógeno en medio NFB y producción de ácido indolacético. Encontramos que, de un total de 43 aislados, 8 (18%) fueron capaces de solubilizar de fosfato, sólo 10 aislados (23%) produjeron sideróforos, 14 aislados (32%) tuvieron la capacidad de fijar nitrógeno en medio NFB y un total de 12 aislados (27%) resultaron positivos para producción de ácido indolacético (AIA). Para la promoción de crecimiento *in vitro* con semillas de *Arabidopsis thaliana* se evaluaron los aislados 198, 696-1 y 108, ya que resultaron positivos para dos o más de los ensayos antes realizados. El aislado que indujo una promoción de crecimiento fue el 198 a una concentración de 0.05 μM de AIA, ya que se observó que la raíz presentaba una longitud mayor respecto al control. Finalmente, se realizaron pruebas enzimáticas para determinar el potencial biotecnológico de los aislados 198, 696-1, 108 y PR117, solo el aislado PR117 dio positivo para celulasas en agar CMC, con un diámetro de halo de 0.6 cm. Ningún aislado resulto capaz de producir quitinasas y lipasas, y para proteasas los aislados 198 y 108 resultaron positivos, con un diámetro de 4 mm y 3.2 mm, respectivamente. Las actinobacterias aisladas de Cuatro ciénegas, Coahuila, presentan los mecanismos para ser consideradas como bacterias promotoras de crecimiento en plantas, además de poseer enzimas de interés biotecnológico e industrial.

ABSTRACT

Currently, the use of microbial consortia in the form of biofertilizers for the reduction in the application of chemical fertilizers, without compromising the production of plants, is an important area of research in agriculture, microbiology and biotechnology. The use of plant growth promoting bacteria (PGBP) for the benefit of agriculture has received greater acceptance and attention. Actinobacteria have been extensively investigated due to their economic and ecological importance, and their biotechnological potential. In recent years, researchers have focused on minority groups of actinobacteria, including those that are difficult to isolate and cultivate, because the conditions present in that environment make their metabolism versatile and unique. On a regional scale, Cuatro Ciénegas, Coahuila, was selected as it not only has an endemic ecological biodiversity, but also particular climatic conditions. Therefore, the aim of this work was to evaluate the ability of isolated actinobacteria of Cuatro Ciénegas, Coahuila, to promote the growth of *Arabidopsis thaliana* *in vitro*. For this purpose, the isolates were evaluated for phosphate solubilization, siderophores production, nitrogen fixation in NFB medium and indolacetic acid production. We found that, out of a total of 43 isolates, 8 isolates (18%) were able to solubilize phosphate, only 10 isolates (23%) produced siderophores, 14 isolates (32%) had the ability to fix nitrogen in NFB medium and a total of 12 isolates (27%) were positive for the production of indolacetic acid (AIA). For the promotion of *in vitro* growth with *Arabidopsis thaliana* seeds, isolates 198, 696-1 and 108 were evaluated, since they were positive in two or more of the tests previously performed. The isolate that induced a growth promotion was 198 at a concentration of 0.05 μM of AIA, since it was observed that the root was longer than the control. Finally, enzymatic tests were performed to determine the biotechnological potential of isolates 198, 696-1, 108 and PR117. Only the PR117 isolate tested positive for cellulases in CMC agar, with a halo diameter of 0.6 cm, no isolate was capable of produce chitinases and lipases, and for proteases, isolates 198 and 108 were positive with a diameter of 4 mm and 3.2 mm, respectively. The isolated actinobacteria of Cuatro Ciénegas, Coahuila, have the mechanisms to be considered as growth promoting bacteria in plants, in addition to having enzymes of biotechnological and industrial interest.

INTRODUCCIÓN

Las plantas se encuentran en constante interacción con el medio ambiente, por lo que se ven afectadas por factores bióticos y abióticos. Las condiciones abióticas, como lo son el clima, la salinidad o el suelo, tienen un impacto importante en la salud de la planta, ya que en este último se encuentran nutrientes necesarios para su desarrollo. Los principales nutrientes de la planta son: El hierro (Fe); el cual es un constituyente de enzimas y algunos pigmentos, además de estar involucrado en la reducción de sulfato y nitrato (PROMIX, 2018); el potasio (K), el cual es un cofactor de más de 50 enzimas; el fósforo (P), el cual es constituyente de ácidos nucleicos; y el nitrógeno (N), involucrado en la síntesis de aminoácidos, clorofila, etcétera (Dordas, 2008). Estos nutrientes no siempre se encuentran disponibles, por lo cual es necesario suministrarlos de forma exógena mediante fertilizantes sintetizados industrialmente. Los procedimientos por los cuales se elaboran estos fertilizantes tienen un alto impacto ambiental; por ejemplo, para la producción de fosfatos a partir de roca fosfórica, se utiliza ácido sulfúrico, el cual es causante de suelos ácidos, además de ser un químico corrosivo. Asimismo, se estima que las reservas de fosfato se agotarán dentro de los próximos 25 – 100 años (Van Kauwenbergh, 2010). Por otro lado, para la producción de amonio se utiliza un proceso llamado fijación industrial de nitrógeno Haber-Bosch, el cual involucra la quema de combustibles fósiles para llevar a cabo el calentamiento de N_2 y H_2 , liberando CO_2 al ambiente (Chen et al., 2019).

Los fertilizantes sintéticos tienen como desventajas los altos costos y aumentos dramáticos en sus costos, debido a las fluctuaciones en el precio de la energía y materias primas, impactando la sostenibilidad agrícola. Además, la síntesis de fertilizantes nitrogenados contribuye a la producción de gases de efecto invernadero, y son contribuyentes importantes de procesos de eutrofización de agua y lixiviación de estos en el suelo (FAO, s.f.).

Debido a lo anterior mencionado, se han buscado alternativas para el reemplazamiento de fertilizantes sintéticos. Una de las iniciativas más prometedoras para un modelo nuevo de agricultura, está basado en convertir los procesos naturales que ocurren en el sistema planta-suelo en tecnologías biológicas. En este contexto, los microorganismos, sus productos y sus procesos, son recursos esenciales para una nueva generación de biotecnologías aplicables a

la producción y protección de plantas y así generar un cambio en las prácticas de agricultura (De Jesús et al., 2016).

El uso de bacterias que promueven el crecimiento de plantas (PGBP) para el beneficio de la agricultura ha recibido mayor aceptación y atención (De Jesús et al., 2016). Estas bacterias se encuentran en la rizósfera o en el tejido vegetal e inducen el crecimiento de la planta aumentando la disponibilidad de nutrientes del suelo, suplementando hormonas vegetales e induciendo resistencia sistemática contra patógenos. La mayoría de las PGBP pertenecen a los filum Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacterias, aunque también se ha demostrado que el filum Actinobacteria presenta características propias de bacterias promotoras de crecimiento en plantas, aunque la información aun es limitada (Sathya et al., 2017). Las actinobacterias utilizan mecanismos directos como producción de fitohormonas, fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato, y adquisición de hierro; y mecanismos indirectos como el control de factores externos que puedan causar estrés biótico o abiótico a la planta, mediante diferentes mecanismos como producción de moléculas inhibitorias de bajo peso molecular, como amonio, alcoholes, aldehídos, sulfuros, enzimas que degradan pared celular, competición de nutrientes, entre otras (El-Tarabily y Sivasithamparam, 2006; Alexander y Zureber, 1991). Recientemente, las actinobacterias aisladas de cuatro Ciénegas (un oasis en el desierto de Chihuahua), han llamado la atención de algunos grupos de investigación, debido a su diversidad, grado de endemismo y su capacidad para crecer en condiciones de baja concentración de fósforo y pH alcalinos (Arocha *et al*, v2017). Este trabajo de investigación describe las capacidades de fijación de nitrógeno asimbiótico, la solubilización de fósforo, así como la producción de sideróforos y de auxinas, de una colección de 43 actinobacterias aisladas de Cuatro ciénegas, Coahuila. Este documento propone el uso de tres actinobacterias como PGBPs, de acuerdo con los resultados obtenidos en el crecimiento del tejido foliar y radicular en plántulas de *Arabidopsis thaliana*. Creemos que estas actinobacterias de Cuatro Ciénegas representan una alternativa para reducir el uso de fertilizantes químicos en el campo mexicano, y promover el crecimiento de las plantas cultivadas en suelos salinos con pH alcalinos.

ANTECEDENTES

1. El suelo y sus componentes microbianos.

Aunque el suelo algunas veces es considerado como una simple fuente de nutrientes para las plantas, este es en realidad un ecosistema complejo que alberga bacterias, hongos, protistas, y animales (Muller et al., 2016). Estos organismos establecen relaciones entre sí en formas variadas y complejas, contribuyendo a generar las características propias de cada suelo. Los microorganismos resultan ser de gran importancia ya que se relacionan con ciclos biogeoquímicos de elementos como carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre, fósforo, hierro y otros metales, así como en la fertilidad de las plantas y su protección contra patógenos, además de relacionarse con la degradación de compuestos xenobióticos (Nogales, 2005).

El suelo es considerado como uno de los ambientes más diversos en cuanto a microorganismos se refiere, ya que puede contener cerca de 10^9 UFC/gramo de suelo y un estimado de 10^4 especies microbianas diferentes por gramo de suelo (Cavaletti et al., 2006).

En 1904, se definió el término rizósfera por Hiltner para describir la zona del suelo en cual se desarrollan las raíces, las cuales inducen la proliferación de microorganismos. Las actividades metabólicas de los microorganismos en la rizósfera son de importancia vital para el desarrollo de la planta (Azcón et al., 2002). Algunos de los efectos beneficiosos en los sistemas suelo-planta son la estimulación de la germinación de las semillas y enraizamiento, incremento en el suministro y/o disponibilidad de nutrientes, mejora de la estructura del suelo, y protección de la planta frente al estrés biótico y abiótico (Gaiero et al., 2013).

Por otro lado, el término “rizobacteria” hace referencia a microorganismos capaces de colonizar preferencialmente las interfases suelo-raíz, donde mantienen poblaciones de individuos a un nivel que permite su efectividad (Kloepper et al. 1991; Barea et al. 2005).

Las actinobacterias han atraído especial interés, porque estas bacterias pueden prosperar en condiciones de suelo extremadamente diferentes y desempeñan un papel ecológico de importancia en el ciclo de nutrientes. Además, recientemente fueron consideradas como bacterias promotoras de crecimiento vegetal (Jiang et al., 2006; Pathom-aree, 2006).

Las bacterias promotoras de crecimiento de plantas (PGPB), son bacterias benéficas de vida libre de importancia agrícola, ya que su presencia produce efectos benéficos en la salud y crecimiento de la planta, mediante la supresión de microorganismos que causan enfermedades y acelerando la disponibilidad y captación de nutrientes (Franco y Chavarro, 2016). En este documento se propone el estudio de las actinobacterias con el fin de mejorar la fertilidad del suelo, el rendimiento de los cultivos y reducir el impacto negativo de fertilizantes químicos en el medio ambiente.

2. Actinobacterias.

Las actinobacterias son unas de las principales poblaciones microbianas que se encuentran presentes en el suelo. Pertenecen al grupo de las Grampositivas, son aerobias, bacterias micelares y además tienen un papel importante en la nutrición del suelo, así como también son conocidas por producir antibióticos, vitaminas y enzimas, además son una fuente importante de metabolitos antimicrobianos (Franco y Chavarro, 2016).

2.1 Características Generales.

Las actinobacterias constituyen a un grupo heterogéneo de microorganismos. Los 63 géneros del orden Actinomycetales constituyen aproximadamente del 20-60% de la población microbiana. (Ezziyyani et al., 2004).

Actualmente, las actinobacterias se encuentran en el dominio bacteria debido a que su pared celular se encuentra compuesta de peptidoglicano, tienen un diámetro inferior al de los hongos (0.5-2.0 μm) y su material genético es típico de un procariota (Sylvia, 2005). Son bacterias heterótrofas, por lo que pueden utilizar fuentes de carbono simples y complejas, así como compuestos moleculares orgánicos. Utilizan como fuentes de nitrógeno amonio, nitratos, aminoácidos, peptonas y un número elevado de proteínas (Leveau y Bouix, 2000). La mayoría de las especies son aerobias, mesófilas, crecen en un rango de temperatura entre 25-30°C, son poco tolerantes a la acidez, por lo que para su crecimiento óptimo requieren un pH neutro, aunque pueden crecer en un rango de pH entre 5.0 y 9.0 (El-Tarabily y Sivasithamparam, 2006).

La actividad y distribución de las actinobacterias en el suelo puede verse afectado por diversos factores como lo son el pH, temperatura y por la composición y tipo de suelo

(Prescott, 2002). La mayoría de las actinobacterias del suelo muestran un crecimiento óptimo en condiciones neutras o ligeramente alcalinas, y los géneros comúnmente aislados son *Streptomyces* y *Micromonospora* (Basilio et al., 2002).

2.2 Importancia

Las actinobacterias son importantes para la mineralización del carbono y nitrógeno, así como en la descomposición de la materia orgánica presente en el suelo (Sylvia, 1999).

Estas bacterias son muy reconocidas debido a su versatilidad metabólica, ya que su potencial metabólico les permite sobrevivir aun cuando las condiciones ecológicas son poco favorables; todo lo anterior debido a que producen una gran variedad de metabolitos primarios y secundarios (Nawani et al., 2013).

Las actinobacterias son consideradas como minas de varias enzimas, antibióticos y otros metabolitos bioactivos, por lo que en la actualidad, distintos programas siguen buscando compuestos producidos por estas bacterias, especialmente en el ámbito de la medicina, con la búsqueda de nuevos antibióticos, y en la agricultura, como medida de protección y enriquecimiento de cultivos (Krishnaraj et al., 2014).

3. Actinobacterias y su actividad promotora de crecimiento en plantas.

Las interacciones planta-microorganismos en la rizósfera son determinantes para la salud de la planta, la productividad y fertilidad del suelo. Las bacterias que promueven el crecimiento de las plantas son aquellas que pueden incrementar el crecimiento y proteger a la planta del estrés abiótico mediante una gran variedad de mecanismos, tales como la fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato, actividad ACC desaminasa, y producción de sideróforos y fitohormonas (Souza et al., 2015).

Como se ha mencionado, los actinomicetos producen muchos tipos de metabolitos bioactivos, incluyendo los mencionados anteriormente. La mayoría de los compuestos son producidos por especies del género *Streptomyces*, que forma parte de la microflora del suelo en forma abundante y son colonizadores efectivos del sistema radicular de las plantas. Los metabolitos producidos por las actinobacterias pueden promover el crecimiento de las plantas de forma indirecta, previniendo efectos perjudiciales de uno o más microorganismos mediante mecanismos de biocontrol o antagonismo de patógenos en el suelo a través de la

producción de antibióticos y otros metabolitos secundarios. También pueden promover el crecimiento de una manera directa, suplementando a la planta con compuestos que son sintetizados por el actinomiceto, o facilitando la toma de nutrientes del suelo por la planta, mediante la síntesis de sideróforos, fijación de nitrógeno, síntesis y solubilización de fitohormonas y minerales (Sharma et al., 2014).

3.1 Producción de reguladores de crecimiento de plantas.

Los reguladores de crecimiento en plantas, también conocidos como hormonas vegetales, son pequeñas moléculas que afectan su crecimiento y desarrollo a muy pequeñas concentraciones.

Un parámetro utilizado para determinar la efectividad de ciertas bacterias de la rizósfera es la capacidad de promover el desarrollo de un sistema de raíces, ya que su rápido desarrollo tanto por elongación primaria de raíces o emergencia de raíces laterales secundarias permite a las semillas jóvenes tener un fácil acceso a nutrientes y agua del ambiente en donde se encuentran (Patten y Glick, 2002). Como se mencionó anteriormente, existen diferentes mecanismos involucrados como la producción de sideróforos y ácido indolacético, solubilización de nutrientes, efectos sinérgicos antagónicos o beneficiosos.

3.1.1 Producción de ácido indolacético (AIA).

El ácido indolacético (AIA) es un regulador del crecimiento de la planta y es una forma activa de auxinas. Esta fitohormona estimula el crecimiento del sistema radicular, gracias al desarrollo de raíces laterales y divisiones del meristemo apical, que deriva en la elongación de las raíces (Garrido et al., 2002), incrementando el acceso a nutrientes del suelo por la planta. Se ha comprobado que el AIA es el principal responsable de la promoción de crecimiento de la planta sobre la fijación de nitrógeno, relacionada con la actividad de las bacterias diazotróficas (Malhotra y Srivastava, 2008).

El-Shanshoury (2006), sugiere que el AIA actúa como un regulador endógeno de la germinación de esporas de *Streptomyces atrovirens* y puede estar involucrado en la diferenciación de la actinobacteria (Manulis et al., 1994).

La liberación continua de pequeñas cantidades del ácido indolacético bacteriano, provee a la planta de los niveles necesarios de la hormona (Glick, 2012). Durante el proceso, la planta

también provee a la bacteria con nutrientes mediante la excreción de exudados (Ahmed y Hasnain, 2010).

El género *Streptomyces*, *Frankia* sp., *Nocardia* sp., *Kitasatospora* sp., han sido ampliamente estudiados como productores de AIA (Franco y Chavarro, 2016).

3.1.2 Producción de sideróforos.

Los sideróforos son compuestos que son producidos por varios microorganismos del suelo, basándose en el fenómeno de la quelación para apoyar su actividad biológica. Los sideróforos son pigmentos extracelulares fluorescentes, que poseen afinidad por el hierro (III), son solubles en agua y tienen un peso molecular bajo, de 500-1000 Da (Neilands, 1995). Estos compuestos actúan como un agente quelante específico del ion férrico, dejándolo disponible en su forma iónica (Fe^{2+}), la cual es fácilmente absorbida por microorganismos (Haselwandter, 1998).

La quelación se refiere a la formación de quelatos que pueden ser descritos como ligandos polidentados en coordinación con un ion central mediante dos o más átomos (Kaszubiazk, 1998). Cuando los sideróforos forman un complejo con el Fe^{3+} , este es reconocido por los receptores de membrana de la célula y una vez en la célula, el ion Fe^{3+} es reducido a Fe^{2+} haciéndose disponible para poder utilizarse en procesos biológicos diferentes y, por último, el sideróforo es liberado otra vez (Braun et al., 1998). Los sideróforos están clasificados en tres grupos basados en la naturaleza química de sus límites creados con metales. Se conocen como catecolatos, hidroximatos e hidróxido-carboxilatos (Inomata et al., 2007).

Las actinobacterias y enterobacterias, son los microorganismos que son capaces de producir sideróforos, siendo las actinobacterias uno de los grupos más importantes en términos de producción (Franco y Chavarro, 2016).

3.1.3 Solubilización de fosfatos.

Los microorganismos de la rizósfera pueden contribuir al fitness de la planta mediante el incremento de la eficacia de la fijación biológica de nitrógeno o la solubilización de fosfatos (Gyanshwar et al., 2002).

El componente orgánico principal del ciclo del fósforo es la biomasa microbiana (Stewart y Sharpley, 1987). El fosfato orgánico es solubilizado por la enzima fosfatasa, la cual es excretada por algunos microorganismos (Kucey et al., 1989).

El crecimiento de bacterias que solubilizan fosfato algunas veces causan acidificación, la cual juega un papel clave en la solubilización de fósforo, por lo que estos microorganismos son considerados como solubilizadores importantes de fosfato inorgánico insoluble (Abd-Alla, 1994).

