



*Celaya Guanajuato, 07 de abril de 2024*

**DRA. ISaura ARREGUÍN ARREGUÍN**  
**DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS**  
**DE LA SALUD E INGENIERÍAS**

**P R E S E N T E**

Empleo este medio a fin de informar a usted que el trabajo de titulación en la modalidad de TESIS, cuyo título es **"CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE RIZOBACTERIAS DE SUELOS DE LA SIERRA DE LOS AGUSTINOS DEL ESTADO DE GUANAJUATO"** y que fue realizado por la estudiante **Lucero Alejandra Gonzalez Tejeda**, cumple con los requisitos teóricos-metodológicos necesarios para ser presentado y defendido ante el jurado. Por lo anterior, le solicitamos de su autorización para que la alumna continúe con sus trámites de obtención de grado, nos permitimos hacer la siguiente propuesta:

Fecha: 22 de mayo 2024, Hora: 16:00 horas, Lugar: Sala audiovisual de la sede Mutualismo. Sin otro asunto en particular, nos despedimos de usted y le solicitamos atentamente comunicarnos su respuesta a los correos electrónicos: [be.gomez@ugto.mx](mailto:be.gomez@ugto.mx), [laura.mejia@ugto.mx](mailto:laura.mejia@ugto.mx), [am.chapa@ugto.mx](mailto:am.chapa@ugto.mx), [perez.s@ugto.mx](mailto:perez.s@ugto.mx), [la.gonzaleztejeda@ugto.mx](mailto:la.gonzaleztejeda@ugto.mx)

**ATENTAMENTE**

**"LA VERDAD OS HARA LIBRES"**

Dra. Blanca Estela Gómez Luna  
Directora de Tesis

---

# UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO



Campus Celaya-Salvatierra  
División de Ciencias de la Salud e Ingenierías

## **CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE RIZOBACTERIAS DE SUELOS DE LA SIERRA DE LOS AGUSTINOS DEL ESTADO DE GUANAJUATO**

Tesis

que para obtener el título de Ingeniero en Biotecnología presenta:

**Lucero Alejandra Gonzalez Tejeda**

Director:

Dra. Blanca Estela Gómez Luna

Codirector:

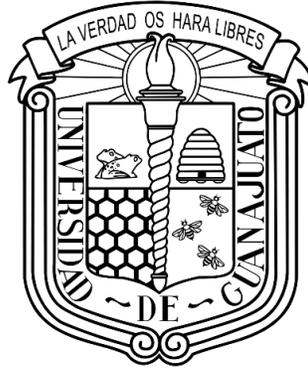
Dr. Rafael Alejandro Veloz García

Celaya, Guanajuato

Abril, 2024



# UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO



Campus Celaya-Salvatierra  
División de Ciencias de la Salud e Ingenierías

## **CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE RIZOBACTERIAS DE SUELOS DE LA SIERRA DE LOS AGUSTINOS DEL ESTADO DE GUANAJUATO**

Tesis

que para obtener el título de Ingeniero en Biotecnología presenta:

**Lucero Alejandra Gonzalez Tejeda**

Director:

Dra. Blanca Estela Gómez Luna

Codirector:

Dr. Rafael Alejandro Veloz García

Celaya, Guanajuato

Abril, 2024





## DEDICATORIA

*A mi madre, a quien amo más que nadie en el mundo y quien con sus esfuerzos hizo posible la realización de este logro.*

*A mis hermanas, que me han amado y cuidado incondicionalmente y me han ayudado a ser la mejor versión de mí misma.*

*A mis profesores, que todos los días se esfuerzan para compartir sus conocimientos y formar así alumnos académicamente competentes y humanos.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Este proyecto fue gracias al programa institucional XXVII Verano de la Ciencia impartido por la Universidad de Guanajuato, que hizo posible su desarrollo a través del uso de sus instalaciones y equipo de investigación, así como su financiamiento por medio de la Beca de Investigación otorgada por la Coordinación de Becas UG.

Agradezco profundamente a mis codirectores de tesis: la Dr. Blanca Estela Gómez Luna, quien me apoyó en cada paso con su orientación y asesoramiento, y al Dr. Rafael Alejandro Veloz García, quien hizo posible este proyecto.

Este trabajó formó parte del XX encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia, organizado por el Centro de Investigaciones en Óptica bajo el nombre de “S3-BCA21 CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS BACTERIANOS DE SUELO DE LA SIERRA DE LOS AGUSTINOS” (ver Apéndice 1). Asimismo, también formó parte del Foro de Investigación CMII 2023 organizado por la Universidad de Guanajuato bajo el nombre “Caracterización cualitativa de aislados bacterianos de suelo de la Sierra de los Agustinos” (ver Apéndice 2).

## RESUMEN

En el presente estudio se llevó a cabo la caracterización metabólica y microbiológica de bacterias obtenidas de la rizosfera de árboles de encino provenientes del Área Natural Protegida (ANP) “Sierra de los Agustinos”, en el estado de Guanajuato. Estas demostraron poseer características asociadas a las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal, ya que se obtuvieron 52 aislados que reportaron actividad positiva para la enzima ACC desaminasa; 37 aislados presentaron actividad favorable para la solubilización de fosfatos; 2 aislados presentaron actividad favorable para la solubilización de potasio; 34 aislados presentaron actividad favorable para la producción de sideróforos; 47 aislados presentaron actividad favorable para la producción de celulastas; 29 aislados fueron capaces de producir exopolisacáridos de fenotipo mucoide; 21 aislados presentaron actividad favorable para la producción de ácido indol acético; 23 aislados tuvieron un porcentaje de germinación y vigorosidad superior al control en semillas de lenteja; 23 aislados tuvieron un porcentaje de germinación y vigorosidad superior al control en semillas de pepino; 2 aislados presentaron actividad favorable para la producción de compuestos volátiles que inhibieron el crecimiento del hongo *Fusarium* spp. durante un mes y 8 aislados presentaron actividad favorable para la producción de compuestos volátiles que inhibieron el crecimiento del hongo *Rizoctonia* spp. durante dos semanas.

## ABSTRACT

In the present study was carried out the metabolic and microbiological characterization of bacteria obtained from the rhizosphere of oak trees from the Natural Protected Area (NPA) "Sierra de los Agustinos", in the state of Guanajuato. These showed characteristics associated with plant growth-promoting rhizobacteria since 52 isolates reported positive activity of the enzyme ACC deaminase; 37 isolates showed favorable activity for phosphate solubilization; 2 isolates showed favorable activity for potassium solubilization; 34 isolates showed favorable activity for the production of siderophores; 47 isolates showed favorable activity for the production of cellulases; 29 isolates were able to produce exopolysaccharides of mucoid phenotype; 21 isolates showed favorable activity for the production of indole acetic acid; 23 isolates had a higher germination percentage and vigorousness than the control in lentil seeds; 23 isolates had a higher germination percentage and vigorousness than the control in cucumber seeds; 2 isolates showed favorable activity for the production of volatile compounds that inhibited the growth of *Fusarium* spp. fungus during one month; and 8 isolates showed favorable activity for the production of volatile compounds that inhibited the growth of *Fusarium* spp. during one month for one month and 8 isolates showed favorable activity for the production of volatile compounds that inhibited the growth of *Rhizoctonia* spp. for two weeks.

# ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN .....	i
ABSTRACT .....	ii
ÍNDICE .....	iii
ÍNDICE DE TABLAS .....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Justificación .....	3
1.2 Hipótesis .....	3
1.3 Objetivos.....	3
1.3.1 Objetivo general .....	3
1.3.2 Objetivos específicos .....	4
2 ANTECEDENTES.....	5
2.1 Áreas Naturales Protegidas.....	6
2.1.1 Sierra de los Agustinos.....	8
2.2 Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal.....	10
2.3 Mecanismos directos .....	11
2.3.1 Actividad de la enzima ACC desaminasa.....	11
2.3.2 Solubilización de fosfatos .....	13
2.3.3 Solubilización de potasio.....	14

2.3.4	Producción de AIA .....	15
2.4	Mecanismos indirectos .....	17
2.4.1	Producción de sideróforos.....	17
2.4.2	Producción de enzimas.....	18
2.4.3	Producción de exopolisacáridos .....	18
2.4.4	Producción de compuestos volátiles .....	19
2.5	Cultivo de lenteja .....	20
2.6	Cultivo de pepino.....	22
3	METODOLOGÍA.....	24
3.1	Muestreo del suelo.....	24
3.2	Aislamiento, purificación y actividad de la enzima ACC desaminasa.....	24
3.3	Tinción de Gram.....	25
3.4	Solubilización de fosfatos.....	26
3.5	Determinación cuantitativa de solubilización de fosfatos.....	26
3.6	Solubilización de potasio.....	30
3.7	Producción de sideróforos .....	30
3.8	Actividad de enzimas extracelulares.....	31
3.8.1	Actividad de celulasas .....	31
3.8.2	Actividad de quitinasas .....	32
3.9	Producción de exopolisacáridos (EPS) .....	32
3.10	Producción de ácido indol acético.....	33
3.11	Pruebas de germinación, vigorosidad y biomasa.....	34
3.11.1	Lenteja ( <i>Lens culinaris</i> ) .....	34
3.11.2	Pepino ( <i>Cucumis sativus</i> ).....	35

3.12	Producción de compuestos volátiles para la inhibición de hongos fitopatógenos	36
3.12.1	<i>Fusarium spp</i> .....	36
3.12.2	<i>Rhizoctonia spp</i> .....	37
3.13	Preservación de los aislados bacterianos .....	37
3.14	Análisis estadístico.....	37
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
4.1	Aislamiento, purificación y actividad de la enzima ACC desaminasa.....	38
4.2	Tinción de Gram.....	40
4.3	Determinación cualitativa de solubilización de fosfatos .....	42
4.4	Determinación cuantitativa de solubilización de fosfatos.....	45
4.5	Solubilización de potasio.....	48
4.6	Producción de sideróforos .....	51
4.7	Presencia de enzimas extracelulares .....	54
4.7.1	Actividad de celulasas .....	54
4.7.2	Presencia de quitinasas .....	56
4.8	Producción de exopolisacáridos (EPS) .....	59
4.9	Producción de ácido indol acético .....	61
4.10	Pruebas de germinación, vigorosidad y biomasa .....	65
4.10.1	Lenteja ( <i>Lens culinaris</i> ) .....	65
4.10.2	Pepino ( <i>Cucumis sativus</i> ).....	68
4.11	Producción de compuestos volátiles para la inhibición de hongos fitopatógenos .....	74
4.11.1	<i>Fusarium spp</i> .....	74
4.11.2	<i>Rhizoctonia spp</i> .....	76

5	CONCLUSIONES.....	82
6	REFERENCIAS.....	83
7	APÉNDICES .....	107

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 3.5 Volúmenes de reactivos para la curva patrón de fosfatos .....	29
Tabla 3.10 Volúmenes de reactivos para la curva patrón de ácido indol acético.....	34
Tabla 4.1 Análisis de las pruebas cualitativas para la producción de la enzima ACC desaminasa .....	39
Tabla 4.2 Características morfológicas de los aislados bacterianos .....	40
Tabla 4.3 Resultados de la evaluación cualitativa para la solubilización de fosfatos .....	42
Tabla 4.4 Resultados de la evaluación cuantitativa para la solubilización de fosfatos .....	45
Tabla 4.5 Resultados de la evaluación cualitativa para la solubilización de potasio .....	48
Tabla 4.6 Resultados de la evaluación cualitativa para la producción de sideróforos .....	51
Tabla 4.7.1 Resultados de la evaluación cualitativa para la actividad de celulasas.....	54
Tabla 4.7.2 Resultados de la evaluación cualitativa para la producción de quitinasas .....	56
Tabla 4.8 Resultados de la evaluación cualitativa para la producción de exopolisacáridos	59
Tabla 4.9 Resultados de la evaluación cuantitativa para la producción de AIA.....	62
Tabla 4.10.1 Resultados de las pruebas de germinación e índice de vigorosidad de lenteja .....	65
Tabla 4.10.2 Resultados de las pruebas de germinación e índice de vigorosidad de lenteja .....	72
Tabla 4.11 Resultados de las pruebas para la caracterización de las rizobacterias .....	79

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 2.1 Distribución de las ANP en el estado de Guanajuato .....	7
Figura 2.1.1 Mapa de la Sierra de los Agustinos .....	9
Figura 2.2 Microbioma vegetal y su interacción con la planta .....	10
Figura 2.3.1 Reacción de la enzima ACC desaminasa en las reacciones de síntesis y degradación del ACC como precursor del etileno.....	12
Figura 2.3.2 Mitigación del estrés en plantas mediado por la producción de 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa .....	13
Figura 2.3.4 Rutas para la biosíntesis de AIA en bacterias .....	16
Figura 4.1 Crecimiento de los aislados en el medio selectivo para la actividad de ACC desaminasa .....	38
Figura 4.2 Morfología y tinción de Gram de los aislados.....	41
Figura 4.3 Solubilización de fosfato en medio Pikovskaya modificado.....	44
Figura 4.4.1 Curva de calibración de fosfatos. ....	45
Figura 4.4.2 Determinación cuantitativa de fosfatos.....	47
Figura 4.5 Solubilización de potasio en medio Pikovskaya modificado .....	50
Figura 4.6 Producción de sideróforos en medio CAS modificado.....	53
Figura 4.7.1 Producción de celulasas en medio Mandels y Reese adicionado .....	56
Figura 4.7.2 Producción de quitinasas en medio Agar Czapek adicionado.....	58
Figura 4.8 Producción de EPS mucoides y no mucoides. ....	61
Figura 4.9.1 Curva de calibración de AIA. ....	62

Figura 4.9.2 Producción de AIA de cada aislado.....	64
Figura 4.10.1 Vista superior de las plántulas de lenteja a una semana de crecimiento .....	67
Figura 4.10.2 Vista del área radicular de las semillas de lenteja.....	68
Figura 4.10.3 Vista superior de las plántulas de pepino a una semana de crecimiento .....	70
Figura 4.10.4 Vista del área radicular de las semillas de pepino.....	71
Figura 4.11.1 Inhibición del crecimiento de <i>Fusarium</i> spp. por los COVs producidos por rizobacterias después de siete días en incubación .....	74
Figura 4.11.2 Inhibición del crecimiento de <i>Fusarium</i> spp. por los COVs producidos por rizobacterias después de catorce días en incubación.....	75
Figura 4.11.3 Inhibición del crecimiento de <i>Fusarium</i> spp. por los COVs producidos por rizobacterias después de veintiún días en incubación.....	75
Figura 4.11.4 Inhibición del crecimiento de <i>Fusarium</i> spp. por los COVs producidos por rizobacterias después de treinta días en incubación.....	75
Figura 4.11.5 Inhibición del crecimiento de <i>Rhizoctonia</i> spp. por los COVs producidos por rizobacterias después de siete días en incubación .....	77
Figura 4.11.6 Inhibición del crecimiento de <i>Rhizoctonia</i> spp. por los VOCs producidos por rizobacterias después de catorce días en incubación.....	78

# 1 INTRODUCCIÓN

La agricultura en México es el subsector que actualmente genera más recursos económicos, proveyendo así de alimentos, materia prima y mano de obra al sector agroindustrial, beneficiando a innumerables familias mexicanas y siendo además parte del patrimonio e identidad cultural de nuestro país (SADER, 2018). El sector agrícola mexicano es uno de los líderes en América Latina, siendo el principal país productor de hortalizas en la región latinoamericana y ocupando la segunda posición en el cultivo de fruta, solo por detrás de Brasil.

El sector agrícola no ha parado de crecer, con un valor de producción que superó los 880,000 millones de pesos mexicanos a finales de 2022 (Statista, 2024). Sin embargo, esta alza en el sector ha forzado la producción intensiva de cultivos, las cuales son fácilmente implementadas por grandes agricultores establecidos comercialmente a diferencia de los pequeños agricultores rurales que no cuentan con las mismas oportunidades, potenciando así la polarización económica, desvalorizando las técnicas tradicionales y del medio rural e incrementando el uso excesivo de fertilizantes sintéticos, generando un impacto negativo a nivel ambiental, poniendo en riesgo la salud de productores, consumidores y los recursos productivos, genéticos y la biodiversidad (Chávez-Díaz y otros, 2021).

Debido a lo anterior, en los últimos años se han estado trabajando para nuevas alternativas que permitan sustituir a los agroquímicos sintéticos por compuestos más amigables para el ambiente y las personas, encontrando viable la utilización de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal como inoculantes microbianos (Moreno-Reséndez y otros, 2018)

Actualmente, en la Universidad de Guanajuato se han estado realizando investigaciones sobre las aplicaciones de la inoculación de estas rizobacterias. Santoyo de

la Cruz y otros (2023) utilizaron rizobacterias en semillas de alfalfa en dos tipos de suelo regado con aguas residuales y de pozo. Mendoza-Hernández y otros (2023) trabajaron con rizobacterias provenientes de jales de mina de Zimapán, Hidalgo para la redistribución de elementos potencialmente tóxicos en jales de minas. Ramírez y Gómez (2015) utilizaron rizobacterias provenientes del cerro de “Las Cruces” en semillas de cilantro y pepino para medir la inhibición frente al hongo *Bipolaris* sp., e Hidalgo (2015) trabajó con rizobacterias aisladas de huertos de guayaba ubicados en Salvatierra en semillas de pepino y guayaba.

Asimismo, la utilización de rizobacterias provenientes de Áreas Naturales Protegidas (ANP) del estado de Guanajuato ha sido objeto de estudio en los últimos años. A través de comunicación directa, se reportó la utilización de rizobacterias provenientes del cerro “El Culiacán” para evaluar su actividad antagónica frente hongos fitopatógenos y de obtención de rizobacterias provenientes del cerro “El Culiacán” y “La Gavia”, las cuales se aislaron y caracterizaron microbiológica y metabólicamente, sirviendo esto como antecedente directo para el desarrollo de este trabajo. El objetivo de este trabajo es realizar un aislamiento y caracterización microbiológica y metabólica de bacterias provenientes de muestras de suelo de la “Sierra de los Agustinos”, una ANP del estado de Guanajuato.

## **1.1 Justificación**

El estado de Guanajuato cuenta con una biodiversidad excepcional y con una gran variedad de ecosistemas, las cuales albergan una diversidad microbiológica que no ha sido completamente explorada. Entre estos microorganismos, las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal han demostrado ser una herramienta eficaz para mejorar el rendimiento de cultivos agrícolas a través del aumento de disponibilidad de elementos nutritivos para el crecimiento de las plantas (Moreno-Reséndez y otros, 2018), reduciendo con esto la dependencia de fertilizantes químicos y pesticidas sintéticos.

Sin embargo, existe muy poca información respecto a la diversidad y potencial de estas rizobacterias en ecosistemas específicos, como las Áreas Naturales Protegidas de Guanajuato. Esta investigación se enfoca en las rizobacterias provenientes de la “Sierra de los Agustinos” para identificar aislados bacterianos con potencial para promover el crecimiento y salud de cultivos importantes para el estado, como la lenteja o el pepino. Al trabajar con estos microorganismos nativos de la región como potenciales biofertilizantes, se busca obtener información sobre los mecanismos de acción involucrados en la promoción vegetal y la resistencia sistémica a enfermedades. Esto permitirá el desarrollo de estrategias de manejo más eficientes y sostenibles para la agricultura en Guanajuato, contribuyendo así a la seguridad alimentaria y la conservación de los ecosistemas locales.

## **1.2 Hipótesis**

Las rizobacterias obtenidas del suelo del ANP “Sierra de los Agustinos” en el estado de Guanajuato tienen el potencial biotecnológico para utilizarse como promotoras de crecimiento vegetal a través de la producción de fitohormonas, metabolitos antifúngicos y actividades enzimáticas propias de este tipo de bacterias.

## **1.3 Objetivos**

### **1.3.1 Objetivo general**

Aislar y caracterizar microbiológica y metabólicamente rizobacterias del ANP “Sierra de los Agustinos” del estado de Guanajuato.

### **1.3.2 Objetivos específicos**

1. Determinar la actividad de la enzima ACC desaminasa en los aislados de las rizobacterias.
2. Evaluar en los aislados de las rizobacterias características asociadas a los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal (producción de fosfato, potasio, sideróforos, enzimas líticas, AIA, etcétera).
3. Evaluar el incremento en la germinación, índice de vigorosidad y biomasa en semillas de plantas de lenteja y pepino.
4. Evaluar la actividad de compuestos volátiles como agentes de control biológico frente a hongos fitopatógenos.

## 2 ANTECEDENTES

Actualmente, la agricultura representa una de las actividades humanas más demandadas a nivel global, pues no solo es la principal fuente de alimentos tanto para personas como para animales destinados al consumo humano, sino que también es un promotor esencial en el crecimiento económico de los países. En México, por ejemplo, al cierre del 2022 el sector agrícola presentó un crecimiento de 0.9% respecto al año anterior, impulsado por una mayor producción de frutas, hortalizas y forrajes y, en términos de valor, equivalió más de 7 billones de pesos, incrementando un 7.2% con referencia a 2021 (SIAP, 2023).

México es un país megadiverso, tanto en ecosistemas como en climas, por lo que los requerimientos de clima y suelo de un elevado número de cultivos agrícolas son óptimos para su escalamiento, lo que ha permitido posicionar al país como uno de los mayores productores a nivel global de productos agrícolas, entre los cuales encontramos el maíz grano blanco y amarillo, trigo, sorgo, jitomate, lenteja, soya, etcétera. Esto ha permitido que el Producto Interno Bruto (PIB) haya tenido un alza de 3.1%, recuperándose así de los estragos económicos ocasionados por la pandemia global del COVID-19 (IMCO, 2023).

Sin embargo, en los últimos años la agricultura se ha encontrado en una creciente presión derivada del aumento poblacional, así como los patrones insostenibles de producción y consumo global (Cuadras-Berrelleza y otros, 2021). Debido a esto, los productores han tenido que recurrir a la agricultura intensiva para poder suplir las demandas tan elevadas de alimentos en plazos límite de tiempo, afectando con esto la sustentabilidad y la calidad de los suelos, comprometiendo las propiedades fisicoquímicas y microbianas que permiten a este ser fértil y producir productos sanos (Andrade y otros, 2021).

Asimismo, la aplicación y uso indiscriminado de agroquímicos necesarios para el control de plagas y organismos nocivos, las necesidades en el aumento de la fertilidad del

suelo, la mejora del rendimiento de los productos y de la preservación de la calidad de las cosechas han comprometido la calidad del ecosistema; la aplicación necesaria de los agroquímicos hace que sus residuos se arrastren a través de corrientes de agua y aire que permiten su transporte a grandes distancias; además, algunos de estos residuos son volátiles y pueden llegar a la atmósfera y regresar a la tierra a otros lugares (López-Geta y otros, 1992).

Esta es la razón por lo que se han buscado alternativas que puedan reemplazar los agroquímicos, encontrándose en este campo el uso de biofertilizantes, los cuales son ecológicos, no presentan toxicidad al ambiente ni bioacumulación, son fáciles de aplicar y ayudan a mantener la biodiversidad y estructura de los suelos agrícolas (Nosheen y otros, 2021). En este contexto, actualmente se han empleado rizobacterias promotoras de crecimiento de plantas.

## **2.1 Áreas Naturales Protegidas**

Se les conoce como Áreas Naturales Protegidas (ANP) a aquellos suelos que no han sido alterados por el hombre ni han sido comprometidas sus propiedades fisicoquímicas por las acciones antropogénicas, conservando intactas las comunidades de microorganismos que la habitan (Gómez y otros, 2021). Estos microorganismos, como parte de los componentes bióticos del suelo, desarrollan diversas funciones importantes que influyen en la calidad y salud del suelo y del ecosistema, tales como la degradación de materia orgánica, formación del suelo y humus, reciclado y disponibilidad de nutrientes, forma de asociaciones simbióticas con plantas, ser bioindicadores de la fertilidad del suelo, ayudar en la absorción de agua en las plantas, mejorar su tasa fotosintética y desarrollar defensas contra fitopatógenos. Y aunque este grupo de microorganismos suele estar conformado por hongos, algas y bacterias, estas últimas han sido objeto de estudio los últimos años debido a la cantidad de acciones orientadas en el cuidado y mantenimiento de la calidad del suelo (Morocho & Leiva-Mora, 2019).

De acuerdo con la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP, 2020), en nuestro país existen 182 ANP en el sistema federal, las cuales abarcan una superficie total de 90 millones 839 mil 522 hectáreas; de esta superficie total, 21 millones

380 mil 773 hectáreas, es decir el 23.6% corresponde a ecosistemas terrestres continentales, dulceacuícolas e insulares; y, 69 millones 458 mil 748 hectáreas, o sea el 76.4%, a ecosistemas marinos. A estas categorías, se adicionan las 336 Áreas Destinadas Voluntariamente a la Conservación (ADVC) certificadas por la CONANP.

En Guanajuato se encuentran 23 ANP estatales distribuidas en 28 de los 46 municipios de la entidad, como se muestra en la Figura 2.1. Estas áreas tienen una extensión de 346 505.39 ha, lo que constituye el 83.93% de la superficie forestal estatal, lo que representa el 11.32% de la superficie total del estado. La entidad cuenta, además, con 583 388.15 ha bajo el régimen de protección, representando un 19.06% del territorio del estado (CONABIO, 2021), la cual tiene el propósito de conformar un conjunto de espacios, naturales o seminaturales, representativos de la biodiversidad y sus ecosistemas, que contribuyan al logro de determinados objetivos de conservación y desarrollo.



Figura 2.1 Distribución de las ANP en el estado de Guanajuato. Fuente: elaboración propia.

### 2.1.1 Sierra de los Agustinos

La Sierra de los Agustinos es conocida como una de las principales sierras del estado de Guanajuato, dada su riqueza biológica y sus abundantes escurrimientos superficiales que se infiltran en los acuíferos de la región. Comprende 29 comunidades rurales con más de 14 000 habitantes, dedicados la gran mayoría de ellos a las actividades agropecuarias y forestales, por lo que fue declarada Área de Uso Sustentable cuyo objetivo es, según lo señalado en la Ley para la Protección y Preservación del Ambiente del Estado de Guanajuato, el de producir bienes y servicios que respondan a las necesidades económicas, sociales y culturales de la población, con base al aprovechamiento sustentable de los recursos naturales.

Comprende parte del norte del municipio de Acámbaro (2 397 ha), oeste de Jerécuaro (9 671.06 ha) y sureste del municipio de Tarimoro (7 177.85 ha), colinda al norte con las comunidades de la Cañada de Turados de Arriba y Casas Blancas, al sur con Santa Rosa y El Sauz, al este con San Pedro de los Agustinos y Vallecillo y al oeste con Los Hernandez, Avícolas y Rancho de Guadalupe. Su superficie es de 19 246 ha y entre sus principales elevaciones destacan el Cerro de los Agustinos, con 3 260 metros sobre el nivel del mar. Pertenece al sistema fisiográfico de volcanes con grandes elevaciones aisladas, relieve ligeramente escarpado y quebrado, pendientes pronunciadas, lomeríos y pequeños valles, producto de una intensa actividad volcánica (Instituto de Ecología del Estado, 2004). Su mapa topográfico se muestra en la Figura 2.1.1.

De acuerdo con la Secretaría de Medio Ambiente y Ordenamiento Territorial (SMAOT, 2011), es un importante hábitat para la fauna silvestre en la que se registran 3 especies de anfibios, 16 de reptiles, 145 de aves y 29 de mamíferos. De este total, 58 especies se encuentran en estatus de protección y/o endémicas. La vegetación principal en la zona es el bosque de encino y bosque tropical caducifolio, destacando cuatro especies de encino: *Quercus castanea*, *Quercus laurina*, *Quercus obtusata* y *Quercus rugosa*; pinquica (*Arctostaphylos pungens*), palo dulce (*Eysenhardtia polystachya*) y tepeguaje (*Lysiloma* sp)., entre otros. Asimismo, se reportan 531 especies de flora dentro del ANP.

Cuenta con yacimientos de minerales no metálicos como ópalo, perlita, caolín y arena sílica. Es productora de leña y plantas medicinales, aportando un beneficio social a los



Figura 2.1.1 Mapa de la Sierra de los Agustinos. Fuente: SMAOT (2011).

habitantes de la región. Se localiza el Acuífero de los Agustinos, lo que propicia la recarga de acuíferos de la región, teniendo un importante rol en la captura de carbono y, además, es parte de la ruta de la mariposa *Danaus plexippus* (Instituto de Ecología del Estado, 2004).

Presenta diversos problemas medioambientales como deforestación, fragmentación de ecosistemas, erosión, pérdida de especies de flora y fauna silvestre, pérdida de productividad de los suelos, disminución de la recarga de los mantos acuíferos, riesgo de derrumbes e inundaciones, sedimentación de cuerpos de agua y contaminación de espacios con residuos sólidos. Estos daños son ocasionados principalmente por la fuerte presión sobre los recursos naturales con la realización de actividades agrícolas, sobrepastoreo de ganado, eliminación de zonas boscosas, extracción de recursos, entre otros. Lo anterior ha hecho que el estado implemente programas de restauración ecológica, protección y aprovechamiento de los recursos naturales.

## 2.2 Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal

El término bacterias promotoras de crecimiento vegetal se emplea para describir bacterias que se establecen en las raíces de las plantas, específicamente en el área de la rizosfera, contribuyendo así al mejoramiento del crecimiento de las plantas (Vejan y otros, 2016). La rizosfera se define como el área del suelo que rodea las raíces de las plantas, siendo una región con una elevada actividad microbiana, lo que crea una reserva exclusiva de nutrientes esenciales, extraídos mediante la interacción microbiana. La población de microorganismos en la rizosfera difiere notablemente de la que se encuentra en su entorno circundante, debido principalmente a la presencia de exudados radiculares que sirven como fuente de nutrientes para el desarrollo microbiano (Burdman y otros, 2000), lo cual es corroborado a través de la cantidad de bacterias presentes en esta zona, la cual llega a ser de 10 a 100 veces mayor que la que se encuentra en el suelo (Weller & Thomashow, 1994). En la Figura 2.2 se muestra un diagrama de las interacciones entre planta y rizobacterias.

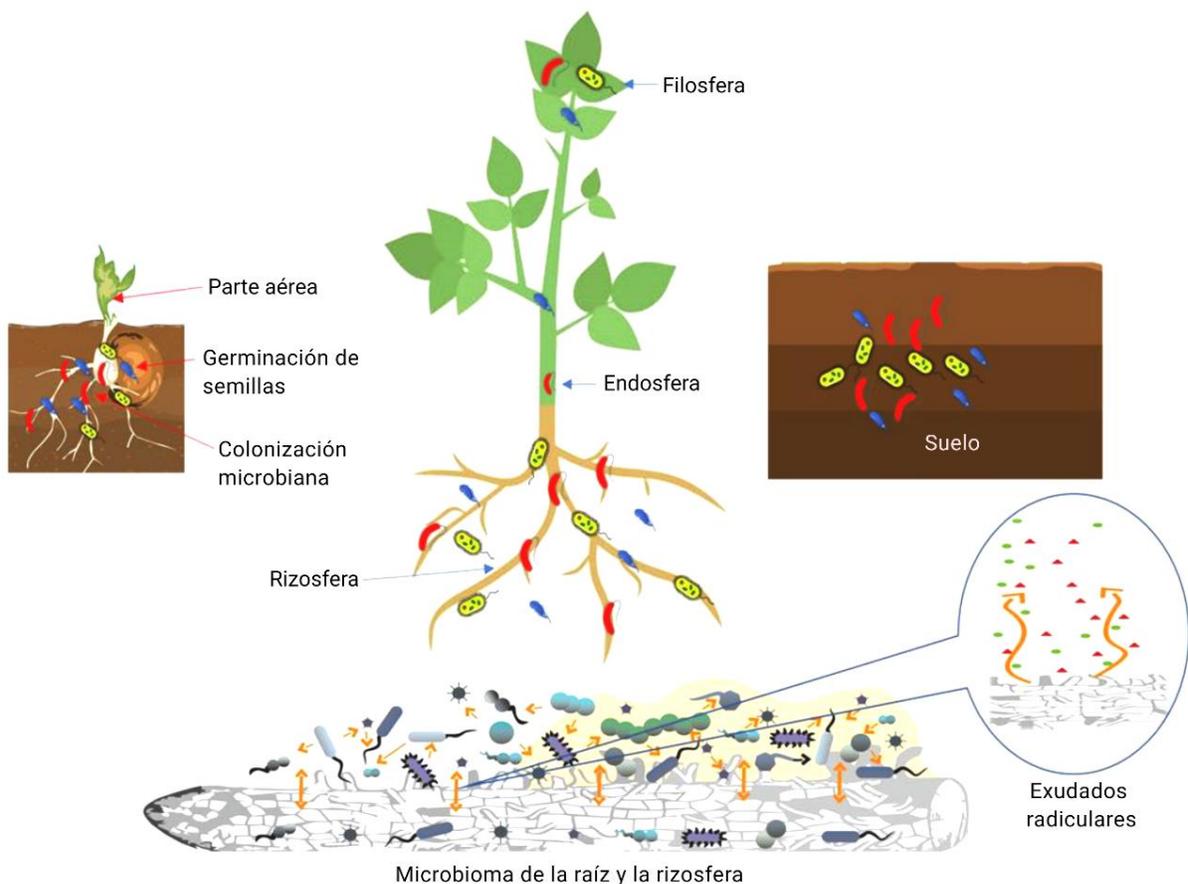


Figura 2.2 Microbioma vegetal y su interacción con la planta. Fuente: Ajijah y otros (2023).

La composición de los exudados radiculares de las plantas esta influenciada por diversos factores, como la especie vegetal, la fase de desarrollo, tipo de suelo, temperatura, humedad, pH y la disponibilidad de nutrientes. Los exudados radiculares también son responsables del control biológico al provocar la formación de biopelículas microbianas en la superficie de las raíces, ya que reduce la competencia de los patógenos por nutrientes y espacio (Zhou y otros, 2016; Chen y otros, 2012).

Se ha reportado que el uso de este tipo de microorganismos ha contribuido a combatir los cambios inducidos por el clima (factores abióticos) como las precipitaciones irregulares, salinización del suelo y el agua y contaminación por metales pesados, lo que limita el rendimiento general de las plantas (Jalal y otros, 2023). Las rizobacterias mejoran la fertilidad y la estructura del suelo, lo que contribuye a una adaptación favorable de la planta frente a condiciones de estrés (Alor y otros, 2017). Varios estudios han destacado el uso de bacterias de géneros como *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Herbaspirillum* y *Burkholderia* para estos propósitos (Zeffa y otros, 2018). Se ha establecido que el impacto positivo de estos en el crecimiento de plantas se logra a través de mecanismos de acción, los cuales han sido clasificados como directos e indirectos (Fahde y otros, 2023). La distinción entre ambos no siempre es clara; por lo general, los mecanismos indirectos suceden fuera de la planta mientras que los mecanismos directos afectan al metabolismo de la planta y ocurren dentro de esta (Goswami y otros, 2016).

## **2.3 Mecanismos directos**

### **2.3.1 Actividad de la enzima ACC desaminasa**

Ciertas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal contienen una enzima vital que regula la producción de etileno, el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa (EC 3.5.99.7), el cual es un precursor intermedio de la biosíntesis de etileno. En plantas superiores, el etileno se sintetiza a partir del aminoácido L-metionina que se encuentra en los exudados de la raíz y la acción de la enzima ACC desaminasa es capaz de metabolizarlo en  $\alpha$ -cetobutirato y amoníaco (Saleem y otros, 2007), evitando así la producción de etileno, como se observa en la Figura 2.3.1.1. A continuación se muestra la reacción química de este proceso:

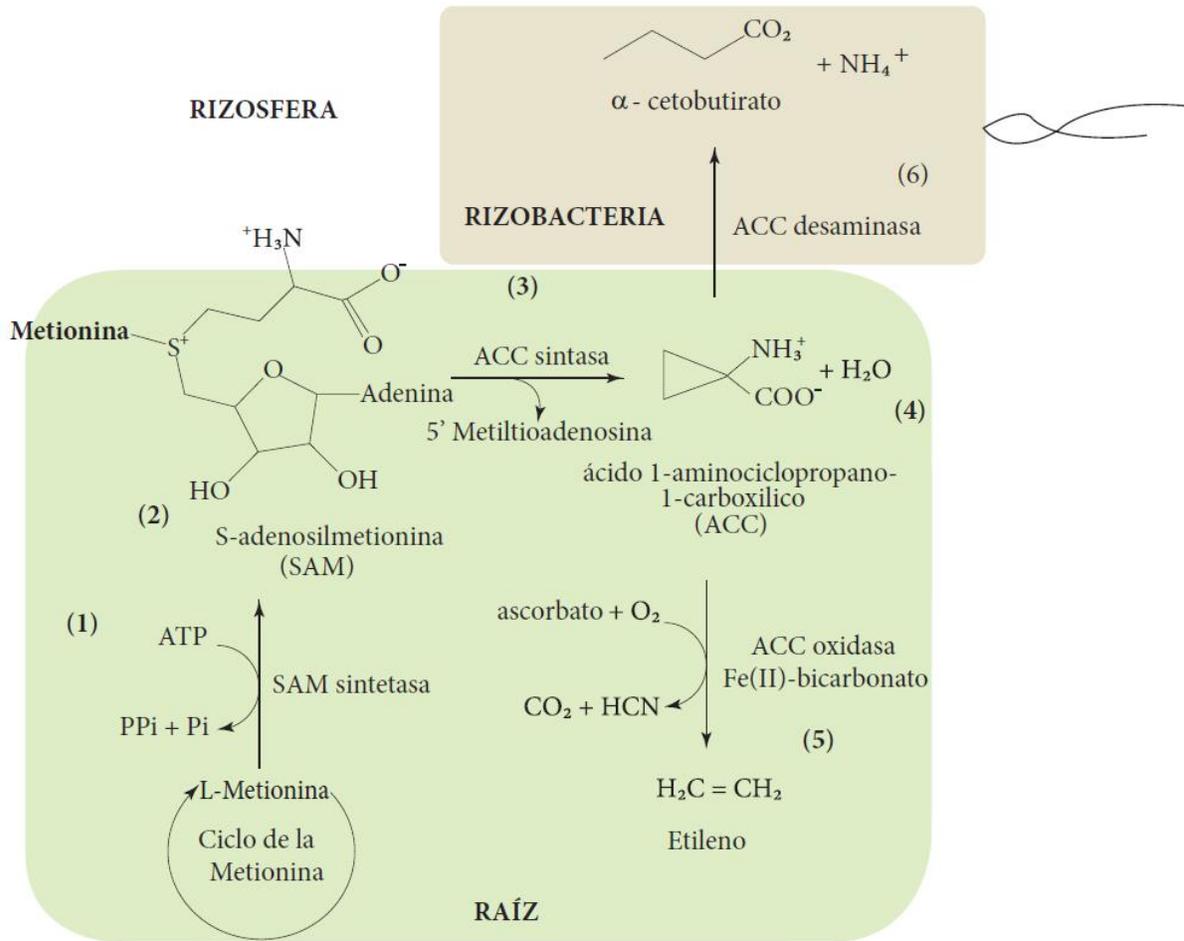
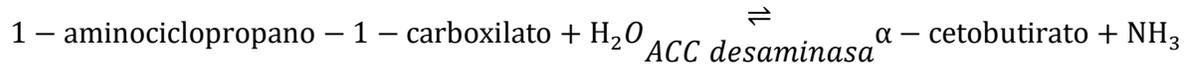


Figura 2.3.1 Reacción de la enzima ACC desaminasa en las reacciones de síntesis y degradación del ACC como precursor del etileno. Fuente: Esquivel-Cote y otros (2013).

La ACC desaminasa es una enzima clave en la regulación de los niveles de etileno en las plantas y los microorganismos asociados, y su presencia puede influir significativamente en el desarrollo y la salud de las plantas, especialmente en condiciones de estrés. El etileno es una fitohormona gaseosa producida en concentraciones más bajas y tiene funciones variadas en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Sin embargo, durante las etapas de formación y maduración del fruto, la concentración de etileno producido aumenta drásticamente (Ghorai y otros, 2021). Muchas plantas requieren de una elevada cantidad de etileno para romper la latencia de la semilla (Matilla, 2000), pero un elevado nivel de este compuesto después de la germinación es capaz de inhibir el crecimiento de la raíz. La

enzima ACC desaminasa actúa como un mecanismo para asegurar que el nivel de etileno no se eleve hasta el punto en que el crecimiento inicial no se vea afectado, además de que su descomposición en  $\alpha$ -cetobutirato y amoníaco sirve como fuente de carbono y nitrógeno, reduce la senescencia en las hojas y fomenta el crecimiento de las plantas (Bernard & Glick, 2015).

