



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

Facultad de Químico Farmacobiología

**Programa institucional de
doctorado en ciencias biológicas**

**“Elaboración de un inoculante sólido en biopelícula de
actinobacterias promotoras del crecimiento vegetal,
aisladas de rizósfera de *Persea americana*”**

TESIS

Para Obtener el Grado de
Doctor en Ciencias Biológicas

Opción: Biotecnología alimentaria

PRESENTA:

M.C. Karla Gabriela Domínguez González

Director: D.C. Héctor Eduardo Martínez Flores

Comité tutorial

D.C. Raúl Cortés Martínez (Co-Director). QFB-UMSNH

D.C. Juan José Valdes Alarcón. FMVZ-UMSNH

D.C. Ma. Guadalupe Garnica Romo. FIC-UMSNH

D.C. Jorge Francisco Cerna Cortés ENCB-IPN

Morelia, Michoacán. Enero de 2023

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Este trabajo fue posible gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) becario N° 711646 y de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH.

Agradezco a los productores de aguacate orgánico que a través de la Junta Local de Sanidad Vegetal Uruapan y a su coordinador en turno el Ing. Andrés Ciprés Torres me dieron las facilidades para llevar a cabo los muestreos y obtención de materiales base de este proyecto.

A los Doctores que forman parte de mi comité porque de cada uno de ellos recibí lecciones de formación y apoyo, además de aportación de su valioso conocimiento en las respectivas áreas de su expertis.

Al doctor Orlando Hernández en quien además de un experto, encontré un fiel y maravilloso amigo, tu apoyo fue crucial.

Al Dr. Horacio Sandoval, quién inspiro éste trabajo, por su apoyo, gracias.

A mis tesisas, chicos de servicio social y amigos, ya que sin ustedes este proyecto no estaría terminado al día de hoy, gracias por creer en mí.

A Ivar Rodrigo, tu apoyo e impulso en toda esta etapa hizo que esto fuera posible.

A mi amigo Jorge García, tu apoyo fue crucial.

CONTENIDO

INDICE GENERAL

	Página
1. Resumen general	11
Abstract	12
2. Justificación	13
3. Hipótesis	13
4. Objetivo General	13
4.1. Objetivos particulares	14
5. Diagrama metodológico	15
CAPÍTULO I.	
Muestreo, aislamiento, selección e identificación de aislados de actinobacterias de rizósfera de <i>Persea americana</i>	
1. Resumen	16
Abstract	17
2. Introducción	18
3. Materiales y métodos	23
3.1. Muestreo	23
3.2. Procesamiento de las muestras de rizósfera	24
3.3. Conservación de microorganismos	26
3.4. Extracción de ADN genómico	26
3.4.1. Calidad y pureza del ADN para análisis de PCR	28
3.4.2. Ensayo de PCR	28
3.5. Amplificación y purificación	28
3.6. Secuenciación e identificación	29
4. Resultados y discusión	29
4.1. Muestreo	29
4.2. Procesamiento de las muestras de rizósfera	32
4.3. Conservación de microorganismos	40

4.4. Extracción de ADN genómico	40
4.4.1. Calidad e idoneidad del ADN para análisis de PCR	40
4.5. Amplificación y purificación	49
4.6. Secuenciación e identificación	51
5. Conclusión	54
Referencias	55
CAPÍTULO II.	
Ensayos de formación de biopelículas	
1. Resumen	60
Abstract	61
2. Introducción	62
3. Materiales y métodos	65
3.1. Pruebas de formación de biopelícula y colonización	65
3.1.1. Pruebas de cristal violeta (CV)	65
3.1.2. Desplazamiento o Sliding Test (ST)	6.6
3.1.3. Agar Rojo Congo (RC)	67
3.2. Análisis estadístico	68
4. Resultados y discusión	69
4.1. Pruebas de formación de biopelícula y colonización	69
4.1.1. Pruebas de cristal violeta (CV)	69
4.1.2. Desplazamiento o Sliding Test (ST)	75
4.1.3. Agar Rojo Congo (RC)	79
5. Conclusión	83
Referencias	84
CAPÍTULO III.	
Pruebas de promoción del crecimiento vegetal	
1. Resumen	87
Abstract	88

2. Introducción	89
3. Materiales y métodos	96
3.1. Reto planta microorganismo	96
3.2. Ensayos de promoción del crecimiento vegetal	97
3.2.1. Actividad solubilizadora de fosfatos	97
3.2.2. Producción de AIA	97
3.2.3. Crecimiento de aislados en medio libre de nitrógeno	98
3.2.4. Producción de sideróforos	99
3.3. Análisis estadístico	100
4. Resultados y discusión	100
4.1. Reto planta microorganismo	100
4.2. Ensayos de promoción del crecimiento vegetal	109
4.2.1. Actividad solubilizadora de fosfatos	109
4.2.2. Producción de AIA	114
4.2.3. Crecimiento de aislados en medio libre de nitrógeno	116
4.2.4. Producción de sideróforos	119
5. Conclusión	127
Referencias	129
CAPÍTULO IV.	
Elaboración del bio-inoculante en biopelícula y pruebas de invernadero	
1. Resumen	136
Abstract	137
2. Introducción	138
3. Materiales y métodos	143
3.1. Formación de biopelícula sobre perlita mineral como vehículo	143
3.2. Bio-inoculante en biopelícula: pruebas de invernadero	144
3.2.1. Suelo y biocarbón	144

3.2.2. Ensayo del inoculante en biopelícula en maceta	145
3.3. Análisis y discusión	147
4. Resultados y discusión	147
4.1. Formación de biopelícula sobre perlita mineral como vehículo	147
4.2. Bio-inoculante en biopelícula: prueba de invernadero	154
4.2.1. Suelo y biocarbón	154
4.2.2. Ensayo del inoculante en biopelícula en maceta	161
5. Conclusión	187
Referencias	188

INDICE DE TABLAS

	Página
CAPÍTULO I.	
Muestreo, aislamiento, selección e identificación de aislados de actinobacterias de rizósfera de <i>Persea americana</i>	
1. Consideración de datos de las unidades de producción para muestreo	31
2. Valores de pH de las muestras de suelo	33
3. Tratamiento de descontaminación de suelo para asilamientos de Actinobacterias	35
4. Rendimiento y pureza de ADN de cultivo líquido usando el protocolo 4	44
5. Rendimiento y pureza de ADN de cultivo sólido usando el protocolo 4	44
6. Calidad del ADN para PCR de Actinobacterias extraído del protocolo 4	47
7. Identificación de aislados de actinobacterias (ARI) basado en la secuencia parcial de 1,500 pb de gen 16S rDNA.	52
CAPÍTULO II.	
Ensayos de formación de biopelículas	
1. Selección de actinobacterias (ARI) a 25 y 30 °C con respecto al control con el método de CV	75

2. Prueba de desplazamiento de cepas en mm de actinobacterias (ARI) al día 14 a 25 °C.	77
3. Prueba de desplazamiento en mm de las cepas de actinobacterias (ARI) al día 14 a 30 °C	78
4. Clasificación de cepas de actinobacterias (ARI) según su producción de biopelícula RC	81
5. Coincidencias de cepas de actinobacterias (ARI), resultados sobresalientes en formación de biopelícula	82
 CAPÍTULO III.	
Pruebas de promoción del crecimiento vegetal	
1. Resultados de pH del grupo de actinobacterias (ARI) en caldo NBRIP para solubilización de fosfatos	109
2. Resultados de solubilización de fosfatos (PO_4^{3-}) de las cepas de actinobacterias (ARI)	112
3. Resultados en $\mu\text{g/mL}$ de AIA de cepas de actinobacterias (ARI)	115
4. Prueba de fijación de Nitrógeno de las cepas de actinobacterias (ARI)	118
5. Resultados de la producción de sideróforos de las cepas de actinobacterias (ARI)	121
6. Sideróforos contra hongos fitopatógenos	123
7. Ensayos de promoción del crecimiento vegetal de las cepas de actinobacterias (ARI)	126
 CAPÍTULO IV.	
Elaboración del bio-inoculante en biopelícula y pruebas de invernadero	
1. Tratamientos del ensayo en maceta con inoculante en biopelícula	146
2. Análisis Elemental de perlita por SEM-EDS	153
3. Análisis de suelo para el ensayo en maceta	155
4. Análisis microelemental del biocarbón por SEM-EDS	157
5. Porcentaje de PGP y comparación de medias de Tukey-Kramer y Dunnett entre los tratamientos en <i>T. aestivum</i>	167
6. Porcentaje de incremento en el crecimiento vegetal con respecto al control y análisis de medias de Tukey-Kramer y Dunnett	170
7. Dinámica de población de las cepas de actinobacteria inoculadas por tratamientos usando <i>T. aestivum</i> (Ta) and <i>V. radiata</i> (Vr) (3 réplicas por tratamiento)	175

INDICE DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO I.	
Muestreo, aislamiento, selección e identificación de aislados de actinobacterias de rizósfera de <i>Persea americana</i>	
1. Mapa satelital de ubicaciones de las huertas y sitios de muestreo	23
2. Tipos de suelo del municipio de Uruapan Michoacán	24
3. UPO de aguacate	30
4. Ensayos de descontaminación de suelos	35
5. Aislados puros de primo aislamiento de actinobacterias	37
6. Mapa de distribución del total de las UPOs muestreadas del municipio de Uruapan, Michoacán	38
7. Morfologías coloniales de aislados de actinobacterias	39
8. Protocolos	41
9. Gráficos de caja-bigotes del porcentaje de ADN en carriles de gel de electroforesis	43
10. Electroforesis de amplificación de ARNr 16s por PCR	46
11. Ejemplo de gel de electroforesis de productos de amplificación del fragmento ADNr 16S de 1,500 pb. Varios aislados	49
12. Geles de electroforesis de productos de amplificación del fragmento ADNr 16S	50
13. Ejemplo de electroferograma del gen 27F	51
14. Ejemplo de resultado de similitudes significativas en BLAST®	52
CAPÍTULO II.	
Ensayos de formación de biopelículas	
1. Método de Cristal Violeta	66
2. Colocación del inóculo en placas Petri con medio EM con Agar 0.3%	67
3. Colonias sobre medio CRA	68
4. Formación de biopelícula de las cepas de actinobacterias (ARI) al día 14 a 30 °C (CV)	70

5. Análisis de comparación de medias de Tukey-Kramer (CV). Formación de biopelícula de las cepas de actinobacterias (ARI) al día 14 a 30 °C	71
6. Formación de biopelícula de las cepas de actinobacterias (ARI) al día 14 a 25 °C (CV)	72
7. Análisis de comparación de medias de Tukey-Kramer (CV)	73
8. Ensayo de desplazamiento al día 14	76
9. Ejemplos de colonias de actinobacterias (ARI) de 14 días de crecimiento sobre medio CRA	80
CAPÍTULO III.	
Pruebas de promoción del crecimiento vegetal	
1. Mecanismos generales de transporte de Fe por microorganismos y plantas	95
2. Ensayo planta-microorganismo con <i>A. thaliana</i> DR5:GUS grupo 1 (ARI)	101
3. Reto planta-microorganismo del Grupo 1 (ARI)	103
4. Análisis de comparación de medias de Tukey-Kramer del grupo 1 (ARI), reto planta-microorganismo	104
5. Ensayo planta-microorganismo con <i>A. thaliana</i> DR5:GUS grupo 2 (ARI)	106
6. Reto planta-microorganismo del Grupo 2 (ARI)	107
7. Análisis de comparación de medias de Tukey-Kramer del grupo 1 (ARI), reto planta-microorganismo	108
8. Solubilización de fosfatos en µg/mL	111
9. Gráfico de producción de AIA en µg/mL de cepas de actinobacterias (ARI)	114
10. Pruebas de fijación de nitrógeno en medio NFB	117
11. Producción de sideróforos en µg/mL de las cepas de actinobacterias (ARI)	120
12. Efecto antagónico de los sideróforos como biocontrol	123
A1. Curva patrón de fosfatos	134
A2. Curva patrón con reactivo puro de Ácido Indol Acético Sigma Aldrich®	134
A3. Curva patrón con el sideróforo comercial DESFERAL® Sigma-Aldrich®	135

CAPÍTULO IV.

Elaboración del bio-inoculante en biopelícula y pruebas de invernadero

1. Inducción de biopelículas sobre la perlita	148
2. Formación de biopelícula sobre perlita	149
3. No formación exitosa de biopelícula sobre perlita	151
4. Micrografía de la perlita EDS-SEM	152
5. Espectro de microanálisis elemental de la perlita por SEM-EDS	153
6. Superficie porosa de perlita	153
7. Análisis de biocarbón mediante SEM	156
8. Espectro de microanálisis elemental de la biocarbón por SEM-EDS	157
9. Espectros de infrarrojo de muestras de Biochar y Biochar control	159
10. Espectros de infrarrojo de las muestras de Biochar control y T1	160
11. Comparación entre controles de <i>T. aestivum</i>	162
12. Evidencia de la altura con los tratamientos entre el bioinoculante y <i>T. aestivum</i>	163
13. Tamaños de la espiga según los tratamientos entre el bioinoculante y <i>T. aestivum</i> y con respecto a los controles	164
14. Efectos del crecimiento de <i>T. aestivum</i> en la interacción con los tratamientos del inoculante en biopelícula	165
15. Biomasa de la raíz según los tratamientos entre el bioinoculante y <i>T. aestivum</i> y con respecto a los controles	166
16. Efectos del crecimiento de <i>V. radiata</i> en la interacción con los tratamientos del inoculante en biopelícula	171
17. Biomasa de tratamientos entre el bioinoculante y <i>V. radiata</i>	172
18. Análisis de SEM del inoculante en biopelícula sobre perlitas post tratamiento en maceta	179
19. Análisis de SEM del inoculante en biopelícula sobre perlitas post tratamiento en maceta	180
20. Raíz de <i>T. aestivum</i> . Posterior desinfección	182
21. Crecimiento de actinobacterias endófitas en raíz de <i>T. aestivum</i>	184

1. RESUMEN GENERAL

Las actinobacterias se han utilizado con éxito en diversos procesos biotecnológicos; sin embargo, se sabe poco sobre su capacidad como formadoras de biopelículas y su uso como inoculantes en biopelícula. En el presente trabajo se muestra y compara la capacidad de diferentes cepas de actinobacterias para promover el crecimiento vegetal y para formar biopelículas sobre un vehículo sólido, como una ventaja para mejorar la supervivencia microbiana y colonizar con éxito la rizósfera y las raíces de plantas de interés agrícola de manera endófitas, resultando en una interacción positiva, brindando protección contra patógenos, mejor aprovechamiento de nutrientes, lo que resulta en una mejora en el crecimiento y la producción vegetal. Se prevé dar continuidad al estudio con la reintroducción de estos microorganismos a los suelos erosionados del propio cultivo y región. Se probaron 41 cepas de actinobacterias de la rizósfera de huertos orgánicos de *Persea americana* en cuanto a la capacidad de promover el crecimiento de las plantas y formar biopelículas, con la finalidad de desarrollar un inoculante en biopelícula con un potencial como biofertilizante en la agricultura. Los tratamientos elegidos para el inoculante sólido en biopelícula, tuvieron un incremento mayor a 200% en biomasa total y peso en raíz para *T. aestivum*, y mayor a un 400% en biomasa total y un incremento por encima del 1,000% peso en raíz para *V. radiata*. La colonización endófitas se logró en un 100% para el trigo y un 14% en soya. La supervivencia microbiana fue incrementada y exitosa en todos los tratamientos. El inoculante sólido en biopelícula generado en el presente trabajo es útil para la mejora del crecimiento vegetal y asegura la supervivencia microbiana por un tiempo prolongado.

Palabras clave. Actinobacteria, Actinobacteria promotora del crecimiento vegetal, Inoculante en biopelícula.

ABSTRACT

Actinobacteria have been used successfully in several biotechnological processes; nevertheless, little is known about its biofilm formation capacity and their use as biofilmed biofertilizers. In the present work, the capacity of different strains of actinobacteria to promote plant growth and biofilm formers on a solid vehicle is shown and compared, as an advantage to successfully colonize the rhizosphere and roots of the plant in an endophytic manner, which results in a positive interaction, protection against pathogens, better use of nutrients and therefore improvement in plant growth and production. It is planned to continue the study with the reintroduction of these microorganisms to the eroded soils of the crop itself and region. Forty-one actinobacteria strains from *Persea americana* rhizosphere of organic farms were tested for the ability to promote plant growth and form biofilms, with the aim of developing a biofilmed inoculant as a potential biofertilizer in agriculture. The chosen treatments for the solid inoculant in biofilm, had an increase >200% in total biomass and root weight for *T. aestivum*, and >400% in total biomass and >1,000% root weight for *V. radiata*. Endophyte colonization was achieved in 100% for wheat and 14% in soybean. Microbial survival was increased and successful in all treatments. The solid inoculant in biofilm generated in this work is useful for improving plant growth and ensures microbial survival for a long time.

Key words. Actinobacteria, Plant Growth Promoting Actinobacteria, Biofilmed inoculant.

2. JUSTIFICACIÓN

El uso de fertilizantes químicos ha mostrado ser eficiente en la producción agrícola; sin embargo, afectan el ambiente en numerosas formas, incluyendo la supresión de microorganismos autóctonos benéficos de la rizósfera, empobreciendo los suelos y disminuyendo significativamente la biodiversidad dinámica de estos microecosistemas, dejando a las plantas vulnerables al ataque de patógenos. Por lo tanto, la reintroducción de bacterias autóctonas mediante un bionoculante con estabilidad viable, provee una alternativa sustentable para incrementar la resistencia inducida a la planta, el crecimiento vegetal y la producción agrícola, así como prevenir la erosión y el empobrecimiento del suelo. Lo anterior contribuiría también a reducir costos de fertilización, con un menor impacto en el ambiente.

3. HIPÓTESIS

Un inoculante biológico elaborado con actinobacterias de rizósfera de *Persea americana* en biopelícula, sobre base de perlita y biocarbón, incrementa el crecimiento y la producción vegetal en plantas de interés agrícola.

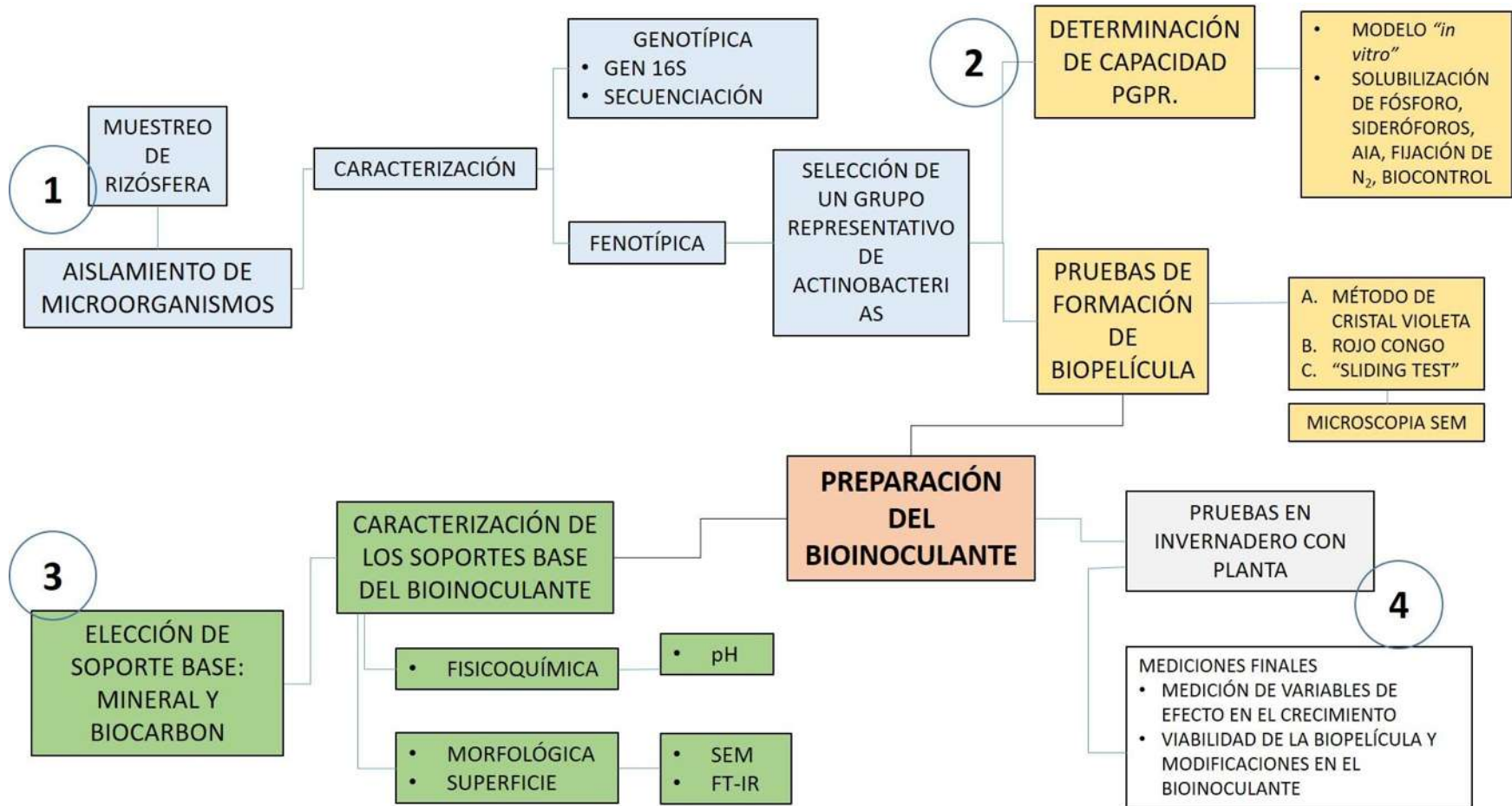
4. OBJETIVO GENERAL

Aislar, identificar y evaluar un grupo de actinobacterias autóctonas de la rizósfera de huertos orgánicos de aguacate para la elaboración de un inoculante sólido en biopelícula, que favorezca el crecimiento y la producción vegetal de plantas de interés agrícola.

4.1. Objetivos particulares

1. Identificar un grupo de actinobacterias recuperadas de rizósfera de cultivo orgánico de *Persea americana* del municipio de Uruapan, Michoacán.
2. Evaluar la capacidad como PGPR y formador de biopelícula de cepas seleccionadas de actinobacterias.
3. Evaluar la viabilidad microbiana de un bioinoculante sólido en biopelícula de actinobacterias seleccionadas, usando como vehículo un mineral y como aditivo un biocarbón.
4. Determinar el efecto que el inoculante biológico tiene sobre el crecimiento de plantas de interés agrícola.

5. DIAGRAMA METODOLÓGICO



CAPÍTULO I.

Muestreo, aislamiento, selección e identificación de aislados de actinobacterias de rizósfera de *Persea americana*

1. Resumen

El filo Actinobacteria es uno de los taxones más grandes del dominio Bacteria. Su taxonomía se basó tradicionalmente en sus complejas características morfológicas y fisiológicas, siendo necesario el uso de técnicas moleculares para identificarlas con precisión. Las actinobacterias tienen morfologías celulares particulares y una composición de la pared celular que es bastante diversa dentro del Phylum. La variabilidad de su constitución y la gran cantidad de ceras contenidas en la pared celular de las actinobacterias, hacen que la extracción de ADN sea una tarea complicada. En el presente capítulo, se expone el muestreo, aislamiento e identificación molecular de un grupo de actinobacterias aisladas de rizósfera de huertos orgánicos de *Persea americana* para la elaboración de un inoculante sólido en biopelícula, proponiendo un método de extracción de ADN rápido y eficiente para Actinobacterias a partir de una pequeña cantidad de cultivo líquido o colonias aisladas de cultivo sólido, mediante la combinación de métodos de extracción físicos y químicos. El protocolo informado mostró un alto rendimiento y calidad, y fue útil para la amplificación por PCR. Los resultados obtenidos de la secuenciación, arrojaron la identificación de los aislados de actinobacterias, pertenecientes en un 70.9% al género *Streptomyces*, 2.4% al género *Actinomycetia*, 2.4% al género *Actinobacteria* y el 24.3% no fueron identificados.

Palabras clave. Actinobacteria, identificación, extracción de ADN, microondas.

Abstract

The phylum Actinobacteria is one of the largest taxons among the Bacteria domain. Its taxonomy was traditionally based on their complex morphological and physiological characteristics, being necessary the use of molecular techniques to precisely identify them. Actinobacteria have particular cellular morphologies and cell wall composition that are quite diverse within the Phylum. The variability of its constitution and the large amount of waxes contained in the cell wall of actinobacteria, make the DNA extraction a complicated task. In this chapter, the sampling, isolation and molecular identification of a group of actinobacteria isolated from *Persea americana* rhizosphere organic farms is exposed to the elaboration of a solid biofilmed inoculant, proposing a fast and efficient DNA extraction method for Actinobacteria, from either a small amount of liquid culture or isolated colonies from solid culture, by mixing physical and chemical extraction methods. The reported protocol showed high yield and quality, and was useful for PCR amplification. The obtained results from the sequencing showed the identification of the actinobacteria isolates, belonging 70.9% to the genus *Streptomyces*, 2.4% to the genus *Actinomycetia*, 2.4% to the genus *Actinobacteria* and 24.3% were not identified.

Keywords. Actinobacteria, identification, DNA extraction, microwaves.

2. Introducción

El cultivo de *Persea americana* es el más importante en el estado de Michoacán, el cual es el primer productor a nivel nacional y en 2017 fungió como el primer productor a nivel mundial según datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SIAP de la SADER antes SAGARPA en 2020 [1]. Su importancia socio-económica ha provocado año con año el aumento de la sustitución de áreas boscosas en áreas de plantación de este fruto.

El estado de Michoacán cuenta con una superficie de 134,452.97 hectáreas y 40,637 unidades de producción registradas en 35 Juntas Locales de Sanidad Vegetal sólo para el programa de exportación; a su vez, el municipio de Uruapan, Michoacán, es una de las superficies más extensas de este cultivo y con mayor importancia socio-económica. La superficie que cubre el cultivo de *Persea americana* sólo en este municipio es de 17,407.72 hectáreas con 6,628 unidades de producción hasta diciembre del 2020, según datos del programa de exportación de Aguacate Hass de México a los Estados Unidos de América y la Junta Local de Sanidad Vegetal de Uruapan. Según datos oficiales de la misma junta, sólo 138 del total de las unidades de producción (UPO) se encuentran dentro del registro de producción orgánica según datos obtenidos de la Junta Local de Sanidad Vegetal con sede en Uruapan (JLSVU) en sus registros del 2020.

La producción orgánica de *Persea americana*, tiene un menor impacto en el cambio de la microbiota de suelo, al evitar la introducción de plaguicidas, agroquímicos, modificadores de pH y otros aditivos que puedan alterar de una manera crucial en la desaparición de algunos de los microorganismos originales de suelo (Datos obtenidos de la JLSVU, 2020).

El cambio de uso de suelo genera cambios ambientales y en la biodiversidad de la microbiota del mismo, ocasionando su empobrecimiento, por lo que el

estudio y la conservación de parte de este microbioma se hace de suma importancia [2].

El uso de los microorganismos ha sido clave en la solución de los diversos problemas que la humanidad enfrenta en áreas como la agricultura y la alimentación de los pueblos [3], esto también debido a los metabolitos secundarios que producen, y que son la fuente de material básico para la elaboración de medicamentos, agroquímicos y de biocontrol entre otros muchos usos [4].

Entre otros microorganismos de suelo, las actinobacterias se consideran las más abundantes de este micro-ecosistema, cubriendo cerca de un 90% del total de ellos. Al formar parte del sistema de descomposición del material orgánico, las actinobacterias se consideran como indicadores de fertilidad y como un elemento de la aproximación a la dinámica y funcionamiento del micro-ecosistema de la rizósfera; así, algún proceso de cambio sustancial como el cambio de uso de suelo a las condiciones originales del mismo, se considera un proceso de perturbación, alterando a las poblaciones microbianas edáficas [3,5,6].

El filo Actinobacteria es uno de los linajes taxonómicos más grandes reconocidos en el dominio Bacteria [7]. Estos filos se dividen en 6 clases: Actinobacteria, Nitrospirae, Acidimicrobiia, Coriobacteriia, Thermoleophilia y Rubrobacteria [8,9]; 46 órdenes y 79 familias sumando los nuevos propuestos por Salam *et al.* [9]. Sin embargo, la taxonomía de las actinobacterias sigue cambiando debido al continuo aislamiento de nuevas cepas y al desarrollo de técnicas moleculares más específicas [9,10].

Las actinobacterias son bacterias Gram positivas filamentosas con un alto contenido de ADN G+C (69-78%) en su genoma [11]. Las actinobacterias son tanto aerobias como anaerobias, distribuidas tanto en ecosistemas acuáticos como terrestres [10,12,13], la mayoría de ellas son parte del crecimiento de hongos, debido a sus similitudes en su ciclo de vida: germinación de una espora, que crece formando hifas ramificadas [12] para formar un micelio vegetativo que

consta de compartimentos multinucleados [10]; este micelio finalmente se diferencia en uno nuevo llamado micelio aéreo que crece en el aire, para eventualmente desarrollar estructuras esporogénicas [14,15] después de la fase de crecimiento exponencial o MII [15,16]. Los septos normalmente dividen las hifas en células largas (20 mm aprox.) que poseen muchos cromosomas bacterianos mayores de 8 Mb organizados en un nucleoide procariótico [3,17].

Las actinobacterias son microorganismos útiles para la medicina humana y veterinaria, la biotecnología y la agricultura [7,18] porque producen más de 10,000 metabolitos secundarios bioactivos, lo que representa el 45% de todos los metabolitos microbianos bioactivos descubiertos hasta la fecha [3]. Las especies de *Streptomyces* se han convertido en la principal fuente de compuestos antitumorales, inmunosupresores, antifúngicos [4], antiparasitarios y antibacterianos en la industria farmacéutica con alrededor de 7600 compuestos activos [18]. El 38% de los productos de *Actinomyces* y el 32% de los raros productos de actinobacteria tienen aplicaciones agrícolas, como actividad fitotóxica, reguladores del crecimiento vegetal, quelantes de hierro, inhibidores de la germinación, fitohormonas, inductores de la formación de micelio, agentes de control biológico, etc. [4,13,18,19].

La clase Actinobacteria presenta la mayor complejidad de la pared celular [20]. Las características más notables de las paredes celulares de las actinobacterias, con algunas excepciones [21], es la presencia de diferentes aminoácidos, isómeros del ácido diaminopimélico (DAP) en el puente tetrapeptídico del peptidoglicano [3,10,22–24]. Además, en algunos géneros, los aminoácidos como la glicina están presentes en los puentes entre péptidos en el peptidoglicano [3,22,24]. La envoltura cerosa hidrófoba se compone principalmente de proteínas chaplins (Chp) (dominio hidrófobo de aproximadamente 50 aminoácidos) y rodlin (Rdl) ancladas a la superficie de las hifas aéreas mediante heteropolimerización, y otro péptido tensioactivo hidrófobo SapB (asociado a esporas) [10,14]; que ayudan a su protección [14,25].

Los principales componentes estructurales de la membrana plasmática actinobacteriana son los glicerofosfolípidos, la membrana plasmática central está compuesta por cardiolipina, fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, fosfatidilinositol manósidos y otros lípidos abundantes como los lípidos de ornitina y menaquinonas [20,24,26]. Los géneros *Nocardia*, *Corynebacterium* y *Mycolicibacterium* (género *Mycobacterium* anteriormente) [9] forman un taxón monofilético dentro de Actinobacteria y el último género comparte una pared celular cerosa inusual que contiene ácidos micólicos y uno o varios polisacáridos [10,27,28]. La micrografía crioelectrónica de *M. smegmatis* mostró que la capa de peptidoglicano-arabinogalactano tiene un espesor de aproximadamente 7 nm [29], el peptidoglicano del género *Corynebacterium* es aproximadamente tres veces más grueso que el de *M. smegmatis* y la pared celular de peptidoglicano del género *Streptomyces* el espesor se estima en 35 nm fuera de la membrana [15,20,21,30]. Estas características particulares de las envolturas celulares hacen que la extracción de ADN sea una tarea difícil para Actinobacteria.

La taxonomía de las actinobacterias se basaba tradicionalmente en las características morfológicas de las colonias, formación de esporas, micelios, requerimientos fisiológicos de crecimiento y nutrición, producción de metabolitos, entre otros [11,24,31–35], lo que dificultó la tarea de identificación y resultó en una identificación inexacta del género o la especie [36]. Durante el último cuarto de siglo, el análisis comparativo de secuencias de semántidas genéticamente estables y homólogas ha demostrado que varias clasificaciones basadas en la morfología y la fisiología no reflejan las relaciones genéticas naturales entre actinobacterias y organismos relacionados [23,37]. Hoy en día, los taxónomos reconocen el patrón de ramificación filogenética como la solución para una verdadera clasificación, siendo necesario el uso de técnicas moleculares que requieren una adecuada calidad del ADN. Recientemente, la identificación de especies y su filogenia se derivan comúnmente de las secuencias que ofrece el gen 16S rDNA [3,38], la hibridación ADN-ADN e incluso la secuenciación del genoma completo se está volviendo rutinaria [7,9,10].

Debido a la variabilidad en la constitución de la pared celular y la gran cantidad de ceras de actinobacterias, la extracción de ADN de aislados ambientales, para estudios de poblaciones, se ha convertido en una tarea complicada. En todo el mundo, muchas empresas fabrican y patentan algunos kits de extracción especializados, como HipurA Streptomyces DNA purification Kit-MB 527-50pr (Himedia®), UltraClean™ Mega Soil DNA kit Cat. 12900-10 (Mo Bio Laboratories, Solana Beach, Calif.) o MN DNA extract kit™ (Macherey-Nagel, Düren, Alemania), eficaz, pero de acceso limitado para grupos de investigadores debido a su coste [39–41]. Por lo tanto, los laboratorios de bajos recursos continúan buscando métodos que garanticen la extracción de ADN con buena integridad y calidad, simple y de bajo costo [42], incluyendo métodos físicos como la extracción mecánica [43] o microondas [44]; métodos químicos como isotiocianato de guanidina [24,38,45], bromuro de cetiltrimetilamonio [46], o TRizol™ y DNAzol™ [42,47]; o enzimático utilizando proteinasa K [48,49]. Sin embargo, estos métodos tienen sus limitaciones debido al tiempo de procesamiento, la calidad o la cantidad del ADN obtenido.

Algunas complicaciones adicionales de los métodos actuales de extracción de ADN de actinobacterias son las grandes cantidades de cultivo líquido (superior a 100 mL), el uso de agitación orbital y el período de incubaciones entre 15 a 20 días, dependiendo del género o especie, debido a la baja tasa de crecimiento de este grupo taxonómico [38,50]. En este trabajo proponemos un método de extracción de ADN rápido y eficiente para las actinobacterias, utilizando pequeñas cantidades de cultivo líquido o colonias aisladas de cultivo sólido.

El objetivo de este capítulo fue aislar e identificar molecularmente un grupo de aislados de actinobacterias de la rizósfera de huertos orgánicos de *Persea americana*, para su posterior evaluación y selección para la elaboración de un inoculante sólido en biopelícula.

3. Materiales y Métodos

3.1. Muestreo

Se realizó un muestreo aleatorio, considerando la altitud (ms.n.m.), los cinco tipos de suelo (Figs. 1 y 2) con los que cuenta el municipio y antigüedad en el manejo del esquema orgánico. Un resumen de datos se muestra en la Tabla 1 de la sección 5.1 de resultados y discusión del presente capítulo. De 138 Unidades de producción orgánica (UPO), se seleccionaron 29 (21% del total), donde cada UPO representa a cinco de éstas [51]. Este 21% debía garantizar, además, estar libre de uso de agroquímicos que afectan directamente las condiciones del suelo.

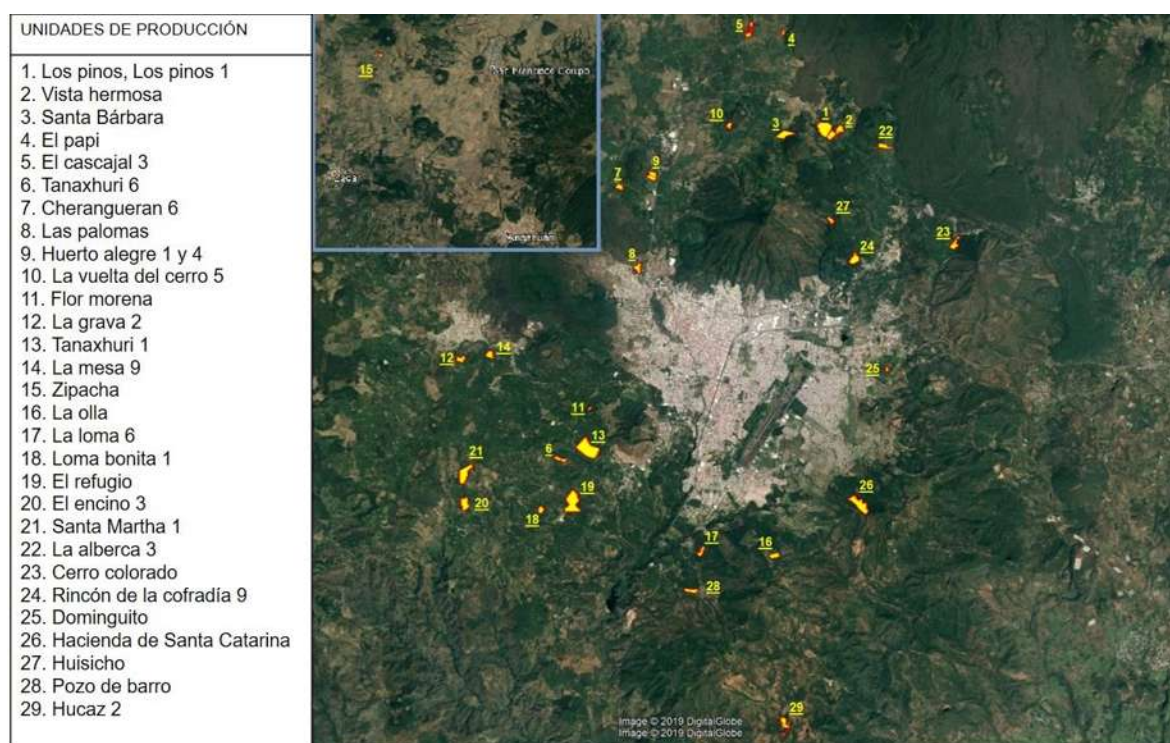


Fig. 1 Mapa satelital de ubicaciones de las huertas y sitios de muestreo. Imagen proporcionada por el Ing. Andrés Ciprés Torres de la JLSVU en 2019.

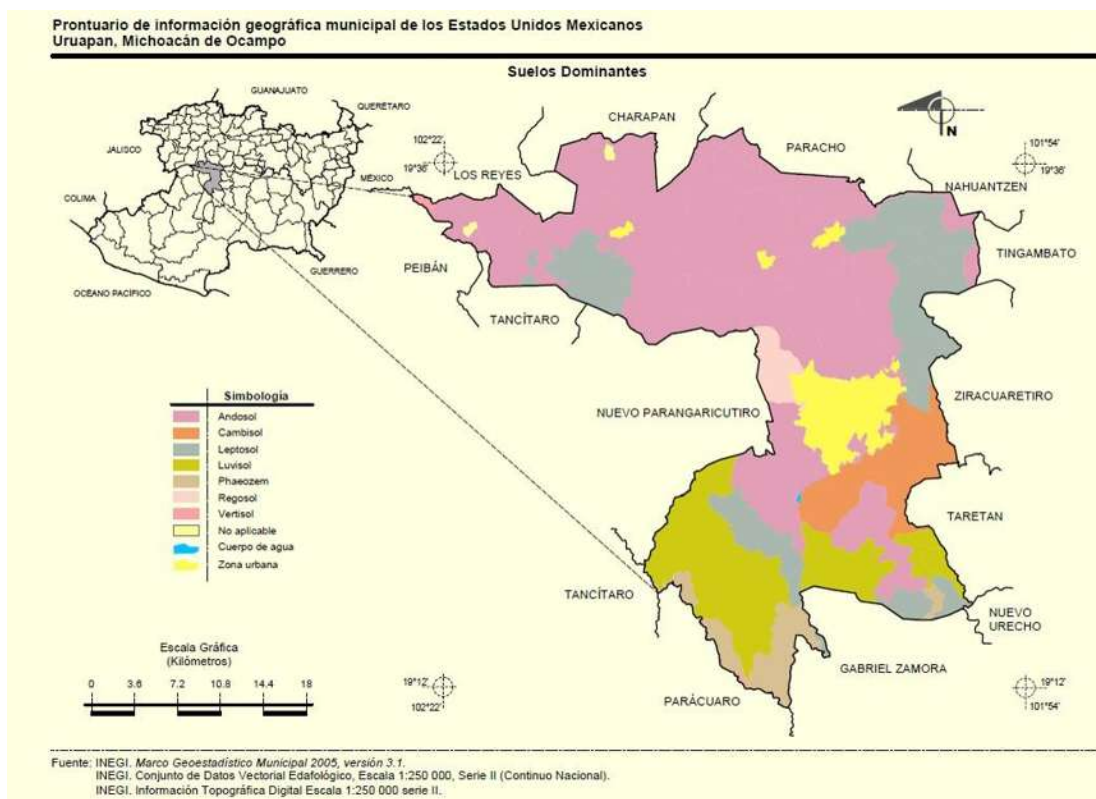


Fig. 2 Tipos de suelo del municipio de Uruapan Michoacán [52].