Los principales ácidos orgánicos producidos por actinobacterias son el ácido cítrico, ácido málico y ácido oxálico (Jog et al., 2014).

Hamdali et al. (2008), reportó la solubilización de fosfato de roca por *Streptomyces youssoufiensis*. Por otro lado, Oteino y colaboradoras (2015) reportaron como solubilizadores de fosforo inorganico a bacterias del genero *Arthrobacter* sp. y *Microbacterium* sp.

3.1.4 Producción de quitinasas, lipasas, celulasas y proteasas.

La pared celular de la mayoría de los hongos patógenos consiste en polímeros como quitina, celulosa, glucanos, proteínas y lípidos (García, 1968). Las actinobacterias son capaces de excretar enzimas líticas como un mecanismo de biocontrol contra patógenos (Jacob y Sudini, 2016).

La quitina es homopolímero comprendido por residuos de N-acetil-D-Glucosamina con enlaces α -1, 4 y esta ampliamente distribuida en la naturaleza como un componente estructural de los hongos en un 22-44%, insectos y crustáceos en un 25-58%, y protozoarios y es hidrolizada por una quitinasa compleja que está compuesta por tres enzimas: exoquitinasa, endoquitinasa y N-acetil-D-glucosamina (Hoster et al., 2005).

Las actinobacterias son consideradas como los organismos dominantes involucrados en la descomposición de la quitina en el suelo y también son agentes antagonistas prometedores para el biocontrol debido a la reacción de hidrólisis sobre el micelio de hongos (Gomes et al., 2001).

Se ha reportado que *S. cavourensis* SY224 produce quitinasa y glucanasa contra *Colleotrichum gloeosporides* (Lee et al., 2012) y algunas *Streptomyces spp.* suprimen el crecimiento de varios hongos fitopatógenos (Valois et al., 1996).

Las lipasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces éster presentes en los acilgliceroles in vivo, además, pueden catalizar la hidrólisis o síntesis de un grupo amplio de ésteres carboxílicos (Bornscheuer et al., 1994).

Gopalakrishnana et al. (2014) evaluó cinco cepas de *Streptomyces* para la promoción de crecimiento de sorgo y arroz; estas cepas demostraron tener múltiples mecanismos de acción incluyendo antibiosis, producción de AIA, así como enzimas líticas (lipasas, β -1-3-glucanasa y quitinasa), así como una alta tolerancia a NaCl, con más del 6%, a un amplio rango de pH (5 y 13), y temperaturas.

Las celulasas son enzimas que hidrolizan enlaces β -1,4 en cadenas celulolíticas; son producidas por hongos, protozoarios, plantas y animales. Contienen módulos catalíticos, los cuales han sido clasificados en numerosas familias basándose en su secuencia aminoacídica y estructuras de cristales (Henrissat, 1991) Las celulasas contienen módulos de unión a carbohidratos no catalíticos y/o otros módulos funcionalmente conocidos o desconocidos, que pueden estar ubicados en el extremo N o C de un módulo catalítico. En la naturaleza, la hidrólisis completa de celulosa está mediada por una combinación de tres tipos principales de celulasas: (1) endoglucanasas, exoglucanasas, que incluyen celobiohidrolasas (CBH) y β -glucosidasa (BG). Para hidrolizar y metabolizar la celulosa insoluble, los microorganismos deben secretar celulasas que están libres o están unidas a la superficie celular (Zhang y Percival, 2013).

Se conoce que los actinomicetos secretan una amplia colección de enzimas hidrolíticas en condiciones naturales como miembros dominantes de una comunidad saprófita, ya que son descomponedores primarios de materia orgánica muerta, especialmente de desechos lignocelulolíticos. Tienen una notable capacidad para producir xilanasas, celulasas, lignina peroxidasa y quitinasas, convirtiéndola así en una forma más simple para descomponedores secundarios (Jog et al., 2016).

Ninawe et al. (2006) reportaron a actinomicetos del género *Streptomyces* como productores de celulasas.

Las proteasas son enzimas que rompen enlaces peptídicos de proteínas, y se encuentran divididas en proteasas ácidas, neutras y alcalinas. Estas enzimas pueden ser obtenidas de una gran variedad de organismos como animales, plantas y microorganismos (Flores-Gallegos *et al.*, 2019). Algunas de estas proteasas tienen uso potencial en la industria de detergentes, farmacéutica, biorremediación y alimenticia (Mohammadipanah *et al.*, 2015). En el suelo, estas enzimas juegan un papel crucial en la mineralización del nitrógeno, haciéndolo disponible para la planta (Ali *et al.*, 2019).

Mansour y colaboradores (2015) encontraron a dos especies de *Nocardiopsis* sp. y una de *Kitasatosporia* sp. capaces de producir lipasas con una actividad débil a moderada.

4. Actinobacterias de Cuatro Ciénegas, Coahuila.

Cuatro Ciénegas es un valle pequeño de alrededor de 840 km², en el cual se pueden encontrar una diversidad ecológica altamente endémica. Su clima es muy seco, semiárido, con pocas lluvias en verano y ocasionalmente algunas en invierno. Se caracteriza por tener una gran variedad de ambientes acuáticos, entre los cuales destacan humedales tipo pantanos, aunque también se encuentran sistemas de corrientes subterráneas, manantiales, canales, ríos, lagos y estanques temporales. Las aguas en general son duras, debido a que contienen una gran cantidad de calcio y magnesio con sodio, potasio, sulfatos, carbonatos y cloruros, y esta dureza se incrementa a partir de los manantiales hasta los ríos y las lagunas de desecación en donde la salinidad es el límite de saturación. El pH cambia de forma paralela, en cual puede encontrarse desde uno neutro (7.0-7.2) en manantiales, hasta básico (8.0-9.7) en lagos termales en fase de desecación. (Souza et al., 2004).

Se ha investigado ampliamente la diversidad de actinobacterias, no solo debido a su importancia ecológica, sino también a que poseen potencial biotecnológico, debido a que producen una amplia variedad de metabolitos y moléculas bioactivas de interés para su aplicación en industrias, medicina y agricultura. Se han realizado esfuerzos por describir la diversidad de actinomicetos cultivables provenientes de diferentes condiciones y ecosistemas, principalmente de ambientes extremos, con el fin de reportar microorganismos

con la capacidad de generar algún compuesto que pueda ser utilizado de forma eficiente y mejorada en los ámbitos anteriormente mencionados.

Se desconoce la capacidad promotora de crecimiento en plantas de las actinobacterias previamente aisladas del Valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila, y debido a que este lugar posee un ambiente único y altamente diverso, se espera encontrar que estas bacterias posean la capacidad de producir moléculas bio-activas y de interés agrícola, con potencial de poder utilizarse para mejorar el crecimiento de plantas y rendimiento de cultivos, principalmente en suelos salinos y alcalinos.

5. *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio

Arabidopsis thaliana, es una planta pequeña con flores blancas, comúnmente consideradas como maleza donde se encuentra en Europa, Asia y África. Esta planta tiene un crecimiento rápido, produce semillas prolíficamente en un periodo corto de tiempo, tiene un genoma pequeño de aproximadamente 114.5 Mb, además se encuentra genéticamente caracterizado debido a que se trabaja de forma habitual con esta planta. *A. thaliana* se utiliza ampliamente en diversos campos científicos, como genética y evolución, ha ayudado a comprender mejor la germinación y los aspectos de crecimiento de plantas, importantes en cultivos comerciales (Mullan & Marsh, 2019).

JUSTIFICACIÓN

Los altos costos de producción de fertilizantes sintéticos y los efectos de contaminación al medio ambiente, hacen necesarias estrategias sustentables para la producción de cultivos mediante el uso de PGPBs.

Las actinobacterias de Cuatro Ciénegas, Coahuila, son microorganismos adaptados a suelos salinos, pobres en fósforo y altos niveles de pH, similares a los suelos del noreste de México, que pueden mejorar la nutrición mineral de las plantas.

HIPOTESIS

Las actinobacterias aisladas de Cuatro Ciénegas, Coahuila producen compuestos bioactivos que favorecen el crecimiento *in vitro* de plantas de *Arabidopsis thaliana*.

OBJETIVO DEL TRABAJO

1.1 Objetivo general

Evaluar la promoción de crecimiento en *Arabidopsis thaliana in vitro* por Actinobacterias aisladas de Cuatro Ciénegas, Coahuila.

1.2 Objetivos particulares

- Evaluar la producción de auxinas, solubilización de fosfatos, producción de sideróforos y fijación de nitrógeno en actinobacterias de Cuatro Ciénegas, Coahuila.
- Determinar el efecto de metabolitos bacterianos sobre la promoción de crecimiento *in vitro* en plántulas de *Arabidopsis thaliana*.
- Evaluar la producción de lipasas, celulasas, quitinasas y proteasas por actinobacterias de Cuatro Cienegas, Coahuila

MATERIAL Y METODOS

2.1. Aislados.

Se reactivaron 43 aislados provenientes de la colección de actinobacterias del Laboratorio L9 del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Los aislados se encontraban resguardados a -20°C y conservados en glicerol al 50%.

2.1.1 Reactivación de aislados

Para la reactivación de los aislados en cajas de Petri, se utilizó medio ISP2 modificado, el cual está compuesto de extracto de levadura (5 g/L), extracto de malta (10 g/L), dextrosa (4 g/L), sal de arrecife (25 g/L), y agar bacteriológico (20 g/L). Las cajas se incubaron a 28°C por 5 días.

2.2 Evaluación de solubilización de fosfatos.

El agar Pikovskaya consiste de extracto de levadura (0.500 g/L), dextrosa (10 g/L), fosfato de calcio (5 g/L) (LKG5121, WAKO), sulfato de amonio (0.500 g/L), cloruro de potasio (0.200 g/L), sulfato de magnesio (0.100 g/L), sulfato de manganeso (0.0001 g/L), sulfato de hierro (0.0001 g/L) y agar bacteriológico (15 g/L).

La evaluación de los aislados para determinar la solubilización de fosfatos en agar Pikovskaya, consistió en un screening inicial de todos los aislados en el medio de cultivo. Se inocularon inicialmente por punción para determinar cuáles eran capaces de formar halos de solubilización del fósforo.

Los aislados positivos se sembraron en placas de Petri con medio ISP2 para obtener sacabocados. Para lo anterior, se tomó una asada del cultivo original y se sembró por estría simple, procurando que las estrías estuvieran juntas con el fin de saturar la placa con el microorganismo. Los sacabocados se obtuvieron utilizando puntillas amarillas de 200 μl estériles, se tomaron con mondadientes, también esterilizados, se colocaron en las cajas de Petri con agar Pikovskaya, y fueron incubadas a 28°C por 10 días.

Por último, los diámetros de la colonia y de los halos de solubilización (sacabocado y crecimiento alrededor de este), se determinaron midiendo con una regla en ángulos de 0° ,

90° y 45° cada colonia y sus halos. Se calculó el promedio de estas mediciones y se restó el resultado obtenido del diámetro de la colonia del halo de solubilización. Los experimentos se realizaron por triplicado.

2.3 Evaluación de producción de sideróforos

El método utilizado para determinar si los aislados producían sideróforos fue mediante el ensayo O-CAS, preparado de acuerdo con Pérez-Miranda y colaboradores (2007). Para lo anterior, las actinobacterias fueron inoculadas en placas de Petri con medio ISP2 por punción, por triplicado, y se incubaron por 5 días a 28°C. Todo el material de vidrio utilizado para el ensayo O-CAS se lavó con HCl 3 M, para que estuvieran libres de hierro. Para un litro de O-CAS se utilizan 60.5 mg de Cromo azurol S (CAS, BCBM1324V, ALDRICH), 72.9 mg de bromuro de hexadacimetil amonio (HDTMA, M2C02550, Bio Basic INC.), 30.24 g de Piperizina-1,4-bis(acido 2-etanosulfónico) (PIPES, IC055072ZB, Bio Basic INC.), y 10 ml de FeCl₃ 6H₂O 1mM en HCl 10 mM, ajustando el pH a 7 con una solución de hidróxido de sodio concentrado. Se utilizó agrosa (0.9% p/v) como agente gelificante, y se esterilizaron en autoclave por 15 min a 120°C 15 lb

La detección de sideróforos se logró añadiendo una capa 10 mL a la caja de Petri de 80mm, las cuales contenían el medio previamente inoculado con los aislados. Después de 24 horas de incubación, se observó el cambio de color en la capa de O-CAS alrededor de los aislados. El cambio de color de azul a naranja, indica la producción hidroxamatos, de azul a morado de catecoles, y de azul a amarillo la producción de carboxilatos.

Por último, los diámetros de la colonia y de los halos formados alrededor de la colonia se determinaron midiendo con una regla en ángulos de 0°, 90° y 45°. Se calculó el promedio de estas mediciones y se restó el resultado obtenido del diámetro de la colonia del halo formado alrededor de esta. Los experimentos se realizaron por triplicado.

2.4 Evaluación de fijación de nitrógeno

La capacidad de fijación de nitrógeno de los aislados se llevó acabo en medio NFB (Nitrogen Free Bromotimol). Para un litro de este medio se utilizan 5 g de ácido málico, 0.5 g de K₂HPO₄. 0.2 g de MgSO₄ 7H₂O, 0.1 g NaCl, 0.2 g CaCl₂, 2 ml de solución de azul de

bromotimol 0.5% en 0.2 N de KOH, 2 ml de solución de vitaminas, 1 ml de solución de micronutrientes, 4 ml de solución de Fe EDTA, 4.5 g de KOH, 15 g de sacarosa, 15 g de agar, se ajustó pH a 6.5, y se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 120°C 15 lb.

Para la solución de vitaminas se disolvieron 10 mg de biotina y 20 mg de piridoxol-HCl en 100 ml de agua bidestilada en baño maría a 100°C y se esterilizó por filtración (20 µm).

Un litro de solución de micronutrientes contiene 40 mg CuSO₄ 5H₂O, 0.12 g ZnSO₄ 7H₂O, 1.4 g H₃BO₃, 1 g Na₂MO₄ 2H₂O, 1.175 g MNSO₄ H₂O. 0.6 g K₂HPO₄, 1.8 g KH₂PO₄, se ajustó pH a 5.8, y se esterilizó por filtración (20 µm).

Los aislados fueron inoculados por punción en el medio, y los que fueron capaces de crecer en NFB se tomaron como positivos para fijadores de nitrógeno.

Por último, el diámetro de la colonia se determinó midiendo a ángulos de 0°, 90° y 45°, se calculó el promedio de estas mediciones.

2.5 Producción de auxinas

Primeramente, el escrutinio de aislados se realizó por un método colorimétrico utilizando el reactivo de Salkowski. Para la preparación de este reactivo se utilizaron 0.45 g de FeCl₃, 74.4 ml de agua destilada y 25.6 ml de ácido perclórico.

Los aislados se inocularon en matraces de 50 ml, los cuales contenían 15 ml de ISP2 con 1 mg/ml de triptófano. Se incubaron en agitación por 5 días a 28°C a 200 rpm. De cada matraz se tomó 1 ml de muestra, se centrifugó a 14,000 rpm, a 0°C durante 10 minutos, y se recolectó el sobrenadante. Los ensayos para la determinación de auxinas se llevaron a cabo en microplaca, en los cuales se añadieron 66 µl del sobrenadante y 134 µl del reactivo de Salkowski, manteniendo una proporción 2:1 (Anwar, 2016). La microplaca se incubó en oscuridad durante 30 minutos.

La producción de auxinas se determinó mediante la solución R2, metodología propuesta por Glickmann y Dessaux (1994). La solución R2 consiste en 4.5 g de FeCl₃ por litro de H₂SO₄ 10.8 M. La microplaca se incubó en oscuridad por 30 minutos, se midió la absorbancia a 550 nm, y se determinó la concentración con la ecuación de la recta obtenida de la curva de

calibración previamente realizada con diferentes estándares de ácido indolacético (143358, SIGMA-ALDRICH).

2.6 Evaluación de promoción de crecimiento de plantas.

Para este propósito se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana*. Para la formulación del medio de cultivo de las plantas, se utilizó sobrenadante de un cultivo previo de los aislados elegidos para esta prueba en ISP2 líquido, el cual se esterilizó mediante filtración con filtro de 0.22 μm , con el fin de conservar el medio libre de microorganismos, dejándolo solo con los metabolitos producidos. Las concentraciones utilizadas de cada sobrenadante fueron 0.5, 0.05 y 0.01 μM . Cada una de las concentraciones fueron ajustadas de acuerdo con la cantidad de compuestos indólicos determinada para cada aislado y utilizando como referencia el peso molecular del ácido indolacético. El sobrenadante se mezcló con medio de 0.5X Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962) suplementada con 15 g sacarosa por litro. Las semillas de *Arabidopsis thaliana* se desinfectaron colocándolas en etanol al 70% por 3 minutos, seguido de un lavado con cloro al 20% por 1 min, y de tres lavados sucesivos con agua destilada estéril por 1 minuto cada lavado. Posteriormente se sembraron en el medio 0.5X MS adicionado con el filtrado, se mantuvieron selladas e incubadas en una cámara climática a 21°C/21°C temperatura día noche, 180 μmol de luz $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a nivel de planta 16h/d y 70% de humedad relativa (Cordovez et al., 2015). Como controles negativo y positivo se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* sembradas en medio 0.5X MS sin el filtrado, adicionado con ISP2 y otras plantas sembradas en medio 0.5X MS pero utilizando ácido indolacético puro.

Se evaluó el crecimiento (longitud de raíz, peso fresco y peso seco promedio por planta) contrastando el crecimiento del control negativo y positivo con las plantas tratadas.

2.7. Pruebas enzimáticas

Los aislados utilizados para promoción de crecimiento fueron los evaluados en las pruebas enzimáticas de producción de celulasas, quitinasas, lipasas y proteasas.

2.7.1. Producción de celulasas.

La producción de celulasas se determinó mediante la aparición de halos de hidrólisis en agar Carboximetilcelulosa (CMC). Para un litro de medio CMC: 1 g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.2 g de KCl,

1 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g de extracto de levadura, 10 g de CMC y 15 g de agar bacteriológico. Las placas se incubaron con sacabocados de cada uno de los aislados por triplicado a $28^\circ C$ por 5 días. A cada una de las placas se les añadió una solución de rojo Congo al 0.1% y se lavaron con una solución de NaCl 1 M, lo anterior para detectar la presencia de halos de hidrólisis alrededor de la colonia. Por último, los diámetros de la colonia y de los halos de hidrólisis (sacabocado y crecimiento alrededor de este), se determinaron midiendo con una regla en ángulos de 0° , 90° y 45° cada colonia y sus halos. Se calculó el promedio de estas mediciones y se restó el resultado obtenido del diámetro de la colonia del halo de hidrólisis. Los experimentos se realizaron por triplicado.

2.7.2. Producción de quitinasas.

Para evaluar la producción de quitinasas, primeramente se obtuvo quitina coloidal: Se pesaron 10 g de quitina (MFCD00466914, ALDRICH), y en un matraz de medio litro se le añadieron 100 ml de ácido fosfórico, y se agitó en plancha magnética durante toda la noche a temperatura ambiente. Se recuperó la quitina del matraz extrayendo el sobrenadante del matraz y colocándola en un frasco limpio al cual se le añadieron 100 ml de etanol frío y se centrifugó a 4,000 rpm durante 15 minutos. Se le realizaron lavados con agua destilada a la quitina coloidal, hasta que se alcanzó un pH de 7. Posteriormente la quitina coloidal se esterilizó a 15 lbs de presión, a una temperatura de $121^\circ C$ durante 15 minutos.