Las bacterias productoras de ACC desaminasa pueden colonizar las raíces de las plantas u optar por ser endófitas, residiendo en los tejidos internos de las plantas (Babu y otros, 2015) y absorber nutrientes de los exudados de las raíces, como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos y moléculas pequeñas como triptófano. Esto ayuda para la síntesis de ácido indol-3-acético (AIA) que ayuda a la producción de ACC sintasa en las plantas y que, a su vez, promueve la síntesis de ACC, como se puede observar en la Figura 2.3.1.2.

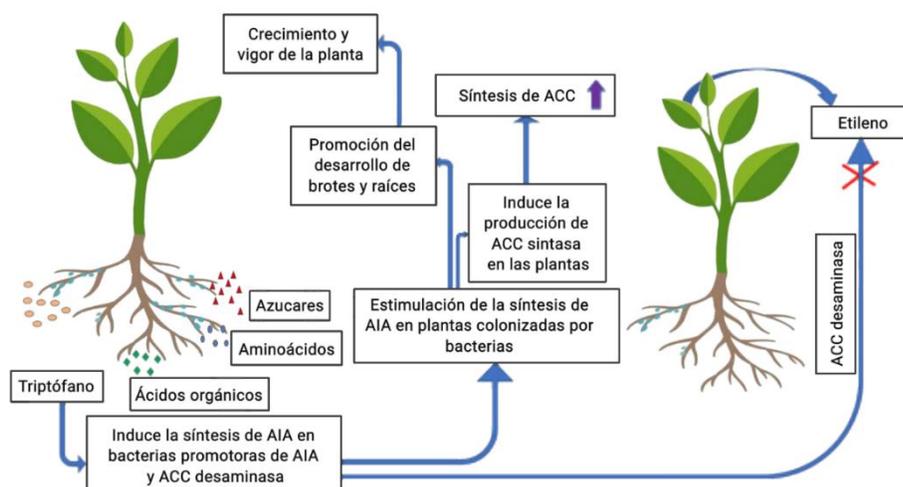


Figura 2.3.2 Mitigación del estrés en plantas mediado por la producción de 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa. Fuente: Ghorai y otros (2021).

### 2.3.2 Solubilización de fosfatos

El fósforo es uno de los nutrientes vegetales más esenciales y que afectan al crecimiento general de las plantas al influir en varios de los procesos metabólicos clave, como la división celular, transporte de energía, transducción de señales, biosíntesis macromolecular, fotosíntesis y la respiración de las plantas (Shenoy & Kalagudi, 2005; Ahemad y otros, 2009). Sin embargo, a diferencia del nitrógeno, la atmosfera no proporciona fosfato soluble a las plantas; la fuente de fosfato es en gran medida los

minerales primarios y secundarios y/o compuestos orgánicos (Khan y otros, 2014). Esto ha provocado que la cantidad de fósforo disponible para las plantas sea muy baja en relación con el fósforo total del suelo. Además, la mayor parte del fósforo del suelo se encuentra fijado a minerales de arcilla y óxidos de hierro y aluminio y sólo una pequeña fracción está disponible para su absorción por las plantas. Por lo tanto, su deficiencia provoca un retraso en el crecimiento, hojas oscuras e inhibición de la floración y del desarrollo del sistema radicular (Wissuwa, 2003).

Diversos informes señalan que las rizobacterias pueden liberar fosfatos orgánicos o solubilizar compuestos de fósforo inorgánico soluble, como el fósforo tricálcico o dicálcico. Estas bacterias proporcionan a las plantas fosfatos solubles y, a cambio, reciben compuestos de carbono como azúcares o ácidos orgánicos (Khan y otros, 2010). La liberación de fosfatos orgánicos es mediada por la acción de enzimas como las fitasas, C-P liasas y fosfatasas y el proceso principal de solubilización involucra la generación de ácidos orgánicos y fosfatasas ácidas (Illmer y otros, 1995). Entre los ácidos orgánicos, el ácido glucónico parece ser el más comúnmente empleado para solubilizar fósforo inorgánico junto con el ácido  $\alpha$ -cetoglucónico (Rodríguez y otros, 2006). Estos ácidos se producen en el periplasma de bacterias Gram negativas a través de una vía de oxidación directa de la glucosa (Anthony, 2014). En este proceso, las enzimas glucosa deshidrogenasa y gluconato deshidrogenasa se encuentran en la cara externa de la membrana citoplasmática y oxidan el sustrato en el espacio periplásmico (Chhabra y otros, 2013). Como resultado, los ácidos orgánicos se liberan fuera de las células, liberando altas cantidades de fósforo soluble de los fosfatos minerales mediante la aportación de protones y aniones de ácidos orgánicos que forman complejos con los metales. (Rodríguez & Fraga, 1999).

Las bacterias solubilizadoras de fósforo también pueden ser útiles para la fitorremediación en suelos afectados por metales pesados (Ahemad, 2015) o para la biolixiviación de elementos de tierras raras en minerales extraídos (Shin y otros, 2015).

### **2.3.3 Solubilización de potasio**

El potasio es uno de los principales macronutrientes para las plantas, ya que tiene un impacto significativo en el crecimiento, desarrollo y calidad de los granos; juega un papel fundamental en la formación de células, enzimas, proteínas, almidón, celulosa y vitaminas.

Además de facilitar el transporte y absorción de otros nutrientes, también contribuye a la resistencia contra el estrés tanto abiótico como biótico, lo que resulta en una mayor producción de cultivos de calidad y proporciona protección contra enfermedades vegetales (Epstein & Bloom, 2005). Sin embargo, solo entre 2 a 3% del potasio del suelo está disponible para las plantas en forma soluble libre, ya que el resto permanece unido a otros minerales del suelo, lo que constituye aproximadamente el 95% del potasio del suelo (Etesami y otros, 2017). Las bacterias que solubilizan potasio utilizan una variedad de métodos como la producción de ácidos orgánicos, formación de complejos, secreción de polisacáridos o la creación de biopelículas sobre las superficies minerales (Prajapati y otros, 2012; Sattar y otros, 2019).

Diversos autores señalan que una amplia gama de bacterias, concretamente del género *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *B. mucilaginosus*, *B. edaphicus*, *B. circulans* y *Paenibacillus* sp., liberan potasio a partir de minerales del suelo que lo contienen (Sheng, 2005; Liu y otros, 2012). Uno de los mecanismos es la liberación de nutrientes potásicos mediante la producción de diferentes ácidos orgánicos (Kumar y otros, 2016), los cuales ayudan en la acidificación de la rizosfera y mejoran la solubilización del potasio de los minerales. Estos ácidos orgánicos disuelven directamente los minerales de potasio debido a la liberación lenta de potasio intercambiable y fácilmente disponible (Ahmad y otros, 2016). Por lo tanto, la síntesis y descarga de ácidos orgánicos por los solubilizadores de potasio en el ambiente circundante disminuye el pH y en última instancia resulta en la liberación de iones de potasio de los minerales a través de la protonación (Kour y otros, 2020).

#### **2.3.4 Producción de AIA**

Las fitohormonas, especialmente las auxinas, controlan varias fases del crecimiento y desarrollo de las plantas, como la elongación celular, la división celular, la diferenciación de tejidos y la dominancia apical. La auxina, ácido indol-3-acético (AIA), es una de las fitohormonas más importantes, ya que posee un papel fundamental en las respuestas celulares de las plantas, como la división celular, expresión génica, organogénesis, formación de pigmentos, desarrollo de las raíces, germinación de las semillas, resistencia de las plantas ante el estrés, respuestas trópicas y fotosíntesis (Spaepen y otros, 2007). El AIA

puede funcionar tanto como inhibidor como estimulante y la cantidad necesaria para promover el crecimiento de las plantas depende en gran medida de la especie vegetal y bacteriana (Lwin y otros, 2012). Se ha identificado cinco vías de biosíntesis de AIA en bacterias en donde el precursor es el triptófano, como se observa en la Figura 2.3.4.

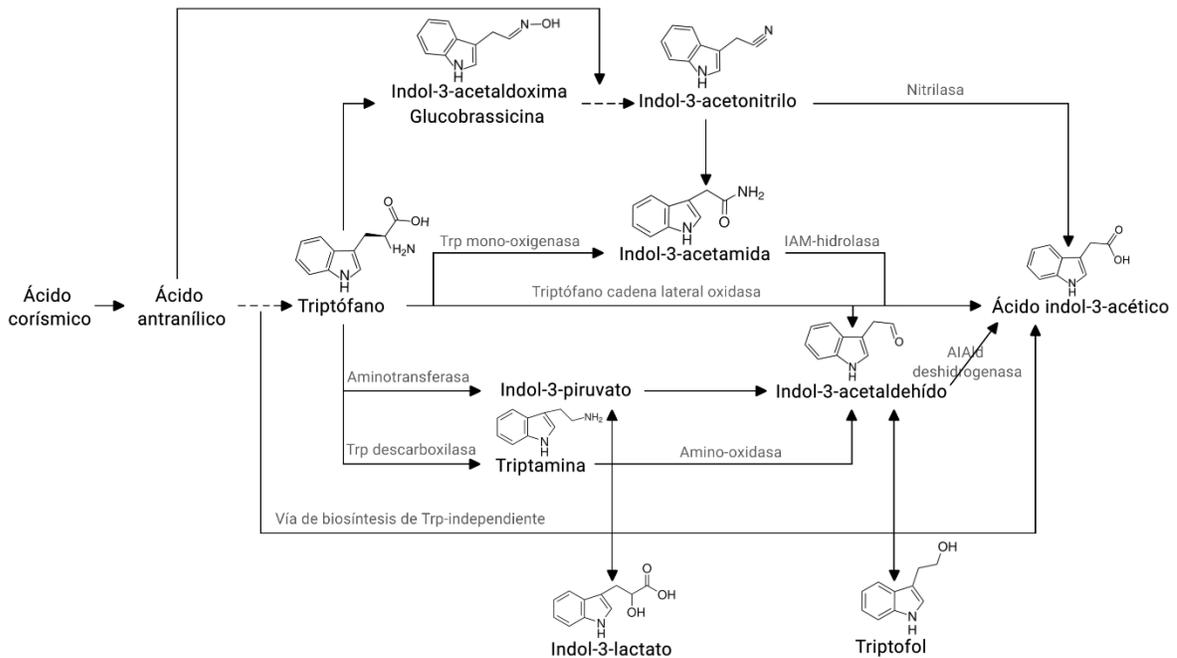


Figura 2.3.4 Rutas para la biosíntesis de AIA en bacterias. El intermediario que hace referencia al nombre de la vía o a la propia vía está subrayado con una línea discontinua. Fuente: Spaepen y otros (2007).

La vía del indol-3-acetamida (IAM) es la vía mejor caracterizada y específica en bacterias, ya que no se ha podido encontrar evidencia de esta vía en plantas. En esta vía de dos pasos, el triptófano se convierte primero en IAM por la enzima triptófano-2-monooxigenasa, codificada por el gen *iaaM*. En el segundo paso, IAM se convierte en AIA mediante una IAM hidrolasa, codificada por *iaaH*. Los genes *iaaM* e *iaaH* han sido clonados y caracterizados a partir de diversas bacterias, como *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae*, *Pantoea agglomerans*, *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (Sekine y otros, 1989; Morris, 1995; Theunis y otros, 2004).

## 2.4 Mecanismos indirectos

### 2.4.1 Producción de sideróforos

El hierro es un elemento vital para el desarrollo de las plantas, ya que actúa como cofactor en varias enzimas cruciales para procesos fisiológicos, tales como la respiración, fotosíntesis, fijación de nitrógeno, metabolismo del ácido cítrico y la síntesis de ADN y ARN por lo que su deficiencia se manifiesta en graves modificaciones metabólicas (Rout & Sahoo, 2015). Aunque el hierro es común en los suelos, frecuentemente no está disponible para las plantas ni para los microorganismos del suelo. La forma química predominante,  $Fe^{+3}$ , la cual se oxida y forma óxidos e hidróxidos insolubles que no pueden ser absorbidos por las plantas ni por los microorganismos del suelo (Deb & Tatung, 2024).

Los sideróforos son un grupo de metabolitos secundarios producidos por diversas bacterias, hongos, levaduras y ciertas plantas monocotiledóneas en respuesta a la escasez de hierro y que presentan una gran afinidad por el hierro (III) (Hider & Kong, 2010). Estos actúan como agentes quelantes de alta afinidad para solubilizar el ion férrico y transportarlo a la célula, en donde se convierte en  $Fe^{2+}$  (Hu & Xu, 2011) Los sideróforos se dividen en tres grupos principales: hidroxamatos, catecolatos y carboxilatos, dependiendo del grupo funcional utilizado para formar complejos con el hierro (Shameer & Prasad, 2018). Los sideróforos pueden absorber el hierro disponible en el medio circundante y, posteriormente, este es adquirido por los organismos que poseen un receptor específico para ese complejo sideróforo-hierro, haciéndolo inaccesible para sus competidores. Los receptores de sideróforos presentes en la membrana celular de las raíces de las plantas reconocen el complejo sideróforo-hierro y es absorbido por la célula (Singh, 2020).

Diversos informes reportan que bacterias como *Agrobacterium tumefaciens*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *E. coli*, *Enterobacter*, *Mycobacterium*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Paracoccus denitrificans*, *P. fluorescens*, *Rhizobium meliloti* o *Serratia*, y *Streptomyces* son capaces de sintetizar sideróforos (Ghosh y otros, 2020). La aplicación de bacterias productoras de sideróforos ha demostrado la mejora en el crecimiento y la productividad de diversas plantas de cultivo (Hakim y otros, 2021).

### **2.4.2 Producción de enzimas**

Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal funcionan como efectivos agentes de control biológico al producir diversas enzimas hidrolíticas que afectan el crecimiento de los patógenos. Entre estas enzimas encontramos a las quitinasas, proteasas, glucanasas, celulasas, ureasas y catalasas, las cuales son eficaces contra patógenos fúngicos al inducir la lisis en las células (Bowman & Free, 2006). Las quitinasas tienen la capacidad de descomponer la pared celular fúngica compuesta por el polímero quitina, la cual está formada por N-acetil-D-glucosamina sin ramificar con enlaces 1,4-beta ( $\beta$ -1,4), siendo este el segundo polímero más común en la naturaleza. Las proteasas son enzimas capaces de hidrolizar proteínas en fragmentos peptídicos, actuando como degradantes de la pared celular de la mayoría de los hongos patógenos. Las glucanasas pueden degradar el glucano, el cual es uno de los componentes principales de la pared celular de hongos y levaduras y que están formados por enlaces beta-1,3 ( $\beta$ -1,3) con ramificaciones beta-1,6 ( $\beta$ -1,6), desde el extremo no reductor o en sitios internos aleatorios. Las celulasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de la celulosa, el cual es el polímero biológico más abundante en la tierra y que compone las paredes celulares de la mayoría de las plantas. La celulosa consiste en miles de unidades de D-glucosa que están unidas entre sí por enlaces  $\beta$ -1, 4-glicosídicos, que se pueden degradar por medio de la hidrólisis inducida por las celulasas para liberar glucosa. Las ureasas llevan a cabo la hidrólisis de la urea en amoníaco y dióxido de carbono, lo que es esencial para proporcionar nitrógeno a las plantas y las catalasas degradan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, desempeñando un papel importante en la defensa, el envejecimiento y la senescencia de las plantas (Mohammed, 2020; Roy y otros, 2022).

### **2.4.3 Producción de exopolisacáridos**

Los exopolisacáridos (EPS) son macromoléculas orgánicas importante para la formación de biopelículas bacterianas y son la parte más importante de la matriz extracelular, representando entre el 40% y el 95% del peso bacteriano (Flemming & Wingender, 2001). Las bacterias producen EPS en dos formas: limosos y capsulares (Ngoufack y otros, 2004). Los EPS son mezclas heterogéneas compuestas por polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Los EPS bacterianos suelen ser polímeros

ácidos debido a la presencia de algunos grupos funcionales como hidroxilo, carboxilo o ácido fosfórico, lo que les confiere una gran afinidad por los iones metálicos (Mittelman & Geesey, 1985). Los EPS bacterianos desempeñan varias funciones relacionadas con la formación de agregados en el suelo, mejorando el agua y los nutrientes disponibles en el suelo, y mejoran las actividades enzimáticas importantes (fosfomonoesterasa,  $\beta$ -glucosidasa, proteasa, arilsulfatasa y ureasa) en el suelo (Deka y otros, 2019).

Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal productoras de EPS han demostrado poseer una excelente capacidad para mejorar las propiedades del suelo y la productividad de los cultivos. Pueden aumentar la disponibilidad de agua y fertilizantes para la planta mediante la mejora del volumen de los microporos del suelo y la agregación del suelo en la rizosfera. Desarrollan además biofilms que ayudan en la regulación de los nutrientes y el flujo de agua a través de las raíces de las plantas y que también ayudan a la regulación de la agregación del suelo. Los EPS bacterianos forman polímeros de limo (cargados negativamente) que tienen potencial adhesivo para unirse a las partículas de arcilla. Estas fuerzas adhesivas que incluyen enlaces de hidrógeno, puentes de cationes, adsorción de aniones y fuerzas de Van der Waals son responsables de la formación de microagregados que además se adhieren al tejido radicular, proporcionando protección contra la desecación (Cheng y otros, 2020).

#### **2.4.4 Producción de compuestos volátiles**

Las bacterias interactúan con las plantas huésped de muchas maneras, teniendo efectos positivos que varían en función de la especie participante. Estas sintetizan compuestos químicos que se difunden a través de los espacios entre las partículas del suelo, los cuales son denominados compuestos orgánicos volátiles microbianos (COVs). Los COVs son metabolitos secundarios, derivados principalmente de vías de fermentación que, debido a su bajo peso molecular, su alta presión de vapor y su bajo punto de ebullición, se volatilizan (Vespermann y otros, 2007) (Kai y otros, 2009). Los microorganismos también pueden producir compuestos volátiles inorgánicos que desempeñan funciones en la cadena alimentaria microbiana al ser asimilados e incorporados a la materia orgánica (bioconversión), o al funcionar como aceptores o donantes de electrones en reacciones metabólicas. Entre estos compuestos se encuentran el dióxido de carbono, el monóxido de

carbono, el hidrógeno, el amoníaco, el sulfuro de hidrógeno y el cianuro de hidrógeno. Estos compuestos juegan un papel primordial en el control de patógenos, ya que pueden propagarse a larga distancia y crear un microambiente bacteriostático alrededor de las comunidades antagónicas (Raza y otros, 2016). Se ha documentado que la regulación de la homeostasis de las auxinas endógenas de la planta y la absorción de hierro por las raíces de las plantas es mediada por los COVs (Zhang y otros, 2009). Además, promueven el crecimiento de las plantas, inducen resistencia a las enfermedades y tolerancia al estrés abiótico (Liu & Zhang , 2015).

El principal grupo utilizado como agente de control biológico es el género *Pseudomonas*, las cuales se consideran las productoras más comunes de cianuro (Lakshmi y otros, 2015), aunque también se han aislado de especies de los géneros *Stenotrophomonas*, *Serratia*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Staphylococcus* y *Xanthomonas* (Santoro y otros, 2015).

## 2.5 Cultivo de lenteja

La lenteja (*Lens culentata*) es un cultivo apreciado por su capacidad para producir granos de alto valor nutricional. Tiene un contenido de alrededor del 25% de proteínas y es rico en hierro, fibra, vitaminas y minerales (Sáenz-Reyes y otros, 2022). De acuerdo con el Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera (SIAP, 2023), para su germinación necesita una temperatura de 15 a 21 °C, adaptándose a una diversidad de climas, para su crecimiento requiere una temperatura que oscile entre los 6 a 28 °C y unas precipitaciones anuales de 260 a 850 mm. Se adapta bien a las diferentes altitudes desde zonas que comprenden desde los 100 hasta 3,100 m. Le perjudica la nieve y los rocíos, requiere un suelo con un PH comprendido entre 5.5 a 9. Es un cultivo muy sensible a la salinidad, por ello suelos con presencia de sal puede ser un obstáculo para el rendimiento; tolera la sequía bastante, requiere suelos profundos, frescos, ricos en materia orgánica y sueltos.

Forma parte esencial de la dieta tradicional de la población mexicana y otorgan importantes beneficios nutricionales a costos accesibles. El SIAP informó que la producción total de este cultivo en México fue de 12 448 toneladas en el 2022, aumentando un 23.1% respecto al año anterior y generando ganancias de 90.6 millones de pesos. Los estados productores de lenteja son Michoacán con 9 496 toneladas, Guanajuato con 612 toneladas

y San Luis Potosí con cuatro toneladas. A nivel nacional, Guanajuato es uno de los estados con mayor producción agrícola. Tan solo en el 2022, la SIAP reportó que cosechó 897 970.12 ha, generando ingresos de más 51 millones de pesos (SIAP, 2023). Destaca sobre todo en la producción de maíz grano, agave, sorgo grano, alfalfa y brócoli, pero a nivel nacional sobresale en la producción de lenteja siendo el segundo estado con mayor producción (SADER, 2023).

Sin embargo, al igual que otros cultivos, el crecimiento de la lenteja se ve gravemente afectado por factores bióticos y abióticos que alteran los procesos bioquímicos y fisiológicos de la célula, reduciendo así el crecimiento y el rendimiento de la planta (Sadeghpour y otros, 2022). La marchitez por *Fusarium* es uno de los factores comunes que limitan el rendimiento biótico en ambientes secos y cálidos. Causa pérdidas de rendimiento del 50 % al 100 % en condiciones favorables para el hongo y afecta en la etapa de plántula y reproductiva del desarrollo, entra a través de la raíz y bloquea el xilema, lo que impide la absorción de agua y otros nutrientes en la planta, provocando marchitamiento, decoloración y la muerte de la planta (Jiskani y otros, 2021). El manejo de la marchitez causado por *Fusarium* es una tarea desalentadora debido a la capacidad del patógeno de permanecer en el tejido del huésped, haciéndolo capaz de sobrevivir en el suelo durante largos periodos de tiempo. Las prácticas de manejo de *Fusarium* incluyen la rotación de cultivos, uso de variedades resistentes y fungicidas químicos. Sin embargo, esto último afecta la comunidad microbiana y al medio ambiente y fomenta la aparición de patógenos resistentes, por lo que en los últimos años se han buscado estrategias ecológicas para combatir este patógeno (Ayub y otros, 2024).

La pudrición seca de la raíz causada por *Rizoctonia bataticola* es una importante enfermedad emergente de las plántulas que forma microesclerocios en lentejas bajo condiciones climáticas secas y húmedas. Este hongo puede vivir hasta 15 años en temperaturas extremadamente altas (30-35 °C), condiciones de pH diverso, baja humedad del suelo, sal y situaciones de sequía. *R. bataticola* es un patógeno que habita en el suelo y que infecta a más de 500 especies de plantas cultivadas y silvestres. Los síntomas de la enfermedad incluyen la caída repentina de las hojas superiores, el secado de las raíces y el desarrollo de cuerpos esclerociales negros en la superficie de la raíz, lo que en última instancia resulta en un retraso en el crecimiento de las plantas (Kraft y otros, 1993).

Recientemente se ha reportado el aumento de la pudrición seca de la raíz en diferentes partes del mundo, causando severas pérdidas de rendimiento, especialmente en condiciones de estrés por déficit de humedad del suelo y altas temperaturas. Sin embargo, actualmente no se dispone de ningún control químico efectivo ni de genotipos absolutamente resistentes a la enfermedad que se conozcan para el manejo de esta enfermedad (Mishra y otros, 2022), por lo que es indispensable buscar estrategias alternativas que permitan tener un mejor control de este patógeno.

## **2.6 Cultivo de pepino**

El pepino (*Cucumis sativus*) es el fruto en baya procedente de una planta herbácea que recibe su mismo nombre. Pertenece a la familia de las cucurbitáceas. Bajo este nombre se engloban unas 850 especies de plantas, casi todas herbáceas, trepadoras o rastreras, que producen frutos muy grandes, cilíndricos, alargados y protegidos por una corteza firme (MAPA, 2018). Es un cultivo que se adapta a una gran variedad de localidades y se puede cultivar desde el nivel del mar hasta los 1300 m. Se adapta temperaturas de 18 a 25 °C con un máximo de 32 °C. Es un cultivo con un alto requerimiento de agua, cerca de 70 a 90% de humedad relativa, además de que su cultivo requiere de suelos con textura-areno-arcillosa, bien drenados y con un pH entre 5.5 y 6.7 (MAG, 1991).

El SIAP informó que la producción total de este cultivo en México fue de 1028 567.57 toneladas en el 2022, generando ganancias de 7.9 millones de pesos. Los estados con mayor producción de pepino son Sonora con 178 460 toneladas, Michoacán con 111 922 toneladas, Sinaloa con 308 482 toneladas, Morelos con 63 075 toneladas y Guanajuato con 62 998 toneladas (SIAP, 2022).

A nivel nacional, Guanajuato cosechó 1,374.15 ha, generando ingresos de más 646 miles de pesos (SIAP, 2023). Desde el 2016, Guanajuato ha buscado posicionarse como uno de los estados con mayor producción de este cultivo, aprovechando las condiciones de suelo y clima de la región. Entre sus municipios con mayor producción, destacan Pénjamo, con 72 163 ha cosechadas, Irapuato con 55 503 ha, Romita con 16 626 ha, Valle de Santiago con 49 075 ha y Abasolo con 41 984 ha. Sin embargo, una de las principales limitantes en el cultivo del pepino que lleva a la caída del rendimiento se deben principalmente a los fitopatógenos, los cuales causan el deterioro del rendimiento al reducir la calidad y cantidad

de los productos de los cultivos. Entre los más importantes encontramos al mildiú veloso (*Pseudoperonospora cubensis*), el mildiú polvoriento (*Erysiphe cichoracearum*), el moho gris (*Botrytis cinerea*) y el marchitamiento por *Fusarium* (*Fusarium oxysporum*), siendo esta última la enfermedad más problemática y destructiva. Es transmitida por el suelo y se transmite a través del suelo y el agua. El hongo puede atacar a las plantas susceptibles en cualquier etapa de crecimiento y la infección de los hipocótilos de las plantas jóvenes provoca un marchitamiento antes o después de la emergencia. La infección en las plantas más viejas puede causar amarillamiento a partir de las hojas viejas, retraso en el crecimiento o marchitamiento y, una vez que se produce el marchitamiento, la muerte puede producirse entre tres a cinco días. Después de que la planta muere, se forma una alfombra de micelio blanco en las superficies externas de la planta (Pscheidt & Ocamb, 2016). Como el hongo infecta a la planta de pepino en cualquier etapa, causa una gran pérdida de rendimiento en la producción (Din y otros, 2020).

La podredumbre del pepino causada por *Rhizoctonia solani* Kuehn se encuentra entre las enfermedades más graves que limitan la producción en las zonas cálidas y húmedas. La incidencia de la enfermedad se ve incrementada por el monocultivo y por la plantación de alta densidad, así como por los procedimientos necesarios para la recolección a máquina. Las condiciones húmedas y cálidas resultantes de la formación de un dosel denso favorecen la infestación de los frutos jóvenes que se desarrollan en la superficie del suelo. Las lesiones comienzan como áreas empapadas de agua que posteriormente se colapsan y forman canchales marrones, hundidos e irregulares en la superficie de la fruta (Lewis & Papavizas, 1980). En la actualidad, la enfermedad se maneja mediante prácticas culturales, como la rotación de cultivos y métodos que minimizan el contacto prolongado de la planta con el patógeno. Los fungicidas químicos se utilizan a menudo cuando las pérdidas por *R. solani* son sustanciales (Parry, 1990). Sin embargo, los controles culturales y químicos actuales no son completamente efectivos, y la enfermedad por *Rhizoctonia* sigue siendo un problema persistente (Huang y otros, 2012).

## 3 METODOLOGÍA

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación en Biotecnología en la Universidad de Guanajuato, Campus Celaya-Salvatierra, sede Mutualismo en la ciudad de Celaya.

### 3.1 Muestreo del suelo

Se recuperaron muestras de suelo del ANP “Sierra de los Agustinos” Tarimoro en el estado de Guanajuato con las coordenadas de localización geográfica 20°13'24.2"N 100°42'29.1"W. El muestreo se realizó en el mes de julio del año 2022.

Las muestras de suelo se tomaron de la zona radicular de árboles de encino (*Quercus rugosa*) a una profundidad de 10 cm, ya que a esta profundidad es la recomendada por organizaciones agrícolas y ambientales para la toma de muestras de suelo (Soil Science Society of America, 2016; National Resources Conservation Service, 2018). Se generó una muestra compuesta de seis puntos diferentes de tres árboles alejados entre sí y se guardaron en bolsas de plástico para su traslado. Para la selección de estos se tomaron en cuenta aspectos positivos como una buena salud, que el tronco poseyera su corteza intacta, de color y aspectos característicos y que no presentase senescencia en las hojas.

### 3.2 Aislamiento, purificación y actividad de la enzima ACC desaminasa

El aislamiento, purificación y determinación cualitativa de la actividad de la enzima ACC desaminasa se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Gómez-Luna y otros (2012). Las muestras de suelo se dejaron secar por dos semanas y posteriormente se pasaron a través de los tamices No. 14 y 20, lo que permitió retirar restos de hojarasca, piedras y raíces presentes en estas. Se prepararon diluciones con 90 mL de agua destilada estéril a las que se le añadieron 10 g de suelo, se agitaron a 240 rpm durante dos horas y se dejaron sedimentar por media hora. Pasado este tiempo, se recuperaron 10 mL de la

solución y se separaron en tres repeticiones de tubos, teniendo cuidado de tomar únicamente la mezcla homogénea y no los sólidos ubicados en la parte inferior de la muestra. Se realizaron diluciones seriadas (1:10, 1:100 y 1:1000) y se sembraron 50 µL en medio selectivo para actividad ACC desaminasa utilizando un equipo de siembra en placa semiautomático Automatic Spiral® Sample Plater.

Para obtener aislados bacterianos con actividad para la enzima ACC desaminasa, se prepararon 500 mL del medio selectivo Dworkin y Foster (DF) (Dworkin & Foster, 1958), modificado por Penrose y Glick (Penrose y otros, 2001) con ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), el cual contiene por litro: 4 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 6 g de  $\text{NaHPO}_4$ , 0.2 g de  $\text{MgSO}_4$ , 1 mg de  $\text{FeSO}_4$ , 10 mg de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 10 mg de  $\text{MnSO}_4$ , 50 mg de  $\text{CuSO}_4$ , 10 mg de  $\text{MoO}_3$ , 70 mg de  $\text{MgSO}_4$ , glucosa 0.2%, ácido glucónico 0.2%, ácido cítrico 0.2%, 20 g de agar bacteriológico y 0.3 g de ACC.

Las cajas sembradas se incubaron a 30 °C por cinco días hasta que se observó el crecimiento de colonias bacterianas, las cuales fueron recuperadas y purificadas en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) por medio de estría cruzada. Posteriormente, los aislados resultantes se volvieron a resembrar en medio Dworkin y Foster para confirmar su capacidad de producir la enzima ACC desaminasa, estriándolas en forma diagonal (45°) y con un centímetro de longitud para visualizar de una manera más efectiva el crecimiento de la biomasa bacteriana. Esta metodología se realizó por triplicado y la medición de la imagen fue obtenida con software de procesamiento ImageJ).

### **3.3 Tinción de Gram**

Para la tinción de Gram se recuperó una porción de inóculo a través de un asa de metal y se realizó un frotis sobre un portaobjeto, agregando además una gota de agua destilada. Una vez seco, se le agregaron unas gotas de cristal violeta y se dejó que actuara por un minuto, se enjuagó con agua destilada y se realizaron lavados hasta que todo el colorante se escurriese. Posteriormente, se cubrió con Lugol y, esperando nuevamente un minuto, se hizo otro lavado con agua para después aplicar unas gotas de solución alcohol-cetona 1:1, deteniendo la reacción inmediatamente con agua. Finalmente, se aplicaron unas gotas de safranina y se dejó actuar por un minuto, lavando y escurriendo el colorante con agua (Gram, 1884).

Esta metodología se realizó para cada uno de los aislados y para la visualización de su morfología, se utilizó el objetivo 100X de un microscopio óptico.

### **3.4 Solubilización de fosfatos**

Para la determinación cualitativa de solubilización de fosfatos, se utilizó el medio Pikovskaya modificado sin extracto de levadura (Nautiyal, 1999), el cual contiene por litro: 10 g de glucosa, 5 g de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , 0.5 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.2 g de KCl, 0.1 g de  $\text{MgSO}_4$ , 0.1 mg de  $\text{MnSO}_4$ , 0.1 mg de  $\text{FeSO}_4$ , 10 mg de purpura de bromocresol y 15 g de agar bacteriológico. Se ajustó el pH a 7.2 mediante la adición de NaOH 0.1 M y los aislados se inocularon con el método de siembra por picadura en el medio, posteriormente estos se incubaron a 30 °C y en oscuridad por al menos 72 h (Gupta y otros, 1994).

Esta metodología se realizó por triplicado y el cambio de coloración morado a amarillo en el medio indica un resultado positivo. La medición de la imagen fue obtenida con software de procesamiento ImageJ.

### **3.5 Determinación cuantitativa de solubilización de fosfatos**

Para determinar la solubilización cuantitativa de fosfatos, se seleccionaron aquellos aislados que presentaran un diámetro de halo superior a 1 cm determinado a través de la prueba cualitativa y se utilizó la metodología azul molibdofosfórico en medio de ácido clorhídrico, descrito por Jackson (1982).

Se inocularon los aislados seleccionados junto con un control negativo en medio NBRIP, el cual contiene para un litro: 10 g de glucosa, 5 g de  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 5 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.25 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.2 g de KCl y 0.1 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Es importante mantener en agitación el medio para que se homogenice, pues el fosfato de calcio monobásico monohidratado tiende a precipitarse. Cada aislado y el control se inocularon en 5 mL del medio NBRIP en tubos Falcon y se incubaron por al menos 72 h a 28 °C y a 320 rpm.

Posteriormente, se recuperaron 2 mL del medio inoculado en tubos Eppendorf y se centrifugó cada cultivo a 6000 rpm durante 10 minutos. A continuación, se rescató 1 mL del sobrenadante libre de células en un tubo Falcon estéril de 50 mL y se le agregaron 3

gotas del indicador 2,4-dinitrofenol al 25% (p/v), el cual contiene 2.5 g de 2,4-dinitrofenol en un litro de etanol al 96%. La solución inmediatamente torna el sobrenadante a un color amarillo limón (#f1c513 por su código en hexadecimal), lo que indica que la muestra se encuentra a un pH cercano a 3 desde la región ácida. Sin embargo, se busca que la solución tenga una tonalidad amarillo pálido desaturado (#f0e6c0) o incoloro para determinar que la muestra se encuentre a un pH cercano a 3. En caso de ser necesario, se pueden agregar gotas de  $\text{NH}_4\text{OH}$  4 N o  $\text{HCl}$  4 N hasta alcanzar la coloración mencionada.

Una vez llegado al pH deseado, se agregaron 5 mL de ácido cloromolíbico al 1.5% a la alícuota. A continuación, se describe su preparación para 200 ml:

1. Se disuelven 3 g de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  en 60 mL de agua desionizada, calentándolo a una temperatura cercana a 50 °C para facilitar su disolución.
2. Se disuelven 56 mL de  $\text{HCl}$  al 38% 12.51 N en 14 mL de agua desionizada, agregando suavemente el ácido al agua por las paredes del recipiente, obteniendo así una solución de  $\text{HCl}$  10 N. Para evitar el aumento de temperatura, es necesario mantener el recipiente adentro de uno más grande con agua.
3. Una vez que ambas soluciones se encuentren frías, se mezclan y se afora hasta 200 mL. Se puede almacenar la solución por 2 meses dentro de un recipiente de vidrio blando y ámbar.

Posterior a esto, la muestra se diluye hasta 25 mL con agua desionizada, mezclando las soluciones con agitaciones suaves. A partir de este punto, se debe de trabajar a una temperatura de  $25\pm 5$  °C debido a la sensibilidad de algunos reactivos. Cubiertas estas condiciones, se agregaron 0.15 ml, o lo equivalente a 3 gotas de una pipeta Pasteur, de ácido cloroestañoso reductor y se mezcló vigorosamente. La preparación de 2 mL de este reactivo se explica a continuación:

1. Se mezclan 0.05 g de  $\text{SnCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y 0.1 mL de  $\text{HCl}$  al 38%, se disuelven muy bien y se le agrega 0.9 mL de agua desionizada.
2. Se agrega 1 mL de  $\text{HCl}$  1.2 N a la solución anterior, con movimientos suaves y por las paredes del recipiente. Como este reactivo es muy susceptible a la oxidación, debe prepararse en volúmenes muy pequeños y el día de su ensayo.

Además, su exposición prolongada a la atmosfera produce resultados dudosos, por lo que puede usarse hasta 4 h luego de haberse preparado.

Después de mezclar vigorosamente la solución se torna, de manera casi inmediata, a una coloración azul, cuyo tono depende de qué tan concentrado se encuentre la muestra. Se esperaron 5 minutos para que el color de la reacción se estabilice y se leyó en un espectrofotómetro Jenway™ Modelo 7305 a 660 nm usando una celda de plástico desechable de 3 mL y utilizando como blanco al control negativo. Dado que el color es estable hasta los 20 minutos, todas las lecturas fueron hechas dentro de este rango de tiempo. Esta metodología se realizó por triplicado (Morales-Torres, 2012).

Es importante mencionar que este método es afectado fácilmente por contaminación con fósforo, por lo que se deben de tomar precauciones en su desarrollo, como evitar respirar o toser cerca de los reactivos y recipientes usados. Preferentemente, debe usarse tapabocas, bata cerrada y guantes de nylon, el material y cristalería debe lavarse con detergente libre de fosfatos y enjuagarse con agua destilada, además de preparar cada uno de los reactivos con agua destilada.

Se elaboró una curva patrón o de calibración utilizando una solución patrón de 50 ppm de fosfato. A continuación, se detalla su elaboración:

1. Se disuelven 0.2195 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , previamente secado a 40 °C, en 400 mL de agua destilada.
2. Se añade a la solución anterior 25 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  7 N y se afora a un litro. Se debe almacenar en un recipiente de vidrio blando y no pyrex para reducir la contaminación con arsénico. Se conserva indefinidamente.

Se requirió una solución patrón de 10 ppm a partir de la de 50 ppm haciendo una dilución 1:4 en agua desionizada. Esta se diluyó para obtener ocho soluciones con concentraciones menores de fosfato, pues su volumen final es de 25 mL debido a que se afora a esta cantidad con agua destilada. Posteriormente se lleva a cabo la metodología descrita anteriormente, añadiendo la misma cantidad de ácido cloromólbico y ácido cloroestañoso. En la Tabla 3.2 se muestra la concentración de cada reactivo.

Tabla 3.5 Volúmenes de reactivos para la curva patrón de fosfatos

Concentración final de fosfato (mg/L)	Solución 10 ppm (ml)	Ácido cloromolibdico (ml)	Ácido cloroestañoso (ml)
0.00	0.00	5	0.15
0.04	0.10	5	0.15
0.10	0.25	5	0.15
0.20	0.50	5	0.15
0.40	1.00	5	0.15
0.60	1.50	5	0.15
0.80	2.00	5	0.15
1.00	2.50	5	0.15

Fuente: Morales-Torres (2012)

Con los datos de absorbancia, se hizo un análisis de regresión lineal para obtener una función de concentración de fosforo en la reacción en ppm. Para esto, se utiliza la siguiente relación:

$$\frac{A}{R} = \frac{V_R}{V_A} \quad (1)$$

Por lo tanto, se simplifica la Fórmula 1 para obtener la absorbancia:

$$A = \frac{R(V_R)}{V_A} \quad (2)$$

Donde:

$A$  es la concentración de fosforo en la alícuota ensayada en la reacción.