Se colectaron 2 muestras por UPO de 400 g de suelo de rizósfera en la zona de las raíces secundarias de dos árboles (una muestra por árbol) dentro del perímetro de manera aleatoria, en bolsas plásticas tipo Ziploc® de cierre hermético. Se conservaron desde su colecta y hasta su proceso en el laboratorio a 4 °C.

3.2. Procesamiento de las muestras de rizósfera

El pH de suelo se procesó según Kloster [53]. Se utilizó agua desionizada pH de 6.6 como extractor. Se colocaron 12 g de muestra problema en matraz Erlenmeyer de 250 mL, se adicionaron 30 mL de agua desionizada, se agitó durante 30 s y se dejó reposar durante 1 h, el pH se determinó con un potenciómetro (HANNA® Instruments pH 210 Microprocessor pH Meter®).

Para descontaminar la muestra, se empleó como base el método de Masayuki [54], haciendo cuatro tratamientos con diferentes modificaciones. 1) Se adicionó lo equivalente a 2 mL de muestra de suelo en un tubo de ensaye, se aforó hasta 10 ml (dilución 10^{-1}). Una segunda dilución 10^{-2} , se hizo tomando de la solución 10^{-1} 100 μ l en un vial y se adicionaron 900 μ l de solución de Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) al 1%: Extracto de levadura (YE) al 3%. Se incubó en baño con agitación durante 20 min a 40 °C. 2) Se repitieron las diluciones del tratamiento 1 y se hizo una tercera dilución 10^{-3} , tomando 100 μ l de la dilución 10^{-2} y se adicionaron 900 μ l de la solución SDS:YE 1%:3%, con el mismo tratamiento térmico del procedimiento 1. 3) Tratamiento 1, pero modificando las concentraciones SDS:YE 2%:3% y la temperatura de tratamiento fue de 43 °C. 4) Tratamiento 1 con solución SDS:YE ambas al 3% a 44 °C por 25 min. La agitación en el termobañó fue una constante para todos los tratamientos a 150 rpm.

Los tratamientos se inocularon masivamente con asa en “L” adicionando 25 μ l de la dilución 10^{-2} y 10^{-3} según correspondió al tratamiento, sobre placas de agar infusión de cerebro y corazón (BHI, Bioxon®) y Extracto de Malta (EM) [55]. Las placas se incubaron de 24 a 72 h a 30 °C, y posteriormente se dejaron a temperatura ambiente y en la obscuridad hasta 10 días, revisando diariamente la presencia de colonias presuntivas de actinobacterias en la superficie del medio.

Se seleccionaron colonias con características morfológicas sugestivas de actinobacterias: coloración llamativa, colonias usualmente duras adheridas fuertemente a la superficie del agar, crecimiento convexo, elevado, formaciones irregulares como migajas de pan sobrepuestas, rocosas, serosas, lisas o con fragmentaciones superficiales, crateriformes o umbilicadas, de bordes lobulados o fragmentados, generación de pigmentos difusibles en el agar o generación de metabolitos secundarios líquidos, formación de esporas, entre otras; se re-aislaron en tubos en plano inclinado con medio de cultivo agar BHI. Se hizo una tinción de

Gram, buscando estructuras filamentosas menores a 1 mm, pudiendo ser rectas, ondulantes, ramificadas, pudiendo ser tabicadas o no, con desprendimiento de formas cocoides (esporas) o no [5,12].

Después de hacer varios grupos y descartar similitudes, se preseleccionaron 137 aislados, éstos fueron sembrados e incubados a temperatura ambiente por un periodo de 5 a 7 días en el medio propuesto por Murashige & Skoog (MS), para la prueba reto planta-microorganismo y evidenciar su capacidad PGP [56], seleccionando únicamente los aislados que presentaron un mejor crecimiento en el medio, para evitar dificultades de crecimiento en las determinaciones de su capacidad como Bacteria Promotora del Crecimiento Vegetal o PGP (por sus siglas en inglés: Plant Growth-Promoting). Resultando un número final de 41 aislados a probar, las cuales fueron divididas en dos grupos de prueba.

3.3. Conservación de microorganismos

Los microorganismos se conservaron por tres métodos: 1) ultra congelación a -70 °C en caldo EM y BHI más glicerol al 20%, 2) mediano plazo en agua destilada estéril a temperatura ambiente, para conservar micelio y esporas y 3) conservación periódica en medio de cultivo sólido en plano inclinado BHI y EM, únicamente de las cepas de trabajo que se estarán utilizando con frecuencia.

3.4. Extracción del ADN genómico

Previo a la extracción del ADN del total de aislados, se seleccionaron un total de seis aislados de Actinobacteria para estandarizar un protocolo de extracción de ADN. Se eligieron cuatro aislados de la colección de actinobacterias aisladas de rizósfera de *Persea americana* identificados previamente por métodos morfológicos y fisiológicos como pertenecientes al grupo de las actinobacterias:

ARI_A16-4, ARI_A18-15, ARI_A20-3, ARI_A20-5. Dos controles identificados como *Streptomyces sp.* y *Mycolicibacterium smegmatis* MC² 155.

Las actinobacterias se inocularon en tubos cónicos con 7 mL de caldo EM durante 9 días, 30 °C, 120 rpm y agar EM con extracto de suelo al 0.1% durante 2-3 días, 30 °C, verificando todos los días antes de la aparición de esporas. Solo el control *M. smegmatis* MC² 155 se cultivó en caldo Middlebrook 7H10® BD suplementado con ADC® Sigma Aldrich durante 7 días, 37 ° C, 120 rpm y Middlebrook 7H10 Agar® BD suplementado con ADC® Sigma Aldrich durante 5 días, 37 °C. El caldo se centrifugó a 3,200 rpm durante 20 min y la biomasa fresca se transfirió a un microtubo Eppendorf® que se secó a temperatura ambiente para determinar el peso (40-45 mg de biomasa). Para los cultivos en medio sólido, se tomaron y se pesaron dos colonias (35-40 mg de biomasa) en un microtubo Eppendorf®. Después de la ponderación, se añadieron 20 µl de agua desionizada a cada muestra.

Se utilizó el reactivo DNAzol® (Invitrogen™, cat. 10503-027), para la extracción de ADN siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Se implementaron varios protocolos (P) utilizando DNAzol®: P1. Uso de DNAzol® solo; P2. DNAzol® en combinación con horno microondas durante 20 s a 480 W [44]. P3. Protocolo 2 de DNAzol® y la adición de 10 µL de Proteinasa-K 40 µg/mL (Invitrogen™, cat. AM2542). P4. P3 con la adición de 3 µL de RNase A Pure Link (Invitrogen™, cat. 12091-021) más tres repeticiones. A todos los métodos se les agregó un paso adicional: el precipitado seco que contenía ADN fue resuspendido en TE 10/1 100 µL, se calentó por 10 min a 65 °C, para liberar el ADN atrapado en los componentes residuales de la pared celular. Las muestras se centrifugaron a 4000 x g durante 7 min. El sobrenadante se recuperó cuidadosamente en un tubo limpio; este paso resultó crítico para el rendimiento y la calidad del ADN.

3.4.1. Calidad y pureza del ADN para análisis de PCR

La presencia y calidad del ADN extraído se verificó mediante electroforesis en agarosa al 0.8%, 2 µL por pocillo. El análisis de densitometría para evaluar la proporción de ADN y ARN presente en cada muestra se realizó con el software Gel Analyzer® versión 19.1. El área bajo las curvas para ADN de alto tamaño molecular y el frotis de ARN, y las proporciones de ADN/ARN de todas las muestras en el tratamiento (protocolo) se usaron para calcular la media y el error estándar. Las diferencias significativas entre los protocolos se determinaron con el software estadístico PAST3® [57]. La concentración y pureza del ADN se evaluaron con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™). También una amplificación de 1,500 pb de la región 16s del rRNA utilizando los iniciadores 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') [58,59] obtenidos de OligoT4® (México). Se realizó con el ADN extraído de todos los protocolos, confirmando su idoneidad para la amplificación.

3.4.2. Ensayo de PCR

Las reacciones (50 µl) se realizaron en 1 x Taq PCR Master Mix que contenía 1,5 Mg²⁺, mezcla de dNTP (2,5 mM cada uno), 50 ng de ADN, iniciador 27F 1,0 µM (conc. final), iniciador 1492R 1,0 µM (conc. final). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador modelo Veriti 9902® de AB Applied Biosystem con las siguientes condiciones: 5 min a 94 °C; 30 ciclos de amplificación exponencial (60 s a 94 °C, 60 s a 54 °C, 2 min a 72 °C) y 10 min a 72 °C [59].

3.5. Amplificación y purificación

Una vez estandarizado el método de extracción de ADN, se extrajo el ADN genómico de los 37 aislados restantes empleando el protocolo 4 (P4). La amplificación del fragmento ADNr 16S de 1,500 pb, se llevó a cabo de acuerdo a

lo especificado en el punto 4.4.2. Los productos de amplificación de PCR fueron purificados utilizando el kit de extracción en gel “QIAquick PCR purification kit® (Quiagen®).

3.6. Secuenciación e identificación

Los productos de purificación fueron verificados en un gel de agarosa al 0.8% a 80 Volts/50 min, para llevar a secuenciación. La secuenciación se hizo en dos partes, una en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM y en MacroGen Genome Center, Seoul, Korea. Las secuencias fueron ensambladas usando el software Ugene® de Unipro e identificadas usando el buscador de análisis de taxonomía BLAST de la NBCI [60].

4. Resultados y discusión

4.1. Muestreo

Se colectaron un total 60 muestras al azar (2 por UP), en un total de 29 Unidades de Producción Orgánica (UPO) cavando a una profundidad de entre 20 a 30 cm, es la zona donde se encontraban parte de las raíces secundarias (Figs. 3A y 3B).

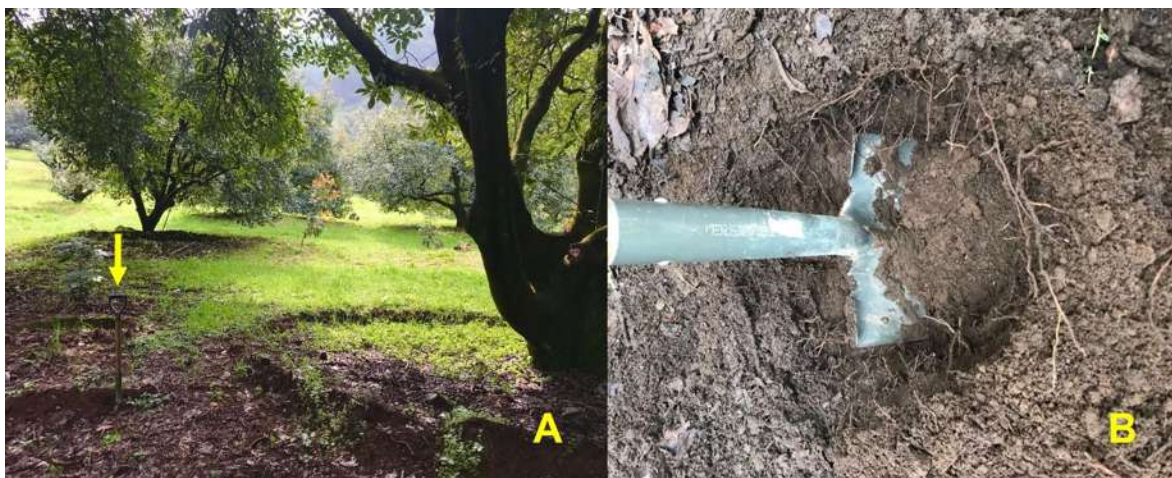


Fig. 3 A. UPO de aguacate. Zona de muestreo, área de raíces secundarias (flecha amarilla). **B.** Zona de toma de muestra de rizósfera.

En la tabla 1 se muestran características que tienen las UPO, tales como altitud, superficie de extensión de la UPO, los años de manejo orgánico que tiene la huerta y su geo-posicionamiento. Cabe mencionar que algunas UPO no siempre tuvieron este tipo de manejo, pero para ser consideradas para el muestreo debían tener por lo menos 3 años en este esquema. En el caso de la UPO Zipacha, ésta es de nueva creación y desde origen tiene un manejo orgánico. Este parámetro fue importante para el muestreo, debido a que en el manejo convencional, el uso constante o excesivo de plaguicidas y fertilizantes químicos, erosionan y suprimen la mayoría de los microorganismos benéficos del suelo [61,62]. Por el contrario, en las UPO con este manejo orgánico los microorganismos benéficos suelen permanecer y hacer relaciones simbióticas con los árboles y plantas silvestres del lugar.

Tabla 1. Consideración de datos de las unidades de producción para el muestreo.

N° DE UPO		ALTITUD MS.N.M.	COORDEN ADAS (LT, LG)	SUPERFICI E EN Ha	MANEJO ORGÁNICO EN AÑOS	N° DE UPO		ALTITUD MS.N.M.	COORDEN ADAS LT, LG)	SUPERFICI E EN Ha	MANEJO ORGÁNICO EN AÑOS
1	Los pinos	2040	19.48, 102.02	22.87	3	16	La olla	1703	19.35, 102.03	3.95	20
2	Vista Hermosa	2031	19.48, 102.02	5.00	7	17	La loma 6	1565	19.35, 102.05	2.70	4
3	Santa Bárbara	2015	19.48, 102.03	9.40	10	18	Loma bonita 1	1657	19.36, 102.10	3.00	14
4	El papi	2140	19.51, 102.03	2.00	8	19	El refugio	1650	19.37, 102.09	20.00	7
5	El cascajal 3	2130	19.51, 102.05	6.00	7	20	El encino 3	1760	19.36, 102.12	8.00	4
6	Tanaxhuri 6	1730	19.38, 102.09	3.45	8	21	Santa Martha 1	1808	19.37, 102.12	12.94	5
7	Cherangueran 6	1906	19.46, 102.08	4.00	3	22	La alberca 3	1911	19.47, 102.00	5.71	6
8	Las palomas	1767	19.43, 102.08	5.20	5	23	Cerro colorado	1902	19.45, 101.98	5.90	17
9	Huerto alegre	1882	19.46, 102.07	3.60	10	24	Rincón de la cofradía 9	1738	19.44, 102.01	7.00	12
10	La vuelta del cerro 5	1996	19.48, 102.05	2.50	3	25	Dominguito	1695	19.41, 102.00	1.23	9
11	Flor morena	1700	19.39, 102.09	1.00	9	26	Hda de Sta. Catarina	1720	19.37, 102.00	15.00	10
12	La grava 2	1908	19.40, 102.13	4.08	25	27	Huisicho	1864	19.45, 102.02	2.85	8
13	Tanaxhuri 1	1715	19.38, 102.09	25.00	4	28	Pozo de barro	1577	19.34, 102.05	3.00	4
14	La mesa 9	1902	19.41, 102.12	5.00	25	29	Hucaz 2	1555	19.31, 102.03	5.00	4
15	Zipacha	2512	19.60, 102.27	4.50	0.5						

4.2. Procesamiento de las muestras de rizósfera

Al analizar los valores de pH obtenidos de las muestras de rizósfera, se observa que el pH promedio se encuentra inferior a la neutralidad. Este rango se considera apto y dentro de los límites de pH tolerantes para la vida de las actinobacterias que oscila entre un pH 5.0 a 9.0 [12,63], haciendo favorable su recuperación y supervivencia, aunque estudios mencionan que es más favorable su recuperación en suelos con tendencias alcalinas, muchos de ellos se adaptan a vivir en condiciones de pH neutro y con tendencia a la acidez como por ejemplo varias especies del género *Streptomyces* [64]. Los valores de pH encontrados en las 60 muestras tienen rangos similares, su mínimo se encontró en 5.38 mientras que su máximo fue de 7.92 (indicados en rojo en la Tabla 2), encontrándose dentro del rango mencionado (Tabla 2). El pH no es la única variable a considerar, ya que existen muchas otras interacciones entre nutrientes y microorganismos que hacen posible la estabilidad de la población de actinobacterias en suelos; sin embargo, es de vital importancia para muchos géneros de los microorganismos de interés [5].

Tabla 2. Valores de pH de las muestras de suelo

UPO		pH SUELO, MUESTRA 1 y 2	N° DE AISLADOS OBTENIDO S	MANEJO ORGÁNICO EN AÑOS	UPO		pH SUELO, MUESTRA 1 y 2	N° DE AISLADOS OBTENIDO S	MANEJO ORGÁNICO EN AÑOS
1	Los pinos	6.60, 6.62	30	3	16	La olla	6.60, 7.70	9	20
	Los pinos 1	5.88, 6.90							
2	Vista Hermosa	6.90, 6.55	0	7	17	La loma 6	6.76, 7.04	23	4
3	Santa Bárbara	6.45, 6.51	48	10	18	Loma bonita 1	6.58, 6.42	14	14
4	Huerto al papi	6.25, 6.21	20	8	19	El refugio	6.96, 6.12	12	7
5	El cascajal 3	6.44, 6.25	54	7	20	El encino 3	6.62, 6.42	17	4
6	Tanaxhuri 6	6.63, 6.83	13	8	21	Santa Martha 1	6.20, 6.66	12	5
7	Cherangueran 6	6.83, 6.77	13	3	22	La alberca 3	6.14, 6.60	10	6
8	Las palomas	6.95, 7.92	24	5	23	Cerro colorado	6.21, 6.05	12	17
9	Huerto alegre	6.82, 6.90	7	10	24	Rincón de la cofradía 9	6.90, 6.43	9	12
10	La vuelta del cerro 5	6.50, 7.10	9	3	25	Dominguito	6.10, 6.37	4	9
11	Flor morena	6.80, 6.65	17	9	26	Hda de Sta. Catarina	6.10, 7.20	15	10
12	La grava 2	6.65, 7.02	27	25	27	Huisicho	6.10, 6.30	33	8
13	Tanaxhuri 1	6.60, 6.35	7	4	28	Pozo de barro	7.26, 6.55	0	4
14	La mesa 9	6.60, 6.98	16	25	29	Hucaz 2	6.66, 5.38	7	4
15	Zipacha	6.50, 6.85	79	0.5					

Se destaca también en la Tabla 2 la relación que existe entre el número de aislados recuperados y el tiempo de manejo en el esquema orgánico y la UPO 15 “Zipacha”, que, por ser una UPO de reciente creación con suelo fértil, fue donde se obtuvo el mayor número de aislados de actinobacterias.

Como un dato a considerar, la mayoría de las UPOs que se enlistan en la Tabla 2, fueron previamente unidades de producción convencional sometidas a tratamientos de fertilización química, lo que ha contribuido a la modificación del micro-ecosistema del suelo y como consecuencia, a la disminución de bacterias benéficas. De esta forma, se explica que el número de aislados sea muy variable. En el esquema de manejo orgánico, algunos productores, optan por la introducción de otro tipo de frutales, plantas silvestres de la región y mezclas de suelos de bosques aledaños de zonas más altas, lo que puede contribuir a la permanencia de microorganismos de origen.

Para obtener los aislados de actinobacterias, las muestras fueron sometidas a tratamientos de descontaminación de microbiota acompañante. Los tratamientos propuestos de descontaminación (Tabla 3) se evaluaron visualmente por la limpieza en el crecimiento observado en las placas (Fig. 4), así como del número de colonias aisladas y sugestivas de actinobacterias (Fig. 4D), siendo el método 4 el mejor y el de elección para fines de este ensayo.

Tabla 3. Tratamientos de descontaminación de suelo para aislamientos de Actinobacterias.

TRATAMIE NTO	DILUCIONES	YE % (M/V)	SDS % (M/V)	TEMPERATURA °C Y TIEMPO DE TRATAMIENTO TÉRMICO
1	10^{-1} , 10^{-2}	3	1	40 °C, 20 min
2	10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}	3	1	40°C, 20 min
3	10^{-1} , 10^{-2}	3	2	43°C, 20 min
4	10^{-1} , 10^{-2}	3	3	44°C, 25 min

YE: Yeast extract, SDS: Dodecil Sulfato de Sodio

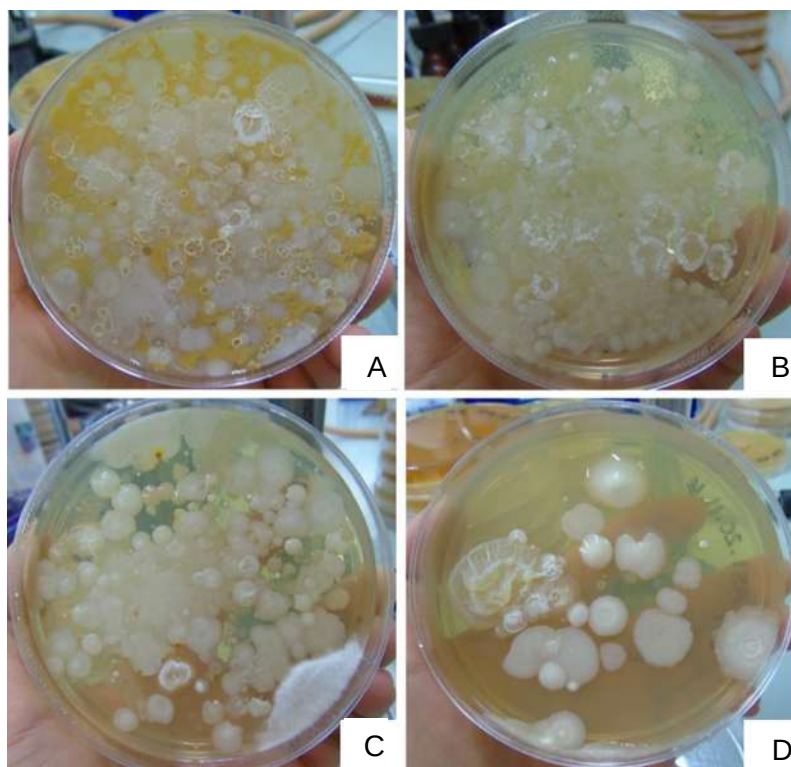


Fig. 4 Ensayos de descontaminación de suelos. **A.** tratamiento 1, **B.** tratamiento 2, **C.** tratamiento 3, **D.** tratamiento 4. Diluciones 10^{-3} , crecimiento en Agar EM.

De las 29 UPOs, se recuperaron un total de 1,583 aislados. Posterior purificación, se sembraron en agar EM, Agar suelo, Agar Avena y BHI, para descartar similitudes y formar grupos, también, se transfirieron a tubos con medio agar EM en plano inclinado y se dejaron envejecer hasta su fase estacionaria, para inducir la producción de pigmentos y metabolitos secundarios. Se realizó un criterio de preselección basado en su morfología colonial, en los diferentes medios, presencia de micelio aéreo, colores, generación de pigmentos difusibles en el agar y/o generación de metabolitos secundarios visibles, presencia de esporas y afinidad tintorial al Gram. Con esto se pudieron seleccionar y agrupar los aislados con características similares reduciendo el número a 541 aislados [10,12,65,66].

En la figura 5 se muestran algunos de los aislados obtenidos de primo aislamiento del tratamiento 4 de descontaminación, en donde se observa la morfología colonial con su par en morfología microscópica en tinción de Gram y observado en 100x en microscopía de campo claro. Fig. 5: A con A1, B con B1, C con C1 y D con D1. Las colonias se pueden apreciar visualmente duras y fuertemente adheridas a la superficie del agar y en el caso de las tinciones de Gram, se observa la morfología característica de la mayoría de las actinobacterias (género *Streptomyces*), hifas largas y delgadas $<1\mu\text{m}$, ramificadas y generalmente en cúmulos de hifas denominados “pellets”.

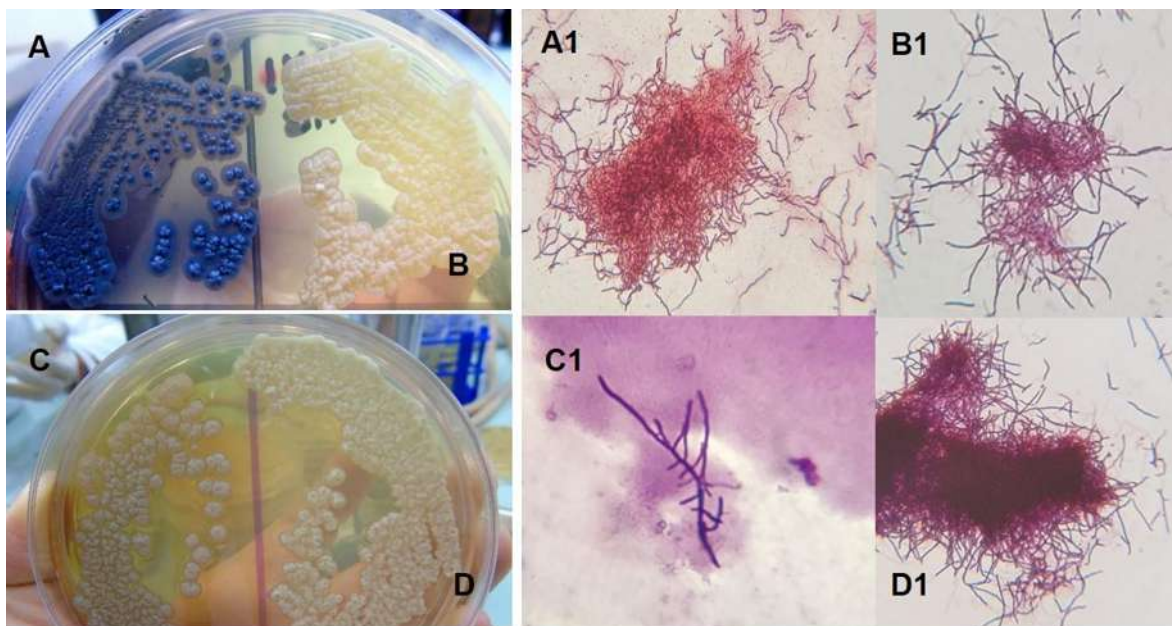


Fig. 5 Aislados puros de primo aislamiento de actinobacterias. Se muestran sus pares indicados con la misma letra.

En la siguiente etapa de discriminación, para hacer grupos más reducidos se consideró cubrir una distribución homogénea de la ubicación de las UPOs y que fuese representativa del total de éstas, considerando también que fuesen de los huertos con mayor recuperación de aislados y mejor manejo orgánico (Tabla 2, Fig. 6).

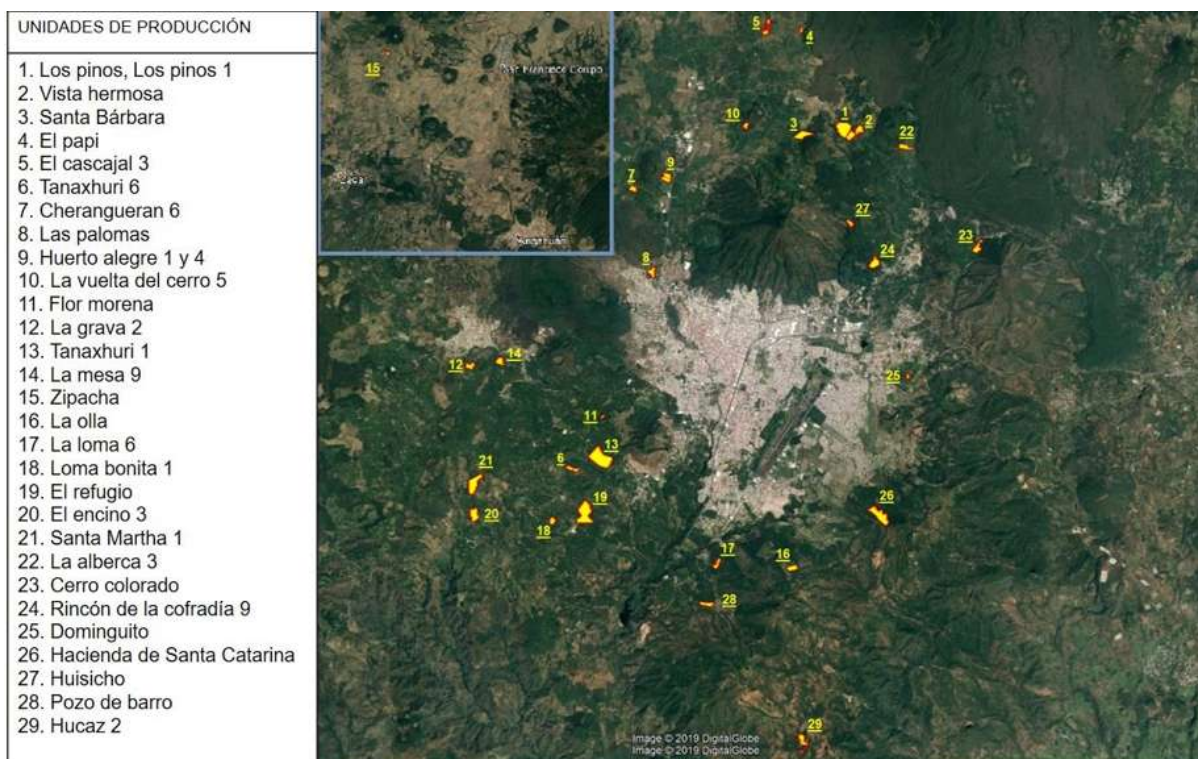


Fig. 6 Mapa de distribución del total de las UPOs muestreadas del municipio de Uruapan, Michoacán. Mapa elaborado por el Ing. Andrés Ciprés Torres, JLSV Uruapan.

De 14 UPOs, se seleccionaron ± 10 aislados, con un total de 137 tratando de cubrir la mayor diversidad fenotípica que pudiera representar a los grupos del total de aislados de la zona de muestreo, se les asignaron códigos iniciando con las iniciales ARI (Avocado Rhizosphere Isolate) que indican su origen de rizósfera, seguido con un guión bajo la letra A junto con el número de UPO que corresponda y separado por un guion se encuentra el número de aislado (ejemplo ARI_A20-3 = Aislado de rizósfera de aguacate, de la UPO 20 llamada El encino 3, aislado 3).

Para reducir más el número de aislados, se hizo otra discriminación fenotípica. Se agruparon por UPOs, y se sembraron nuevamente en medio agar suelo y agar avena buscando estimular características fenotípicas. Posteriormente, se llevó a cabo una nueva reagrupación por similitudes (Fig. 7), quedando un número de 50 aislados tratando de respetar la distribución por UPOs.

Finalmente, los 50 aislados fueron sembrados en medio Murashige & Skoog [56], considerando las de mejor crecimiento en el medio para facilitar las pruebas en la interacción planta-microorganismo. El grupo de bacterias seleccionado para este proyecto fue de 41 aislados en total.



Fig. 7 Morfología colonial de aislados de actinobacterias. Crecimiento en medio agar avena, 14 días a 30 °C.

4.3. Conservación de microorganismos

Los 137 aislados se conservaron en tres tipos de conservación, conformando la colección de actinobacterias aisladas de rizósfera de *Persea americana* del Laboratorio de Innovación y Desarrollo de Alimentos LIDA de la Facultad de QFB-UMSNH.

4.4. Extracción de ADN genómico

4.4.1. Calidad e idoneidad del ADN para análisis de PCR

La integridad del ADN se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa (Fig. 8). Usando P1, (P1: DNAzol solo; Fig. 8A), en los carriles 2, 5 y 6 se aprecia un frotis de ADN por debajo de la banda principal de alto tamaño molecular, probablemente debido a la degradación o contaminación de los fragmentos de la pared residual que afectan la migración. En los carriles 1, 7 y 9 se observaron bandas tenues con grandes cantidades de ARN residual. Al introducir la lisis física (microondas) en P2, se mejoró la banda de alto tamaño molecular (Fig. 8B, 8C Y 8D) y mostró menos frotis con la adición de proteinasa K en P3 (Fig. 8C, 8D) pero aún con ARN residual. Finalmente, con la adición de RNAsa resultó en la eliminación del RNA para una mejor calidad del DNA (Fig. 8D).

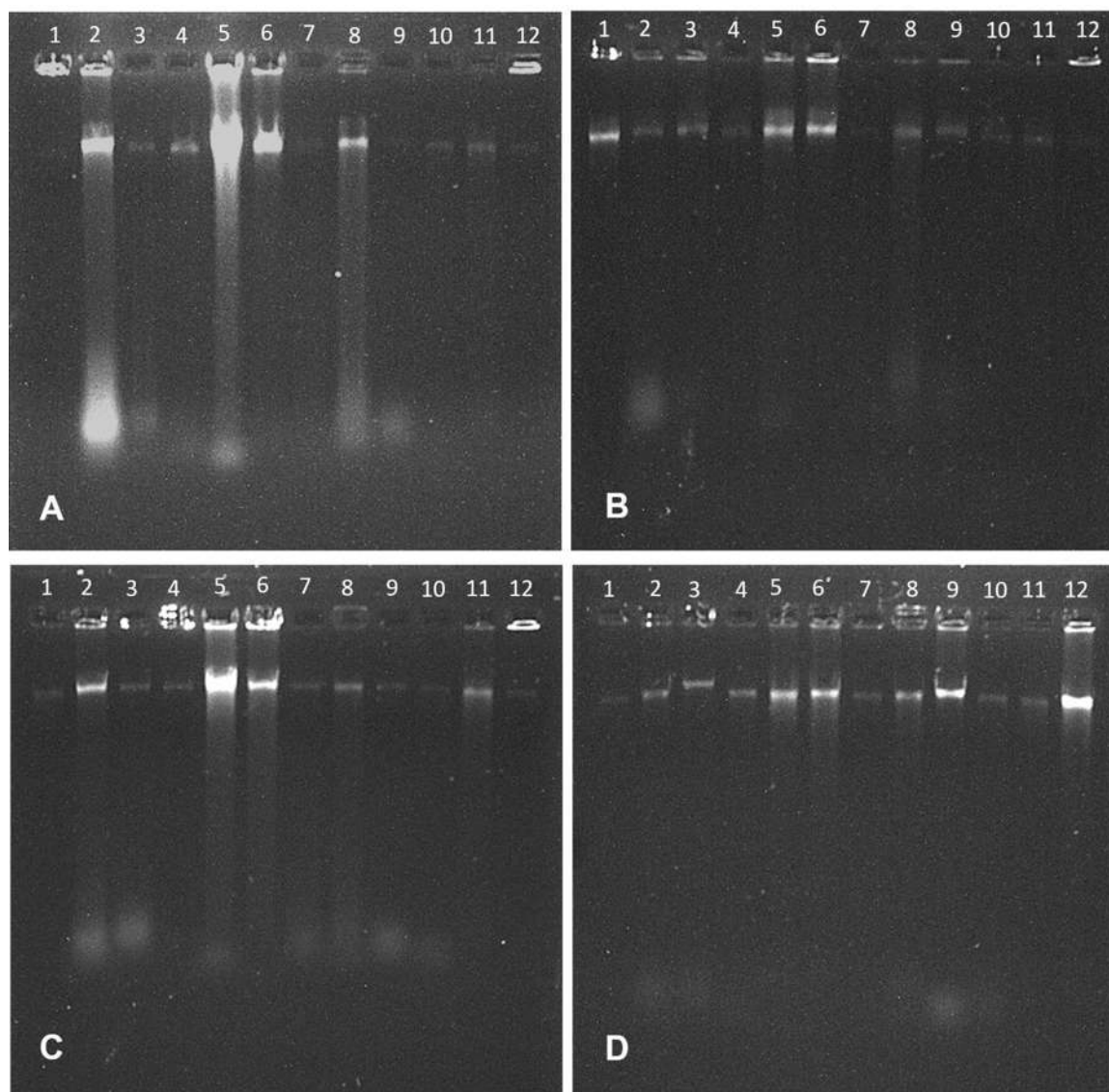


Fig. 8 Protocolos: **A** P1, DNAzol®. **B** P2, DNAzol® + Microondas. **C** P3, DNAzol® + Microondas + proteinasa K. **D** P4, DNAzol® + Microondas + proteinasa K + RNasa. **CARRILES** 1: Aislado 16-4 L, 2: Aislado 18-15 L, 3: Aislado 20-3 L, 4: Aislado 20-5 L, 5: *Streptomyces* sp L, 6: *M. smegmatis* MC² 155 L, 7: 16-4 C, 8: 18-15 C, 9: 20-3 C, 10: 20-5 C, 11: *Streptomyces* sp C, 12: *M. smegmatis* MC² 155 C. P: protocolo. L: cultivo líquido, C: colonia de medios de cultivo sólidos.

Debido a las diferencias en la complejidad de la pared celular entre cada género [3,10,14,20,24,26] puede ser difícil recuperar un ADN de buena calidad libre de carbohidratos residuales o componentes de la pared celular. En una observación preliminar, notamos que las extracciones de ADN con DNAzol

(Protocolo 1) dieron rendimientos muy bajos. Entonces, analizamos el sedimento del paso de lisis para verificar si el ADN quedó atrapado en él. De hecho, calentar el sedimento a 60 °C durante 10 min permitió recuperar el ADN atrapado en el sedimento (datos no mostrados). Por lo que se recomienda no omitir este paso del protocolo de extracción de ADN.

Para analizar el grado de mejora en la pureza del ADN con respecto al ARN, las proporciones de ADN/ARN se calcularon mediante análisis de densitometría (Fig. 9). Se representan los porcentajes de señal de ADN sobre la señal de ácidos nucleicos totales en el gel. El protocolo 1 (P1: DNAzol® solo) muestra el porcentaje más bajo de ADN en las muestras (Fig. 3A P1L, 3B barras P1C). Los protocolos 2 (P1 + microondas) y 3 (P2 + proteinasa) muestran un aumento grande y similar en la proporción de ADN en la muestra, lo que sugiere una mejora de la extracción de ADN sobre el ARN por microondas, pero no por proteinasa (Fig. 9A P2L, barras P3L y 3B P2C, P3C). Sin embargo, el Protocolo 4 (P3 + RNasa) mostró el mayor aumento en la proporción de ADN sobre el ARN, lo que sugiere la eliminación del ARN por el tratamiento enzimático (Fig. 9A P4L, 3B barras P4C). Aunque se observaron claras diferencias en la proporción de ADN/ARN entre los protocolos, no se observaron diferencias significativas.

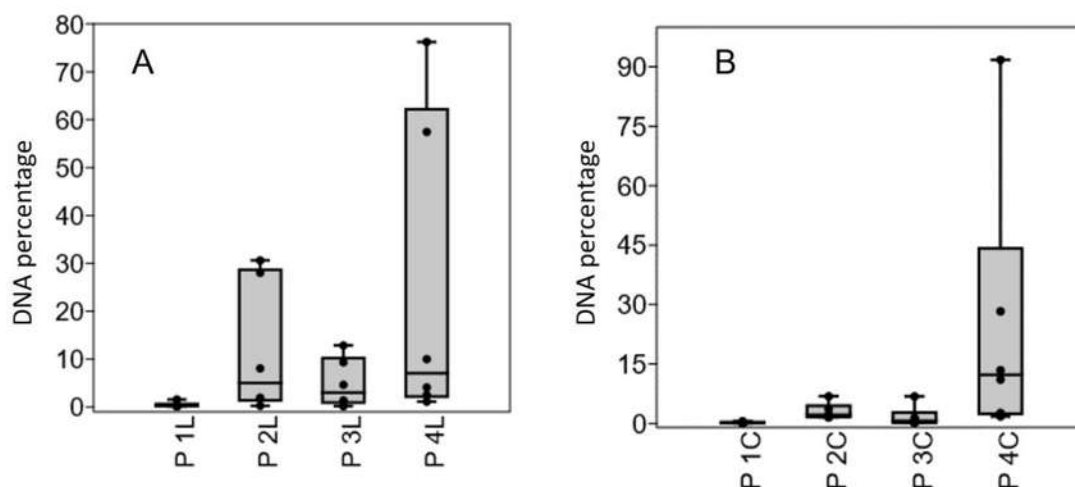


Fig. 9 Gráficos de caja-bigotes del porcentaje de ADN en carriles de gel de electroforesis: **A** P 1L: Protocolo 1 DNAzol®, P 2L: Protocolo 2 DNAzol® + Microondas, P 3L: Protocolo 3 DNAzol® + Microondas + K proteinasa, P 4L: Protocolo 4 DNAzol® + Microondas + proteinasa K + RNasa. **B** P 1C, DNAzol®, P 2C, DNAzol® + Horno microondas, P 3C, DNAzol® + Horno microondas + proteinasa K, P 4C, DNAzol® + Horno microondas + proteinasa K + RNasa. P, protocolo. L, cultivo líquido. C, colonia de medios de cultivo sólidos.

La calidad y pureza del ADN, así como la eliminación del ARN contaminante, se logró en el protocolo P4. Un paso importante en la mejora del rendimiento fue la adición del tratamiento con microondas [44] al protocolo, que resultó en hasta un 50 % más de ADN total extraído que con DNAzol® solo (datos no mostrados). Esto también fue cierto cuando se midió la proporción de ADN sobre los ácidos nucleicos totales (Fig. 9). Además, la adición de proteinasa K permitió mejorar la extracción al aumentar la cantidad de ADN obtenido (Fig. 9C y D) sin interferir con la amplificación de ADN para PCR [48]. La adición de RNasa en el Protocolo 4 permitió eliminar el RNA residual y aumentar la proporción de DNA sobre los ácidos nucleicos totales (Figs. 8 y 9).

Debido a estas observaciones previas, se seleccionó el Protocolo 4 y se evaluó la integridad (Fig. 8), la concentración, el rendimiento y la pureza de los ADN obtenidos de cultivos líquidos (Tabla 4) y sólidos (Tabla 5). A pesar de algunas diferencias en 260/230, no afecta la calidad del ADN para realizar otras pruebas moleculares.