Para un litro de medio de quitinasas de una solución stock de Medio Mínimo 9 (MM9) 5X, se ajustó el volumen necesario para tener una concentración final de 1X en un litro, al cual, en lugar de dextrosa, se le añadió como fuente de carbono 10 g de quitina coloidal y 15 g de agar bacteriológico. Cada una de las placas fueron inoculadas por punción, por triplicado. Las placas se incubaron durante 5 días a $28^\circ C$. La actividad de quitinasas fue detectada por la presencia de halos de hidrólisis alrededor de la colonia.

2.7.3. Producción de lipasas.

La producción de lipasas se llevó a cabo en agar rodamina B. Como medio base, se utilizó agar ISP2. Por cada litro de medio preparado, se le añadió 3% de aceite de oliva, rodamina B al 0.02% p/v, esterilizada por filtración y 250 μl de tween 20. La solución se mantiene en calentamiento a $100^\circ C$ y agitación constante durante 15 minutos. Las placas fueron

inoculadas por estría y se incubaron durante 72 horas a 28°C. Posteriormente, las placas fueron observadas bajo luz UV a 350 nm, teniendo como resultado positivo las colonias fluorescentes bajo esta longitud de onda.

2.6.4. Producción de proteasas.

La producción de proteasas se determinó utilizando como base medio ISP2, al cual se le añadió una solución de leche descremada en polvo al 2% p/v (Svelty figura 0%, Nestlé, Vevey, Suiza). Después de 48° horas de incubación a 28°C la actividad de proteasas fue detectada por la presencia de halos de hidrólisis alrededor de las colonias.

2.8 Análisis estadísticos.

Se realizó un análisis estadístico de tipo ANOVA con el fin de identificar si hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos. Se aplicó prueba PostHoc (Tukey) para determinar cuáles aislados mostraban mayor diferencia estadística.

Todas las herramientas estadísticas se harán con un intervalo de confianza mínimo del 95% y se utilizará el software Minitab. Las gráficas se realizaron con el software GraphPad.

RESULTADOS

1. Actinobacterias de Cuatro Ciénegas solubilizadoras de fosfato.

Con el fin de determinar la capacidad de solubilización de fosfatos, los 43 aislados (ANEXO 1) se inocularon en agar Pikovskaya, pero únicamente 8 aislados formaron halos de solubilización, representando el 18% del total (Figura 1).

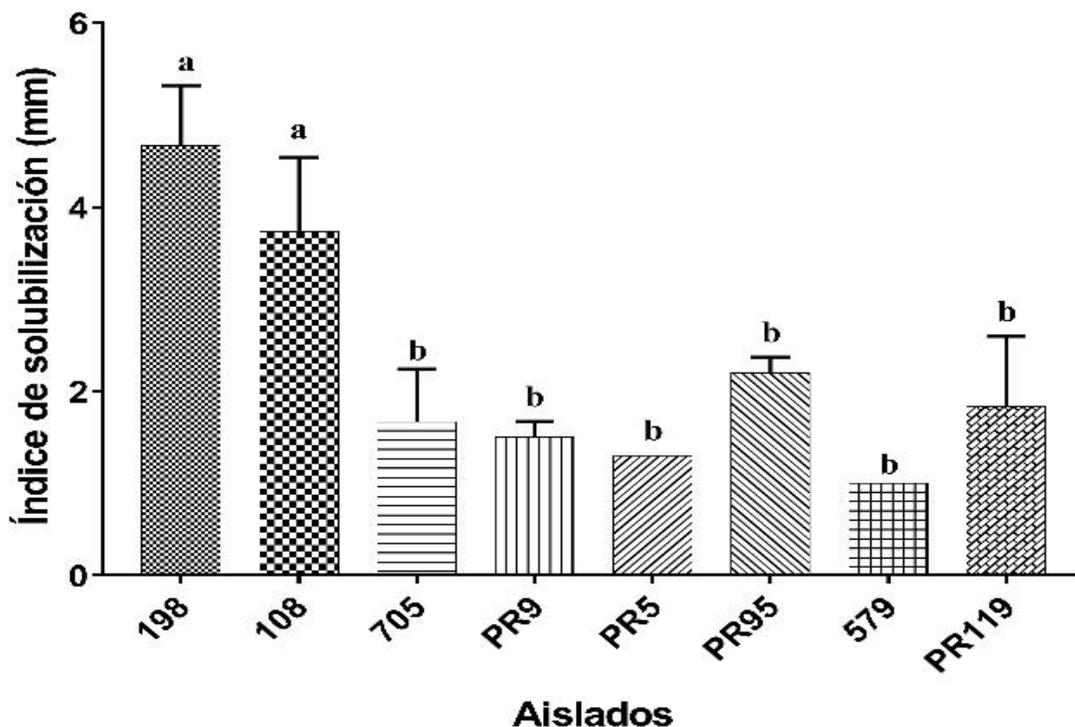


Figura 1. Índice de solubilización de fosfato (mm) de actinobacterias provenientes de Cuatro Ciénegas, Coahuila. Los datos mostrados son medias de tres repeticiones y las barras de error representan desviación estándar de la media. Se realizó un ANOVA con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$ y como prueba *post hoc* el método de Tukey; las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Al realizar el análisis estadístico con ANOVA y prueba *post hoc* de Tukey, los aislados con un mayor índice de solubilización fueron los aislados 198 y 108, presentando índice de solubilización con una media de 4.66 y 3.77 mm de diámetro respectivamente, sin embargo, no hay una diferencia significativa entre sus medias. El aislado 198 fue previamente identificado en el grupo de trabajo como *Kocuria* sp (GenBank: KT387335). El resto de los

aislados produjeron un halo en promedio menor a 2.5 mm de diámetro, y tampoco se encontró diferencia significativa entre los diámetros de halo producidos por el resto de los aislados.

2. Actinobacterias de Cuatro Ciénegas productoras de sideróforos.

La producción de sideróforos se determinó mediante el ensayo O-CAS. 10 aislados (23%) de un total de 43 produjeron sideróforos, identificados mediante la formación de halos de coloración naranja alrededor de la colonia (Figura 2). El aislado con mayor diámetro de halo fue PR117, con una media de 17.33 mm, seguido del aislado 180 y PR122, con una media de 14.33 mm y 13.33 mm, respectivamente (Figura 3). El aislado con un menor índice de solubilización fue PR84, con una media de 5.33 mm de diámetro de halo.

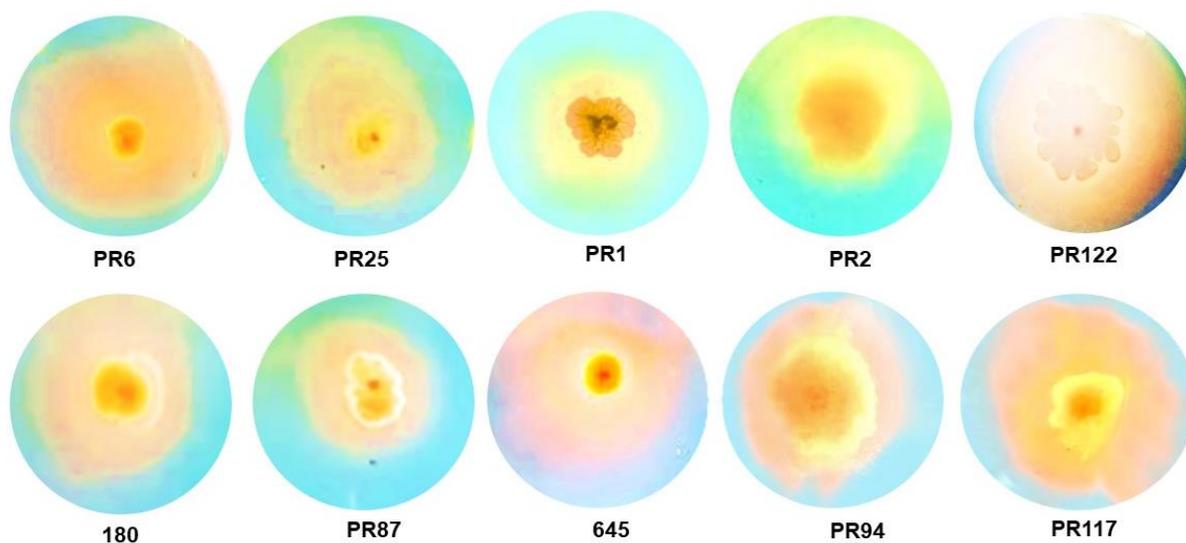


Figura 2. Imagen de halos formados en medio O-CAS (producción de sideróforos) por aislados de Cuatro Ciénegas, Coahuila, después de 5 días de incubación.

El análisis estadístico de ANOVA y prueba *post hoc* de Tukey, mostró que los aislados PR117 y PR87 son diferentes entre sí. El resto de los aislados no muestran una diferencia significativa entre ellos.

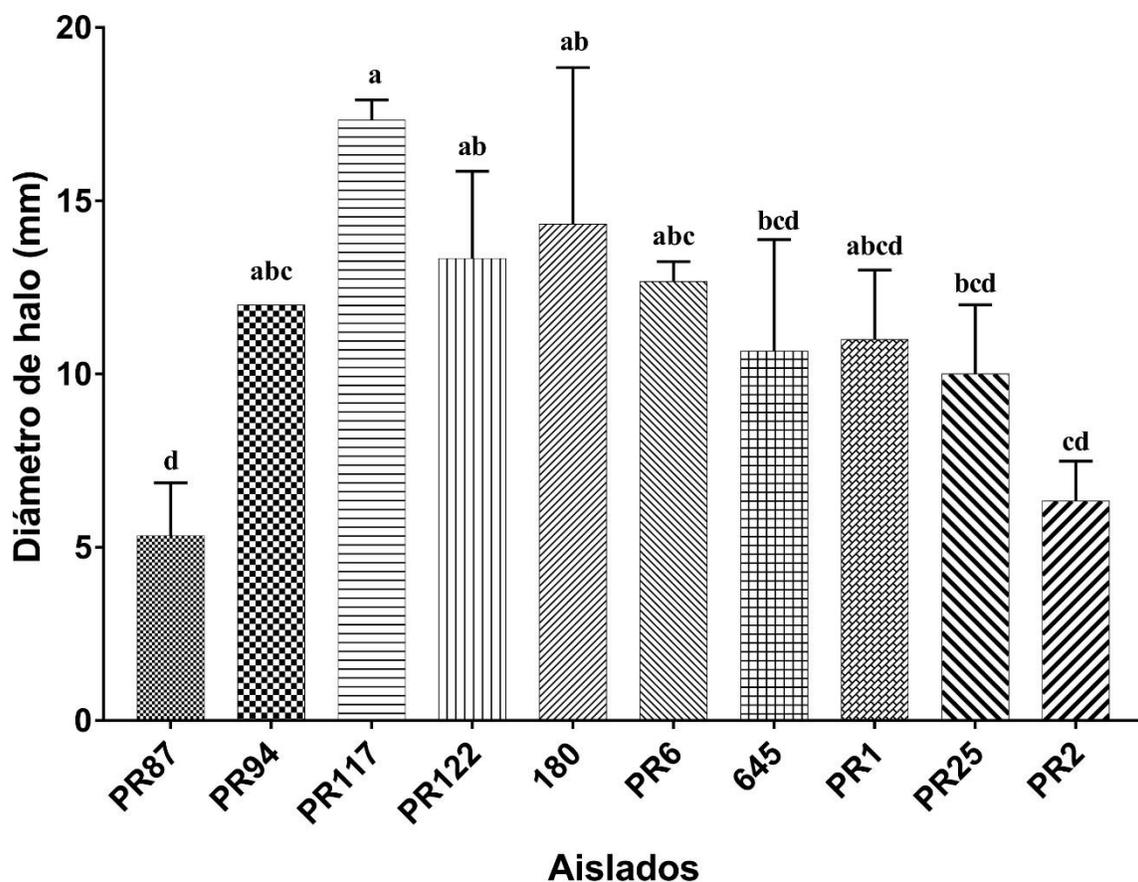


Figura 3. Producción de sideróforos (diámetro en mm) por colonias de actinobacterias de Cuatro Ciénegas, en el ensayo O-CAS. Se muestran las medias de diámetros de halo (mm) de tres repeticiones producidas después de 5 días de cultivo y la barra de error representa la desviación estándar de la muestra. Se realizó un ANOVA con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$ y como prueba *post hoc* el método de Tukey; las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

3. Fijación de nitrógeno asimbiótico por actinobacterias de Cuatro Ciénegas.

En el ensayo de fijación de nitrógeno se observó que 14 aislados (32%) de un total de 43 tuvieron la capacidad de crecer en medio libre de fuentes de nitrógeno NFB (Figura. 4).

El aislado con el mayor crecimiento colonial fue PR94, identificado previamente como *Streptomyces sp.* (GenBank: KY271788), con un diámetro en promedio de 26.55 mm, seguido de los aislados PR114 y PR87 con un diámetro de 18.22 mm y 17 mm

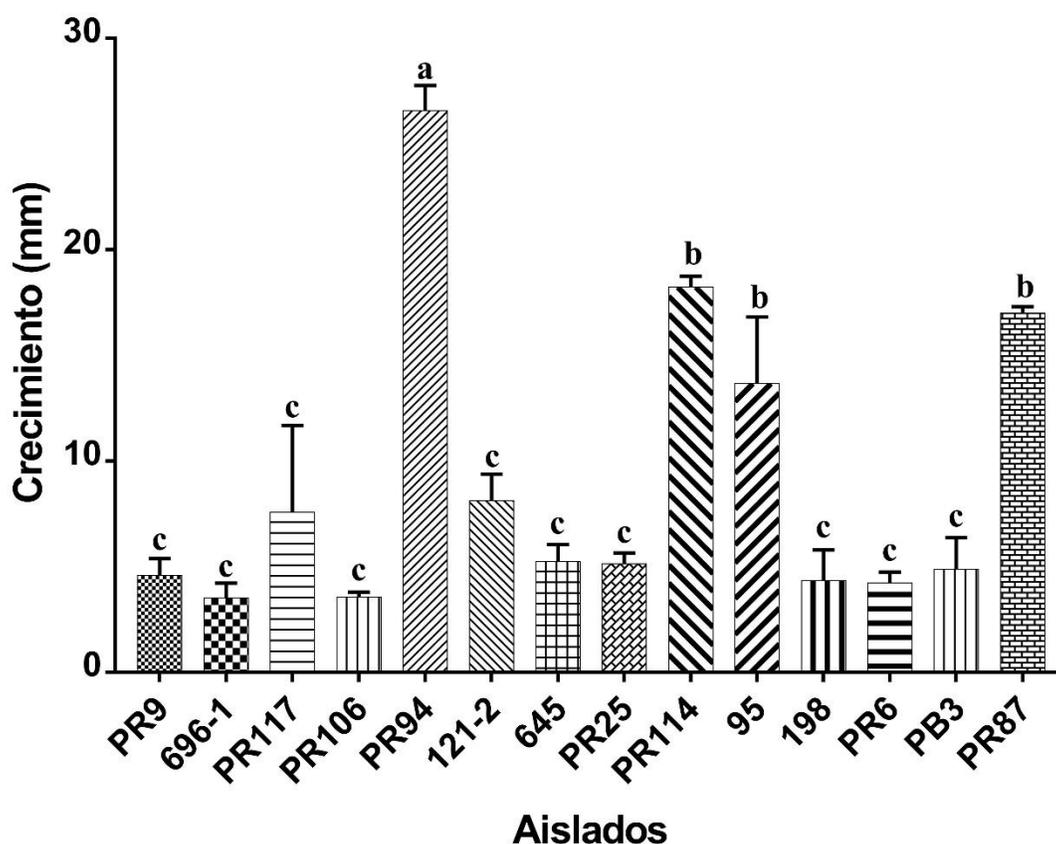


Figura 4. Crecimiento de los aislados en medio NFB después de 10 días. Se muestran las medias del tamaño de la colonia (mm) de tres repeticiones y la barra de error representa la desviación estándar de la muestra. Se realizó un ANOVA con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$ y como prueba post hoc el método de Tukey; las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

respectivamente. Los aislados que mostraron un crecimiento menor en el medio NFB fueron PR6, PB3 y 198, con un diámetro promedio de 4.22, 4.88 y 4.33 mm respectivamente. El análisis estadístico de ANOVA y prueba *post hoc* de Tukey mostró la formación de tres grupos, representado con las a, b y c. Solo el aislado PR94 se encuentra en el grupo a, dado

que es el que tiene el mayor crecimiento en el medio de cultivo NFB (26 mm aprox.). El grupo b, está formado por los aislados PR114, 95 y PR87; los cuales mostraron un crecimiento entre 15 – 18 mm de diámetro, y por último, el grupo c, compuesto por el resto de los aislados, y su crecimiento en el medio NFB se encuentra entre 5-8 mm de diámetro.

4. Actinobacterias de Cuatro Ciénegas productoras de ácido indolacético.

12 de 43 aislados (27%) fueron positivos para la producción de moléculas con grupo indol (Figura 5). El aislado con una mayor producción de compuestos indólicos fue el 696-1, con una concentración promedio de 707 $\mu\text{g/ml}$, seguido del PB3 y 108 con un promedio de 355.3 y 311 $\mu\text{g/ml}$ después de 5 días de cultivo, respectivamente. El aislado con una producción menor de estos compuestos fue PR1 con un promedio de 111.81 $\mu\text{g/ml}$.

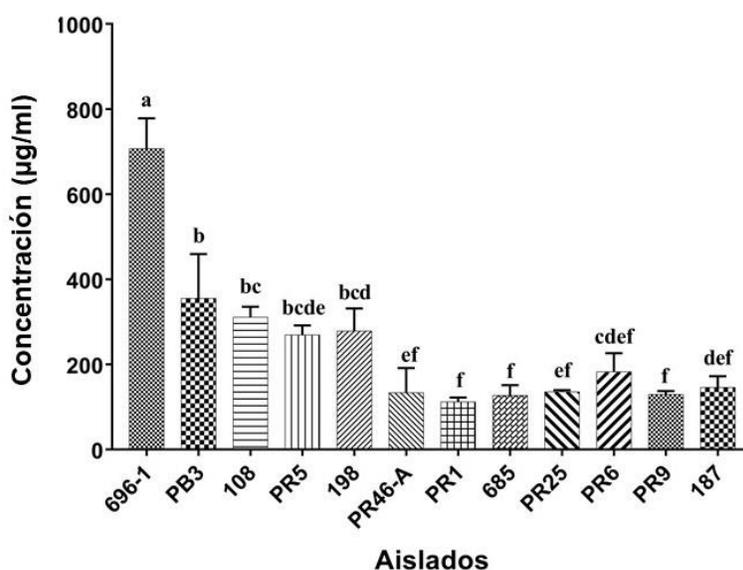


Figura 5. Concentración de ácido indolacético después de 5 días de cultivo. Se muestran las medias de la concentración (mcg/mL) de tres repeticiones (matraces) y las barras de error representan la desviación estándar de las muestras. Se realizó un ANOVA con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ y como prueba post hoc el método de Tukey; las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

El análisis estadístico de ANOVA y prueba *post hoc* de Tukey mostró que solamente tres grupos son significativamente diferentes a los demás, el grupo a conformado por el aislado

696-1, el grupo b perteneciente al aislado PB3, y el grupo f, en el cual están agrupados los aislados que produjeron una concentración de auxina de entre 100 a 150 $\mu\text{g/ml}$.