$R$  es la concentración de fosforo en la reacción.

$V_R$  es el volumen de la reacción.

$V_A$  es el volumen de la alícuota ensayada en la reacción.

### 3.6 Solubilización de potasio

Para la determinación cualitativa de solubilización de potasio inorgánico, se utilizó el medio Pikovskaya modificado sin extracto de levadura, utilizando la misma cantidad descrita anteriormente de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  y púrpura de bromocresol por  $\text{KNO}_3$  y verde de bromocresol, respectivamente. Los aislados se inocularon por picadura en el medio y se incubaron en oscuridad por al menos 72 h a 30 °C (Delgado-Ramírez y otros, 2021).

Esta metodología se realizó por triplicado y el cambio de coloración azul a amarillo en el medio indica un resultado positivo. La medición de la imagen fue obtenida con software de procesamiento ImageJ.

### 3.7 Producción de sideróforos

Para la determinación cualitativa de sideróforos, se utilizó el medio Cromo Azurol S (CAS) (Schwyn & Neilands, 1987) modificado por Barton y Hemming (1993). Para la preparación de este medio, se requiere de la elaboración de cuatro soluciones diferentes cuyos volúmenes totales son unidos al final. A continuación, se describe la preparación de cada solución para un litro de medio:

1. La solución 1 (100 ml) se preparó adicionando 0.0027 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en 10 mL de HCl 10 mM. Posteriormente, esto se añadió a una solución conformada por 0.06 g de CAS en 50 mL de agua destilada. A continuación, la solución resultante se añadió a una nueva conformada por 0.073 g de HDTMA en 40 mL de agua destilada. La mezcla resultante produjo una solución azul oscuro, la cual se esterilizó en autoclave y, posteriormente, se dejó enfriar a 50 °C.
2. La solución 2 (800 ml) se preparó disolviendo 30.24 g de PIPES en 750 mL de una solución salina que contenía: 0.3 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 g de NaCl y 1 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . El pH se ajustó a 6.8 con KOH al 50% (p/v) y posteriormente se aforó con agua destilada hasta llegar a 800 ml. Se le agregaron 15 g de agar bacteriológico y la solución resultante se esterilizó en autoclave y, posteriormente, se dejó enfriar a 50 °C.
3. La solución 3 (70 ml) se preparó disolviendo 2 g de glucosa, 2 g de manitol, 493 mg de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 11 mg de  $\text{CaCl}_2$ , 1.17 mg de  $\text{MnSO}_4$ , 1.4 mg de

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.04 mg de CuSO<sub>4</sub>, 1.2 mg de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y 1 mg de NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O en 70 mL de agua destilada. La solución resultante se esterilizó en autoclave y, posteriormente, se dejó enfriar a 50 °C.

4. La solución 4 (30 ml) se preparó mezclando 3 g de casamino ácidos en 30 mL de agua destilada, la cual se esterilizó con una membrana Milipore de 0.45 µm de diámetro.
5. La solución 3 se adicionó a la solución 2 junto con la solución 4. La solución 1 se agregó al final, vertiéndolo con cuidado por las paredes del recipiente. La solución resultante se agitó suavemente para evitar la formación de espuma en el medio.

Cabe destacar que la elaboración de este medio puede verse obstaculizado por su susceptibilidad de contaminarse, por lo que es recomendable limpiar toda la cristalería utilizada con HCl 6 M para eliminar cualquier rastro de elementos traza en su superficie, así como enjuagar estos con agua destilada (Louden y otros, 2011).

Los aislados bacterianos se inocularon mediante picadura en el medio y se incubaron en oscuridad por al menos 96 h a 30 °C.

Esta metodología se realizó por triplicado y el cambio de coloración azul a amarillo en el medio indica un resultado positivo. La medición de la imagen fue obtenida con software de procesamiento ImageJ.

## **3.8 Actividad de enzimas extracelulares**

### **3.8.1 Actividad de celulasas**

Para la determinación cualitativa de producción de celulasas, se utilizó la metodología descrita por Liang y otros (2014). Los aislados bacterianos se inocularon en medio Mandels y Reese (Mandels & Reese, 1957) adicionado con sal sódica carboximetilcelulosa (CMC) como fuente única de carbono, el cual contiene para un litro: 2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.4 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.3 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.3 g de CaCl<sub>2</sub>, 0.4 g de extracto de levadura, 0.005 g de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.0016 g de MnSO<sub>4</sub>, 0.0017 g de ZnCl<sub>2</sub>, 0.002 g de CoCl<sub>2</sub>, 5 g de CMC-Na y 15 g de agar bacteriológico. El pH se ajustó a 5.0 con HCl 0.1 M

antes de meter el medio a esterilizar. Los aislados se inocularon por picadura y se incubaron por al menos 48 h a 29 °C.

Una vez pasado el tiempo de inoculación, las placas se tiñeron con una solución de Rojo Congo 1% (p/v) durante 15 minutos. Posteriormente se retiró el colorante y se decoloraron con una solución de NaCl 1 M durante una hora.

Esta metodología se realizó por triplicado y el cambio de coloración por la formación de un halo en el medio indica la capacidad de hidrolizar CMC de los aislados. La medición de la imagen fue obtenida con software de procesamiento ImageJ.

### **3.8.2 Actividad de quitinasas**

Para la determinación cualitativa de quitinasas, se utilizó el medio Agar Czapek (Raper & Fennell, 1965) adicionado con quitina como fuente única de carbono, el cual contiene para un litro: 3 g de NaNO<sub>3</sub>, 1 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5 g de KCl, 0.1 g de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 15 g de agar bacteriológico y 2 g de quitina como fuente de carbono. Los aislados se inocularon por picadura y se incubaron en oscuridad por al menos 48 h a 28 °C.

Esta metodología se realizó por triplicado y el cambio de coloración por la formación de un halo en el medio indica la capacidad de producir quitinasas de los aislados. La medición de la imagen fue obtenida con software de procesamiento ImageJ.

## **3.9 Producción de exopolisacáridos (EPS)**

Para la determinación cualitativa de producción de exopolisacáridos se utilizó la metodología descrita por Zlosnik y otros (2008) utilizando el medio levadura manitol (LM) (Sage y otros, 1990), el cual contiene para un litro: 0.5 g de extracto de levadura, 4 g de manitol y 15 g de agar bacteriológico. Todos los aislados de la colección se cultivaron en este medio y se dejaron incubar por al menos 48 h a 35 °C.

Pasado el tiempo de incubación, se visualizó la morfología y la cantidad de biomasa bacteriana producida por cada aislado bacteriano. La medición de la imagen fue obtenida con software de procesamiento ImageJ.

### 3.10 Producción de ácido indol acético

Para la producción cuantitativa de ácido indol acético, se utilizó la técnica colorimétrica con el reactivo de Salkowsky (Ehmann, 1977), utilizando medio Luria-Bertani (LB) (Bertani, 1951) adicionado con L-Triptófano en vez de caldo levadura extracto de malta-dextrosa (caldo YMD) (Mohite, 2013). El medio LB contiene para un litro: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl y se suplementa con 500 µg de L-Triptófano (Sigma). Los aislados se incubaron en 15 mL de este medio junto con un control negativo y se incubaron por al menos 48 h a 28 °C y a 150 rpm.

Terminado el tiempo de inoculación, se recuperaron 2 mL del caldo bacteriano y se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante libre de células y se le agregó 1 mL del reactivo de Salkowsky, el cual contiene para un litro: 19.6 mL de FeCl<sub>3</sub> 0.5 M y 980 mL de HClO<sub>4</sub> al 35% (v/v).

La solución se dejó en oscuridad y a temperatura ambiente durante 30 minutos y, una vez pasado este tiempo, se leyó en un espectrofotómetro a 530 nm usando una celda de plástico desechable de 3 mL y utilizando como blanco al control negativo. Dado que el color es estable entre un rango de 30 a 120 minutos, todas las lecturas fueron hechas dentro de este rango de tiempo. El cambio de color amarillo a rosa o rojo indica la producción de AIA. Esta metodología se realizó por triplicado.

La elaboración de la curva patrón o de calibración se realizó utilizando diferentes concentraciones de un estándar de AIA, variando de 0 a 10 µg/mL de AIA. El estándar se elaboró de la siguiente manera:

1. La solución concentrada de 10 mg/mL requiere disolver 50 mg de AIA (Sigma) en 5 mL de etanol al 70% (v/v).
2. La solución estándar original de 100 µg/mL requiere disolver 50 µL de la solución concentrada en 4950 µL de agua destilada.

Posteriormente se lleva a cabo la metodología descrita anteriormente, variando las concentraciones de la solución estándar junto con 1 mL del reactivo de Salkowsky. Se dejó reposar en oscuridad y a temperatura ambiente por 30 minutos y se leyó en un espectrofotómetro a 530 nm usando una celda de plástico desechable de 3 ml, utilizando

como blanco un control sin AIA. En la Tabla 3.1 se muestra la concentración de cada reactivo.

Tabla 3.10 Volúmenes de reactivos para la curva patrón de ácido indol acético

Concentración final de AIA ( $\mu\text{g/L}$ )	Solución madre ( $\mu\text{L}$ )	Agua destilada ( $\mu\text{L}$ )	Reactivo de Salkowsky ( $\mu\text{L}$ )
0	0	1000	1000
1	10	990	1000
2	20	980	1000
3	30	970	1000
4	40	960	1000
5	50	950	1000
6	60	940	1000
7	70	930	1000
8	80	920	1000
9	90	910	1000
10	100	900	1000

### 3.11 Pruebas de germinación, vigorosidad y biomasa

#### 3.11.1 Lenteja (*Lens culinaris*)

Para este ensayo, se utilizó la metodología descrita por Oliva-García y Gómez-Luna (2016). Se preparó para cada aislado junto con un control negativo un inóculo de 10 mL de Caldo Papa Dextrosa, el cual se puso en agitación constante por al menos 24 h a 28 °C y a 150 rpm.

Posteriormente, se lavaron 25 semillas de lentejas (Hortyjardín®) para cada aislado y se desinfectaron con una solución de alcohol etílico al 70% (v/v) durante 20 segundos; una vez terminado el tiempo, se retiró el exceso de alcohol y se enjuagaron las semillas con

agua estéril por 30 segundos. Las semillas se colocaron en un tubo Falcon de 50 mL junto con el inóculo y se llevaron nuevamente a agitación por 30 minutos a 240 rpm.

Una vez terminado el tiempo de agitación, se les retiró el exceso de líquido y las semillas embebidas se colocaron en cajas Petri con papel húmedo estéril, a modo de una cámara húmeda. Las semillas se dejaron crecer por ocho días en un ambiente con luz óptima y se regaron cada dos días con 1.5 mL de agua estéril.

Pasado el tiempo de germinación, se midió la longitud de las plántulas y del área radial y se obtuvo un promedio por cada aislado. También se evaluó el porcentaje de germinación con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de germinación} = \frac{(100)(\text{no.de semillas germinadas})}{\text{cantidad inicial de semillas}} \quad (3)$$

El índice de vigorosidad (IV) se obtuvo de la siguiente forma:

$$IV = (\text{promedio de longitud de las plantulas})(\% \text{ de germinación}) \quad (4)$$

Una vez evaluadas todas los aislados bacterianos, se seleccionaron aquellos que superaron al control tanto en el porcentaje de germinación como en el índice de vigorosidad y se repitió el experimento, aumentando el número de semillas a 50 para cada tratamiento.

Se realizó un duplicado para este ensayo y la medición de las plántulas fue obtenida con software de procesamiento ImageJ.

### **3.11.2 Pepino (*Cucumis sativus*)**

Para este ensayo se utilizó la misma metodología descrita anteriormente para la desinfección de semillas, con la excepción de que se trabajaron con semillas de pepino (Vita®). Se utilizaron las mismas condiciones de cultivo y germinación para los inóculos.

Pasado el tiempo de germinación de las semillas, se midió la longitud de las plántulas y área radicular para obtener un promedio de esto y se evaluó también el porcentaje de germinación e índice de vigorosidad.

Finalmente, se midió el peso fresco de cinco plántulas escogidas al azar. El peso seco se obtuvo después de someter a las mismas plántulas a una temperatura de 80 °C en una

estufa de secado por al menos 24 h y, pasado este tiempo, se midió el peso de estas nuevamente. El peso húmedo se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Peso húmedo} = \text{Peso fresco} - \text{Peso seco} \quad (5)$$

Se realizó un duplicado para este ensayo y la medición de la imagen fue obtenida con software de procesamiento ImageJ.

### **3.12 Producción de compuestos volátiles para la inhibición de hongos fitopatógenos**

#### **3.12.1 *Fusarium spp***

Para la detección de la producción de compuestos volátiles emitidas por las rizobacterias, se utilizó la metodología propuesta por Osorio-Hernández y otros (2016), en donde se dejó en crecimiento en cajas Petri divididas un disco de 5 mm del micelio activo del hongo *Fusarium spp.* en medio PDA durante 48 h para asegurar su crecimiento. Posteriormente, se realizó un estriado vertical de cada uno de los aislados en el medio a 1.5 cm de distancia de la línea divisora de la caja.

Las cajas se incubaron a 28 °C durante ocho días y se llevó un registro del crecimiento del diámetro del micelio e intersección con la bacteria (si era el caso) cada día. Las cajas permanecieron selladas con plástico durante todo el experimento con el fin de asegurar la interacción únicamente por el espacio aéreo entre el hongo y la bacteria.

Para el control negativo se utilizó una placa con un medio PDA y solo con la presencia de *Fusarium spp.*, a modo de ver el crecimiento normal del hongo sin la interferencia de los compuestos volátiles emitidos por las rizobacterias y se determinó su cinética de crecimiento.

Aquellos tratamientos que lograron inhibir o frenar el avance del hongo se les dejó en observación durante una semana más para ver su evolución, llegando hasta un máximo de cuatro semanas a partir del primer día de inoculación. La medición de la imagen fue obtenida con software de procesamiento ImageJ.

### **3.12.2 *Rhizoctonia* spp.**

Para este ensayo, se utilizó la misma metodología descrita anteriormente, utilizando el hongo *Rhizoctonia* spp.

Aquellos tratamientos que lograron inhibir o frenar el avance del hongo se les dejó en observación durante una semana más para ver su evolución, llegando hasta un máximo de cuatro semanas a partir del primer día de inoculación. La medición de la imagen fue obtenida con software de procesamiento ImageJ.

### **3.13 Preservación de los aislados bacterianos**

Para la preservación de la colección bacteriana, se utilizó la metodología descrita por Pérez-Reytor y Sosa-Espinosa (2010) modificando las concentraciones del caldo y crioprotector. Se cultivó cada uno de los aislados en medio LB inoculándolos en 3 mL de medio y se dejaron incubar en agitación por al menos 24 h a 28 °C y a 150 rpm.

Transcurrido el tiempo de incubación, se recuperó 2 mL del caldo bacteriano y se centrifugó a 10000 rpm durante 6 minutos. Posteriormente se descartó el sobrenadante y el precipitado resultante se resuspendió en 1 mL de medio LB y se le añadió 500 µl de glicerol biesterilizado al 100%.

La colección se resguardó a -71 °C. en un ultracongelador Panasonic® Pro Series MDF-U5486SC.

### **3.14 Análisis estadístico**

El análisis estadístico de este trabajo se realizó a través de un Análisis de Varianza (ANOVA) de diseño aleatorio y la comparación de medias fue llevada a cabo utilizando una prueba de diferencia mínima significativa de Tukey, utilizando un nivel de significancia del 95% a través del software estadístico Minitab.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Aislamiento, purificación y actividad de la enzima ACC desaminasa de las rizobacterias

Del aislamiento y purificación de las rizobacterias provenientes de suelo del ANP Sierra de los Agustinos, se obtuvieron 52 aislados bacterianos con actividad para la enzima ACC desaminasa, la cual se determinó con el crecimiento observable de las bacterias sobre la estría en el medio Dworkin-Foster después de una semana en incubación, como se puede observar en la Figura 4.1. Esta determinación cualitativa se realizó a través de un estudio de imagen por medio de la medición de la biomasa a partir del crecimiento bacteriano en la línea de estriado en diagonal para cada uno de los aislados.

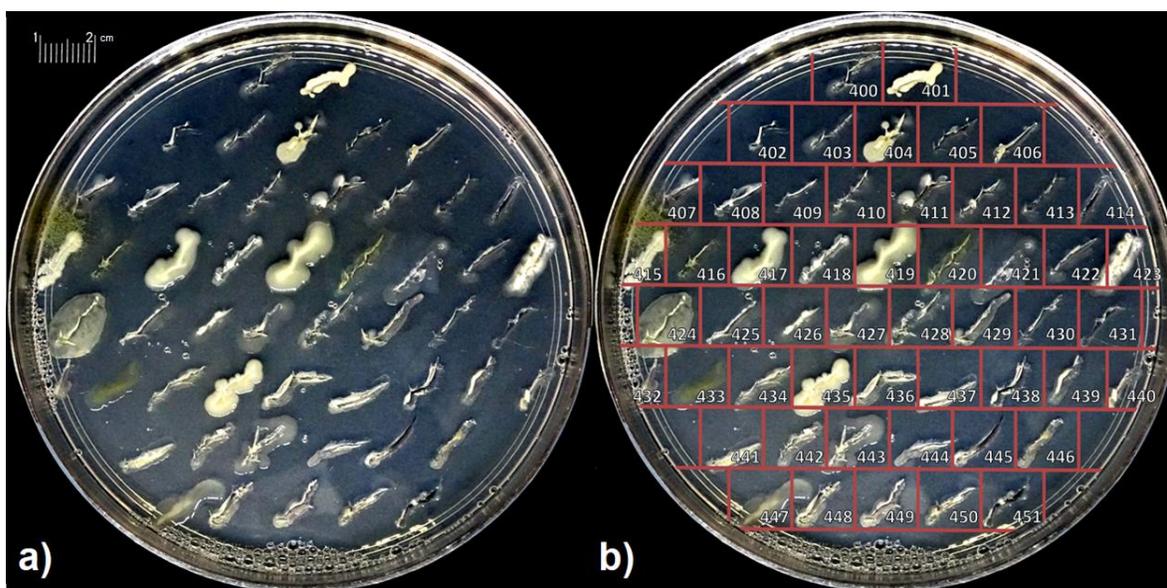


Figura 4.1 Crecimiento de los aislados en el medio selectivo para la actividad de ACC desaminasa. En a) se muestra la producción de biomasa bacteriana de los aislados y en b) se observa su ubicación en el medio de cada uno.

A continuación, se muestran los resultados de las mediciones en la Tabla 4.1 y su análisis en el crecimiento de biomasa.

Tabla 4.1 Análisis de las pruebas cualitativas para la producción de la enzima ACC desaminasa

Aislado	Longitud de la biomasa (cm)	Aislado	Longitud de la biomasa (cm)
400	0.137±0.026	426	0.115±0.005
401	<b>0.152±0.020</b>	427	<b>0.191±0.027</b>
402	0.073±0.002	428	0.117±0.042
403	0.126±0.030	429	0.138±0.014
404	<b>0.168±0.045</b>	430	0.090±0.015
405	0.102±0.017	431	0.058±0.004
406	0.094±0.012	432	0.097±0.007
407	0.147±0.039	433	<b>0.188±0.036</b>
408	0.125±0.035	434	0.108±0.020
409	0.147±0.034	435	<b>0.204±0.020</b>
410	0.108±0.030	436	0.178±0.015
411	0.146±0.053	437	0.121±0.006
412	0.125±0.047	438	0.113±0.029
413	0.116±0.020	439	0.120±0.004
414	0.110±0.031	440	0.085±0.045
415	<b>0.151±0.024</b>	441	0.122±0.061
416	0.119±0.023	442	0.144±0.012
417	<b>0.198±0.017</b>	443	<b>0.158±0.013</b>
418	0.079±0.013	444	0.105±0.014
419	<b>0.235±0.034</b>	445	0.090±0.024
420	0.161±0.040	446	0.140±0.023
421	<b>0.191±0.052</b>	447	<b>0.163±0.031</b>
422	0.167±0.009	448	0.125±0.007
423	<b>0.207±0.023</b>	449	<b>0.157±0.045</b>
424	<b>0.384±0.051</b>	450	0.087±0.038
425	0.187±0.026	451	0.093±0.017

El número seguido de ± indica la desviación estándar.

Diversos autores han utilizado el medio DF adicionado con ACC para evaluar la capacidad de la enzima ACC desaminasa (Luna-Martínez y otros, 2013; Angulo y otros, 2014; Mejía-Bautista y otros, 2022), siendo este un método confiable para su análisis cualitativo. Los aislados que demostraron poseer un mayor crecimiento en el medio selectivo fueron: 401, 404, 415, 417, 419, 423, 424, 427, 433, 435, 443, 447 y 449; los cuales alcanzaron una longitud de biomasa superior a 0.15 cm a partir del estriado. Los aislados presentaron colonias diferentes en morfología y color; los aislados 427, 433, 447 y 449 fueron transparentes mientras que el resto de los aislados presentaron una apariencia lechosa y densa.

Actualmente, se ha reconocido la presencia de la enzima ACC desaminasa en diversas cepas bacterianas que abarcan una amplia variedad de géneros, entre los que se incluyen: *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Methylobacterium*, *Mesorhizobium*, *Pseudomonas* y *Sinorhizobium* (Molina-Romero y otros, 2015; Patil y otros, 2016). La actividad de esta enzima ha sido reportada como favorable en la promoción del crecimiento en plantas como: tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), pimiento (*Capsicum annuum* L.) (Luna-Martínez y otros, 2013), eucalipto (*Eucalyptus nitens*) (Angulo y otros, 2014) y chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) (Mejía-Bautista y otros, 2022).

## 4.2 Tinción de Gram

La clasificación de los aislados bacterianos a través de su pared celular se determinó mediante la tinción de Gram, en donde se pudieron determinar que 26 de los aislados de la colección son Gram positivo y los 26 restantes son Gram negativo. En la Tabla 4.2 se muestran estos resultados junto con la identificación morfológica de la colección, como se muestra en la Figura 4.2.

Tabla 4.2 Características morfológicas de los aislados bacterianos

Gram +				Gram -			
Cepa	Morfología	Cepa	Morfología	Cepa	Morfología	Cepa	Morfología
400	Bacilos	420	Bacilos	402	Bacilos	436	Diplobacilos

401	Bacilos	421	Bacilos	408	Bacilos	438	Bacilos
403	Cocos	422	Cocos	413	Bacilos	439	Diplobacilos
404	Cocos	423	Cocos	415	Bacilos	440	Diplobacilos
405	Bacilos	424	Bacilos	417	Bacilos	441	Bacilos
406	Bacilos	426	Bacilos	418	Cocos	442	Diplobacilos
407	Cocos	427	Cocos	419	Bacilos	444	Bacilos
409	Bacilos	430	Bacilos	425	Bacilos	445	Bacilos
410	Bacilos	431	Bacilos	428	Bacilos	446	Bacilos
411	Cocos	435	Bacilos	429	Diplobacilos	447	Cocos
412	Cocos	437	Bacilos	432	Diplobacilos	448	Bacilos
414	Cocos	443	Cocos	433	Bacilos	449	Bacilos
416	Bacilos	451	Bacilos	434	Bacilos	450	Bacilos

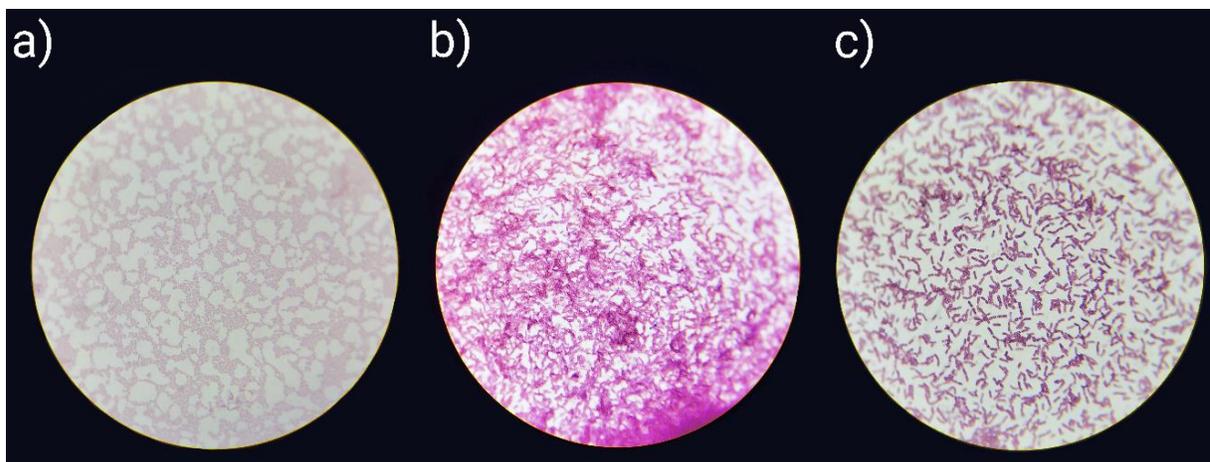


Figura 4.2 Morfología y tinción de Gram de los aislados. En a) se observa el aislado 406, la cual es Gram – y de tipo coco; en b) se muestra el aislado 428, la cual es Gram + y de tipo bacilo; y en c) se presenta el aislado 440, la cual es Gram + y de tipo diplobacilo.

De los 52 aislados de la colección, 16 son del tipo bacilo Gram +. Estas pueden ser asociadas al género *Bacillus*, mencionada anteriormente por su capacidad de producir ACC desaminasa. Este género, además, es parte de un conjunto de bacterias aeróbicas que forman endosporas y son comunes en el suelo y la rizosfera (Adame-García y otros, 2021). Especies como *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *B. cereus* y *B. pumilus*

pueden ayudar a mejorar el crecimiento y desarrollo de las plantas a través de la producción de compuestos orgánicos (Meena V. S. y otros, 2016).

### 4.3 Determinación cualitativa de solubilización de fosfatos

De acuerdo con los resultados, 37 de los 52 aislados presentaron actividad favorable para la solubilización de fosfatos, la cual pudo ser visualizada gracias al cambio de color azul a amarillo-naranja en el medio Pikovskaya adicionado, como se puede observar en la Figura 4.3. En la Tabla 4.3 se presentan los diámetros de la colonia y del halo de cada colonia.

Tabla 4.3 Resultados de la evaluación cualitativa para la solubilización de fosfatos

Aislado	Diámetro de la colonia (cm)	Diámetro del halo (cm)	Aislado	Diámetro de la colonia (cm)	Diámetro del halo (cm)
<b>400</b>	<b>0.776±0.114</b>	<b>1.369±0.244</b>	<b>426</b>	<b>1.007±0.094</b>	<b>1.179±0.042</b>
<b>401</b>	<b>0.943±0.070</b>	<b>1.147±0.106</b>	<b>427</b>	<b>0.917±0.064</b>	<b>1.184±0.069</b>
402	S/P	S/P	428	0.364±0.078	0.540±0.098
<b>403</b>	<b>0.995±0.045</b>	<b>1.142±0.036</b>	429	S/P	S/P
<b>404</b>	<b>0.911±0.069</b>	<b>1.039±0.028</b>	<b>430</b>	<b>0.745±0.078</b>	<b>1.351±0.089</b>
405	0.463±0.160	0.987±0.067	<b>431</b>	<b>0.665±0.082</b>	<b>1.245±0.062</b>
<b>406</b>	<b>0.519±0.078</b>	<b>1.237±0.015</b>	432	0.757±0.039	0.853±0.043
407	0.084±0.030	0.293±0.091	433	S/P	S/P
408	0.279±0.059	0.475±0.054	434	S/P	S/P
409	0.364±0.086	0.501±0.089	435	0.348±0.056	0.513±0.049
<b>410</b>	<b>0.771±0.096</b>	<b>1.003±0.048</b>	436	S/P	S/P
<b>411</b>	<b>0.489±0.057</b>	<b>1.287±0.079</b>	437	0.653±0.104	0.909±0.096
<b>412</b>	<b>1.129±0.088</b>	<b>1.297±0.055</b>	438	S/P	S/P
413	0.098±0.047	0.141±0.022	<b>439</b>	<b>1.049±0.116</b>	<b>1.263±0.057</b>
<b>414</b>	<b>0.739±0.043</b>	<b>1.207±0.018</b>	440	S/P	S/P
415	0.293±0.132	0.447±0.162	441	0.130±0.038	0.229±0.022
416	0.095±0.045	0.203±0.061	442	0.250±0.036	0.425±0.044
417	S/P	S/P	443	0.137±0.041	0.231±0.049
418	0.116±0.043	0.189±0.025	444	0.101±0.041	0.233±0.086

419	S/P±S/P	S/P	445	S/P	S/P
420	0.072±0.003	0.157±0.040	446	0.505±0.019	0.574±0.134
<b>421</b>	<b>1.070±0.256</b>	<b>1.189±0.068</b>	447	S/P	S/P
422	0.482±0.327	0.609±0.249	448	S/P	S/P
423	S/P	S/P	449	S/P	S/P
424	S/P	S/P	<b>450</b>	<b>0.414±0.052</b>	<b>0.975±0.028</b>
<b>425</b>	<b>0.606±0.096</b>	<b>1.608±0.050</b>	451	0.226±0.027	0.710±0.019

S/P: sin presencia de solubilización. El número seguido de ± indica la desviación estándar.

De los 37 aislados mencionados anteriormente, solo 14 de estos pudieron superar el centímetro en el diámetro del halo y, respecto a la relación entre el radio de la colonia y el de los halos, 8 de estas pudieron superar los 0.25 cm de distancia, siendo los aislados 425 (0.501 cm), 411 (0.399 cm), 406 (0.359 cm), 430 (0.303 cm), 400 (0.296 cm), 431 (0.29 cm), 450 (0.28 cm) y 405 (0.262 cm) las que más destacaron. Para esta prueba se estableció la distancia entre el radio de la colonia y el halo de coloración en 0.25 cm como punto de referencia, lo que podría indicar una mayor capacidad solubilizadoras en comparación con aquellas que tienen un halo más pequeño o no lo presentan.

La utilización del medio Pikovskaya para la determinación cualitativa de producción de fosfatos en aislados bacterianos ha sido utilizada por un gran número de autores (Sanchez-Gonzalez y otros, 2023; Joe y otros, 2018; Naik y otros, 2008; Jha y otros, 2009) gracias a la efectividad relativa de las cepas aisladas, la cual se logra al seleccionar a los microorganismos capaces de generar un halo o área transparente en la placa, resultado de la producción de ácidos orgánicos en el medio, como el ácido cítrico o el ácido oxálico, o enzimas fosfatasas, los cuales disuelven los materiales fosfatados y quelan complejos catiónicos de iones de fósforo, es decir  $PO_4^{3-}$ , liberando así el fósforo. Esto mejora la disolución en fuentes con fósforo poco soluble, incluyendo fosfatos de hierro y aluminio y apatita, mediante procesos de acidificación y complejación (He y otros, 2002; Violante y otros, 1991). Asimismo, se ha reportado la disminución significativa del pH en el medio gracias a la producción microbiana de ácidos orgánicos, estableciendo así una relación entre la acidez del medio y la liberación de fosfatos solubles (Illmer & Schinner, 1995; Chen y otros, 2006; Pandey & Palni, 1998).

No obstante, se cuestiona la fiabilidad de esta técnica, ya que varios aislados que no producen ningún halo o área visible en las placas de agar demostraban tener la capacidad de solubilizar diversos tipos de fosfatos inorgánicos insolubles en el medio líquido (Gupta y otros, 1994; Louw & Webley, 1959), por lo que no se descarta la posibilidad de encontrar más aislados con capacidad de solubilizar fosfato mediante otras técnicas.

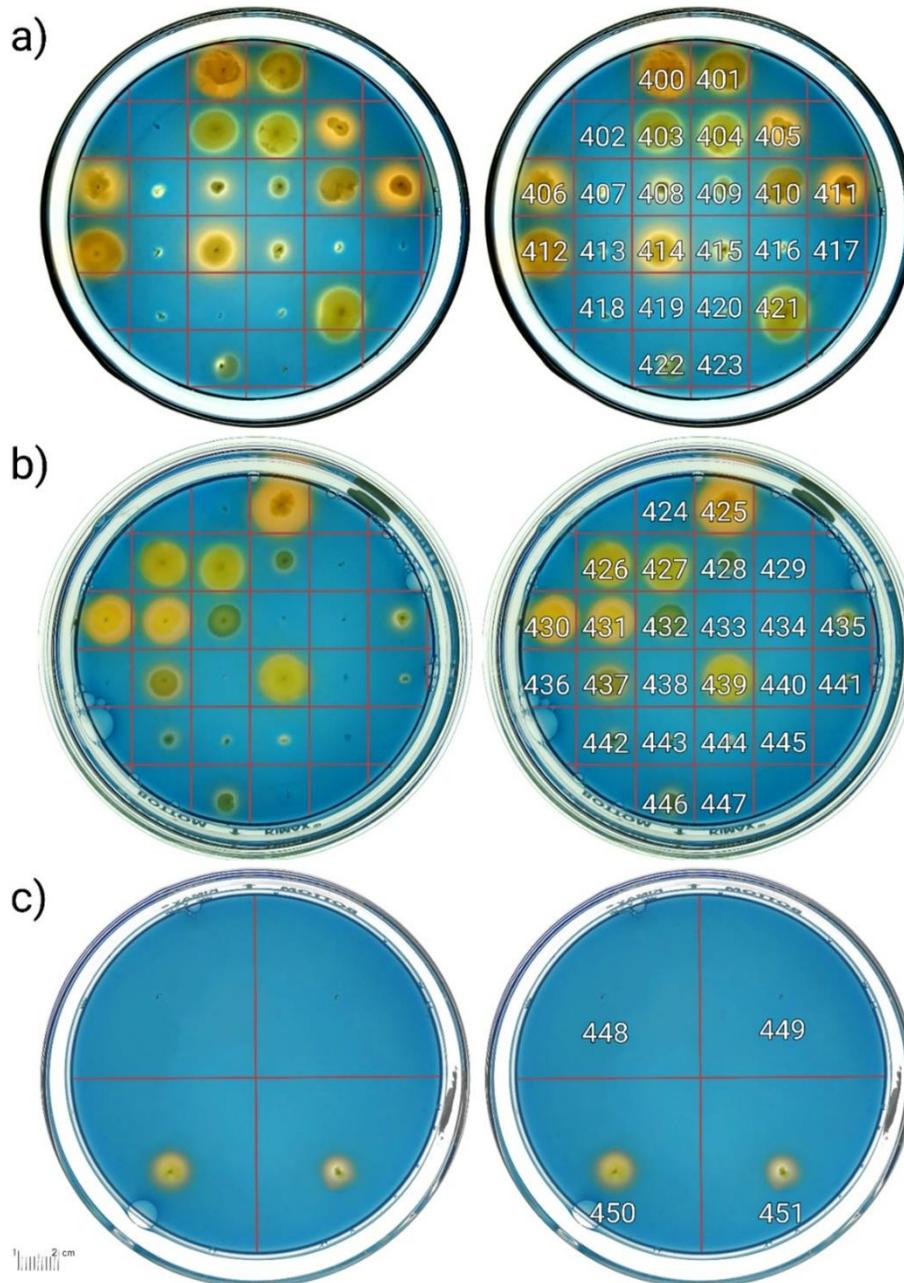


Figura 4.3 Solubilización de fosfato en medio Pikovskaya modificado a partir de una semana de la inoculación. En a) se muestra del aislado 400 a 423, cuya disposición se denota a la derecha; en b) se encuentra del aislado 424 a 447; y en c) se visualizan del aislado 448 a la 451.

#### 4.4 Determinación cuantitativa de solubilización de fosfatos

Se obtuvo la curva de calibración y a partir de ella se generó la ecuación para poder relacionar la absorbancia de cada uno de los aislados a 660 nm en función de la concentración de fosfato, la cual se puede observar en la Figura 4.4.1. Se eligieron los 17 aislados que presentaron mejores resultados de la prueba anterior, tanto como que presentaran un diámetro del halo mayor a 1 cm y que la distancia entre este y el diámetro de la biomasa fuera superior a 0.25 cm de distancia; se les realizó la lectura de su absorbancia, con la que se pudo determinar su concentración de fosfatos a través de la Fórmula 2, como se puede observar en la Tabla 4.4.

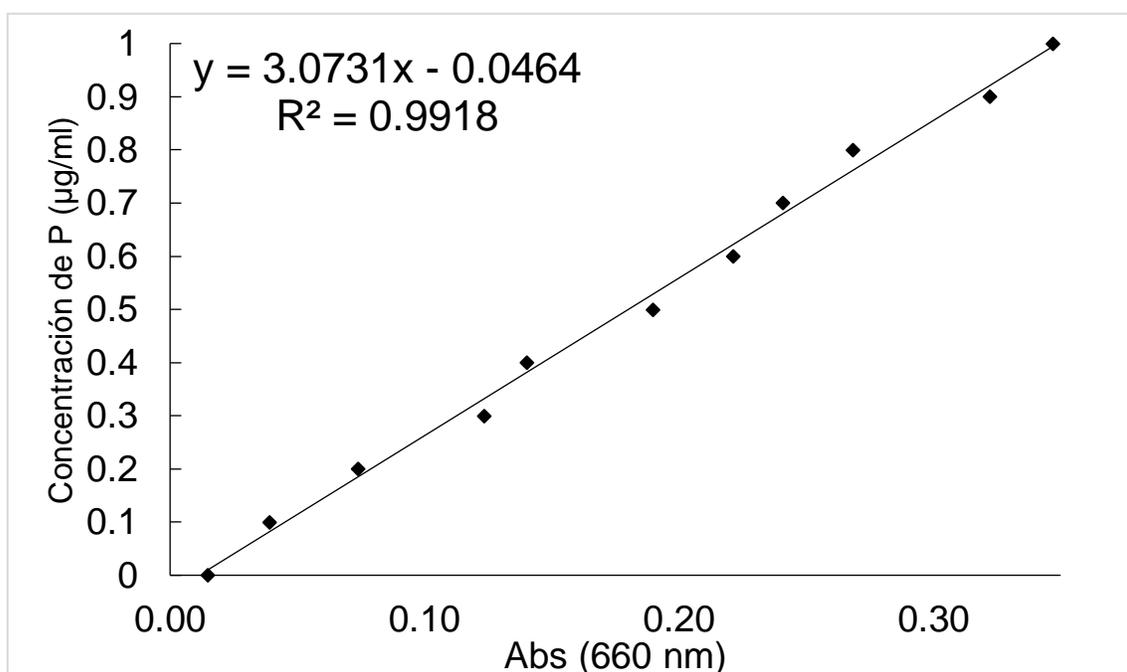


Figura 4.4.1 Curva de calibración de fosfatos.

Tabla 4.4 Resultados de la evaluación cuantitativa para la solubilización de fosfatos

Aislado	Abs <sub>660</sub>	Concentración de P (µg/ml)	Aislado	Abs <sub>660</sub>	Concentración de P (µg/ml)
400	0.179±0.135	4.189	426	0.160±0.075	3.702
<b>401</b>	<b>0.214±0.170</b>	<b>5.102</b>	427	0.140±0.076	3.199
402	S/P	S/P	428	S/P	S/P
<b>403</b>	<b>0.247±0.174</b>	<b>5.930</b>	429	S/P	S/P
404	0.206±0.160	4.889	430	0.195±0.115	4.607

405	S/P	S/P	431	0.193±0.091	4.564
<b>406</b>	<b>0.226±0.181</b>	<b>5.392</b>	432	S/P	S/P
407	S/P	S/P	433	S/P	S/P
408	S/P	S/P	434	S/P	S/P
409	S/P	S/P	435	S/P	S/P
410	0.117±0.049	2.610	436	S/P	S/P
411	0.206±0.194	4.897	437	S/P	S/P
412	0.140±0.065	3.190	438	S/P	S/P
413	S/P	S/P	439	0.115±0.031	2.558
<b>414</b>	<b>0.222±0.208</b>	<b>5.307</b>	440	S/P	S/P
415	S/P	S/P	441	S/P	S/P
416	S/P	S/P	442	S/P	S/P
417	S/P	S/P	443	S/P	S/P
418	S/P	S/P	444	S/P	S/P
419	S/P	S/P	445	S/P	S/P
420	S/P	S/P	446	S/P	S/P
<b>421</b>	<b>0.306±0.076</b>	<b>7.441</b>	447	S/P	S/P
422	S/P	S/P	448	S/P	S/P
423	S/P	S/P	449	S/P	S/P
424	S/P	S/P	<b>450</b>	<b>0.276±0.165</b>	<b>6.681</b>
425	0.155±0.028	3.574	451	S/P	S/P

S/P: sin presencia de producción. El número seguido de ± indica la desviación estándar.