Tabla 4 Rendimiento y pureza del ADN de cultivo líquido usando el Protocolo 4.

CEPA	CONCENTRACIÓN ng ADN /ul	RENDIMIENTO ng ADN/mg	260/280	PUREZA 260/230
Aislado 16-4	63.87 ± 6.70	242.19 ± 69.11	1.96 ± 0.09	1.75 ± 0.12
Aislado 18-15	225.60 ± 10.50	202.30 ± 86.46	1.85 ± 0.09	2.54 ± 0.66
Aislado 20-3	145.18 ± 6.80	466.35 ± 35.47	2.07 ± 0.15	2.88 ± 0.82
Aislado 20-5	104.96 ± 23.00	346.24 ± 245.23	1.93 ± 0.20	3.33 ± 0.83
<i>Streptomyces</i> sp.	270.48 ± 60.00	1105.28 ± 620.28	2.11 ± 0.10	2.00 ± 0.05
<i>M. smegmatis</i> MC ² 155	67.18 ± 2.10	94.59 ± 25.68	2 ± 0.20	1.97 ± 0.33

n=4; número de datos ± error estándar

Tabla 5 Rendimiento y pureza del ADN de cultivo sólido usando el Protocolo 4.

CEPA	CONCENTRACIÓN ng ADN /ul	RENDIMIENTO ng ADN/mg	260/280	PUREZA 260/230
Aislado 16-4	48.90 ± 1.10	98.30 ± 13.94	2.23 ± 0.02	1.64 ± 0.32
Aislado 18-15	213.33 ± 28.50	715.03 ± 287.35	2.16 ± 0.15	3.78 ± 0.74
Aislado 20-3	55.22 ± 6.00	156.28 ± 76.28	2.17 ± 0.19	2.71 ± 0.74
Aislado 20-5	56.60 ± 3.00	178.82 ± 30.33	2.07 ± 0.20	1.87 ± 0.10
<i>Streptomyces</i> sp.	193.61 ± 26.80	516.79 ± 270.65	2.12 ± 0.08	2.28 ± 0.05
<i>M. smegmatis</i> MC ² 155	35.70 ± 3.20	89.50 ± 30.72	1.73 ± 0.15	1.78 ± 0.15

n=4; número de datos ± error estándar

Las diferencias en la concentración y pureza del ADN observadas para nuestros aislados y cepas de referencia (Tablas 4 y 5) pueden estar relacionadas

con las diferencias en la complejidad de la pared celular entre géneros. En este mismo contexto, las similitudes entre el aislado 16-4 identificado como *Streptomyces* sp. y la cepa de referencia *M. smegmatis* MC² 155 pueden deberse a similitudes en la composición de la pared celular, a pesar de que las células para la extracción de ADN se obtuvieron de diferentes medios de cultivo.

El ADN de los diferentes aislados obtenidos con el Protocolo 4 (Fig. 10B y 10C) se utilizó para amplificar por PCR un fragmento 16S rDNA de 1.500 pb con cebadores universales para la división procariótica [58,59]. Para la comparación, también se utilizó el ADN extraído con el Protocolo 1, 2 y 3 (Fig. 10A). Todos los ADN, ya sea de cultivos líquidos o sólidos, produjeron un amplicón de aproximadamente 1500 pb correspondiente al tamaño esperado del fragmento de ADNr 16S. Los ADN obtenidos con los Protocolos 1, 2 y 3 mostraron una banda adicional, débil y de menor tamaño molecular atribuida a una amplificación inespecífica (Fig. 10A, flecha amarilla). Los bajos valores de pureza obtenidos en proporción 260/230 debido al carbohidrato de pared residual en el protocolo 4 (Tabla 4 y 5), no afectaron su uso para la amplificación en una PCR y los resultados fueron independientes del medio de crecimiento, en todos los casos, se obtuvo el fragmento de 1,500 pb sin bandas de amplificación espurias. Se obtuvieron rendimientos similares a los observados en el gel teñido con bromuro de etidio (Fig. 10A, C).

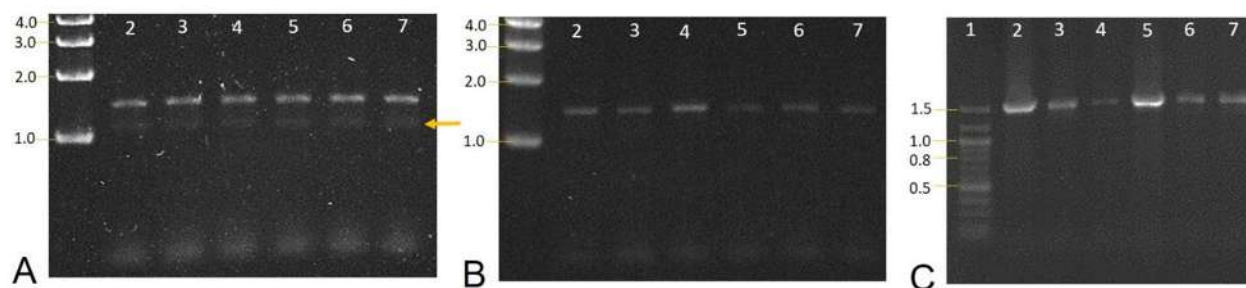


Fig. 10 Electroforesis de amplificación de ARNr 16s por PCR. Fragmento de 1.500 pb y banda inespecífica: **A CARRILES:** 1. Marcador de tamaño molecular. 2. ADN P1, aislado 16-4, 3. ADN P1, aislado 18-15, 4. ADN P2, aislado 16-4, 5. ADN P2, aislado 18-15, 6. ADN P3, aislado 16-4, 7. ADN de P3, aislado 18-15. Banda inespecífica, flecha amarilla. **B** ADN de cultivo líquido de P4, **CARRILES:** 1. Escalera. 2. Aislar 16-4 L, 3. Aislar 18-15 L, 4. Aislar 20-3 L, 5. Aislar 20-5 L, 6. *Streptomyces* sp L, 7. *M. smegmatis* MC² 155 L. **C** ADN de colonia de P4, **CARRILES:** 1. Escalera, 2. Aislar 16-4 C, 3. Aislar 18-15 C, 4. Aislar 20-3 C, 5. Aislar 20-5 C, 6. *Streptomyces* sp C, 7. *M. smegmatis* MC² 155 C. P: protocolo, L: cultivo líquido, C: colonia de medios de cultivo sólidos.

Los ADN con alto contenido de G+C, presentan problemas particulares como moldes de PCR debido a sus altos valores de T_m [67], y pueden aparecer bandas inespecíficas, siendo un problema a la hora de secuenciar, sin embargo se puede corregir utilizando diferentes alternativas, como temperaturas de alineamiento más altas [68], uso de ADN polimerasas específicas o modificadas o uso de co-disolventes [67,69–72]. En este trabajo se usaron las mismas condiciones para la amplificación por PCR con ADN polimerasa convencional, los mismos aislados de bacterias y la única diferencia fue el protocolo para la extracción de ADN. En el protocolo seleccionado (P4), se mostró cualquier banda inespecífica en las diferentes muestras (Fig. 10B y C), y cuando se usó ADN de otros protocolos, apareció una banda adicional en el gel teñido con bromuro de etidio (Figura 10A). Si bien Cha y Thilly, mencionaron que la extracción de ADN no afecta la eficiencia de la PCR [73], los resultados de este trabajo sugieren que la selección adecuada del método de extracción de ADN afecta la calidad del ADN y también puede ser causa de la presencia de bandas inespecíficas, al menos en

algunas actinobacterias. La complejidad en la composición y los residuos de las paredes celulares de las actinobacterias pueden ser la causa de una mala calidad del ADN o una menor idoneidad para la amplificación. Además, el alto contenido de G+C del ADN de las actinobacterias también puede producir bandas espurias a partir de la amplificación por PCR [10,11]. Al menos en los diferentes aislados y cepas ensayadas en este trabajo, el Protocolo 4 parece solucionar los problemas de contaminación.

Se cuantificaron los productos de PCR de una de las réplicas. Se observaron concentraciones medias de $427,3 \pm 19,34$ ng ADN/ μ L y una pureza (As260/280) de $1,83 \pm 0,009$ (Tabla 6).

Tabla 6. Calidad del ADN para PCR de Actinobacterias extraído del protocolo 4.

AISLADO/CEPA	CONCENTRACIÓN ng ADN/ μ L	PUREZA 260/280	260/230
16-4 C	468.9	1.82	2.31
16-4 L	425.3	1.84	2.70
18-15 C	408.3	1.83	2.33
18-15 L	431.0	1.84	2.67
20-3 C	398.3	1.83	2.37
20-3 L	431.8	1.84	2.69
20-5 C	430.9	1.83	2.71
20-5 L	449.4	1.83	2.69
<i>Streptomyces</i> sp. C	431.1	1.83	2.71
<i>Streptomyces</i> sp. L	407.5	1.86	2.32
<i>M. smegmatis</i> MC ² 155 C	432.1	1.83	2.69
<i>M. smegmatis</i> MC ² 155 L	412.7	1.83	2.74
	427.3 ± 19.34	1.83 ± 0.009	2.57 ± 0.18

L: ADN de cultivo líquido C: ADN de colonias.
n=12; $\pm$ error estándar.

Varios métodos han sido previamente reportados para la extracción de ADN de Actinobacteria [24,38–41,44,45,49,74,75]. Algunas desventajas de estos métodos son los altos costos, los extensos períodos de tiempo para cultivar grandes volúmenes de aislados de actinobacterias y la gran cantidad de biomasa

que se requiere [38,50,74]. El objetivo principal de estandarizar un método de extracción de ADN, fue fusionar algunas de las contribuciones anteriores sobre estrategias de extracción de ADN, para encontrar un método universal, rápido y eficiente para la extracción de ADN del filo Actinobacteria. Para lograr este objetivo, utilizamos cultivos obtenidos de volúmenes bajos (7 mL) o colonias individuales (reduciendo el tiempo de crecimiento) para probar nuestros protocolos de extracción de ADN. Esta es una ventaja importante cuando se va a analizar una gran cantidad de aislamientos y/o colecciones de actinobacterias, lo que facilita estudios de gran población o filogenéticos.

El protocolo elegido en este trabajo evitó un gran problema inherente al grupo de actinobacterias, relacionado con las diferencias y la complejidad de la composición de la pared celular en cada género o especie. Aunque el rendimiento en la extracción de ADN puede ser diferente para cada cepa, debido a la diversidad estructural de la estructura de su pared celular, esto puede superarse aumentando la cantidad de biomasa o ajustando aún más la intensidad, la concentración o el tiempo de los tratamientos con pulsos de horno de microondas o cada enzima. Una contribución adicional de nuestro protocolo es el uso de suministros comúnmente disponibles en los laboratorios de biología molecular bacteriana. Esto da como resultado un enfoque más barato y rápido en comparación con el uso de kits comerciales de extracción de ADN caros y difíciles de conseguir, lo que hace que nuestro método sea asequible para los laboratorios de investigación cuando el apoyo financiero es escaso.

Para una correcta identificación de las actinobacterias, incluso en género, es crucial el uso de herramientas moleculares, debido a la complejidad de este grupo y al tipo de dificultades que se presentan al intentar hacer una identificación convencional, debido a que no todas las pruebas son idóneas para este grupo ni se obtienen buenos resultados. Hasta hace algunos años la identificación se seguía haciendo de manera general por patrones morfológicos macro y microscópicos, pero al encontrar muchísimas similitudes y obstáculos como la complejidad de su pared celular, se optó por dejar de lado la identificación clásica

para dar paso al uso a la amplificación de segmentos de genes e incluso el genoma completo de la bacteria, por lo que la obtención de un ADN en buena cantidad y calidad son la base para una correcta aplicación de estas técnicas que nos arrojen resultados confiables.

4.5. Amplificación y purificación

Para verificar que la integridad de los fragmentos amplificados del gen ADNr 16S de los aislados actinobacterias se hizo una electroforesis en agarosa al 1% a 80 Volts/50 min, colocando 4 μ L por pocillo y pudiendo observar de manera clara la banda correspondiente al fragmento de 1,500 pb de interés (Fig. 11).

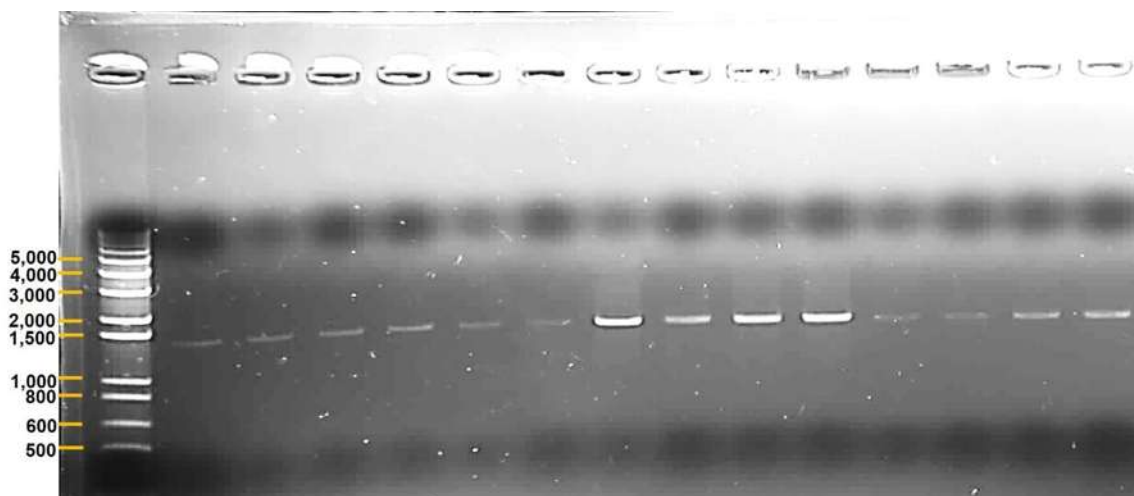


Fig. 11 Ejemplo de gel de electroforesis de productos de amplificación del fragmento ADNr 16S de 1,500 pb. Varios aislados.

Una vez verificada la integridad de los productos de amplificación de PCR (Fig. 12A), estos fueron purificados utilizando el kit de extracción en gel “QIAquick PCR purification kit® (Quiagen®). Los productos de purificación fueron verificados en un gel de agarosa al 0.8% para llevar a secuenciación (Fig. 12B).

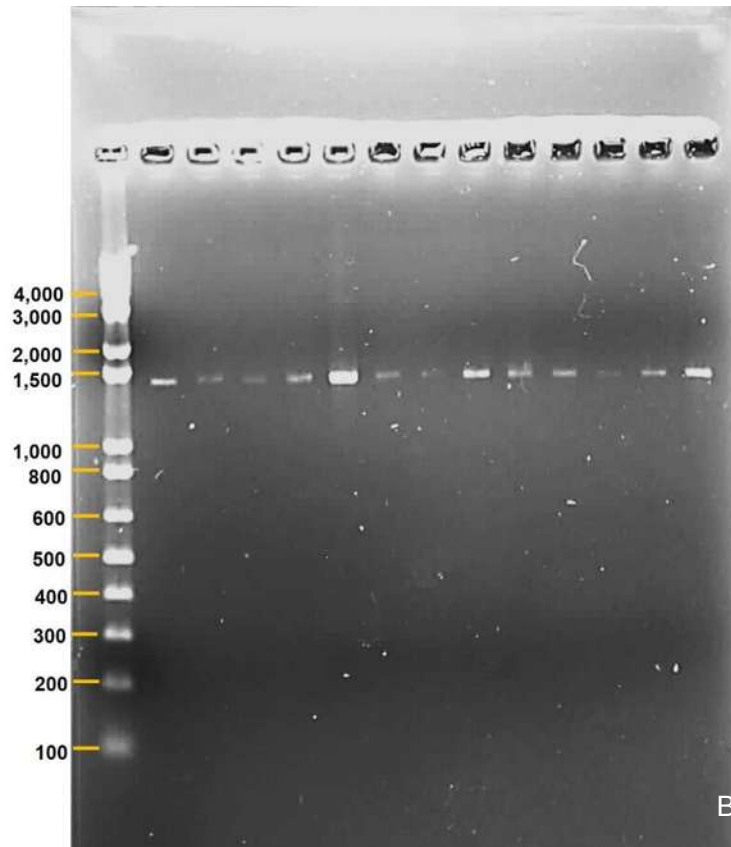
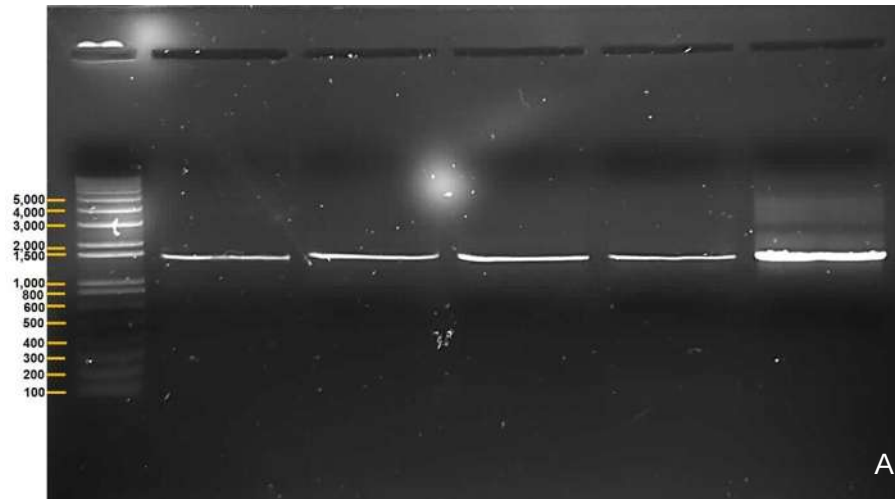


Fig. 12 Geles de electroforesis de productos de amplificación del fragmento ADN_r 16S. **A.** Productos varios de PCR previo al kit de purificación. **B.** Verificación de los fragmentos de 1,500 pb posterior purificación.

4.6. Secuenciación e identificación

En la figura 13, se muestra un ejemplo de las secuencias obtenidas que fueron analizadas utilizando el software Chromas 2.6.6©.

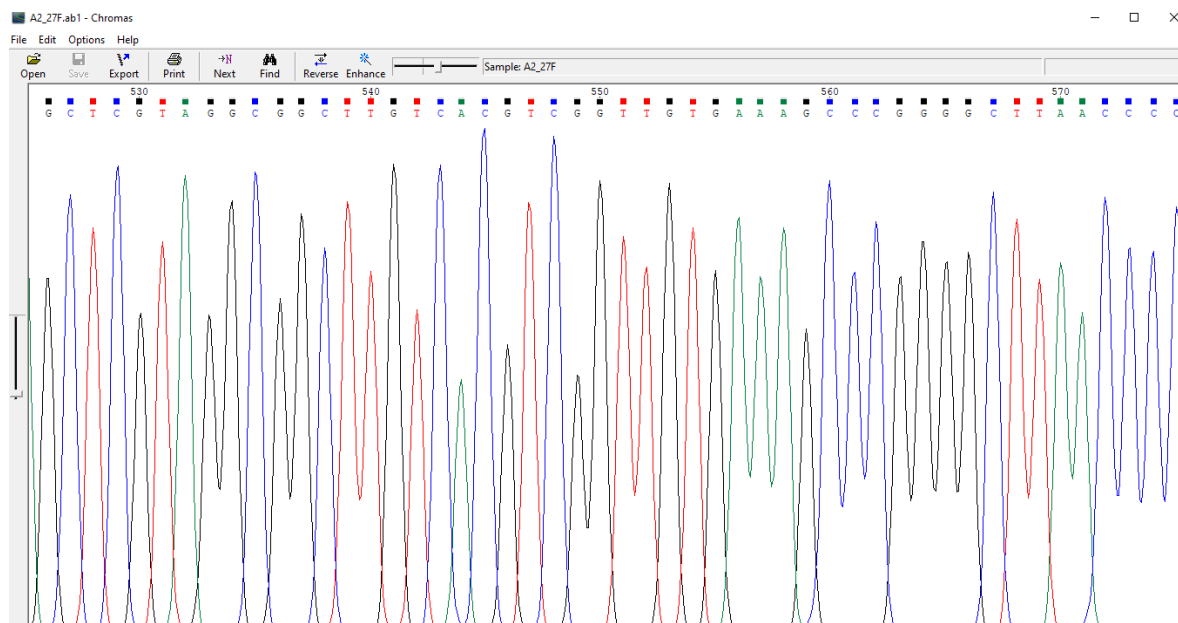


Fig. 13 Ejemplo de electroferograma del gen 27F del aislado ARI_A20-5 analizado a través del programa Chromas 2.6.6 ©.

La secuencia obtenida se pasó al formato FASTA para su análisis a través del sitio web de BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool) con la base de datos disponibles en el sitio del “*National Center for Biotechnology Information*” (NCBI), se buscó un resultado con una similitud mayor al 97% para la identificación del género y la especie de los aislados de actinobacterias (Fig. 14).

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Other reports Distance tree of results MSA viewer

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download Select columns Show 100

☒ select all 100 sequences selected

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒ Streptomyces cellulosa strain ROA126 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Streptomyces cellulosa	2543	2543	100%	0.0	99.57%	1435	MW989992.1
☒ Streptomyces sp. CPE357 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Streptomyces sp. CPE357	2543	2543	100%	0.0	99.57%	1431	JN969027.1
☒ Streptomyces heilongjiangensis strain FREP14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Streptomyces heilongjiangensis	2538	2538	100%	0.0	99.50%	1523	KY628828.1
☒ Streptomyces sp. Heilongjiang20134 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Streptomyces sp. Heilongjiang...	2538	2538	100%	0.0	99.50%	1523	KF804152.1
☒ Streptomyces sp. Heilongjiang2013B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Streptomyces sp. Heilongjiang...	2538	2538	100%	0.0	99.50%	1525	KF804151.1
☒ Streptomyces variabilis strain R9-526 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Streptomyces variabilis	2538	2538	100%	0.0	99.50%	1457	JQ659995.1
☒ Streptomyces cellulosa gene for 16S rRNA, partial sequence, strain old-30-2-1	Streptomyces cellulosa	2538	2538	100%	0.0	99.50%	1434	AB562483.1
☒ Streptomyces sp. strain ZZ820 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Streptomyces sp.	2532	2532	100%	0.0	99.43%	1514	MH388488.1
☒ Streptomyces sp. strain MJM16145 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Streptomyces sp.	2532	2532	100%	0.0	99.43%	1471	MG980063.1
☒ Uncultured Streptomyces sp. clone ASC810 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured Streptomyces sp.	2531	2531	100%	0.0	99.43%	1521	JQ358599.1
☒ Streptomyces sp. strain MMS21-DH1MA22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Streptomyces sp.	2527	2527	100%	0.0	99.36%	1457	M7960294.1
☒ Uncultured Streptomyces sp. clone ASC786 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured Streptomyces sp.	2527	2527	100%	0.0	99.36%	1522	JQ358598.1
☒ Streptomyces sp. B4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Streptomyces sp. B4	2527	2527	100%	0.0	99.36%	1463	DQ086265.1

Fig. 14 Ejemplo de resultado de similitudes significativas en BLAST® del gen completo de 1,500 pb, del aislado de la actinobacteria ARI_A8-4.

Con base en los resultados obtenidos de los aislados se definió el género y la especie basado en los porcentajes de similitudes (Tabla 7).

Tabla 7. Identificación de aislados de actinobacterias (ARI) basado en la secuencia parcial de 1,500 pb de gen 16S rDNA.

CEPA	% DE SIMILITUD	ID NBCI-BLAST	NÚMERO DE ACCESO
A1-7	100%	<i>Streptomyces radiopugnans</i>	MN179921.1
A2-2	92.64%	<i>Streptomyces</i> sp.	OL913953.1
A2-5	NID	NID	-
A4-9	98.01%	<i>Streptomyces chattanoogensis</i>	JN566019.1
A4-11	98.27%	<i>Streptomyces</i> sp	MK934987.1
A4-15	NID	NID	-
A4-18	98.35%	<i>Streptomyces</i> sp	KT274755.1
A4-26	86.97%	<i>Streptomyces</i> sp.	KU921429.1
A4-31	97.35%	<i>Streptomyces diastaticus</i>	MF988679.1
A4-33	NID	NID	-
A4-49	97%	<i>Streptomyces</i> sp.	MT225687.1
A6-12	99.76%	<i>Streptomyces pseudogriseolus</i>	OL468407.1
		<i>Streptomyces siastaticus</i>	MZ389921.1

A7-3	98.58%	<i>Streptomyces cellulosae</i>	OP745475.1
A7-13	97.95%	<i>Streptomyces labedae</i>	MT463534.1
		<i>Streptomyces fragilis</i>	MT490872.1
A7-17	96%	<i>Streptomyces</i> sp.	MN093307.1
A7-22	NID	NID	-
A8-4	99.57%	<i>Streptomyces cellulosae</i>	MW989992.1
A10-3	98.29%	<i>Actinomycetia bacterium</i>	MW448360.1
A10-13	100%	<i>Streptomyces aureus</i>	MN203732.1
A11-10	99.21%	<i>Streptomyces flaveolus</i>	KU647253.1
A11-29	NID	NID	-
A11-30	NID	NID	-
A11-36	97.40%	<i>Streptomyces</i> sp	KM507718.1
A11-37	NID	NID	-
A13-11	98.05%	NID	-
A15-11	99.86%	<i>Streptomyces vinaceus</i>	CP023692.1
		<i>Streptomyces cirratus</i>	KR063212.1
A16-3	99.86%	<i>Streptomyces aureus</i>	EU841615.1
A16-4	90.65%	<i>Streptomyces pilosus</i>	OM836431.1
A16-7	93.75%	<i>Streptomyces aureoverticillatus</i>	MH265966.1
A16-52	NID	contaminada	-
A18-14	90.45%	<i>Streptomyces</i> sp.	KX674567.1
A18-15	98.98%	<i>Streptomyces flaveolus</i>	MW563930.1
A20-1	99.64%	<i>Actinobacteria bacterium</i>	MG515743.1
		<i>Streptomyces lividans</i>	KC898819.1
A20-2	100%	<i>Streptomyces flaveolus</i>	KU647253.1
A20-3	98.16%	<i>Streptomyces griseorubens</i>	KP718552.1
A20-5	99.7%	<i>Streptomyces flaveolus</i>	KU647253.1
A20-6	97.85%	<i>Streptomyces violaceolatus</i>	KT363060.1
A20-13	NID	NID	-
A30-7	99.80%	<i>Streptomyces nigrescens</i>	LC027721.1
A30-14	NID	NID	-
A30-32	99.56%	<i>Streptomyces aureus</i>	EU841615.1

Al analizar la Tabla 7 se observa que la mayoría de las cepas identificadas corresponden al género *Streptomyces* con un 70.9%, se obtuvieron especies que corresponden a géneros diferentes, la cepa ARI_A10-3 identificada como *Actinomycetia bacterium* (2.4%) y la cepa ARI_A20-1 identificada como *Actinobacteria bacterium* (2.4%), el 24.3% de los aislados no fueron identificados por diversas razones: no fueron encontradas similitudes en la base de datos, no fue suficiente el ADN para el laboratorio que se contrató para secuenciación o únicamente se nos envió una de las dos cadenas y un caso tuvo contaminación por un bacilo esporulado.

4. Conclusión

Los microorganismos recuperados de la rizósfera de *Persea americana* fueron extraídos de unidades de producción orgánica por lo que se considera pueden tener mejores posibilidades de funcionamiento como PGP. El protocolo de purificación fue modificado con éxito por lo que se aseguró su aislamiento y con ello se garantiza el estudio de los microorganismos en el presente estudio y en trabajos posteriores al hacer una colección de los mismos.

Si bien DNAzol ha sido reportado como un buen método de extracción de ADN, para el caso del ADN procedente de actinobacterias, la adición del tratamiento con microondas, proteinasa K y RNasa, mejoran de manera sobresaliente su extracción, ofreciendo altas expectativas en calidad y cantidad de ADN. Debido a estas observaciones, el protocolo propuesto de extracción de ADN en este trabajo es considerado como un ADN miniprep rápida, eficiente y asequible.

Se obtuvieron en su mayoría cepas del género *Streptomyces*. Este resultado nos ofrece un sin número de ventajas, debido a que es un género fácil de crecer y reproducir, es el de mayor abundancia en los suelos fértiles, además, se ha encontrado que el género *Streptomyces* tiene una dinámica simbiótica con la mayoría de las rizósferas y es el género con mayor producción de moléculas y enzimas con aprovechamiento biotecnológico, por lo que se tienen altas expectativas de su uso como inoculante y como promotor del crecimiento vegetal.

Referencias

1. Datos Abiertos | Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera | Gob.Mx Available online: <http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos.php> (accessed on 8 January 2023).
2. Behera, B.C.; Singdevsachan, S.K.; Mishra, R.R.; Dutta, S.K.; Thatoi, H.N. Diversity, Mechanism and Biotechnology of Phosphate Solubilising Microorganism in Mangrove—A Review. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2014**, *3*, 97–110, doi:10.1016/j.bcab.2013.09.008.
3. Sharma, M.; Dangi, P.; Choudhary, M. Actinomycetes: Source, Identification, and Their Applications. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* **2014**, 801–832.
4. Khamna, S.; Yokota, A.; Lumyong, S. Actinomycetes Isolated from Medicinal Plant Rhizosphere Soils: Diversity and Screening of Antifungal Compounds, Indole-3-Acetic Acid and Siderophore Production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *25*, 649–655, doi:10.1007/s11274-008-9933-x.
5. Cardona, G.I.; Peña-Venegas, C.P.; Ruiz-García, M. [Http://Www.Scielo.Sa.Cr/Scielo.Php?Script=sci_abstract&pid=S0034-77442009000400017&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0034-77442009000400017&lng=en&nrm=iso&tlng=en). *Rev. Biol. Trop.* **2009**, *57*, 1119–1139.
6. Sharma, D.; Gahtyari, N.C.; Chhabra, R.; Kumar, D. Role of Microbes in Improving Plant Growth and Soil Health for Sustainable Agriculture. In *Advances in Plant Microbiome and Sustainable Agriculture: Diversity and Biotechnological Applications*; Yadav, A.N., Rastegari, A.A., Yadav, N., Kour, D., Eds.; Microorganisms for Sustainability; Springer: Singapore, 2020; pp. 207–256 ISBN 9789811532085.
7. Nouioui, I.; Carro, L.; García-López, M.; Meier-Kolthoff, J.P.; Woyke, T.; Kyrpides, N.C.; Pukall, R.; Klenk, H.-P.; Goodfellow, M.; Göker, M. Genome-Based Taxonomic Classification of the Phylum Actinobacteria. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*.
8. Ludwig, W.; Euzéby, J.; Schumann, P.; Busse, H.-J.; Trujillo, M.E.; Kämpfer, P.; Whitman, W.B. Road Map of the Phylum Actinobacteria. In *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Five The Actinobacteria, Part A and B*; Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.-J., Trujillo, M.E., Suzuki, K., Ludwig, W., Whitman, W.B., Eds.; Springer: New York, NY, 2012; pp. 1–28 ISBN 978-0-387-68233-4.
9. Salam, N.; Jiao, J.-Y.; Zhang, X.-T.; Li, W.-J. Update on the Classification of Higher Ranks in the Phylum Actinobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2020**, *70*, 1331–1355, doi:10.1099/ijsem.0.003920.
10. Barka, E.A.; Vatsa, P.; Sanchez, L.; Gaveau-Vaillant, N.; Jacquard, C.; Klenk, H.-P.; Clément, C.; Ouhdouch, Y.; van Wezel, G.P. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2016**, *80*, 1–43, doi:10.1128/MMBR.00019-15.
11. Goodfellow, M.; Ferguson, E.V.; Sanglier, J.-J. Numerical Classification and Identification of Streptomyces Species — a Review. *Gene* **1992**, *115*, 225–233, doi:10.1016/0378-1119(92)90563-5.
12. Goodfellow, M.; Williams, S.T. ECOLOGY OF ACTINOMYCETES. *Annu. Rev. Microbiol.* **1983**, *37*, 189–216, doi:10.1146/annurev.mi.37.100183.001201.
13. Bhatti, A.A.; Haq, S.; Bhat, R.A. Actinomycetes Benefaction Role in Soil and Plant Health. *Microb. Pathog.* **2017**, *111*, 458–467, doi:10.1016/j.micpath.2017.09.036.
14. Flärdh, K.; Buttner, M.J. Streptomyces Morphogenetics: Dissecting Differentiation in a Filamentous Bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, *7*, 36–49, doi:10.1038/nrmicro1968.
15. Yagüe, P.; Willemse, J.; Koning, R.I.; Rioseras, B.; López-García, M.T.; Gonzalez-Quiñonez, N.; Lopez-Iglesias, C.; Shliaha, P.V.; Rogowska-Wrzesinska, A.; Koster, A.J.; et al.

- Subcompartmentalization by Cross-Membranes during Early Growth of Streptomyces Hyphae. *Nat. Commun.* **2016**, 7, 12467, doi:10.1038/ncomms12467.
16. Alonso, A.N.; Pomposiello, P.J.; Leschine, S.B. Biofilm Formation in the Life Cycle of the Cellulolytic Actinomycete Thermobifida Fusca. *Biofilms* **2008**, 1–11, doi:10.1017/S1479050508002238.
 17. Solanki, M.K.; Malviya, M.K.; Wang, Z. Actinomycetes Bio-Inoculants: A Modern Prospectus for Plant Disease Management. In *Plant Growth Promoting Actinobacteria: A New Avenue for Enhancing the Productivity and Soil Fertility of Grain Legumes*; Subramaniam, G., Arumugam, S., Rajendran, V., Eds.; Springer: Singapore, 2016; pp. 63–81 ISBN 978-981-10-0707-1.
 18. Bérdy, J. Bioactive Microbial Metabolites: A Personal View. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2005**, 58, 1–26, doi:10.1038/ja.2005.1.
 19. Shimizu, M. Endophytic Actinomycetes: Biocontrol Agents and Growth Promoters. In *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses*; Maheshwari, D.K., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2011; pp. 201–220 ISBN 978-3-642-20331-2.
 20. Rahlwes, K.C.; Sparks, I.L.; Morita, Y.S. Cell Walls and Membranes of Actinobacteria. In *Bacterial Cell Walls and Membranes*; Kuhn, A., Ed.; Subcellular Biochemistry; Springer International Publishing: Cham, 2019; Vol. 92, pp. 417–469 ISBN 978-3-030-18767-5.
 21. Groth, I.; Schumann, P.; Weiss, N.; Martin, K.; Rainey, F.A. Agrococcus Jenensis Gen. Nov., Sp. Nov., a New Genus of Actinomycetes with Diaminobutyric Acid in the Cell Wall. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1996**, 46, 234–239, doi:10.1099/00207713-46-1-234.
 22. Lechevalier, M.P.; Lechevalier, H. Chemical Composition as a Criterion in the Classification of Aerobic Actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1970**, 20, 435–443, doi:10.1099/00207713-20-4-435.
 23. *The Prokaryotes*; Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E., Eds.; Springer New York: New York, NY, 2006; ISBN 978-0-387-25493-7.
 24. Balagurunathan, R.; Radhakrishnan, M.; Shanmugasundaram, T.; Gopikrishnan, V.; Jerrine, J. Characterization and Identification of Actinobacteria. In *Protocols in Actinobacterial Research*; Balagurunathan, R., Radhakrishnan, M., Shanmugasundaram, T., Gopikrishnan, V., Jerrine, J., Eds.; Springer Protocols Handbooks; Springer US: New York, NY, 2020; pp. 39–64 ISBN 978-1-07-160728-2.
 25. Franco-Correa, M.; Chavarro-Anzola, V. Actinobacteria as Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. In *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*; Dhanasekaran, D., Jiang, Y., Eds.; InTech, 2016 ISBN 978-953-51-2248-7.
 26. Celler, K.; Koning, R.I.; Willemse, J.; Koster, A.J.; van Wezel, G.P. Cross-Membranes Orchestrate Compartmentalization and Morphogenesis in Streptomyces. *Nat. Commun.* **2016**, 7, ncomms11836, doi:10.1038/ncomms11836.
 27. Brennan, P.J.; Nikaido, H. The Envelope of Mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, 64, 29–63, doi:10.1146/annurev.bi.64.070195.000333.
 28. Chiaradia, L.; Lefebvre, C.; Parra, J.; Marcoux, J.; Burlet-Schiltz, O.; Etienne, G.; Tropis, M.; Daffé, M. Dissecting the Mycobacterial Cell Envelope and Defining the Composition of the Native Mycomembrane. *Sci. Rep.* **2017**, 7, 12807, doi:10.1038/s41598-017-12718-4.
 29. Zuber, B.; Chami, M.; Houssin, C.; Dubochet, J.; Griffiths, G.; Daffé, M. Direct Visualization of the Outer Membrane of Mycobacteria and Corynebacteria in Their Native State. *J. Bacteriol.* **2008**, 190, 5672–5680, doi:10.1128/JB.01919-07.
 30. Lerat, S.; Forest, M.; Lauzier, A.; Grondin, G.; Lacelle, S.; Beaulieu, C. Potato Suberin Induces Differentiation and Secondary Metabolism in the Genus Streptomyces. *Microbes Environ.* **2009**, advpub, 1111240331–1111240331, doi:10.1264/jsme2.ME11282.

31. Nonomura, H.; Ohara, Y. Distribution of actinomycetes in soil. VI. A culture method effective for both preferential isolation and enumeration of Microbispora and Streptosporangium strains in soil. *J Ferment Technol* **1969**.
32. Bergey, D.H.; Buchanan, R.E.; Gibbons, N.E.; American Society for Microbiology *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*; Williams & Wilkins Co.: Baltimore, 1974;
33. NONOMURA, H. Key for Classification and Identification of 458 Species of the Streptomycetes Included in ISP. *J Ferment Technol* **1974**, *52*, 78–92.
34. Nonomura, H. Studies on Isolation, Taxonomy and Ecology of Soil Actinomycetes (in Japanese with English Abstract). *日本放線菌学会誌* **1989**, *3*, 45–54, doi:10.3209/saj.3_45.
35. Sabaou, N.; Boudjella, H.; Bennadji, A.; Mostefaoui, A.; Zitouni, A.; Lamari, L.; Bennadji, H.; Lefèbvre, G.; Germain, P. Les Sols Des Oasis Du Sahara Algérien, Source d'actinomycètes, Rares Producteurs d'antibiotiques. *Sci. Chang. Planétaires Sécher.* **1998**, *9*, 147–153.
36. Khanna, M.; Solanki, R.; Lal, R. Selective Isolation of Rare Actinomycetes Producing Novel Antimicrobial Compounds. *Int J Adv Biotechnol Res* **2011**, *2*, 357–375.
37. Stackebrandt, E.; Rainey, F.A.; Ward-Rainey, N.L. Proposal for a New Hierarchic Classification System, Actinobacteria Classis Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1997**, *47*, 479–491, doi:10.1099/00207713-47-2-479.
38. Kamil, I.; Talha, G.; Fadime, zdemir-K.; Elif, C. Molecular Identification of Different Actinomycetes Isolated from East Black Sea Region Plateau Soil by 16S rDNA Gene Sequencing. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2014**, *8*, 878–887, doi:10.5897/AJMR2013.6174.
39. Stach, J.E.M.; Maldonado, L.A.; Masson, D.G.; Ward, A.C.; Goodfellow, M.; Bull, A.T. Statistical Approaches for Estimating Actinobacterial Diversity in Marine Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 6189–6200, doi:10.1128/AEM.69.10.6189-6200.2003.
40. Pathalam, G.; Rajendran, H.A.D.; Appadurai, D.R.; Gandhi, M.R.; Michael, G.P.; Savarimuthu, I.; Naif, A.A.-D. Isolation and Molecular Characterization of Actinomycetes with Antimicrobial and Mosquito Larvicidal Properties. *Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.* **2017**, *6*, 209–217, doi:10.1016/j.bjbas.2017.04.002.
41. Nithya, K.; Muthukumar, C.; Biswas, B.; Alharbi, N.S.; Kadaikunnan, S.; Khaled, J.M.; Dhanasekaran, D. Desert Actinobacteria as a Source of Bioactive Compounds Production with a Special Emphases on Pyridine-2,5-Diacetamide a New Pyridine Alkaloid Produced by Streptomyces Sp. DA3-7. *Microbiol. Res.* **2018**, *207*, 116–133, doi:10.1016/j.micres.2017.11.012.
42. Villegas-Rivera, G.; Vargas-Cabrera, Y.; González-Silva, N.; Aguilera-García, F.; Gutiérrez-Vázquez, E.; Bravo-Patiño, A.; Cajero-Juárez, M.; Baizabal-Aguirre, V.M.; Valdez-Alarcón, J.J. Evaluation of DNA Extraction Methods of Rumen Microbial Populations. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *29*, 301–307, doi:10.1007/s11274-012-1183-2.
43. Krause, D.O.; Smith, W.J.M.; McSweeney, C.S.Y. 2004 Use of Community Genome Arrays (CGAs) to Assess the Effects of Acacia Angustissima on Rumen Ecology. *Microbiology* **150**, 2899–2909, doi:10.1099/mic.0.26953-0.
44. Salgado, A.; Ramírez, N.; Sandoval, E.; Sandoval, H. Fast Method for DNA Extraction in Nocardia and Saccharomonospora. *J. Mycol. Médicale* **2008**, *18*, 100–102, doi:10.1016/j.mycmed.2008.04.005.
45. Pitcher, D.G.; Saunders, N.A.; Owen, R.J. Rapid Extraction of Bacterial Genomic DNA with Guanidium Thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* **1989**, *8*, 151–156, doi:10.1111/j.1472-765X.1989.tb00262.x.