5. Resultados Globales

En la Tabla 1 y ANEXO 2 se muestran los aislados que resultaron como positivos para de cada uno de los ensayos, junto al porcentaje que representa la cantidad de aislados respecto al total (Tabla 1).

Tabla1. Lista de aislados positivos para cada uno de los ensayos para determinar candidatos para promoción de crecimiento en plantas y su representación en porcentaje.

Aislados totales

43

Ensayo	Aislados positivos	Porcentaje
Solubilización de fosfato	8	19%
Producción de sideróforos	10	23%
Fijación de nitrógeno	14	33%
Producción de AIA	12	28%

6. Cinéticas de producción de ácido indolacético.

Para este ensayo se eligieron los mejores aislados, es decir, el mejor aislado para cada prueba, por lo que se seleccionaron los aislados 198, 108 y 696-1.

El aislado 198 cumple con 3 de las 4 características probadas: solubiliza fosfato, fija nitrógeno y produce compuestos indólicos; el aislado 108 resultó ser el mejor solubilizador de fosfato y produce ácido indolacético, y por último, el aislado 696-1 fue el mejor productor de ácido indolacético, produce sideróforos y fija nitrógeno.

Para conocer la cinética de producción de AIA de cada aislado, se realizaron curvas de crecimiento monitoreadas por densidad óptica durante 48 horas, en las cuales se determinó también la acumulación del ácido indolacético respecto al tiempo. Para los aislados 108 y 696-1, la máxima acumulación de AIA fue durante la fase estacionaria (Figura 6 y 7), mientras que para el aislado 198 la acumulación se daba conforme al crecimiento del microorganismo (Figura 8)



Figura 6. Curva de crecimiento del aislado 108. En el eje y izquierdo se muestra la densidad óptica, y en el derecho la concentración de ácido indolacético acumulado al pasar el tiempo (eje x).

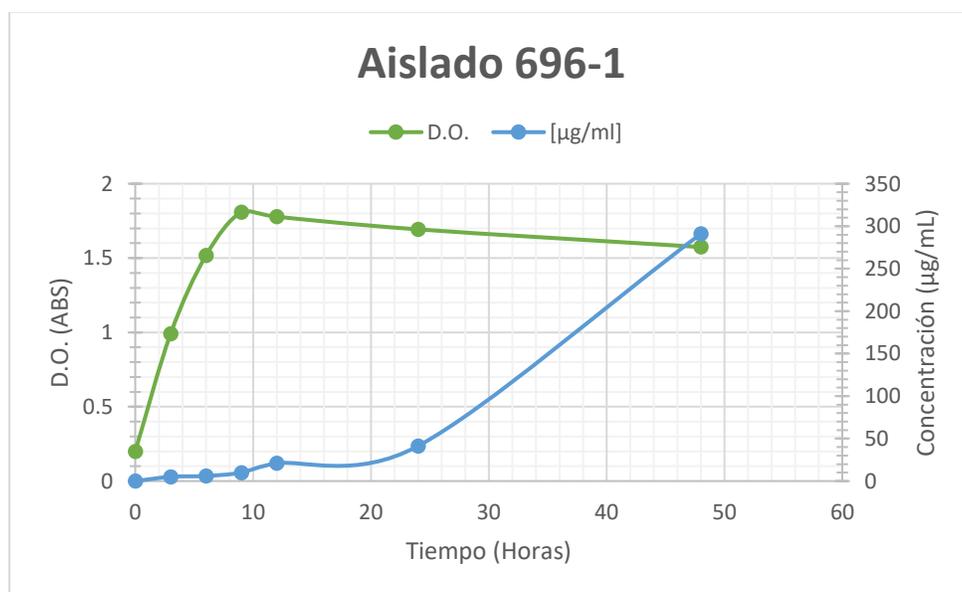


Figura 7. Curva de crecimiento del aislado 696-1. En el eje y izquierdo se muestra la densidad óptica, y en el derecho la concentración de ácido indolacético acumulado al pasar el tiempo (eje x).

Los resultados anteriores permitieron establecer el tiempo de cultivo de 48 h como el ideal para obtener la mayor concentración de AIA en los tres aislados de actinobacterias estudiadas.



Figura 8. Curva de crecimiento del aislado 198. En el eje y izquierdo se muestra la densidad óptica, y en el derecho la concentración de ácido indolacético acumulado al pasar el tiempo (eje x).

7. Promoción de crecimiento *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*

El primer aislado analizado para este propósito fue el 198, este aislado cumple con 3 de las 4 características probadas: solubiliza fosfato, fija nitrógeno y produce ácido indolacético a una concentración de 278.4 µg/ml. En base al peso molecular del ácido indolacético, se ajustó la cantidad necesaria de sobrenadante que se utilizará para someter a la planta a 3 tratamientos con concentraciones diferentes: 1µM, 10 µM y 100 µM, las cuales fueron suplementadas a los medios MS 0.5X, además se probó el medio donde se cultivaron estas bacterias, es decir, el ISP2 estéril con la misma cantidad utilizada para las concentraciones molares para comprobar que no estuviera interfiriendo en el experimento, así como la misma concentración de ácido indolacético sintético y el medio MS sin el sobrenadante.

Los resultados obtenidos demostraron que no hay una diferencia significativa entre el MS sin sobrenadante y el ISP2, a cualquiera de las concentraciones molares en cuanto al crecimiento en longitud de la raíz, así como tampoco hay una diferencia significativa entre el tratamiento (sobrenadante del aislado 198) y la auxina sintética (Figura 9 y 10).

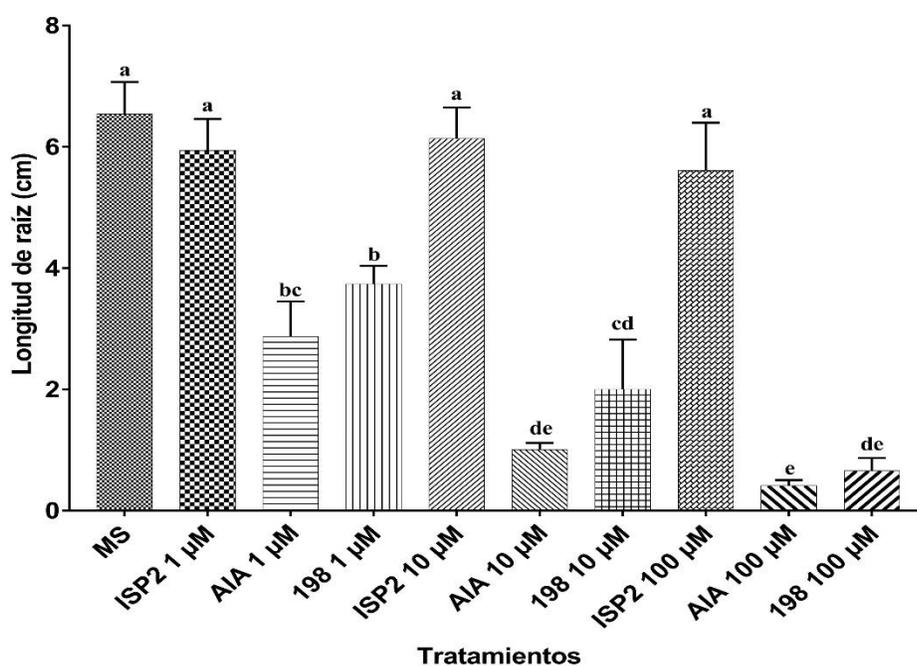


Figura 9. Longitud de raíces después de 10 de germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana*. Se muestran el control absoluto (MS), control negativo (ISP2), control positivo (AIA) y los sobrenadante de aislado 198, concentraciones de 1, 10 y 100 µM. Se muestran las medias de tres repeticiones y las barras de error representan la desviación estándar de las muestras. Se realizó un ANOVA con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ y como prueba post hoc el método de Tukey. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

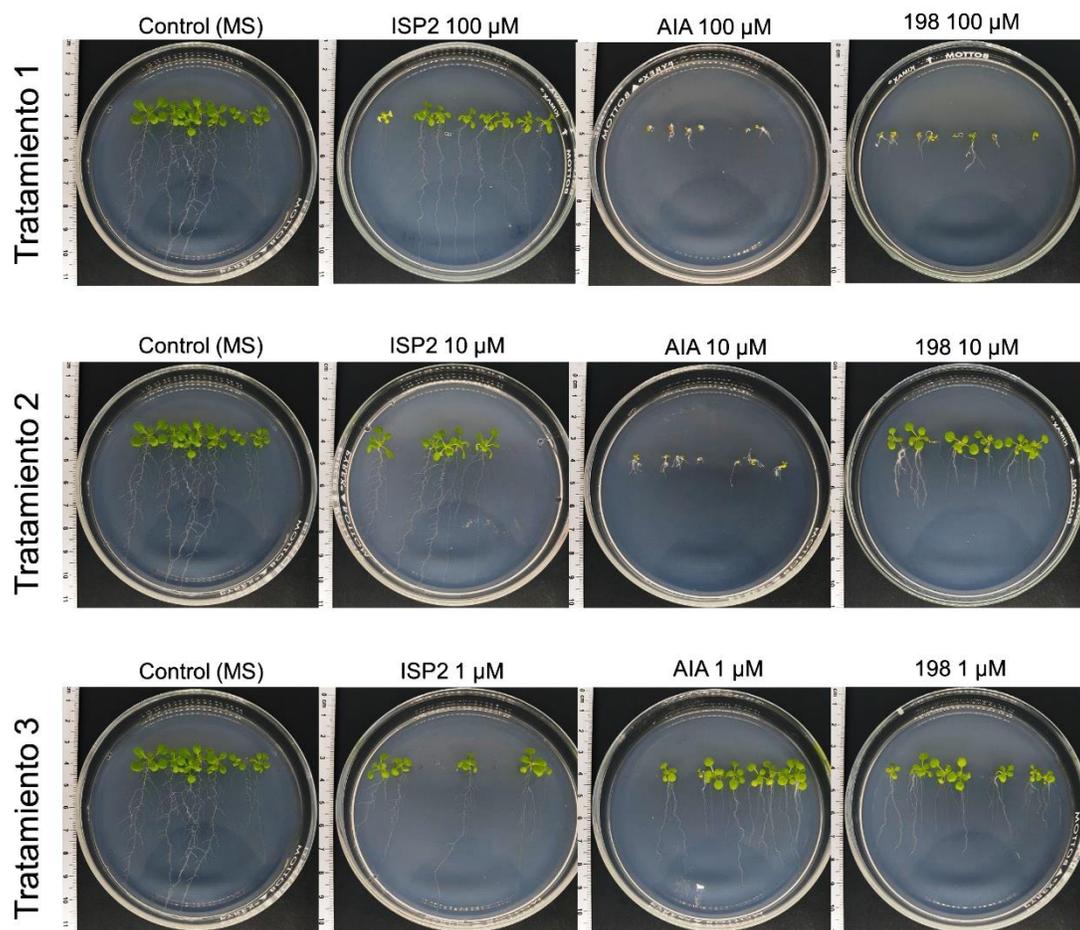


Figura 10. Imagen de plántulas de *Arabidopsis thaliana* después de 10 días de germinación. Se muestran el control absoluto (MS), control negativo (ISP2), control positivo (AIA) y los sobrenadantes de aislado 198, concentraciones de 1, 10 y 100 μM .

En comparación con el MS, se obtuvo que el sobrenadante de la aislado no promovió el crecimiento de la raíz, ya que la longitud de esta es menor comparada con el control. El tamaño longitudinal de la raíz del ácido indolacético comparado con el sobrenadante del aislado 198, como se mencionó antes, estas raíces tienen un tamaño similar, por lo que estas concentraciones de auxinas podrían no ser las ideales para observar y medir una promoción de crecimiento.

Debido a lo anterior mencionado, se determinaron otras concentraciones para evaluar el efecto promotor de crecimiento de los sobrenadantes de los aislados previamente seleccionados (198, 696-1 y 108) y se realizó un segundo ensayo.

Las concentraciones utilizadas fueron 0.5 μM , 0.05 μM y 0.01 μM . Semillas de *Arabidopsis thaliana* fueron germinadas en placas de petri con medio MS 0.5X suplementado con los sobrenadantes de cada aislado ajustados a las tres concentraciones de AIA. Como control negativo se utilizaron semillas de *Arabidopsis* germinadas en placas Petri con medio MS 0.5X suplementado con medio ISP2 estéril (la misma cantidad de medio que se utilizaría de los sobrenadantes). Como control positivo se utilizaron placas Petri con medio MS 0.5X adicionadas con 0.5 μM , 0.05 μM y 0.01 μM de AIA puro (Reactivo Sigma agregar número de catálogo). Como control absoluto se utilizaron placas únicamente con medio MS 0.5X.

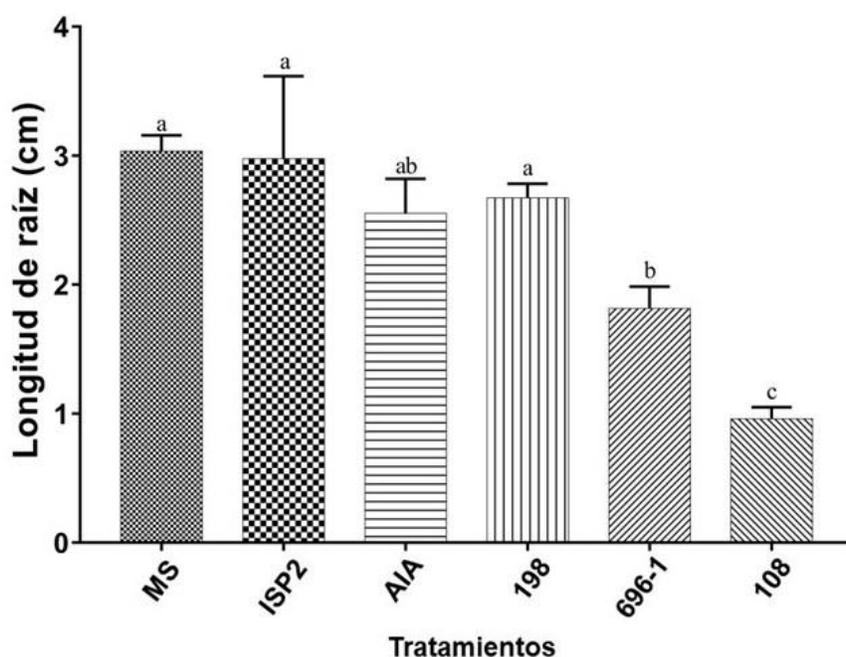


Figura 11. Longitud de raíces de plántulas de *Arabidopsis thaliana* (cm) tratadas con sobrenadantes de actinobacterias). Se muestran el control absoluto (MS), control negativo (ISP2), control positivo (AIA) y los tratamientos a una concentración de 0.5 μM . Se muestran las medias de tres repeticiones y las barras de error representan la desviación estándar de las muestras. Se realizó un ANOVA con un nivel de significancia de $\alpha= 0.05$ y como prueba post hoc el método de Tukey. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Los resultados muestran que no hay diferencia significativa entre la longitud de la raíz de las plántulas cultivadas en las placas con medio MS e ISP2 (Figura 11-19).

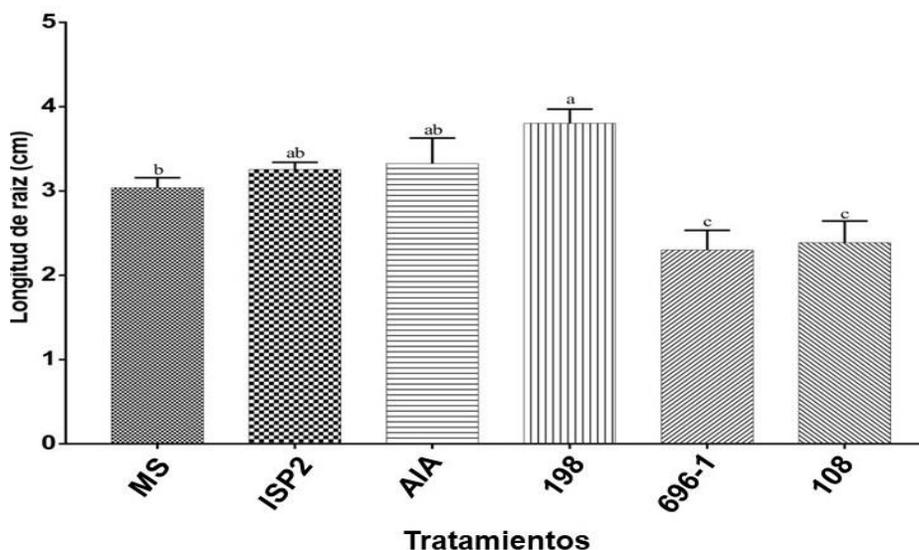


Figura 12. Longitud de raíces de plántulas de *Arabidopsis thaliana* (cm) tratadas con sobrenadantes de actinobacterias). Se muestran el control absoluto (MS), control negativo (ISP2), control positivo (AIA) y los tratamientos a una concentración de 0.05 μ M. Se muestran las medias de tres repeticiones y las barras de error representan la desviación estándar de las muestras. Se realizó un ANOVA con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ y como prueba post hoc el método de Tukey. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

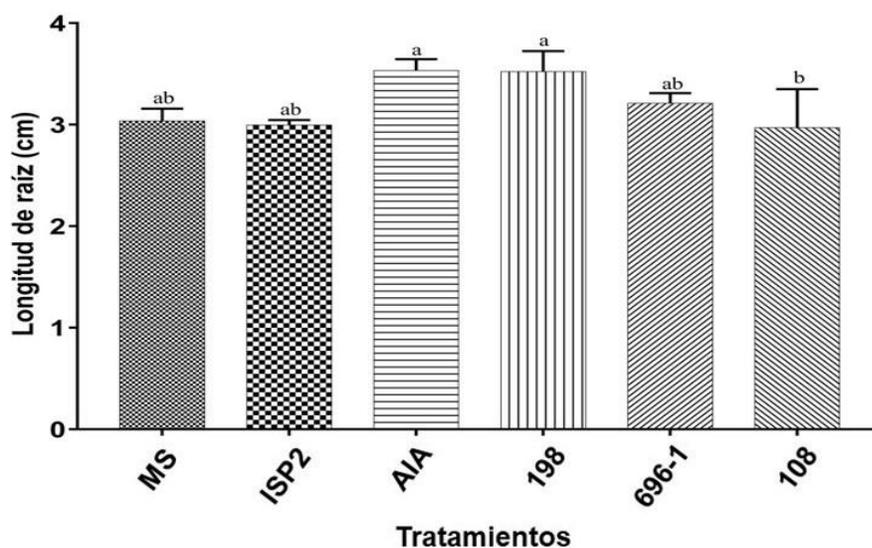


Figura 13. Longitud de raíces de plántulas de *Arabidopsis thaliana* (cm) tratadas con sobrenadantes de actinobacterias). Se muestran el control absoluto (MS), control negativo (ISP2), control positivo (AIA) y los tratamientos a una concentración de 0.01 μ M. Se muestran las medias de tres repeticiones y las barras de error representan la desviación estándar de las muestras. Se realizó un ANOVA con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ y como prueba post hoc el método de Tukey. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Sin embargo, si se observan diferencias entre las longitudes de las raíces entre las diferentes concentraciones de ácido indolacético, demostrando que a menor concentración de AIA, mayor longitud de raíces.