Todos los aislados, hasta el control, presentaron una coloración azul de Prusia (#002b52), como se aprecia en la Figura 4.4.2 debido a la adición del ácido cloroestañoso, el cual forma un complejo azul intenso con el fosfato en medio ácido. Los aislados con producción de fosfato más destacable fueron 421 (7.441 µg/ml), 450 (6.681 µg/ml), 403 (5.930 µg/ml), 406 (5.392 µg/ml), 414 (5.307 µg/ml) y 401 (5.102 µg/ml).

Varios autores han reportado el incremento de la producción de fosfato en rizobacterias luego de mantenerse en incubación por cinco días. Morales-Torres (2012) reportó concentraciones entre 1 a 22 µg/ mL en las primeras 48 h de incubación hasta llegar de 150 a 310 µg/mL después de 5 días en incubación para bacterias provenientes de

suelos calcáreos, bosques de encino y raíces de agave. Thakur y Parikh (2016) mostraron, en sus resultados, aumento en las concentraciones de fosfato de 0.44 a 13.74  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en las primeras 72 h de incubación hasta llegar de 1.01 a 40.54  $\mu\text{g}/\text{mL}$  después de 10 días en incubación para bacterias provenientes de suelos agrícolas de cacahuate (*Arachis hypogaea* L.). Asimismo, bacterias aisladas de muestras de composta reportaron un incremento de 5 a 17.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de fosforo en las primeras 24 h de incubación (Bobadilla & Rincón, 2008) lo que sugiere el incremento en la producción de fosfato es proporcional al tiempo de incubación, por lo que es posible un incremento en las concentraciones de esta colección si el tiempo de incubación se extiende. La importancia de la solubilización de fosfato por parte de las rizobacterias radica en mejorar la disponibilidad de este en el suelo, estimulando así el crecimiento vegetal y reduciendo la dependencia a la aplicación de fertilizantes químicos.

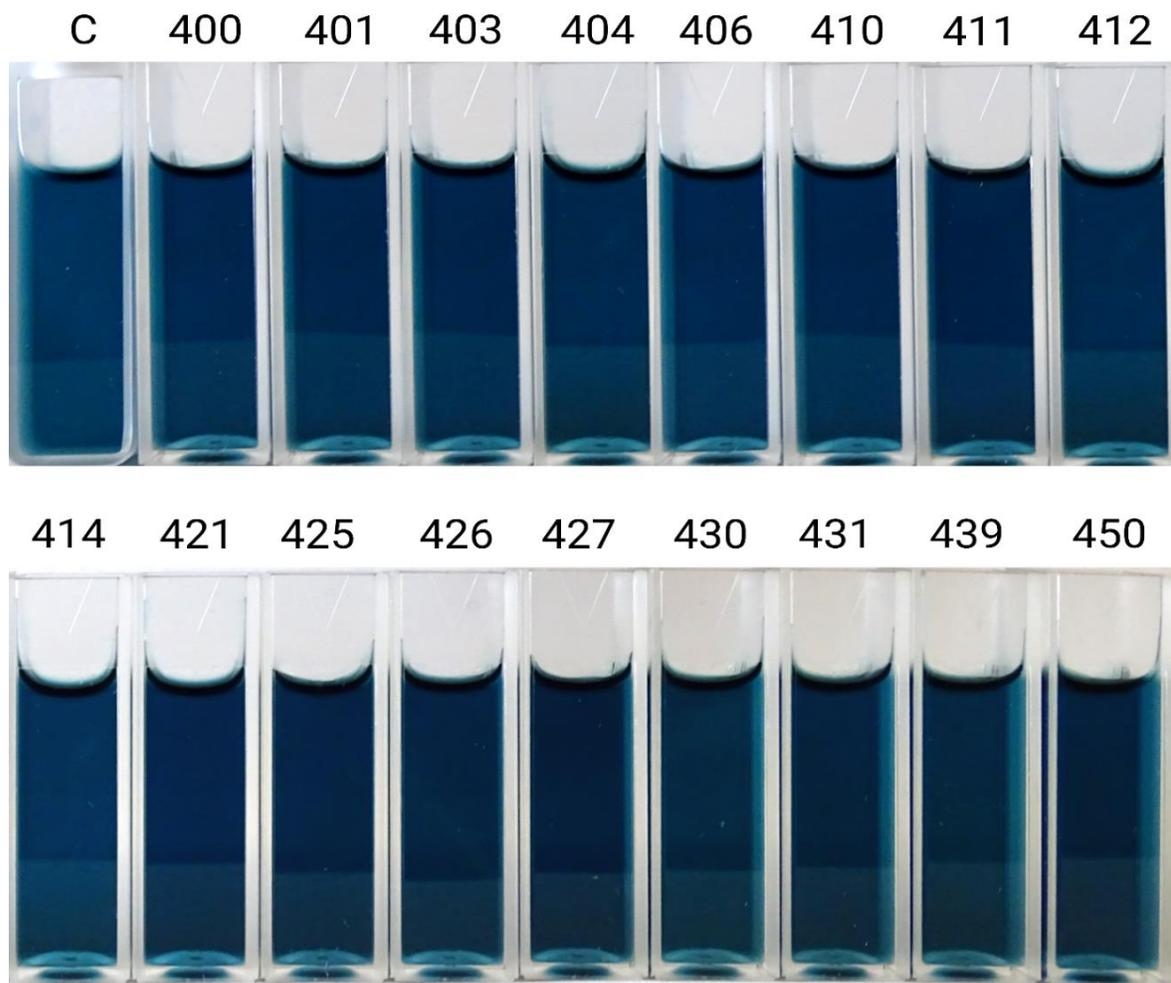


Figura 4.4.2 Determinación cuantitativa de fosfatos de los aislados con más producción de la prueba cualitativa a las 72 h de incubación.

## 4.5 Solubilización de potasio

De acuerdo con los resultados, solo 2 de los 52 aislados presentaron actividad favorable para la solubilización de potasio, la cual pudo ser visualizada gracias al cambio de color azul a amarillo del medio Pikovskaya modificado, como se puede observar en la Figura 4.5. En la Tabla 4.5 se presentan los diámetros de la colonia y del halo de cada colonia.

Tabla 4.5 Resultados de la evaluación cualitativa para la solubilización de potasio

Aislado	Diámetro de la colonia (cm)	Diámetro del halo (cm)	Aislado	Diámetro de la colonia (cm)	Diámetro del halo (cm)
400	0.411±0.053	S/P	426	0.887±0.066	S/P
401	0.559±0.098	S/P	427	0.509±0.114	S/P
402	0.318±0.227	S/P	428	0.698±0.128	S/P
403	0.445±0.033	S/P	429	1.138±0.043	S/P
404	0.648±0.085	S/P	430	3.363±0.487	S/P
405	0.419±0.059	S/P	431	S/P	S/P
406	0.534±0.076	S/P	432	0.999±0.124	S/P
407	0.131±0.026	S/P	433	S/P	S/P
408	0.632±0.029	S/P	434	0.919±0.099	S/P
409	0.439±0.058	S/P	435	0.149±0.055	S/P
410	0.641±0.134	S/P	436	1.078±0.134	S/P
411	S/P	S/P	437	0.603±0.090	S/P
412	0.459±0.095	S/P	438	0.855±0.086	S/P
413	0.451±0.165	S/P	<b>439</b>	<b>0.809±0.058</b>	<b>2.319±0.082</b>
414	0.542±0.097	S/P	440	0.629±0.038	S/P
415	S/P	S/P	441	0.491±0.047	S/P
416	S/P	S/P	442	0.403±0.186	S/P
417	0.554±0.076	S/P	443	0.163±0.076	S/P
418	0.729±0.063	S/P	444	S/P	S/P
419	S/P	S/P	445	1.693±0.245	S/P
420	2.968±0.845	S/P	446	1.057±0.240	S/P
421	0.713±0.162	S/P	447	S/P	S/P

422	S/P	S/P	448	1.477±0.077	S/P
423	0.565±0.022	S/P	449	2.365±0.565	S/P
424	0.427±0.086	S/P	<b>450</b>	<b>0.269±0.112</b>	<b>1.023±0.090</b>
425	S/P	S/P	451	S/P	S/P

S/P: sin presencia de solubilización. El número seguido de ± indica la desviación estándar.

Se pudo formar una colonia bacteriana en 41 de los 52 aislados, lo que indica su capacidad de crecer en el medio Pikovskaya adicionado con nitrato de potasio como fuente única de potasio, aunque solo dos de estos tuvieron la capacidad de solubilizar este compuesto. Aunque ambos lograron superar más de 0.75 cm de diámetro del halo, y su relación entre el radio de la colonia y el halo fue de 0.755 cm para el aislado 439 y 0.377 cm para el aislado 450, el cambio de coloración en el medio gracias al indicador es más visible en este último.

El colorante orgánico verde de bromocresol otorga una mejor visibilidad del halo frente a otros colorantes como el azul de bromotimol o Rojo Congo (Joe y otros, 2018). Mayoritariamente se utiliza como indicador de cambios en el pH, cambiando la apariencia del medio de azul-verde a amarillo en el rango de pH de 3.8 a 5.4. Por lo tanto, el cambio de coloración observado se debe a la acción bacteriana al producir compuestos orgánicos, tales como ácido oxálico, ácido cítrico (Prajapati & Modi, 2012), ácido ferúlico, ácido cumárico (Setiawati & Mutmainnah, 2016), ácido fórmico, ácido málico, ácido acético (Shanware y otros, 2014) y ácido tartárico (Hu y otros, 2006); los cuales acidifican el medio y tienen la capacidad de mejorar la disolución de minerales que contienen potasio al proporcionar protones, desestabilizar la superficie de dichos minerales y formar complejos con iones  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Al}^{3+}$  (Meena S. V. y otros, 2015; Fatharani & Rahayu, 2018).

Aunque el medio Pikovskaya ha sido utilizado para la determinación cualitativa de solubilización de potasio por varios autores (Nawaz y otros, 2023; Delgado-Ramírez y otros, 2021; Mursyida y otros, 2015), el medio agar Alexandrov es el más utilizado para este tipo de pruebas, por lo que no se descarta la posibilidad de encontrar más aislados con capacidad de solubilizar potasio a través de este medio.

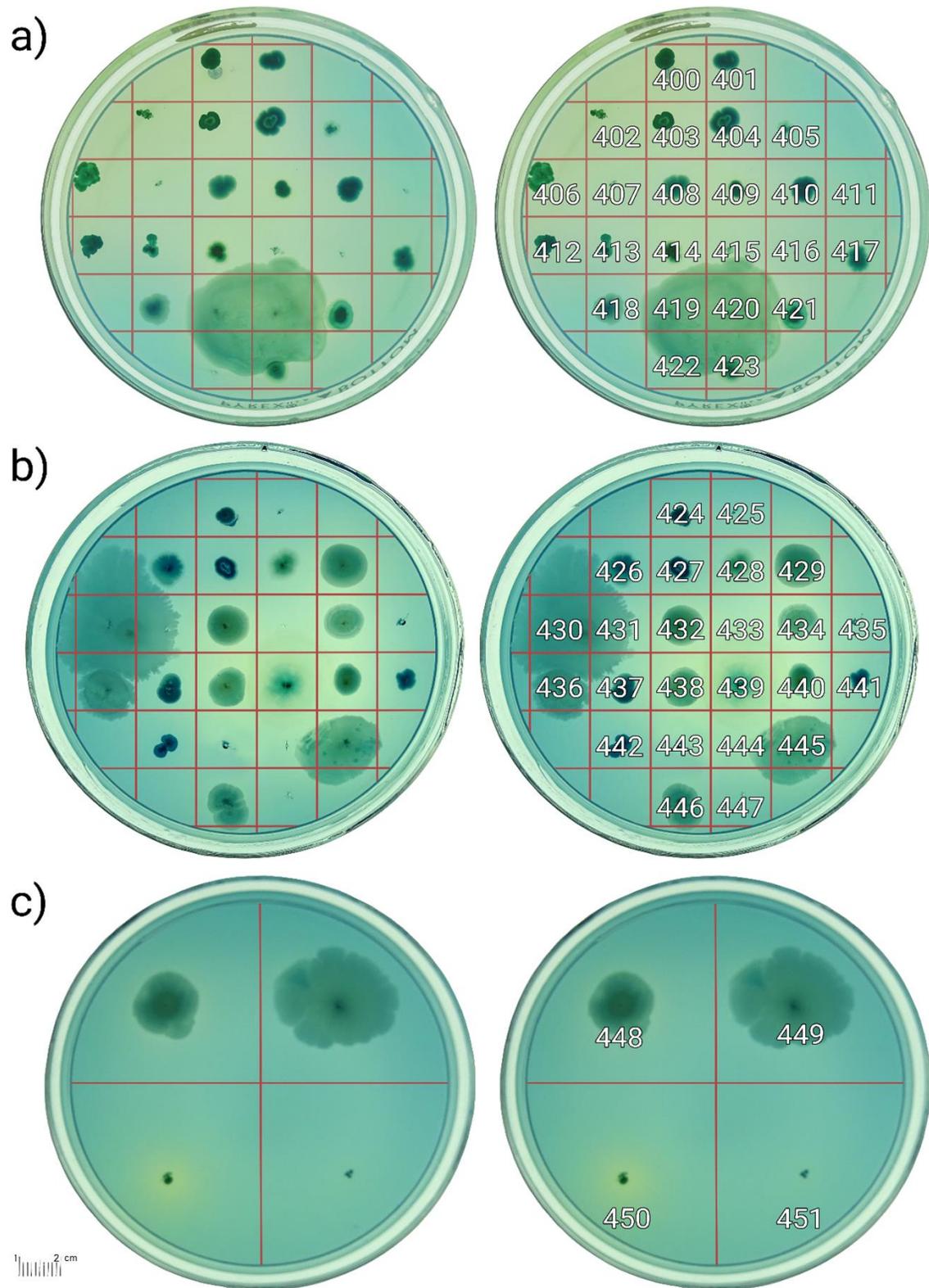


Figura 4.5 Solubilización de potasio en medio Pikovskaya modificado a partir de una semana de la inoculación. En a) se muestra del aislado 400 a 423, cuya disposición de denota a la derecha; en b) se encuentra del aislado 424 a 447; y en c) se visualizan del aislado 448 a la 451.

## 4.6 Producción de sideróforos

Para esta prueba, 34 de los 52 aislados presentaron actividad favorable para la producción de sideróforos, la cual pudo ser visualizada gracias al cambio de color azul del medio CAS modificado a amarillo-naranja, como se puede observar en la Figura 4.6. En la Tabla 4.6 se presentan los diámetros de la colonia y del halo de cada colonia.

Tabla 4.6 Resultados de la evaluación cualitativa para la producción de sideróforos

Aislado	Diámetro de la colonia (cm)	Diámetro del halo (cm)	Aislado	Diámetro de la colonia (cm)	Diámetro del halo (cm)
400	1.087±0.230	1.279±0.197	426	1.857±0.445	2.138±0.244
401	1.547±0.647	1.667±0.614	427	1.163±0.155	1.473±0.098
402	S/P	S/P	428	0.918±0.062	1.091±0.190
403	1.662±0.416	2.154±0.147	429	S/P	S/P
404	1.219±0.206	1.666±0.232	430	S/P	S/P
405	0.895±0.150	1.055±0.144	431	1.161±0.181	1.590±0.194
406	1.239±0.296	1.430±0.163	432	S/P	S/P
407	0.507±0.026	0.937±0.034	433	S/P	S/P
408	0.483±0.091	0.596±0.039	434	0.745±0.618	0.903±0.606
<b>409</b>	<b>1.049±0.129</b>	<b>1.552±0.152</b>	435	0.529±0.101	0.965±0.156
410	1.842±0.332	1.999±0.411	436	S/P	S/P
411	S/P	S/P	437	S/P	S/P
412	1.604±0.211	2.023±0.173	438	0.647±0.189	0.968±0.169
413	0.323±0.105	0.465±0.049	439	S/P	S/P
414	1.535±0.460	1.888±0.093	440	1.923±0.454	2.375±0.465
415	0.441±0.096	0.599±0.005	441	0.751±0.042	1.225±0.082
416	0.247±0.040	0.349±0.027	442	S/P	S/P
417	0.856±0.263	1.216±0.206	443	S/P	S/P
418	0.266±0.036	0.501±0.026	444	0.193±0.012	0.312±0.011
419	S/P	S/P	445	0.980±0.274	1.150±0.208
420	S/P	S/P	446	0.979±0.024	1.193±0.031
421	1.938±0.168	2.187±0.113	447	S/P	S/P

422	0.338±0.089	0.460±0.083	448	S/P	S/P
423	0.873±0.190	0.987±0.240	449	S/P	S/P
424	0.208±0.025	0.504±0.027	<b>450</b>	<b>1.540±0.059</b>	<b>2.238±0.192</b>
425	S/P	S/P	<b>451</b>	<b>1.489±0.195</b>	<b>2.225±0.192</b>

S/P: sin presencia de producción. El número seguido de ± indica la desviación estándar.

De los 34 aislados mencionados anteriormente, solo 22 de estos pudieron superar el centímetro en el diámetro del halo y, respecto a la relación entre el radio de la colonia y el de los halos, 3 de estas pudieron superar los 0.25 cm de distancia, siendo los aislados 451 (0.368 cm), 450 (0.349 cm) y 409 (0.252 cm) las que más destacaron. Como se mencionó anteriormente, se estableció la distancia entre el radio de la colonia y el halo de coloración en 0.25 cm como punto de referencia.

Asimismo, se observó en algunos aislados la presencia de un pigmento verde en su biomasa, como ocurre con 408, 416, 418, 422, 434, 438, 445 y 446. La presencia de este pigmento podría estar vinculada a la generación de sideróforos del conjunto catecolato, los cuales suelen presentar fluorescencia. Bacterias del género *Pseudomonas* son capaces de sintetizar sideróforos fluorescentes de color amarillo-verde (Díaz-Amaya, 2009); sin embargo, de los aislados mencionadas solo 408, 434, 438, 445 y 446 son del tipo bacilo y Gram negativa, por lo que pueden ser potencialmente pertenecientes a este género.

El cambio de coloración en el medio es determinado por indicador CAS, el cual, en presencia de iones de hierro, es capaz de formar un complejo azul. Aquellas bacterias capaces de secretar sideróforos para quelar los iones de hierro y hacerlos solubles producen un cambio en el complejo con el azul de Cromo Azurol S. Esta unión forma un complejo diferente que conduce a un cambio en el color del medio, pasando de azul a amarillo (Schwyn & Neilands, 1987).

Aunque un gran número de autores utilizan este medio para la producción cualitativa de sideróforos en rizobacterias (Alexander & Zuberer, 1991; Chaihar y otros, 2009; Sultana y otros, 2021), la utilización del agar CAS proporciona solo una estimación aproximada y no constituye un método perfecto para cuantificar la producción de sideróforos. Por lo tanto, su estimación cualitativa puede realizarse empleando medios de cultivo líquidos y el reactivo CAS (Arora & Verma, 2017).

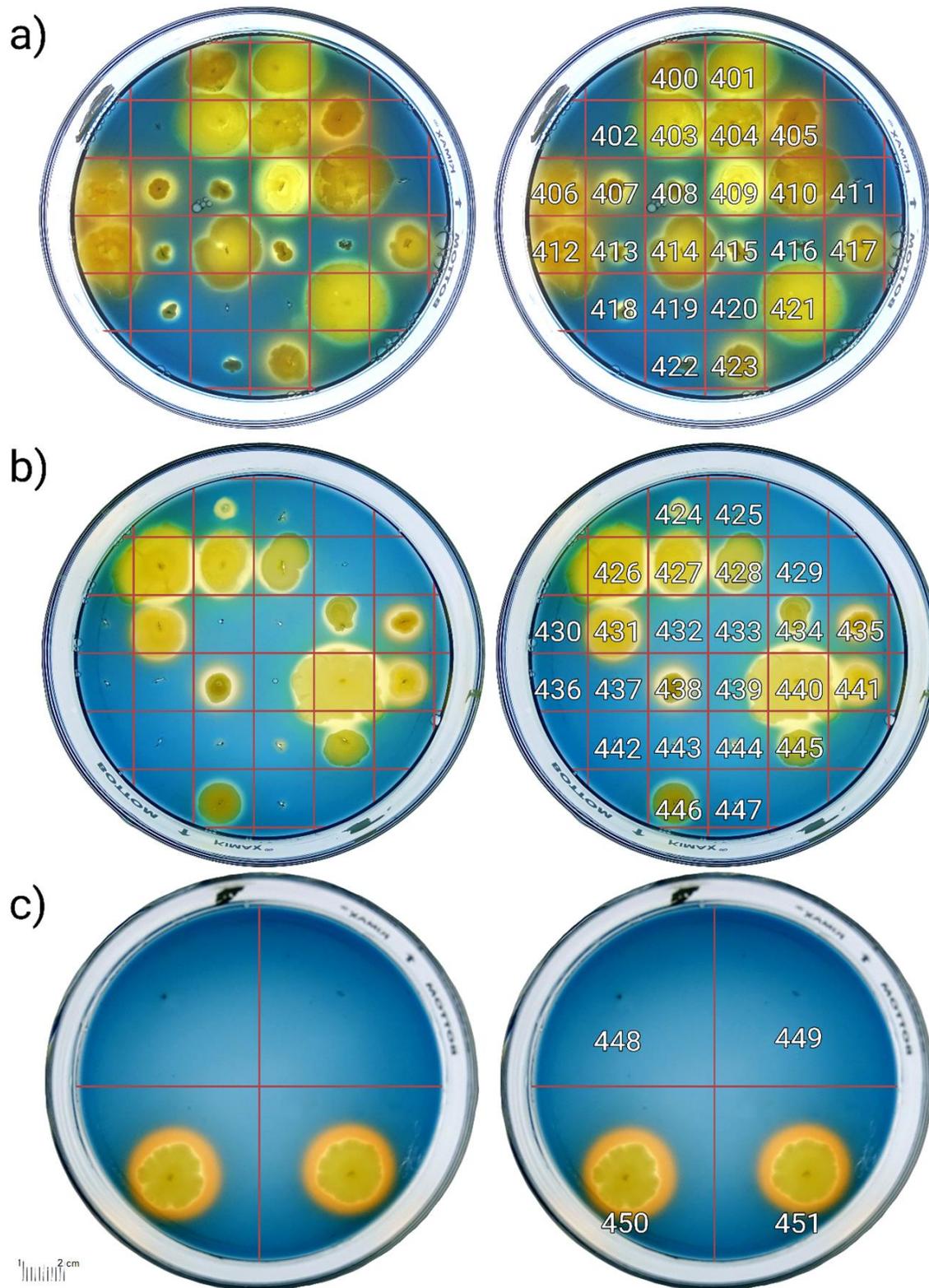


Figura 4.6 Producción de sideróforos en medio CAS modificado a partir de una semana de la inoculación. En a) se muestra del aislado 400 a 423, cuya disposición de denota a la derecha; en b) se encuentra del aislado 424 a 447; y en c) se visualizan del aislado 448 a la 451.

## 4.7 Presencia de enzimas extracelulares

### 4.7.1 Actividad de celulasas

De acuerdo con los resultados, 47 de los 52 aislados presentaron actividad favorable para la producción de celulasas, la cual pudo ser visualizada gracias a la formación de un halo claro en el medio Mandels y Reese adicionado, como se puede observar en la Figura 4.7.1. En la Tabla 4.7.1 se presentan los diámetros de la colonia y del halo de cada colonia.

Tabla 4.7.1 Resultados de la evaluación cualitativa para la actividad de celulasas

Aislado	Diámetro de la colonia (cm)	Diámetro del halo (cm)	Aislado	Diámetro de la colonia (cm)	Diámetro del halo (cm)
400	0.151±0.024	0.429±0.079	426	0.165±0.047	0.381±0.031
401	0.289±0.112	0.546±0.256	427	0.211±0.028	0.299±0.005
402	0.107±0.058	0.351±0.088	428	0.095±0.032	0.305±0.018
403	0.235±0.099	0.531±0.089	429	0.095±0.050	0.253±0.100
404	0.197±0.065	0.299±0.064	430	S/P	S/P
405	0.133±0.092	0.367±0.043	431	0.095±0.008	0.247±0.023
406	0.316±0.177	0.437±0.113	432	0.130±0.042	0.387±0.089
407	0.163±0.044	0.408±0.020	433	0.105±0.042	0.292±0.070
408	0.129±0.064	0.223±0.040	434	0.127±0.065	0.245±0.101
409	0.126±0.043	0.292±0.082	435	0.064±0.030	0.255±0.113
410	0.137±0.085	0.364±0.055	436	0.104±0.014	0.251±0.044
411	0.175±0.058	0.367±0.036	437	0.083±0.020	0.253±0.011
412	0.064±0.033	0.231±0.072	438	0.146±0.012	0.373±0.072
413	0.102±0.022	0.354±0.108	439	0.219±0.036	S/P
414	0.086±0.034	0.272±0.019	440	0.131±0.063	0.214±0.040
415	0.143±0.070	0.303±0.040	441	0.111±0.015	0.187±0.033
416	0.138±0.063	0.203±0.029	442	0.154±0.038	0.237±0.015
<b>417</b>	<b>0.151±0.043</b>	<b>1.586±0.307</b>	443	0.238±0.042	0.536±0.071
418	0.124±0.016	0.358±0.058	444	0.281±0.032	0.478±0.050
<b>419</b>	<b>1.004±0.037</b>	<b>2.497±0.094</b>	445	0.289±0.010	0.513±0.032
420	0.195±0.041	0.398±0.068	446	0.175±0.045	0.409±0.020

421	0.256±0.031	0.342±0.011	447	S/P	S/P
422	0.102±0.030	0.430±0.106	448	0.171±0.070	0.311±0.105
423	0.100±0.031	0.361±0.040	449	0.255±0.025	0.651±0.094
424	0.081±0.047	0.239±0.057	450	S/P	S/P
425	0.148±0.067	0.359±0.038	451	S/P	S/P

S/P: sin presencia de producción. El número seguido de  $\pm$  indica la desviación estándar.

De los 47 aislados mencionados anteriormente, solo 2 de estos pudieron superar el centímetro en el diámetro del halo y tener una relación entre el radio de la colonia mayor a 0.25 cm de distancia, siendo estas los aislados 419 (0.747 cm) y 417 (0.718 cm).

El uso del medio Mandels y Reese adicionado con CMC es útil para la detección de enzimas celulolíticas. De acuerdo con McDonald y otros (2012), la CMC es un producto derivado de la celulosa que contiene grupos carboximetilo. Estos grupos se generan al reaccionar la celulosa con cloroacetato en un entorno alcalino, lo que produce sustituciones en las posiciones C2, C3 o C6 de las unidades de la glucosa (Gelman, 1982). Como consecuencia, la CMC es soluble en agua y más susceptible a la acción hidrolítica de las celulasas, la cual puede determinarse mediante el uso del colorante rojo Congo, que se une a los  $\beta$ -D-glucanos. Las áreas claras alrededor de las colonias que crecen en medios sólidos que contienen CMC y que son teñidas con este colorante, ofrecen un método práctico para detectar la hidrólisis del CMC y, por ende, la actividad de la  $\beta$ -D-glucanasa (Teather & Wood, 1982), ya que las regiones del agar en donde se produce hidrólisis serán claras, mientras que aquellas que fueron capaces de mantener intacta a la CMC retendrán el colorante.

Sin embargo, aunque se ha descrito la relación entre el diámetro de la zona de hidrólisis y la concentración logarítmica de la enzima celulasa, esta correlación no es capaz de representar la capacidad de producción de la enzima de los microorganismos (Teather & Wood, 1982), además de que el diámetro de hidrólisis puede no ser capaz de reflejar con exactitud la actividad real de la celulasa (Sadhu & Maiti, 2013).

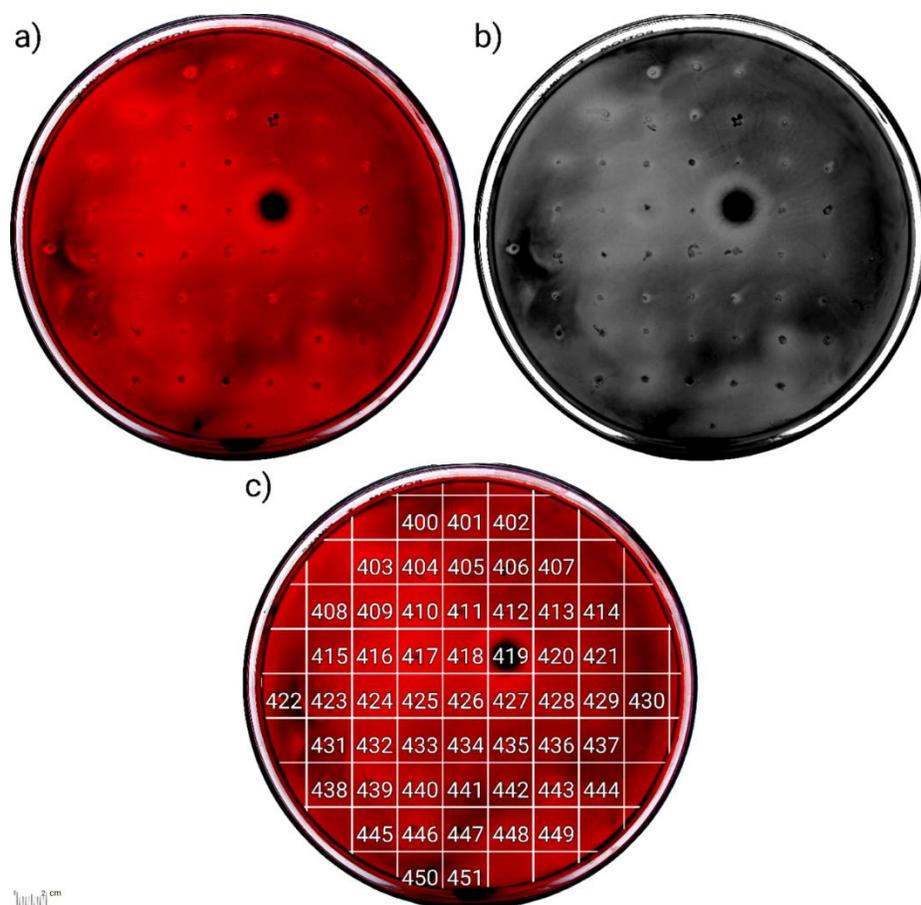


Figura 4.7.1 Producción de celulasas en medio Mandels y Reese adicionado a partir de una semana de la inoculación. En a) se muestra el crecimiento de toda la colección y la formación de los halos; en b) se cambió la imagen a escala de grises para visualizarla con mayor claridad; y en c) se visualiza la ubicación en el medio de cada aislado.

#### 4.7.2 Presencia de quitinasas

De acuerdo con los resultados, ninguno de los 52 aislados presentaron actividad favorable para la producción de quitinasas, ya que no se pudo observar la formación de un halo claro en el medio Agar Czapek adicionado, como se muestra en la Figura 4.7.2. Sin embargo, en la Tabla 4.7.2 se muestra los diámetros de las colonias bacterianas.

Tabla 4.7.2 Resultados de la evaluación cualitativa para la producción de quitinasas

Aislado	Diámetro de la colonia (cm)	Diámetro del halo (cm)	Aislado	Diámetro de la colonia (cm)	Diámetro del halo (cm)
400	0.287±0.057	S/P	426	0.122±0.057	S/P

401	0.144±0.080	S/P	427	0.140±0.037	S/P
402	0.289±0.043	S/P	428	0.334±0.141	S/P
403	0.139±0.042	S/P	429	0.253±0.091	S/P
404	0.123±0.044	S/P	430	S/P	S/P
405	0.265±0.037	S/P	431	S/P	S/P
406	S/P	S/P	432	0.348±0.030	S/P
407	S/P	S/P	433	0.231±0.029	S/P
408	0.328±0.035	S/P	434	0.321±0.105	S/P
409	S/P	S/P	435	S/P	S/P
410	0.237±0.117	S/P	436	0.297±0.101	S/P
411	S/P	S/P	437	0.277±0.025	S/P
412	0.253±0.037	S/P	438	0.243±0.078	S/P
413	S/P	S/P	439	0.108±0.071	S/P
414	0.245±0.065	S/P	440	0.242±0.048	S/P
415	0.397±0.087	S/P	441	S/P	S/P
416	S/P	S/P	442	0.307±0.093	S/P
417	0.260±0.082	S/P	443	0.193±0.026	S/P
418	S/P	S/P	444	0.389±0.170	S/P
419	0.219±0.019	S/P	445	0.184±0.049	S/P
420	0.281±0.019	S/P	446	0.290±0.024	S/P
421	0.174±0.051	S/P	447	0.249±0.019	S/P
422	0.247±0.044	S/P	448	0.309±0.045	S/P
423	S/P	S/P	449	0.231±0.036	S/P
424	S/P	S/P	450	S/P	S/P
425	0.163±0.025	S/P	451	0.309±0.124	S/P

S/P: sin presencia de producción. El número seguido de ± indica la desviación estándar.

Aunque la adición de quitina coloidal ha sido utilizada por diversos autores para evaluar la actividad quitinolítica (Brzezinska & Jankiewicz , 2012; Alves y otros, 2018; Narayana & Vijayalakshmi, 2009), el uso del medio Agar Czapek no mostró resultados favorables para la producción de esta enzima en la colección. No obstante, la utilización de otros medios como Murashige & Skoog (Renwick y otros, 1991) o el digerido de soja y caseína (Wiwat y otros, 1999) han sido útiles para determinar la actividad en rizobacterias.

Cheba y otros (2016) señalaron que las quitinasas son generadas por bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Serratia* y *Enterobacter*. Muchas de estas, de entre las cuales se encuentran reportadas *S. marcescens* y *Enterobacter agglomerans*, poseen el potencial como biocontrol sobre numerosos hongos fitopatógenos (Downing & Thomson, 2000). Asimismo, Shanmugaiah y otros (2008) afirman que diversas especies de *Bacillus* como *B. licheniformis*, *B. circulans*, *B. laterosporus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pabuli*, *B. magaterium*, *B. stearrowthermophilus*, *B. subtilis* y *B. thuringiensis* tienen la capacidad de producir esta enzima.

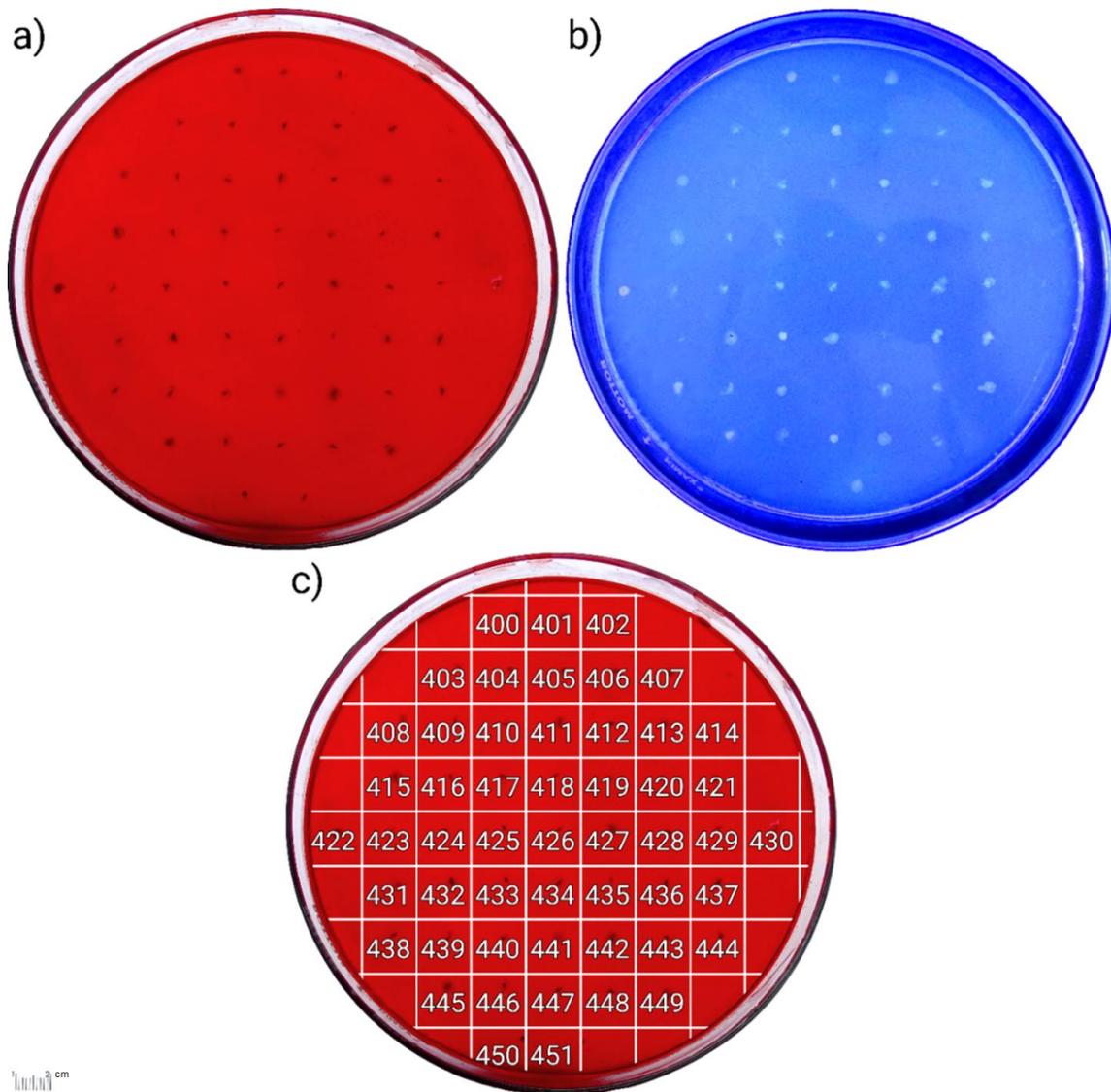


Figura 4.7.2 Producción de quitinasas en medio Agar Czapek adicionado a partir de una semana de la inoculación. En a) se muestra el crecimiento bacteriano de toda la colección; en b) se sometió el medio bajo luz negra para una mejor visualización de estas; y en c) se observa la ubicación en el medio de cada aislado.

## 4.8 Producción de exopolisacáridos (EPS)

De los 52 aislados, solo 43 de estos pudieron crecer en el medio LM. Sin embargo, de estos solo 29 fueron capaces de presentar un fenotipo mucóide, el cual fue clasificado de la siguiente manera: se le asignó el símbolo (–) a aquellos aislados que, aunque tuvieron presencia de biomasa bacteriana en la línea del inóculo inicial, esta no muestra evidencia de producción de EPS y las colonias en el medio presentan una coloración mate y seca; aquellos aislados denominados con el símbolo (+) fueron aquellos en los que se observó un crecimiento bacteriano superior al anterior y que no presenta resistencia al contacto, por lo que se le asigna como bacterias no mucoides; los aislados asignados con el símbolo (++) fueron aquellos con presencia de producción de EPS, ya que presentan una tenue matriz gelatinosa alrededor de las células bacterianas, aunque su crecimiento en el medio es plano; los aislados identificados con el símbolo (+++) fueron aquellos en la que la producción de EPS comienza a deformarse respecto al estriado inicial y la biomasa bacteriana presenta volumen; el aislado marcado con el símbolo (++++) presentó una producción de EPS viscosa al tacto y muy voluminosa, con una matriz gelatinosa muy prominente y en donde la biomasa bacteriana creció incluso sobre las paredes y tapa de la placa. En la Figura 4.8 se observa esta clasificación y en la Tabla 4.8 se clasifica cada uno de los aislados de la colección.