46. Pérez, N.-O.; Olivera, H.; Vásquez, L.; Valdés, M. Genetic Characterization of Mexican *Frankia* Strains Nodulating *Casuarina Equisetifolia*. *Can. J. Bot.* **1999**, *77*, 1214–1219, doi:10.1139/b99-075.
47. Rodríguez-García, Á.; Mares, R.; Muñoz, P.; Meléndez-López, S.; Licea-Navarro, A.; Ramos, M. DNA Extraction with DNAzol and LAMP, Performed in a Heating Block as a Simple Procedure for Detection of Mycobacterium Tuberculosis in Sputum Specimens. *Methods Protoc.* **2018**, *1*, 37, doi:10.3390/mps1040037.
48. Goldenberger, D.; Perschil, I.; Ritzler, M.; Altwegg, M. A Simple "Universal" DNA Extraction Procedure Using SDS and Proteinase K Is Compatible with Direct PCR Amplification. *Genome Res.* **1995**, *4*, 368–370.
49. Shahriar, M.; Haque, M.R.; Kabir, S.; Dewan, I.; Bhuyian, M.A. Effect of Proteinase-K on Genomic DNA Extraction from Gram-Positive Strains. *Stamford J. Pharm. Sci.* **2011**, *4*, 53–57, doi:10.3329/sjps.v4i1.8867.
50. Franco-Correa, M.; Quintana, A.; Duque, C.; Suarez, C.; Rodríguez, M.X.; Barea, J.-M. Evaluation of Actinomycete Strains for Key Traits Related with Plant Growth Promotion and Mycorrhiza Helping Activities. *Appl. Soil Ecol.* **2010**, *45*, 209–217, doi:10.1016/j.apsoil.2010.04.007.
51. H.Zar, J. Biostatistical Analysis. *Phys. Sci. Books* **2010**.
52. Publicación Available online: <https://www.inegi.org.mx/app/biblioteca/ficha.html?upc=702825293048> (accessed on 13 December 2022).
53. Kloster, N.S.; Azcarate, M.P.; Babinec, F.J.; Bono, A. Comparación de Técnicas de Medición Del PH Del Suelo: PH En Pasta de Saturación y En Relación Suelo: Agua 1: 2, 5. In Proceedings of the XXI Congreso argentino de Ciencia del Suelo. Semiarido un desafío para la ciencia del suelo; 2008; Vol. 13.
54. Hayakawa, M. Studies on the Isolation and Distribution of Rare Actinomycetes in Soil. *Actinomycetologica* **2008**, *22*, 12–19, doi:10.3209/saj.SAJ220103.
55. Domínguez-González, K.G.; Robledo-Medrano, J.J.; Valdez-Alarcón, J.J.; Hernández-Cristobal, O.; Martínez-Flores, H.E.; Cerna-Cortés, J.F.; Garnica-Romo, M.G.; Cortés-Martínez, R. Streptomyces Spp. Biofilmed Solid Inoculant Improves Microbial Survival and Plant-Growth Efficiency of Triticum Aestivum. *Appl. Sci.* **2022**, *12*, 11425, doi:10.3390/app122211425.
56. Murashige, T.; Skoog, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* **1962**, *15*, 473–497, doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
57. Hammer, E. Archaeological Assessments of Land Use in Mesopotamia and Arabia at 6000 BP 2020.
58. Weisburg, W.G.; Barns, S.M.; Pelletier, D.A.; Lane, D.J. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 697–703, doi:10.1128/jb.173.2.697-703.1991.
59. DeLong, E.F. Archaea in Coastal Marine Environments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, *89*, 5685–5689, doi:10.1073/pnas.89.12.5685.
60. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool Available online: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (accessed on 13 December 2022).
61. Ferrer, C.M.; Olivete, E.; Orias, S.L.; Rocas, M.R.; Juan, S.; Dungca, J.Z.; Mahboob, T.; Barusrux, S.; Nissapatorn, V. A Review on Streptomyces Spp. as Plant-Growth Promoting Bacteria (PGPB). *Asian J Pharmacogn* **2018**, *2*, 32–40.
62. Viaene, T.; Langendries, S.; Beirinckx, S.; Maes, M.; Goormachtig, S. Streptomyces as a Plant's Best Friend? *FEMS Microbiol. Ecol.* **2016**, *92*.
63. Lin, L.; Guo, W.; Xing, Y.; Zhang, X.; Li, Z.; Hu, C.; Li, S.; Li, Y.; An, Q. The Actinobacterium Microbacterium Sp. 16SH Accepts PBBR1-Based PPROBE Vectors, Forms Biofilms, Invades

- Roots, and Fixes N₂ Associated with Micropropagated Sugarcane Plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *93*, 1185–1195, doi:10.1007/s00253-011-3618-3.
64. Amaresan, N.; Kumar, K.; Naik, J.H.; Bapatla, K.G.; Mishra, R.K. Chapter 8 - Streptomyces in Plant Growth Promotion: Mechanisms and Role. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*; Singh, B.P., Gupta, V.K., Passari, A.K., Eds.; Elsevier, 2018; pp. 125–135 ISBN 978-0-444-63994-3.
 65. Goodfellow, M. Numerical Taxonomy of Some Nocardioform Bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **1971**, *69*, 33–80, doi:10.1099/00221287-69-1-33.
 66. Goodfellow, M.; Ferguson, E.V.; Sanglier, J.-J. Numerical Classification and Identification of Streptomyces Species — a Review. *Gene* **1992**, *115*, 225–233, doi:10.1016/0378-1119(92)90563-5.
 67. Varadaraj, K.; Skinner, D.M. Denaturants or Cosolvents Improve the Specificity of PCR Amplification of a G + C-Rich DNA Using Genetically Engineered DNA Polymerases. *Gene* **1994**, *140*, 1–5, doi:10.1016/0378-1119(94)90723-4.
 68. Wu, D.Y.; Ugozzoli, L.; Pal, B.K.; Qian, J.; Wallace, R.B. The Effect of Temperature and Oligonucleotide Primer Length on the Specificity and Efficiency of Amplification by the Polymerase Chain Reaction. *DNA Cell Biol.* **1991**, *10*, 233–238, doi:10.1089/dna.1991.10.233.
 69. Sarkar, G.; Kapelner, S.; Sommer, S.S. Formamide Can Dramatically Improve the Specificity of PCR. *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 7465.
 70. Lu, Y.H.; Nègre, S. Use of Glycerol for Enhanced Efficiency and Specificity of PCR Amplification. *Trends Genet.* **1993**, *9*, 297, doi:10.1016/0168-9525(93)90238-d.
 71. Henke, W.; Herdel, K.; Jung, K.; Schnorr, D.; Loening, S.A. Betaine Improves the PCR Amplification of GC-Rich DNA Sequences. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3957–3958, doi:10.1093/nar/25.19.3957.
 72. Ralser, M.; Querfurth, R.; Warnatz, H.-J.; Lehrach, H.; Yaspo, M.-L.; Krobitsch, S. An Efficient and Economic Enhancer Mix for PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *347*, 747–751, doi:10.1016/j.bbrc.2006.06.151.
 73. Cha, R.S.; Thilly, W.G. Specificity, Efficiency, and Fidelity of PCR. *Genome Res.* **1993**, *3*, S18–S29, doi:10.1101/gr.3.3.S18.
 74. Kumar, V.; Bharti, A.; Gusain, O.; Bisht, G. An Improved Method for Isolation of Genomic DNA from Filamentous Actinomycetes. *undefined* **2010**.
 75. Perez, N.; Olivera, H.; Vásquez, L.; Valdes, M. Genetic Characterization of Mexican Frankia Strains Nodulating Casuarina Equisetifolia. *Can. J. Bot.* **2011**, *77*, 1214–1219, doi:10.1139/b99-075.

Capítulo II.

Ensayos de formación de biopelículas

1. Resumen

La formación de las biopelículas ha sido reportada en los tres dominios: Archaea, Bacteria y Eukarya, incluyendo diversos phylum como *Actinobacteria*. Una biopelícula puede estar conformada por una sola especie bacteriana, o por una comunidad compleja de especies genéticamente distintas, capaces de adaptarse a diferentes ambientes y superficies, haciendo modificaciones en el material de la matriz que conforma la biopelícula para adquirir la habilidad de adhesión dependiendo de la superficie, prefiriendo las superficies rugosas que proveen de una mayor área superficial de adhesión. Las biopelículas bacterianas tienen una tolerancia de hasta 1,000 veces más que las bacterias planctónicas frente a condiciones hostiles y estrés ambiental. Existen pocos estudios sobre la formación de biopelículas del phylum *Actinobacteria*, solamente 9 géneros muestran habilidad de formar biopelícula, y no todas sus especies ni en todas las superficies. Sin embargo, se sabe que la matriz extracelular que conforma su biopelícula, presenta una composición mayoritaria de proteínas. En el presente capítulo se evaluó la capacidad de 41 cepas de actinobacterias para la formación de biopelículas y colonización por medio de tres pruebas: Cristal Violeta (CV), Rojo Congo (RC) y Desplazamiento o Sliding Test (ST), con la finalidad de seleccionar las mejores cepas formadoras de biopelícula, para la inducción de ésta sobre el mineral perlita que forma parte de bioinoculante, producto final de éste trabajo. Se concluye que, las coincidencias encontradas en todas las pruebas presentan consistencia en las cepas ARI_A20-3 y ARI_A20-5. Las demás cepas pueden ser elegibles una vez que se comparen con las pruebas PGP (Plant Growth Promoting) y con las pruebas de inducción de biopelícula sobre el vehículo mineral.

Palabras clave: Biopelícula, Cristal Violeta, Rojo Congo, Desplazamiento, Perlita

Abstract

The biofilm formation has been reported in the 3 three domains: Archea, Bacteria and Eukarya, including various phyla such as Actinobacteria. A biofilm can be made up of a single bacterial species, or by a complex community of genetically distinct species, capable of adapting to different environments and surfaces, making modifications to the matrix material that makes up the biofilm to acquire the adhesion ability depending on the surface, preferring rough surfaces that provide a greater surface area of adhesion. Bacterial biofilms are up to 1,000 times more tolerant than planktonic bacteria against hostile conditions and environmental stress. There are few studies about biofilm formation of *Actinobacteria* phylum, only 9 genera show the ability to form biofilms, and not all their species or on all surfaces. However, it is known that the extracellular matrix that makes up its biofilm has a majority protein composition. In this chapter, the capacity of 41 strains of actinobacteria for the formation of biofilms was evaluated by means of 3 tests: Crystal Violet (CV), Congo Red (RC) and Sliding Test (ST), with the purpose of selecting the best biofilm-forming strains, for its induction on the perlite mineral that is part of the bioinoculant, the final product of this work. It is concluded that, the coincidences found in all the tests, show consistency in the ARI_A20-3 and ARI_A20-5 strains. The other strains may be eligible once they are compared with the PGP (Plant Growth Promoting) tests and biofilm induction test on the perlite mineral carrier.

Keywords: Biofilm, Crystal Violet, Congo Red, Displacement, Perlite.

2. Introducción

El término biofilm o biopelícula fue asignado y descrito en 1978 por Bill Costerton. Desde Costerton y hasta ahora, la definición de este término se entiende, como un sistema colectivo viviente con una estructura característica de microcolonias (15-20%) [1,2] envueltas y protegidas por una matriz hidratada conformada por proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos (75-80%) [2]; interconectadas por canales de transporte de agua y nutrientes [3].

El estado de biopelícula juega un rol importante en la supervivencia de la comunidad microbiana, haciendo que esta tenga una tolerancia 1000 veces más que las bacterias planctónicas frente a condiciones hostiles, como lo son el estrés ambiental [4], cambios de pH, radiación UV, desecación, predación, cambios osmóticos y el estrés oxidativo [3]; además del aprovechamiento de nutrientes y nuevas adquisiciones genéticas [5–7].

Las biopelículas se forman en diferentes etapas:

- 1) Adherencia reversible de las células planctónicas,
- 2) Adherencia irreversible mediada por la formación de material exopolimérico.
- 3) Formación de microcolonias e inicio de la maduración de la biopelícula.
- 4) Formación de una estructura con células empacadas con la formación de canales para el transporte de agua y nutrientes. Se detiene la división. Ocurre la maduración.
- 5) Disolución de la biopelícula, recuperación de la movilidad, dispersión de las células planctónicas. Búsqueda de una nueva superficie para la formación de una nueva biopelícula [3,7]. Siendo la adhesión a una superficie, la etapa más crucial en todos los microorganismos capaces de formar biopelículas [6].

La inducción de biopelículas cobra su mayor importancia debido a que cuando las células se inmovilizan en una biopelícula, éstas proveen de metabolitos

específicos al entorno en comparación con las células suspendidas en cultivo o planctónicas, así, se obtienen la vasta mayoría de metabolitos secundarios con diversas aplicaciones biotecnológicas, y esto se ha aprendido de la observación de la formación de biopelículas de forma natural en diferentes ambientes y superficies [4,8].

Una biopelícula puede estar conformada por una sola especie bacteriana, o por una comunidad compleja de especies genéticamente distintas pertenecientes a los tres dominios: Archea, Bacteria y Eukarya, incluyendo diversos phylum como *Actinobacteria* [5], que son capaces de adaptarse a diferentes ambientes y superficies (bióticas y abióticas), haciendo modificaciones en su material exopolisacárido (EPS) y habilidades de adhesión dependiendo de la superficie, prefiriendo las superficies rugosas que proveen de una mayor área superficial de adhesión [4,9–14].

El ciclo de vida de las actinobacterias es único. Este comienza con la germinación de su forma de esporas, seguida del desarrollo de hifas ramificadas denominadas micelio vegetativo, las que posteriormente se diferenciarán en estructuras reproductivas especializadas denominadas micelio aéreo. A pesar de la abundancia de *Actinobacteria*, existen pocos reportes disponibles acerca de la formación de biopelículas en el phylum, se sabe que sólo nueve géneros muestran habilidad para formar biopelículas, pero los reportes acerca de la composición de la matriz extracelular de algunos de ellos, son limitados o pobremente entendidos, incluso a nivel molecular. Aunque el género *Streptomyces* provee el 70% de los antibióticos comercialmente disponibles, no existen estudios de la formación de biopelícula de este [6,15].

Sin embargo, de los estudios encontrados de algunas especies de estos nueve géneros, se ha comprobado la formación de estas sobre diversos materiales orgánicos e inorgánicos como las raíces de las plantas [16], celulosa,

[8] vidrio [17], metales [6], teflón; con fines de degradación de materiales; cemento, concreto, minerales de monumentos históricos [6,8] y poliestireno [18].

Se sabe, por ejemplo, que el género *Streptomyces* está conformado por 778 especies [19] y que la composición de la pared, difiere entre especies y es totalmente diferente de otros grupos de bacterias, por lo que la constitución de la matriz de la biopelícula también es diferente al tener áreas de hifas hidrofóbicas e hidrofílicas empaquetadas en una capa proteica constituida por monómeros de chaplins y rodmins que forman a su vez una capa denominada rodlet [6,15,20].

El género *Streptomyces* también crece de forma micelial, este micelio se ha encontrado colonizando diferentes tipos de rizósfera, secretando numerosos metabolitos secundarios y enzimas que les permite degradar la materia orgánica [21–23], haciendo más fácil el acceso a los nutrientes por parte de la planta y usando a su vez, estos nutrientes y los exudados de la planta como nutrientes para seguir extendiendo sus micelios. En esta relación simbiótica, puede existir la formación de biopelículas sobre las raíces de la planta o en la misma rizósfera, aunque la información de este comportamiento sigue siendo limitada [16,23].

En medios libres o superficies interface aire-líquido, se ha observado la formación de “pellets” o grandes cúmulos suspendidos conformados por hifas, las cuales pueden tener su origen al contacto con pequeñas partículas libres, resultando en pellets de muchos milímetros e incluso centímetros de diámetro [6,15].

El crecimiento de una biopelícula en general es el resultado de un complejo proceso que involucra el transporte de moléculas orgánicas e inorgánicas entre las células, condiciones medio ambientales, una subsecuente adsorción a la superficie y, finalmente, una adhesión irreversible seguida por la producción de una matriz extracelular. Todos estos procesos están regulados por diversos

sistemas de intercambio de moléculas de comunicación denominada “*Quorum Sensing*” (QS) [4].

El QS, regula la formación y establecimiento de la biopelícula, dependiendo del número de bacterias que conformen la unidad [14,24]. El sistema de γ -butirolactona es casi exclusivo del phylum *Actinobacteria*, adicionalmente los metilenomicin furanos, AI-2 y AHL son moléculas de señalización que también se han reportado en *Actinobacteria* [25], esto por estudios llevados en el género *Streptomyces* [6,25].

En este capítulo se presenta el análisis de las pruebas de biopelículas aplicadas a las 41 cepas de actinobacterias del presente proyecto con la finalidad de evaluar las mejores opciones para la inducción de biopelícula sobre el soporte mineral perlita, que será utilizado en el inoculante sólido en biopelícula.

3. Materiales y Métodos

3.1. Pruebas de formación de biopelícula y colonización

3.1.1. Prueba de cristal violeta (CV)

Se inocularon tres colonias en cultivo líquido caldo Extracto de Malta (EM) a 30°C, 7 días, y 120 rpm. Se ajustaron 1,000 μ L a 600 nm Densidad Óptica D.O. o 10^7 UFC/mL, previa agitación con vórtice 3 min con perlas de vidrio. Se adicionaron 200 μ L de cada cepa con 5 repeticiones en microplaca de fondo plano de 96 pocillos Falcon™, a temperatura ambiente, una microplaca diferente para cada lectura a los días 1, 2, 5, 7 y 14. Se repitió el mismo procedimiento cambiando la temperatura de incubación a 30 °C. Para mantener la humedad en la cámara y evitar la desecación de los pozos, los pozos alrededor de la prueba se

llenaron con agua destilada estéril, se cubrieron con tapa y se sellaron con triple capa de Parafilm 3M®.

Previamente y dependiendo del día de la lectura (Fig. 1A), se retiró el medio líquido, se lavó con 150 μ L de PBS (Phosphate Base Salts), se dejó secar al aire, se añadieron 100 μ L de cristal violeta Hycel™ filtrado y se incubó 15 min a temperatura ambiente. Se eliminó el colorante y se lavó el exceso cuatro veces con solución de PBS. Se utilizó secado al aire (Fig. 1B). Se añadieron a cada pocillo 150 μ L de etanol al 95% (Fig. 1C). La D.O. se informó utilizando el lector de microplacas multimodo VARIOSKAN™ Lux, el espectrofotómetro ELISA Thermo Scientific™ a 570 nm. Se utilizó caldo estéril como control negativo. Como control biológico positivo se empleó una cepa clínica de *Streptomyces* sp. formadora de biopelícula. Se determinó la absorbancia [26–30].

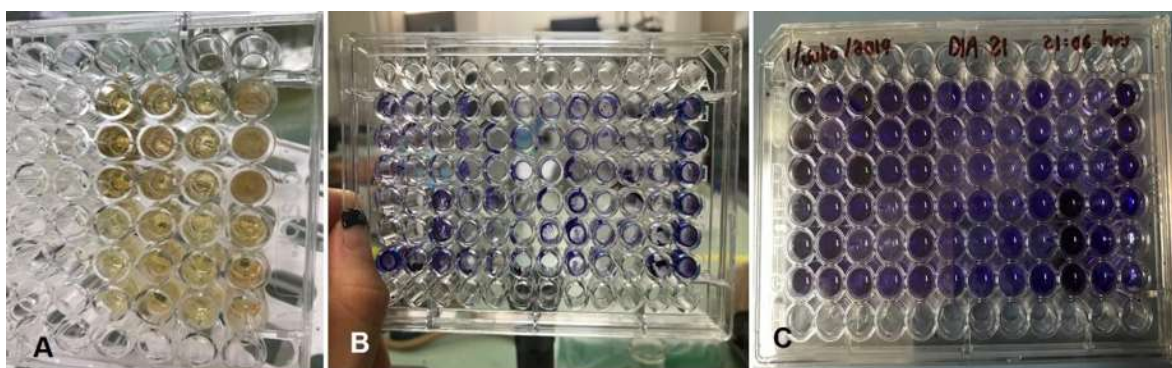


Fig. 1 Método de Cristal Violeta. **A.** Crecimiento después de 14 días de incubación a 30°C. **B.** Tinción con cristal violeta. **C.** Patrón de coloración al adicionar etanol al 95% previo a lectura de D.O.

3.1.2. Desplazamiento o Sliding Test (ST)

Se prepararon medios estériles de extracto de malta (EM) con agar al 0.3%. Se distribuyeron veinticinco mililitros por placa petri estéril de 60X15 mm. En el centro de placa con medio de cultivo semisólido se inoculó a partir de colonias jóvenes pinchando con un palillo estéril por duplicado (Fig. 2) [31]. Las placas se dejaron a temperatura ambiente selladas con Parafilm 3M® durante 14 días. Se

incubó una segunda serie a 30 °C. Se evaluó la dispersión o desplazamiento de colonias por día durante 14 días en centímetros con vernier [32]. Como control biológico positivo se empleó una cepa clínica de *Streptomyces* sp. formadora de biopelícula.

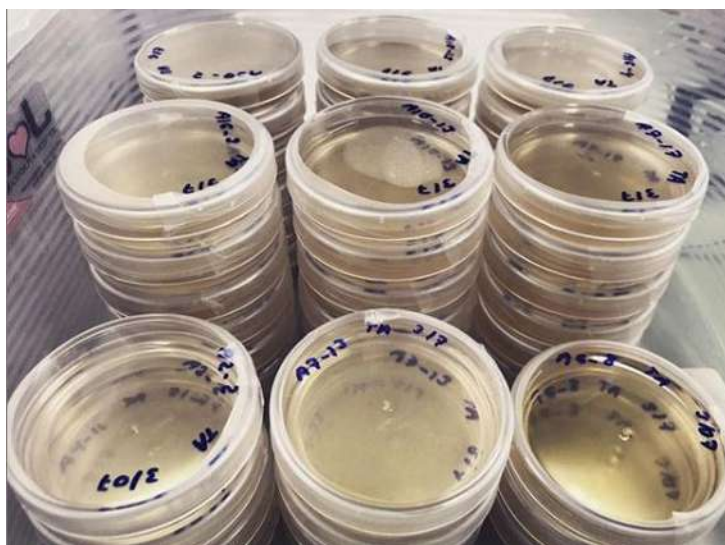


Fig. 2. Colocación del inóculo en placas Petri con medio EM con Agar 0.3%.

3.1.3. Agar Rojo Congo (RC)

Se preparó medio BHI modificado según Freeman (1989) con sacarosa al 5 % (p/v) y rojo Congo al 0.08 % (p/v) (Sigma-Aldrich®) a pH 7 [33]. Las placas se inocularon a partir de colonias pinchando con un palillo estéril por duplicado por cepa. Los cultivos se dejaron a temperatura ambiente sellados con Parafilm 3M® durante 14 días. Se incubó una segunda serie a 30 °C. Después del proceso de incubación, se evaluaron los patrones oscuros en la colonia, tomando como referencia el patrón mencionado en la metodología por Kaiser *et al.* (Fig. 3) [34,35], pero haciendo algunas modificaciones debido a que la composición de la matriz extracelular de las actinobacterias difiere de las proteobacterias y otros Gram positivos.

Los patrones de colores se clasificaron, como sigue:

- 1) **No productor de biopelícula:** aquellas colonias de crecimiento traslúcido o transparente y coloraciones naranjas, rojos claros, rosas y rojos moderados.
- 2) **Bajo productor de biopelícula:** aquellas colonias de crecimiento que presentan coloraciones rojas marrón, rojas pardas con tendencias a negro, marrón y marrón oscuras.
- 3) **Alto productor de biopelícula:** aquellas colonias de crecimiento con coloraciones negras parciales o totales.

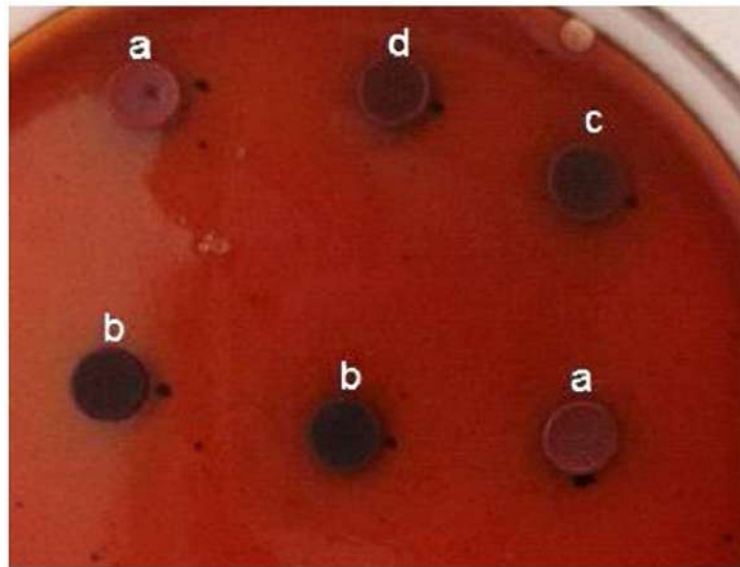


Fig. 3 Colonias sobre medio CRA. **a.** Colonias en rojo, no formadoras de biopelícula. **b.** Colonias negras formadoras de biopelículas. **c.** colonias café se consideran formadoras de biopelículas **d.** Colonias rojo oscuro, bajas formadoras de biopelícula. Imagen original tomada de Kaiser *et al.* 2013.

3.2. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos fueron hechos a través del software JMP 11 de SAS® incluido el análisis de varianza unidireccional (ANOVA) y las comparaciones por pares de Tukey-Kramer y Dunnett.

4. Resultados y discusión

4.1. Pruebas de formación de biopelícula

4.1.1. Método de Cristal Violeta (CV)

Se utilizaron dos temperaturas para observar si existían diferencias en el comportamiento y formación de la biopelícula, con objeto de seleccionar la mejor temperatura para la inducción sobre el vehículo del bioinoculante.

Se hizo un análisis de ANOVA y comparaciones de medias de Tukey-Kramer y Dunnett con una $p < 0.05$ representados en las figuras 4 y 5 con respecto al control para el análisis de formación de biopelícula al día 14 a 30 °C. En el gráfico de la figura 4, se encuentran indicadas por la letra **a** al control y a las cepas, lo que indica que no existen diferencias significativas entre ellas con respecto al control. Las demás uniones arrojadas por el análisis de comparación de medias de Tukey-Kramer se encuentran indicadas en la figura 5. Los niveles no unidos por una misma letra son significativamente distintos al control

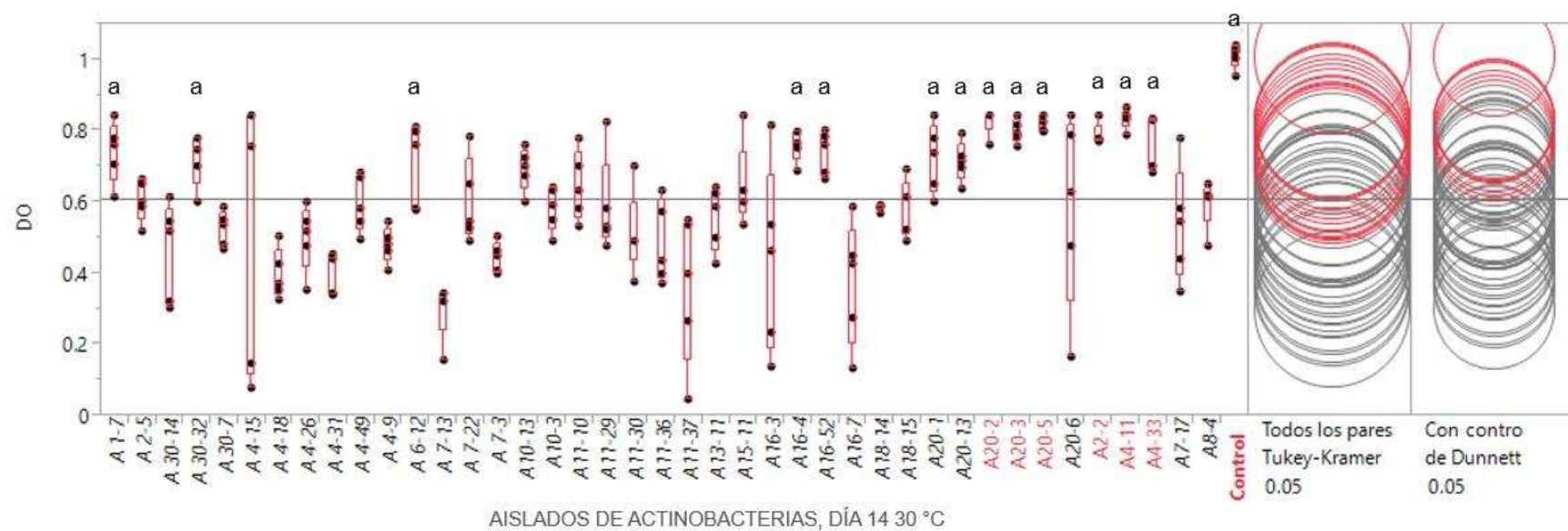


Fig. 4 Formación de biopelícula de las cepas de actinobacterias (ARI) al día 14 a 30 °C (CV).

Nivel	Media
Control + A	1.0112000
A4-11 A B	0.8354000
A20-2 A B C	0.8286000
A20-5 A B C	0.8228000
A20-3 A B C D	0.7998000
A2-2 A B C D E	0.7880000
A4-33 A B C D E F	0.7734000
A16-4 A B C D E F G	0.7598000
A 1-7 A B C D E F G H	0.7414000
A16-52 A B C D E F G H	0.7390000
A20-1 A B C D E F G H	0.7236000
A 30-32 A B C D E F G H	0.7210000
A20-13 A B C D E F G H	0.7140000
A 6-12 A B C D E F G H I	0.7048000
A10-13 B C D E F G H I J	0.6920000
A11-10 B C D E F G H I J K	0.6442000
A15-11 B C D E F G H I J K	0.6432000
A 2-5 B C D E F G H I J K L	0.6044000
A 7-22 B C D E F G H I J K L	0.5996000
A8-4 B C D E F G H I J K L	0.5950000
A 4-49 B C D E F G H I J K L	0.5946000
A11-29 B C D E F G H I J K L	0.5872000
A18-15 B C D E F G H I J K L	0.5866000
A18-14 B C D E F G H I J K L	0.5842000
A10-3 B C D E F G H I J K L	0.5812000
A20-6 B C D E F G H I J K L	0.5808000
A13-11 B C D E F G H I J K L	0.5560000
A7-17 B C D E F G H I J K L	0.5382000
A 4-15 B C D E F G H I J K L	0.5342000
A 30-7 C D E F G H I J K L	0.5248000
A11-30 D E F G H I J K L	0.5100000
A 4-26 D E F G H I J K L	0.4992000
A11-36 E F G H I J K L	0.4830000
A 4-9 F G H I J K L	0.4788000
A 30-14 G H I J K L	0.4600000
A 7-3 H I J K L	0.4438000
A16-3 H I J K L	0.4378000
A 4-31 I J K L	0.4050000
A 4-18 J K L	0.3962000
A16-7 K L	0.3734000
A11-37 K L	0.3600000
A 7-13 L	0.3012000

Fig. 5 Análisis de comparación de medias de Tukey-Kramer (CV). Formación de biopelícula de las cepas de actinobacterias (ARI) al día 14 a 30 °C.

De la misma forma, se hizo un análisis de ANOVA y comparaciones de medias de Tukey-Kramer y Dunnett con una $p < 0.05$ representados en la figura 6 y 7 con respecto al control para el análisis de formación de biopelícula al día 14 a 25 °C o temperatura ambiente.

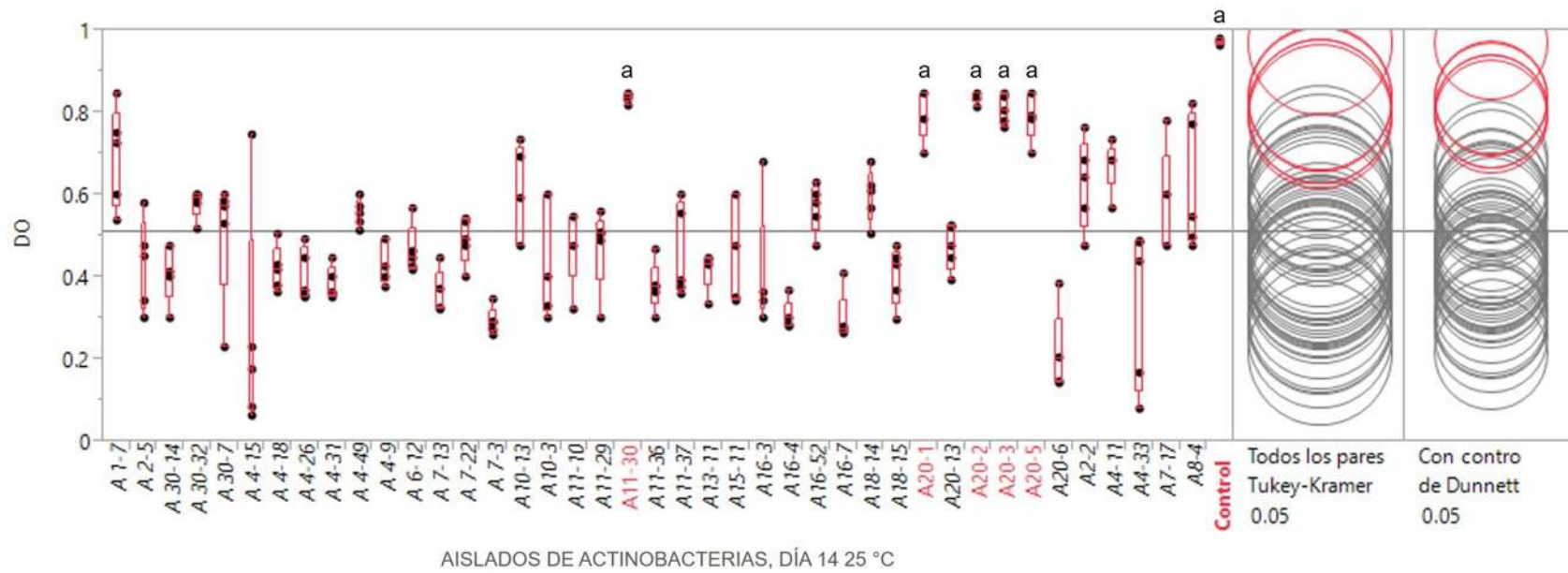


Fig. 6 Formación de biopelícula de las cepas de actinobacterias (ARI) al día 14 a 25 °C (CV).

En la Figura 6, se encuentran indicadas por la letra **a** al control y a los aislados que son significativamente parecidos al control. Las demás uniones arrojadas por el análisis de comparación de medias de Tukey-Kramer se encuentra indicada en la Figura 7. Los niveles no unidos por una misma letra son significativamente distintos al control.

Nivel	Media
Control + A	0.97140000
A20-2 A B	0.83620000
A11-30 A B C	0.83340000
A20-3 A B C D	0.80620000
A20-1 A B C D	0.80440000
A20-5 A B C D E	0.79320000
A 1-7 B C D E F	0.69120000
A4-11 B C D E F G	0.66880000
A2-2 B C D E F G H	0.62600000
A8-4 B C D E F G H I	0.62160000
A18-14 B C D E F G H I J	0.59600000
A10-13 B C D E F G H I J	0.59340000
A7-17 C D E F G H I J	0.58720000
A 30-32 D E F G H I J K	0.57740000
A16-52 D E F G H I J K	0.56660000
A 4-49 E F G H I J K	0.55460000
A 30-7 F G H I J K L	0.50320000
A 7-22 F G H I J K L	0.48820000
A15-11 F G H I J K L	0.47420000
A11-10 F G H I J K L	0.47280000
A11-29 F G H I J K L	0.47220000
A20-13 F G H I J K L	0.47140000
A 6-12 F G H I J K L M	0.46300000
A11-37 F G H I J K L M	0.45660000
A10-3 F G H I J K L M	0.44660000
A 4-9 G H I J K L M	0.43580000
A 2-5 G H I J K L M	0.42960000
A 4-18 H I J K L M	0.41840000
A13-11 H I J K L M	0.41520000
A30-14 H I J K L M	0.41300000
A16-3 H I J K L M	0.40920000
A18-15 H I J K L M	0.40240000
A 4-26 H I J K L M	0.40100000
A 4-31 H I J K L M	0.38300000
A11-36 I J K L M	0.37740000
A 7-13 J K L M	0.36600000
A4-33 K L M	0.33040000
A16-4 L M	0.30580000
A16-7 L M	0.29660000
A 7-3 L M	0.29000000
A 4-15 L M	0.25960000
A20-6 M	0.21560000

Fig. 7 Análisis de comparación de medias de Tukey-Kramer (CV). Formación de biopelícula de las cepas de actinobacteria al día 14 a 25 °C.

Al analizar los resultados y durante el desarrollo de la prueba se observó que las bacterias tenían un poco más de dificultad para la formación de biopelículas a 25 °C, ya que el número de coincidencias con respecto al control se redujo considerablemente al comparar los resultados obtenidos en la temperatura de 30 °C (Fig. 4 y 6), en cuyo análisis de comparación de medias de Tukey-Kramer se observa un número mayor de coincidencias con respecto al control. Cabe mencionar que 28-30 °C, es temperatura idónea de crecimiento reportada en la literatura para actinobacterias aisladas de rizósfera [36]; sin embargo, se optó por probar otra temperatura con la finalidad de ver si esta era una variable que afectaba o ayudaba en la formación de biopelículas.

En la Tabla 1 se muestra una comparativa de cepas de actinobacterias coincidentes con respecto al control en ambas temperaturas, ligadas con la letra **a** según el análisis de comparación de medias de Tukey-Kramer, las cepas ARI_A20-1, ARI_A20-2, ARI_A20-3 y ARI_A20-5, fueron consistentes en la formación de biopelícula en ambas temperaturas, lo cual nos indica una estabilidad en la formación de la misma, no afectando la variación de temperatura, por lo que los microorganismos coincidentes son candidatos idóneos a considerar en la inducción de biopelículas sobre el vehículo mineral que será empleado en el inoculante sólido en biopelícula, producto final de este proyecto.

Tabla 1. Selección de actinobacterias (ARI) a 25 y 30 °C con respecto al control¹ con el método de CV.

TEMPERATURA 25 °C	TEMPERATURA 30 °C
	A1-7 a
	A2-2 a
	A4-11 a
	A4-33 a
	A6-12 a
	A16-4 a
A11-30 a	A16-52 a
A20-1 a*	A20-1 a*
A20-2 a*	A20-2 a*
A20-3 a*	A20-3 a*
A20-5 a*	A20-5 a*
	A20-13 a
	A30-32 a
Control a	Control a

¹Basado en el análisis de comparación de medias de Tukey-Kramer. *Coincidencias en formación de biopelícula

El método de cristal violeta propuesto por O'Toole *et al.* [26], utilizando grupos de bacterias diferentes a las actinobacterias, se podría considerar una prueba no funcional para las actinobacterias debido a las grandes diferencias en la constitución de pared y la complejidad de la formación de la matriz extracelular que es mayoritariamente proteica, sin embargo, ya ha sido empleada con éxito en algunas especies del phylum pertenecientes al género *Micobacterium* y *Micobacterium* [18,31], por lo que se consideró una opción viable para utilizarla como prueba tamiz, por su facilidad, rapidez y buenos resultados.

4.1.2. Desplazamiento o Sliding Test (ST)

El desplazamiento se midió cada día con un vernier hasta su máximo crecimiento al día 14, el control se registró con un valor máximo de 50 mm (interior de placa) debido a que su expansión fue completa e inmediata, además

de que licuaba el poco agar contenido en el medio. Al tener este resultado con el control, se optó hacer un estudio comparativo entre las mismas cepas, ya que las 41 cepas si tuvieron crecimiento regular (Fig. 8) y se formaron tres grupos de cada una de las dos temperaturas utilizadas de 25 y 30 °C (Tablas 2 y 3).

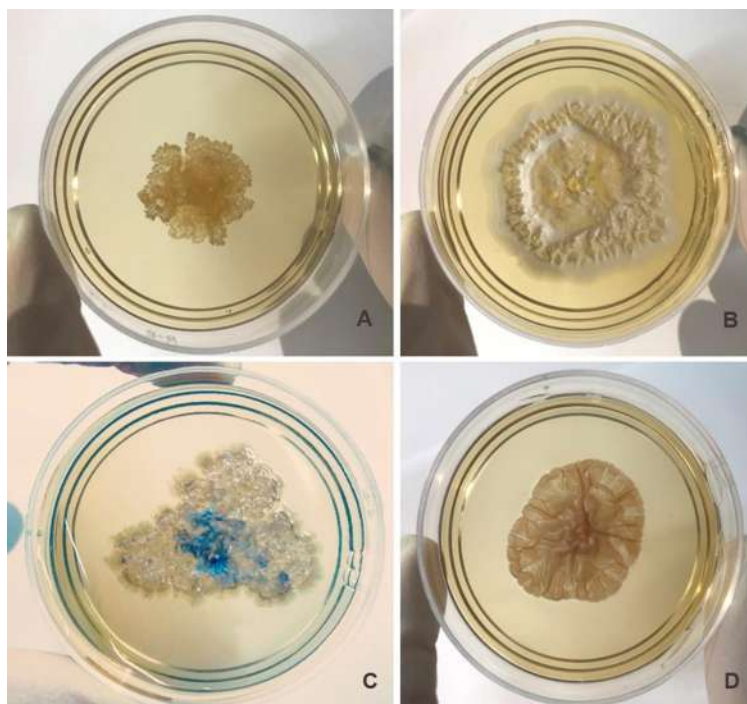


Fig. 8 Ensayo de desplazamiento al día 14. **A.** Cepa ARI_A10-3. **B.** Cepa ARI_A20-3. **C.** Cepa ARI_A20-6. **D.** Cepa ARI_A7-13.