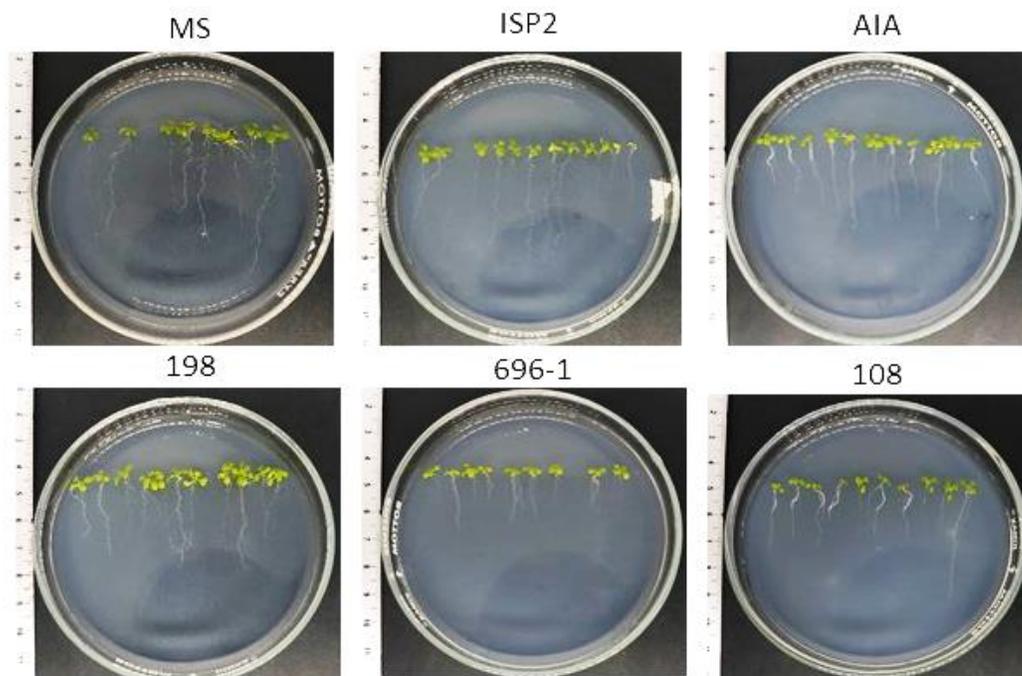


Figura 14. Imagen de plántulas de *Arabidopsis thaliana* después de 10 días de germinación, a una concentración 0.5 μ M. Se muestran el control absoluto (MS), control negativo (ISP2), control positivo (AIA) y los sobrenadantes de aislado 198, 696-1 y 108.

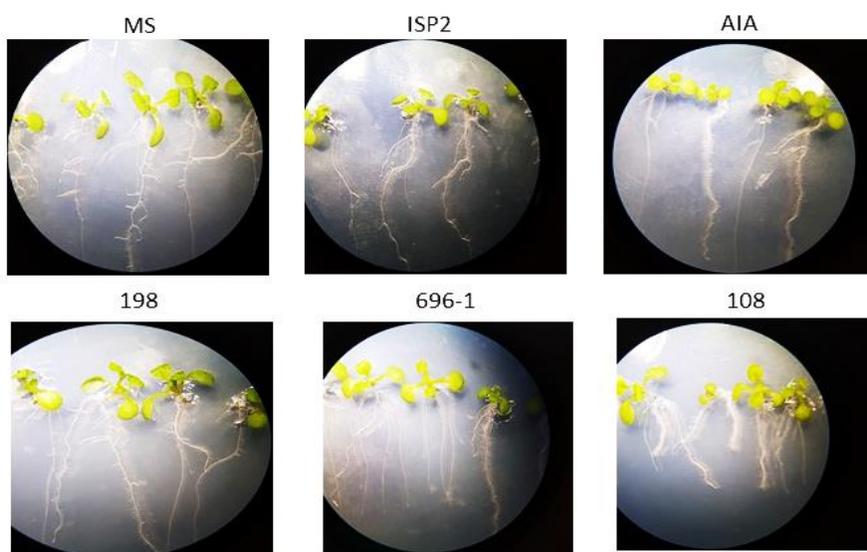


Figura 15. Imagen de plántulas de *Arabidopsis thaliana* después de 10 días de germinación en estereoscopio, a una concentración 0.5 μ M. Se muestran el control absoluto (MS), control negativo (ISP2), control positivo (AIA) y los sobrenadantes de aislado 198, 696-1 y 108.

El único aislado que mostró una promoción de crecimiento en cuanto a la longitud de la raíz fue el 198 (Figura 12, 16 y 17) a una concentración de $0.05 \mu\text{M}$. Este aislado mostró un incremento de raíz del 25% comparado con la presentada en el medio del control absoluto (MS). El aislado 198 pertenece al género *Kocuria* sp.

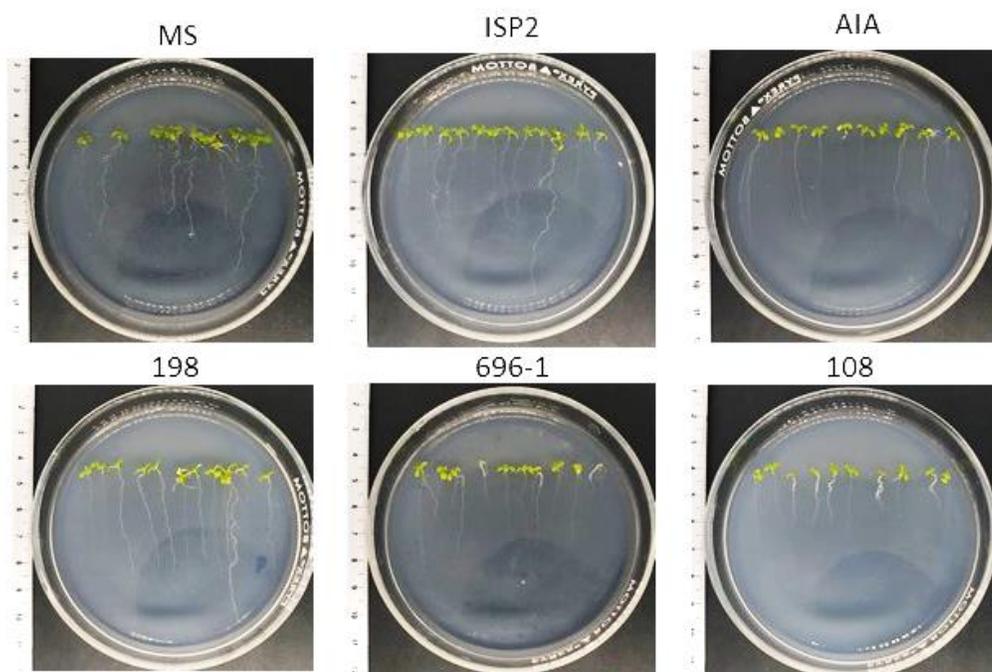


Figura 16. Imagen de plántulas de *Arabidopsis thaliana* después de 10 días de germinación a una concentración $0.05 \mu\text{M}$. Se muestran el control absoluto (MS), control negativo (ISP2), control positivo (AIA) y los sobrenadantes de aislado 198, 696-1 y 108.

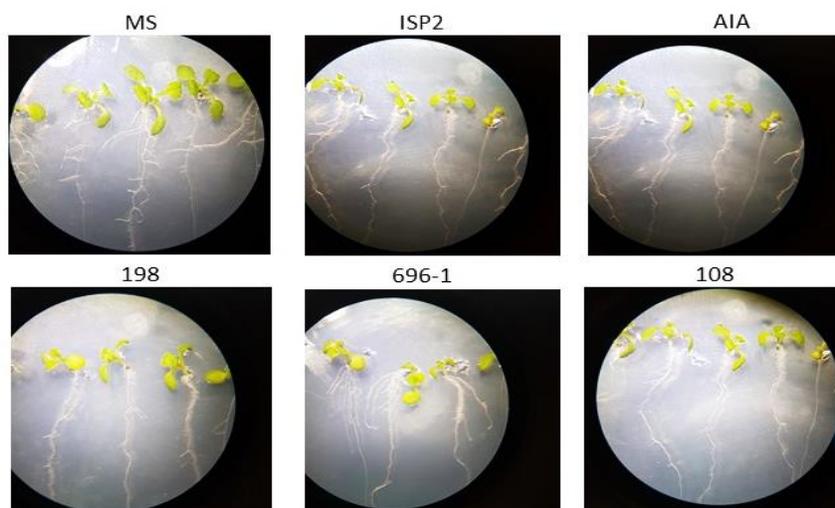


Figura 17. Imagen de plántulas de *Arabidopsis thaliana* después de 10 días de germinación en estereoscopia (concentración $0.05 \mu\text{M}$). Se muestran el control absoluto (MS), control negativo (ISP2), control positivo (AIA) y los sobrenadantes de aislado 198, 696-1 y 108.

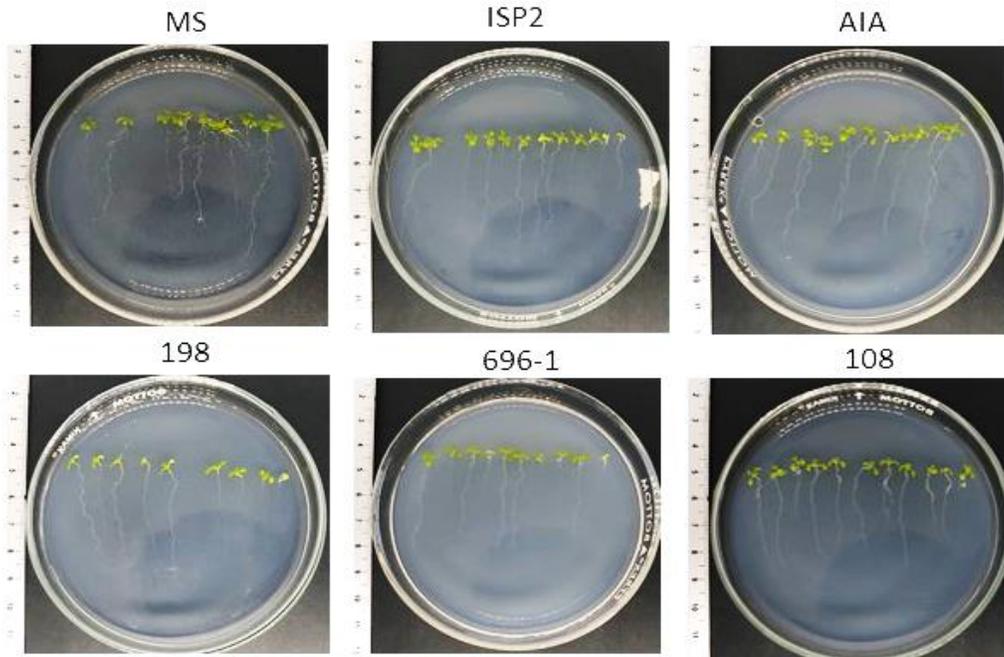


Figura 18. Imagen de plántulas de *Arabidopsis thaliana* después de 10 días de germinación a una concentración 0.01 μ M. Se muestran el control absoluto (MS), control negativo (ISP2), control positivo (AIA) y los sobrenadantes de aislado 198, 696-1 y 108.

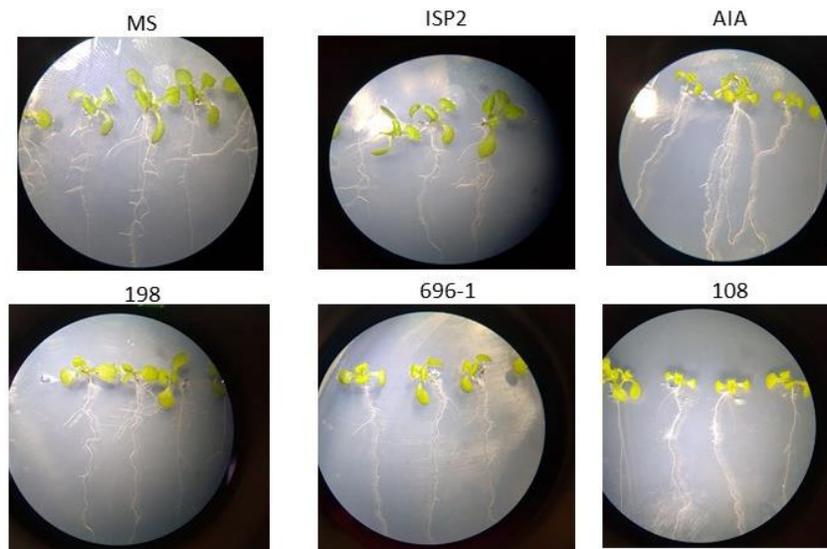


Figura 19. Imagen de plántulas de *Arabidopsis thaliana* después de 10 días de germinación en estereoscopio (concentración 0.01 μ M). Se muestran el control absoluto (MS), control negativo (ISP2), control positivo (AIA) y los sobrenadantes de aislado 198, 696-1 y 108.

En la Figura 20 y 21, en las cuales se muestran las plántulas del tratamiento 0.05 μM , se observa que, a diferencia del control de MS y MS + ISP2 (Ctrl), hay un incremento en las raíces secundarias y aumento en pelos radiculares para el sobrenadante del aislado 696-1, mientras que para el aislado 108 se observa un aumento en la cantidad y longitud de los pelos radiculares, efecto también observado en plantas tratadas con AIA.

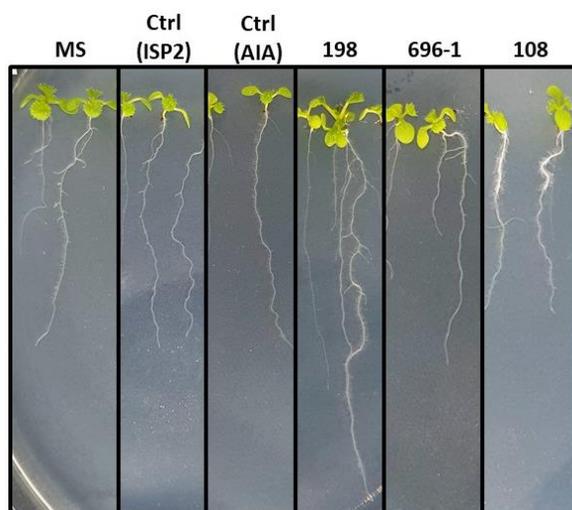


Figura 20. Imagen de plántulas de *Arabidopsis thaliana* (10 días después de germinación) tratadas con sobrenadantes a 0.05 μM . Ctrl = MS + ISP2, Ctrl (+) = AIA.

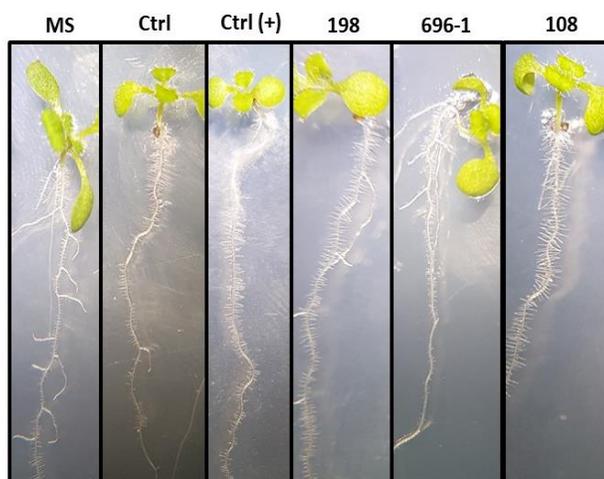


Figura 21. Imagen de plántulas de *Arabidopsis thaliana* (10 días después de germinación) tratadas con sobrenadantes a 0.05 μM . en estereoscopio Ctrl = MS + ISP2, Ctrl (+) = AIA.

Para determinar la promoción de crecimiento inducida por los sobrenadantes de tres aislados de actinobacterias de Cuatrociénegas, se decidió comparar el peso fresco total de las plántulas de *Arabidopsis thaliana* germinadas en placas Petri.

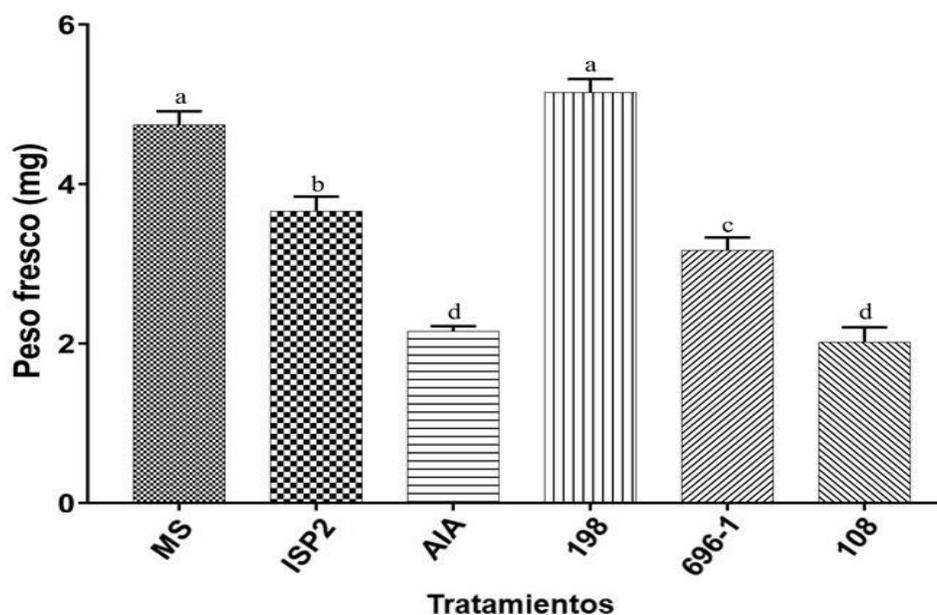


Figura 22. Peso fresco de plántulas de *Arabidopsis thaliana* (mg), 0.5 μ M. Se muestra el control absoluto (MS), control negativo (ISP2), control positivo (AIA) y los tratamientos (sobrenadantes de cultivos de actinobacterias) a una concentración de 0.5 μ M. Se muestran las medias de tres repeticiones y las barras de error representan la desviación estándar de las muestras. Se realizó un ANOVA con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$ y como prueba post hoc el método de Tukey; las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Los resultados mostraron que únicamente el sobrenadante del aislado 198 produjo un aumento significativo en el peso fresco total de plantas de *Arabidopsis thaliana* a una concentración de 0.5 μ M, comparada con la media del peso total de las plantas correspondientes al control negativo (ISP2) (Figura 22). Para el resto de los tratamientos, no hubo un aumento significativo en el peso de las plántulas de *A. thaliana* (Figura 22, 23 y 24).