Tabla 4.8 Resultados de la evaluación cualitativa para la producción de exopolisacáridos

Aislado	Biomasa bacteriana	EPS mucoides	Aislado	Biomasa bacteriana	EPS mucoides
<b>400</b>	**	++	426	*	-
401	*	-	<b>427</b>	*	+
<b>402</b>	**	++	<b>428</b>	**	++
<b>403</b>	*	+	429	*	-
<b>404</b>	*	+++	430	S/P	S/P
<b>405</b>	**	++	431	S/P	S/P
406	*	-	<b>432</b>	*	++
407	*	-	<b>433</b>	**	++
<b>408</b>	*	+	434	*	-

<b>409</b>	*	+	435	S/P	S/P
<b>410</b>	*	+	<b>436</b>	*	+
411	*	-	<b>437</b>	**	++
<b>412</b>	*	+++	<b>438</b>	**	++
413	*	-	439	*	-
<b>414</b>	*	++	<b>440</b>	*	++
<b>415</b>	*	+	441	S/P	S/P
416	*	-	442	S/P	S/P
417	*	-	443	*	-
<b>418</b>	**	+++	<b>444</b>	*	+
419	S/P	S/P	<b>445</b>	**	++
420	*	++	<b>446</b>	*	++
421	*	-	<b>447</b>	**	++
<b>422</b>	**	++	448	*	+
423	S/P	S/P	<b>449</b>	*	+++
<b>424</b>	**	++++	450	S/P	S/P
425	*	-	451	S/P	S/P

\*: Producción media de biomasa; \*\*: Producción alta de biomasa; S/P: sin presencia de producción.

El aislado 424 fue el único con la capacidad de formar una prominente matriz gelatinosa alrededor del inóculo, el cual era viscoso al contacto y muy elástico. Dado que la síntesis de exopolisacáridos juega un papel crucial en las bacterias promotoras de crecimiento vegetal para contrarrestar el estrés salino al unir los iones a los exopolisacáridos bacterianos y disminuir la concentración de Na<sup>+</sup> libre, también resultan beneficiosos frente al estrés causado por sequía (Upadhyay y otros, 2011). Debido a esto, muchos autores han mostrado interés en rizobacterias autóctonas de suelo y agua con alta salinidad (Arias y otros, 2003; Martínez-Cánovas y otros, 2004; Fuentes y otros, 2013), los cuales reportan que la presencia de EPS asociados a las células bacterianas es reconocida mediante la formación de colonias gomosas en medios sólidos o por el aumento de la viscosidad e incluso la formación de un gel en medios líquidos. (Luque y otros, 2010).

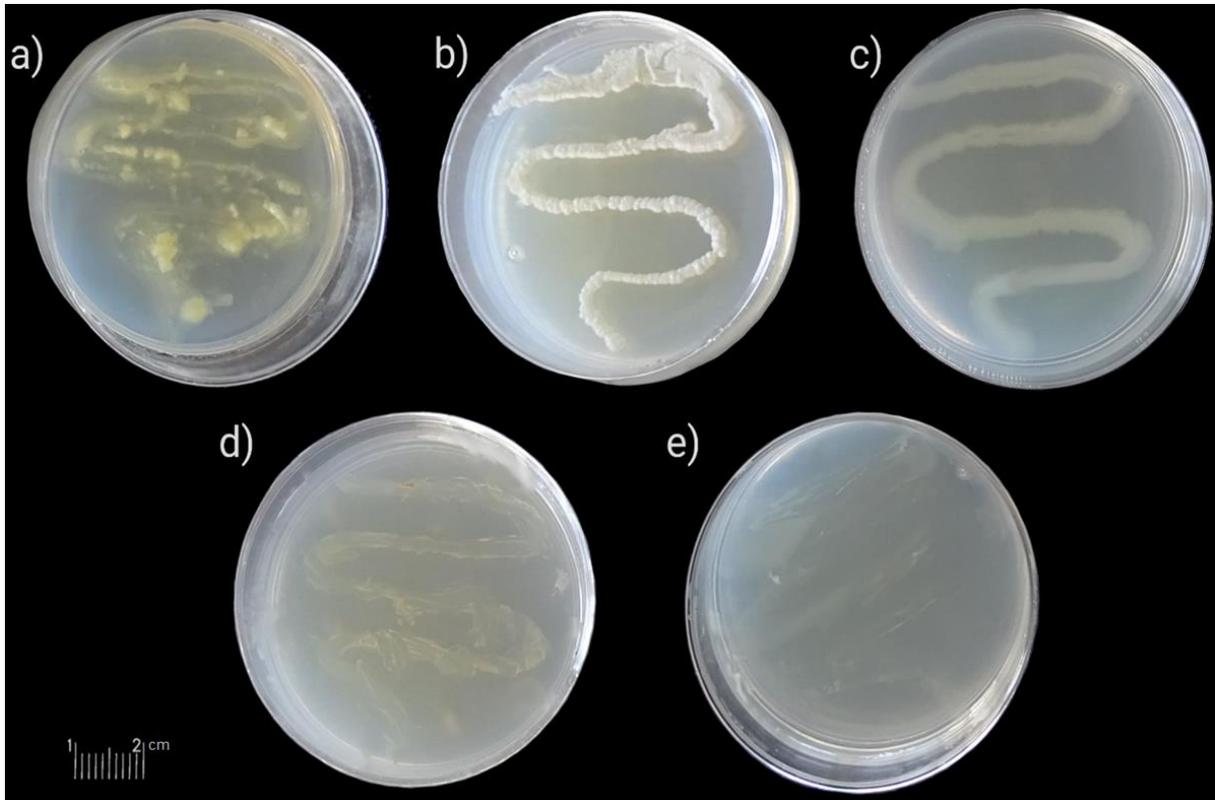


Figura 4.8 Producción de EPS mucoides y no mucoides. En a) se visualiza el aislado 424, categorizada como “++++” debido a su naturaleza altamente mucoide; en b) se aprecia el aislado 418, categorizado como “+++”; en c) se observa el aislado 438, categorizado como “++”; en d) se muestra el aislado 410, categorizado como “+” debido a que no presenta mucosidad y en e) se presenta el aislado 425, categorizado como “-”.

#### 4.9 Producción de ácido indol acético

Se obtuvo la curva de calibración y a partir de ella se generó la ecuación para poder relacionar la absorbancia de cada uno de los aislados a 530 nm en función de la concentración de AIA, cuantificada por una reacción colorimétrica con el reactivo de Salkowsky, la cual se puede observar en la Figura 4.9.1. Se hizo una lectura de la absorbancia para cada uno de los aislados de la colección, y aquellos que presentaron una coloración rosa-roja se les hicieron dos lecturas más, como se puede observar en la Tabla 4.9. De los 52 aislados, 21 presentaron esta coloración, que iba desde el color whiskey (#d29e7a) hasta el carmín (#ab3434), como se aprecia en la Figura 4.9.2. Los aislados con producción de AIA más destacable fueron 438 (69.622  $\mu\text{g/ml}$ ), 448 (65.263  $\mu\text{g/ml}$ ), 445 (50.742  $\mu\text{g/ml}$ ), 412 (43.470  $\mu\text{g/ml}$ ) y 434 (41.731  $\mu\text{g/ml}$ ).

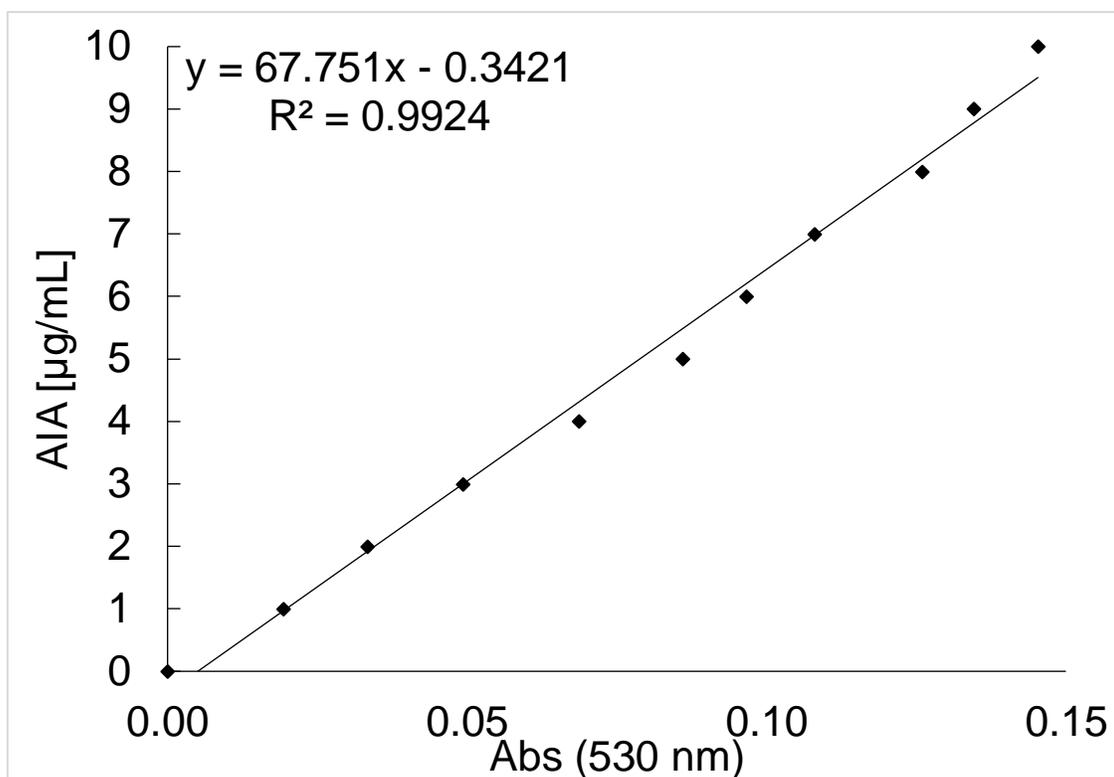


Figura 4.9.1 Curva de calibración de AIA.

Tabla 4.9 Resultados de la evaluación cuantitativa para la producción de AIA

Aislado	Abs <sub>530</sub>	AIA (µg/ml)	Aislado	Abs <sub>530</sub>	AIA (µg/ml)
<b>400</b>	<b>0.198±0.058</b>	<b>13.073</b>	426	0.147	9.617
401	0.143	9.346	<b>427</b>	<b>0.178±0.066</b>	<b>11.695</b>
<b>402</b>	<b>0.312±0.119</b>	<b>20.819</b>	428	0.110	7.111
403	0.134	9.346	<b>429</b>	<b>0.328±0.051</b>	<b>21.858</b>
404	0.117	7.585	430	0.018	0.877
405	0.118	7.653	431	0.025	1.352
406	0.078	4.942	<b>432</b>	<b>0.551±0.261</b>	<b>37.011</b>
407	0.141	9.211	<b>433</b>	<b>0.313±0.106</b>	<b>20.841</b>
<b>408</b>	<b>0.357±0.192</b>	<b>23.868</b>	<b>434</b>	<b>0.621±0.295</b>	<b>41.731</b>
409	0.135	8.804	435	0.179	11.785
410	0.092	5.891	436	0.162	10.634
411	0.149	9.753	<b>437</b>	<b>0.386±0.052</b>	<b>25.787</b>
<b>412</b>	<b>0.647±0.329</b>	<b>43.470</b>	<b>438</b>	<b>1.033±0.534</b>	<b>69.622</b>

413	0.137	8.940	439	0.140	9.143
414	0.069	4.333	<b>440</b>	<b>0.592±0.118</b>	<b>48.777</b>
415	0.124	8.059	<b>441</b>	<b>0.461±0.265</b>	<b>30.914</b>
416	0.134	8.737	<b>442</b>	<b>0.516±0.303</b>	<b>34.617</b>
417	0.104	6.704	443	0.156	10.227
418	0.058	3.587	<b>444</b>	<b>0.573±0.153</b>	<b>38.479</b>
419	0.097	6.230	<b>445</b>	<b>0.754±0.337</b>	<b>50.742</b>
<b>420</b>	<b>0.286±0.055</b>	<b>19.012</b>	<b>446</b>	<b>0.458±0.351</b>	<b>30.665</b>
<b>421</b>	<b>0.159±0.095</b>	<b>10.430</b>	447	0.091	5.823
422	0.149	9.753	<b>448</b>	<b>0.968±0.240</b>	<b>65.263</b>
423	0.097	6.230	<b>449</b>	<b>0.271±0.038</b>	<b>18.041</b>
424	0.067	4.197	450	0.020	1.013
425	0.091	5.823	451	0.167	10.972

El número seguido de  $\pm$  indica la desviación estándar.

Diversas investigaciones han evidenciado la capacidad de distintas especies bacterianas para generar AIA en un amplio rango de concentraciones, pues es un metabolito secundario abundante durante la fase estacionaria del crecimiento celular (Wahyudi y otros, 2011). Sin embargo, no todas las bacterias que producen este compuesto favorecen el crecimiento de las plantas. Por ejemplo, *Agrobacterium tumefaciens* puede generar hasta 78  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de AIA, produciendo una enfermedad conocida como “agalla de corona”, manifestada por tumores en raíces, tallo y ramas de varias especies vegetales. El AIA estimula la elongación de las raíces de haba (*Vicia faba*) a concentraciones inferiores a 17.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , pero a concentraciones superiores a 87.5 inhibe considerablemente el crecimiento (El-Antably & Larsen, 1974). Khalid y otros (2004) aislaron rizobacterias de plantas de trigo que producían AIA en concentraciones 1.1 a 12.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , estimulando el crecimiento para estos cultivos. García y otros (2010) identificaron cepas de *Azospirillum* que generaba 18.02 a 38.02  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y que favorecían el crecimiento en plantas de arroz. La concentración de AIA necesaria para estimular el crecimiento de las plantas varía según la especie. Así, mientras que cierta concentración puede ser adecuada para estimular el crecimiento de una especie vegetal, para otras, esa misma concentración podría no tener una influencia significativa.

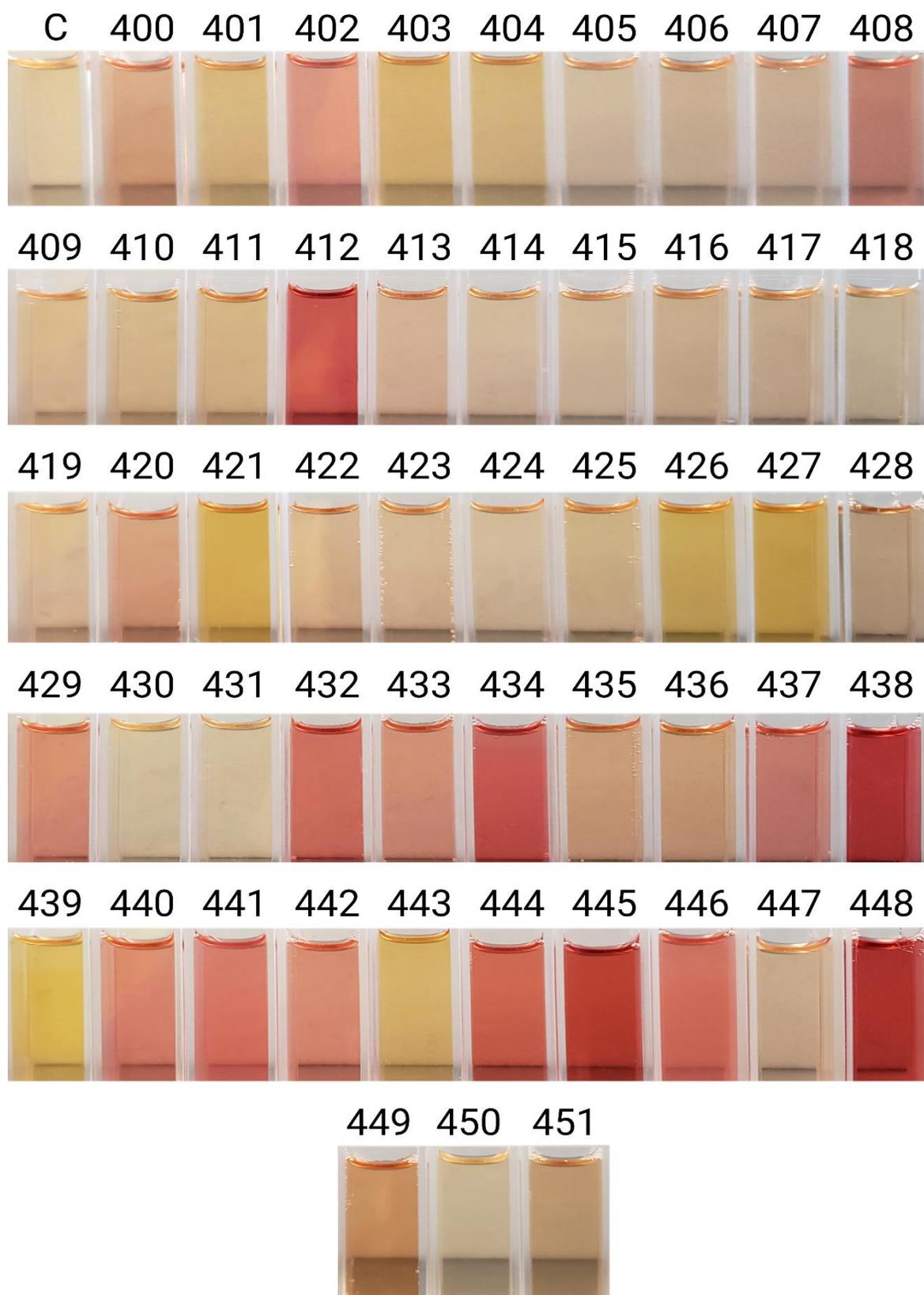


Figura 4.9.2 Producción de AIA de cada aislado.

## 4.10 Pruebas de germinación, vigorosidad y biomasa

### 4.10.1 Lenteja (*Lens culinaris*)

Se evaluó el porcentaje de germinación e índice de vigorosidad haciendo uso de las Fórmulas 3 y 4. Se encontró que, en la primera repetición, 30 de los 52 aislados pudieron superar el porcentaje de germinación del control, el cual fue de 33%. No obstante, de estos solo 27 aislados pudieron superar el índice de vigorosidad reportado por el control, el cual fue de 193.33. Con los 27 aislados que superaron al control tanto en germinación como en índice de vigorosidad, se realizó una segunda repetición de la prueba, realizada entre los meses de febrero y abril. Debido al aumento de temperatura propia de estos meses, se requirió un aumento de humedad para las semillas. De estos, solo 25 de los 27 aislados pudieron superar el porcentaje de germinación del control, el cual fue de 44%. Sin embargo, 23 de los 27 aislados pudieron superar el índice de vigorosidad reportado por el control, el cual fue de 273.82.

En la Tabla 4.10.1 se observan los resultados obtenidos para cada uno de los aislados.

Tabla 4.10.1 Resultados de las pruebas de germinación e índice de vigorosidad de lenteja

Aislado	% Germinación	Índice vigorosidad	Aislado	% Germinación	Índice vigorosidad
Control	38.5±7.77 <sup>c</sup>	233.57±56.91 <sup>c</sup>	426	36	128.16
400	32	125.76	427	51±1.41 <sup>abc</sup>	304.82±145.7 <sup>ab</sup>
401	16	42.84	428	62±19.80 <sup>abc</sup>	328.21±29.94 <sup>ab</sup>
402	24	66.72	429	57±21.21 <sup>abc</sup>	264.07±9.40 <sup>ab</sup>
403	16	37.92	430	40	165.60
404	24	72.96	431	50±2.83 <sup>abc</sup>	306.51±156.9 <sup>ab</sup>
405	8	25.60	<b>432</b>	<b>77±26.87<sup>a</sup></b>	<b>405.29±100.70<sup>ab</sup></b>
406	4	8.40	433	54±19.80	214.82±23.17
407	8	12.80	434	56	132.16
408	46±2.83 <sup>abc</sup>	266.70±75.76 <sup>ab</sup>	435	59±12.73 <sup>abc</sup>	318.91±75.95 <sup>ab</sup>
409	28	84.56	436	62±19.80 <sup>abc</sup>	363.32±25.73 <sup>ab</sup>
410	28±16.97	155.29±122.06	437	60±11.31 <sup>abc</sup>	423.67±47.16 <sup>ab</sup>

411	45±1.41	257.54±3.41	<b>438</b>	<b>69±15.56<sup>ab</sup></b>	<b>481.43±115.15<sup>a</sup></b>
412	8	34.00	<b>439</b>	<b>72±16.97<sup>ab</sup></b>	<b>472.68±133.8<sup>ab</sup></b>
<b>413</b>	<b>67±21.21<sup>ab</sup></b>	<b>484.56±174.80<sup>a</sup></b>	440	33	184.80
414	28	84.56	<b>441</b>	<b>73±9.90<sup>ab</sup></b>	<b>469.32±227<sup>ab</sup></b>
415	47±4.24 <sup>abc</sup>	344.32±101.1 <sup>ab</sup>	442	58±14.14 <sup>abc</sup>	334.86±129.2 <sup>ab</sup>
416	28	229.04	443	63±12.73 <sup>abc</sup>	369.56±97.01 <sup>ab</sup>
417	41.5±2.12	207.20	444	29	387.60
418	36	236.16	445	63±12.73 <sup>abc</sup>	421.52±76.82 <sup>ab</sup>
419	45±21.21 <sup>bc</sup>	339.60±198.5 <sup>ab</sup>	446	32	122.56
420	57±15.56 <sup>abc</sup>	315.35±51.68 <sup>ab</sup>	447	24	134.40
421	26	74.88	448	32±5.66 <sup>c</sup>	200.89±12.41 <sup>bc</sup>
422	44	168.96	449	25	129.65
423	24	71.04	450	42±2.83 <sup>bc</sup>	312.98±110.9 <sup>ab</sup>
424	62±8.49 <sup>abc</sup>	360.18±136.2 <sup>ab</sup>	451	30	188.94
425	59±1.41 <sup>abc</sup>	372.51±229.8 <sup>ab</sup>			

El número seguido de  $\pm$  indica la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos de acuerdo con la diferencia honestamente significativa de Tukey con  $\alpha=0.05$ .

De acuerdo con lo anterior, los aislados que lograron poseer una diferencia estadística frente al control en el porcentaje de germinación y vigorosidad en semillas de lenteja fueron: 413, 432, 438, 439 y 441; los cuales además tuvieron un mayor crecimiento en el área radicular y del tallo respecto al control, como se puede observar en la Figura 4.10.1.

Asimismo, varios de los aislados que obtuvieron buenos valores para esta prueba también reportaron resultados favorables para la producción de ácido indol acético. Sin embargo, esto se contrapone con los resultados reportados por Sepúlveda-Caamaño y otros (2017) y Jahanian y otros (2012), los cuales indican que las rizobacterias que producen AIA pueden tener efectos negativos sobre el desarrollo de las plantas, ya que las altas concentraciones de este compuesto pueden llegar a inhibir el desarrollo radicular de estas por medio de emisiones de amoníaco a través de la síntesis de cianuro de hidrógeno (Weise y otros, 2013).



Figura 4.10.1 Vista superior de las plántulas de lenteja a una semana de crecimiento. En la parte superior se encuentra el control y en la parte inferior, las plántulas inoculadas con el aislado 413.

Sin embargo, en tres de los aislados mencionados anteriormente se observó la presencia de pelos radiculares, como se observa en la Figura 4.10.2. Estas estructuras aumentan el área de captación en las raíces, propiciando así una mayor captación de agua y nutrientes para la planta.

No obstante, otros aislados con una elevada producción de AIA presentaron un bajo porcentaje de germinación o vigorosidad, como se puede observar en el aislado 412 o 434. Asimismo, en el análisis estadístico se revelaron pocas diferencias significativas entre aislados con alta y baja producción de AIA, como en el aislado 413 o 439, lo que puede indicar que el fomento de estas características es dependiente de más condiciones como la temperatura o humedad, ya que la temperatura óptima de germinación oscila entre los 15 y 25°C y la temperatura real en la que germinaron estas semillas fue de entre 30 a 35°C.

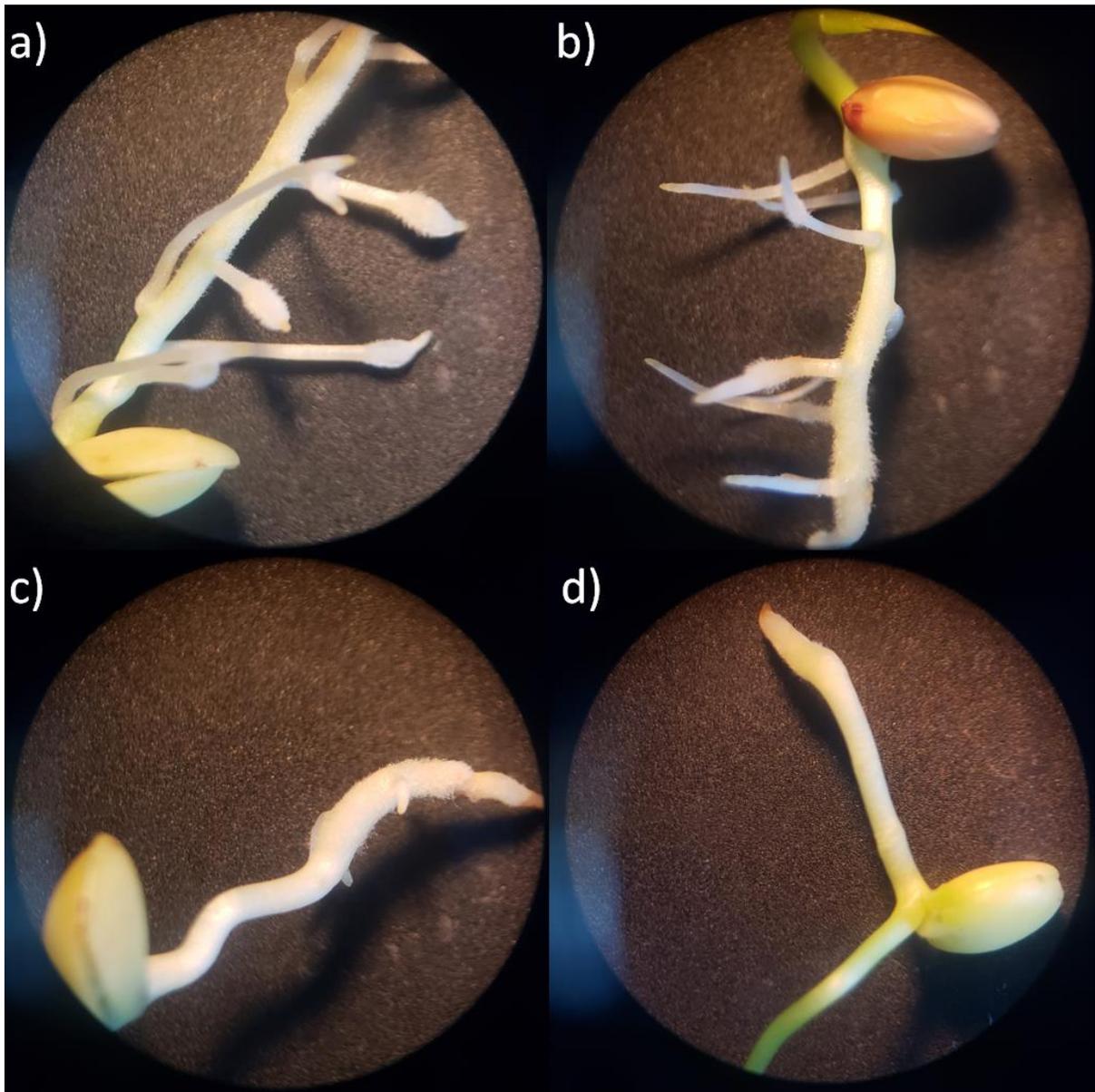


Figura 4.10.2 Vista del área radicular de las semillas de lenteja mediante un estereomicroscopio con un objetivo de 2x y aumentado 5x. En a) se observa a la planta tratada con el aislado 413; en b) se observa a la planta tratada con el aislado 432; en c) se observa a la planta tratada con el aislado 439 y en d) se observa a la planta control.

#### 4.10.2 Pepino (*Cucumis sativus*)

Se evaluó el porcentaje de germinación e índice de vigorosidad haciendo uso de las Fórmulas 3 y 4. Se encontró que, en la primera repetición, 33 de los 52 aislados pudieron superar el porcentaje de germinación del control, el cual fue de 67%. No obstante, de estos solo 21 aislados pudieron superar el índice de vigorosidad reportado por el control, el cual

fue de 462.501. En la segunda repetición, 34 de los 52 aislados pudieron superar el porcentaje de germinación del control, el cual fue de 61%. De estos, 27 aislados pudieron superar el índice de vigorosidad del control, el cual fue de 493.32. Al hacer el análisis estadístico, encontramos finalmente que son 23 los aislados que superan el porcentaje de germinación e índice de vigorosidad del control, el cual es del 64% y 447, respectivamente.

Asimismo, se hizo una determinación del peso de las plántulas para observar el desarrollo de su biomasa y efecto de las rizobacterias, a través de la medición del peso fresco y seco, haciendo uso de la Fórmula 5. En la primera repetición, solo 25 de los 52 aislados pudieron superar al peso fresco, seco y húmedo del control, el cual fue de 0.8356, 0.0848 y 0.7508, respectivamente. En la segunda repetición, 30 de los 52 aislados pudieron superar al peso fresco, seco y húmedo del control, el cual fue de 0.7554, 0.0891 y 0.6663, respectivamente. Por lo tanto, el peso fresco, seco y húmedo promediado de ambas pruebas fue de 0.80, 0.09, 0.71, respectivamente. En la Tabla 4.10.2 se observan los resultados obtenidos para cada uno de los aislados.

De acuerdo con lo anterior, los aislados que lograron poseer una diferencia estadística frente al control en el porcentaje de germinación y vigorosidad en semillas de pepino fueron: 424, 437 y 440; los cuales además tuvieron un mayor crecimiento en el área radicular y del tallo respecto al control, como se puede observar en la Figura 4.10.3.

Al igual que las pruebas realizadas en semillas de lenteja, algunos aislados de la colección demostraron ser promotores del crecimiento vegetal, fomentando el crecimiento de raíces y pelos radiculares, como se puede observar en la Figura 4.10.4. Medina-Reyes (2020) reportó resultados favorables con *Bacillus paralicheniformis* y *Pseudomonas lini* para el rendimiento total en plantas de pepino y Perez-Rosales (2012), quien inoculó las cepas *Pseudomonas tolassi*, *P. tolassi*, *Bacillus pumilus* y *Microbacterium paraoxydans* en plantas de pepino para ver su respuesta frente al crecimiento de la plántula, rendimiento en un sistema de fertirriego, calidad del fruto bajo diferentes concentraciones de fertilizante y capacidad antagónica contra *Fusarium oxysporum* y *Alternaria* sp, reportó que la inoculación de estas mejoró la calidad de las plántulas en cuanto al tamaño y nutrición y mejoró algunos atributos relacionados a la calidad del fruto debido al aumento de sólidos totales y concentración de ortofosfatos en el fruto, tuvieron la capacidad de inhibir el

crecimiento de los hongos en condiciones *in vitro*, aunque la respuesta del rendimiento disminuyó y solo una cepa tuvo un ligero efecto en el rendimiento del fruto. Por otro lado, Islam y otros (2016), utilizando rizobacterias provenientes de suelo agroecológico destinado al cultivo de pepino, reportaron niveles significativamente más altos de germinación, vigor de plántulas, crecimiento y contenido de nitrógeno en el tejido de la raíz y el brote en comparación con las plantas control no tratadas, así como ser capaces de suprimir significativamente la pudrición de la corona de *Phytophthora* causada por *Phytophthora capsici*. Los aislados utilizados para este trabajo fueron identificados como *Pseudomonas stutzeri*, *Bacillus subtilis*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Bacillus amyloliquefaciens*.

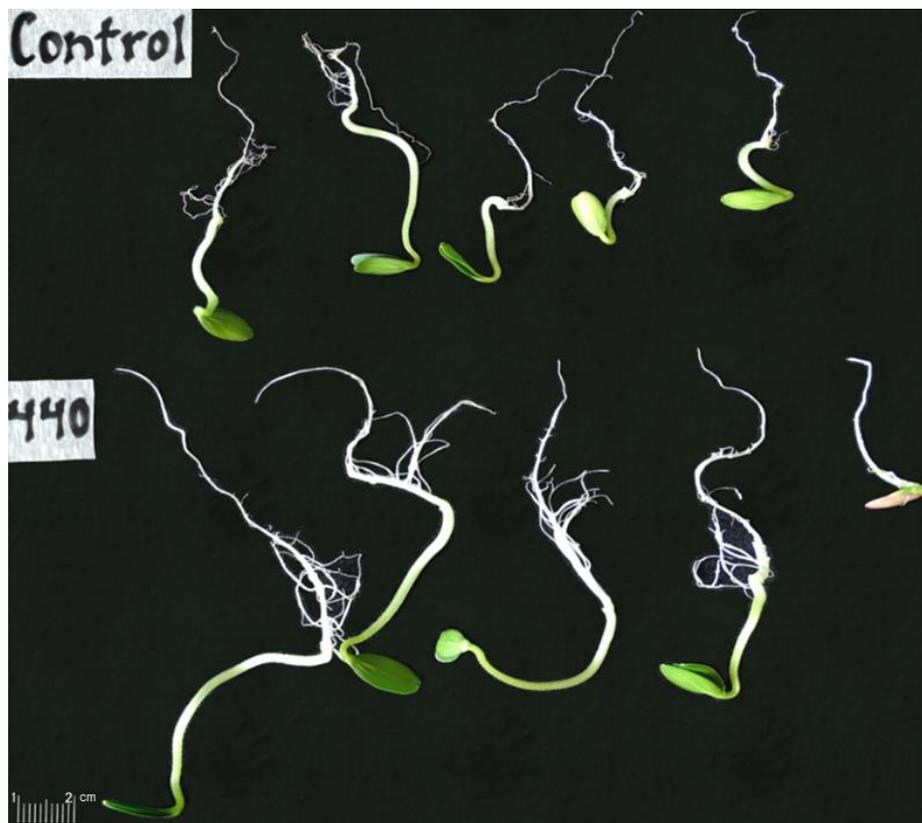


Figura 4.10.3 Vista superior de las plántulas de pepino a una semana de crecimiento. En la parte superior se encuentra el control y en la parte inferior, las plántulas inoculadas con el aislado 440.

Con los resultados obtenidos y reportados por la literatura, se observó que el tratamiento de las semillas de pepino con rizobacterias resulta en una mejora significativa en la emergencia y crecimiento de la plántula, gracias a diferentes mecanismos como la

reducción de la micoflora de las semillas. La producción de AIA es un mecanismo común entre las rizobacterias y, aunque los aislados que presentaron mayor promoción vegetal no fueron aquellos con mayor producción de AIA de la colección, los valores reportados por la literatura oscilan en un rango de 29.25 a 51.28  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de AIA, contrastando con los de este trabajo que fueron de 4.19 a 48.77  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de AIA. Este mecanismo es crucial para la promoción del crecimiento de las plantas, ya que promueve el desarrollo de las raíces y la absorción de nutrientes. Se sugiere que las fitohormonas también pueden coordinar la demanda y la adquisición de nitrógeno, el cual desempeña también un papel adicional en la promoción del crecimiento de las plantas.

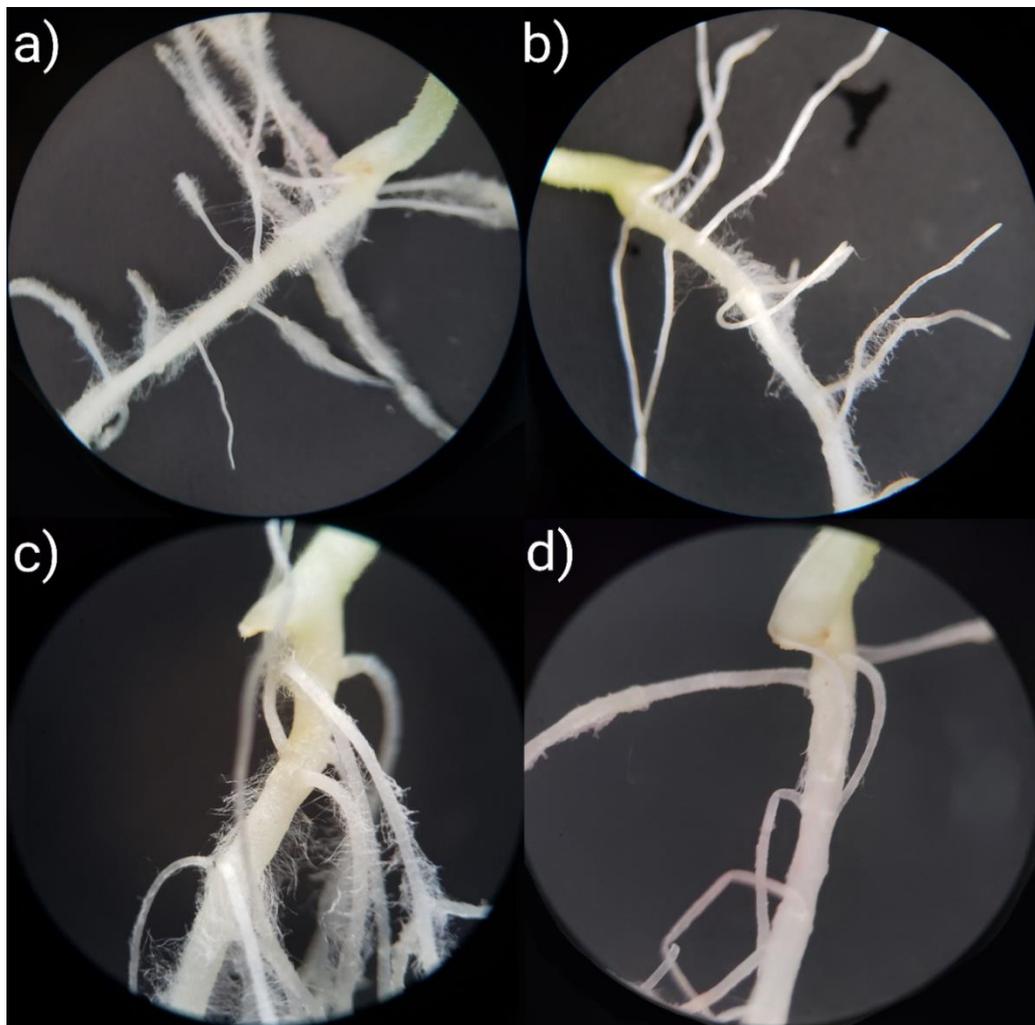


Figura 4.10.4 Vista del área radicular de las semillas de pepino mediante un estereomicroscopio con un objetivo de 2x y aumentado 5x. En a) se observa a la planta tratada con el aislado 424; en b) se observa a la planta tratada con el aislado 437; en c) se observa a la planta tratada con el aislado 440 y en d) se observa a la planta control.