En la tabla 2 se observan los resultados del diámetro de desplazamiento o expansión (mm) al día 14 de las cepas de actinobacterias (ARI), que tiene relación directa con la forma de colonización del microorganismo y se relaciona a su vez con la formación de biopelícula [31]. Así se conformaron tres grupos para la temperatura de 25 °C: 1) alto formador de biopelícula >15 mm, 2) mediano formador de biopelícula >11.5 mm, pero <15 mm y 3) bajo formador de biopelícula <11.5 mm.

Tabla 2 Prueba de desplazamiento de cepas en mm de actinobacterias (ARI) al día 14 a 25 °C.

Alto formador de biopelícula		Mediano formador de biopelícula		Bajo formador de biopelícula	
CEPA	DIA 14 EN mm	CEPA	DIA 14 EN mm	CEPA	DIA 14 EN mm
A20-3	22.5	A16-4	13.5	A4-18	11
A11-37	21	A4-31	13	A7-22	11
A4-15	20	A11-10	13	A20-1	11
A16-7	19	A13-11	13	A30-32	11
A16-52	19	A18-15	13	A4-9	10
A20-5	19	A11-36	12.5	A4-26	10
A6-12	18	A16-3	12.5	A4-33	9
A10-3	18	A1-7	12	A10-13	9
A11-30	18	A15-11	12	A11-29	9
A4-11	17	A20-6	12	A7-17	8
A2-5	16.5	A18-14	12	A30-7	8
A4-49	16	A8-4	11.5	A30-14	8
A20-13	16			A2-2	6
A7-13	15			A7-3	6
A20-2	15				

En la tabla 3 se observan los resultados del diámetro de desplazamiento o expansión (mm) al día 14 de las cepas de actinobacterias (ARI), que tiene relación directa con la forma de colonización del microorganismo y se relaciona a su vez con la formación de biopelícula [31]. Así se conformaron tres grupos para la temperatura de 30 °C: 1) alto formador de biopelícula >20 mm, 2) mediano formador de biopelícula >13.5 mm, pero <20 mm y 3) bajo formador de biopelícula <13.5 mm.

Tabla 3 Prueba de desplazamiento en mm de la cepas de actinobacterias (ARI) al día 14 a 30 °C.

Alto formador de biopelícula		Mediano formador de biopelícula		Bajo formador de biopelícula	
CEPA	DIA 14 EN mm	CEPA	DIA 14 EN mm	CEPA	DIA 14 EN mm
A16-7	32	A4-33	19	A4-49	13
A11-10	25	A4-11	18	A10-13	13
A4-9	24	A7-13	18	A11-29	13
A20-3	22	A11-37	18	A20-6	12.5
A2-5	20	A16-4	18	A7-3	11
A4-15	20	A4-26	17	A20-1	11
A4-18	20	A4-31	17	A10-3	9.5
A7-22	20	A11-36	17	A2-2	9
A8-4	20	A6-12	16	A15-11	7
A13-11	20	A16-3	16	A30-32	7
A16-52	20	A20-5	15	A18-15	6
A20-2	20	A1-7	15	A7-17	5.5
A20-13	20	A30-14	14	A18-14	5.5
A30-7	20	A11-30	13.5		

La prueba de ST se encuentra relacionada con la prueba de formación de biopelículas para bacterias inmóviles como las actinobacterias, ya que se ha observado relación en la manera en la que ésta se forma y distribuye. En esta prueba también se suele observar la acumulación bacteriana o desplazamiento [31,32]. Sin embargo, esta prueba debe ser relacionada con la formación de biopelícula, en primer lugar, y se debe considerar que las actinobacterias son inmóviles y la forma en la que pueden “moverse” que es por desplazamiento en las superficies dependiendo de su crecimiento, por extensión de sus hifas o ramificaciones, también denominada expansión o desplazamiento (conforme va creciendo la colonia) y está directamente relacionada en la forma en la que se conforman las biopelículas; se ha indicado que entre mayor diámetro de expansión tenga la cepa en cuestión mejor formador de biopelícula sería [31]. Sin embargo, es la primera vez, con este trabajo que se utiliza esta prueba para el género

Streptomyces, el uso de esta metodología se espera tenga utilidad para hacer una mejor toma de decisiones al momento de la selección de las mejores cepas formadoras de biopelículas.

4.1.3. Agar Rojo Congo (RC)

El análisis visual del crecimiento de las colonias en el medio ARC, siguiendo con lo descrito en la metodología y considerando las modificaciones, se pueden observar en el ejemplo de la figura 9, donde los colores más claros, están relacionados con la no formación de biopelículas (Fig. 9A y B), los colores rojos oscuros con tendencias pardas, se relacionan con el grupo de medianos formadores de biopelículas (Fig. 9C y D) y las coloraciones con tendencias al negro, son relacionadas con el grupo de altos formadores de biopelículas (Fig. 9E y F).

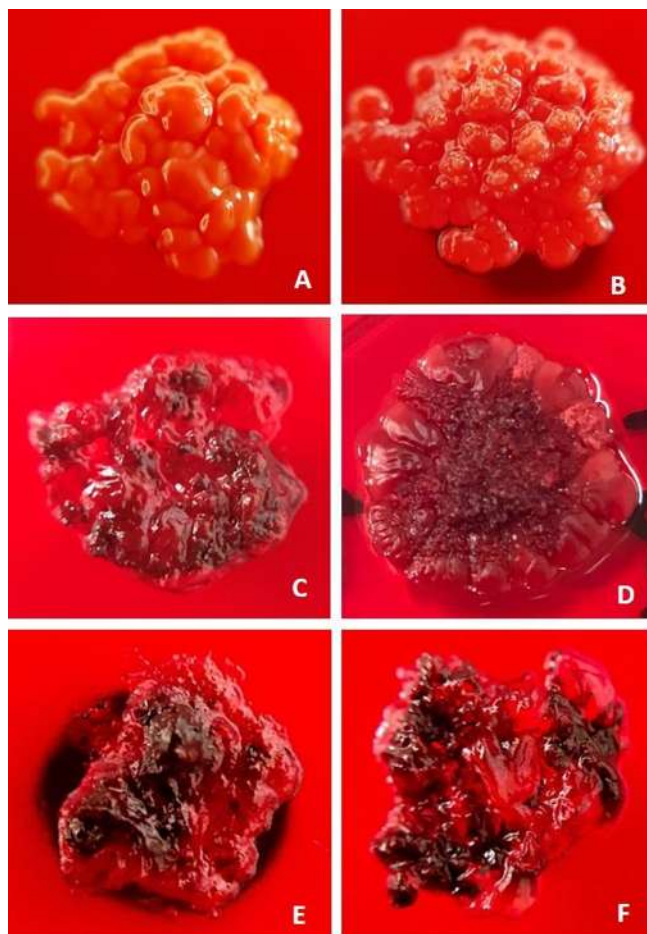


Fig. 9 Ejemplos de colonias de actinobacterias (ARI) de 14 días de crecimiento sobre medio CRA. **A** y **B**. No formadoras de biopelícula. **C** y **D**. Bajo productor de biopelículas. **E** y **F**. Alto productor de biopelículas.

Los resultados obtenidos de las cepas de actinobacterias siguiendo los mencionados patrones de colores, se resumen en la Tabla 4, en donde se logró establecer tres grupos y separar de manera cualitativa o fenotípica al grupo con mejores resultados relacionados con la formación de biopelícula según ésta metodología, no hubo diferencias entre las dos temperaturas a probar, por lo que se hizo una sola tabla.

Tabla 4. Clasificación de cepas de actinobacterias (ARI) según su producción de biopelícula RC.

CEPA	CATEGORÍA	CEPA	CATEGORÍA	CEPA	CATEGORÍA
A1-7	AP	A4-11	BP	A2-2	NP
A4-33	AP	A4-15	BP	A4-9	NP
A6-12	AP	A4-18	BP	A4-26	NP
A7-22	AP	A7-13	BP	A4-31	NP
A11-30	AP	A8-4	BP	A4-49	NP
A11-36	AP	A10-3	BP	A6-8	NP
A16-4	AP	A11-10	BP	A7-3	NP
A18-15	AP	A13-11	BP	A7-17	NP
A20-5	AP	A16-3	BP	A10-13	NP
A20-6	AP	A16-7	BP	A11-29	NP
A20-13	AP	A16-52	BP	A11-37	NP
A30-32	AP	A20-1	BP	A15-11	NP
		A20-3	BP	A18-14	NP
				A20-2	NP
				A30-7	NP
				A30-14	NP

AP: Alto productor de biopelícula, **BP:** Bajo productor de biopelícula, **NP:** No productor de biopelícula.

Nota: No hubo diferencias que se pudieran considerar entre una y otra temperatura.

El método de Agar Rojo Congo fue desarrollado por Freeman *et al.* [33] y es basado en el subcultivo de cepas bacterianas en agar Infusión de Cerebro y Corazón (BHI), suplementado con sacarosa y colorante Rojo Congo, el cual tiñe algunos de los componentes de la matriz extracelular que conforma la biopelícula. Aunque esta metodología no ha sido probada con cepas de actinobacterias, se utilizó con la finalidad de obtener un indicio que diera una mejor orientación en la selección de las mejores cepas formadoras de biopelícula. [34].

Finalmente, se hizo un resumen comparativo de los métodos anteriores, con las mejores cepas con indicios de buena formación de biopelículas basados principalmente en su formación por el método de CV a 30 °C temperatura óptima de incubación (Tabla 5, primera columna). Cabe mencionar que se probó también la temperatura de 35 °C aparte de 25 y 30 °C, pero algunas dejaron de crecer y se pudo observar que la temperatura idónea fue de 30 °C.

Tabla 5. Coincidencias de cepas de actinobacterias (ARI), resultados sobresalientes en formación de biopelícula.

CEPA	CV a 30 °C	CV a 25 °C	Sliding a 25 °C	Sliding a 30 °C	RC
A1-7	A	A		M	A
A2-2	A	A			
A4-11	A	A	A	M	
A4-33	A			M	A
A6-12	A	M	A	M	A
A11-30	A	M	A	M	A
A16-4	A		M	M	A
A16-52	A	A	A	A	
A18-14	A	A	A		
A20-1	A	A			
A20-2	A	A	A	A	
A20-3	A	A	A	A	
A20-5	A	A	A	M	A
A20-13	A		A	A	A
A30-32	A	M			A

CV: Cristal Violeta, RC: Rojo Congo, A: Alto productor de biopelícula según su prueba, M: Mediano productor de biopelícula según su prueba.

5. Conclusión

La formación de biopelícula fue uno de los atributos más importantes para este proyecto, ya que la elaboración del bioinculante depende de su formación. Se concluye que, aunque las coincidencias encontradas no son excelentes en todas las pruebas a las dos temperaturas, vemos que hay consistencia en las cepas ARI_A20-3 y ARI_A20-5. Las demás cepas pueden ser elegibles una vez que se comparen con las pruebas PGP y prueba de inducción de biopelícula sobre el vehículo mineral perlita.

Referencias

1. Costerton, J.W.; Geesey, G.G.; Cheng, K.-J. How Bacteria Stick. *Sci. Am.* **1978**, *238*, 86–95.
2. Díaz Caballero, A.J.; Vivas Reyes, R.; Puerta, L.; Ahumado Monterrosa, M.; Arévalo Tovar, L.; Cabrales Salgado, R.; Herrera Herrera, A. Biopelículas como expresión del mecanismo de quorum sensing: Una revisión. *Av. En Period. E Implantol. Oral* **2011**, *23*, 195–201, doi:10.4321/S1699-65852011000300005.
3. Annous, B.A.; Fratafico, P.M.; Smith, J.L. Scientific Status Summary: Quorum Sensing in Biofilms: Why Bacteria Behave the Way They Do. *J. Food Sci.* **2009**, *74*, R24–R37.
4. Vu, B.; Chen, M.; Crawford, R.J.; Ivanova, E.P. Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation. *Molecules* **2009**, *14*, 2535–2554, doi:10.3390/molecules14072535.
5. Monds, R.D.; O'Toole, G.A. The Developmental Model of Microbial Biofilms: Ten Years of a Paradigm up for Review. *Trends Microbiol.* **2009**, *17*, 73–87, doi:10.1016/j.tim.2008.11.001.
6. El Othmany, R.; Zahir, H.; Ellouali, M.; Latrache, H. Current Understanding on Adhesion and Biofilm Development in Actinobacteria. *Int. J. Microbiol.* **2021**.
7. Flemming, H.-C.; Wingender, J. The Biofilm Matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 623–633, doi:10.1038/nrmicro2415.
8. Alonso, A.N.; Pomposiello, P.J.; Leschine, S.B. Biofilm Formation in the Life Cycle of the Cellulolytic Actinomycete *Thermobifida Fusca*. *Biofilms* **2008**, 1–11, doi:10.1017/S1479050508002238.
9. Behera, B.; Das, T.K.; Raj, R.; Ghosh, S.; Raza, Md.B.; Sen, S. Microbial Consortia for Sustaining Productivity of Non-Legume Crops: Prospects and Challenges. *Agric. Res.* **2021**, *10*, 1–14, doi:10.1007/s40003-020-00482-3.
10. Bhattacharya, D.C. Biofilmed Biofertilizer: Promising Technology for Tomorrow. **2015**, 4.
11. Seneviratne, G.; Weerasekara, M.; Seneviratne, C.; Ismail, J.; Kecskés, M.; Kennedy, I. Importance of Biofilm Formation in Plant Growth Promoting Rhizobacterial Action. In *Microbiol. Monographs*; 2010; Vol. 18, pp. 81–95 ISBN 978-3-642-13611-5.
12. Seneviratne, G.; Zavahir, J.S.; Bandara, W.M.M.S.; Weerasekara, M.L.M.A.W. Fungal-Bacterial Biofilms: Their Development for Novel Biotechnological Applications. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *24*, 739, doi:10.1007/s11274-007-9539-8.
13. Seneviratne, G.; Jayasinghearachchi, H.S. Mycelial Colonization by Bradyrhizobia and Azorhizobia. *J. Biosci.* **2003**, *28*, 243–247, doi:10.1007/BF02706224.
14. Zakeel, M.C.M.; Safeena, M.I.S. Biofilmed Biofertilizer for Sustainable Agriculture. In *Plant Health Under Biotic Stress: Volume 2: Microbial Interactions*; Ansari, R.A., Mahmood, I., Eds.; Springer: Singapore, 2019; pp. 65–82 ISBN 9789811360404.

15. Kim, Y.-M.; Kim, J. Formation and Dispersion of Mycelial Pellets of *Streptomyces Coelicolor* A3(2). *J. Microbiol. Seoul Korea* **2004**, *42*, 64–67.
16. Solanki, M.K.; Malviya, M.K.; Wang, Z. Actinomycetes Bio-Inoculants: A Modern Prospectus for Plant Disease Management. In *Plant Growth Promoting Actinobacteria: A New Avenue for Enhancing the Productivity and Soil Fertility of Grain Legumes*; Subramaniam, G., Arumugam, S., Rajendran, V., Eds.; Springer: Singapore, 2016; pp. 63–81 ISBN 978-981-10-0707-1.
17. Doghri, I.; Rodrigues, S.; Bazire, A.; Dufour, A.; Akbar, D.; Sopena, V.; Sablé, S.; Lanneluc, I. Marine Bacteria from the French Atlantic Coast Displaying High Forming-Biofilm Abilities and Different Biofilm 3D Architectures. *BMC Microbiol.* **2015**, *15*, 1–10.
18. Mor, R.; Sivan, A. Biofilm Formation and Partial Biodegradation of Polystyrene by the Actinomycete *Rhodococcus Ruber*. *Biodegradation* **2008**, *19*, 851–858.
19. Salam, N.; Jiao, J.-Y.; Zhang, X.-T.; Li, W.-J. Update on the Classification of Higher Ranks in the Phylum Actinobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2020**, *70*, 1331–1355, doi:10.1099/ijsem.0.003920.
20. Homero, U.; Tortella, G.; Sandoval, E.; Cuozzo, S.A. Extracellular Polymeric Substances (EPS) Produced by *Streptomyces* Sp. Biofilms: Chemical Composition and Anticancer Properties. *Microbiol. Res.* **2021**, *253*, 126877, doi:10.1016/j.micres.2021.126877.
21. Rey, T.; Dumas, B. Plenty Is No Plague: *Streptomyces* Symbiosis with Crops. *Trends Plant Sci.* **2017**, *22*, 30–37, doi:10.1016/j.tplants.2016.10.008.
22. Chen, S.; Lai, K.; Li, Y.; Hu, M.; Zhang, Y.; Zeng, Y. Biodegradation of Deltamethrin and Its Hydrolysis Product 3-Phenoxybenzaldehyde by a Newly Isolated *Streptomyces Aureus* Strain HP-S-01. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *90*, 1471–1483, doi:10.1007/s00253-011-3136-3.
23. Viaene, T.; Langendries, S.; Beirinckx, S.; Maes, M.; Goormachtig, S. *Streptomyces* as a Plant's Best Friend? *FEMS Microbiol. Ecol.* **2016**, *92*.
24. Gupta, G.; Snehi, Dr.S.K.; Singh, V. Role of PGPR in Biofilm Formations and Its Importance in Plant Health. In; 2017; pp. 27–42 ISBN 978-1-119-24634-3.
25. Polkade, A.V.; Mantri, S.S.; Patwekar, U.J.; Jangid, K. Quorum Sensing: An Under-Explored Phenomenon in the Phylum Actinobacteria. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, doi:10.3389/fmicb.2016.00131.
26. O'Toole, G.; Kaplan, H.B.; Kolter, R. Biofilm Formation as Microbial Development. *Annu. Rev. Microbiol.* **2000**, *54*, 49–79, doi:10.1146/annurev.micro.54.1.49.
27. O'Toole, G.A.; Gibbs, K.A.; Hager, P.W.; Phibbs, P.V.; Kolter, R. The Global Carbon Metabolism Regulator Crc Is a Component of a Signal Transduction Pathway Required for Biofilm Development by *Pseudomonas Aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 425–431, doi:10.1128/JB.182.2.425-431.2000.
28. Gavín, R.; Merino, S.; Altarriba, M.; Canals, R.; Shaw, J.G.; Tomás, J.M. Lateral Flagella Are Required for Increased Cell Adherence, Invasion and Biofilm Formation by *Aeromonas* Spp. *FEMS Microbiol. Lett.* **2003**, *224*, 77–83, doi:10.1016/S0378-1097(03)00418-X.

29. Anderson, G.G.; O'Toole, G.A. Innate and Induced Resistance Mechanisms of Bacterial Biofilms. In *Bacterial Biofilms*; Romeo, T., Ed.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2008; pp. 85–105 ISBN 978-3-540-75418-3.
30. Oriani, A.S.; Gentili, A.R.; Zuñiga, A.E.; Oriani, D.S.; Baldini, M. Composición lipídica de la pared celular de tres especies de micobacterias ambientales y su posible correlación con la formación de biofilms y movilidad por sliding / Lipid composition of cell wall of three species of environmental mycobacteria and its po. *Cienc. Vet.* **2017**, *17*, 47–59, doi:10.19137/10.19137/cienvet20151714.
31. Sousa, S.; Bandeira, M.; Carvalho, P.A.; Duarte, A.; Jordao, L. Nontuberculous Mycobacteria Pathogenesis and Biofilm Assembly. *Int. J. Mycobacteriology* **2015**, *4*, 36–43, doi:10.1016/j.ijmyco.2014.11.065.
32. Martínez, A.; Torello, S.; Kolter, R. Sliding Motility in Mycobacteria. *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 7331–7338, doi:10.1128/JB.181.23.7331-7338.1999.
33. Freeman, D.J.; Falkiner, F.R.; Keane, C.T. New Method for Detecting Slime Production by Coagulase Negative Staphylococci. *J. Clin. Pathol.* **1989**, *42*, 872–874, doi:10.1136/jcp.42.8.872.
34. Kaiser, T.D.L.; Pereira, E.M.; dos Santos, K.R.N.; Maciel, E.L.N.; Schuenck, R.P.; Nunes, A.P.F. Modification of the Congo Red Agar Method to Detect Biofilm Production by Staphylococcus Epidermidis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2013**, *75*, 235–239, doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.11.014.
35. Koçak, F.Ö. Identification of Streptomyces Strains Isolated from Humulus Lupulus Rhizosphere and Determination of Plant Growth Promotion Potential of Selected Strains. *Turk J Biol* *17*.
36. Franco-Correa, M.; Quintana, A.; Duque, C.; Suarez, C.; Rodríguez, M.X.; Barea, J.-M. Evaluation of Actinomycete Strains for Key Traits Related with Plant Growth Promotion and Mycorrhiza Helping Activities. *Appl. Soil Ecol.* **2010**, *45*, 209–217, doi:10.1016/j.apsoil.2010.04.007.

Capítulo III.

Pruebas de promoción del crecimiento vegetal

1. Resumen

Determinados microorganismos, en su mayoría hongos micorrízicos y bacterias se desarrollan en asociación con las raíces de las plantas, en la rizósfera, y están involucrados en la promoción del crecimiento y desarrollo vegetal. Las actinobacterias, intervienen directamente con la fertilidad de los suelos (en concentraciones de 10^6 UFC g^{-1} de un total de microorganismos de 10^{11} UFC g^{-1}) y se ha descrito que juegan un rol esencial en diversas actividades en el ecosistema, específicamente, influyendo con mecanismos directos e indirectos. Lo que se traduce en el mejoramiento de la estructura del suelo y la salud de la rizósfera. Por la suma de estas actividades se han catalogado a las Actinobacterias como Promotoras del Crecimiento Vegetal: PGP (*Plant Growth Promoting*). El objetivo de este capítulo es el análisis y evaluación de 41 cepas de actinobacterias aisladas de la rizósfera de *Persea americana*, a través de los ensayos reto planta microorganismo, la solubilización de fosfato, fijación de nitrógeno, producción de ácido indol acético, producción de sideróforos, y antagonismo contra hongos fitopatógenos; que permitan la selección de los aislados que promuevan de mejor manera el crecimiento vegetal para la elaboración de un bionoculante en biopelícula. Las cepas seleccionadas para el ensayo en maceta fueron: ARI_A20-3 (*S. griseorubens*), ARI_A20-5 (*S. flaveolus*) y ARI_A30-32 (*S. aureus*) para el ensayo de maceta, mostrando excelentes resultados en la formación de biopelículas y características PGP probadas.

Palabras clave: Planta-microorganismo, Fosfatos, Ácido Indol Acético, Fijación de Nitrógeno, Sideróforos.

Abstract

Certain microorganisms, mostly mycorrhizal fungi and bacteria, engage in an association with plant roots in the rhizosphere and are involved in promoting plant growth and development. Actinobacteria are directly involved in soil fertility (10^6 CFU g⁻¹ concentrations of a total of microorganisms of 10^{11} CFU g⁻¹), and it has been described that they play an essential role in several activities in the ecosystem, specifically influencing direct and indirect mechanisms, which translates into the soil improvement structure and rhizosphere health. Due to the sum of these activities, they have been classified as Plant Growth Promoting: PGP. The objective of this chapter is the analysis and evaluation of 41 strains of actinobacteria isolated from the *Persea americana* rhizosphere through microorganism-plant challenge assays, phosphate solubilization, nitrogen fixation, indole acetic acid production, siderophore production, antagonism against phytopathogenic fungi; that allow us to select the isolates that best promote plant growth for the preparation of a biofilmed inoculant. The strains selected for the pot test were: ARI_A20-3 (*S. griseorubens*), ARI_A20-5 (*S. flaveolus*), and ARI_A30-32 (*S. aureus*) for the pot test showing excellent results in the formation of biofilms and proven PGP features.

Keywords: Plant-microorganism, Phosphates, Indole Acetic Acid, Nitrogen Fixation, Siderophores.

2. Introducción

En la rizósfera se desarrollan asociaciones entre determinados microorganismos que interaccionan con las raíces de las plantas, en su mayoría hongos micorrízicos, que están involucrados en la promoción del crecimiento y desarrollo vegetal mediante un amplio rango de actividades, influyendo en la estimulación de los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes, mejorando la calidad del suelo y su fertilidad así como la salud de la planta [1–4].

Cabe resaltar que los microbiomas de la rizósfera y raíces varían según el tipo de suelo, condiciones medio ambientales y el hospedero por lo que siendo estrictos se debe tener cuidado en la introducción de microorganismos ajenos al micro ecosistema que en lugar de ayudar, perjudiquen a la planta haciendo una interacción negativa [4].

Las actinobacterias son grupo de microorganismos abundantes y poco estudiados en su interacción con las plantas. Estas se involucran directamente con la fertilidad de los suelos, en suelos más saludables, las actinobacterias se encuentran en concentraciones de 10^6 UFC/g de un total de 10^{11} UFC/g, que es la cantidad de microorganismos encontrados de microbiota por cada gramo de suelo rizosférico [5,6]; y se ha descrito que juegan un rol esencial en diversas actividades en el ecosistema, interviniendo por medio de *mecanismos directos*: Fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato, solubilización de potasio, producción de fitohormonas y como *mecanismos indirectos*: Antagonismo, competencia, producción de sideróforos, producción de ácido cianhídrico (HCN), enzimas degradadoras de pared celular, producción de antimicrobianos, vitaminas, inducción de resistencia del hospedero, manejo de estrés abiótico [2]; y cuando son capaces de colonizar las raíces de la planta de manera endófitas o epífitas el beneficio es mayor, ya que le brindan protección adicional a la planta contra patógenos y contra la desecación entre otras cosas [4]. Por estos atributos se les ha catalogado también como Promotoras del Crecimiento Vegetal: PGP (*Plant Growth Promoting*) [1,2,7].

Recientemente se han estudiado sus interacciones con otros microorganismos PGP, formando consorcios con relaciones sinérgicas como el denominado *mycorrhiza helper bacteria* [8].

Dentro de los numerosos atributos que se han encontrado en las actinobacterias para ser consideradas como PGP, es la fijación de nitrógeno atmosférico. El nitrógeno N_2 , es uno de los elementos más abundantes en la naturaleza, pero la mayoría de los organismos, incluidos plantas y animales, son incapaces de acceder a la utilización del nitrógeno atmosférico para fines de su metabolismo [9]. El dinitrógeno, debe ser primero fijado o convertido en amoníaco o nitrato para que pueda ser consumido [10].

De acuerdo a Swarnalakshmi [11], las actinobacterias son capaces de fijar nitrógeno y algunas son formadoras de nódulos. Estas bacterias se han encontrado colonizando pasivamente los espacios intercelulares de las raíces de las plantas (incluyendo tallos, hojas, frutos, nódulos de leguminosas y sistema vascular en general) de manera endófito o epífita, además de establecer simbiosis con algunas otras bacterias fijadoras de nitrógeno para este fin en común. Además, con este fenómeno de colonización de las actinobacterias, las plantas ganan resistencia contra patógenos o insectos plaga [11,12].

Se ha demostrado que las actinobacterias tienen genes fijadores de nitrógeno (*nifH*), descubiertos al estudiar sus habilidades de reducir acetileno a etileno, el cual es un indicador de la actividad de la nitrogenasa. La nitrogenasa cataliza la reducción de dinitrógeno a amoníaco [13]. Se ha encontrado que algunas actinobacterias incluidas en 120 géneros [14] como *Frankia* spp. crecen en forma de hifas, bajo condiciones limitadas de nitrógeno y condiciones aeróbicas, formando órganos especiales para la fijación de nitrógeno, consistentes en vesículas generalmente terminales de las hifas o laterales en las hifas cortas [12]. Éstas vesículas están rodeadas por múltiples capas de hofanoides, un

esteroide lipídico bacteriano que protege a la enzima nitrogenasa sensible al oxígeno para que realice su actividad [15].

Bajo condiciones micro-aerófilas y muy bajas de nitrógeno, se suele expresar la enzima nitrogenasa en las hifas [16]. A estas actinobacterias se les denomina “diazótrofas”, por su capacidad de fijar nitrógeno [14]. Así, algunas actinobacterias son capaces de colonizar a la raíz de las plantas, haciendo que estas formen raíces radicales curvadas y formando nódulos en la raíz, por lo que se les ha denominado también “actinorizas”, donde se activan las nitrogenasas dentro de la planta y se protegen a su vez de la acción del oxígeno; esto dependerá mucho del tipo de planta que colonicen y de las bajas condiciones de nitrógeno presentes [16].

Dentro de los géneros de actinobacterias a los cuales se les ha encontrado esta capacidad, ya sea por mecanismos simbióticos y no simbióticos en la planta, además del género *Frankia* [13,15], se incluye a los géneros *Streptomyces*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Slackia*, *Rothia*, *Gordonibacter* [17] y algunas cepas de las familias Thermomonosporaceae y Micromonosporaceae [1,2].

Muchas bacterias endófitas y epífitas de rizósfera, dentro de las que se colocan las actinobacterias, se han demostrado como productoras de fitohormonas con genes integrados para este fin [18]. Las fitohormonas son reguladoras del crecimiento de las plantas, produciendo como resultado modificaciones benéficas en la arquitectura de la raíz, afectando la elongación e influyendo en la organogénesis, formación de abundantes raíces secundarias y pelos radicales [19], por mencionar algunos ejemplos. De las fitohormonas destacan las auxinas/AIA, las giberelinas, las citoquininas [20], ácido abscísico y la ACC desaminasa. Se ha encontrado dentro del grupo de las actinobacterias a los géneros *Actinomyces*, *Frankia*, *Micrococcus*, *Nocardia* y *Streptomyces* como principales productoras de fitohormonas, principalmente de AIA [14,21].

La auxina Ácido-3-Indol Acético (AIA) encontrada en plantas y producida por microorganismos, es la hormona más importante implicada en la estimulación del crecimiento de las plantas [14,20,22], principalmente influye en la formación de raíces laterales y pelos radiculares, los cuales participan en una mejor captación de agua y nutrientes, lo que a su vez contribuye al incremento de la producción de biomasa [23,24]. También han probado el incremento en la germinación de semillas, la elongación de la raíz primaria y el incremento en el peso seco de productos de cosecha como cereales y leguminosas [2,7].

En bajas o muy bajas concentraciones el AIA estimula y en altas concentraciones inhibe su crecimiento haciendo una interacción negativa o patógena en las plantas, como es el caso de *Pseudomonas aeruginosa* con algunos hospederos [22,25].

Los mecanismos de síntesis de AIA se han clasificado basados en el triptófano (Trp) como vía Trp-dependientes y Trp-independientes, pero las rutas independientes de triptófano no han sido probadas en bacterias (Fig. 3) [20,21]. Las cuatro principales vías de síntesis de AIA por bacterias Trp-dependientes son: ácido-3-indol pirúvico (IPA), triptamina (TPM), indol-3-acetonitrilo (IAN) y como último se ha adicionado la vía de indol-3-acetamida (IAM) [25–27].

El fósforo (P) es uno de los macronutrientes más esenciales para el desarrollo de la planta y es el más limitado después del nitrógeno [3,28,29]. El P orgánico se encuentra en bajas proporciones mayormente como inositol fosfato [30]. Una vasta proporción de P inorgánico aplicado al suelo como fertilizante es rápidamente inmovilizado después de la aplicación y se convierte en no disponible para la planta, hasta un 90% o mayor [28].

Así, las plantas tienen una baja disponibilidad de P debido a que en la vasta mayoría se encuentra en formas insolubles, y las plantas únicamente lo pueden disponer ya sea como fosfato monobásico o dibásico. [31]. La presencia

dominante de estas formas iónicas de ortofosfato, son pH dependientes. A un pH de 4-5 el orto fosfato usualmente existe como iones H_2PO_4^- , pero si el pH se incrementa primero aparecen los iones HPO_4^{2-} y después la forma iónica PO_4^{3-} se convierte en la dominante [30].

Los microorganismos de rizósfera cumplen un papel esencial en los procesos de transformación de P y en los ciclos de movilización y nutrición por la planta [29]. Aunque no se sabe con exactitud los mecanismos por los cuales los microorganismos cumplen esta función con el P, las teorías más acertadas indican alguno de estos activadores: **1)** Solubilización por medio de la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular como el acetato, lactato, malato, oxalato, succinato, citrato, gluconato, ketogluconato, etc., donde sus grupos hidroxilo y carboxilo, oxidan o quelan los cationes de Al, Fe y Ca unidos a los grupos fosfato, convirtiéndolos en formas solubles. **2)** Por medio de la producción de otros ácidos como el láctico, cítrico, tartárico, glicólico, oxálico, malónico y succínico, quelando grupos funcionales sulfhídrico, nítrico, y carbónico. **3)** La producción de enzimas solubilizadoras de fosfatos son: **a.** las fosfatasas (fosfohidrolasas) que se unen a materia orgánica catalizando la hidrólisis de las uniones éster y anhídrido de los fosfatos, **b.** las fitasas (mioinositol hexafosfato fosfohidrolasas) y **c.** las fosfonatasas y C-P liasas rompiendo los enlaces C-P de organofosfonatos. Estas enzimas dependen de un pH óptimo y son clasificadas como fosfatasas alcalinas ($\text{pH} > 7$) o ácidas ($\text{pH} < 6$). [29–31].

Dentro de las actinobacterias capaces de solubilizar fosfato de fuentes minerales se han reportado especies de los géneros: *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Actinomadura*, *Rhodococcus*, *Actinoplanes*, *Microbiospora* y *Streptosporangium*. En el caso de la solubilización de fosfato inorgánico, el género *Streptomyces* solubiliza fósforo por medio de la producción de ácidos orgánicos [30] y de enzimas fosfatasas [7,32–35].

La deficiencia de hierro en plantas ha sido catalogada como uno de los problemas más importantes en la fertilización [7,36]. El hierro es uno de los

elementos más abundantes de la tierra. Es un cofactor necesario en procesos enzimáticos, metabolismo de oxígeno y para la síntesis de ADN y ARN [37], la mayoría se encuentra en forma insoluble como hidróxido férrico, permaneciendo no disponible para su uso en suelo para organismos y plantas. Algunas bacterias son capaces de secuestrar el hierro del suelo en solución y de complejos orgánicos de hierro a través de sideróforos, específicamente el Fe^{3+} [14,38].

Los sideróforos son pigmentos extracelulares fluorescentes con afinidad al hierro (III). Son solubles en agua y de bajo peso molecular (500-1000 Da) [39]. Son producidos por diversos microorganismos en el suelo, entre ellos las actinobacterias. Por medio de estos, se da un fenómeno de quelación, formando un complejo al secuestrar el ion Fe^{+3} y reducirlo por procesos metabólicos a Fe^{+2} , apoyando una función fundamental de aprovechamiento de nutrientes para el crecimiento de las plantas y para los propios microorganismos [40].

En algunas bacterias se pueden observar en cultivo algunos de estos compuestos, que se manifiestan como pigmentos difusibles en el agar. Un ejemplo de ello es la pioverdina en la *Pseudomonas aeruginosa* [38]. Además, las bacterias productoras de sideróforos pueden, mediante competencia nutricional por el Fe, inhibir el crecimiento de patógenos bajo condiciones de baja disponibilidad de hierro. Sin embargo, bajo condiciones ácidas ($\text{pH} < 6$), la demanda de hierro incrementa, pero los sideróforos son menos eficientes [14]. Se conocen más de 500 sideróforos diferentes y sólo cerca de 270 han sido estructuralmente caracterizados; además, los mecanismos de captura de Fe aún están siendo dilucidados [37,38].

Algunos géneros asociados a la adquisición de hierro y como biocontrol sobre hongos fitopatógenos, por su habilidad en la producción de antibióticos y sideróforos, son especies del género *Streptomyces* [38,41–43] que produce sideróforos desferroxamina, como las desferroxaminas G, B y E [42], también empleados en medicina y en biorremediación de suelos [2,40] y especies de los

géneros *Nocardia*, *Rhodococcus*, y *Thermobifida*. Estos, en su mayoría son productoras de sideróforos de tipo hidroxamato, y en menor proporción catecolatos, α -hidroxicarboxilatos y mixtos [2,37,38,40,44,45].

Se sugiere que hay tres mecanismos por los cuales el hierro es transportado por sideróforos hacia los microorganismos y plantas para su aprovechamiento (**Fig. 1**). El primero (A) involucra una permeasa para los sideróforos que ya han formado el complejo con el Fe; después de transportado, el Fe puede ser introducido del sideróforo por una reductasa citoplasmática que reduce el Fe^{3+} disociándolo a Fe^{2+} del sideróforo ya inestable, que ya puede ser destruido o también removido del quelato por hidrólisis. El segundo mecanismo (B) se denomina directo, implica la unión del sideróforo Fe a la superficie celular, donde lo recibe un receptor del desferri-sideróforo, esto involucra un proceso de reducción a Fe^{2+} , después es removido e ingresado sin necesidad de ser transportado por el sideróforo; y en el tercer mecanismo (C) se hace una disociación extracelular, en la que el Fe se reduce y remueve en el mismo sitio y lejos del canal iónico de Fe [40,44].

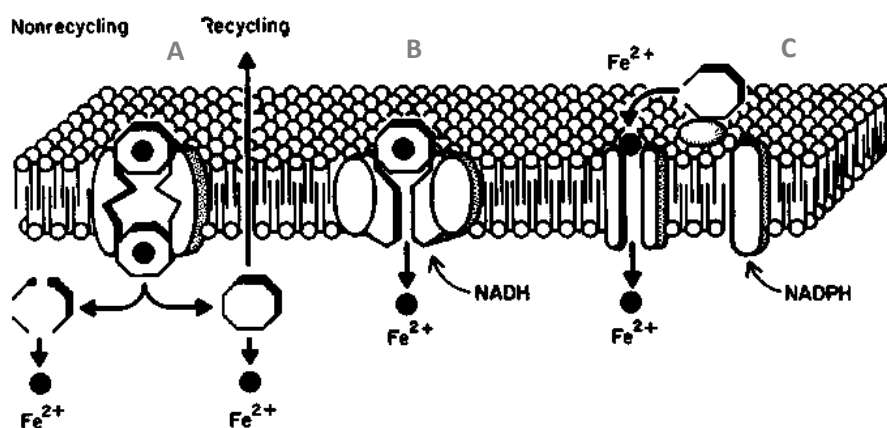


Fig. 1 Mecanismos generales de transporte de Fe por microorganismos y plantas. Imagen tomada de Crowley *et al.* [44].

Por la importancia que tienen el AIA, la fijación de nitrógeno, el hierro y la solubilización de fosfatos en los ciclos vitales de la relación planta-

microorganismo, y para fines de este proyecto, en este capítulo se muestra el análisis que se hizo para la selección de cepas de actinobacterias con mejores rendimientos de éstos atributos, para ser consideradas como bacterias promotoras del crecimiento vegetal en un bioinoculante sólido en biopelícula, aunado a las pruebas de formación de biopelícula mostrados en el capítulo anterior.

3. Materiales y Métodos

3.1. Reto planta microorganismo

Se emplearon semillas ecotipo Col-0 de *A. thaliana* reportera inducible por auxinas DR5:GUS. Las semillas se desinfectaron superficialmente con solución de hipoclorito de sodio al 20% por 7 minutos, posteriormente se dieron 5 enjuagues con agua desionizada estéril. Las semillas se germinaron por 6 días en medio Murashige & Skoog basal salts mixture Sigma® (MS) 0.2x en sales carente de aminoácidos y vitaminas y phytagar 1.2% de Phytotechnology® (grado micropropagación) [46]. Las plantas fueron colocadas en una cámara de crecimiento (Percival Scientific AR-95L®) con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 horas de oscuridad, con una intensidad luminosa de 10 mol y una temperatura controlada de 22 °C.

Se probaron los 41 aislados de actinobacterias, por triplicado más un control sin inóculo bacteriano. Se colocó un inóculo de 2.5×10^8 UFC mediante una estría sobre la placa de MS sólido y sobre la estría inoculada se transfirieron 6 plántulas de 6 días de crecimiento desde su germinación. Las plántulas fueron crecidas con la bacteria a probar durante 8 días en la cámara de crecimiento vegetal en las condiciones mencionadas [23].

Para evaluar los resultados del crecimiento, se midió con vernier la raíz principal de la planta, el número de raíces laterales (RL), la densidad de las raíces laterales

(DRL) dividiendo el número de raíces laterales entre la longitud de la raíz primaria y expresada como DRL/cm.