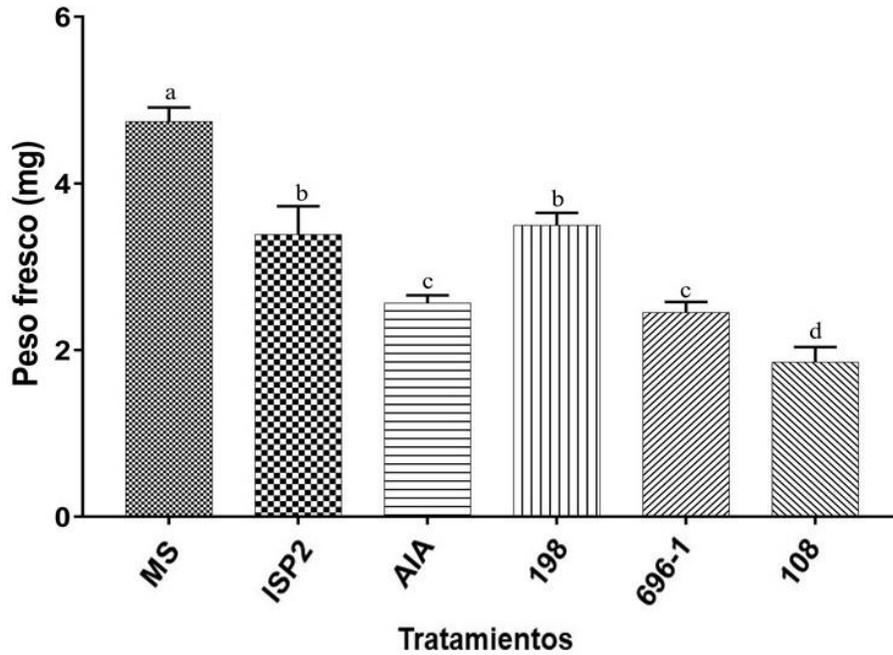


Figura 23. Peso fresco de plántulas de *Arabidopsis thaliana* (mg), 0.05 μM . Se muestra el control absoluto (MS), control negativo (ISP2), control positivo (AIA) y los tratamientos (sobrenadantes de cultivos de actinobacterias) a una concentración de 0.05 μM . Se muestran las medias de tres repeticiones y las barras de error representan la desviación estándar de las muestras. Se realizó un ANOVA con un nivel de significancia de $\alpha= 0.05$ y como prueba post hoc el método de Tukey; las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

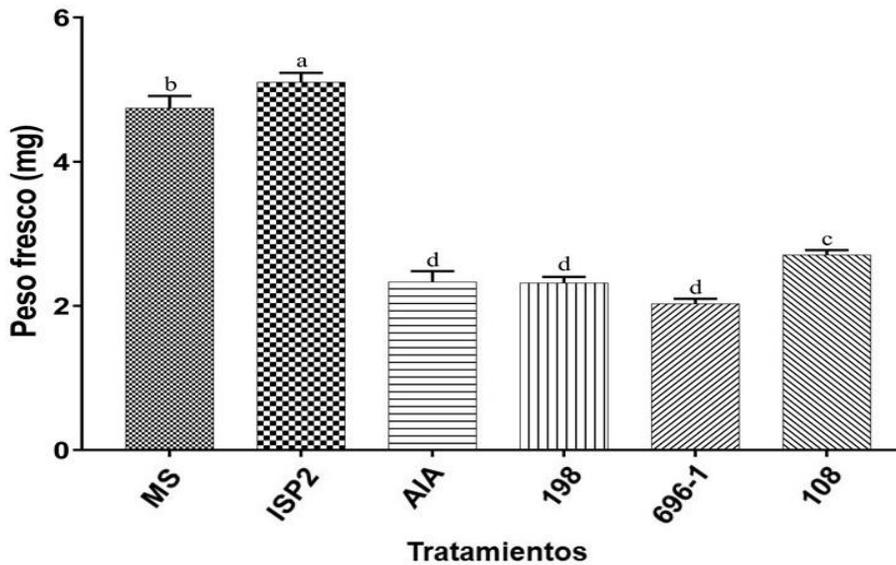


Figura 24. Peso fresco de plántulas de *Arabidopsis thaliana* (mg), 0.01 μM . Se muestra el control absoluto (MS), control negativo (ISP2), control positivo (AIA) y los tratamientos (sobrenadantes de cultivos de actinobacterias) a una concentración de 0.01 μM . Se muestran las medias de tres repeticiones y las barras de error representan la desviación estándar de las muestras. Se realizó un ANOVA con un nivel de significancia de $\alpha= 0.05$ y como prueba post hoc el método de Tukey; las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

8. Ensayos enzimáticos.

Los aislados utilizados para promoción de crecimiento en plantas fueron ensayados para determinar si poseían la capacidad de producir lipasas, celulasas, quitinasas y proteasas (aislados 696-1, 108 y 198). Además de estos aislados, se incluyó el aislado PR117 debido a que presentó el mayor diámetro colonial en el ensayo de fijación de nitrógeno en medio NFB.

En el caso de producción de celulasas, el aislado que resulto positivo para esta prueba fue PR117 (Figura 17), presentando un diámetro de 0.6 cm, el resto de los aislados no presentó actividad después de 5 días de incubación.



Figura 25. Imagen de producción de celulasas por los aislados de Cuatro Ciénegas, Coahuila después de 5 días de incubación.

Por otro lado, para la producción de quitinasas, todos los aislados resultaron negativos, ya que no existe formación de halos alrededor de las colonias (Figura 18)

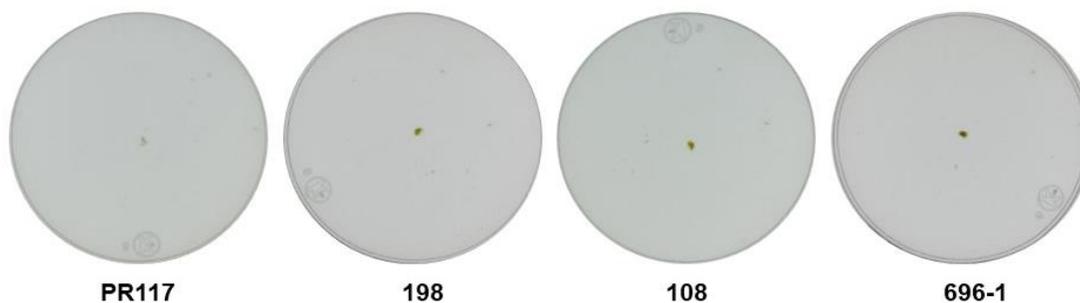


Figura 26. Imagen de producción de quitinasas por los aislados de Cuatro Ciénegas, Coahuila después de 5 días de incubación.

En el ensayo de producción de lipasas, al igual que para el de quitinasas, todos los aislados resultaron negativos después de 72 horas de incubación (Figura 19).

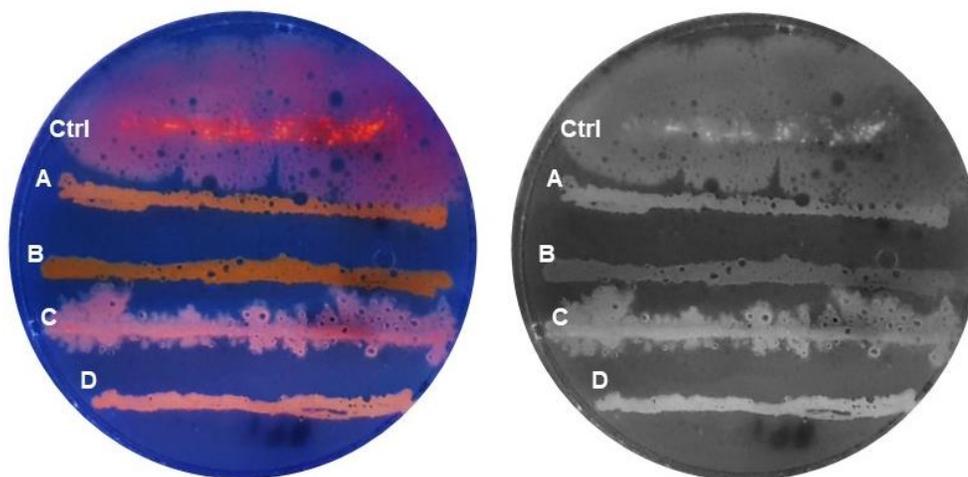


Figura 27. Imagen de producción de lipasas por los aislados de Cuatro Ciénegas, Coahuila después de 72 horas de incubación. Ctrl: B05 (lipasa positiva), A. aislado 696-1, B. aislado 108, C. aislado PR117, D. aislado 198,

Por último, para el ensayo de proteasas, los aislados 198 y 108 resultaron positivos, con un diámetro de 4 mm y 3.2 mm, respectivamente (Figura 20)

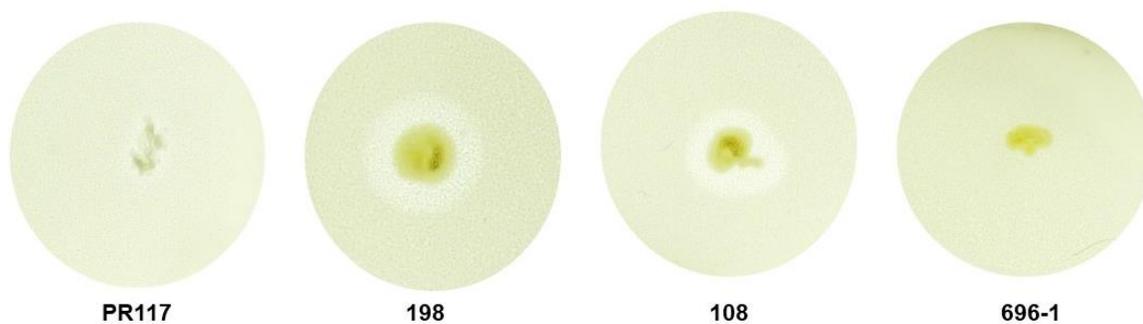


Figura 28. Imagen de producción de proteasas por los aislados de Cuatro Ciénegas, Coahuila después de 72 horas de incubación. Ctrl: B05 (lipasa positiva), A. aislado 696-1, B. aislado 108, C. aislado PR117, D. aislado 198,

DISCUSIÓN

1. Solubilización de fosfatos

El fósforo es un macronutriente requerido para el crecimiento adecuado de las plantas, aunque en muchas ocasiones se encuentra poco disponible en el suelo. El fósforo está presente dentro de ácidos nucleicos, enzimas, coenzimas, nucleótidos, y fosfolípidos, además de ser esencial para el crecimiento y desarrollo, ya que está involucrado en la fotosíntesis, desarrollo de raíces, formación de flores, crecimiento de raíces, elongación y división celular, resistencia a enfermedades, entre otras (Kalayu, 2019).

En los ensayos realizados en agar Pikovskaya, los aislados 108 y 198 presentaron el mayor índice de solubilización de fosfato, con una máxima formación de halo (zona de solubilización) de 3.5 mm y 3.2 mm, respectivamente. Dastager y Damare (2013), encontraron que 33 diferentes aislados exhibían una zona de solubilización de fosfato de 9-23 mm después de 6 días de incubación, y estos pertenecen al género *Streptomyces*, *Kocuria*, *Microbacterium* e *Isoptericola*. Como se mencionó en los resultados, el aislado 198 pertenece al género *Kocuria* sp., coincidiendo con un género encontrado por el estudio antes mencionado.

Goswami et al. (2014), encontraron que *Kocuria turfanensis* posee la capacidad de solubilizar fosfato, producir sideróforos y amoníaco.

La bacteria analizada, el aislado 198, en este estudio demostró solubilizar fosfato, sin embargo, no es capaz de producir sideróforos y se desconoce si sea capaz de producir amoníaco, sin embargo, este aislado fue capaz de crecer en medio NFB, por lo que podría considerarse como un buen candidato de promotor de crecimiento en plantas.

Prada et al (2013) encontró que de 57 aislados de actinobacterias evaluados, sólo 10 mostraron solubilizar fosfato, lo que representa el 18% del total, y que la solubilización de fosfato era debida a la presencia de ácido oxálico, cítrico y glucónico. En nuestro caso, también encontramos que, del total, el 18% fue capaz de solubilizar fosfato, pero se desconoce cuál mecanismo está involucrado en este proceso. Aunque no todas las actinobacterias fueron capaces de formar halos de solubilización en agar Pikovskaya, no es indicio que los microorganismos carezcan de esta habilidad, sino que posiblemente el medio

de cultivo no es adecuado para detectar la actividad de algunos microorganismos, por lo que sería necesario recurrir a medios líquidos para obtener resultados precisos (Jones *et al.*, 1997; Whitelaw, 1999).

2. Producción de sideróforos

Nakouti y colaboradores en el 2012 encontraron que un 44% (87/196) de actinobacterias de suelo resultaron positivas en placas de ensayo de sulfato de azurol de cromo (CAS), los resultados indicaron la presencia de catecoles o de hidroxamatos. En nuestro caso, determinamos que el 23% del total de los aislados producían sideróforos. No sabemos con exactitud a qué clase de sideróforos pertenecen los producidos por las actinobacterias en este estudio, sin embargo, en su mayoría se produjo una coloración naranja, por lo que corresponde al color producido por sideróforos de la clase de hidroxamatos (Miranda *et al.*, 2007).

Las actinobacterias productoras de sideróforos crean condiciones deficientes de hierro para los fitopatógenos quelando el hierro presente en la rizósfera y ayudan a proteger a las plantas de enfermedades que conducen a un mejor crecimiento (Rani *et al.*, 2018).

3. Fijación de Nitrógeno

Varios estudios acerca de las propiedades de fijación de nitrógeno entre Actinobacterias Gram-positivas han revelado que algunas especies de *Arrobacter*, *Agromyces*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Micromonospora*, *Propionibacteria* y *Streptomyces* tienen capacidad de fijación de nitrógeno (Sellstedt y Richau, 2013). En este caso, sabemos que PR94, el aislado con un mayor diámetro colonial en medio NFB, pertenece al género *Streptomyces*, coincidiendo con un género encontrado en el estudio mencionado.

Franco y Chavarro (2015) probaron actinobacterias en medio libre de nitrógeno, en las cuales tres de diez (30%) aislados fueron capaces de fijar nitrógeno en medio NFB después de 10 días, una de ellas perteneciente al género *Streptomyces*. En este caso, nosotros encontramos que del total, el 32% de los aislados fueron capaces de fijar nitrógeno en medio NFB después del mismo periodo de tiempo y, como se mencionó anteriormente, también encontramos a *Streptomyces* como el mejor fijador de nitrógeno.

4. Producción de ácido indolacético

El ácido indolacético es una hormona vegetal que juega un papel central en la modulación del crecimiento y desarrollo de la planta. Además de ser producida por plantas, algunas bacterias presentes en la rizósfera son capaces de producirla. En las bacterias actúa como una molécula de señalización, la cual tiene efectos significativos en la comunicación entre la planta y el microorganismo, además de promover el crecimiento (Li, *et al.*, 2018).

En este estudio encontramos que el 27% del total de los aislados fueron capaces de producir compuestos indólicos. Grupos de investigadores (Mahesh *et al.* 2012) han encontrado que actinobacterias como *Streptomyces olivaceus* producen hasta 89.34 µg/ml de AIA. En este caso, el aislado PR94, el cual pertenece al género *Streptomyces*, no produjo ácido indolacético.

Goswami y colaboradores (2014) encontraron que *Kocuria turfanensis* producía 38 µg/ml cuando se le suplementaba al medio de cultivo con 600 µg/ml de triptófano. En este caso, *K. rhizophila* (aislado 198) produjo más de 200 µg/ml cuando se le suplementó con 1 mg/ml de triptófano, siendo una cantidad 5 veces mayor a la cantidad encontrada en el estudio anteriormente mencionado.

El ácido indolacético bacteriano tiene un efecto fitoestimulador, el cual impacta y mejora el crecimiento de la planta, ya que aumenta el desarrollo de raíces en la planta e incrementa el área superficial de volumen de raíces, haciendo que tenga una mejor adsorción de agua y nutrientes (Ahmed & Hasnain, 2010).

En nuestro estudio encontramos que las bacterias analizadas producen cantidades superiores a 100 µg/ml, siendo esto una cantidad hasta 10 veces mayor comparada a la concentración determinada en otros microorganismos denominados como promotores de crecimiento en plantas: *Azotobacter* 20 µg/ml, *Pseudomonas* 25 µg/ml y *Bacillus* 10 µg/ml (Ahmad *et al.* 2008). Sin embargo, la promoción de crecimiento sobre la elongación de la raíz de la planta por PGPRs de vida libre como lo son *Alcaligenes faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Acetobacter diaxotrophicus*, especies de *Azospirillum*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas*, y por simbiontes como *Bradyrhizobium japonicum* y *Rhizobium* spp., está relacionada con una secreción de ácido indolacético en niveles bajos (Patten y Glick, 1996), por lo que, cuando

hay una producción elevada de ácido indolacético, se observa el efecto contrario, es decir, se inhibe el crecimiento (Sarwar y Kremer, 1995).

5. Promoción de crecimiento

Los estudios realizados de promoción de crecimiento en plántulas de *Arabidopsis thaliana* mostraron que, a una concentración 0.05 μM el aislado 198 (*Kocuria rhizophila*) tuvo una elongación de raíz 25% mayor al control sin tratamiento, esto es MS sin sobrenadante. Sin embargo, el resto de los aislados, aunque no mostraron una elongación de la raíz, tuvieron desarrollo de raíces laterales y una abundancia en pelos radiculares, esto observado tanto en el aislado 696-1 y 108. La estimulación del desarrollo de la raíz lateral, los pelos radiculares y la liberación de azúcares, son efectos fisiológicos del AIA en las plantas (Davies, 2004). Como se mencionó anteriormente, la estimulación del desarrollo del sistema radicular, gracias al desarrollo de raíces laterales y división del meristemo apical dando lugar a la elongación de raíces, tiene como resultado en la planta un incremento en el acceso de nutrientes presentes en el suelo (Garrido *et al.*, 2002).

En un estudio realizado por Palaniyandi y colaboradores (2013), observaron que 28 de 29 aislados de actinobacterias producían AIA, pero de estas, solo 11 fueron capaces de promover el crecimiento de *A. thaliana* en cultivo *in vitro*. Esta falta de correlación entre la producción de IAA y la promoción del crecimiento podría deberse a varios otros factores, como la presencia de fitotoxinas que enmascaran el efecto de IAA o el requisito de factores adicionales para la promoción del crecimiento, por lo que sí no se logró observar esta promoción de crecimiento en otras concentraciones puede deberse a la acumulación de fitotoxinas ya que, como se observó en las curvas de crecimiento, los aislados 696-1 y 108 a las 48 horas se encuentran en fase estacionaria, en la cual las condiciones del medio de cultivo se vuelven poco favorables para el crecimiento por diferentes factores como la limitación de un nutriente esencial, acumulación de subproductos tóxicos, presencia de factores de estrés como cambios de pH, temperatura, osmolaridad, etc., y las bacterias detienen su replicación (Rolfe *et al.*, 2019; Jaishankar & Srivastava, 2017). Sin embargo, el aislado 198 sigue en fase exponencial en este período de tiempo, por lo que no hay acumulación de metabolitos tóxicos para la propia bacteria y para la planta.

6. Ensayos enzimáticos

Con el fin de conocer el potencial biotecnológico de los aislados seleccionados para la promoción de crecimiento, se realizaron cuatro ensayos enzimáticos: celulasas, quitinasas, lipasas y proteasas.

La quitina es el componente principal de la pared de muchos hongos patógenos para plantas, por lo que las quitinasas bacterianas juegan un papel importante en su antagonismo hidrolizando estos componentes de la pared celular (Gomez *et al.*, 2000). Para este ensayo, ninguno de los cuatro aislados resultaron positivos para quitinasas ya que ninguno formó halo de solubilización. En ensayo de celulasas, llevado a cabo en agar CMC, se encontró que solamente el aislado PR117 fue capaz de formar halos de degradación de celulosa. Muchos hongos fitopatógenos poseen celulosa en su pared celular (Lin & Aronson, 1970), como es el caso de *Phyitium* sp., el cual tiene celulosa como componente principal de su pared celular (Kavamura *et al.*, 2013), por lo que la actividad de estas enzimas juega un papel importante en la supresión de enfermedades causada por hongos fitopatógenos (Sindhu & Dadarwal, 2001).