Tabla 4.10.2 Resultados de las pruebas de germinación e índice de vigorosidad de lenteja

Aislado	% Germinación	Índice vigorosidad	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Peso húmedo (g)	Aislado	% Germinación	Índice vigorosidad	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Peso húmedo (g)
Control	64±4.2 <sup>c</sup>	447±21.7 <sup>d</sup>	0.80	0.09	0.71	426	76±11.3 <sup>abc</sup>	521.7±189 <sup>cd</sup>	0.92	0.08	0.84
400	62±25.4	397.1±196.2	1.20	0.08	1.12	427	76 <sup>abc</sup>	495±63.1 <sup>cd</sup>	0.90	0.07	0.82
401	56±6.9	304.1±133.3	0.98	0.07	0.91	428	78±14.14 <sup>abc</sup>	645.8±49 <sup>bcd</sup>	0.81	0.08	0.73
402	52±22.6	233.4±73.7	1.17	0.08	1.09	429	74±8.49 <sup>abc</sup>	462.8±111.6	0.87	0.07	0.80
403	76±22.6	395±173.8	1.05	0.08	0.97	430	70±8.49 <sup>abc</sup>	450.5±5.8	0.80	0.08	0.72
404	60	293.6±47.8	0.89	0.07	0.81	431	76±5.66 <sup>abc</sup>	473.3±82.9	0.64	0.07	0.57
405	72±22.6	290.±159.9	0.90	0.09	0.82	432	78±19.80 <sup>abc</sup>	690±123 <sup>bcd</sup>	0.71	0.08	0.64
406	58±25.4	237.7±144.4	1.00	0.10	0.90	433	82±8.49 <sup>abc</sup>	694±34.7 <sup>bcd</sup>	0.82	0.09	0.73
407	30±8.4	123.9±12.9	1.10	0.08	1.03	434	82±8.49 <sup>abc</sup>	597.2±9.3 <sup>cd</sup>	0.74	0.09	0.65
408	48±33.9	220.8±112.4	1.17	0.09	1.08	435	86±8.49 <sup>ab</sup>	651±98.7 <sup>bcd</sup>	0.72	0.07	0.65
409	40±16.9	201.6±93.7	0.87	0.08	0.79	436	76±11.31 <sup>abc</sup>	663±138 <sup>bcd</sup>	0.69	0.07	0.62
410	62±14.1	353.4±3.5	0.69	0.07	0.61	<b>437</b>	<b>86±8.49<sup>ab</sup></b>	<b>737.1±6.9<sup>abc</sup></b>	<b>0.77</b>	<b>0.08</b>	<b>0.69</b>
411	60±5.6	306.1±29.8	0.85	0.08	0.77	438	82±2.83 <sup>abc</sup>	666±26.7 <sup>bcd</sup>	0.85	0.08	0.77

412	64±5.6	370.9±98.9	0.85	0.09	0.76	439	82±2.83 <sup>abc</sup>	584±25.8 <sup>cd</sup>	0.71	0.08	0.63
413	58±14.1	325.5±119.9	0.85	0.08	0.76	<b>440</b>	<b>88±11.31<sup>a</sup></b>	<b>984.9±89.3<sup>a</sup></b>	<b>1.03</b>	<b>0.08</b>	<b>0.65</b>
414	50±8.4	250.1±32.8	0.85	0.07	0.78	441	78±2.83 <sup>abc</sup>	855.8±17 <sup>ab</sup>	0.76	0.07	0.69
415	68 <sup>bc</sup>	304.6±36.5	0.86	0.08	0.78	442	70±8.49	451.3±146.7	0.87	0.08	0.79
416	62±25.4	435.8±93.8	0.89	0.08	0.81	443	64±11.31	530±18.2 <sup>cd</sup>	0.80	0.09	0.71
417	54±42.4	377.6±229.3	0.79	0.09	0.70	444	68±11.31	571.7±290.8	0.72	0.07	0.65
418	58±14.1	423.1±29.5	1.01	0.10	0.91	445	60	453.7±189.3	0.95	0.09	0.86
419	58±42.4	365.8±299	0.90	0.09	0.81	446	74±8.49 <sup>abc</sup>	700±336 <sup>bcd</sup>	1.05	0.09	0.96
420	48±11.3	285.5±46.8	0.87	0.09	0.78	447	80 <sup>abc</sup>	708±178 <sup>bcd</sup>	0.82	0.08	0.74
421	36±22.6	239±137.6	0.96	0.09	0.86	448	74±2.83 <sup>abc</sup>	675±148 <sup>bcd</sup>	0.66	0.08	0.58
422	56	344.9±29.1	0.97	0.09	0.88	449	78±14.14 <sup>abc</sup>	660.9±29 <sup>bcd</sup>	0.66	0.08	0.58
423	70±25.4	517±263.6 <sup>cd</sup>	0.94	0.08	0.85	450	74±8.49 <sup>abc</sup>	679±93.6 <sup>bcd</sup>	0.57	0.08	0.49
<b>424</b>	<b>88±11.3<sup>a</sup></b>	<b>619±117<sup>bc</sup></b>	<b>0.95</b>	<b>0.09</b>	<b>0.86</b>	451	62±14.14	523±84.5 <sup>cd</sup>	0.54	0.08	0.46
425	80±5.6 <sup>abc</sup>	516.9±105 <sup>cd</sup>	0.81	0.07	0.74						

El número seguido de ± indica la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos de acuerdo con la diferencia honestamente significativa de Tukey con  $\alpha=0.05$ .

## 4.11 Producción de compuestos volátiles para la inhibición de hongos fitopatógenos

### 4.11.1 *Fusarium spp*

Para esta prueba, se comparó la inhibición del crecimiento del hongo *Fusarium spp.* a través de la producción de compuestos volátiles generados por cada uno de los aislados de las rizobacterias, el control fue una placa con hongo en el medio y sin la presencia de la bacteria a través de la medición del diámetro del micelio del hongo. En la primera semana, solo 15 aislados pudieron mantener al hongo detrás de la línea divisora de la caja, siendo estos los aislados 400, 403, 406, 408, 410, 416, 417, 423, 425, 426, 427, 440, 443, 445 y 448, como se puede observar en la Figura 4.11.1; teniendo un diámetro máximo horizontal de 4 cm y uno vertical de 8.5 cm. Esto indica que el hongo fitopatógeno tuvo una disminución del 30% en su crecimiento.

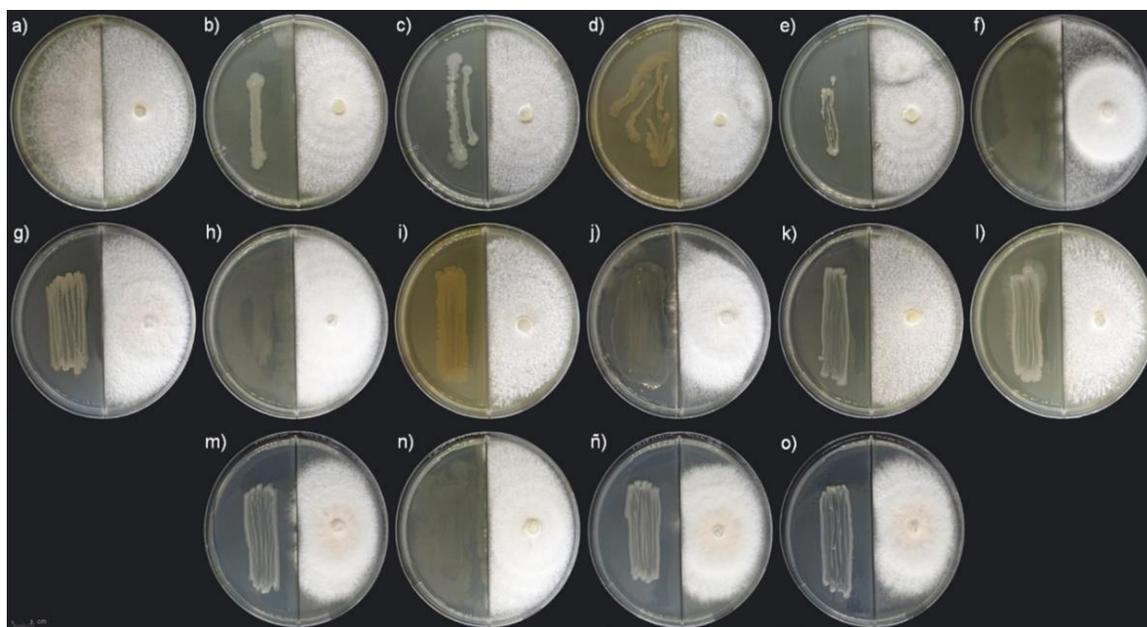


Figura 4.11.1 Inhibición del crecimiento de *Fusarium spp.* por los COVs producidos por rizobacterias después de siete días en incubación. Se observa en a) el control y los aislados: b) 400, c) 403, d) 406, e) 408, f) 410, g) 416, h) 417, i) 423, j) 425, k) 426, l) 427, m) 440, n) 443, ñ) 445 y o) 448.

A partir de la segunda semana, de los 15 aislados anteriores que presentaron una producción favorable de COVs como control biológico, solo 6 de estos pudieron mantener la inhibición del hongo, siendo los aislados 410, 415, 417, 423, 425 y 443; como se observa en la Figura 4.11.2.

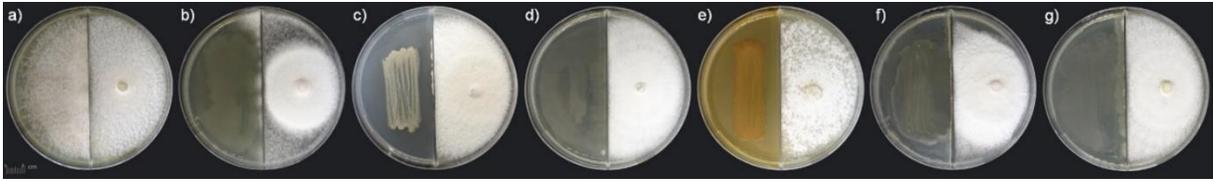


Figura 4.11.2 Inhibición del crecimiento de *Fusarium* spp. por los COVs producidos por rizobacterias después de catorce días en incubación. Se observa en a) el control y los aislados: b) 410, c) 416, d) 417, e) 423, f) 425 y g) 443.

En la tercera semana, los 6 aislados anteriores siguieron manteniendo una producción favorable de COVs como control biológico en la inhibición del hongo, como se observa en la Figura 4.11.3.

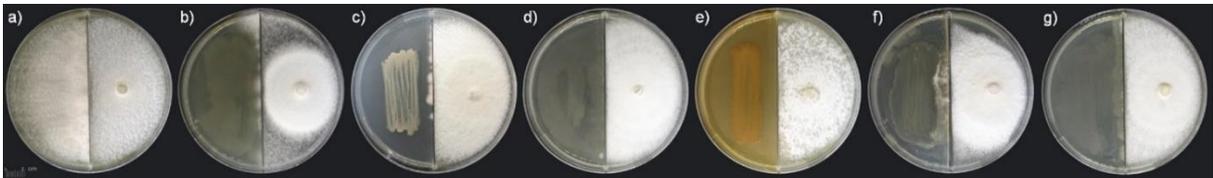


Figura 4.11.3 Inhibición del crecimiento de *Fusarium* spp. por los COVs producidos por rizobacterias después de veintiún días en incubación. Se observa en a) el control y los aislados: b) 410, c) 416, d) 417, e) 423, f) 425 y g) 443.

A partir de la cuarta semana de incubación, de los seis aislados anteriores, solamente dos pudieron mantener la inhibición del hongo, siendo los aislados 423 y 443; como se observa en la Figura 4.11.4.

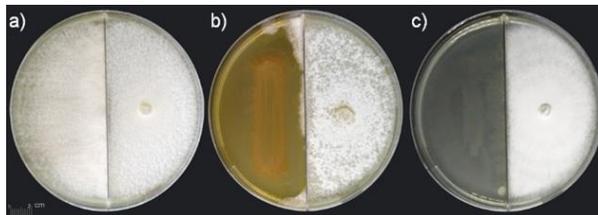


Figura 4.11.4 Inhibición del crecimiento de *Fusarium* spp. por los COVs producidos por rizobacterias después de treinta días en incubación. Se observa en a) el control y los aislados: b) 423 y c) 443.

Con lo anterior, podemos concluir que de las 52 rizobacterias de la colección, solo nueve de estas son capaces de inhibir el crecimiento micelial del hongo *Fusarium* spp. durante una semana, ya que a partir del séptimo día el micelio del hongo supera la línea divisora y se propaga por la mitad restante a través del inóculo. Durante la segunda y tercera semana, cuatro aislados son capaces de inhibir el crecimiento del hongo hasta día

veintiuno. Al final, tan solo dos aislados son capaces de inhibir el crecimiento micelial del hongo durante treinta días. Reverchon y otros (2020) aislaron bacterias obtenidas de la rizosfera y filósfera de diferentes especies de árboles de bosque mesófilo de montaña de una ANP con actividad antifúngica significativa contra *Fusarium solani*. Estos pertenecían a los géneros bacterianos *Bacillus*, *Pseudomonas* y al filo Actinobacteria, los cuales son grupos taxonómicos identificados como agentes de control biológico para diversas especies de *Fusarium*, como *Fusarium circinatum* (Iturrutxa y otros, 2017), *F. oxysporum* (Reverchon y otros, 2019), *F. euwallaceae* (Guevara-Avendaño y otros, 2019) y *F. kuroshium* (Báez-Vallejo y otros, 2020). Su actividad antifúngica ha sido atribuida a la producción de metabolitos secundarios antimicrobianos en forma difusible, como algunos lipopéptidos o el 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) (Guevara-Avendaño y otros, 2020) o en forma volátil como algunas cetonas o pirazinas (Yuan y otros, 2012). Algunos géneros como *Pseudomonas* sp. PmH1-050 son capaces de inducir la producción de pigmentos en el micelio de *F. solani*, lo que indica una reacción de defensa del hongo contra los metabolitos secundarios o enzimas líticas producidas por la bacteria (Hamzah y otros, 2018).

No obstante, los dos aislados que pudieron mantener la inhibición del hongo por treinta días fueron inicialmente caracterizadas morfológicamente como cocos Gram positivo, las cuales son capaces de producir una gran cantidad de metabolitos secundarios bioactivos y sus respuestas ante el medio hacen que puedan ser ventajosos para las aplicaciones agrícolas (Francis y otros, 2010). Bacterias del orden de los Actinomycetes poseen mecanismos de control basados en la destrucción de las paredes celulares fúngicas mediante enzimas hidrolíticas bacterianas extracelulares como como las  $\beta$ -1,3-glucanasas, quitinasas (Trejo-Estrada y otros, 1998),  $\beta$ -1,4-N-acetil glucosaminidasa (Manjula & Podile, 2005) o mediante la formación de hifas que se enrollan en las oosporas, causando un colapso citoplasmático (El-Tarabily & Sivasithamparam, 2006).

#### **4.11.2 *Rhizoctonia* spp.**

Para esta prueba, se comparó la inhibición del crecimiento del hongo *Rhizoctonia* spp. a través de la producción de compuestos volátiles producidos por cada uno de los aislados de las rizobacterias, el control fue una placa con hongo en el medio y sin la presencia de la bacteria a través de la medición del diámetro del micelio del hongo. En la

primera semana, de los 52 aislados solo 17 aislados pudieron mantener al hongo detrás de la línea divisora de la caja, siendo estos los aislados 403, 404, 406, 407, 410, 412, 414, 416, 420, 421, 423, 424, 425, 429, 433, 436 y 438, como se puede observar en la Figura 4.11.5; teniendo un diámetro máximo horizontal de 4 cm y uno vertical de 8.3 cm. Esto indica que el hongo fitopatógeno tuvo una disminución del 33% en su crecimiento.

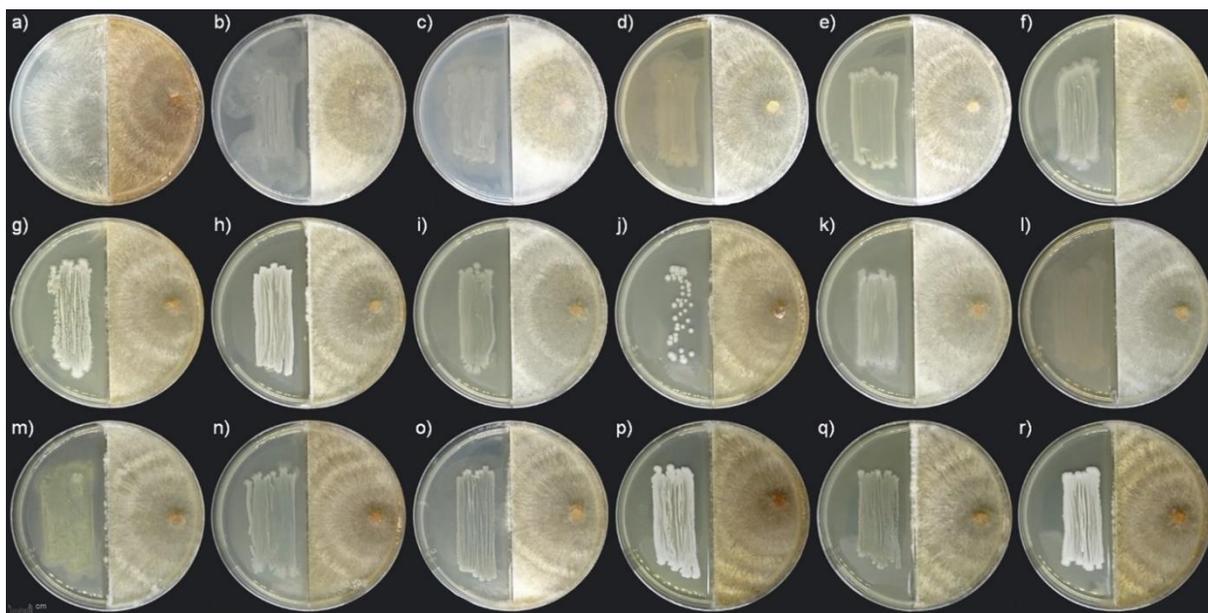


Figura 4.11.5 Inhibición del crecimiento de *Rhizoctonia* spp. por los COVs producidos por rizobacterias después de siete días en incubación. En a) se observa el control y los aislados: b) 403, c) 404, d) 406, e) 407, f) 410, g) 412, h) 414, i) 416, j) 420, k) 421, l) 423, m) 424, n) 425, ñ) 429, o) 433, p) 436 y q) 438.

A partir de la segunda semana, de los 17 aislados anteriores que presentaron una producción favorable de COVs como control biológico, solo 8 de estos pudieron mantener la inhibición del hongo, siendo los aislados 406, 410, 414, 416, 420, 423, 433 y 438; como se observa en la Figura 4.11.6. A partir de este punto, ninguna de las cepas anteriores pudo retener el avance del hongo, el cual pasó incluso por encima del inóculo, por lo que su producción de compuestos volátiles contra este fitopatógeno es viable hasta catorce días.

Wang y otros (2021) reportaron que la utilización de rizobacterias provenientes de plantas de arroz fue capaz de inhibir el crecimiento de *R. solani* sin contacto directo a través de la liberación de COVs y entre las cuales destacaron cepas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Ralstonia*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Brevibacillus* y *Paenisporosarcina*, las cuales tuvieron un porcentaje de inhibición entre 7.84 y 100%. Entre

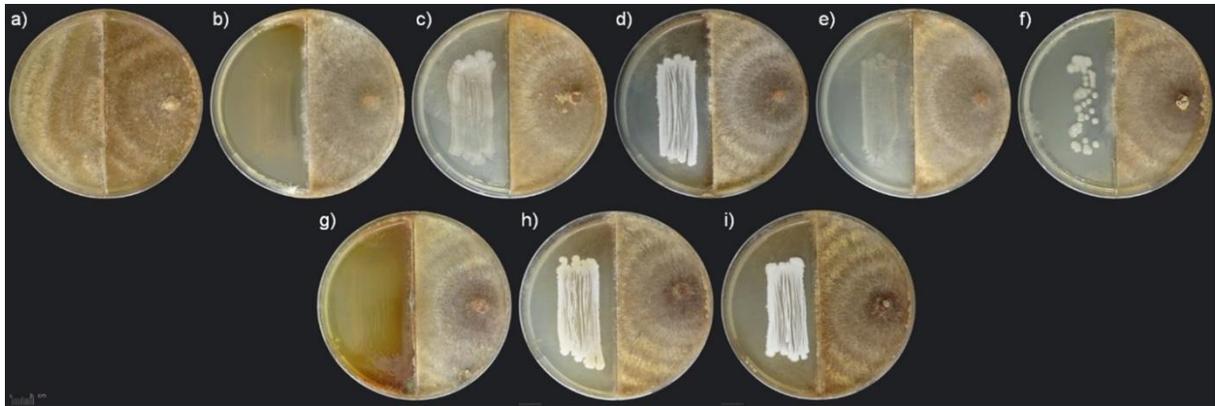


Figura 4.11.6 Inhibición del crecimiento de *Rhizoctonia* spp. por los VOCs producidos por rizobacterias después de catorce días en incubación. En a) se observa el control y los aislados: b) 406, c) 410, d) 414, e) 416, f) 420, g) 423, h) 433 e i) 438.

los COVs producidos por las bacterias con mayor actividad antifúngica, se destaca el éster metílico del ácido benzoico y el ácido 3-metil-butanoico, ya que tuvieron una actividad letal frente de *R. solani* a concentraciones de 25%, mientras que el 2-etil-1-hexanol, el 3-metil-1-butanol y el 6-metil-5-hepten-2-ona fueron capaz de inhibir significativamente el crecimiento a la misma concentración. Otros estudios señalan que COVs como el 2-feniletanol, acetato de isopentilo, naftaleno, 2-metilpentanoato de metilo, 1,3,5-tricloro-2-metoxibenceno, 1-metil-4-(1-metileténil)-ciclohexeno y la 4-flavanona (4H-1-benzopiran-4-ona, 2,3-dihidro-2-fenilo), son capaces de inhibir el crecimiento de este hongo fitopatógeno (Cordovez y otros, 2015; Mookherjee y otros, 2018; Elshafie y otros, 2013). Asimismo, Kai y otros (2007) indicaron que los aislados bacterianos pertenecientes a los géneros *Stenotrophomonas*, *Serratia* spp., *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* son capaces de influir negativamente en el crecimiento del hongo *R. solani* Kühn, llegando a inhibir de un 80 a 99% el crecimiento del micelio.

Como se puede observar, la inhibición de las rizobacterias de esta colección frente a *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp. varía de entre 30 a 33%, siendo mayoritariamente del género Gram positivo. El impacto de este tipo de bacterias esta mucho menos documentado que las Gram negativo, pero aun así tienen importantes repercusiones en plantas.

A continuación, en la Tabla 4.11 se muestran los resultados de los aislados en cada una de las pruebas realizadas:

Tabla 4.11 Resultados de las pruebas para la caracterización de las rizobacterias

Aislado	ACC	P	K	Fe	CEL	QUIT	EPS	AIA	% GER		COV	
									LENT	PEP	F	R
400	*	**	*	*	*	S/P	++	**	*	*	*	S/P
401	**	***	*	*	*	S/P	-	*	*	*	S/P	S/P
402	*	S/P	*	S/P	*	S/P	++	**	*	*	S/P	S/P
403	*	***	*	*	*	S/P	+	*	*	*	*	*
404	**	**	*	*	*	S/P	+++	*	*	*	S/P	*
405	*	*	*	*	*	S/P	++	*	*	*	S/P	S/P
406	*	***	*	*	*	S/P	-	*	*	*	*	**
407	*	*	*	*	*	S/P	-	*	*	*	S/P	*
408	*	*	*	*	*	S/P	+	*	**	*	*	S/P
409	*	*	*	**	*	S/P	+	*	*	*	S/P	S/P
410	*	**	*	*	*	S/P	+	*	*	*	***	**
411	*	**	S/P	S/P	*	S/P	-	*	*	*	S/P	S/P
412	*	**	*	*	*	S/P	+++	**	*	*	S/P	*
413	*	*	*	*	*	S/P	-	*	***	*	S/P	S/P
414	*	***	*	*	*	S/P	++	*	*	*	S/P	**
415	**	*	S/P	*	*	S/P	+	*	**	*	S/P	S/P
416	*	*	S/P	*	*	S/P	-	*	*	*	***	**

417	**	S/P	*	*	**	S/P	-	*	*	*	***	S/P
418	*	*	*	*	*	S/P	+++	*	*	*	S/P	S/P
419	**	S/P	S/P	S/P	**	S/P	S/P	*	**	*	S/P	S/P
420	*	*	*	S/P	*	S/P	++	**	**	*	S/P	**
421	**	***	*	*	*	S/P	-	**	*	*	S/P	*
422	*	*	S/P	*	*	S/P	++	*	*	*	S/P	S/P
423	**	S/P	*	*	*	S/P	S/P	*	*	**	****	**
424	**	S/P	*	*	*	S/P	++++	*	**	***	S/P	*
425	*	**	S/P	S/P	*	S/P	-	*	**	**	***	*
426	*	**	*	*	*	S/P	-	*	*	**	*	S/P
427	**	**	*	*	*	S/P	+	**	**	**	*	S/P
428	*	*	*	*	*	S/P	++	*	**	**	S/P	S/P
429	*	S/P	*	S/P	*	S/P	-	**	**	*	S/P	*
430	*	**	*	S/P	S/P	S/P	S/P	*	*	*	S/P	S/P
431	*	**	S/P	*	*	S/P	S/P	*	**	*	S/P	S/P
432	*	*	*	S/P	*	S/P	++	**	***	**	S/P	S/P
433	**	S/P	S/P	S/P	*	S/P	++	**	*	**	S/P	**
434	*	S/P	*	*	*	S/P	-	**	*	**	S/P	S/P
435	**	*	*	*	*	S/P	S/P	*	**	**	S/P	S/P
436	*	S/P	*	S/P	*	S/P	+	*	**	**	S/P	*

437	*	*	*	S/P	*	S/P	++	**	**	***	S/P	S/P
438	*	S/P	*	*	*	S/P	++	**	***	**	S/P	**
439	*	**	**	S/P	S/P	S/P	-	*	***	**	S/P	S/P
440	*	S/P	*	*	*	S/P	++	**	*	***	*	S/P
441	*	*	*	*	*	S/P	S/P	**	***	**	S/P	S/P
442	*	*	*	S/P	*	S/P	S/P	**	**	*	S/P	S/P
443	**	*	*	S/P	*	S/P	-	*	**	**	****	S/P
444	*	*	S/P	*	*	S/P	+	**	*	*	S/P	S/P
445	*	S/P	*	*	*	S/P	++	**	**	*	*	S/P
446	*	*	*	*	*	S/P	++	**	*	**	S/P	S/P
447	**	S/P	S/P	*	S/P	S/P	++	*	*	**	S/P	S/P
448	*	S/P	*	S/P	*	S/P	+	**	**	**	*	S/P
449	**	S/P	*	S/P	*	S/P	+++	**	*	**	S/P	S/P
450	*	***	**	**	S/P	S/P	S/P	*	**	**	S/P	S/P
451	*	**	S/P	**	S/P	S/P	S/P	*	*	**	S/P	S/P

**ACC:** ACC desaminasa, \*: Producción media de biomasa, \*\*: Producción alta de biomasa; **P:** Fosfato, **K:** Potasio, **Fe:** Sideróforos, \*: Solubilización del compuesto, \*\*: Solubilización superior a la media, \*\*\*: Solubilización con diferencias estadísticas significativas; **CEL:** Celulasas, **QUIT:** Quitinasas, \*: producción de enzimas extracelulares; \*\*: producción de enzimas superior a la media; **EPS:** Exopolisacáridos; **AIA:** Ácido indolacético, \*: producción del compuesto; \*\*: producción del compuesto superior a la media; **% GER:** % de germinación, vigorosidad y biomasa, **LEN:** Lenteja, **PEP:** Pepino, \*:% GER menor al control, \*\*: % GER mayor al control, \*\*\*: % GER mayor al control con diferencias estadísticamente significativas; **COV:** compuestos volátiles, **F:** Fusarium spp., **R:** *Rhizoctonia* spp., \*: Inhibición del hongo por una semana, \*\*: Inhibición del hongo por dos semanas, \*\*\*: Inhibición del hongo por tres semanas, \*\*\*\*: Inhibición del hongo por cuatro semanas; **S/P:** sin presencia.

## 5 CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados de este trabajo, se pudieron aislar rizobacterias provenientes del suelo del ANP “Sierra de los Agustinos” con capacidades significativas para mejorar el porcentaje de germinación y vigorosidad en semillas de lenteja y pepino, se confirmó la acción promotora de crecimiento directo en la planta, demostrando así el potencial biotecnológico que poseen para utilizarse como promotoras de crecimiento vegetal. Además, se identificó la actividad de los distintos mecanismos de acción en cada uno de los aislados por su diversidad metabólica ya que presentaron capacidad de facilitar la biodisponibilidad de varios nutrientes y la producción de compuestos volátiles como agentes de control biológico.

La caracterización de cada uno de los 52 aislados ofrece información específica que abre nuevas posibilidades para el futuro de esta investigación a través del uso de consorcios bacterianos, lo que pueden llegar a ser una pieza clave para la formulación de alternativa a los fertilizantes químicos y que estos sean más amigables con el medio ambiente y la salud de las personas.

Los hallazgos aquí presentados tienen el potencial de informar políticas y prácticas agrícolas que promuevan la resiliencia de los sistemas agrícolas frente a los desafíos ambientales y socioeconómicos, beneficiando tanto a los agricultores locales como al medio ambiente en general.

La conservación y recuperación de las áreas naturales es de suma importancia por los servicios ecosistémicos que proporcionan y como se muestra en este trabajo se encuentra un gran potencial biotecnológico con diversas aplicaciones.

## 6 REFERENCIAS

- Adame-García, J., Murillo-Cuevas, F. D., Flores-de la Rosa, F. R., Velázquez-Mendoza, V., López-Vázquez, M., Cabrera-Mireles, H., & Antonio-Vázquez, E. (2021). Identificación molecular y evaluación de bacterias en el desarrollo vegetativo y producción de chile habanero. *Biocencia*, 23(3), 151-157. <https://doi.org/10.18633/biocencia.v23i3.1480>
- Ahemad, M. (2015). Phosphate solubilising bacteria assisted phytoremediation of metalliferous soil: a review. *Biotech*, 5, 111-121. <https://doi.org/10.1007/s13205.014.0206.0>
- Ahemad, M., Zaidi, A., Khan, M. S., & Oves, M. (2009). Biological importance of phosphorus and phosphate solubilizing microorganisms—an overview. En *Phosphate solubilizing microbes for crop improvement* (págs. 1-4).
- Ahmad, M., Nadeem, S. M., Naveed, M., & Zahir, Z. A. (2016). Potassium-Solubilizing Bacteria and Their Application in Agriculture. En *Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture* (págs. 293-313). [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2776-2\\_21](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2776-2_21)
- Ajjah, N., Fiodor, A., Pandey, A. K., Rana, A., & Pranaw, K. (2023). Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) with Biofilm-Forming Ability: A Multifaceted Agent for Sustainable Agriculture. *Diversity*, 15, 112. <https://doi.org/10.3390/d15010112>
- Alexander, D. B., & Zuberer, D. A. (1991). Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 12, 39-45. <https://doi.org/10.1007/BF00369386>
- Alor, E. T., Dare, M. O., & Babalola, O. O. (2017). Microbial inoculants for soil quality and plant health. *Sustainable Agriculture Reviews*, 22, 281-307. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-48006-0\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-48006-0_9)

- Alves, T. B., de Oliveira-Ornela, P. H., de Oliveira, A. H., Jorge, J. A., & Guimarães, L. H. (2018). Production and characterization of a thermostable antifungal chitinase secreted by the filamentous fungus *Aspergillus niveus* under submerged fermentation. *3 Biotech*, *8*(369), 1-10. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1397-6>
- Andrade, V. H., Redmile-Gordon, M. B., Andreote, F. D., & Roesch, L. F. (2021). Artificially intelligent soil quality and health indices for 'next generation' food production systems. *Trends in Food Science & Technology*, *107*, 195-200. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.10.018>
- Angulo, V. C., Sanfuentes, E. A., Rodríguez, F., & Sossa, K. E. (2014). Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. *Revista Argentina de Microbiología*, *46*(4), 338-447. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70093-8](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70093-8)
- Anthony, C. (2014). The quinoprotein dehydrogenases for methanol and glucose. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *428*, 2-9. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.03.038>
- Arias, S., del Moral, A., Ferrer, M. R., Tallon, R., Quesada, E., & Béjar, V. (2003). Mauran, an exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas maura*, with a novel composition and interesting properties for biotechnology. *Extremophiles*, *7*, 319–326. <https://doi.org/10.1007/s00792-003-0325-8>
- Arora, N. K., & Verma, M. (2017). Modified microplate method for rapid and efficient estimation of siderophore produced by bacteria. *BioTech*, *7*(381), 1-9. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-1008-y>
- Ayub, J., Tahir, A., Iqbal, U., Ayub, H., Hyder, M. Z., Kiyani, A., Hafeez, F. Y., Ilyas, M. K., Ghafoor, A., & Yasmin, T. (2024). Effective biological control of Lentil (*Lens culinaris*) Fusarium wilt and plant growth promotion through native Rhizobacteria. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *129*, 102203. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2023.102203>
- Babu, A. N., Jogaiah, S., Ito, S., Nagaraj, A. M., & Tran, L. P. (2015). Improvement of growth,

- fruit weight and early blight disease protection of tomato plants by rhizosphere bacteria is correlated with their beneficial traits and induced biosynthesis of antioxidant peroxidase and polyphenol oxidase. *Plant Science*, 231, 62-73. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.11.006>
- Báez-Vallejo, N., Camarena-Pozos, D. A., Monribot-Villanueva, J. L., Ramírez-Vázquez, M., Carrión-Villarnovo, G. L., Guerrero-Analco, J. A., Partida-Martínez, L. P., & Reverchon, F. (2020). Forest tree associated bacteria for potential biological control of *Fusarium solani* and of *Fusarium uroshium*, causal agent of *Fusarium dieback*. *Microbiological research*, 235, 235, 126440. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126440>
- Barton, L. L., & Hemming, B. C. (1993). *Iron Chelation in Plants and Soil Microorganisms*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-120-79870-4.X5001-7>
- Bernard, R., & Glick, B. R. (2015). Bacterial Modulation of Plant Ethylene Levels. *Plant Physiology*, 169(1), 13-22. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00284>
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 62(3), 293–300. <https://doi.org/10.1128/jb.62.3.293-300.1951>
- Bobadilla, C., & Rincón, S. C. (2008). Aislamiento y producción de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza [Trabajo de grado, Pontificia Universidad Javeriana]: <http://hdl.handle.net/10554/8433>
- Bowman, S. M., & Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 28(8), 799–808. <https://doi.org/10.1002/bies.20441>
- Brzezinska , M. S., & Jankiewicz , U. (2012). Production of antifungal chitinase by *Aspergillus niger* LOCK 62 and its potential role in the biological control. *Current Microbiology*, 65(6), 666-672. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0208-2>
- Burdman, S., Jurkevitch, E., & Okon, Y. (2000). Recent advances in the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture. *Microbial Interactions in Agriculture and Forestry*, 229–250.

- Chaiharn, M., Chunhaleuchanon, S., & Lumyong, S. (2009). Screening siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 1919–1928. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0090-7>
- Chávez-Díaz, I. F., Zelaya-Molina, L. X., Cruz-Cárdenas, C. I., Rojas-Anaya, E., Ruíz-Ramírez, S., & Santos-Villalobos, S. (2021). Consideraciones sobre el uso de biofertilizantes como alternativa agro-biotecnológica sostenible para la seguridad alimentaria en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(6), 1423-1436. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i6.2492>
- Cheba, B. A., Zaghoul, T. I., EL-Mahdy, A. R., & EL-Massry, M. H. (2016). Effect of pH and Temperature on *Bacillus* sp. R2 Chitinase Activity and Stability. *Procedia Technology*, 22, 471-477. <https://doi.org/10.1016/j.protcy.2016.01.092>
- Chen, Y. P., Rekha, P. D., Arun, A. B., Shen, F. T., Lai, W. A., & Young, C. C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tri-calcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*, 34, 33-41. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2005.12.002>
- Chen, Y., Cao, S., Chai, Y., Clardy, J., Kolter, R., Guo, J. H., & Losick, R. (2012). A *Bacillus subtilis* sensor kinase involved in triggering biofilm formation on the roots of tomato plants. *Molecular Microbiology*, 85, 418–430. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08109.x>
- Cheng, C., Shang-Guan, W., He, L., & Sheng, X. (2020). Effect of Exopolysaccharide-Producing Bacteria on Water-Stable Macro-Aggregate Formation in Soil. *Geomicrobiology Journal*, 37(8), 738-745. <https://doi.org/10.1080/01490451.2020.1764677>
- Chhabra, S., Brazil, D., Morrissey, J., Burke, J. I., O'Gara, F., & Dowling, D. N. (2013). Characterisation of mineral phosphate solubilisation traits from a barley rhizosphere soil functional metagenome. *Microbiologyopen*, 2, 717–724. <https://doi.org/10.1002/mbo3.110>
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). (2021). *La*

*biodiversidad en Guanajuato: Estudio de Estado*. Instituto de Ecología del Estado de Guanajuato.

CONANP. (2020). *Programa Nacional de Áreas Naturales Protegidas 2020-2024*. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas.

Cordovez, V., Carrion , V. J., Etalo , D. W., Mumm , R., Zhu , H., van Wezel, G. P., & Raaijmakers , J. M. (2015). Diversity and functions of volatile organic compounds produced by *Streptomyces* from a disease-suppressive soil . *Frontiers in Microbiology*, 6, 1-13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01081>

Cuadras-Berrelleza, A., Peinado-Guevara, V., Peinado-Guevara, H., López-López, J., & Herrera-Barrientos, J. (2021). Agricultura intensiva y calidad de suelos: retos para el desarrollo. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 12(8), 1401-1414. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i8.2704>

Deb, C. R., & Tatung, M. (2024). Siderophore producing bacteria as biocontrol agent against phytopathogens for a better environment: A review. *South African Journal of Botany*, 165, 153-162. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.12.031>

Deka, P., Goswami, G., Das, P., Gautom, T., Chowdhury, N., Boro, R. C., & Barooah, M. (2019). Bacterial exopolysaccharide promotes acid tolerance in *Bacillus amyloliquefaciens* and improves soil aggregation. *Molecular Biology* , 46(1), 1079–1091. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4566-0>

Delgado-Ramírez, C. S., Hernández-Martínez, R., & Sepúlveda, E. (2021). Rhizobacteria Associated with a Native Solanaceae Promote Plant Growth and Decrease the Effects of *Fusarium oxysporum* in Tomato. *Agronomy*, 11(3), 579. <https://doi.org/10.3390/agronomy11030579>

Díaz-Amaya, L. S. (2009). *Detección y cuantificación de sideróforos en aislamientos de actinomicetos provenientes de suelo cundi - boyacense*. [Trabajo de Grado, Pontificia Universidad Javeriana]. <http://hdl.handle.net/10554/8457>

Din, H. M., Rashed, O., & Ahmad, K. (2020). Prevalence of Fusarium Wilt Disease of Cucumber (*Cucumis sativus* Linn) in Peninsular Malaysia Caused by *Fusarium oxysporum* and *F. Solani*. *Tropical Life Sciences Research*, 31(3), 29-45.

<https://doi.org/10.21315/tlsr2020.31.3.3>

Downing, K. J., & Thomson, J. A. (2000). Introduction of the *Serratia marcescens* chiA gene into an endophytic *Pseudomonas fluorescens* for the biocontrol of phytopathogenic fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, 46(4), 363–369. <https://doi.org/10.1139/w99-147>

Dworkin, M., & Foster, J. (1958). Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. *Journal of bacteriology*, 75(5), 592-603. <https://doi.org/10.1128/jb.75.5.592-603.1958>

Ehmann, A. (1977). The van URK-Salkowski reagent — a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives. *Journal of Chromatography A*, 132(2), 267-276. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)89300-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)89300-0)

El-Antably, H. M., & Larsen, P. (1974). Distribution of Gibberellins and Abscisic Acid in Geotropically Stimulated *Vicia faba* Roots. *Physiologia Plantarum*, 4(322-329), 32. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1974.tb03145.x>

Elshafie, H. S., Bufo, S. A., Racioppi, R., & Camele, I. (2013). Biochemical characterization of volatile secondary metabolites produced by *Burkholderia gladioli* pv. *agaricola*. *International Journal of Drug Discovery*, 5(1), 181-184. <https://doi.org/10.9735/0975-4423.5.1.181-184>

El-Tarabily, K. A., & Sivasithamparam, K. (2006). Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biology and Biochemistry*, 7(1505-1520), 38. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.12.017>

Epstein, E., & Bloom, A. (2005). Inorganic components of plants. En *Mineral nutrition of plants: principles and perspectives* (2nd ed., págs. 44-45). Sinauer Associates.