3.2. Ensayos de promoción del crecimiento vegetal

3.2.1. Actividad solubilizadora de fosfatos

Se inocularon dos colonias de las cepas de actinobacterias a probar en medio de caldo NBRIP por triplicado en tubos de ensayo libres de fosfatos, de vidrio con 7 mL del medio en una incubadora con agitación de 125 rpm a 30 °C durante 14 días. Este medio contenía: dextrosa 10 g, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g, KCl 0,2 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1 g; cantidades por litro, pH final 7.0 ± 0.2 [28]. Después del período de incubación, los cultivos se recolectaron y centrifugaron a 5000 rpm durante 20 min y el sobrenadante se recogió y filtró a través de filtros de jeringa Whatman® GD/XP con membrana de PVDF de $0.45 \mu\text{m}$ de tamaño de poro, Cat. WHA69732504. El filtrado se utilizó para la estimación de fósforo por el método del azul de paramolibdato de Olsen y Sommers (1982) [47–50], se utilizó un espectrofotómetro UV/Vis para medir absorbancia a una longitud de onda de 880nm [51].

Como control positivo biológico se utilizó una cepa tipo *Pseudomonas aeruginosa* solubilizadora de fosfatos donada por el Centro Nacional de Recursos Genéticos CNRG. La curva patrón se preparó con fosfato de potasio KH_2PO_4 grado analítico (Anexos Fig. A1).

3.2.2. Producción de AIA

Las cepas seleccionadas de actinobacterias se inocularon en medio de caldo B suplementado con triptona. La composición de este caldo fue la siguiente: dextrosa 5.0 g, K_2HPO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g, NH_4NO_3 0.4 g, NaCl 0.2 g, triptona 20 g, FeCl_3 0.1 g, cantidades por litro, pH final 7.0 ± 0.2 . Las actinobacterias se cultivaron

por triplicado en tubos cónicos tipo Falcon™ con 7 mL del medio en una incubadora con agitación de 125 rpm a 30 °C durante 14 días. Después del período de incubación, se centrifugaron cultivos de 5 mL cada uno a 3000 rpm por 15 min, se recolectaron 100 µL de sobrenadante y 200 µL de reactivo de Salkowsky (1 mL de FeCl₃ 0.5 M en 50 mL de HClO₄ al 35 %) [52], la reacción se reveló en una microplaca de fondo plano de 96 pocillos Falcon™ cat. 08-772-2C. Se utilizó un lector de microplacas multimodo VARIOSKAN™ Lux, espectrofotómetro ELISA Thermo Scientific™ a 530 nm para medir la absorbancia, y como control positivo se utilizó *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 AIA productor [22,53]. Para la elaboración de la curva patrón se utilizó el reactivo de Ácido Indol Acético comercial, Sigma-Aldrich® (Anexos Fig. A2).

3.2.3. Crecimiento de aislados en medio libre de nitrógeno

Las 41 cepas de actinobacteria se inocularon por estría cruzada en un medio libre de nitrógeno (NFB). La composición de este medio de cultivo fue la siguiente: KH₂PO₄ 0.2 g, K₂HPO₄ 0.8 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, CaSO₄ 0.1 g, Na₂MoO₄ 0.001 g, FeSO₄·7H₂O 0.04 g, sacarosa 5 g, solución de azul de bromotimol (5%) en KOH (2N) 2 mL⁻¹. Estos medios se suplementaron con agar bacteriológico al 1.5% libre de inhibidores microbianos sin fuente de nitrógeno (Merck®), las cantidades fueron por litro, pH final 7.6 ±0.1 [8,16,54]. Se informó la presencia de micelio aéreo. Se examinaron las características de crecimiento de los cultivos después de 14 días de incubación a 30 °C analizando cada 3 días las estructuras diazotróficas al microscopio óptico [13].

Para la obtención de resultados, se evaluó el crecimiento sobre la superficie del medio: - poco crecimiento, + buen crecimiento y ++ excelente crecimiento, siendo relativamente proporcional a la cantidad de nitrógeno fijado [8,13].

Como control negativo del medio NFB se usó *E. coli* y como control positivo *Azotobacter* spp.

3.2.4. Producción de sideróforos

Las cepas de actinobacterias se inocularon en medio de Simon y Tessman [55], en condiciones severas de limitación de hierro por triplicado en tubos cónicos con 7 mL del medio en una incubadora con agitación de 120 rpm a 30 °C durante 12 días. Este medio contenía: Succinato de sodio 10 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g, Tris 12.1 g, $\text{MgCl} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, NH_4Cl 1.1 g, Na_2SO_3 0.142 g, K_2HPO_4 0.272 g, cantidades por litro, pH final 6.8 ± 0.2 [8,56]. Después del período de incubación, se centrifugaron cultivos de 5 mL cada uno a 4000 rpm por 6 min, se recogieron cuidadosamente 100 μL de sobrenadante y se mezclaron con 100 μL de perclorato férrico 5 mM en ácido perclórico 0.14 M para revelar la reacción en un recipiente plano de 96 pocillos. microplaca inferior Falcon™ cat. 08-772-2C. Se utilizó un espectrofotómetro ELISA Thermo Scientific™ con lector de microplacas multimodo VARIOSKAN™ Lux a 480 nm para el método de prueba cuantitativa según Atkin (1970) [57]. El reactivo sideróforo comercial Salmesilato de desferrioxamina $\text{C}_{25}\text{H}_{48}\text{N}_6\text{O}_8 \cdot \text{CH}_4\text{O}_3\text{S}$ o Desferal®, Sigma-Aldrich N.º de cat. D9533 se utilizó como control positivo y para la curva patrón (Anexos Fig. A3). Como microorganismo control positivo se empleó una cepa de *P. aeruginosa* ATCC 9027 productora de sideróforos.

Concluido este experimento, se seleccionaron las cepas de actinobacterias más productivas en sideróforos, para determinar su actividad antagonista como biocontrol de fitopatógenos frente a *Phytophthora cinnamomi*, *Verticillium* sp y *Neopestalotiopsis* sp, de la colección de hongos fitopatógenos del Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Alimentos QFB-UMSNH, mediante un ensayo *in vitro* de cultivo dual en Agar Papa Dextrosa o PDA (Difco®). Los aislados se inocularon a 10^6 células 2 días antes en una mitad de placa con medio PDA Bioxon® y se preincubaron a 30 °C, seguido de la inoculación de hongos en la otra mitad de la placa. Las zonas de inhibición se midieron después de 7 días de incubación a

temperatura ambiente según el método de Berg [58]. Todas las cepas se probaron por triplicado. Como control positivo se utilizó *P. aeruginosa* productora de sideróforos, como control negativo cada hongo sin actinobacterias.

3.3. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos fueron hechos a través del software JMP 11 by SAS™, incluido el análisis de varianza unidireccional (ANOVA) y las comparaciones por pares de Tukey-Kramer y Dunnett.

4. Resultados y discusión

4.1. Reto planta microorganismos

Los retos se hicieron en dos grupos, sin respetar el número consecutivo, ya que se inocularon conforme fue creciendo el inóculo, recordando que algunas actinobacterias tienen más lento crecimiento que otras, por lo que para expresar los resultados y discusión se manejara el grupo 1 y 2. De manera visual en las Figuras 6 y 9 se presentan las evidencias de la respuesta que *A. thaliana* tuvo con respecto de cada uno de los aislados. Para fines de facilitar el manejo de datos, se omitirán las siglas “ARI” y/o “ARI_A” de todas las cepas en tablas y figuras.

Grupo 1

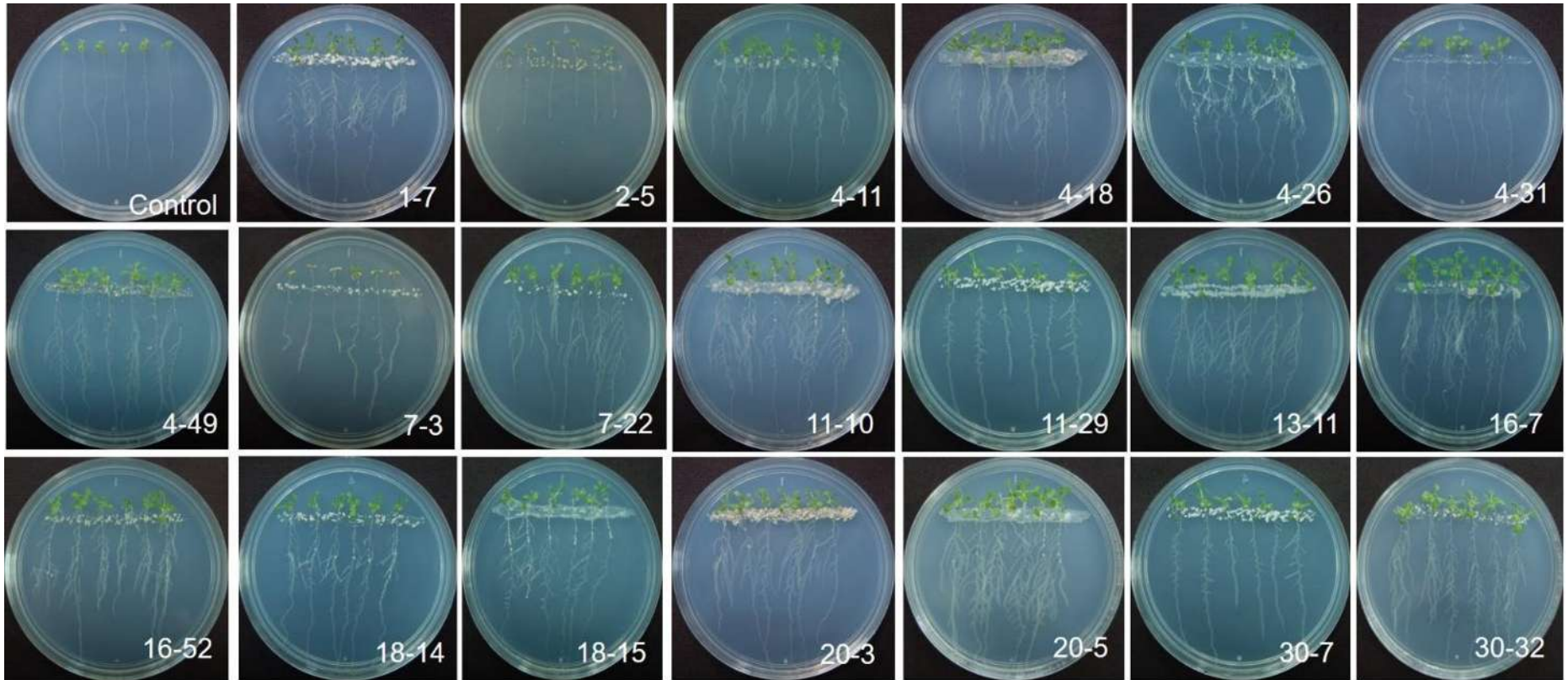


Fig. 2 Ensayo planta-microorganismo con *A. thaliana* DR5:GUS grupo 1 (ARI).

Al comparar el crecimiento de la planta en general, el área foliar, la arquitectura y biomasa de la raíz con respecto al control, se observaron diferencias significativas aumentadas para considerar a las bacterias como PGP, no siendo así para los retos con las cepas A2-5 y la A7-3 que se consideraron como bacterias con efecto represor para la planta (Fig. 2).

Se hizo un análisis de ANOVA y comparaciones de medias de Tukey-Kramer y Dunnett con una $p < 0.05$ representados en la Figuras 3 y 4 con respecto al control. El control se tomó como un 100% de crecimiento de la planta sin estímulo y de ahí se partió para considerar el porcentaje de incremento de la biomasa vegetal, considerando los 3 parámetros: el porcentaje Longitud de la Raíz Primaria (LRP), el porcentaje de Raíces Laterales (RL) y el porcentaje en Densidad de las Raíces Laterales (DRL). Se considera que RL y DRL son los parámetros de mayor importancia ya que las raíces responden a estímulos químicos y nutrientes en la interacción planta-microorganismo [23,24], así en el gráfico de la Figura 3 y en el gráfico de la Figura 6 los niveles no unidos por la misma letra son significativamente distintos de acuerdo a un análisis de ANOVA de una vía y comparación de medias con el control Tukey y Dunnett (Fig. 3 y 4).

En el pie de gráfica de la Figura 2 se muestran numéricamente los porcentajes de incremento de cada uno de los aislados del grupo.

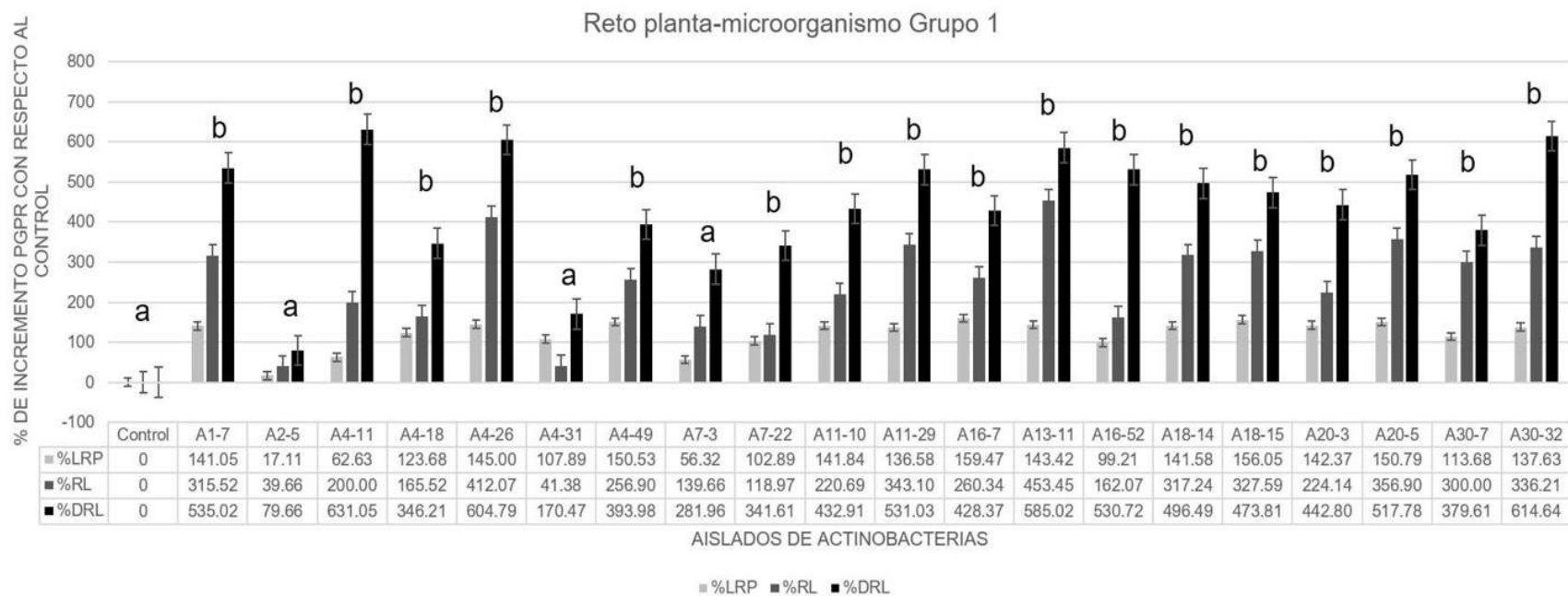


Fig. 3 Reto planta-microorganismo del Grupo 1 (ARI). Porcentaje de longitud de la raíz principal (%LRP), porcentaje de raíces laterales (%RL), porcentaje de la densidad de las raíces laterales (%DRL).

A			B			C		
Nivel		Media	Nivel		Media	Nivel		Media
A20-5	A	6.7083333	A30-32	A	27.333333	A4-11	A	4.5422500
A18-15	A	6.5583333	A16-7	A	27.166667	A30-32	A B	4.4240833
A1-7	A	6.5416667	A4-26	A B	25.500000	A4-26	A B C	4.3531667
A13-11	A	6.5416667	A1-7	A B	24.916667	A16-7	A B C	4.2108333
A16-7	A	6.4916667	A20-5	A B	24.750000	A1-7	A B C D	3.8510000
A4-49	A	6.4500000	A18-14	A B C	22.916667	A11-29	A B C D	3.8222500
A18-14	A	6.4166667	A18-15	A B C D	21.666667	A16-52	A B C D	3.8201667
A11-10	A	6.3500000	A11-29	A B C D	21.333333	A20-5	A B C D	3.7270000
A20-3	A	6.2583333	A16-52	A B C D	20.583333	A18-14	A B C D E	3.5738333
A30-32	A B	6.2500000	A13-11	A B C D	20.083333	A18-15	A B C D E	3.4104167
A4-18	A B	6.1333333	A11-10	A B C D	19.500000	A20-3	A B C D E	3.1873333
A4-26	A B C	6.0000000	A20-3	A B C D	19.416667	A11-10	A B C D E	3.1158333
A11-29	A B C D	5.5916667	A4-11	A B C D	19.000000	A13-11	A B C D E	3.0832500
A4-31	A B C D	5.5166667	A4-49	B C D	18.166667	A4-49	B C D E F	2.8358333
CONTROL	A B C D	5.5083333	A4-18	C D E	15.333333	A30-7	C D E F	2.7323333
A16-52	A B C D	5.4583333	A30-7	D E F	14.000000	A4-18	D E F	2.4920000
A7-22	A B C D	5.4166667	A7-22	D E F	13.500000	A7-22	D E F	2.4587500
A30-7	B C D	4.8666667	A7-3	E F G	8.750000	A7-3	E F G	2.0294167
A4-11	C D	4.6750000	A4-31	F G	6.833333	A4-31	F G	1.2269167
A7-3	D E	4.4166667	CONTROL	G	4.000000	CONTROL	G	0.7198333
A2-5	E	3.2666667	A2-5	G	1.916667	A2-5	G	0.5733333

Fig. 4 Análisis de comparación de medias de Tukey-Kramer del grupo 1 (ARI), reto planta-microorganismo. **A.** Longitud de la Raíz Primaria. **B.** Raíces Laterales. **C.** Densidad de las Raíces Laterales.

Los resultados arrojados en el análisis estadístico y el resultado capturado en imágenes del reto planta-microorganismo (Fig. 2) se constata que la mayoría de los aislados de actinobacterias del grupo 1 son Promotoras del Crecimiento Vegetal o PGP en el modelo vegetal *A. thaliana*, a excepción de los aislados A2-5, A4-31 y A7-3, en las cuales se ve una reducción del efecto del crecimiento vegetal con respecto al control que se podría considerar como un efecto represor en lugar de estimulante.

Grupo 2

De una forma similar al comparar el crecimiento de *A. thaliana* en presencia de los aislados del grupo 2, se observa en general de manera visual un incremento en el área foliar, la arquitectura y biomasa de la raíz con respecto al control, y a su vez visualmente también se distingue un efecto represor para los aislados A7-17 y la A11-37 (Fig. 5).

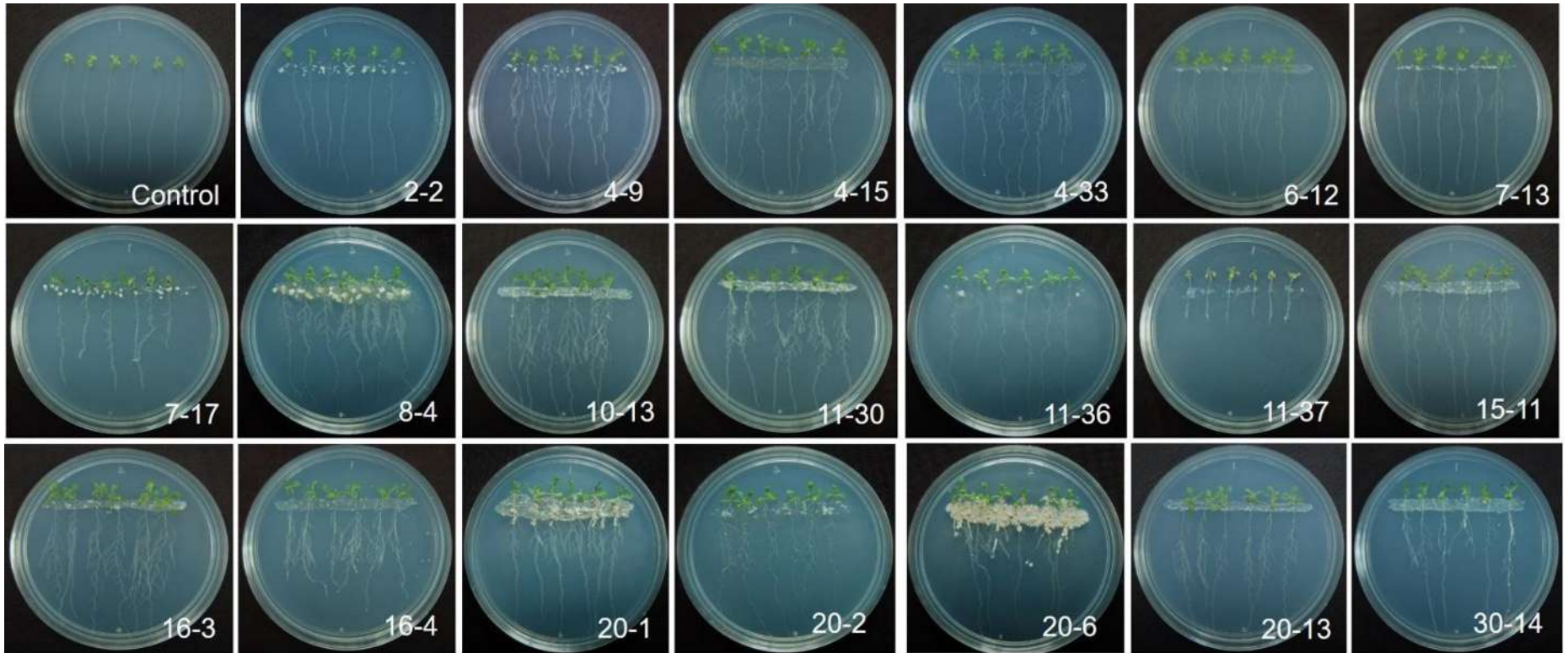


Fig. 5 Ensayo planta-microorganismo con *A. thaliana* DR5:GUS grupo 2 (ARI).

Se hizo un análisis de ANOVA y comparaciones de medias de Tukey-Kramer y Dunnett con una $p < 0.05$ representados en las Figuras 6 y 7 con respecto al control. El control se tomó como un 100% de crecimiento de la planta sin estímulo y de ahí se partió para considerar el porcentaje de incremento de la biomasa vegetal, considerando los 3 parámetros: el porcentaje Longitud de la Raíz Primaria (LRP), el porcentaje de Raíces Laterales (RL) y el porcentaje en Densidad de las Raíces Laterales (DRL). Se considera que RL y DRL son los parámetros de mayor importancia ya que las raíces responden a estímulos químicos y nutrientes en la interacción planta-microorganismo [23], así en el gráfico de la Figura 6 los niveles no unidos por la misma letra son significativamente distintos de acuerdo a un análisis de ANOVA de una vía y comparación de medias con el control Tukey y Dunnett (Fig. 6 y 7).

En el pie de gráfica de la Figura 6 se muestran numéricamente los porcentajes de incremento de cada uno de los aislados del grupo.

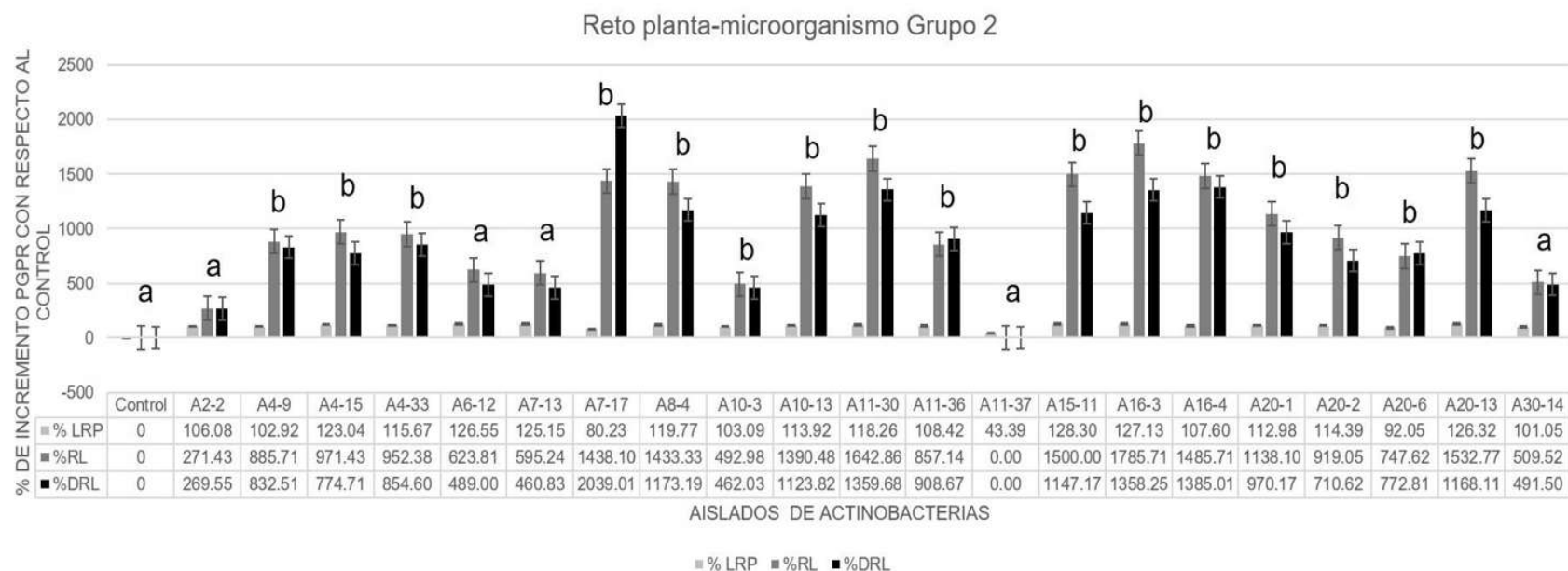


Fig. 6 Reto planta-microorganismo del Grupo 2 (ARI). %LRP, porcentaje de longitud de la raíz principal, %RL, porcentaje de raíces laterales, %DRL, porcentaje de la densidad de las raíces laterales.

Nivel	Media	Nivel	Media	Nivel	Media
A15-11 A	6.0944444	A16-3 A	20.833333	A7-17 A	5.1035556
A16-3 A	6.0388889	A11-30 A B	19.166667	A16-4 B	3.4667778
A20-13 A	6.0277778	A20-13 A B	18.000000	A11-30 B C	3.4032222
A6-12 A	6.0111111	A15-11 A B	17.500000	A16-3 B C	3.3996667
A7-13 A B	5.9444444	A16-4 A B C	17.333333	A10-3 B C D	3.1171111
A4-15 A B	5.8444444	A7-17 A B C D	16.777778	A8-4 B C D	2.9363889
A8-4 A B	5.6888889	A8-4 A B C D	16.722222	A20-13 B C D	2.9323889
A11-30 A B	5.6172222	A10-13 A B C D E	16.222222	A15-11 B C D	2.8715000
A4-33 A B C	5.4944444	A10-3 A B C D E F	15.611111	A10-13 B C D	2.8129444
A20-2 A B C	5.4333333	A20-1 B C D E F G	13.277778	A20-1 B C D E	2.4283333
A10-13 A B C	5.4111111	A4-15 C D E F G H	11.333333	A11-36 B C D E	2.2743889
A20-1 A B C	5.3666667	A4-33 D E F G H	11.111111	A4-33 B C D E	2.1390000
A10-3 A B C	5.1944444	A20-2 D E F G H	10.722222	A4-9 C D E	2.0838889
A11-36 A B C	5.1500000	A4-9 E F G H	10.333333	A4-15 D E F	1.9390556
A11-37 A B C	5.1500000	A11-36 F G H	10.000000	A20-6 D E F	1.9342222
A16-4 A B C	5.1111111	A20-6 G H I	8.722222	A20-2 D E F	1.7786667
A2-2 A B C	5.0388889	A6-12 G H I	7.277778	A30-14 E F G	1.2301667
A4-9 A B C D	4.8888889	A7-13 H I J	6.944444	A6-12 E F G	1.2238889
A30-14 B C D	4.8000000	A30-14 H I J K	5.944444	A7-13 E F G	1.1535556
Control B C D	4.7500000	A2-2 I J K	3.166667	A2-2 F G	0.6746111
A20-6 C D	4.3722222	Control J K	1.166667	Control G	0.2503333
A7-17 D	3.8111111	A11-37 K	0.000000	A11-37 G	0.0000000

Fig. 7 Análisis de comparación de medias de Tukey-Kramer del grupo 1 (ARI), reto planta-microorganismo. **A.** Longitud de la Raíz Primaria. **B.** Raíces Laterales. **C.** Densidad de las Raíces Laterales.

Los resultados arrojados en el análisis estadístico y el resultado capturado en imágenes del reto planta-microorganismo (Fig. 5) se constata que, la mayoría de los aislados de actinobacterias del grupo 1 son Promotoras del Crecimiento Vegetal o PGP en el modelo vegetal *A. thaliana* a excepción de los aislados ARI_A2-2, ARI_A6-12, ARI_A7-13, y ARI_A30-14 que no muestran un efecto estimulante y en el caso del aislado ARI_11-37 se ve una reducción del efecto del crecimiento vegetal con respecto al control que se podría considerar como un efecto represor en lugar de estimulante.

El 80.5% de las cepas de actinobacterias, mostraron un efecto positivo como PGPR en el reto planta microorganismo con *A. thaliana*, y un 19.5% mostró un efecto similar al control o represor (ARI_A2-2, ARI_A2-5, ARI_A4-31, ARI_A6-12, ARI_A7-3, ARI_A7-13, ARI_A11-37 y ARI_A30-14); sin embargo, las cepas en su totalidad y sin descartar éstos últimos, fueron sometidos a diversas pruebas adicionales de promoción del crecimiento vegetal. Este ensayo es funcional para una mejor toma de decisión con respecto a los aislados que serían elegidos para formar parte del bioinoculante del presente trabajo.

4.2. Ensayos de promoción del crecimiento vegetal

Los ensayos consistieron en: 1. Formación de biopelícula, el cual se analiza y discute en el capítulo II, 2. Crecimiento en medio libre de nitrógeno, presencia de micelio aéreo y presencia de estructuras diazotróficas como parte de la capacidad fijadora de nitrógeno, 3. Producción de sideróforos, 4. Producción de Ácido Indol Acético y 5. Actividad solubilizadora de fosfatos.

4.2.1. Actividad solubilizadora de fosfatos

En la Tabla 1 se muestran los resultados de la determinación de pH de las 41 cepas de actinobacterias (ARI), en su totalidad con una tendencia ácida. Con esta información adicional, sabemos que el grupo de actinobacterias de este estudio, no utiliza la vía de solubilización de ácidos orgánicos, no utiliza la vía de las fosfatasas alcalinas y por la gran cantidad de sideróforos producidos (Tabla 5), se especula que estas bacterias utilizan a los sideróforos como herramienta de solubilización de fosfatos y/o la vía de las enzimas fosfatasas ácidas que es otro vía comúnmente utilizada por las actinobacterias [8].

Tabla 1.

Resultados de pH del grupo de actinobacterias (ARI) en caldo NBRIP para solubilización de fosfatos.

AISLADO	PH	AISLADO	PH	AISLADO	PH
Control (+)	4.5*	A 7-13	5.8*	A 16-4	5.92*
A 1-7	4.63*	A 7-17	6.12	A 16-7	6.48
A 2-2	4.56*	A 7-22	5.92*	A 16-52	6.24
A 2-5	6.48	A 8-4	4.78*	A 18-14	5.78*
A 4-9	6.04	A 10-3	5.07*	A 18-15	4.8*
A 4-11	5.16*	A 10-13	5.43*	A 20-1	5.85*
A 4-15	6.19	A 11-10	5.94*	A 20-2	5.92*
A 4-18	5.17*	A 11-29	6.39	A 20-3	5.34*
A 4-26	6.03	A 11-30	5.38*	A 20-5	5.64*
A 4-31	4.47*	A 11-36	5.01*	A 20-6	4.76*
A 4-33	4.56*	A 11-37	5.77*	A 20-13	5.86*
A 4-49	4.14*	A 13-11	4.5*	A 30-7	6.07
A 6-12	5.85*	A 15-11	5.49*	A 30-14	4.93*
A 7-3	5.04*	A 16-3	6.2	A 30-32	4.67*

Control (+): *Pseudomonas aeruginosa* *pH más ácidos <6 ideales para la acción de la enzima fosfatasa ácida.

Se hizo un análisis de ANOVA y comparaciones de medias de Tukey-Kramer y Dunnett con una $p < 0.05$ representados en las Figuras 8 y 9 con respecto al control. El control utilizado fue una cepa *P. aeruginosa* solubilizadora de fosfatos.

En el gráfico de la Figura 8 y Tabla 2, se encuentran indicadas por la letra **a** al control *P. aeruginosa*, por las letras **b**, **c** y **bc** se muestran las cepas con mayor actividad solubilizadora de fosfatos, los niveles de producción de solubilización de fosfatos son relativamente cercanos entre los primeros 15 que son los indicados por letras sobre las barras. Los valores no ligados por una misma letra, son significativamente distintos entre sí.

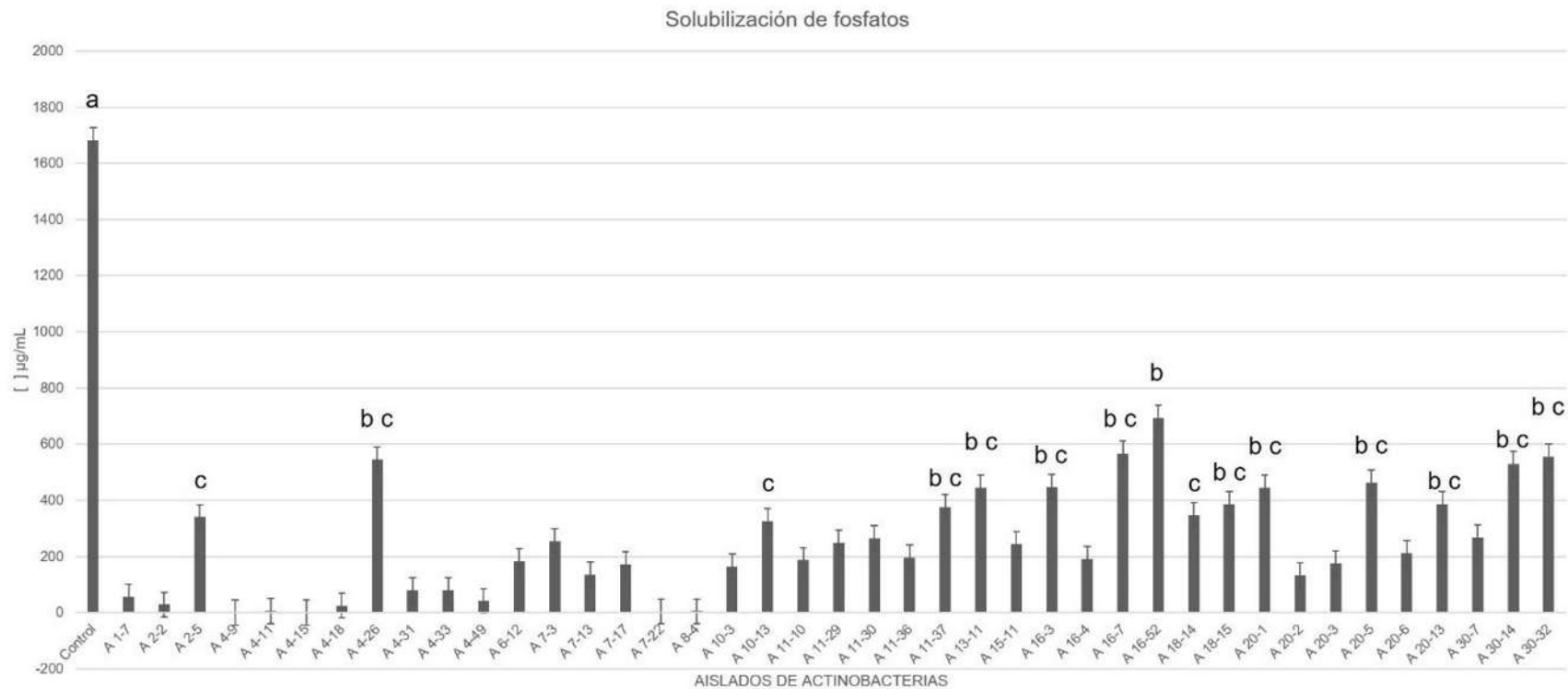


Fig. 8 Solubilización de fosfatos en µg/mL. Los niveles no unidos por la misma letra son significativamente distintos de acuerdo a un análisis de ANOVA de una vía y comparación de medias con el control Tukey y Dunnett.

Tabla 2. Resultados de solubilización de fosfatos (PO_4^{3-}) de las cepas de actinobacterias (ARI)

CEPA	$[\text{PO}_4^{3-}]$ ($\mu\text{g/mL}$)	SD	CEPA	$[\text{PO}_4^{3-}]$ ($\mu\text{g/mL}$)	SD
Control (+)	1682	$\pm 120.12a$	A20-6	212	± 25.80
A16-52	693	$\pm 43.50b$	A11-36	197	± 6.95
A16-7	565	$\pm 13.78bc$	A16-4	190	± 20.50
A30-32	555	$\pm 11.42bc$	A11-10	187	± 9.68
A4-26	544	$\pm 8.37bc$	A6-12	182	± 15.70
A30-14	528	$\pm 9.52bc$	A20-3	175	± 8.23
A20-5	463	$\pm 6.72bc$	A7-17	171	± 11.70
A16-3	448	$\pm 15.00bc$	A10-3	164	± 11.10
A20-1	446	$\pm 20.30bc$	A7-13	135	± 9.50
A13-11	444	$\pm 18.70bc$	A20-2	132	± 7.18
A18-15	387	$\pm 9.43bc$	A4-31	80	± 13.79
A20-13	386	$\pm 3.32bc$	A4-33	79	± 11.47
A11-37	376	$\pm 5.00bc$	A1-7	57	± 30.04
A18-14	346	$\pm 3.81c$	A4-49	41	± 4.45
A2-5	340	$\pm 22.00c$	A2-2	28	± 17.32
A10-13	326	$\pm 13.10c$	A4-18	25	± 9.23
A30-7	267	$\pm 7.23c$	A4-11	5	± 8.60
A11-30	264	$\pm 4.86c$	A8-4	4	± 7.50
A7-3	255	$\pm 14.40c$	A7-22	4	± 6.35
A11-29	248	$\pm 5.56c$	A4-15	0	0
A15-11	244	± 20.00	A4-9	0	0

Control (+): *Pseudomonas aeruginosa*

SD Desviación estándar.

Las cepas con mayor actividad solubilizadora de fosfatos fueron ARI_A16-52, ARI_A16-7, ARI_A30-32, ARI_A4-26, ARI_A30-14, ARI_A20-5, ARI_A16-3, ARI_A20-1, ARI_A13-11, ARI_A18-15, ARI_A20-13, ARI_A11-37, ARI_A18-14, ARI_A2,5 y ARI_A10-13, con valores significativamente iguales entre sí (Tabla 2). Para fines de este estudio es útil conocer únicamente cuales de este grupo de bacterias solubilizan fosfatos y cuales lo hacen en mayor proporción para ser elegibles como un atributo de PGP.

Hamdali, encontró actinobacterias que no presentaron secreción de ácidos orgánicos en el medio NBRIP. Sin embargo, solubilizaron fosfatos con ligera

alcalinización del medio, con concentraciones que van desde los 10 µg/mL hasta los 30 µg/mL [2,59]. Madhurama *et al.*, reportaron rangos de 3.2 mg/100mL hasta 32.6 mg/100mL [59,60]. Gangwar *et al.*, reporta cantidades de P solubilizado de 4.8 mg/mL hasta 26.5 mg/mL, utilizando medio Pikoskaya modificado, es decir NBRIP en medio sólido y líquido [61]. Aunque los valores no alcanzan la unidad de miligramos, la eficiencia es considerada dependiendo del cultivo destino. Cabe mencionar que la capacidad solubilizadora de fosfatos se va perdiendo a través de las resiembras “*in vitro*” en el laboratorio al no estar en su hábitat natural competitivo [59].

La actividad de solubilización de fosfato por las actinobacterias probadas se registra también en el resumen de la Tabla 1, en medio PVK donde (++) > 300 µg/mL, (+) actividad entre <300 y hasta 25 µg/mL y (-) sin actividad.

Aunque el método más popular utilizado por investigadores como prueba tamiz para la búsqueda de bacterias solubilizadoras de fosfatos es el propuesto por Kumar y Nautiyal [28], este método no resultó exitoso en nuestro caso al no tener la presencia de formación de halos en placa con un inóculo bacteriano conocido producto de la liberación de ácidos orgánicos, unos de los mecanismos responsables de la solubilización de fosfatos [29].

Se optó por emplear un método cuantitativo en cultivo líquido con una sensibilidad de 0.05 mg/g [51], que ha sido exitoso en casos en donde el método de Kumar y Nautiyal ha tenido resultados negativos [8,29], debido a que existen otros mecanismos de solubilización alternativos al de los ácidos orgánicos [28].

Otro mecanismo es mediado por enzimas: fosfatasas ácidas cuyo pH óptimo es menor a 6, alcalinas, que trabajan a un pH mayor a 7 y fitasas específicamente las que segregan ácido fítico. Y el tercer mecanismo es mediado por sideróforos a través del secuestro de iones metálicos, dejando a cambio una caída en el pH [29,51,62].

4.2.2. Producción de AIA

Para encontrar las cepas con mayor producción de AIA, se hizo un análisis de ANOVA y comparaciones de medias de Tukey-Kramer y Dunnett con una $p < 0.05$ representados en la Figura 9 y la Tabla 3 con respecto al control. El control utilizado fue una cepa de *P. aeruginosa* productora de AIA.