En el caso de lipasas, ninguno de los aislados resultó positivos para este ensayo en agar rodamina B. Sin embargo, se puede lograr la estimulación de lipasas en medio líquido. Las lipasas bacterianas generalmente son extracelulares y están influenciadas por factores nutricionales fisicoquímicos, como lo son temperatura, pH, fuente de carbono y nitrógeno, presencia de lípidos, entre otros (Gupta *et al.*, 2004). Aunque el factor principal para la expresión de la actividad lipasa se deriva de la presencia de una fuente lipídica como un aceite o algún otro inductor como ácidos grasos, tweens, sales biliares, etc., su producción también se ve influenciada por otras fuentes de carbono, como azúcares, azúcares alcoholes, polisacáridos (Gilbert *et al.*, 1991; Rathi *et al.*, 2001). Algunos ácidos grasos de cadena larga pueden apoyar la producción de lipasas por bacterias, sin embargo, en algunas de ellas, como en *Acinetobacter calcoaceticus*, la presencia de ácido oleico, aceite de cadena larga y componente principal del aceite de oliva (García-Inza *et al.*, 2014) reprime la actividad lipasa de la bacteria (Mahler *et al.*, 2000). Debido a lo anterior mencionado, no podemos asegurar que las bacterias ensayadas en agar rodamina B no poseen actividad lipasa, ya que esta actividad podría estar reprimida o necesita ser estimulada.

Por último, se realizó un ensayo para determinar la actividad de proteasa de los aislados, resultado positivo el aislado 198 y 108. Las proteasas, conocidas como peptidil-peptidohidrolasas, son enzimas de importancia industrial, ya que están presentes en detergentes, ablandadores de carne, involucrados en la fabricación de queso, en la industria cervecera, entre otros procesos y productos (Fernandez *et al.*, 2018). Estas enzimas tienen actividades catalíticas únicas, alta especificidad de acción y aplicación (Gupta *et al.*, 2002), por lo que su posterior estudio podría ser importante para obtener productos biotecnológicos nuevos, aplicables a diferentes industrias.

CONCLUSIÓN

Las actinobacterias aisladas de Cuatro ciénegas, Coahuila, presentan los mecanismos para ser consideradas como bacterias promotoras de crecimiento en plantas. De todos los 43 aislados, el 108, 198, 696-1, PR94, y PR117 fueron los que presentaron mayor capacidad de solubilización de fosfato, fijación de nitrógeno, producción de sideróforos y producción de ácido indolacético, respectivamente.

El sobrenadante del aislado 198 (*Kocuria rhizophila*) a una concentración de 0.05 μ M indujo un crecimiento de las raíces tratadas 25% mayor a las raíces de las plantas control de *Arabidopsis thaliana*.

El sobrenadante de los tres aislados, 198 (*K. rhizophila*), 108 y 696-1 incrementaron el número y longitud de pelos radiculares en plantas de *A. thaliana*.

El aislado PR117 fue el único aislado capaz de producir celulasas en agar CMC, mientras que los aislados 696-1, 108 y 198 mostraron actividad proteolítica en el medio de cultivo. Debido a lo anterior, estos aislados, además de mostrar características propias de bacterias promotoras de crecimiento en plantas, también mostraron poseer enzimas de interés biotecnológico e industrial, como lo son las proteasas, por lo que es pertinente seguir realizando estudios y ensayos en busca de otras moléculas en estos aislados, así como su identificación.

PERSPECTIVAS

Analizar el efecto de las actinobacterias 108, 198 y 696-1 como promotores de crecimiento en plantas cultivadas en suelo, así como la identificación de los aislados.

Purificación e identificación de los compuestos responsables de la promoción de crecimiento *in vitro* mediante cromatografía, MS y RMN.

Evaluar el efecto de un consorcio de actinobacterias *in vivo* en plántulas de *Arabidopsis thaliana*.

Realizar otros ensayos en busca de enzimas y moléculas de interés biotecnológico e industrial.

BIBLIOGRAFÍA

- Abd-Alla MH. 1994. Phosphatases and the utilization of organic phosphorus by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viceae*. Letters Applied Microbiology 18(5):294-6.
- Ahmad F, Ahmad I, Khan M. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiology Research. 163(2): 173-181.
- Ahmad F, Ahmad I, Khan MS. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiological research, 163(2):173-181.
- Ahmed A, Hasnain S. (2010). Auxin producing *Bacillus* sp.: and alkaline environments. Acta Microbiol Sinica 46:191-195.
- Ahmed A, Hasnain S. 2010. Auxin-producing *Bacillus* sp.: auxin quantification and effect on the growth of *Solanum tuberosum*. Pure and Applied Chemistry 82:313–319.
- Alexander DB, Zuberer DA. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Biology and Fertility of soils, 12(1):39-45.
- Anwar S, Basharat A, Sajid I. 2016. Screening of Rhizospheric Actinomycetes of Various In-vitro and In-vivo Plant Growth Promoting (PGP) Traits and for Agroactive Compounds. Fontiers of Microbiology, 7(1), 1334.
- Auxin quantification and effect on the growth *Solanum tuberosum*. Pure and Applied Chemistry. 82 (1): 313–319.
- Azcón C, Palenzuela J, Roldan A, Bautista S, Vallejo R, Barea J.M. 2002. Analysis of the mycorrhizal potential in the rizosphere of representative plant species from desertification-threatened Mediterranean shrublands. Applied Soil Ecology 21:1-9.
- Barea JM, Pozo MJ, Azcon C. 2005. Microbial cooperation in the rizosphere. Journal of experimental Botany 56:1778-1784.
- Basilio A, Gonzalez I, Vicente M F, Gorrochategui J, Cabello A, Gonzalez A, Genilloud, O. 2003. Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. Journal of Applied Microbiology, 95:814-823.

- Braun V, Hantke K, Koster W. 1998. Bacterial iron transport: mechanisms, genetics, and regulation. *Metal Ions in Biological Systems* 35:67-146.
- Cavaletti L, Monciardini P, Bamonte R, Schumann P, Rohde M, Sosio M, Donadio S. 2006. New Lineage of filamentous, spore-forming, gram-positive bacteria from soil. *Applied and Environmental Microbiology* 72:4360-4369.
- Chen S, Perathoner S, Ampelli C, Centi G. (2019). Electrochemical Dinitrogen Activation: To find a sustainable Way to Produce Ammonia. *Studies in surface science and catalysis*: 178(1):31-46
- Cordovez V, Carrion V, Etalo D, Mumm R, Zhu H., van Wezel G, Raaijmakers J. 2015. Diversity and functions of volatile organic compounds produced by *Streptomyces* from a disease-suppressive soil. *Frontiers in Microbiology*, 6(1), 1081.
- Correa M, Chavarro V. 2016. Actinobacteria as Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications. In tech, pp. 249-270.
- Dastager S, Damare S. (2013). Marine Actinobacteria Showing Phosphate-Solubilizing Efficiency in Chorao Island, Goa, India. *Current Microbiology*: 66(5): 421-427.
- Davies, P. (2004). Regulatory factors in hormone action: Level, location and signal transduction. *Plant hormones*. 1(1):16-35.
- De Souza R, Ambrosini A, Passaglia LMP. 2015. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, 38(4), pp. 401–419.
- Dias M, Bastos M, Xavier V, Cassel E, Astarita L, Santarém E. 2017. Plant Growth and resistance promoted by *Streptomyces* spp. In tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*.
- Dordas C. (2008). Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development*: 28(1):33-46.
- El-Tarabily K, Sivasithamparan K. 2006. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biology and Biochemistry* 38(7):1505-1520.

Ezziyyani M, Pérez C, Requena M, Ahmed A, Candela M. 2004. Evaluación del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*. *Anales de Biología* 26: 61-68.

Fernandez R, Ramachandran R, Nallakumar K. (2018). Screening and characterization of protease producing marine actinobacteria *Streptomyces pactum* RA71 isolated from Pulicat lake, Chennai, Tamil Nadu, India. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences*. 20.

Gaiero JR, McCall CA, Thompson KA, Day NJ, Best AS, Dunfield K.E. 2013. Inside the root microbiome: Bacterial root endophytes and plant growth promotion. *American Journal of Botany* 100:1738-1750.

Garcia SB. 1968. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungus. *Annual Review of Microbiology* 22:87–108.

García-Fernández, R., Reytor, M. L., del Rivero, M. A., & de los Angeles Chávez, M. (2017). Relación estructura-función de inhibidores de proteasas tipo BPTI-Kunitz/Structure-function relationship of BPTI-Kunitz type protease inhibitors. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 4(2), 2-19.

Garcia-Inza G, Castro D, Hall A, Rousseaux M. (2014). Responses to temperature of fruit dry weight, oil concentration, and oil fatty acid composition in olive (*Olea europaea* L. var. 'Arauco'). *European Journal of Agronomy*. 54(1):107–115.

Garrido G, Guerrero J, Cano E, Acosta M, Sánchez-Bravo J. 2002. Origin and basipetal transport of the IAA responsible for rooting of carnation cuttings. *Physiologia Plantarum* 114:303-312.

Garrido J, Ocampo J. (2002). Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal of Experimental Botany*. 53(373):13377-1386.

Gilbert E, Cornish A, Jones, C. (1991). Purification and properties of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* EF2. *Microbiology*, 137(9), 2223-2229.

Glick BR. 2012 Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica* 2012:1–1

Gomes RC, Semeado LTAS, Soares RMA, Linhares LF, Ulhoa CJ, Alviano CS, Coelho RRR. 2001. Purification of a thermostable endochitinase from *Streptomyces* RC1071 isolated from a cerrado soil and its antagonism against phytopathogenic fungi. *Journal of Applied Microbiology* 90(4):653-661.

Gopalakrishnan S, Vadlamudi S, Bandikinda P, Sathya A, Vijayabharathi R, Rupela O, Kudapa H, Katta K, Varshney RK. 2014. Evaluation of *Streptomyces* strains isolated from herbal vermicompost for their plant growth-promotion traits in rice. *Microbiological Research* 169:40–48.

Goswami D, Pithwa S, Dhandhukia P, Thakker J. (2014). Delineating *Kocuria turfanensis* 2M4 as a credible PGPR: a novel IAA-producing bacteria isolated from saline desert. *Journal of Plant Interactions*-, 9(1):556-576.

Gupta R, Gupta N, Rathi P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied microbiology and biotechnology*, 64(6), 763-781.

Gyaneshwar P, James EK, Reddy PM, Ladha JK. 2002 *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. *New Phytologist* 154:131–145

Hamdali H, Bouizgarne B, Hafidi M, Lebrihi A, Virolle MJ, Ouhdouch Y. 2008. Screening for rock phosphate-solubilizing actinomycetes from Moroccan phosphate mines. *Applied Soil Ecology* 38:12–19

Hamdali H, Hafidi M, Virolle MJ, Ouhdouch Y. 2008. Rock phosphate-solubilizing Actinomycetes: screening for plant growth-promoting activities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(1), pp. 2565-2575.

Haselwandter K. 1998. Identification and characterization of siderophores of mycorrhizal fungi. In: Varma A, ed. *Mycorrhiza Manual*. Springer.

Henrissat B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal* 2:309-316.

Hoster F, Schmitz JE, Daniel R. 2005. Enrichment of chitinolytic microorganisms: isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic

fungi from a novel *Streptomyces* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66:434-442.

Inomata T, Eguchi H, Matsumoto K, Funahashi Y, Ozawa T, Masuda H. 2007. Adsorption of microorganisms onto an artificial siderophore-modified Au substrate. *Biosensors and Bioelectronics* 23:751-755.

Jacob S, Sudini K. 2016. Indirect Plant Growth Promotion in Grain Legumes: Role of Actinobacteria. In: *Plant Growth Promoting Actinobacteria: A New Avenue for Enhancing the Productivity and soil fertility of Grain and Legumes*, Subramaniam G., Arumugam, S., Rajendran, V. (eds). Springer: Telangana, India, pp. 17-27.

Jaishankar J, Srivastava P. (2017). Molecular basis of stationary phase survival and applications. *Frontiers in microbiology*, 8, 2000.

Jiang Y, Li WJ, Xu P, Tang SK, Xu LH. 2006. Study on Actinomycetes diversity under salt

Jog R, Nareshkumar G, Rajkumar S. 2016. Enhancing Soil Health and Plant Growth Promotion by Actinomycetes. In: *Plant Growth Promoting Actinobacteria: A New Avenue for Enhancing the Productivity and soil fertility of Grain and Legumes*, Subramaniam G., Arumugam, S., Rajendran, V. (eds). Springer: Telangana, India, pp. 33-46.

Jog R, Pandhya M, Nareshkumar G, Rajkumar S. 2014 Mechanism of phosphate solubilization and antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from wheat roots and rhizosphere and their application in improving plant growth. *Microbiology* 160:778–788.

Jones D, Smith B, Wilson M, Goodman A. (1997). Phosphate solubilizing fungi in a Scottish upland soil. *Mycol. Res.* 95: 1090-1093.

Kalayu G. (2019). Phosphate Solubilizing Microorganism: Promising Approach as Biofertilizers. *International Journal of Agronomy*: 1(1):1-7.

Kaszubiak H. 1998. Mutual antagonism between fluorescent pseudomonads and soil Actinomycetes. *Polish Journal Environmental Studies* 7(4):201-211.

- Kavamura V, Santos S, da Silva J, Parma M, Ávila L, Visconti A, de Melo I. (2013). Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. *Microbiological research*, 168(4), 183-191.
- Kloepper JW, Zablotowicz RM, Tipping EM, Lifshitz R. 1991. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. *The rhizosphere and plant growth*, Keister D.L. and Cregan P.B. (eds). Kluwer academic Publishers, Netherlands, pp 315-326.
- Krishnaraj M, Prabavathy VR, Mathivanan N. 2014. Actinomycetes: Diversity, Distribution, Economic Importance and their Role in Plant Protection. *Annual Review of Plant Pathology*, 6(1), pp. 269-297.
- Kucey RMN, Janzen HH, Legett ME. 1989. Microbial mediated increases in plant-available phosphorus. *Advances in Agricultural Research* 42:198-228.
- Leaveau Y, Bouxi M. 2000. *Microbiología industrial: los microorganismos de interés industrial*. Acribia, pp. 213-255.
- Lee SY, Tindwa H, Lee YS, Naing KW, Hong SH, Nam Y, Kim KY. 2012. Biocontrol of anthracnose in pepper using chitinase, beta-1,3 glucanase, and 2-furancarboxaldehyde produced by *Streptomyces cavourensis* SY224. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 22:1359–1366
- Li Z, Li Y, Zhang Y, Cheng B, Peng Y, Zhang X, Ma X, Huang L, Yan Y. (2018). Indole-3-acetic acid modulates phytohormones and polyamines metabolism associated with the tolerance to water stress in white clover. *Plant Physiology and Biochemistry*, 129:251-263.
- Lin C, Aronson J. (1970). Chitin and cellulose in the cell walls of the oomycete, *Apodachlya* sp. *Achiv für Mikrobiologie*. 72(3):111-114.
- Louden BC, Haarmann D, Lynne A. 2011. Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection. *Journal of Microbiology and Biology Education*, pp. 51-53.
- Mahler G, Kok R, Cordenons A, Hellingwerf K, Nudel B. (2000). Effects of carbon sources on extracellular lipase production and lipA transcription in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 24(1), 25-30.

- Malhotra M, Srivastava S. 2009. Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. *European Journal of Soil Biology* 45:73-80.
- Mansour R, Abdel-Azeem A, Abo-Deraz S. 2015. A new record of Actiobacteria isolated from soil in Jerusalem and their enzymatic potential. *F1000Research* 2015, 4:11.
- Manulis S, Shafir H, Epteinamnon E, Barash I. 1994. Biosynthesis of indole-3-acetic acid via the indole-3-acetamide pathway in *Streptomyces* spp. *Microbiology* 140:1045-50.
- Muller DB, Vogel C, Bai Y, Vorholt JA. 2016. The plant microbiota: systems-level insights and perspectives. *Annual Review of Genetics* 50:211–234.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), pp. 473-497.
- Nakouti, I., Sihanonth, P., and Hobbs, G. (2012). A new approach to isolating siderophore-producing actinobacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 55, 68–72
- Nawani N, Aigle B, Mandal A, Bodas M, Ghorbel S, Prakash D. 2013. Actinomycetes: Role in Biotechnology and Medicine. *BioMed Research International*, 2013, 687190.
- Neilands JB. 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal of Biological Chemistry* 270(45):26723-6.
- Ninawe S, Lal R, Kuhad RC. 2006. Isolation of three xylanase producing strains of actinomycetes and their identification using molecular methods. *Current Microbiology* 53:178–182
- Nogales B. 2005. La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. *Ecosistemas* 14(2):1-10.
- Pathom-aree W, Stach EM, Ward A, Horikoshi K, Bull AT, Goodfellow M. 2006. Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles* 10:181-189.
- Patten C, Glick B. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*. 42(3):207-220.

Patten CL, Glick BR. 2002. Role of *Pseudomonas putida* Indole acetic acid in development of the host plant root system. *Applied Environmental Microbiology* 68(8):3795-3801.

Prada, L. D., Prieto, G. C., & Franco, M. (2014). Screening phosphate solubilizing actinobacteria isolated from the rhizosphere of wild plants from the eastern cordillera of the colombian andes. *African Journal of Microbiology Research*, 8(8), 734-742.

Prescott L. 2002. *Microbiology*. 5th ed. Editorial McGraw-Hill. Boston, Massachusetts, USA. pp. 524-528.

PRO-MIX (2018). Role of Iron in plant culture. Recuperado de: <https://www.pthorticulture.com/en/training-center/role-of-iron-in-plant-culture/>

Rani, K., Dahiya, A., Masih, J. C., & Wati, L. (2018). Actinobacterial biofertilizers: an alternative strategy for plant growth promotion. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 7(09), 607-614.

Rathi P, Goswami V, Sahai V, Gupta R. (2002). Statistical medium optimization and production of a hyperthermostable lipase from *Burkholderia cepacia* in a bioreactor. *Journal of applied microbiology*, 93(6), 930-936.

Sarwar M, & Kremer RJ. (1995). Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. *Letters in applied microbiology*, 20(5):282-285.

Sellstedt A, Richau KH. (2013). Aspects of nitrogen-fixing Actinobacteria, in particular free-living and symbiotic Frankia. *FEMS Microbiology Letters*, 342(2):179-186.

Sharma M, Dangi P, Meenakshi C. 2014. Actinomycetes: Source, Identification, and Their Applications. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences.*, 2(3), pp. 801-832.

Sindhu S, Dadarwal K. (2001). Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas* sp. antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp. Cicer in chickpea. *Microbiological Research*, 156(4), 353-358.

Sousa JA, Olivares FL. 2016. Plant growth promotion by streptomycetes: ecophysiology, mechanisms and applications. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 3(1), 24.

Souza V, Escalante A, Espinoza L, Valera A. 2004. Cuatro Ciénegas, Un laboratorio de Astrobiología. *Ciencias* 75:4-12.