Esquivel-Cote, R., Gavilanes-Ruiz, M., Cruz-Ortega, R., & Huante, P. (2013). Importancia agrobiotecnológica de la enzima ACC desaminasa. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(3), 251-258. <https://doi.org/10.35196/rfm.2013.3.251>

Etesami, H., Emami, S., & Alikhani, H. A. (2017). Potassium solubilizing bacteria (KSB):

- mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects - a review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 17(4), 897-911. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162017000400005>
- Fahde, S., Boughribil, S., Boughribil, B., & Amri, A. (2023). Rhizobia: A Promising Source of Plant Growth-Promoting Molecules and Their Non-Legume Interactions: Examining Applications and Mechanisms. *Agriculture*, 13(7), 1279. <https://doi.org/10.3390/agriculture13071279>
- Fatharani, R., & Rahayu, Y. S. (2018). Isolation and Characterization of Potassium-Solubilizing Bacteria from Paddy Rhizosphere (*Oryza sativa* L.). *Journal of Physics: Conference Series*, 1108(1), 1-5. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1108/1/012105>
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2001). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part I: Structural and ecological aspects. *Water Science and Technology*, 43(6), 1-8.
- Francis, I., Holsters, M., & Vereecke, D. (2010). The Gram-positive side of plant-microbe interactions. *Environmental microbiology*, 12(1), 1-12. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01989.x>
- Fuentes, A., Carreño, C., & Llanos, C. (2013). Rendimiento de exopolisacáridos emulgentes producidos por bacterias halófilas nativas en tres concentraciones de melaza de *Saccharum officinarum* L. "caña de azúcar". *Scientia Agropecuaria*, 4, 111-120. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2013.02.04>
- García, F., Muñoz, H., & Mendoza, G. (2010). Caracterización de cepas nativas de *Azospirillum* spp. y su efecto en el desarrollo de *Oryza sativa* L. "arroz" en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*, 1(2), 107-116.
- Gelman, R. A. (1982). Characterization of carboxymethylcellulose: Distribution of substituent groups along the chain. *Journal of Applied Polymer Science*, 27(8), 2957–2964. <https://doi.org/10.1002/app.1982.070270820>
- Ghorai, A. K., Patsa, R., Jash, S., & Dutta, S. (2021). 12 - Microbial secondary metabolites and their role in stress management of plants. En S. Jogaiah, *Biocontrol Agents and*

*Secondary Metabolites* (págs. 283-319). Woodhead Publishing.

- Ghosh, S. K., Bera, T., & Chakrabarty, A. M. (2020). Microbial siderophore—A boon to agricultural sciences. *Biological Control*, *144*, 104214. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104214>
- Gómez, B., Mejía, L., & Ruiz, G. (2021). Bacterias benéficas del suelo para proteger y recuperar áreas naturales protegidas. *Temas de Ciencia y Tecnología*, *25*(74), 43-47.
- Gómez-Luna, B., Hernández-Morales, A., Herrera-Méndez, C., Arroyo-Figueroa, G., Vargas-Rodríguez, L., & Olalde-Portugal, V. (2012). AISLAMIENTO DE BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO DE LA RIZÓSFERA DE PLANTAS DE GUAYABA (*Psidium guajava*). *Ra Ximhai*, *8*(3), 97-102.
- Goswami, D., Thakker, J. N., & Dhandhukia, P. C. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*, *2*(1), 1-19. <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1127500>
- Gram, C. (1884). The differential staining of Schizomycetes in tissue sections and in dried preparations. *General Microbiology*, *2*, 215-218.
- Guevara-Avenidaño, E., Bravo-Castillo, K. R., Monribot-Villanueva, J. L., Kiel-Martínez, A. L., Ramírez-Vázquez, M., Guerrero-Analco, J. A., & Reverchon, F. (2020). Diffusible and volatile organic compounds produced by avocado rhizobacteria exhibit antifungal effects against *Fusarium kuroshium*. *Brazilian Journal of Microbiology*, *51*(3), 861–873. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00249-6>
- Guevara-Avenidaño, E., Carrillo, J. D., Ndinga-Muniania, C., Moreno, K., Méndez-Bravo, A., Guerrero-Analco, J. A., Eskalen, A., & Reverchon, F. (2019). Antifungal activity of avocado rhizobacteria against *Fusarium euwallaceae* and *Graphium* spp., associated with *Euwallacea* spp. nr. *forficatus*, and *Phytophthora cinnamomi*. *Antonie van Leeuwenhoek*, *111*, 563-572. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0977-5>
- Gupta, R., Singal, R., Shankar, A., Kuhad, R. C., & Saxena, R. K. (1994). A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. *The Journal of General and Applied Microbiology*, *40*(3), 255-260. <https://doi.org/10.2323/jgam.40.255>

- Hakim, S., Naqqash, T., Nawaz, M. S., Laraib, I., Siddique, M. J., Zia, R., Mirza, M. S., & Imran, A. (2021). Rhizosphere Engineering With Plant Growth-Promoting Microorganisms for Agriculture and Ecological Sustainability. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 617157. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.617157>
- Hamzah, T. N., Lee, S. Y., Hidayat, A., Terhem, R., Faridah-Hanum, I., & Mohamed, R. (2018). Diversity and Characterization of Endophytic Fungi Isolated From the Tropical Mangrove Species, *Rhizophora mucronata*, and Identification of Potential Antagonists Against the Soil-Borne Fungus, *Fusarium solani*. *Frontiers in microbiology*, 9, 1707. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01707>
- He, Z. L., Bian, W., & Zhu, J. (2002). Screening and identification of microorganisms capable of utilizing phosphate adsorbed by goethite. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 33(5&6), 647-663. <https://doi.org/10.1081/CSS-120003057>
- Hider, R. C., & Kong, X. (2010). Chemistry and biology of siderophores. *Natural Product Reports*, 27(5), 637-657. <https://doi.org/10.1039/b906679a>
- Hu, Q. P., & Xu, J. G. (2011). A simple double-layered chrome azurol S agar (SDCASA) plate assay to optimize the production of siderophores by a potential biocontrol agent *Bacillus*. *African Journal of Microbiology Research*, 5, 4321-4327. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.238>
- Hu, X., Chen, J., & Guo, J. (2006). Two phosphate- and potassium-solubilizing bacteria isolated from Tianmu Mountain, Zhejiang, China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 983-990. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9144-2>
- Huang, X., Zhang, N., Yong, X., Yang, X., & Shen, Q. (2012). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber with *Bacillus pumilus* SQR-N43. *Microbiological Research*, 167(3), 135-143. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.06.002>
- Illmer, P., & Schinner, F. (1995). Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 3, 257-263. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)00190-C](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)00190-C)
- Illmer, P., Barbato, A., & Schinner, F. (1995). Solubilization of hardly soluble  $AlPO_4$  with P-

solubilizing microorganisms. *Soil Biol. Biochem*, 27, 260–270. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)00205-F](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)00205-F)

Instituto de Ecología del Estado. (2004). *Resumen del programa de manejo del Área Natural Protegida "Sierra de los Agustinos", ubicada en los municipios de Acámbaro, Jerécuaro y Tarimoro*. Periodico N. 198 Tercera Parte.

Instituto Mexicano para la Competitividad (IMCO). (2023). *México en el mundo*.

Islam, S., Akanda, A. M., Prova, A., Islam, M. T., & Hossain, M. M. (2016). Isolation and Identification of Plant Growth Promoting Rhizobacteria from Cucumber Rhizosphere and Their Effect on Plant Growth Promotion and Disease Suppression. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01360>

Iturrutxa, E., Trask, T., Mesanza, M., Raposo, R., Elvira-Recuenco, M., & Patten, C. L. (2017). Biocontrol of *Fusarium circinatum* infection of young *Pinus radiata* trees. *Forests*, 8, 32. <https://doi.org/10.3390/f8020032>

Jackson, L. M. (1982). *Análisis químico de suelos*. Omega.

Jahanian, A., Chaichi, M. R., Rezaei, K., Rezayazdi, K., & Khavazi, K. (2012). The effect of plant growth promoting rhizobacteria (pgpr) on germination and primary growth of artichoke (*Cynara scolymus*). *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 4, 923-929.

Jalal, A., da Silva-Oliveira, C. E., Shintate-Galindo, F., Leonel-Rosa, P. A., Bueno-Gato, I. M., Horschut de Lima, B., & Minhoto-Teixeira, M. C. (2023). Regulatory Mechanisms of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and Plant Nutrition against Abiotic Stresses in Brassicaceae Family. *Life*, 13(1), 211. <https://doi.org/10.3390/life13010211>

Jha, K. B., Pragash, M. G., Cletus, J., Raman, G., & Sakthivel, N. (2009). Simultaneous phosphate solubilization potential and antifungal activity of new fluorescent pseudomonad strains, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. plecoglossicida* and *P. mosselii*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 573-581. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9925-x>

Jiskani, A. M., Samo, Y., Soomro, M. A., Leghari, Z. H., Gishkori, Z. G., Bhutto, S. H., & Majeedano, A. Q. (2021). A destructive disease of lentil: fusarium wilt of lentil. *Plant*

*Archives*, 21(1), 2117-2127.  
<https://doi.org/10.51470/PLANTARCHIVES.2021.v21.S1.350>

- Joe, M. M., Deivaraj, S., Benson, A., Henry, A. J., & Narendrakumar, G. (2018). Soil extract calcium phosphate media for screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Agriculture and Natural Resources*, 52(3), 305-308. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.09.014>
- Kai, M., Effmert, U., Berg, G., & Piechulla, B. (2007). Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Archives of Microbiology*, 187, 351–360. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0199-0>
- Kai, M., Hausteiner, M., Molina, F., Petri, A., Scholz, B., & Piechulla, B. (2009). Bacterial volatiles and their action potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(6), 1001–1012. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1760-3>
- Khalid, A., Arshad, M., & Zahir, Z. A. (2004). Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*, 93(3), 473–480. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02161.x>
- Khan, M. S., Zaidi, A., & Ahmad, E. (2014). Mechanism of Phosphate Solubilization and Physiological Functions of Phosphate-Solubilizing Microorganisms. En *Phosphate Solubilizing Microorganisms* (págs. 31-62). Mohammad Saghir Khan, Almas Zaidi, Javed Musarrat. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-08216-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-08216-5_2)
- Khan, M. S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M., & Wani, P. A. (2010). Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 56(1), 73-98. <https://doi.org/10.1080/03650340902806469>
- Kour, D., Rana, K. L., Kaur, T., Yadav, N., Halder, S., Yadav, A. N., Sachan, S. G., & Saxena, A. K. (2020). Potassium solubilizing and mobilizing microbes: Biodiversity, mechanisms of solubilization, and biotechnological implication for alleviations of abiotic stress. En *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (págs. 177-202). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820526-6.00012-9>

- Kraft, J. M., Haware, M. P., Jiménez-Díaz, R. M., Bayaa, B., & Harrabi, M. (1993). Screening techniques and sources of resistance to root rots and wilts in cool season food legumes. *Euphytica*, 73, 27–39. <https://doi.org/10.1007/BF00027179>
- Kumar, A., Patel, J. S., Bahadur, I., & Meena, V. (2016). The Molecular Mechanisms of KSMs for Enhancement of Crop Production Under Organic Farming. En V. Meena, B. Maurya, J. Verma, & R. Meena, *Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture* (págs. 61-75). [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2776-2\\_5](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2776-2_5)
- Lakshmi, V., Kumari, S., Singh, A., & Prabha, C. (2015). Isolation and characterization of deleterious *Pseudomonas aeruginosa* KC1 from rhizospheric soils and its interaction with weed seedlings. *Journal of King Saud University - Science*, 27, 113-119. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2014.04.007>
- Lewis, J. A., & Papavizas, G. C. (1980). Integrated Control of *Rhizoctonia* Fruit Rot of Cucumber. *Phytopathology*, 70(2), 85-89. <https://doi.org/10.1094/phyto-70-85>
- Liang, Y. L., Zhang, Z., Wu, M., Wu, Y., & Feng, J. X. (2014). Isolation, Screening, and Identification of Cellulolytic Bacteria from Natural Reserves in the Subtropical Region of China and Optimization of Cellulase Production by *Paenibacillus terrae* ME27-1. *BioMed Research International*, 2014, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2014/512497>
- Liu, D., Lian, B., & Dong, H. (2012). Isolation of *Paenibacillus* sp. and Assessment of its Potential for Enhancing Mineral Weathering. *Geomicrobiology Journal*, 29(5), 413-421. <https://doi.org/10.1080/01490451.2011.576602>
- Liu, X., & Zhang, H. (2015). The effects of bacterial volatile emissions on plant abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1-6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00774>
- López-Geta, J., Martínez-Navarrete, C., Moreno-Merino, L., & Navarrete-Martínez, P. (1992). Las aguas subterráneas y los plaguicidas. En *Movimiento de los plaguicidas hacia las aguas subterráneas* (pág. 149). Instituto Geológico y minero de España.
- Louden, B. C., Haarmann, D., & Lynne, A. M. (2011). Use of Blue Agar CAS Assay for

- Siderophore Detection. *Journal of Microbiology & Biology Education*, 12(1), 51-53. <https://doi.org/10.1128/jmbe.v12i1.249>
- Louw, H. A., & Webley, D. M. (1959). A study of soil bacteria dissolving certain mineral phosphate fertilizers and related compounds. *Journal of Applied Bacteriology*, 22(1), 227-233. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1959.tb00155.x>
- Luna-Martínez, L., Martínez-Peniche, R. A., Hernández Iturriaga, M., Arvizu-Medrano, S. M., & Pacheco Aguilar, J. R. (2013). Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(1), 63-69. <https://doi.org/10.35196/rfm.2013.1.63>
- Luque, R., Quesada, E., Béjar, B., & Llamas, I. (2010). Aislamiento de cepas del género Halomonas con interés biotecnológico en Rambla Salada (Murcia). *ARS Pharmaceutica*, 51(3), 453-462.
- Lwin, K. M., Myint, M. M., Tar, T., & Aung, W. Z. (2012). Isolation of Plant Hormone (Indole-3-Acetic Acid - IAA) Producing Rhizobacteria and Study on Their Effects on Maize Seedling. *Engineering Journal*, 16(5), 137-144. <https://doi.org/10.4186/ej.2012.16.5.137>
- MAG. (1991). Pepino. En *Aspectos Técnicos sobre Cuarenta y Cinco Cultivos Agrícolas de Costa Rica* (págs. 1-5). Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica.
- Mandels, M., & Reese, E. T. (1957). Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *Journal of Bacteriology*, 73(2), 269-278. <https://doi.org/10.1128/jb.73.2.269-278.1957>
- Manjula, K., & Podile, A. R. (2005). Production of fungal cell wall degrading enzymes by a biocontrol strain of *Bacillus subtilis* AF 1. *Indian Journal of Experimental Biology*, 43, 43892-896. <http://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/23257>
- MAPA. (2018). *Pepino*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Martínez-Cánovas, M. J., Quesada, E., Martínez-Checa, F., & Bejar, F. (2004). A Taxonomic Study to Establish the Relationship between Exopolysaccharide-Producing Bacterial Strains Living in Diverse Hypersaline Habitats. *Current Microbiology*, 48, 348-353. <https://doi.org/10.1007/s00284-003-4208-0>

- Matilla, A. J. (2000). Ethylene in seed formation and germination. *Seed Science Research*, 10(2), 111–126. <https://doi.org/10.1017/S096025850000012X>
- McDonald, J. E., Rooks, D. J., & McCarthy, A. J. (2012). Chapter nineteen - Methods for the Isolation of Cellulose-Degrading Microorganisms. En *Methods in Enzymology* (Vol. 510, págs. 349-374). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415931-0.00019-7>
- Medina-Reyes, G. L. (2020). *Efecto de las rizobacterias en el desarrollo vegetativo y rendimiento del pepino (Cucumis sativus L.) en invernadero. [Tesis de maestría, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro]*. <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/46999>
- Meena, S. V., Maurya, B. R., Verma, J. P., Aeron, A., Kumar, A., Kim, K., & Bajpai, V. K. (2015). Potassium solubilizing rhizobacteria (KSR): Isolation, identification, and K-release dynamics from waste mica. *Ecological Engineering*, 81, 340-347. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.04.065>
- Meena, V. S., Maurya, V. R., Meena, S. K., Meena, R. K., Kumar, A., Verma, J. P., & Singh, N. P. (2016). Can Bacillus Species Enhance Nutrient Availability in Agricultural Soils? *Bacilli and Agrobiotechnology*, 367-395. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-44409-3\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-319-44409-3_16)
- Mejía-Bautista, M. A., Cristóbal-Alejo, J., Pacheco-Aguilar, J. R., & Reyes-Ramírez, A. (2022). Bacillus spp. en el crecimiento y rendimiento de Capsicum chinense Jacq. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 13(1), 115-126. <https://doi.org/10.29312/remexca.v13i1.2664>
- Mendoza-Hernández, J. C., Arriola-Morales, J., Castillo-Morales, M., Santamaria-Juarez, J. D., & Urbina-Trinidad, P. A. (2023). Análisis del efecto de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal en la redistribución de elementos potencialmente tóxicos en jales de minas. *Acta Universitaria*, 33, 1-11. <https://doi.org/10.15174/au.2023.3799>
- Mishra, G. P., Aski, M. S., Bosamia, T., Chaurasia, S., Mishra, D. C., Bhati, J., Kumar, A., Javeria, S., Tripathi, K., Kohli, M., Kumar, R. R., Singh, A. K., Devi, J., Kumar, S., &

- Dikshit, H. K. (2022). Insights into the Host-Pathogen Interaction Pathways through RNA-Seq Analysis of *Lens culinaris* Medik. In Response to *Rhizoctonia bataticola* Infection. *Genes*, *13*(1), 90. <https://doi.org/10.3390/genes13010090>
- Mittelman, M. W., & Geesey, G. G. (1985). Copper-binding characteristics of exopolymers from a freshwater-sediment bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, *49*(4), 846–851. <https://doi.org/10.1128/aem.49.4.846-851.1985>
- Mohammed, A. F. (2020). Optimization of cellulase and chitinase enzymes production by plant growth promoting rhizobacteria. *Novel Research in Microbiology Journal*, *4*(1), 641-652 . <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.34937.21601>
- Mohite, B. (2013). Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, *13*(3), 638-649. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162013005000051>
- Molina-Romero, D., Bustillos-Cristales, M. R., Rodríguez-Andrade, O., Morales-García, Y. E., Santiago-Saenz, Y., Castañeda-Lucio, M., & Muñoz-Rojas, J. (2015). Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Biologicas*, *17*(2), 24-34.
- Mookherjee, A., Bera, P., Mitra, A., & Maiti, M. K. (2018). Characterization and Synergistic Effect of Antifungal Volatile Organic Compounds Emitted by the *Geotrichum candidum* PF005, an Endophytic Fungus from the Eggplant. *Microbial Ecology*, *75*, 647–661. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1065-0>
- Morales-Torres, H. C. (2012). Aislamiento y caracterización de fosfobacterias. [Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Querétaro]: <https://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/4816>
- Moreno-Reséndez, A., Carda-Mendoza, V., R. C., Vásquez-Arroyo, J., & Cano-Ríos, P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *20*(1), 68-83. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707>.
- Morocho, M. T., & Leiva-Mora, M. (2019). Microorganismos eficientes, propiedades

- funcionales y aplicaciones agrícolas. *Centro Agrícola*, 46(2), 93-103.
- Morris, R. O. (1995). Genes specifying auxin and cytokinin biosynthesis in prokaryotes. En *Plant Hormones* (págs. 318–339). Davies PJ.
- Mursyida, E., Mubarik, N., & Tjahjoleksono, A. (2015). Selection and Identification of Phosphate-Potassium Solubilizing Bacteria from the Area Around the Limestone Mining in Cirebon Quarry. *Research Journal of Microbiology*, 10, 270-279. <https://doi.org/10.3923/jm.2015.270.279>
- Naik, P. R., Raman, G., Narayanan, K. B., & Sakthivel, N. (2008). Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. *BMC Microbiol*, 8, 230. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-230>
- Narayana, K. J., & Vijayalakshmi, M. (2009). Chitinase Production by *Streptomyces* sp. ANU 6277. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(4), 725–733. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000400002>
- National Resources Conservation Service. (2018). *Soil health assessment*. USDA-NRCS.
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1), 265–270. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>
- Nawaz, A., Qamar, Z. U., Marghoob, M. U., Imtiaz, M., Imran, A., & Mubeen, F. (2023). Contribution of potassium solubilizing bacteria in improved potassium assimilation and cytosolic K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> ratio in rice (*Oryza sativa* L.) under saline-sodic conditions. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1-14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1196024>
- Ngoufack, F. Z., El-Noda, A. N., Tchouanguép, F. M., & El-Soda, M. (2004). Effect of ropy and capsular exopolysaccharides producing strain of *Lactobacillus plantarum* 162RM on characteristics and functionality of fermented milk and soft Kareish type cheese. *African Journal of Biotechnology*, 3(10), 512-518. <https://doi.org/10.5897/AJB2004.000-2102>
- Nosheen, S., Ajmal, I., & Song, Y. (2021). Microbes as biofertilizers, a potential approach for sustainable crop production. *Sustainability*, 13(4), 1868.

<https://doi.org/10.3390/su13041868>

- Oliva-García, G. C., & Gómez-Luna, B. E. (2016). Estudio de bacterias promotoras de crecimiento de plantas asiladas de zonas naturales protegidas del estado de Guanajuato. *Jovenes en la Ciencia*, 2(1), 1576-1579. <http://repositorio.ugto.mx/handle/20.500.12059/2642>
- Osorio-Hernández, E., Hernández-Castillo, F. D., Rodríguez-Herrera, R., Varela-Fuentes, S. E., Estrada-Drouaillet, B., & López-Santillán, J. A. (2016). Actividad antagónica de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia solani* in vitro. *Investigación y Ciencia*, 24(67), 5-11. <https://doi.org/10.33064/iycuaa2016672267>
- Pandey, A., & Palni, L. M. (1998). Isolation of *Pseudomonas corrugate* from Sikkim Himalaya. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14, 411-413. <https://doi.org/10.1023/A:1008825514148>
- Parry, D. W. (1990). Diseases of potato. En *Plant pathology in agriculture* (págs. 276-280). Cambridge University Press.
- Patil, C., Suryawanshi, R., Koli, S., & Patil, S. (2016). Improved method for effective screening of ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase producing microorganisms,. *Journal of Microbiological Methods*, 131, 102-104. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.10.009>.
- Penrose, D. M., Moffatt, B. A., & Glick, B. R. (2001). Determination of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) to assess the effects of ACC deaminase-containing bacteria on roots of canola seedlings. *Canadian journal of microbiology*, 47(1), 77-80. <https://doi.org/10.1139/w00-128>
- Pérez-Reytor, D. C., & Sosa-Espinosa, A. E. (2010). Evaluación de la tolerancia a la crioconservación de dos cepas de *Escherichia coli* K12 de uso frecuente en biotecnología. *VacciMonitor*, 19(2), 11-17.
- Perez-Rosales, E. (2012). *Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal en pepino (Cucumis sativus L.)*. [Tesis de maestría, Colegio de Postgraduados]. <http://hdl.handle.net/10521/729>
- Prajapati, K. B., & Modi, H. A. (2012). Isolation and characterization of potassium

- solubilizing bacteria from ceramic industry soil. *CIBTech Journal of Microbiology*, 1, 8-14.
- Prajapati, K., Sharma, M. C., & Modi, H. A. (2012). Isolation of two potassium solubilizing fungi from ceramic industry soils. . *Life Sci Leaflets*, 5, 71-75.
- Pscheidt, J. W., & Ocamb, C. M. (2016). *Pacific northwest plant disease management handbook*. Oregon State Extension Service.
- Ramírez, C. A., & Gómez, B. E. (2015). Estudio de bacterias promotoras de crecimiento de plantas aisladas de zonas naturales protegidas del estado de Guanajuato (visión de conservación). *Jovenes en la Ciencia*, 1(2), 365-268.
- Raper, K. B., & Fennell, D. I. (1965). *The genus Aspergillus*. Williams and Wilkin.
- Raza, W., Wang, J., Wu, Y., Ling, N., Wei, Z., Huang, Q., & Shen, Q. (2016). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(17), 1-12. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7584-7>
- Renwick, A., Campbell, R., & Coe, S. (1991). Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. *Plant Pathology*, 40, 524-532. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1991.tb02415.x>
- Reverchon, F., Escudero-Osorio, Y. S., Morteo-Zavaleta, J., Guevara-Avendaño, E., & Ramírez-Vázquez, M. (2020). Inhibición de *Fusarium solani* por bacterias de la filósfera y rizósfera de árboles del bosque mesófilo de montaña. *Bioteología y Sustentabilidad*, 5(1), 3-18. <https://doi.org/10.57737/bioteologiaysust.v5i1.738>
- Reverchon, F., García-Quiroz, W., Guevara-Avendaño, E., Solís-García, I. A., Ferrera-Rodríguez, O., & Lorea-Hernández, F. (2019). Antifungal potential of Lauraceae rhizobacteria from a tropical montane cloud forest against *Fusarium* spp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 50, 583-592. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00094-2>
- Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17, 319-339. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00014-2)

- Rodriguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T., & Bashan, Y. (2006). Genetics of phosphate solubilisation and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant Soil*, 287, 15–21. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9056-9>
- Rout, G. R., & Sahoo, S. (2015). Role of iron in plant growth and metabolism. *Reviews in Agricultural Science*, 3, 1-24. <https://doi.org/10.7831/ras.3.1>
- Roy, S., Bhowmik, S., Chowdhury, A. D., Dhara, B., & Mitra, A. K. (2022). Plant growth-promoting rhizobacteria: An alternative for NPK fertilizers. *Microbes and Microbial Biotechnology for Green Remediation*, 149-167. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90452-0.00007-4>
- Sadeghpour, N., Asadi-Gharneh, H. A., Nasr- Esfahani, M., Khankahdani, H. H., & Golabadi, M. (2022). Antioxidant enzymes associated with resistance to *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Melonis* race 1.2 in melon. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 121, 101880. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2022.101880>
- SADER. (2018). *¿Cómo beneficia la agricultura a las familias mexicanas?* Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural .
- SADER. (2023). *Legumbres, uno de los pilares alimenticios que ofrece el campo mexicano.* Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural.
- Sadhu, S., & Maiti, T. K. (2013). Cellulase Production by Bacteria: A Review. *Microbiology Research Journal International*, 3(3), 235-258. <https://doi.org/10.9734/BMRJ/2013/2367>
- Sáenz-Reyes, J. T., Muñoz-Flores, H. J., Ruíz-Rivas, M., Rueda-Sánchez, A., Castillo-Quiroz, D., & Castillo-Reyes. (2022). Diagnóstico del cultivo de lenteja en unidades de producción familiar en Michoacán. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*(27), 35-44. <https://doi.org/10.29312/remexca.v13i27.3160>
- Sage, A., Linker, A., Evans, L. R., & Lessie, T. G. (1990). Hexose phosphate metabolism and exopolysaccharide formation in *Pseudomonas cepacia*. *Current Microbiology*, 20, 191-198. <https://doi.org/10.1007/bf02091996>
- Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S., & Bhatti, A. S. (2007). Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture.

*Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(10), 635–648.  
<https://doi.org/10.1007/s10295-007-0240-6>

Sanchez-Gonzalez, M. E., Mora-Herrera, M. E., Wong-Villarreal, A., De La Portilla-López, N., Sanchez-Paz, L., Lugo, J., Vaca-Paulín, R., Del Aguila, P., & Yañez-Ocampo, G. (2023). Effect of pH and Carbon Source on Phosphate Solubilization by Bacterial Strains in Pikovskaya Medium. *Microorganisms*, 11(1), 49.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms11010049>

Santoro, M., Cappellari, L., Giordano, W., & Banchio, E. (2015). Production of Volatile Organic Compounds in PGPR. En *Handbook for Azospirillum* (págs. 307–317).  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-06542-7\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-319-06542-7_17)

Santoyo de la Cruz, M. F., Gardezi, A. K., Carrillo-Castañeda, G., Ortega-Escobar, H. M., Mancilla-Villa, O. R., Rubiños-Panta, J. E., López-Buenfil, J. A., Larque-Saavedra, M. U., Haro-Aguilar, G., & Ali-Gamboa, C. A. (2023). Efecto de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (*Medicago sativa* L.) en dos tipos de suelo, cobre y composta. *Acta Universitaria*, 33, 1-14. <https://doi.org/10.15174/au.2023.3569>

Sattar, A., Naveed, M., Ali, M., Zahir, Z. A., Nadeem, S. M., Yaseen, M., Meena, V. S., Farooq, M., Singh, R., Rahman, M., & Meena, H. N. (2019). Perspectives of potassium solubilizing microbes in sustainable food production system: A review. *Applied Soil Ecology*, 133, 146-159. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.09.012>

Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1), 47–56.  
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)

Sekine, M., Watanabe, K., & Syono, K. (1989). Molecular cloning of a gene for indole-3-acetamide hydrolase from *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology*, 171, 1718–1724. <https://doi.org/10.1128/jb.171.3.1718-1724.1989>

Sepúlveda-Caamaño, M., Gerding-Gonzalez, M., Vargas, M., Moya-Elizondo, E., Oyarzúa, P., & Campos, J. (2017). Lentil (*Lens culinaris* L.) growth promoting rhizobacteria and their effect on nodulation in coinoculation with rhizobia. *Agronomy and Soil Science*, 64(2), 244-256. <https://doi.org/10.1080/03650340.2017.1342034>

- Setiawati, T. C., & Mutmainnah, L. (2016). Solubilization of Potassium Containing Mineral by Microorganisms From Sugarcane Rhizosphere. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 9, 108-117. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2016.02.134>
- Shameer, S., & Prasad, T. (2018). Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable agricultural practices with special reference to biotic and abiotic stresses. *Plant Growth Regulation*, 84, 603–615. <https://doi.org/10.1007/s10725-017-0365-1>
- Shanmugaiah, V., Mathivanan, N., Natesan, B., & Manoharan, P. T. (2008). Optimization of cultural conditions for production of chitinase by *Bacillus laterosporous* MML2270 isolated from rice rhizosphere soil. *African Journal of Biotechnology*, 7(15), 2562-2568.
- Shanware, A. S., Kalkar, S. A., & Trivedi, M. M. (2014). Potassium Solublisers: Occurrence, Mechanism and Their Role as Competent Biofertilizers. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(9), 622-629.
- Sheng, X. (2005). Growth promotion and increased potassium uptake of cotton and rape by a potassium releasing strain of *Bacillus edaphicus*. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(10), 1918-1922. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.02.026>
- Shenoy, V. V., & Kalagudi, G. M. (2005). Enhancing plant phosphorus use efficiency for sustainable cropping. *Biotechnology advances*, 23(7-8), 501–513. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.01.004>
- Shin, D., Kim, J., Kim, B. S., Jeong, J., & Lee, J. C. (2015). Use of phosphate solubilizing bacteria to leach rare Earth elements from monazite-bearing ore. *Minerals*, 5, 189–202. <https://doi.org/10.3390/min5020189>
- SIAP. (2022). *Anuario Agrícola*. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.
- SIAP. (2023). *¿Cómo cerramos el año agrícola 2022 y qué esperamos del 2023?* Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.
- SIAP. (2023). *Expectativas agroalimentarias*. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural.
- SIAP. (2023). *Lenteja*. Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera.
- Singh, S. K. (2020). Microbes for iron chlorosis remediation in Peach. En S. Mirmajlessi, &

- R. Radhakrishnan, *Biostimulants in Plant Science*.  
<https://doi.org/10.5272/intechopen.B2916>
- Soil Science Society of America. (2016). *Soil sampling and methods of analysis* (Tercera ed.). CRC Press.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), 425–448.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x>
- Statista. (2024). *El sector agrícola en México – Datos estadísticos*. Statista Research Department.
- Sultana, S., Alam, S., & Karim, M. M. (2021). Screening of siderophore-producing salt-tolerant rhizobacteria suitable for supporting plant growth in saline soils with iron limitation. *Journal of Agriculture and Food Research*, 4, 1-5.  
<https://doi.org/10.1016/j.jafr.2021.100150>
- Teather, R. M., & Wood, P. J. (1982). Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(4), 777–780.  
<https://doi.org/10.1128/aem.43.4.777-780.1982>
- Thakur, A., & Parikh, S. C. (2016). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria associated with groundnut rhizosphere. *International Journal of Agricultural Science and Research*, 6(5), 243-260.
- Theunis, M., Kobayashi, H., Broughton, W. J., & Prinsen, E. (2004). Flavonoids, NodD1, NodD2, and Nod-Box NB15 Modulate Expression of the y4wEFG Locus That Is Required for Indole-3-Acetic Acid Synthesis in *Rhizobium* sp. strain NGR234. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17, 1153–1161.  
<https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.10.1153>
- Trejo-Estrada, S. R., Paszczynski, A., & Crawford, D. L. (1998). Antibiotics and enzymes produced by the biocontrol agent *Streptomyces violaceusniger* YCED-9. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 21(1-2), 81-90.  
<https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900549>

- Upadhyay, S. K., Singh, J. S., & Singh, D. P. (2011). Exopolysaccharide-Producing Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Under Salinity Condition. *Pedosphere*, 21(2), 214-222. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(11\)60120-3](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(11)60120-3)
- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, I., & Nasrulhaq, B. A. (2016). Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability—A Review. *Molecules*, 21(5), 573. <https://doi.org/10.3390/molecules21050573>
- Vespermann, A., Kai, M., & Piechulla, B. (2007). Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(17), 5639–5641. <https://doi.org/10.1128/AEM.01078-07>
- Violante, A., Colombo, C., & Buondonno, A. (1991). Competitive Adsorption of Phosphate and Oxalate by Aluminum Oxides. *Soil Science Society of America Journal*, 55, 65-70. <https://doi.org/10.2136/sssaj1991.03615995005500010011x>
- Wahyudi, A. T., Astuti, R. P., Widyawati, A., Meryandini, A., & Nawangsih, A. A. (2011). Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting Rhizobacteria. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 3(2), 34-40.
- Wang, E., Liu, X., Si, Z., Li, X., Bi, J., Dong, W., Chen, M., Wang, S., Zhang, J., & Song, A. (2021). Volatile Organic Compounds from Rice Rhizosphere Bacteria Inhibit Growth of the Pathogen *Rhizoctonia solani*. *Agriculture*, 11(4), 368. <https://doi.org/10.3390/agriculture11040368>
- Weise, T., Kai, M., & Piechulla, B. (2013). Bacterial ammonia causes significant plant growth inhibition. *PLoS One*, 8(5), 1-7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063538>
- Weller, D. M., & Thomashow, L. S. (1994). *Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the rhizosphere.* <https://doi.org/10.1002/9783527615810.ch1>
- Wissuwa, M. (2003). How Do Plants Achieve Tolerance to Phosphorus Deficiency? Small Causes with Big Effects. *Plant Physiology*, 133(4), 1947-1958. <https://doi.org/10.1104/pp.103.029306>
- Wiwat, C., Siwayaprahm, P., & Bhumiratana, A. (1999). Purification and Characterization

- of Chitinase from *Bacillus circulans* No.4.1. *Current Microbiology*, 39, 134-140.  
<https://doi.org/10.1007/s002849900434>
- Yuan, J., Raza, W., Shen, Q., & Huang, Q. (2012). Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), 5942–5944.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.01357-12>
- Zeffa, D. M., Fantin, L. H., dos Santos, O. J., de Oliveira, A. L., Canteri, M. G., Scapim, C. A., & Gonçalves, L. S. (2018). The influence of topdressing nitrogen on *Azospirillum* spp. inoculation in maize crops through meta-analysis. *Bragantia*, 77(3), 493–500.  
<https://doi.org/10.1590/1678-4499.2017273>
- Zhang, H., Sun, Y., Xie, X., Kim, M. S., Dowd, S. E., & Paré, P. W. (2009). A soil bacteria regulates plant acquisition of iron via deficiency-inducible mechanisms. *Plant Journal*, 58, 568–577. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03803.x>
- Zhou, D., Huang, X. F., Huang, J. M., Badri, D. V., Manter, D. K., Vivanco, J. M., & Guo, J. (2016). Root and bacterial secretions regulate the interaction between plants and PGPR leading to distinct plant growth promotion effects. *Plant Soil*, 401, 259–272.  
<https://doi.org/10.1007/s11104-015-2743-7>
- Zlosnik, J. E., Hird, T. J., Fraenkel, M. C., Moreira, L. M., Henry, D. A., & Speert, D. P. (2008). Differential mucoid exopolysaccharide production by members of the *Burkholderia cepacia* complex. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(4), 1470-1473.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.02273-07>

## **7 APÉNDICES**

## CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS BACTERIANOS DE SUELO DE LA SIERRA DE LOS AGUSTINOS

Lucero Alejandra Gonzalez Tejeda, Ricardo Hernández Martínez, Rafael Alejandro Veloz García y Blanca Estela Gómez Luna

Universidad de Guanajuato

la.gonzaleztejeda@ugto.mx

### RESUMEN

La agricultura es uno de los principales motores de desarrollo de nuestro país, por lo que su escalamiento ha representado un crecimiento económico nacional que ha beneficiado a un elevado sector de la población mexicana. Sin embargo, esto ha forzado a los productores a recurrir a la agricultura intensiva y a la aplicación desmedida de agroquímicos, afectando así la sustentabilidad y calidad de los suelos y comprometiendo sus propiedades fisicoquímicas y microbiológicas. Debido a esto, se han buscado alternativas más amigables con el medio ambiente que sean más fáciles de aplicar, que ayuden a mantener la biodiversidad y estructura de los suelos y que no presenten toxicidad ni bioacumulación. Actualmente, el uso de rizobacterias promotoras de crecimiento (PGPR) ha demostrado ser una buena opción a esto, por lo que en este trabajo se buscó aislar y purificar PGPR provenientes del Área Natural Protegida de la Sierra de los Agustinos en el estado de Guanajuato y probar su potencial en: índice de vigorosidad, en el porcentaje y reducción del tiempo de germinación de semillas de lentejas. Se obtuvieron 52 cepas bacterianas mediante diluciones seriadas de muestras de suelo y de las cuales 16 demostraron superar el porcentaje de germinación e índice de vigorosidad frente al control. Las cepas aisladas tienen un potencial como biofertilizantes en semillas de lenteja y representan una alternativa ecológica frente al uso de agroquímicos.

### INTRODUCCIÓN

Actualmente, la agricultura representa una de las actividades humanas más demandadas a nivel global, pues no solo es la principal fuente de alimentos tanto para personas como para animales destinados al consumo humano, sino que también es un promotor esencial en el crecimiento económico de los países. De acuerdo con la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER), en el 2022 se registró en México una alza del 15 por ciento en el sector agroalimentario, fortaleciendo la economía nacional y desempeñando un papel fundamental a nivel global al incrementar sus exportaciones y atracción de la inversión extranjera al país (SADER, 2022).

Sin embargo, en los últimos años la agricultura ha encontrado una creciente presión derivada por el aumento poblacional, así como los patrones insostenibles de producción y consumo global (Cuadras-Berrelleza y otros, 2022). Debido a esto, los productores han tenido que recurrir a la agricultura intensiva para poder suplir las demandas tan elevadas de alimentos en plazos límite de tiempo, afectando así la sustentabilidad y calidad de los suelos, comprometiendo sus propiedades fisicoquímicas y microbianas que le permiten ser fértil y producir productos sanos (Gomes-Zuppa de Andrade y otros, 2021).

Actualmente, la aplicación y el uso indiscriminado de agroquímicos necesarios para el control de plagas y aumento de fertilidad en los suelos ha comprometido la calidad de los ecosistemas en los que se aplica, arrastrándose a través de corrientes de agua y aire que permiten su transporte; además sus residuos llegan a ser volátiles, llegando a la atmósfera y regresando nuevamente a la tierra a otros lugares (López-Geta y otros, 2009).

Otro problema derivado de este uso son los efectos negativos que tiene en la salud humana. La exposición de los agricultores a la aplicación de agroquímicos es peligrosa para su salud en varios aspectos. Las enfermedades cardiovasculares están directamente relacionadas con esta exposición y pueden provocar infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva (ICC), accidentes

cerebrovasculares, arritmia y muerte súbita. El estrés oxidativo de estos insumos agrícolas, combinado con su transporte a través de la sangre hace que el corazón sea uno de los órganos más expuestos a los riesgos de los agroquímicos (Sekhatha y otros, 2016). Además, estudios demuestran que la prevalencia de intoxicación por organofosforados debido a la exposición creciente de agricultores a agroquímicos, además de bioacumulación de pesticidas en la ropa de quienes aplican el producto, inhalación y contacto directo con la piel cuando no hay un uso correcto del equipo de protección individual (Raksanam y otros, 2014) (Magauzi y otros, 2011).