En el gráfico de la Figura 9, se encuentran indicadas por la letra **a** las actinobacterias que no presentan diferencias significativas con respecto al control en la producción de AIA, algunos ejemplos de otras uniones arrojadas por el análisis de ANOVA y comparación de medias de Tukey-Kramer y Dunnett se encuentra indicada en la tabla 3. Debido a la cercanía de valores la mayoría permaneció ligado con hasta 4 cepas, por lo que los que son diferentes de **a** no son significativamente distintos entre ellos. Al tener valores relativamente cercanos entre ellos, se optó por hacer una distribución en grupos (cuartiles) de mayor productor y de manera descendente (Tabla 3).

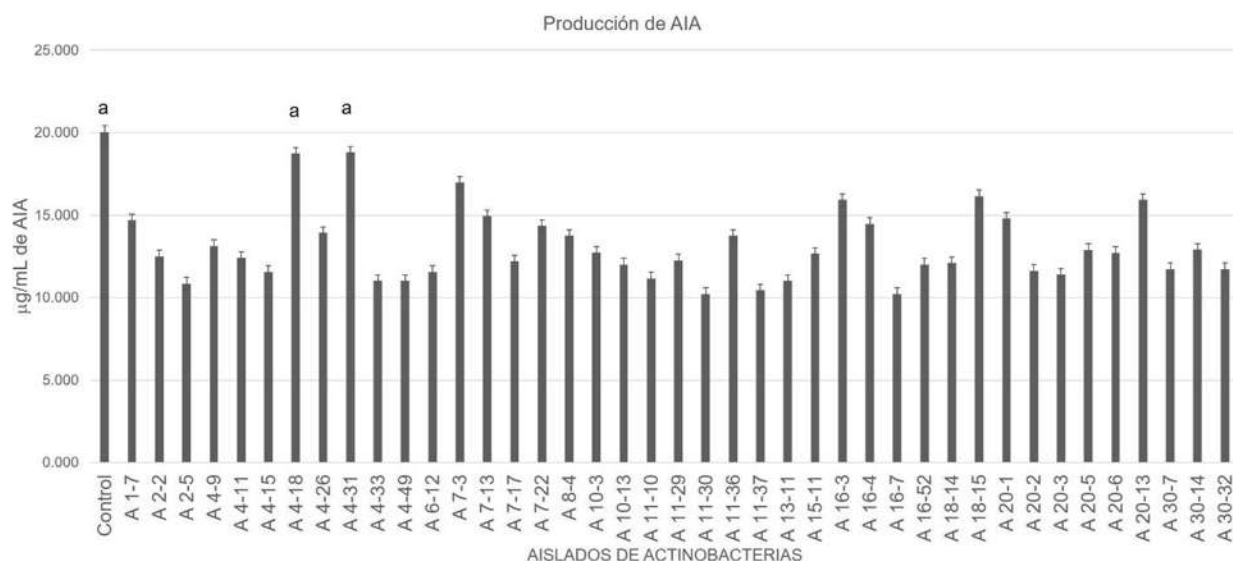


Fig. 9 Gráfico de producción de AIA en µg/mL de cepas de actinobacterias (ARI).

Tabla 3. Resultados en $\mu\text{g/mL}$ de AIA de cepas de actinobacterias (ARI).

AISLADO	$\mu\text{g/mL}$ de AIA	AISLADO	$\mu\text{g/mL}$ de AIA
A4-31	$18.78 \pm 0.370a$	A15-11	12.61 ± 0.12
A4-18	$18.72 \pm 2.50ab$	A2-2	12.47 ± 0.35
A7-3	$16.97 \pm 0.65bc$	A4-11	12.38 ± 0.29
A18-15	$16.16 \pm 0.52bc$	A11-29	12.22 ± 1.31
A16-3	$15.91 \pm 2.97bc$	A18-14	12.06 ± 1.88
A20-13	$15.88 \pm 2.68bc$	A4-15	11.56 ± 1.30
A30-14	$15.48 \pm 1.46bc$	A6-12	11.53 ± 0.16
A7-13	$14.92 \pm 0.85bc$	A20-3	11.36 ± 1.61
A20-1	14.78 ± 0.83	A11-10	11.17 ± 0.84
A1-7	14.70 ± 0.28	A4-33	11.03 ± 0.73
A16-4	14.49 ± 1.18	A13-11	10.98 ± 1.66
A7-22	14.34 ± 0.30	A4-49	10.96 ± 0.88
A20-6	14.25 ± 0.54	A2-5	10.82 ± 1.11
A30-7	14.08 ± 1.05	A11-37	10.45 ± 1.60
A30-32	14.04 ± 0.57	A11-30	10.24 ± 0.95
A4-26	13.94 ± 0.86	A16-7	10.18 ± 1.26
A11-36	13.78 ± 0.88	A7-17	9.97 ± 1.29
A8-4	13.73 ± 0.20	A16-52	9.85 ± 0.30
A4-9	13.12 ± 1.14	A10-13	9.78 ± 0.22
A20-5	12.90 ± 0.28	A20-2	9.53 ± 0.74
A10-3	12.70 ± 0.57	Control (+)	$21.33 \pm 0.55a$

$\pm$ Error estándar, n= 6 repeticiones.

Al analizar los resultados obtenidos y ordenados por cuartiles en la Tabla 3 de la concentración de AIA producido por las cepas de actinobacterias, se observa que el cuartil superior izquierdo 26.82%, representa a las cepas que son consideradas en este trabajo como excelentes productoras de AIA de este grupo, si se compara con lo obtenido por Khamna *et al.*, donde después de evaluar 270 cepas de *Streptomyces* aisladas de 14 diferentes rizósferas, se encontró que una cepa que es buena productora de AIA oscila entre 11 $\mu\text{g/mL}$ hasta 144 $\mu\text{g/mL}$ [19], pero sin dejar de lado que cantidades tan elevadas de AIA podrían ser perjudiciales a la planta. En cuartil inferior izquierdo (24.39%), se separan las que

se consideran como buenas productoras; el cuartil superior derecho (24.39%), las que son productoras moderadas y el cuartil inferior derecho, 24.39%, las que se consideran como bajas productoras. Abd-Alla *et al.* considera que las cepas son valiosas productoras, aunque sus niveles sean bajos o entre rango de 3.5 a 22.5 $\mu\text{g/mL}$, estos datos fueron obtenidos de cepas de *Streptomyces* aisladas de rizósfera de trigo, y estas colaboraron en el mejoramiento de este cultivo [19,58,63].

La capacidad de producir AIA por las actinobacterias objetivo se registra también en el resumen de la Tabla 8, donde se reportan con las siguientes consideraciones $>15 \mu\text{g/mL}$ (++), > 12 pero $<15 \mu\text{g/mL}$ (+) y $<12 \mu\text{g/mL}$ como actividad débil (-) de producción de AIA pero sin descartar su utilidad.

4.2.3. Crecimiento de aislados en medio libre de Nitrógeno

Para probar que las cepas de actinobacterias tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, se evaluó el crecimiento en medio libre de nitrógeno NFB, donde se catalogó de manera visual con dos cruces (++) cuando se tenía un excelente crecimiento en el medio (Fig. 10B) una cruz (+) como buen crecimiento y un signo negativo (-) cuando el crecimiento fue muy deficiente (Fig. 9A), se buscaron además durante el transcurso del crecimiento en este medio, estructuras diazotróficas correspondientes a la actividad de la enzima nitrogenasa, las cuales se podían distinguir como formación de vesículas laterales o terminales y engrosamiento de hifas como se observa en la Figura 10D con flechas amarillas, no todas las cepas presentaron este tipo de estructuras (Fig. 10C).

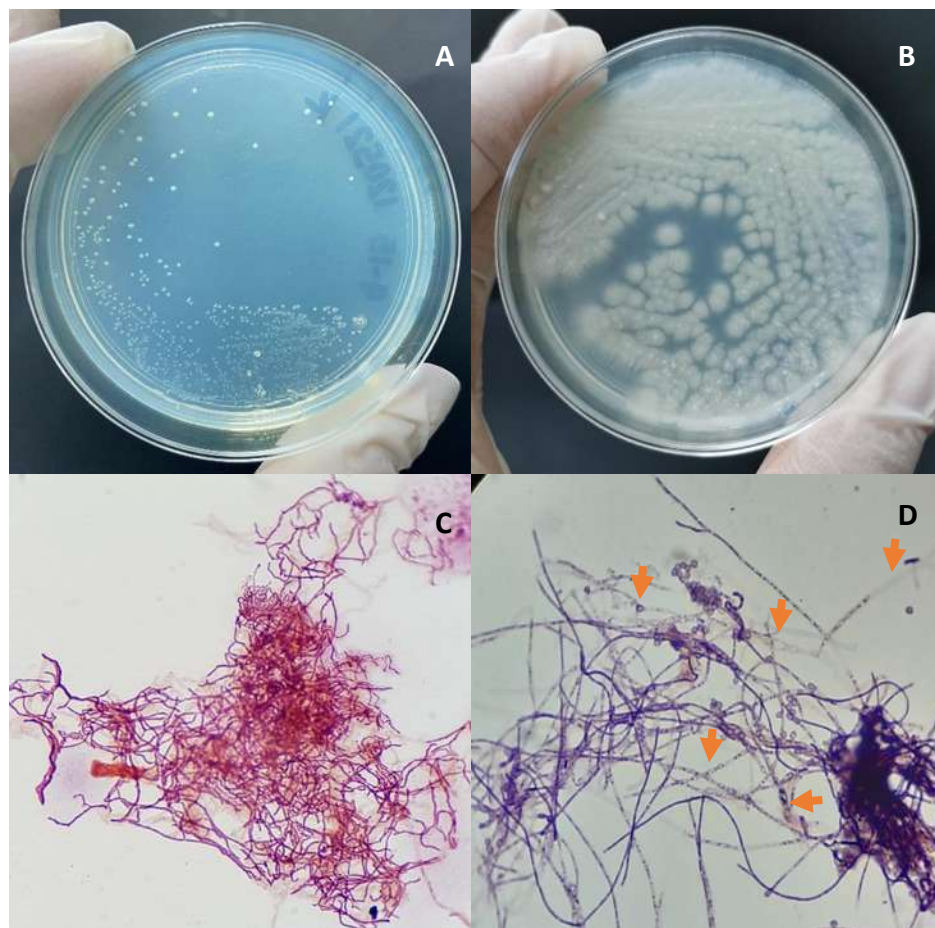


Fig. 10 Pruebas de fijación de nitrógeno en medio NFB. **A.** cepa ARI_A4-15 (-). **B.** cepa ARI_A18-14 (++) **C.** tinción de Gram cepa ARI_A4-15 (100x), sin cambios estructurales aparentes. **D.** tinción de Gram cepa ARI_A18-14 (100x).

Tabla 4. Prueba de fijación de Nitrógeno de las cepas de actinobacterias (ARI).

CEPA	CRECIMIENTO ¹	MICELIO AÉREO	ESTRUCTURAS DIAZOTRÓFICAS	CEPA	CRECIMIENTO ¹	MICELIO AÉREO	ESTRUCTURAS DIAZOTRÓFICAS
A1-7	+	+	+	A11-30	+	-	-
A2-2	+	-	-	A11-36	++	+	+
A2-5	+	+	+	A11-37	++	+	+
A4-9	++	+	+	A13-11	++	+	+
A4-11	+	+	-	A15-11	-	-	-
A4-15	-	-	-	A16-3	++	+	+
A4-18	+	+	+	A16-4	++	+	+
A4-26	++	+	+	A16-7	++	+	+
A4-31	+	+	-	A16-52	++	+	+
A4-33	+	+	+	A18-14	++	+	+
A4-49	+	+	+	A18-15	++	+	+
A6-12	+	+	+	A20-1	++	+	+
A7-3	+	+	+	A20-2	++	+	+
A7-13	-	-	-	A20-3	++	+	+
A7-17	++	+	+	A20-5	++	+	+
A7-22	++	+	+	A20-6	+	+	-
A8-4	+	-	-	A20-13	-	+	-
A10-3	+	+	-	A30-7	+	-	-
A10-13	+	+	+	A30-14	++	+	+
A11-10	++	+	+	A30-32	++	+	+
A11-29	++	+	+				

¹- Poco o nulo crecimiento, + Buen crecimiento, ++ Excelente crecimiento.

En la tabla 3 se muestran los resultados de los parámetros analizados para considerar a las cepas de actinobacterias como fijadoras de nitrógeno: crecimiento en medio libre de nitrógeno, presencia de micelio aéreo y presencia de estructuras diazotróficas.

Con base en los resultados de las pruebas de fijación de nitrógeno (Tabla 4), se puede establecer que el 9.75 % de los aislados son consideradas como no fijadoras de nitrógeno, mientras que el 41.46 % de los aislados se podrían considerar como fijadores moderados de nitrógeno, aunado a la presencia de

micelio aéreo (presentes en el 82.92 % de los aislados) o estructuras diazotróficas (presentes en el 70 % de las cepas).

De acuerdo a los resultados obtenidos por Franco-Correa *et al.* [8], se sugiere que los aislados con mejor crecimiento (++) 48.78 % en el medio libre de nitrógeno podrían ser consideradas como fijadores de nitrógeno, si aunamos esto a que se confirmó al microscopio la presencia de estructuras diazotróficas de algunas de ellas (Tabla 5). Estas estructuras ya han sido reportadas por Valdés *et al.* [13], donde destacan que estas vesículas y estructuras no son exclusivas del género *Frankia*, si no que otras cepas de actinobacterias aisladas de rizósfera con capacidad de fijar nitrógeno atmosférico también las expresan [13]. Lo anterior ya había sido estudiado y notificado también por Mattsson & Sellstedt [12]. El crecimiento en este medio, más la formación de estructuras diazotróficas y la presencia de micelio aéreo (Tabla 5) está asociado con la actividad de la enzima nitrogenasa en actinobacterias [13,54,64] y únicamente el 46.34 % de los aislados obtuvieron éstas 3 características juntas; la enzima nitrogenasa se puede cuantificar por algunas técnicas como el uso del isótopo ^{15}N [9]; sin embargo, es costoso y la cuantificación no se considera importante para fines de este proyecto, cuyo propósito en el uso de estos métodos es sólo realizar una selección de las mejores cepas con características de promoción del crecimiento vegetal [54].

4.2.4. Producción de sideróforos

Para analizar los resultados obtenidos en el ensayo de producción de sideróforos por el grupo de actinobacterias, se hizo un análisis de ANOVA y comparaciones de medias de Tukey-Kramer y Dunnett con una $p < 0.05$ representados en la Figura 11 y Tabla 5 con respecto al control. El control utilizado fue una cepa *P. aeruginosa* productora de sideróforos. Los niveles no unidos por la misma letra son significativamente distintos.

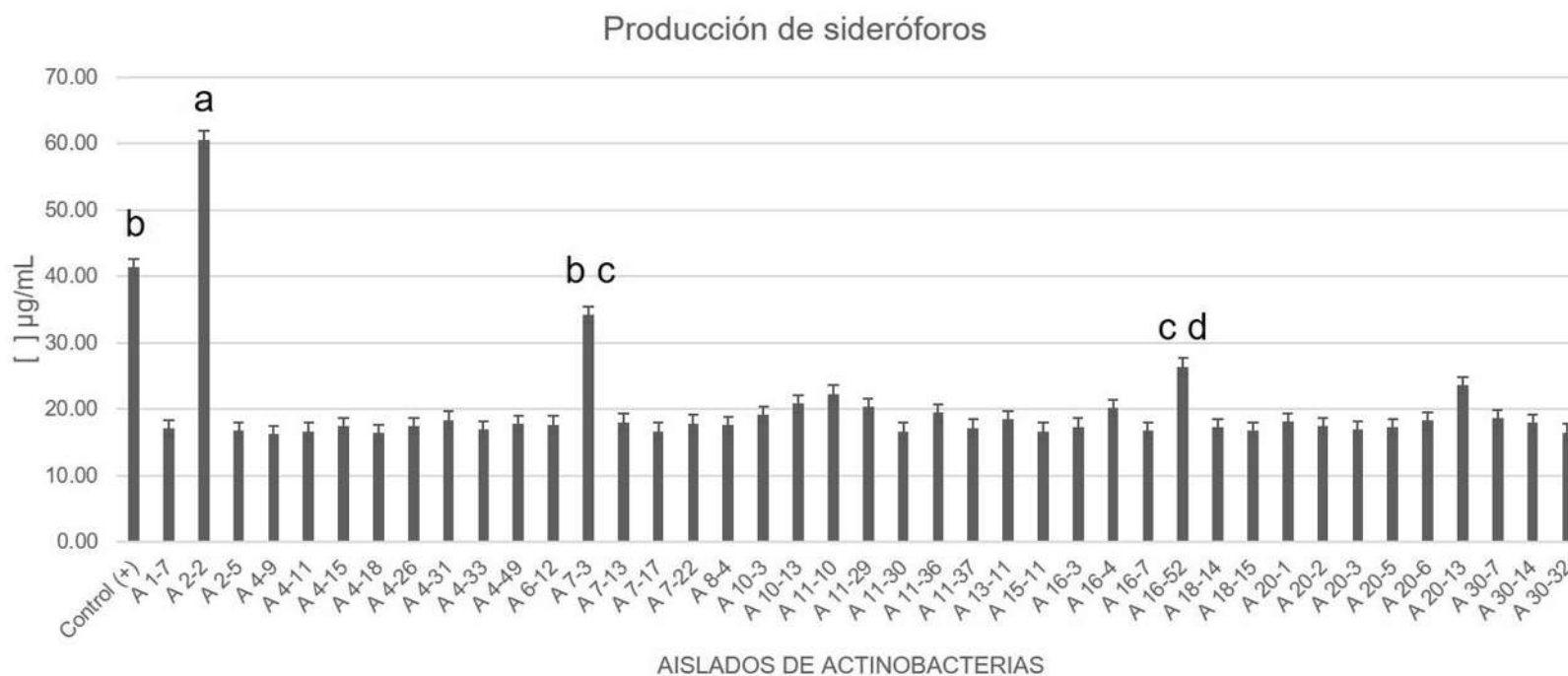


Fig. 11 Producción de sideróforos en µg/mL de las cepas de actinobacterias (ARI).

Se presentan los resultados de las 41 cepas de actinobacterias, ordenadas de mayor a menor según su producción de sideróforos en $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados de la producción de sideróforos de las cepas de actinobacterias (ARI).

AISLADO	Sideróforos $\mu\text{g/mL}$ SD	AISLADO	Sideróforos $\mu\text{g/mL}$ SD
Control (+)	41.39 $\pm$ 2.82b	A8-4	17.65 $\pm$ 0.52
A2-2*	60.00 $\pm$ 10.62a	A4-26	17.50 $\pm$ 0.24
A7-3	34.25 $\pm$ 16.67bc	A20-2	17.49 $\pm$ 2.11
A16-52	26.42 $\pm$ 4.26cd	A4-15	17.43 $\pm$ 0.35
A20-13	23.63 $\pm$ 9.52de	A16-3	17.34 $\pm$ 0.18
A11-10	22.32 $\pm$ 6.49de	A20-5	17.29 $\pm$ 0.70
A10-13	20.82 $\pm$ 6.72de	A18-14	17.27 $\pm$ 0.66
A11-29	20.41 $\pm$ 1.14de	A11-37	17.19 $\pm$ 0.34
A16-4	20.20 $\pm$ 1.13	A1-7	17.12 $\pm$ 0.61
A11-36	19.44 $\pm$ 1.77	A4-33	16.96 $\pm$ 0.34
A10-3	19.17 $\pm$ 0.85	A20-3	16.89 $\pm$ 0.70
A13-11	18.47 $\pm$ 1.38	A16-7	16.74 $\pm$ 0.78
A30-7	18.68 $\pm$ 1.85	A18-15	16.74 $\pm$ 0.97
A4-31	18.40 $\pm$ 0.64	A2-5	16.74 $\pm$ 0.34
A20-6	18.26 $\pm$ 0.87	A11-30	16.66 $\pm$ 0.37
A20-1	18.18 $\pm$ 0.27	A15-11	16.66 $\pm$ 0.37
A7-13	18.05 $\pm$ 0.96	A4-11	16.66 $\pm$ 0.23
A30-14	17.98 $\pm$ 1.27	A7-17	16.66 $\pm$ 0.23
A7-22	17.90 $\pm$ 0.52	A30-32	16.51 $\pm$ 0.23
A4-49	17.80 $\pm$ 0.60	A4-18	16.43 $\pm$ 0.34
A6-12	17.70 $\pm$ 0.34	A4-9	16.21 $\pm$ 0.84

SD: error estándar *Mayor productor de sideróforos

Control (+): *Pseudomonas aeruginosa*.

De acuerdo a Franco-Correa *et al.* [8], la mayoría de las actinobacterias, salvo algunas excepciones como *Streptomyces cuspidosporus*, son productoras de sideróforos en mayor o menor concentración y el dato de producción obtenido dependerá del uso que se le destine a la cepa [8]. Sin embargo, Cisneros Moscol [65], encontró valores de entre 1 y 2 $\mu\text{g/mL}$ en la mayoría de 49 aislados rizosféricos de cultivo de *Solanum tuberosum* sp (papa), empleando el mismo método cuantitativo, considerando que es una producción significativa que puede

ayudar al mejoramiento del cultivo de papa. Si se consideran los valores anteriores, se puede establecer que, hasta el momento, las cepas estudiadas en este proyecto son excelentes productoras de sideróforo [65].

Todas las cepas fueron evaluadas para la producción de sideróforos, todas fueron positivas, (++) significa mayor producción sobre el control (A2-2) y (+) similar al control (Tabla 7), no en todas ellas se detectó la presencia de pigmentos coloridos difusibles, aunque algunos de ellos mostraron colores naranjas, marrón y coral.

Como parte del ensayo de sideróforos, se optó por evaluar el antagonismo con hongos fitopatógenos, encontrándose que el 27% presentó inhibición frente a *Verticillium sp.*, 12.2% presentó inhibición frente a *Neopestalotiopsis sp.*, mientras que solo el 7.3% presentó un resultado positivo en la prueba frente *Phytophthora sp.* En la Tabla 6, se muestran los resultados de la prueba de antagonismo. Las cepas no mostradas en la tabla, no presentaron actividad antifúngica contra estos hongos en particular, pero no se descarta que lo hagan contra otros debido a su alta producción de sideróforos.

Las cepas ARI_A2-2, ARI_A7-3 y ARI_A30-32 presentaron excelente eficiencia antagónica frente a los fitopatógenos contra los que se retaron, incluso, mayor que el control (+). El aislado ARI_A2-2 mantuvo resultados antagónicos >50% de inhibición frente a los tres hongos fitopatógenos retados, ARI_A7-3 inhibió más del 50% a *Neopestalotiopsis sp.* (Fig. 12C) y *Phytophthora sp.*, con *Verticillium sp.* fue menos efectivo con una inhibición <50%, mientras que el aislado ARI_A30-32 presentó una eficiencia de inhibición >50% frente a *Neopestalotiopsis sp.*, y resultados <50% de inhibición frente a *Verticillium sp.* y *Phytophthora sp.* Aunque ARI_A20-3 no presentó actividad contra los hongos *Neopestalotiopsis sp.* (Fig 12B) y *Phytophthora sp.* si lo hizo en un 50% contra el fitopatógeno *Verticillium sp.*, estos resultados son valiosos debido que, al identificar el patógeno específico en un cultivo, se podría adicionar una solución de actinobacteria específica en contra del patógeno en cuestión.

Tabla 6 Sideróforos contra hongos fitopatógenos.

	<i>Verticillium sp.</i>	<i>Neopestalotiopsis sp.</i>	<i>Phytophthora sp.</i>
Control (-)	64 mm	68 mm	85 mm
Control (+)	+++	+++	+
Actinobacteria	<i>Verticillium sp.</i>	<i>Neopestalotiopsis sp.</i>	<i>Phytophthora sp.</i>
A2-2	+++	+++	+++
A7-3	++	+++	++
A10-13	++	-	-
A16-4	+	-	-
A18-15	++	+	-
A20-1	+	++	-
A20-3	++	-	-
A20-5	+	-	-
A20-13	+	-	-
A30-14	++	-	-
A30-32	++	+++	++

(+++) Inhibición >50%, >15 mm; (++) Inhibición entre 50 y 25%, 10 a 15 mm; (+) Inhibición <25% pero diferente de 0%, 0-5 mm; (-) Sin inhibición.



Fig. 12 Efecto antagónico de los sideróforos como biocontrol. **A.** *Neopestalotiopsis sp.* **B.** *Neopestalotiopsis sp* (superior), ARI_A20-3 (inferior). **C.** *Neopestalotiopsis sp* (superior), ARI_A7-3 (inferior).

Las cepas de actinobacterias ARI_A2-2 y ARI_A7-3 mantienen una correlación directa de porcentaje de inhibición con la producción de sideróforos, aunque el aislado ARI_A30-32 no fue de los mejores productores de sideróforos, tuvo una eficiencia antagónica satisfactoria frente a los tres fitopatógenos. Este tipo de diferencias en la actividad antagónica se debe principalmente a la cantidad

segregada al medio y a la naturaleza química de los sideróforos producidos por las actinobacterias, al ser uno de los mecanismos la actividad antimicrobiana y la competencia de nutrientes, privando de hierro al patógeno que intente colonizar el entorno [38]. Al Shaer *et al.* [38] a su vez, indica que los sideróforos de tipo hidroxamato producidos por actinobacterias, tienen la capacidad de anclar fragmentos de antibióticos a la molécula del sideróforo, como estrategia en la competencia por colonizar el entorno en el que se encuentran [38].

Cabe recordar que las cepas de actinobacterias utilizadas en este estudio pertenecen al género *Streptomyces*. Misk y Franco [66] reportaron buena eficiencia antagónica del género *Streptomyces*, frente a distintas cepas del fitopatógeno *Phytophthora* aislado de la raíz de la planta del garbanzo [67]. Por su parte Shimizu [68] y Meguro *et al.* [69] realizaron experimentos con plántulas enfermas infectadas con *Phytophthora cinnamomi* y *Rhizoctonia sp.* cultivadas de tejido de rododendro y laurel de montaña preinoculadas con cepas de *Streptomyces* en matraces, encontrando que estas plántulas se volvían resistentes al marchitamiento causado por estos fitopatógenos [68,69]. Posteriormente, aislaron las mismas cepas de *Streptomyces* de las plántulas inoculadas para asegurar que la resistencia estuviera asociada con la colonización endofítica de las cepas inoculadas. Esta técnica de biocontrol se ha aplicado en la producción comercial de plántulas en Japón [69,70]. Considerando los antecedentes descritos, los aislados ARI_A2-2, ARI_A7-3 y ARI_A30-32 tienen gran potencial antagónico como alternativa sustentable en el biocontrol de fitopatógenos que atacan cultivos de gran importancia económica como lo son el de aguacate y fresa del país.

Los resultados que prueban la promoción del crecimiento vegetal se resumen en la Tabla 7 consideradas para la selección de las 3 cepas de actinobacterias ARI. En la primera columna, se resume también, los ensayos de formación de biopelículas presentada en el capítulo II y exceptuando el parámetro de biocontrol,

debido a que se utilizó como un ensayo piloto del cual se pretende profundizar en un estudio posterior.

La formación de biopelículas fue el principal parámetro a considerar, seguido de las características de promoción del crecimiento de las plantas. Trece aislamientos mostraron una alta capacidad para la formación de biopelículas utilizando el método del cristal violeta (CV) (letra a). Se analizaron las características positivas de PGP para discriminar entre estos aislamientos, descartando las cepas ARI_A2-2, ARI_A4-11 y ARI_A20-13 y seleccionando aquellos con características sobresalientes. Posteriormente, se analizó la formación de biopelículas en diez de los aislamientos restantes en el vehículo mineral perlita (Capítulo IV), lo que resultó en la selección de las cepas ARI_A20-3 (*S. griseorubens*), ARI_A20-5 (*S. flaveolus*) y ARI_A30-32 (*S. aureus*) para el ensayo de maceta, que mostró una excelente formación de biopelículas (Capítulos II y IV). Estos tres aislamientos presentaron todas las características de PGP probadas, excepto el aislamiento ARI_A20-3, que se informó como un productor bajo de IAA. Esta cepa fue seleccionada para determinar las diferencias en el crecimiento en comparación con los otros aislados elegidos, ya que esta característica es importante para estimular la elongación de la raíz [71]. Panneerselvam *et al.* [72] informaron una mejora en la absorción de nutrientes de las plantas, las propiedades microbianas del suelo y las actividades enzimáticas en la rizósfera de la granada contra un patógeno utilizando consorcios de *Streptomyces* planctónicos [72]. Boubekri *et al.* [73] destacaron el uso de planctónicos *Streptomyces griseorubens* y *Nocardiopsis* como PGP en trigo, describiendo una mayor actividad en el crecimiento de raíces y productores de IAA y sideróforos [73]. Las actinobacterias previamente reportadas fueron similares a las utilizadas en este estudio; sin embargo, nuestras cepas fueron aisladas de la rizósfera de aguacate. En este estudio, se evaluaron las ventajas de la formación de biopelículas sobre un soporte.

Tabla 7 Ensayos de promoción del crecimiento vegetal de las cepas de actinobacterias (ARI).

Cepa	Formación de biopelícula ¹	Crecimiento en medio NFB ²	Micelio aéreo	Estructuras diazotróficas	Producción de sideróforos	Producción de AIA	Actividad solubilizadora de fosfatos	Cepa	Formación de biopelícula ¹	Crecimiento en medio NFB ²	Micelio aéreo	Estructuras diazotróficas	Producción de sideróforos	Producción de AIA	Actividad solubilizadora de fosfatos
A1-7	+a	+	+	+	+	++	+	A11-30	+b	+	-	-	+	-	+
A2-2	+a	+	-	-	++	+	+	A11-36	-	++	+	+	+	+	+
A2-5	-	+	+	+	+	-	++	A11-37	-	++	+	+	+	-	++
A4-9	-	++	+	+	+	+	-	A13-11	-	++	+	+	+	-	++
A4-11	+a	+	+	-	+	+	-	A15-11	-	-	-	-	+	+	+
A4-15	-	-	-	-	+	-	-	A16-3	-	++	+	+	+	++	++
A4-18	-	+	+	+	+	++	+	A16-4	-	++	+	+	+	+	+
A4-26	-	++	+	+	+	+	++	A16-7	-	++	+	+	+	-	++
A4-31	-	+	+	-	+	++	+	A16-52	+a	++	+	+	+	+	++
A4-33	+a	+	+	+	+	-	+	A18-14	+a	++	+	+	+	-	++
A4-49	-	+	+	+	+	-	+	A18-15	-	++	+	+	+	++	++
A6-12	+a	+	+	+	+	+	+	A20-1	+a	++	+	+	+	++	++
A7-3	-	+	+	+	+	++	+	A20-2	+a	++	+	+	+	-	+
A7-13	-	-	-	-	+	++	+	A20-3	+a	++	+	+	+	-	+
A7-17	-	++	+	+	+	+	+	A20-5	+a	++	+	+	+	+	++
A7-22	-	++	+	+	+	++	-	A20-6	-	+	+	-	+	++	+
A8-4	+b	+	-	-	+	+	-	A20-13	+a	-	+	-	+	++	++
A10-3	-	+	+	-	+	+	+	A30-7	-	+	+	-	+	++	+
A10-13	+b	+	+	+	+	-	++	A30-14	-	++	+	+	+	++	++
A11-10	-	++	+	+	+	-	+	A30-32	+a	++	+	+	+	++	++
A11-29	-	++	+	+	+	+	+								

¹Para cada variable experimental, los valores medios seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes a P=0.05, en comparación con el control positivo en el ensayo Cristal violeta a 30 °C en medios EMA.

²++, crecimiento excelente. + buen crecimiento, los aislados de actinobacterias en medios de cultivo sin fuente de nitrógeno NFB pueden ser diazotófos en función de su capacidad para crecer en medios libres de N y se asocia a la presencia de micelios aéreos y presencia de estructuras diazotróficas.

5. Conclusión

Los ensayos expuestos en este capítulo fueron de utilidad para seleccionar las cepas de actinobacterias con los mejores atributos PGP para la elaboración del bioinoculante en biopelícula. Cabe destacar que, si consideramos únicamente los atributos PGP, solamente 11 de los 41 se consideran los más aptos (ARI_A1-7, ARI_A4-26, ARI_ **A6-12**, ARI_A7-17, ARI_A10-13, ARI_A18-14, ARI_A20-1, ARI_A20-2, A20-5, **A30-14** y A30-32), pero si analizamos estos aislados con los resultados del reto planta-microorganismo, al comparar se observa que la cepas ARI_ **A6-12** y ARI_ **A30-14**, aunque tuvieron resultados positivos en los ensayos PGP, presentaron un efecto negativo con la *A. thaliana*, ya sea reprimiendo su crecimiento o mostrando un resultado nulo (Fig. 5 y 6), por lo que se debe descartar el uso de estos aislados. A su vez se debe considerar dentro de estos aislados, el criterio de formación de biopelícula, expuesto en el capítulo II, debido a que, aunque sus características PGP sean sobresalientes, pueden ser o no formadores de biopelícula sobre el soporte elegido en la formulación del bioinoculante.

La cepa ARI_ **A2-2**, que presentó un efecto represor en la prueba planta-microorganismo con *A. thaliana*, fue el aislado con mayor producción de moléculas sideróforos incluso sobre el control, y esta pudo haber sido la causa de dicho efecto, se sugiere que este microorganismo por tal efecto podría usarse en consorcio para aprovechar su capacidad contra los agentes fitopatógenos (Tabla 6).

Para la selección del inoculante en biopelícula se hizo una evaluación destacando alguno de los atributos en particular para ver si sólo o en consorcio causa un efecto diferente. Los aislados seleccionados fueron las cepas ARI_A20-3

(*S. griseorubens*), ARI_A20-5 (*S. flaveolus*) y ARI_A30-32 (*S. aureus*).

Referencias

1. Franco-Correa, M. Utilización de Los Actinomicetos En Procesos de Biofertilización. *Rev. Peru. Biol.* **2009**, *16*, 239–242.
2. Amaresan, N.; Kumar, K.; Naik, J.H.; Bapatla, K.G.; Mishra, R.K. Chapter 8 - Streptomyces in Plant Growth Promotion: Mechanisms and Role. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*; Singh, B.P., Gupta, V.K., Passari, A.K., Eds.; Elsevier, 2018; pp. 125–135 ISBN 978-0-444-63994-3.
3. Sharma, D.; Gahtyari, N.C.; Chhabra, R.; Kumar, D. Role of Microbes in Improving Plant Growth and Soil Health for Sustainable Agriculture. In *Advances in Plant Microbiome and Sustainable Agriculture: Diversity and Biotechnological Applications*; Yadav, A.N., Rastegari, A.A., Yadav, N., Kour, D., Eds.; Microorganisms for Sustainability; Springer: Singapore, 2020; pp. 207–256 ISBN 9789811532085.
4. Yadav, A.N.; Singh, J.; Rastegari, A.A.; Yadav, N. *Plant Microbiomes for Sustainable Agriculture*; Springer Nature, 2020; ISBN 978-3-030-38453-1.
5. Anderson, C.R.; Condon, L.M.; Clough, T.J.; Fiers, M.; Stewart, A.; Hill, R.A.; Sherlock, R.R. Biochar Induced Soil Microbial Community Change: Implications for Biogeochemical Cycling of Carbon, Nitrogen and Phosphorus. *Pedobiol. - J. Soil Ecol.* **2011**, *5–6*, 309–320, doi:10.1016/j.pedobi.2011.07.005.
6. Rana, K.L.; Kour, D.; Yadav, A.N.; Yadav, N.; Saxena, A.K. Chapter 16 - Agriculturally Important Microbial Biofilms: Biodiversity, Ecological Significances, and Biotechnological Applications. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Biofilms*; Yadav, M.K., Singh, B.P., Eds.; Elsevier, 2020; pp. 221–265 ISBN 978-0-444-64279-0.
7. Gupta, G.; Snehi, Dr.S.K.; Singh, V. Role of PGPR in Biofilm Formations and Its Importance in Plant Health. In; 2017; pp. 27–42 ISBN 978-1-119-24634-3.
8. Franco-Correa, M.; Quintana, A.; Duque, C.; Suarez, C.; Rodríguez, M.X.; Barea, J.-M. Evaluation of Actinomycete Strains for Key Traits Related with Plant Growth Promotion and Mycorrhiza Helping Activities. *Appl. Soil Ecol.* **2010**, *45*, 209–217, doi:10.1016/j.apsoil.2010.04.007.
9. Peoples, M.B.; Boddey, R.M.; Herridge, D.F. Quantification of Nitrogen Fixation. *Nitrogen Fixat. Millenn.* **2002**, 357–389.
10. Rees, D.C.; Akif Tezcan, F.; Haynes, C.A.; Walton, M.Y.; Andrade, S.; Einsle, O.; Howard, J.B. Structural Basis of Biological Nitrogen Fixation. *Philos. Trans. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.* **2005**, *363*, 971–984, doi:10.1098/rsta.2004.1539.
11. Swarnalakshmi, K.; Senthilkumar, M.; Ramakrishnan, B. Endophytic Actinobacteria: Nitrogen Fixation, Phytohormone Production, and Antibiosis. In *Plant Growth Promoting Actinobacteria: A New Avenue for Enhancing the Productivity and Soil Fertility of Grain Legumes*; Subramaniam, G., Arumugam, S., Rajendran, V., Eds.; Springer: Singapore, 2016; pp. 123–145 ISBN 978-981-10-0707-1.
12. Mattsson, U.; Sellstedt, A. Hydrogenase in Frankia KB5: Expression of and Relation to Nitrogenase. *Can. J. Microbiol.* **2000**, *46*, 1091–1095, doi:10.1139/w00-100.
13. Valdés, M.; Pérez, N.-O.; Estrada-de los Santos, P.; Caballero-Mellado, J.; Peña-Cabriales, J.J.; Normand, P.; Hirsch, A.M. Non- *Frankia* Actinomycetes Isolated from Surface-Sterilized Roots of *Casuarina Equisetifolia* Fix Nitrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 460–466, doi:10.1128/AEM.71.1.460-466.2005.