Stewart JWB, Sharpley AN. 1987. Controls on dynamics of soil and fertilizer phosphorus and sulphur. *Soil Fertility and Organic Matter as Critical Components on Production Systems*. St. Paul, MN: Soil Science Society of America.

Sylvia D, Fuhrmann J, Hartel P, Zuberer D. 1999. *Principles and Applications of Soil Microbiology*. Prentice Hall, Inc. New Jersey USA. pp. 7-8.

Sylvia D. 2005. *Principles and applications of soil microbiology*. Second Edition. Pearson/Prentice Hall. New Jersey, USA. pp. 259 – 306.

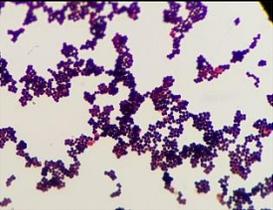
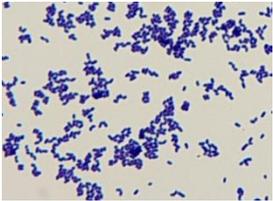
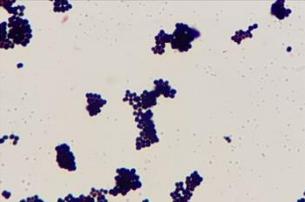
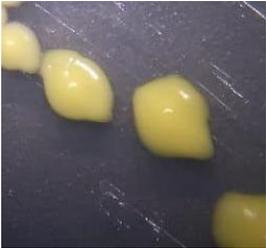
Van Kauwenbergh SJ. (2010). World phosphate rock reserves and resources. *International*

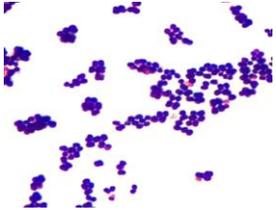
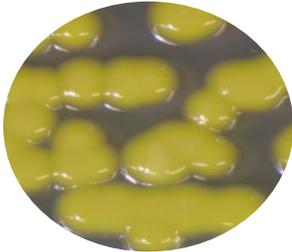
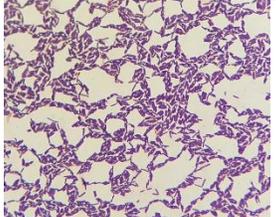
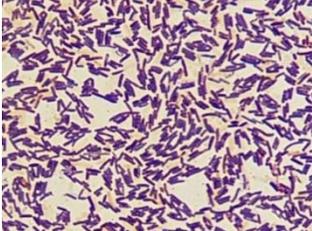
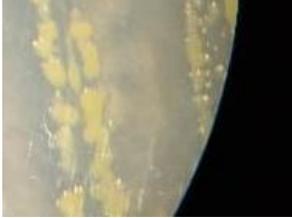
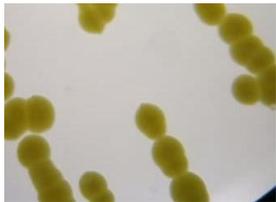
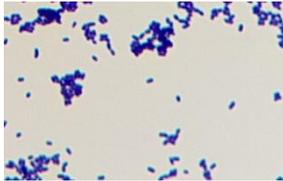
Whitelaw, M. A., Harden, T. J., & Helyar, K. R. (1999). Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. *Soil biology and biochemistry*, 31(5), 655-665.

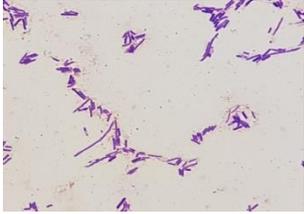
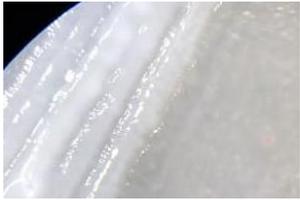
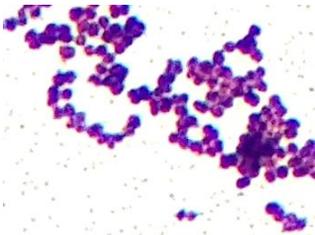
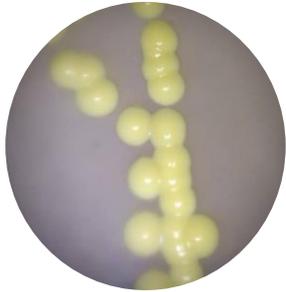
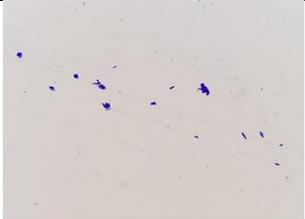
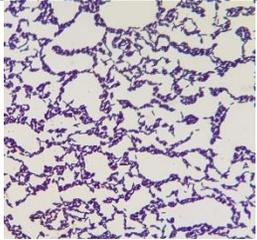
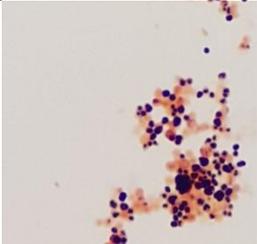
Zhang XZ, Percival YH. 2013. Cellulases: Characteristics, sources, production, and applications. In: *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers*, Yang ST, El-Enshasy HA, Thongchul N (eds). Wiley Online Libery, pp. 585-593.

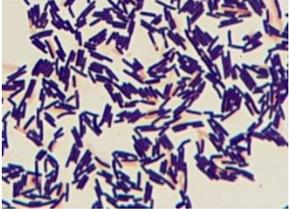
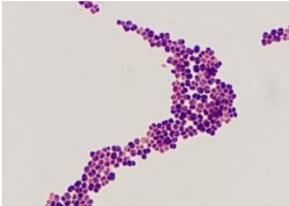
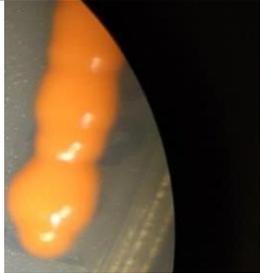
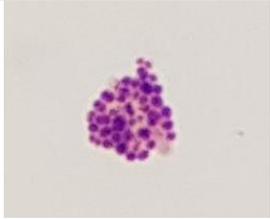
ANEXOS

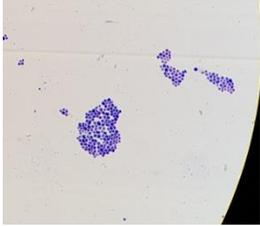
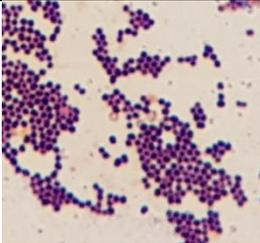
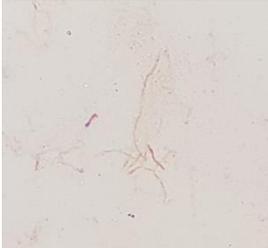
Anexo 1. Lista Actinobacterias

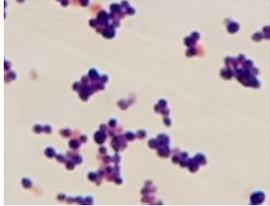
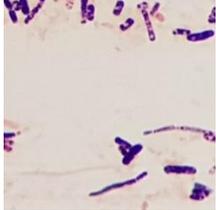
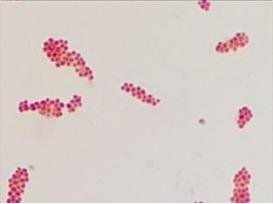
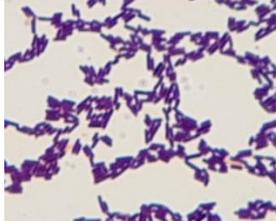
AISLADOS			
Total; 43			
Aislado/ lugar de aislamiento	Gram	Morfología colonial	
187 LI	 Cocos	Amarilla; forma circular, borde liso, elevada, superficie lisa, brillante, consistencia mucoide.	
95 N/A	 bacilos	Amarilla pastel; forma circular, borde liso, elevada, superficie lisa, brillante, consistencia mucoide.	
696-1 LI	 cocos	Amarillo brillante; forma circular, borde liso, elevada, superficie rugosa, brillante, consistencia mucoide.	
685 LI	 cocos	Amarilla; forma circular, borde liso, elevada, superficie lisa, brillante, consistencia cremosa.	

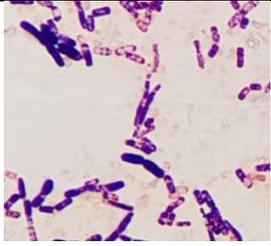
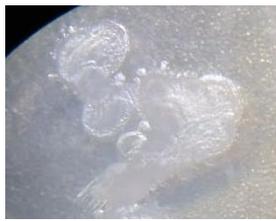
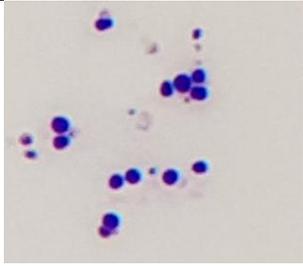
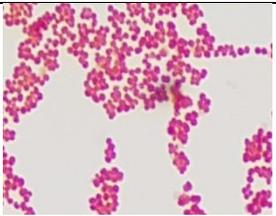
<p>198 LI</p>	 <p>cocos</p>	<p>Amarilla; forma circular, borde liso, elevación plana, superficie lisa, brillante, consistencia cremosa.</p>	
<p>PR46 PR</p>	 <p>Bacilos</p>	<p>Amarilla; forma circular, borde liso, plana, superficie lisa, brillante, consistencia cremosa.</p>	
<p>PB3 PB</p>	 <p>Bacilos</p>	<p>Amarillas; forma circular, borde liso, plana, superficie lisa, traslucida, consistencia mucoide.</p>	
<p>127 N/A</p>	 <p>Bacilos</p>	<p>Amarilla; forma irregular, borde liso, elevación plana, superficie seca, luz opaca, consistencia cremosa.</p>	
<p>94 N/A</p>	 <p>Bacilos</p>	<p>Amarilla; forma circular, borde liso, elevación plana, superficie lisa, brillante, consistencia cremosa.</p>	

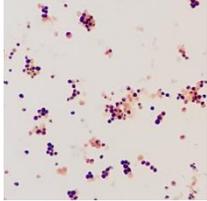
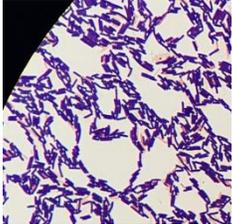
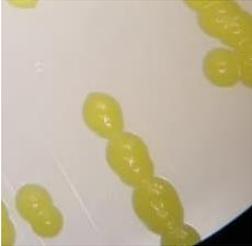
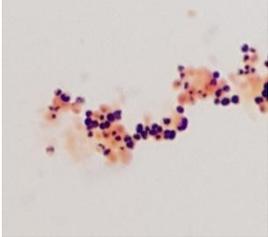
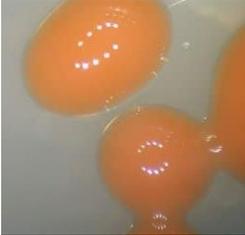
<p>579 LI</p>	 <p>Bacilos</p>	<p>Blanquecina; forma irregular, borde ondulado, elevación umbilicada, superficie rugosa, luz opaca, consistencia seca</p>	
<p>108 N/A</p>	 <p>Cocos</p>	<p>Amarillas; forma redonda, borde liso, elevación convexa, superficie lisa, brillante consistencia mucoide</p>	
<p>PR121-1 PR</p>	 <p>Bacilos</p>	<p>Blanquecino; forma circular, borde liso, convexo, superficie lisa, brillante, consistencia mucoide.</p>	
<p>PR118 PR</p>	 <p>Bacilos</p>	<p>Blanquecino; forma irregular, borde ondulado, plana, superficie lisa, brillante, mucoide.</p>	
<p>PR58 PR</p>	 <p>Cocos</p>	<p>Naranjas; forma irregular, borde liso, plano, superficie lisa, brillante, mucoide.</p>	

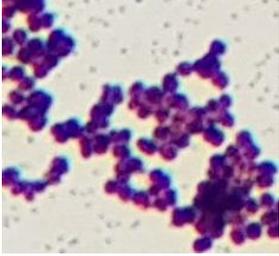
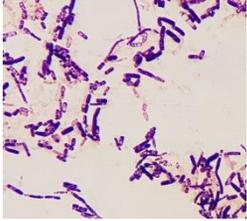
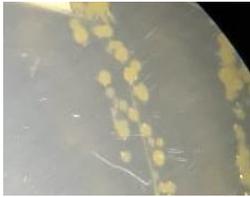
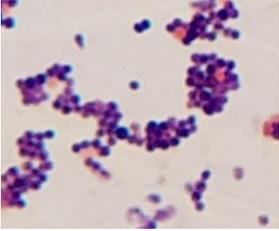
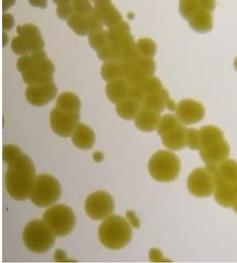
<p>PR120 PR</p>	 <p>Bacilos</p>	<p>Blanquecino; forma irregular, borde ondulado, plana, superficie seca, opaca, consistencia seca.</p>	
<p>PR1 PR</p>	 <p>Cocos</p>	<p>Naranja; forma circular, borde liso, convexa, superficie lisa, brillante, mucoide.</p>	
<p>PR121-2 PR</p>	 <p>Bacilos</p>	<p>Blanquecino; forma irregular, borde liso, convexa, superficie lisa, brillante, cremosa.</p>	
<p>PR93 PR</p>	 <p>Actinomiceto</p>	<p>Crema; forma irregular, bordes rugosos, superficie rugosa, opaca, consistencia seca.</p>	
<p>PR2 PR</p>	 <p>Cocos</p>	<p>Naranja; forma circular, borde liso, convexa, superficie lisa, brillante, mucoide.</p>	

<p>PR25 PR</p>	 <p>Cocos</p>	<p>Naranja; forma circular, borde liso, convexa, superficie lisa, brillante, mucoide.</p>	
<p>PR3 PR</p>	 <p>Cocos</p>	<p>Naranja; forma circular, borde liso, convexa, superficie lisa, brillante, mucoide.</p>	
<p>PR85 PR</p>	 <p>Actinomiceto</p>	<p>Crema; forma irregular, bordes rugosos, superficie rugosa, opaca, consistencia seca.</p>	
<p>PR94 PR</p>	 <p>Actinomiceto</p>	<p>Crema; forma irregular, bordes rugosos, superficie rugosa, opaca, consistencia seca.</p>	
<p>696-2 N/A</p>	 <p>Bacilo</p>	<p>Naranja; forma circular, borde liso, convexa, superficie lisa, brillante, mucoide.</p>	

<p>PR116 PR</p>	 <p>Bacilo</p>	<p>Blanquecino; forma irregular, borde liso, convexa, superficie lisa, brillante, cremosa</p>	
<p>PR87 PR</p>	 <p>Bacilo</p>	<p>Blanquecino; forma irregular, borde liso, convexa, superficie lisa, brillante, cremosa</p>	
<p>PR9 PR</p>	 <p>Cocos</p>	<p>Naranja; forma circular, borde liso, convexa, superficie lisa, brillante, mucoide.</p>	
<p>PR119 PR</p>	 <p>Bacilos</p>	<p>Blanquecino; forma irregular, borde liso, convexa, superficie lisa, brillante, cremosa</p>	
<p>PR5 PR</p>	 <p>Coco</p>	<p>Naranja; forma circular, borde liso, convexa, superficie lisa, brillante, mucoide.</p>	
<p>PR106 PR</p>	 	<p>Amarillas; forma redonda, borde liso, elevación convexa, superficie lisa,</p>	

	Bacilo	brillante consistencia mucoide	
PR6 PR	 Cocos	Naranja; forma circular, borde liso, convexa, superficie lisa, brillante, mucoide.	
PR117 PR	 Bacilos	Blanquecino; forma irregular, borde liso, plana, superficie rugosa, opaca, seca.	
PR48 PR	 Cocos	Naranja; forma circular, borde liso, convexa, superficie lisa, brillante, mucoide.	
PR114 PR	 Actinomiceto	Blanquecino; forma irregular, borde rugoso, superficie rugosa, opaca, seca	
PR88 PR	 Cocos	Blanquecino; forma irregular, borde liso, convexa, superficie lisa, brillante, cremosa	

<p>705 PA</p>	 <p>Bacilo</p>	<p>Negro; forma irregular, borde rugoso, superficie rugosa, opaca, seca</p>	
<p>PR95 PR</p>	 <p>Bacilo</p>	<p>Amarillas; forma redonda, borde liso, elevación convexa, superficie lisa, brillante consistencia mucoide</p>	
<p>205 LI</p>	 <p>Cocos</p>	<p>Naranja; forma circular, borde liso, convexa, superficie lisa, brillante, mucoide.</p>	
<p>PB2 PB</p>	 <p>Bacilos</p>	<p>Amarillas; forma redonda, borde liso, elevación convexa, superficie lisa, brillante consistencia mucoide</p>	
<p>645 LI</p>	 <p>Cocos</p>	<p>Naranja; forma circular, borde liso, convexa, superficie lisa, brillante, mucoide.</p>	

<p>PR46-B PR</p>	 <p>Cocos</p>	<p>Naranja; forma circular, borde liso, convexa, superficie lisa, brillante, mucoide.</p>	
<p>PR16 PR</p>	 <p>Bacilo</p>	<p>Amarillas; forma redonda, borde liso, elevación convexa, superficie lisa, brillante consistencia mucoide</p>	
<p>PR122 PR</p>	 <p>Cocos</p>	<p>Amarillas; forma redonda, borde liso, elevación convexa, superficie lisa, brillante consistencia mucoide</p>	

IL = Laguna Intermedia, **PR**= Poza Roja, **PB**= Poza Becerra, **PA**= Poza Azul, **N/A**= No aplica

ANEXO 2. Listado de aislados positivos y negativos para ensayos de solubilización de fosfato, producción de sideróforos, fijación de nitrógeno y producción de auxinas.

Aislado	Solubilización de fosfato	Sideróforos	Fijación de nitrógeno	Producción auxinas	ID
187				+	<i>Micrococcus</i> sp. KY327799
95			+		
696-1			+	+	
685				+	<i>Micrococcus</i> <i>yunannensis</i> KY434663
198	+		+	+	<i>Kocuria rhizophila</i> KY434635
PR46-A				+	<i>Pseudokineococcus</i> <i>marinus</i> AL30 KU258227.1
PB3			+	+	<i>Arthrobacter</i> sp. KY327809
127					
94					
579	+				<i>Microbacterium</i> sp. KY434330
108	+			+	
121-1					<i>Bacillus pomilus</i> KY316438
PR118					
PR58					
PR120					
PR1		+		+	

PR121-2			+		<i>Bacillus pomilus</i> KY316438
PR93					
PR2		+			
PR25		+	+	+	
180		+			<i>Glycomyces endophyticus</i> NR_044432.1
PR3					
PR85					
PR94		+	+		<i>Streptomyces</i> sp. KY271788
696-2					<i>Blastococcus</i> sp. KY4341185
PR116					
PR87		+	+		
PR9	+		+	+	
PR119	+				
PR5	+			+	
PR106			+		
PR6		+	+	+	
PR117		+	+		<i>Bacilli bacterium</i> IC217427
PR48					
PR114			+		
PR88					<i>Planococcus maritimus</i> Xmb052 KT986178.1
705	+				
PR95	+				

205					
PB2					
645		+	+		
PR46-B					
PR16					
PR122		+			<i>Streptomyces</i> sp. KU921107.1