Por esta razón, se han buscado alternativas que puedan remplazar a los agroquímicos, encontrándose en este campo el uso de biofertilizantes, los cuales son ecológicos, no presentan toxicidad al ambiente ni bioacumulación, son fáciles de aplicar y ayudan a mantener la biodiversidad y estructura de los suelos agrícolas (Nosheen y otros, 2021). Y es por esto por lo que se han empleado rizobacterias promotoras de crecimiento de plantas, mejor conocidas como PGPR debido al acrónimo “Plant Growth Promoting Rhizobacteria”.

Las bacterias promotoras de crecimiento son importantes en el control de enfermedades y la mejora del crecimiento en una variedad de cultivos. Los microbiomas pueden inducir resistencia en plantas a muchos de sus patógenos, mejorar las propiedades químicas del suelo y la calidad de los cultivos (Song y otros, 2015). Además, investigaciones recientes han demostrado que el manejo de las comunidades microbianas de la rizosfera ayuda en el control de las enfermedades de las plantas (Fadiji y otros, 2021). Las bacterias endofitas y rizosféricas tienen un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas y las actividades antifúngicas tanto directa como indirectamente antagonistas antifúngicos (Liu y otros, 2018).

Estas bacterias tienen mecanismos de acción que les ayudan a la promoción vegetal y que son clasificados en directos e indirectos. En el primero, los mecanismos más destacados son: la fijación del nitrógeno, síntesis de fitohormonas, vitaminas y enzimas, solubilización de fósforo inorgánico y mineralización de fosfato orgánico, oxidación de sulfuros y la actividad de la enzima ACC desaminasa (Reséndez y otros, 2018), la cual disminuye los niveles de etileno en la planta metabolizando su precursor en una fuente de carbono y nitrógeno para utilizarlo como fuente de alimento (Shen y otros, 2012).

Se le conoce como Áreas Naturales Protegidas (ANP) a aquellos suelos que no han sido alterados por el hombre ni han sido comprometidas sus propiedades fisicoquímicas por acciones antropogénicas, conservando intactas las comunidades de microorganismos que la habitan y los cuales desarrollan diversas funciones importantes que influyen en la calidad y salud del suelo y los ecosistemas, tales como la degradación de materia orgánica, reciclado y disponibilidad de nutrientes, formar asociaciones simbióticas con plantas, mejorar su tasa fotosintética, desarrollar defensas contra fitopatógenos, entre otras cosas (Gómez y otros, 2021).

La Sierra de los Agustinos, localizada en el estado de Guanajuato entre los municipios de Jerécuaro, Tarimoro y Acámbaro, es una ANP en la categoría de área de uso sustentable que, de acuerdo con la Secretaría de Medio Ambiente y Ordenamiento Territorial (SMAOT) es una importante habitat para la flora y fauna silvestre del estado, albergando 58 especies en estatus de protección y/o endémicas.

Las PGPR generalmente abundan en suelos de las ANP debido a que son ambientes originales que no han sido alterados por actividades humanas o que requieren ser preservadas y/o restauradas (Mosqueda-Arreguin y otros, 2018). En el presente trabajo, se utilizaron PGPR provenientes de un área natural protegida del estado de Guanajuato para evaluar su capacidad para incrementar el porcentaje de germinación y el índice de vigorosidad en semillas de lenteja.

## PARTE EXPERIMENTAL

El presente estudio se realizó en el laboratorio de investigación de la Universidad de Guanajuato, Campus Celaya-Salvatierra de la sede Mutualismo.

### *Muestreo del suelo*

Se obtuvieron muestras de suelo recuperadas de la zona radical de árboles de encino pertenecientes

al ANP "Sierra de los Agustinos" del estado de Guanajuato (20°13'24.2"N 100°42'29.1"W), de las cuales se obtuvieron un kilogramo de suelo de seis puntos diferentes de tres árboles separados entre sí y que presentaban buena salud y vigorosidad. La muestra se extrajo escarbando a partir de diez centímetros de la base del tronco y se guardaron en bolsas de plástico para su traslado.

#### *Aislamiento, purificación y actividad de AAC desaminasa*

Las muestras de suelo se dejaron secar y posteriormente se redujeron de tamaño con la ayuda de los tamices No. 14 y 20, lo que permitió retirar restos de hojarasca, raíces y piedras. Posteriormente, se prepararon tres diluciones con 90 mL de agua estéril a las que se le añadieron 10 gr del suelo, se agitaron a 240 rpm durante 2 hrs y se dejaron sedimentar por media hora. Se prepararon 500 mL del medio selectivo Dworkin-Foster modificado por Penrose y Glick (Penrose y otros, 2001) con ACC, el cual contiene para un litro: 4 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 6 g de  $\text{NaHPO}_4$ , 0.2 g de  $\text{MgSO}_4$ , 1 mg de  $\text{FeSO}_4$ , 10 mg de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 10 mg de  $\text{MnSO}_4$ , 50 mg de  $\text{CuSO}_4$ , 10 mg de  $\text{MoO}_3$ , 70 mg de  $\text{MgSO}_4$ , glucosa 0.2%, ácido glucónico 0.2%, ácido cítrico 0.2%, 20 g de agar bacteriológico y 0.3 g de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). Este último se filtra por separado a través de una membrana Millipore. Para la siembra se empleó un sembrador en placa semiautomático Automatic Spiral ® Sample Plater, utilizándose 50 µl con modo exponencial. Se incubaron a 30°C por cinco días en el medio selectivo hasta que crecieron las bacterias con actividad ACC desaminasa. Estas cepas fueron recuperadas y se purificaron en medio PDA (Papa Dextrosa Agar) por estría cruzada. Finalmente, toda la colección se volvió a resembrar en el medio Dworkin-Foster para corroborar su capacidad de producir la enzima ACC desaminasa.

#### *Tinción de Gram*

Se realizó un frotis de cada aislado, colocando una asada con el inóculo sobre el portaobjetos. Una vez seco, se le agregaron unas gotas de cristal violeta y se dejó que actuara por un minuto, se escurrió el colorante y se enjuagó con agua destilada. Posteriormente, se cubrió con lugol y, esperando nuevamente un minuto, se hizo un lavado con agua para aplicar inmediatamente alcohol-acetona 1:1, deteniendo la reacción inmediatamente con agua. Finalmente, se aplicó safranina por un minuto y se escurrió lavándose con agua. Para la visualización de su morfología, se utilizó el objetivo 100X de un microscopio electrónico.

#### *Pruebas de germinación*

Se preparó por cada aislado un inóculo en 10 mL de Caldo Papa Dextrosa y se puso en agitación constante por 24 hrs a 150 rpm en 22°C. Posteriormente se lavaron 25 semillas de lenteja por cada aislado y se desinfectaron con alcohol etílico al 70% (v/v) por 20 segundos y posteriormente con agua estéril durante 30 segundos. Las semillas se embebieron con el caldo de bacterias en agitación constante por 30 minutos a 240 rpm. Una vez finalizado las semillas se llevaron a cajas Petri con papel húmedo estéril, las cuales fungieron como cámaras húmedas. Se dejaron germinar durante 7 días en un ambiente con luz óptima, con una temperatura no mayor a 30°C y se regaron cada dos días con 1.5 mL de agua.

El porcentaje de germinación fue calculado utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Germinación} = \frac{(100 \times \text{no. de semillas germinadas})}{\text{no. de semillas totales}}$$

El índice de vigorosidad fue calculado de la siguiente forma:

$$\text{Índice de vigorosidad} = \text{promedio de la longitud de las plantulas} \times \% \text{ Germinación}$$

Una vez evaluadas todas las cepas, se realizó un promedio junto con los controles para repetir el experimento con los mejores resultados, tomando esta vez 50 semillas en lugar de 25. La medición de las plántulas fue medida con software de procesamiento de imagen ImageJ.

**RESULTADOS**

Se obtuvieron un total de 52 cepas que demostraron poseer actividad de la enzima ACC desaminasa, de las cuales 26 presentaron un crecimiento de biomasa superior al resto. En la Figura 1 se observa la comparación entre la actividad enzimática de cada aislado:

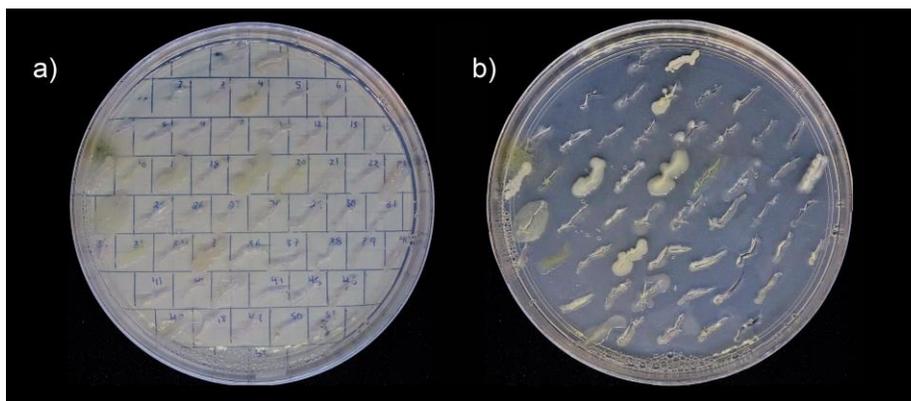


Figura 4. Aislados con producción de la enzima ACC desaminasa. En a) se observa la numeración y posición de cada cepa y en b) la biomasa producida.

Además, gracias a la tinción de Gram, se pudo determinar su morfología, obteniendo 26 aislados Gram positivo y 26 Gram negativo, encontrándose que la mayoría de las bacterias son de tipo bacilo, como se observa en la Figura 2. En la Tabla 1 se observan los resultados de la tinción de Gram:

Tabla 4.11.1 Características de los aislados observadas mediante tinción de Gram

Gram +				Gram -			
Cepa	Morfología	Cepa	Morfología	Cepa	Morfología	Cepa	Morfología
400	Bacilos	420	Bacilos	402	Bacilos	436	Diplobacilos
401	Bacilos	421	Bacilos	408	Bacilos	438	Cocos
403	Cocos	422	Cocos	413	Bacilos	439	Diplobacilos
404	Cocos	423	Cocos	415	Bacilos	440	Diplobacilos
405	Bacilos	424	Bacilos	417	Bacilos	441	Bacilos
406	Bacilos	426	Bacilos	418	Cocos	442	Diplobacilos
407	Cocos	427	Cocos	419	Bacilos	444	Bacilos
409	Bacilos	430	Bacilos	425	Bacilos	445	Diplobacilos
410	Bacilos	431	Bacilos	428	Bacilos	446	Bacilos
411	Cocos	435	Bacilos	429	Diplobacilos	447	Cocos
412	Cocos	437	Bacilos	432	Diplobacilos	448	Bacilos
414	Cocos	443	Cocos	433	Bacilos	449	Bacilos
416	Bacilos	451	Bacilos	434	Diplobacilos	450	Bacilos

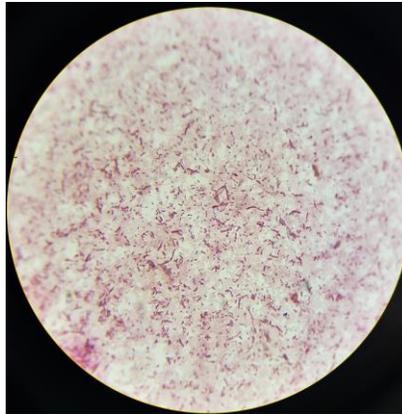


Figura 5 Muestra de bacteria Gram negativo de tipo bacilo (cepa 413).

La promoción de crecimiento en plantas mostró que 30 de 52 aislados tuvieron un mayor porcentaje de germinación respecto al control, la cual tuvo una germinación del 33%. Por otro lado, las 30 cepas antes mencionadas tuvieron una germinación arriba del 36%. Sin embargo, solo 27 aislados pudieron superar al índice de vigorosidad que reportaba el control. En el Gráfico 1 se presentan los resultados de esta prueba.

En la segunda prueba de germinación, se tomaron las cepas que destararon en el porcentaje de germinación e índice de vigorosidad, siendo 27 cepas las seleccionadas. De estas, solo 16 lograron superar el porcentaje de germinación del control, el cual era de 44%, obteniendo estos una germinación arriba del 46%. En este prueba se destaca por sobre todas las demás la cepa 413, tanto en sus valores de germinación como en el índice de vigorosidad. En el Gráfico 2 se presentan los resultados de estas pruebas.

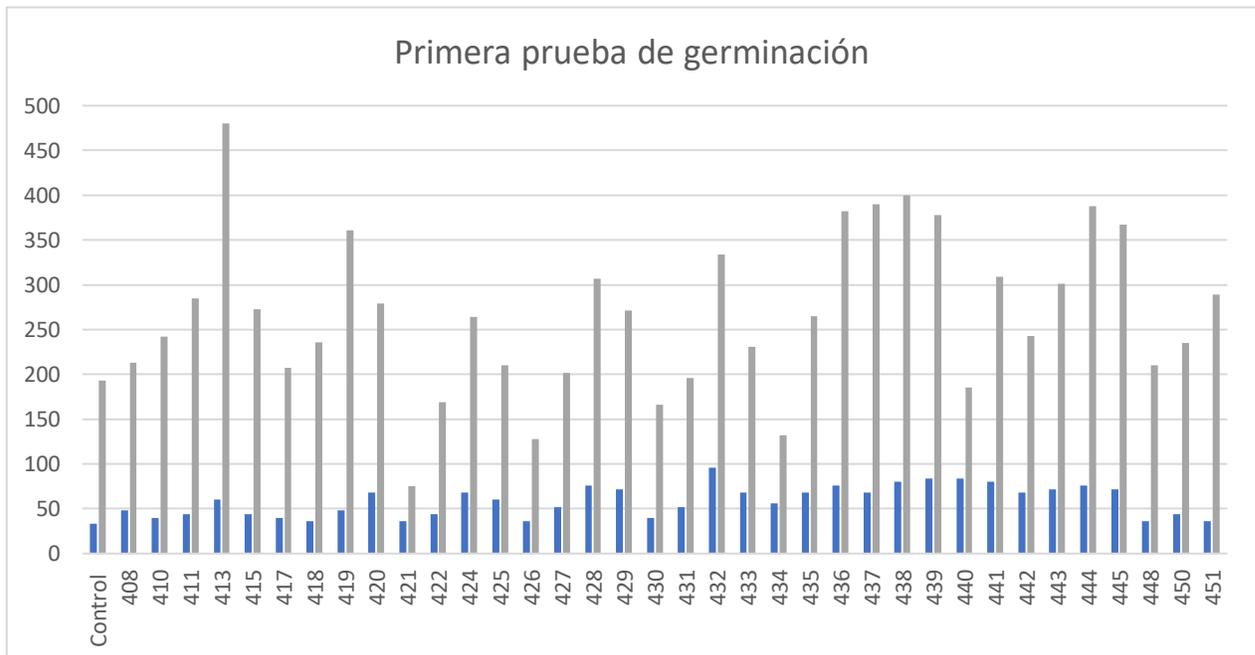


Gráfico 1 Resultados de las mejores cepas de la *primera* prueba, en donde las gráficas de color azul representan el porcentaje de germinación y las gráficas de color verde el índice de vigorosidad.

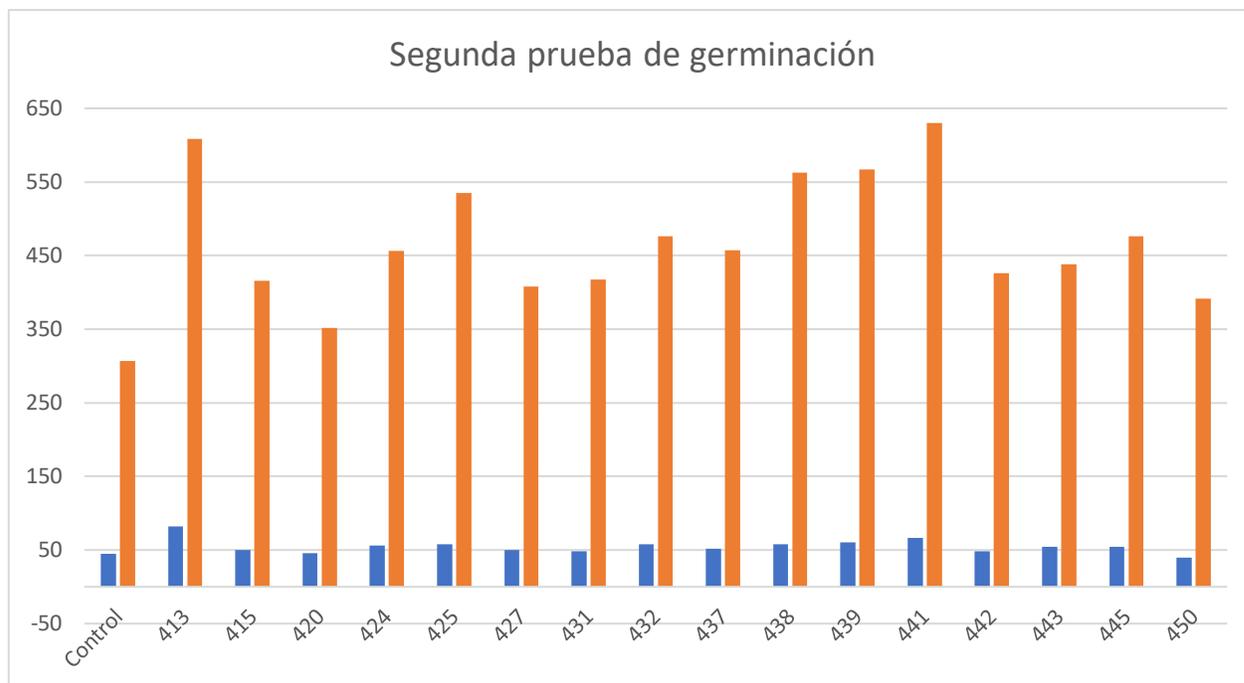


Gráfico 2 Resultados de las mejores cepas de la segunda prueba, en donde las gráficas de color azul representan el porcentaje de germinación y las gráficas de color rojo el índice de vigorosidad.

Otra característica importante fue la presencia de pelos radiculares en las cepas con mejores índices de vigorosidad, así como una mayor extensión en el área radicular. En la Figura 3 se presentan algunos ejemplos de estas características.

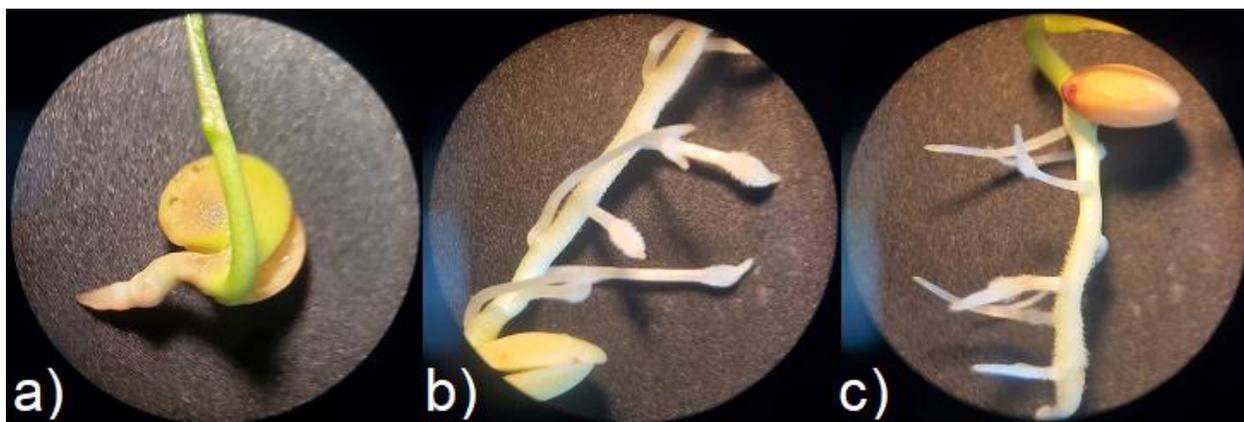


Figura 6 Fotografías del tallo y área radicular de: a) Control, b) cepa 413 y c) cepa 441. Nótese que en b) y c) se observa la presencia de pelos radiculares, así como una mayor longitud en la radícula.

**CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos en este trabajo nos indican que la aplicación de bacterias provenientes de Áreas Naturales Protegidas en semilla de lentejas puede poseer un potencial biotecnológico beneficioso al aumentar el porcentaje de germinación, vigorosidad en plántulas, longitud del tallo y desarrollo de pelos radiculares, los cuales aumentan el área de espacio para la toma de agua y nutrientes del suelo.

Asimismo, nos demuestran la importancia del mantenimiento y conservación de los microbiomas originarios de Áreas Naturales Protegidas, ya que estos pueden llegar a ser una pieza clave para la

formulación de alternativa a los fertilizantes químicos y que sean más amigables con el medio ambiente y la salud de las personas.

## BIBLIOGRAFÍA

Cuadras-Berrelleza, A. A., Peinado-Guevara, V. M., López-López, J. J., & Herrera-Barrientos, J. (2022). Agricultura intensiva y calidad de suelos: retos para el desarrollo sustentable en Sinaloa. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 12(8), 1401-1414.

Fadiji, A. E., Kanu, J. O., & Babalola, O. O. (2021). Metagenomic profiling of rhizosphere microbial community structure and diversity associated with maize plant as affected by cropping systems. *International Microbiology*, 24, 325–335.

Gomes-Zuppa de Andrade, V. H., Redmile-Gordon, M., Groenner-Barbosa, B. H., Dini-Andreote, F., Wurdig-Roesch, L. F., & Satler-Pylro, V. (2021). Artificially intelligent soil quality and health indices for 'next generation' food production systems. *Trends in Food Science & Technology*, 195-200.

Gómez, B. E., Mejía, L., & Ruíz, G. (2021). Bacterias benéficas del suelo para proteger y recuperar áreas naturales protegidas. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 25(74), 43-47.

Liu, K., McInroy, J. A., Hu, C. H., & Kloepper, J. W. (2018). Mixtures of Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria Enhance Biological Control of Multiple Plant Diseases and Plant-Growth Promotion in the Presence of Pathogens. *Plant disease*, 102, 57-72.

López-Geta, J. A., Martínez-Navarrete, C., Moreno-Merino, L., & Navarrete-Martínez, P. (2009). Las aguas subterráneas y los plaguicidas. España: Instituto Geológico y Minero de España.

Magauzi, R., Mabaera, B., Rusakaniko, S., Chimusoro, A., Ndlovu, N., Tshimanga, M., Shambira, G., Shambira, A., & Gombe, N. (2011). Health effects of agrochemicals among farm workers in commercial farms of Kwekwe district, Zimbabwe. *The Pan African medical journal*.

Mosqueda-Arreguin, N. G., Gómez-Luna, B. E., & Díaz-Pérez, C. (2018). BACTERIAS DEL SUELO CON POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO EN PLANTAS. *Jovenes en la Ciencia*, 4(1), 1160-1163.

Nosheen, N., Ajmal, I., & Song, Y. (2021). Microbes as Biofertilizers, a Potential Approach for Sustainable Crop Production. *Sustainability*.

Penrose, D. M., Moffatt, B. A., & Glick, B. R. (2001). Determination of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) to assess the effects of ACC deaminase-containing bacteria on roots of canola seedlings. *Canadian journal of microbiology*, 47(1), 77-80.

Raksanam, B., Taneepanichskul, S., Robson, M. G., & Siriwong, W. (2014). Health risk behaviors associated with agrochemical exposure among rice farmers in a rural community, Thailand: a community-based ethnography. *Asia-Pacific journal of public health*, 588–595.

Reséndez, A., Mendoza, V., Carrillo, J., Arroyo, J., & Ríos, P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1), 68-83.

SADER. (2022). El sector agrícola mexicano en cifras: avances, retos y oportunidades del T-MEC. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural.

Sekhotha, M. M., Monyeki, K. D., & Sibuyi, M. E. (2016). Exposure to Agrochemicals and Cardiovascular Disease: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 1-12.

Shen, M., Kang, Y., Wang, H., Zhang, X. S., & Zhao, Q. X. (2012). Effect of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPRs) on plant growth, yield, and quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) under simulated seawater irrigation. *The Journal of general and applied microbiology*, 58(4), 253–262.

Song, X., Liu, M., Wu, D., Griffiths, B. S., Jiao, J., Li, H., & Hu, F. (2015). Interaction matters: Synergy between vermicompost and PGPR agents improves soil quality, crop quality and crop yield in the field. *Applied Soil Ecology*, 89, 25-34.

## Caracterización cualitativa de aislados bacterianos de suelo de la Sierra de los Agustinos

Lucero Alejandra Gonzalez Tejeda<sup>1</sup>, Cesar Díaz Pérez<sup>1</sup>, Rafael Alejandro Veloz García<sup>1</sup> y Blanca Estela Gómez Luna<sup>1</sup>

<sup>1</sup>División de Ciencias de la Salud e Ingenierías. Campus Celaya-Salvatierra. Universidad de Guanajuato  
la.gonzaleztejeda@ugto.mx<sup>1</sup>

### Resumen

En la actualidad, el uso de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal ha surgido como una alternativa para la aplicación de agroquímicos como biofertilizantes, aumentando la salud y productividad de los cultivos y disminuyendo el impacto ecológico en el suelo. No obstante, estos beneficios pueden verse afectados si las plantas no son capaces de resistir las condiciones ambientales y ecológicas de las regiones en las que se aplican. Debido a esto, las rizobacterias inducen el crecimiento y protección de la planta a través de diferentes mecanismos de acción como los mecanismos directos e indirectos, los cuales incrementan la disponibilidad de nutrientes, generan fitohormonas y reducen las enfermedades. En este trabajo, se evaluó la capacidad de producir sideróforos y ACC desaminasa en 52 cepas obtenidas del Área Natural Protegida “Sierra de los Agustinos”, de las cuales 35 pueden producir sideróforos y todas las cepas presentan actividad de ACC desaminasa. Estos aislados pueden ser utilizados en la formulación de biofertilizantes.

**Palabras clave:** rizobacterias; biofertilizantes; sideróforos.

### Introducción

Actualmente, una de las problemáticas más importantes a nivel global es la disminución en los rendimientos de sistemas agrícolas, ya que de estos dependen la alimentación y el sustento económico de un gran número de países. Aunado a esto, el desgaste provocado por la agricultura intensiva y la aplicación desmedida de agroquímicos ha comenzado a comprometer la calidad de los ecosistemas, afectando la sustentabilidad y calidad de los suelos. Es por esto por lo que desde los últimos años se han estado desarrollando estrategias que permitan aumentar estos rendimientos a través de tecnologías ecológicas. Entre estos, destaca el uso de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés) como biofertilizantes, siendo estos una alternativa para la sustitución parcial o total de los fertilizantes minerales (**Grageda y otros, 2018**). Las rizobacterias inducen el crecimiento de las plantas y las protegen contra patógenos a través de mecanismos. Los mecanismos directos ayudan a mejorar la disponibilidad de nutrientes en el suelo a través de la solubilización de minerales o a la producción de fitohormonas y los mecanismos de acción indirectos ayudan a la reducción de enfermedades a través de la producción de compuestos y a la estimulación de mecanismos de resistencia (**Delgado y otros, 2021**).

Enzimas como la 1-aminociclopropano-1-carboxilo, también conocida como ACC desaminasa, desempeña un papel en la regulación del etileno, el cual es una fitohormona gaseosa que se produce en la mayoría de las plantas y que media una amplia gama de respuestas y procesos de desarrollo, teniendo efectos estimulantes o inhibitorios sobre el crecimiento vegetal de acuerdo con sus concentraciones. Las PGPR son capaces de hidrolizar el ACC en  $\alpha$ -cetobutirato y amoníaco, los cuales son compuestos más amigables para la planta y que ayudan a promover el crecimiento de las raíces (**Sher y otros, 2021**).

Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular y que contienen grupos como hidroxamatos y catecoles capaces de unir el hierro de manera reversible. Son secretados por las bacterias afectando la competitividad del suelo, pues inhiben el crecimiento de otros microorganismos gracias a su acción antimicrobiana, constituyendo así además un mecanismo de defensa frente al estrés abiótico (**Benjumeda, 2017**). El objetivo de este trabajo fue utilizar rizobacterias provenientes de una Área Natural Protegida (ANP) del estado de Guanajuato para evaluar su producción de sideróforos y ACC desaminasa.

## Metodología

Se trabajó con una colección de 52 cepas bacterianas recolectadas de suelo del ANP Sierra de los Agustinos (20°13'24.2"N 100°42'29.1"W). Para determinar cualitativamente la producción de ACC desaminasa, se utilizó el medio selectivo Dworkin-Foster modificado por Penrose y Glick (**Penrose y otros, 2001**). Toda la colección se resembró en el medio Dworkin-Foster mediante estría en diagonal y las placas resultantes se incubaron a 30°C por siete días para observar el crecimiento de la biomasa bacteriana y verificar su capacidad de sintetizar ACC desaminasa. Esta metodología se realizó por triplicado.

Para la evaluación cualitativa de la producción de sideróforos, se utilizó la metodología descrita por Schwyn y Neilands para la preparación el medio CAS (**Schwyn & Neilands, 1987**). Los aislados bacterianos se sembraron por punción y las placas se incubaron a 30°C en oscuridad por siete días. Se realizaron triplicados y el cambio de coloración del medio a amarillo indica un resultado positivo. Se utilizó un vernier para medir la longitud de los halos producidos.

## Resultados y discusión

El cambio de color del medio azul (#28667d por su código en hexadecimal) a amarillo (#d6d24d) es un indicativo de producción de sideróforos por los aislados bacterianos, debido a la eliminación del hierro presente en el medio por los sideróforos. Este cambio ocurrido en las cepas productoras de hidroxamatos provoca cambio en la coloración azul a un naranja-rojo (**Pérez-Miranda y otros, 2007**). Asimismo, se observó un incremento proporcional de la biomasa bacteriana respecto al diámetro de los halos, siendo 35 cepas las que destacan en este apartado (Figura 1.a-c).

Para la producción de ACC desaminasa, se observa un crecimiento positivo de toda la colección, visualmente fácil de distinguir debido al color transparente del medio selectivo y en el cual se observan las cepas con mayor producción de biomasa bacteriana (Figura 1.d). De estos aislados, destacan 5 cepas (401, 404, 417, 421 y 423) por encima del resto de la colección, pues éstas presentan una alta producción de biomasa bacteriana y sus halos formados tienen un diámetro mayor a 1 cm. La presencia de la enzima ACC desaminasa en plantas favorece la tolerancia de estrés provocado por sequía, anegación, salinidad y presencia de metales pesados (**Luna-Martínez y otros, 2013**).

En la Tabla 1 se muestra el diámetro de las colonias y el halo para la producción de sideróforos y la biomasa para la producción de ACC desaminasa.

**Tabla 1. Análisis de las pruebas de producción de sideróforos y ACC desaminasa. Fuente: elaboración propia.**

Cepa	Producción de sideróforos		Producción de ACC desaminasa
	Diámetro de la colonia (cm)	Diámetro del halo (cm)	
400	1.167 ± 0.06	1.643 ± 0.07	*
401	1.117 ± 0.09	1.494 ± 0.09	**
402	S/P	S/P	*
403	1.777 ± 0.07	1.953 ± 0.03	*
404	1.380 ± 0.09	1.851 ± 0.13	**
405	1.111 ± 0.14	1.243 ± 0.06	*
406	1.521 ± 0.18	1.762 ± 0.05	*
407	0.614 ± 0.3	1.049 ± 0.04	*
408	0.461 ± 0.14	0.711 ± 0.05	*
409	1.346 ± 0.31	1.649 ± 0.08	*



410	1.860 ± 0.13	2.091 ± 0.12	*
411	S/P	S/P	*
412	2.132 ± 0.13	2.324 ± 0.25	*
413	0.518 ± 0.03	0.620 ± 0.03	*
414	1.820 ± 0.06	2.275 ± 0.25	*
415	0.517 ± 0.05	0.708 ± 0.09	**
416	0.391 ± 0.04	0.486 ± 0.06	*
417	1.222 ± 0.08	1.368 ± 0.05	**
418	0.347 ± 0.03	0.594 ± 0.04	*
419	S/P	S/P	**
420	S/P	S/P	*
421	2.011 ± 0.03	2.475 ± 0.23	**
422	0.278 ± 0.03	0.497 ± 0.05	*
423	0.887 ± 0.07	1.013 ± 0.03	**
424	0.520 ± 0.04	0.635 ± 0.05	**
425	S/P	S/P	*
426	1.577 ± 0.06	1.961 ± 0.05	*
427	1.769 ± 0.11	1.648 ± 0.16	*
428	1.135 ± 0.07	1.397 ± 0.02	*
429	S/P	S/P	*
430	S/P	S/P	*
431	1.552 ± 0.16	1.654 ± 0.09	*
432	S/P	S/P	*
433	S/P	S/P	*
434	0.483 ± 0.03	0.637 ± 0.04	*
435	0.683 ± 0.02	0.919 ± 0.03	**
436	S/P	S/P	*
437	S/P	S/P	*
438	0.585 ± 0.02	0.969 ± 0.03	*
439	S/P	S/P	*
440	1.747 ± 0.1	2.022 ± 0.21	*
441	0.939 ± 0.06	1.251 ± 0.05	*
442	S/P	S/P	*
443	S/P	S/P	**



444	0.189 ± 0.09	0.280 ± 0.03	*
445	1.044 ± 0.11	1.151 ± 0.06	*
446	1.026 ± 0.05	1.330 ± 0.08	*
447	S/P	S/P	**
448	S/P	S/P	*
449	S/P	S/P	**
450	1.795 ± 0.09	2.289 ± 0.23	*
451	1.609 ± 0.11	2.211 ± 0.17	*

S/P: Sin presencia; \*: Producción media de biomasa; \*\*: Producción alta de biomasa.

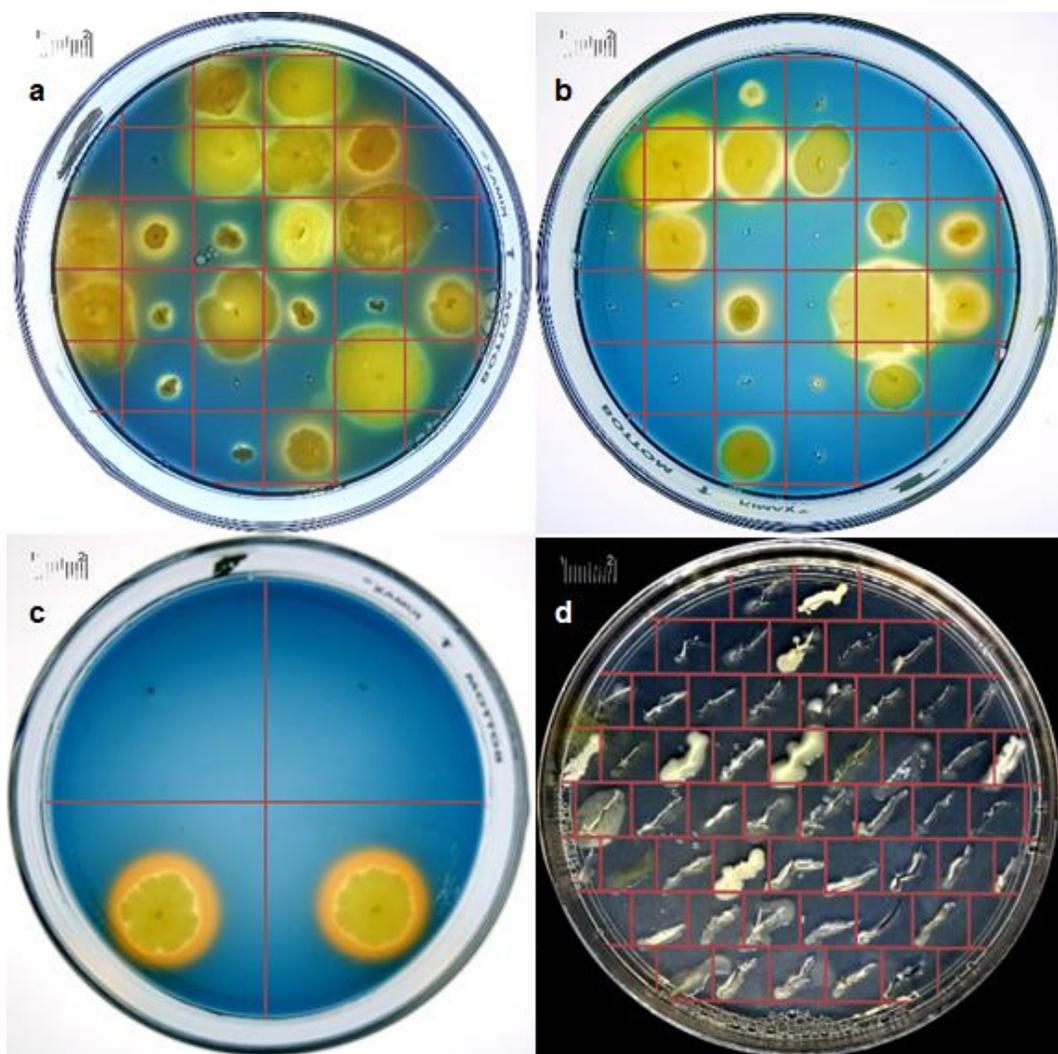


Figura 1. De izquierda a derecha y de arriba hacia abajo: Producción de sideróforos a) cepa 400 a la 423, b) cepa 424 a la 447, c) cepa 448 a la 451; Producción de ACC desaminasa d) cepa 400 a la 451. Fuente: elaboración propia.

## Conclusiones

La capacidad de producción de sideróforos y ACC desaminasa está presente la gran mayoría de la colección obtenida de las Sierra de los Agustinos, destacando de ésta 5 cepas con una amplia producción de dichos compuestos. Estos aislados bacterianos puede poseer un potencial biotecnológico beneficioso en la aplicación de cultivos con dificultades de asimilar hierro y/o en su regulación de etileno, así como ser pieza clave para la formulación de alternativa a los fertilizantes químicos.

## Agradecimientos

Este trabajo fue posible gracias a la Universidad de Guanajuato, la cual prestó sus instalaciones, equipos para el desarrollo de esta investigación, además de una beca de investigación otorgada.

## Referencias

Benjumeda, D. (2017). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: Mecanismos y aplicaciones [Trabajo de Fin de Grado en Farmacia]. Universidad de Sevilla.

Delgado, C. S., Hernández, R., & Sepúlveda, E. (2021). Rhizobacteria Associated with a Native Solanaceae Promote Plant Growth and Decrease the Effects of *Fusarium oxysporum* in Tomato. *Agronomy*, 11(3), 579. <https://doi.org/doi.org/10.3390/agronomy11030579>

Grageda, O. A., Díaz, A., Peña, J. J., & Vera, J. A. (2012). Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3(6), 1261-1274. <https://doi.org/10.29312/remexca.v3i6.1376>.

Luna-Martínez, L., Martínez-Peniche, R. A., Hernández-Iturriaga, M., Arvizu-Medrano, S. F., & Pacheco-Aguilar, J. R. (2013). Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(1), 63-69. <https://doi.org/10.35196/rfm.2013.1.63>

Penrose, D. M., Moffatt, B. A., & Glick, B. R. (2001). Determination of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) to assess the effects of ACC deaminase-containing bacteria on roots of canola seedlings. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(1), 77-80. <https://doi.org/10.1139/w00-128>

Pérez-Miranda, S., Cabirol, N., George-Téllez, R., Zamudio-Rivera, L. S., & Fernández, F. J. (2007). O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of Microbiological Methods*, 70(1), 127-131. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.03.023>

Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal CAS assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1), 47-56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)

Sher, M. S., Muhammad, S. A., Muhammad, R., Zafar, I., & Muhammad, A. (2013). PGPR with varied ACC-deaminase activity induced different growth and yield response in maize (*Zea mays* L.) under fertilized conditions. *European Journal of Soil Biology*, 57, 27-34. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.ejsobi.2013.04.002>