14. Sathya, A.; Vijayabharathi, R.; Gopalakrishnan, S. Plant Growth-Promoting Actinobacteria: A New Strategy for Enhancing Sustainable Production and Protection of Grain Legumes. *3 Biotech* **2017**, *7*, 102, doi:10.1007/s13205-017-0736-3.
15. Perez, N.; Olivera, H.; Vásquez, L.; Valdes, M. Genetic Characterization of Mexican Frankia Strains Nodulating Casuarina Equisetifolia. *Can. J. Bot.* **2011**, *77*, 1214–1219, doi:10.1139/b99-075.
16. Pawlowski, K. Actinorhizal Symbioses. *Nitrogen Fixat. Millenn. Elsevier Sci. Pergamon Press Amst.* **2002**, 167–189.
17. Gtari, M.; Ghodhbane-Gtari, F.; Nouiou, I.; Beauchemin, N.; Tisa, L.S. Phylogenetic Perspectives of Nitrogen-Fixing Actinobacteria. *Arch. Microbiol.* **2012**, *194*, 3–11, doi:10.1007/s00203-011-0733-6.
18. Zhang, X.; Gao, B.; Creamer, A.E.; Cao, C.; Li, Y. Adsorption of VOCs onto Engineered Carbon Materials: A Review. *J. Hazard. Mater.* **2017**, *338*, 102–123, doi:10.1016/j.jhazmat.2017.05.013.
19. Khamna, S.; Yokota, A.; Lumyong, S. Actinomycetes Isolated from Medicinal Plant Rhizosphere Soils: Diversity and Screening of Antifungal Compounds, Indole-3-Acetic Acid and Siderophore Production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *25*, 649–655, doi:10.1007/s11274-008-9933-x.
20. Kochar, M.; Vaishnavi, A.; Upadhyay, A.; Srivastava, S. Bacterial Biosynthesis of Indole-3-Acetic Acid: Signal Messenger Service. In *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*; John Wiley & Sons, Ltd, 2013; pp. 309–325 ISBN 978-1-118-29767-4.
21. Lin, L.; Xu, X. Indole-3-Acetic Acid Production by Endophytic Streptomyces Sp. En-1 Isolated from Medicinal Plants. *Curr. Microbiol.* **2013**, *67*, 209–217, doi:10.1007/s00284-013-0348-z.
22. Patten, C.L.; Glick, B.R. Role of *Pseudomonas Putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 3795–3801, doi:10.1128/AEM.68.8.3795-3801.2002.
23. Ortíz-Castro, R.; Contreras-Cornejo, H.A.; Macías-Rodríguez, L.; López-Bucio, J. The Role of Microbial Signals in Plant Growth and Development. *Plant Signal. Behav.* **2009**, *4*, 701–712, doi:10.4161/psb.4.8.9047.
24. Castro, R.O. planta-bacteria basada en ciclodipeptidos de origen microbiano con actividad auxínica. **2012**, 16.
25. Duca, D.; Lorv, J.; Patten, C.L.; Rose, D.; Glick, B.R. Indole-3-Acetic Acid in Plant–Microbe Interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2014**, *106*, 85–125, doi:10.1007/s10482-013-0095-y.
26. Yousef, N.M.H. Capability of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) for Producing Indole Acetic Acid (IAA) under Extreme Conditions. *Eur. J. Biol. Res.* **2018**, *8*, 174–182.
27. Zhang, P.; Jin, T.; Kumar Sahu, S.; Xu, J.; Shi, Q.; Liu, H.; Wang, Y. The Distribution of Tryptophan-Dependent Indole-3-Acetic Acid Synthesis Pathways in Bacteria Unraveled by Large-Scale Genomic Analysis. *Molecules* **2019**, *24*, 1411, doi:10.3390/molecules24071411.
28. Nautiyal, C.S. An Efficient Microbiological Growth Medium for Screening Phosphate Solubilizing Microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* **1999**, *170*, 265–270, doi:10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x.
29. Behera, B.C.; Singdevsachan, S.K.; Mishra, R.R.; Dutta, S.K.; Thatoi, H.N. Diversity, Mechanism and Biotechnology of Phosphate Solubilising Microorganism in

- Mangrove—A Review. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2014**, 3, 97–110, doi:10.1016/j.bcab.2013.09.008.
30. Zhu, J.; Li, M.; Whelan, M. Phosphorus Activators Contribute to Legacy Phosphorus Availability in Agricultural Soils: A Review. *Sci. Total Environ.* **2018**, 612, 522–537, doi:10.1016/j.scitotenv.2017.08.095.
 31. Vessey, J.K. Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Biofertilizers. *Plant Soil* **2003**, 255, 571–586, doi:10.1023/A:1026037216893.
 32. Franco-Correa, M.; Chavarro-Anzola, V. Actinobacteria as Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. In *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*; Dhanasekaran, D., Jiang, Y., Eds.; InTech, 2016 ISBN 978-953-51-2248-7.
 33. Greiner, R.; Haller, E.; Konietzny, U.; Jany, K.-D. Purification and Characterization of a Phytase From *Klebsiella Terrigena*. *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, 341, 201–206, doi:10.1006/abbi.1997.9942.
 34. Richardson, A.E.; Hadobas, P.A. Soil Isolates of *Pseudomonas* Spp. That Utilize Inositol Phosphates. *Can. J. Microbiol.* **1997**, 43, 509–516, doi:10.1139/m97-073.
 35. Fuentes-Ramirez, L.E.; Caballero-Mellado, J. Bacterial Biofertilizers. In *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*; Siddiqui, Z.A., Ed.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2006; pp. 143–172 ISBN 978-1-4020-4152-5.
 36. Adak, A.; Prasanna, R.; Babu, S.; Bidiarani, N.; Verma, S.; Pal, M.; Shivay, Y.S.; Nain, L. Micronutrient Enrichment Mediated by Plant-Microbe Interactions and Rice Cultivation Practices. *J. Plant Nutr.* **2016**, 39, 1216–1232, doi:10.1080/01904167.2016.1148723.
 37. Maglangit, F.; Tong, M.H.; Jaspars, M.; Kyeremeh, K.; Deng, H. Legonoxamines A-B, Two New Hydroxamate Siderophores from the Soil Bacterium, *Streptomyces* Sp. MA37. *Tetrahedron Lett.* **2019**, 60, 75–79, doi:10.1016/j.tetlet.2018.11.063.
 38. Al Shaer, D.; Al Musaimi, O.; de la Torre, B.G.; Albericio, F. Hydroxamate Siderophores: Natural Occurrence, Chemical Synthesis, Iron Binding Affinity and Use as Trojan Horses against Pathogens. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, 208, 112791, doi:10.1016/j.ejmech.2020.112791.
 39. Bhatti, A.A.; Haq, S.; Bhat, R.A. Actinomycetes Benefaction Role in Soil and Plant Health. *Microb. Pathog.* **2017**, 111, 458–467, doi:10.1016/j.micpath.2017.09.036.
 40. Wang, W.; Qiu, Z.; Tan, H.; Cao, L. Siderophore Production by Actinobacteria. *BioMetals* **2014**, 27, 623–631, doi:10.1007/s10534-014-9739-2.
 41. Fiedler, H.-P.; Krastel, P.; Müller, J.; Gebhardt, K.; Zeeck, A. Enterobactin: The Characteristic Catecholate Siderophore of Enterobacteriaceae Is Produced by *Streptomyces* Species. *FEMS Microbiol. Lett.* **2001**, 196, 147–151, doi:10.1111/j.1574-6968.2001.tb10556.x.
 42. Imbert, M.; Béchet, M.; Blondeau, R. Comparison of the Main Siderophores Produced by Some Species of *Streptomyces*. *Curr. Microbiol.* **1995**, 31, 129–133, doi:10.1007/BF00294289.
 43. Nakouti, I.; Sihanonth, P.; Hobbs, G. A New Approach to Isolating Siderophore-Producing Actinobacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* **2012**, 55, 68–72, doi:10.1111/j.1472-765X.2012.03259.x.
 44. Crowley, D.E.; Wang, Y.C.; Reid, C.P.P.; Szaniszlo, P.J. Mechanisms of Iron Acquisition from Siderophores by Microorganisms and Plants. In *Iron Nutrition and Interactions in Plants: "Proceedings of the Fifth International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants", 11–17 June 1989, Jerusalem, Israel, 1989*; Chen, Y., Hadar, Y., Eds.; Developments in Plant and Soil Sciences; Springer Netherlands: Dordrecht, 1991; pp. 213–232 ISBN 978-94-011-3294-7.

45. Zakeel, M.C.M.; Safeena, M.I.S. Biofilmed Biofertilizer for Sustainable Agriculture. In *Plant Health Under Biotic Stress: Volume 2: Microbial Interactions*; Ansari, R.A., Mahmood, I., Eds.; Springer: Singapore, 2019; pp. 65–82 ISBN 9789811360404.
46. Murashige, T.; Skoog, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* **1962**, *15*, 473–497, doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
47. Fiske, C.H.; Subbarow, Y. THE COLORIMETRIC DETERMINATION OF PHOSPHORUS. *J. Biol. Chem.* **1925**, *66*, 375–400, doi:10.1016/S0021-9258(18)84756-1.
48. Olsen, S.R. Sommers 1982 Phosphorus. *Methods Soil Anal. Part* **1982**, *2*, 403–430.
49. Bowman, R.A. A Rapid Method to Determine Total Phosphorus in Soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1988**, *52*, 1301–1304, doi:10.2136/sssaj1988.03615995005200050016x.
50. Adesanwo, O.O.; Ige, D.V.; Thibault, L.; Flaten, D.; Akinremi, W. Comparison of Colorimetric and ICP Methods of Phosphorus Determination in Soil Extracts. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **2013**, *44*, 3061–3075, doi:10.1080/00103624.2013.832771.
51. Sahu, M.K.; Sivakumar, K.; Thangaradjou, T.; Kannan, L. Phosphate Solubilizing Actinomycetes in the Estuarine Environment: An Inventory. **2007**, *4*.
52. Glickmann, E.; Dessaux, Y. A Critical Examination of the Specificity of the Salkowski Reagent for Indolic Compounds Produced by Phytopathogenic Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 793–796.
53. Tabatabaei, S.; Ehsanzadeh, P.; Etesami, H.; Alikhani, H.A.; Glick, B.R. Indole-3-Acetic Acid (IAA) Producing Pseudomonas Isolates Inhibit Seed Germination and α -Amylase Activity in Durum Wheat (*Triticum Turgidum* L.). *Span. J. Agric. Res.* **2016**, *14*, 15.
54. Balagurunathan, R.; Radhakrishnan, M.; Shanmugasundaram, T.; Gopikrishnan, V.; Jerrine, J. Characterization and Identification of Actinobacteria. In *Protocols in Actinobacterial Research*; Balagurunathan, R., Radhakrishnan, M., Shanmugasundaram, T., Gopikrishnan, V., Jerrine, J., Eds.; Springer Protocols Handbooks; Springer US: New York, NY, 2020; pp. 39–64 ISBN 978-1-07-160728-2.
55. Simon, E.H.; Tessman, I. THYMIDINE-REQUIRING MUTANTS OF PHAGE T4*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1963**, *50*, 526–532.
56. Costa, J.M.; Loper, J.E. Characterization of Siderophore Production by the Biological Control Agent Enterobacter Cloacae. *MPMI-Mol. Plant Microbe Interact.* **1994**, *7*, 440–448.
57. Baakza, A.; Vala, A.K.; Dave, B.P.; Dube, H.C. A Comparative Study of Siderophore Production by Fungi from Marine and Terrestrial Habitats. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **2004**, *311*, 1–9.
58. Berg, G.; Roskot, N.; Steidle, A.; Eberl, L.; Zock, A.; Smalla, K. Plant-Dependent Genotypic and Phenotypic Diversity of Antagonistic Rhizobacteria Isolated from Different Verticillium Host Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 3328–3338.
59. Hamdali, H.; Hafidi, M.; Virolle, M.J.; Ouhdouch, Y. Rock Phosphate-Solubilizing Actinomycetes: Screening for Plant Growth-Promoting Activities. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *24*, 2565–2575, doi:10.1007/s11274-008-9817-0.
60. Madhurama, G.; Sonam, D.; Urmil, P.G.; Ravindra, N.K. Diversity and Biopotential of Endophytic Actinomycetes from Three Medicinal Plants in India. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2014**, *8*, 184–191, doi:10.5897/AJMR2012.2452.

61. Gangwar, M.; Dogra, S.; Gupta, U.P.; Kharwar, R.N. Diversity and Biopotential of Endophytic Actinomycetes from Three Medicinal Plants in India. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2014**, *8*, 184–191.
62. De Souza, M.-J.B.D.; Nair, S.; Chandramohan, D. Phosphate Solubilizing Bacteria around Indian Peninsula. *IJMS Vol291 March 2000* **2000**.
63. Abd-Alla, M.H.; El-Sayed, E.A.; Rasmey, A.H.M. Indole-3-Acetic Acid (IAA) Production by Streptomyces Atrovirens Isolated from Rhizospheric Soil in Egypt. *J. Biol. Earth Sci.* **2013**, *3*.
64. Flärdh, K.; Buttner, M.J. Streptomyces Morphogenetics: Dissecting Differentiation in a Filamentous Bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, *7*, 36–49, doi:10.1038/nrmicro1968.
65. Cisneros Moscol, J.E. Aislamiento y selección de actinomicetos rizosféricos con potencial aplicación como bioinoculante en el cultivo de Solanum tuberosum sp. andigena (Papa). **2016**.
66. Misk, A.; Franco, C. Biocontrol of Chickpea Root Rot Using Endophytic Actinobacteria. *BioControl* **2011**, *56*, 811–822, doi:10.1007/s10526-011-9352-z.
67. Misk, A.; Franco, C. Biocontrol of Chickpea Root Rot Using Endophytic Actinobacteria. *BioControl* **2011**, *56*, 811–822, doi:10.1007/s10526-011-9352-z.
68. Shimizu, M. Endophytic Actinomycetes: Biocontrol Agents and Growth Promoters. In *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses*; Maheshwari, D.K., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2011; pp. 201–220 ISBN 978-3-642-20331-2.
69. Meguro, A.; Ohmura, Y.; Hasegawa, S.; Shimizu, M.; Nishimura, T.; Kunoh, H. An Endophytic Actinomycete, *Streptomyces* Sp. MBR-52, That Accelerates Emergence and Elongation of Plant Adventitious Roots. *日本放線菌学会誌* **2006**, *20*, 1–9, doi:10.3209/saj.20.1.
70. Shimizu, M. Endophytic Actinomycetes: Biocontrol Agents and Growth Promoters. In *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses*; Maheshwari, D.K., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2011; pp. 201–220 ISBN 978-3-642-20331-2.
71. Srinivas, V.; Gopalakrishnan, S.; Kamidi, J.P.; Chander, G. Effect Of Plant Growth-Promoting Streptomyces Sp. On Plant Growth And Yield Of Tomato And Chilli. *Andhra Pradesh J Agril Sci* **2020**, 65–70.
72. Panneerselvam, P.; Selvakumar, G.; Ganeshamurthy, A.N.; Mitra, D.; Senapati, A. Enhancing Pomegranate (Punica Granatum L.) Plant Health through the Intervention of a Streptomyces Consortium. *Biocontrol Sci. Technol.* **2021**, *31*, 430–442, doi:10.1080/09583157.2020.1859095.
73. Boubekri, K.; Soumare, A.; Mardad, I.; Lyamlouli, K.; Hafidi, M.; Ouhdouch, Y.; Kouisni, L. The Screening of Potassium- and Phosphate-Solubilizing Actinobacteria and the Assessment of Their Ability to Promote Wheat Growth Parameters. *Microorganisms* **2021**, *9*, 470, doi:10.3390/microorganisms9030470.

ANEXOS

1.

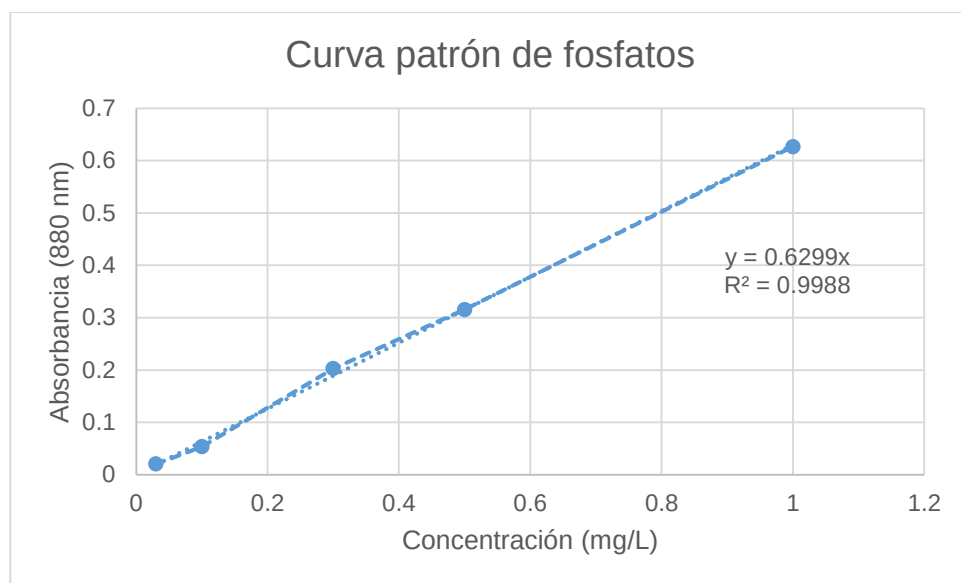


Fig. A1 Curva patrón de fosfatos.

2.

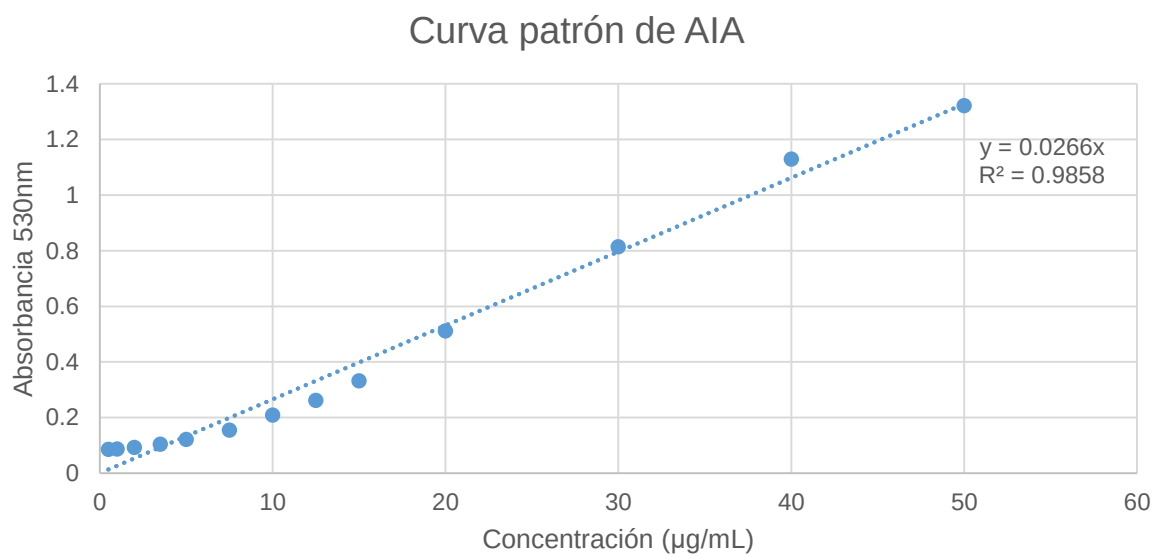


Fig. A2 Curva patrón con reactivo puro de Ácido Indol Acético Sigma Aldrich®

3.

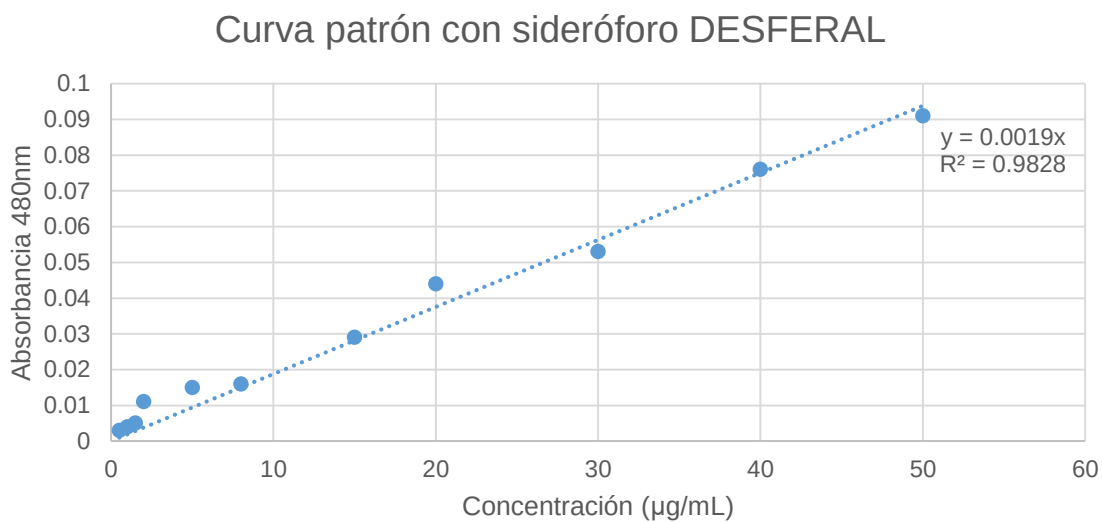


Fig. A3 Curva patrón con el sideróforo comercial DESFERAL® Sigma-Aldrich

Capítulo IV.

Elaboración del bio-inoculante en biopelícula y pruebas de invernadero

1. Resumen

Las actinobacterias, específicamente del género *Streptomyces*, se han utilizado con éxito en diversos procesos biotecnológicos y más recientemente en procesos de mejora e innovación agrícola; sin embargo, se sabe poco sobre la formación de biopelículas de las actinobacterias y su uso como inoculantes en biopelícula. En el presente capítulo se evaluó y comparó la capacidad de tres especies del género *Streptomyces* seleccionadas por su capacidad como promotoras del crecimiento vegetal (PGP) e inducidas en biopelícula sobre un vehículo mineral en siete formulaciones de inoculantes en biopelícula, sobre dos modelos de plantas de interés agrícola, *T. aestivum* y *V. radiata* en condiciones de invernadero. El uso de los inoculantes en biopelículas benefició con una mayor supervivencia de los microorganismos, colonización exitosa en la rizósfera y la colonización endófitas de las raíces, mostrando una interacción positiva con beneficios en la promoción de crecimiento vegetal. Los resultados evidencian un incremento >200% en biomasa total y peso en raíz para *T. aestivum* y un incremento >400% en biomasa total y >1,000% peso en raíz para *V. radiata*. La colonización endófitas se logró en un 100% para el trigo y un 14% en soya. La supervivencia microbiana fue en promedio de entre 10^8 UFC/g⁻¹ y 10^9 UFC/g⁻¹ a las 12 semanas de tratamiento verificando además su permanencia en el vehículo, se encontró la formación exitosa de consorcios en fase de esporas, asegurando así su recolonización por un tiempo prolongado. Lo anterior demuestra que el uso de inoculantes en biopelícula tiene un potencial como biofertilizante en agricultura sustentable.

Palabras clave. Actinobacteria, PGP, colonización endófitas, biopelícula.

Abstract

Actinobacteria have been used successfully in several biotechnological processes and, more recently, in agricultural improvement and innovation processes. However, little is known about actinobacteria biofilm formation and their use as biofilmed biofertilizers. In the present work, the effects of 3 strains of the *Streptomyces* genus selected for their capacity as promoters of plant growth and induced in biofilm on a mineral vehicle in 7 formulations of bioinoculants in biofilm on two models of plants of agricultural interest are shown, and compared, *T. aestivum* and *V. radiata* under greenhouse conditions. Biofilms were used to successfully colonize the rhizosphere and roots of the plant, resulting in a positive interaction with growth promotion and defense benefits for the plant, thus showing its potential use as a biofertilizer in agriculture. The results show a >200% increase in total biomass and root weight for *T. aestivum* and a >400% increase in total biomass and >1,000% root weight for *V. radiata*. Furthermore, endophytic colonization was achieved in 100% wheat and 14% soybean. Microbial survival was, on average, between 10^8 CFU/g⁻¹ and 10^9 CFU/g⁻¹ at 12 weeks of treatment, verifying their permanence in the vehicle, finding the formation of successful consortia as spores, and ensuring their recolonization for a long time. This behavior shows that biofilmed inoculants have the potential as biofertilizers in sustainable agriculture.

Keywords. Actinobacteria, PGP, endophytic colonization, biofilmed.

2. Introducción

El aumento de la población mundial exige una mayor producción de alimentos; sin embargo, los conflictos mundiales, la variabilidad climática extrema, y las desaceleraciones y recesiones económicas (ahora exacerbadas por la pandemia de COVID-19) son los principales impulsores de la inseguridad alimentaria [1]. Una consecuencia de esos impulsores es la baja productividad agrícola destacándose entre sus causas, la reducción de las tierras agrícolas, la salinización, la desertificación de los suelos, la erosión y la reducción de la fertilidad por el uso más intensivo de pesticidas y fertilizantes químicos, que hoy en día son cada vez menos accesibles por sus altos costos y su producción, entre otros [1–3]. Ha resultado en un mayor interés en los microorganismos del suelo que pueden mejorar la nutrición y la salud de las plantas, así como la calidad del suelo, aumentando la producción de cultivos y reduciendo el uso de productos químicos, lo que se denomina "Agricultura sustentable" [4–10].

Las actinobacterias son ubicuas en una población persistente en varios ecosistemas, especialmente en el suelo. Estos organismos existen y crecen más profusamente en diferentes profundidades del suelo que rodea las raíces de las plantas, llamado rizósfera [11,12]. Las actinobacterias son bacterias filamentosas, Gram positivas, formadoras de esporas [13]. La mayoría de ellas poseen verdaderos micelios aéreos y vegetativos, que recuerdan al crecimiento de los hongos. Su crecimiento generalmente se da en cúmulos de micelios llamados pellets. Parecen jugar un papel vital en el ciclo de la materia orgánica y la fertilidad [14]. Las especies del género *Streptomyces* son los microorganismos más valiosos desde el punto de vista económico y biotecnológico, no solo para las industrias farmacéuticas que producen enzimas, antibióticos, vitaminas, hormonas vegetales, aminoácidos y otras sustancias biológicamente activas, sino para la

agricultura actual, mostrando su potencial de varias maneras interactuando con la planta y mantener la rizósfera saludable [11,14].

Su presencia en la rizósfera ha sido discutida en la agricultura como biocontrol y bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGP). Estas bacterias se consideran como promotoras del crecimiento por su influencia por mecanismos directos como la fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato, solubilización de potasio, producción de fitohormonas (principalmente ácido indol acético) y por mecanismos indirectos, algunos enlistados son: antagonismo, competencia, producción de sideróforos, producción de HCN, enzimas que degradan la pared celular, producción de vitaminas, producción de compuestos antimicrobianos, entre otros [15]; además, algunas actinobacterias son capaces de colonizar la raíz de la planta de forma endófito o epífita, ofreciendo protección extra a la planta contra patógenos, desecación y contribuyendo al secuestro de micronutrientes para beneficio de la planta [7,9,16,17].

Pocos ensayos sobre las actinobacterias como biofertilizantes se han mostrado en las últimas dos décadas [18–20]. El uso de Actinobacteria, específicamente de la especie *Streptomyces*, tiene sus ventajas y desventajas como bioinoculante. Ventajas, es un biocontrol naturalmente menos dañino y ecológico, eficiente que protege las raíces de las plantas, afecta solo a patógenos específicos, apoya la colonización de microorganismos benéficos como micorrizas [10,21,22], equilibra el ciclo de nutrientes del suelo y contribuye a reducir la fijación de N, P, la solubilización o mineralización de K, suministra micronutrientes a la planta, juega un papel importante en la degradación de la materia orgánica del suelo, proporciona alimento y apoya el crecimiento de insectos benéficos, proporciona inmunidad al suelo y a la planta, ayudar a las plantas a equilibrar el estrés biótico y abiótico [7,9,17]. Teniendo en cuenta esos atributos, están siendo considerados como inoculantes en la agricultura. Sin embargo también presentan algunas desventajas como, la tasa de proliferación es más lenta que la de otros

inoculantes bacterianos, el almacenamiento y las aplicaciones no tienen éxito en forma planctónica [12].

Ciertos microbios pueden adherirse a superficies bióticas o abióticas y diferenciarse para formar comunidades multicelulares complejas llamadas biopelículas. Una biopelícula consiste en células microbianas (bacterias, hongos o algas, por ejemplo) protegidas por un polímero extracelular producido por las células que proporciona estructura y protección a la comunidad [18,23]. Su uso ha sido investigado para obtener múltiples aplicaciones beneficiosas en la industria y actualmente en campos agrícolas y ambientales [12]. En la agricultura, las biopelículas tienen un papel más importante de lo que se creía, la mayoría de las biopelículas beneficiosas desarrolladas *in vitro* han comenzado a usarse como biofertilizantes, con el fin de colonizar las raíces de las plantas para multiplicar sus beneficios, como la defensa de las plantas, la promoción del crecimiento de las plantas, la disponibilidad de nutrientes, colonización, aumento de materia orgánica, retención de humedad del suelo y adquisición de ventajas genéticas, por lo que se les ha llamado “Biofilmed biofertilizers” [4,11,24–27], y la importancia de su uso se destacó por primera vez hace una década por Seneviratne (2013) [28], aunque se reportaron algunos trabajos previos al respecto [29,30].

La biopelícula, tiene una mayor tolerancia frente a diversas tensiones ambientales, como el cambio de pH, el cromo y la depredación por lombrices de tierra, la radiación UV, el choque osmótico, la desecación y la protección de patógenos, entre otros [6,18,31]. A pesar de la abundancia de actinobacterias, hay muy pocos informes disponibles sobre la formación de biopelículas en el filo [31]. Los pocos estudios hasta ahora han demostrado que el uso como biofertilizantes en biopelícula de monocultivo o en consorcio puede aumentar significativamente la fijación de N₂ en las leguminosas (en aproximadamente un 30 %) y la promoción del crecimiento de las plantas (en aproximadamente un 25 %) aumento del peso seco de la planta en el crecimiento temprano del arroz en comparación con los

bioinoculantes convencionales, por ejemplo, la biopelícula de *P. fluorescens* que aumentó la colonización endofítica del tomate, mostró una actividad de biocontrol de más del 1000 % en comparación con la inoculación con el cultivo planctónico [6,29,32]. Comparado con esos ejemplos, se ha demostrado una fertilización exitosa en cultivos de arroz, trigo, soya, maíz, té, sorgo, caucho y algunos otros cereales y vegetales en condiciones de invernadero, ofreciendo múltiples beneficios, pero destacando los 50 % de reducción en la fertilización química en condiciones de cultivo de campo [4,27,32,32–36]. No todos los microorganismos son capaces de formar biopelículas y hay pocas actinobacterias capaces de conseguirlo, de hecho, se creía que las actinobacterias no eran capaces de formar biopelículas por sí mismas; es decir, sin la ayuda de otro microorganismo o consorcio [13,26].

En la tecnología de inoculantes convencionales (usando células planctónicas), un problema importante aún por abordar es la escasa supervivencia de los microorganismos introducidos en el suelo debido a diversos factores de estrés ambiental, por lo que la necesidad de utilizar portadores ha ido en aumento [6]. Un vehículo, es la parte principal que transporta una cantidad sustancial de PGP al suelo en la agricultura, cuya función, además del transporte, es mantener la viabilidad del microorganismo por un período prolongado de tiempo [8,37]. Comercialmente hay muchas opciones disponibles dependiendo de la forma de aplicación o del microorganismo seleccionado, el más popular utilizado como portador es la turba, pero la adquisición local no está disponible en varios países como México, otros portadores como perlita, vermiculita, bentonita, sepiolita, atapulgita, compost, alginato de calcio, biocarbón o polímeros se han utilizado con diferentes resultados, no siempre positivos [38–41].

Se considera un soporte ideal si cumple con algunas características, como mínimo de humedad disponible en caso de que los microorganismos lo requieran, buena aireación, capacidad de retención de agua, suficiente área

superficial, inerte, fácil de manipular y esterilizar, amigable con el medio ambiente, pH neutro o ajustable, química y estabilidad física, bajo costo, entre otros [8,37,40]. Por otro lado, el biocarbón se ha utilizado con resultados no sobresalientes como vehículo [41] pero encontrando otros atributos positivos como la capacidad de adsorción dependiendo de la naturaleza química con la que fue creado según su materia base, permitiendo la inmovilización de compuestos tóxicos para la planta y microorganismos benéficos, ayudando a revitalizar los suelos al permitir que los microorganismos benéficos interactúen con la planta y contribuyendo con la estabilización del pH, la retención de humedad, la fuente de carbono y algunos grupos funcionales químicos útiles en el suelo y se ha verificado que el biocarbón interfiere en el Quorum Sensing y puede ser beneficioso para la estabilidad del biofilm [41–48].

El presente capítulo muestra el papel que desempeñan las biopelículas de actinobacterias promotoras del crecimiento vegetal en un nuevo inoculante en biopelícula en términos de la eficiencia promotora del crecimiento vegetal de *T. aestivum* y *V. radiata*. Su introducción utilizando perlita como vehículo, mejora y garantiza la viabilidad o supervivencia microbiana por sus características idóneas, y el uso de biocarbón se utiliza como accesorio para ayudar en la interacción planta-microorganismo y como testigo de algunas de las interacciones en la rizósfera.

3. Materiales y Métodos

3.1. Formación de biopelícula sobre perlita mineral como vehículo

Se seleccionó la perlita sin tratamiento térmico previo como vehículo mineral o “carrier” para la elaboración del bioinoculante; un cristal volcánico amorfo e inerte, cuyas características son ideales para este proyecto. El tamaño de partícula fue de 2 mm, utilizando el tamiz 4535 de prueba modelo Test sieve 8”-FR-BR-BR-US-10 Tyler® [49].

Se agregaron 0.5 g de perlita a un tubo de ensayo de borosilicato de 30x150 mm con tapón de rosca Pyrex® con 10 mL de caldo Extracto de Malta (EM) y se esterilizó en autoclave 20 min, 121 °C, 15 lb. Se inocularon dos colonias de actinobacterias seleccionadas y se incubó a 30 °C, 120 rpm, por 7-10 días (tiempo inicial de formación de biopelícula), posteriormente, los tubos se trasladaron a incubadora estática a la misma temperatura durante 8-10 días más, hasta la completa adherencia de la biopelícula al mineral. La formación de biopelículas sobre la perlita (bio-inoculante) se analizó con microscopio de campo claro y tinción de Gram y se corroboró por el Scanning Electronic Microscope (SEM) JEOL JSM-IT300 antes y al término del ensayo en maceta. La perlita fue analizada superficialmente a la par en SEM, agregando un análisis de Electródispersión (EDS-SEM) y mapeo para corroboración de su composición.

Las muestras de bio-inoculante previo al análisis en SEM, fueron fijadas en solución de glutaraldehído al 2.5% en PBS 24 h y lavadas con tampón fosfato (PBS) (pH = 7.2). Las muestras fueron sometidas a un proceso de deshidratación en un gradiente de metanol (30%, 50%, 70% (16 h), 80 %, 90 % y etanol absoluto). Posteriormente, las muestras se secaron con CO₂ líquido grado II, 15 min en un Toussimis Autosamdri®-815, Serie A, se incorporaron a casquillos de aluminio y se recubrieron por pulverización con una capa de oro de 10 nm en un

equipo Denton Desk V®. La exploración se realizó con un voltaje de aceleración de entre 18 a 20 kV.

3.2. Bio-inoculante en biopelícula: pruebas de invernadero

3.2.1. Suelo y biocarbón

El suelo fue recolectado de una UP de aguacate convencional de 50 años erosionada por su uso, ubicada en el municipio de Uruapan, Michoacán, México. Se esterilizó en tres ocasiones en autoclave en periodos de 1.5 h, 121 °C, 15 lb dejando 24 h entre periodo. Se realizó un análisis de suelo previo a su uso por parte del Centro de Innovación y Desarrollo Agropecuario de Michoacán, A.C. (CIDAM), según normas de ensayo nacionales e internacionales.

Para el biocarbón, la materia fue cáscara de aguacate, esta se lavó con detergente líquido al 10 % Hyclin plus neutro 5342 marca Hyclen® en agua destilada para retirar los residuos de moléculas químicas y restos de pulpa. Se retiró el exceso de humedad bajo los rayos del sol y se secó en estufa a 75 °C por 24 h. La materia seca fue molida en digestor para reducir el tamaño de partícula, se llevó a pirólisis lenta en horno tubular a escala de laboratorio a 400 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, un tiempo de mantenimiento de 30 min y un flujo de N₂ de 0.5 L/min.

El biocarbón se sometió a las siguientes caracterizaciones. El análisis elemental del biocarbón, mediante Microscopía Electrónica de Barrido (EDS-SEM JEOL™ JSM IT300LV) en el laboratorio de microscopía electrónica del ENES-UNAM campus Morelia. Los grupos funcionales del biocarbón se estudiaron posterior pirólisis y posterior tratamiento en invernadero en interacción con la rizósfera mediante espectrometría FT-IR Nicolet mod. iS10, ATR (Attenuated Total

Reflectance), de Thermo Scientific® en la UNAM campus Morelia. El pH del biocarbón seleccionado se midió de acuerdo a lo propuesto por Kloster *et al.* [50].

3.2.2. Ensayo del inoculante en biopelícula en maceta

Se probaron tres cepas de actinobacteria seleccionadas por los atributos destacados como PGP analizados en el capítulo III, ARI_A20-3 (*S. griseorubens*), ARI_A20-5 (*S. flaveolus*) y ARI_A30-32 (*S. aureus*), para investigar sus efectos de promoción del crecimiento de las plantas de interés agrícola. Recordando que los atributos a considerar fueron: Capacidad de crecimiento en medios libres de N, presencia de estructuras diazotróficas o presencia de micelio aéreo, producción de sideróforos, producción de AIA, actividad solubilizadora de fosfato y capacidad de formación de biopelículas.

Para probar los efectos de PGRP, se llevó a cabo un experimento en macetas. Esto involucró semillas de trigo (*T. aestivum*) y frijol mungo (*V. radiata*), éstas fueron germinadas en el mismo suelo con el que se prepararon las macetas (Tabla 3 sección de resultados) (maceta de 400 mL) en presencia de siete combinaciones de los bioinoculantes de actinobacterias en biopelícula o tratamientos (T) con cinco repeticiones para cada uno, adicionando 0.2 g de biocarbón de aguacate y tres controles sin bacterias (Tabla 1). Las tres actinobacterias fueron crecidas por separado y mezcladas al momento de la preparación de las macetas. Se agregó el bioinoculante en una concentración de 10^6 células biopelículas/maceta a un centímetro de profundidad en contacto semillas esterilizadas en la superficie según la metodología de Coombs y Franco [51], dos semillas por maceta. Las macetas se colocaron en invernadero. Se regaron según se requirió. El periodo de germinación a cosecha fue de doce semanas. La viabilidad del bioinoculante de Actinobacteria se evaluó en las semanas 0, 6 y 12 utilizando el método reportado por Janssen [52]. Después del

período de crecimiento, las plantas se cosecharon, se secaron a 60 °C durante 24 h y se pesaron. Las mediciones que fueron evaluadas son: altura de la planta, tamaño de la espiga (trigo), número de hojas (soya), biomasa total en peso seco, biomasa de raíz en peso seco.

Los tratamientos a los que se sometieron las plantas del experimento de invernadero, se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Tratamientos del ensayo en maceta con inoculante en biopelícula.

TRATAMIENTOS	FORMULACIÓN
C0	Control, suelo estéril
C1	Control, suelo estéril + biocarbón
C2	Control, suelo estéril + perlita + biocarbón
T1	A20-3 + biocarbón
T2	A20-5 + biocarbón
T3	A30-32 + biocarbón
T4	A20-3, A20-5 combinación + biocarbón
T5	A20-3, A30-32 combinación + biocarbón
T6	A20-5, A30-32 combinación + biocarbón
T7	A20-3, A20-5, A30-32 combinación + biocarbón

Para verificar los efectos o modificaciones que tuvo la biopelícula de actinobacterias al interaccionar con la rizósfera y su permanencia o no en el vehículo (perlita), al término del tratamiento de invernadero, se sustrajeron, fijaron y procesaron las perlititas de cada uno de tratamientos de las dos plantas modelo y se llevaron a un análisis con SEM. Se inocularon algunas perlititas en medio EM para verificar la recuperación del o los microorganismos inoculados en un principio.

Después del período de tratamiento, se analizaron las raíces para determinar la colonización de manera endófitas por las actinobacterias. La bacteria endófitas se buscó en raíces previamente esterilizadas superficialmente según la metodología de Coombs y Franco [51] agregando un lavado de 1 min de NaHCO_3 10% para evitar la contaminación por hongos. Se hizo un enjuague final con agua destilada estéril. Las raíces se colocaron sobre la superficie de agar EM de 4-10 días o hasta la aparición de colonias en la superficie de las raíces. Finalmente, las raíces se fijaron y analizaron mediante SEM. La desinfección superficial de las raíces fue también constatada por SEM.

3.3. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando JPM 11 by SAS™, incluido el análisis de varianza unidireccional (ANOVA) y las comparaciones por pares de Tukey-Kramer y Dunnett.

4. Resultados y discusión

4.1. Formación de biopelícula sobre perlita mineral como vehículo

Para asegurarse que las actinobacterias formaron biopelículas, se inspeccionó visualmente pasado el tiempo de incubación (Fig. 1A), al mover el tubo que contenía las perlitas, éstas ya no se encontraban sueltas, se encontraban adheridas unas con otras por medio de la biopelícula, siendo esta la primera evidencia. Se tomaron de cada tubo algunas perlitas al azar para visualizarlas en el microscopio de campo claro con ayuda de una tinción de Gram (Fig. 1B y 1C), al observar las perlitas se pudo distinguir a las hifas entre el cristal y formando pellets de gran cantidad de células.

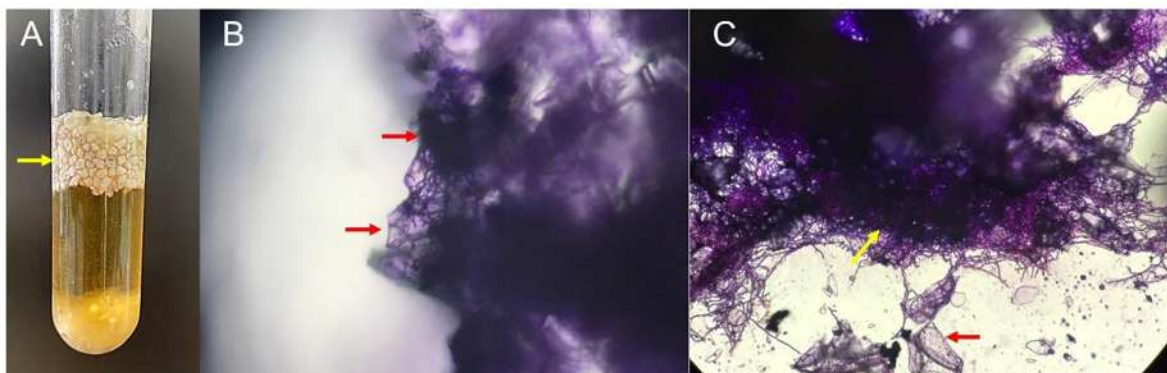


Fig. 1 Inducción de biopelículas sobre la perlita. **A.** Cepa ARI_A20-3, formación de biomasa en el fondo y un paquete celular compacto con la perlita en la superficie (flecha en amarillo). **B.** Tinción de Gram 40X. Se visualizan hifas de ARI_A20-3 a través de los fragmentos del cristal amorfo (flechas en rojo). **C.** Tinción de Gram 40X. Se visualizan hifas de ARI_A20-3 saliendo del cristal (flecha en amarillo) y fragmentos dispersos del cristal amorfo (flecha en rojo).

Para corroborar la formación de la biopelícula por las actinobacterias y previo a la introducción del bioinoculante en las macetas, éste se procesó para su visualización en SEM (Fig. 2). En las micrográficas de la figura 3, se puede observar que la formación de biopelícula fue exitosa en los tres casos, lo que se pudo constatar con la cuenta viable (ver en sección de resultados), también se pudo corroborar que las hifas de actinobacteria penetraron de manera interna y externa entre los poros del mineral perlita en todos los casos en la preparación del bioinoculante, se ejemplifica con la cepa ARI_A20-5 (Fig. 2D).

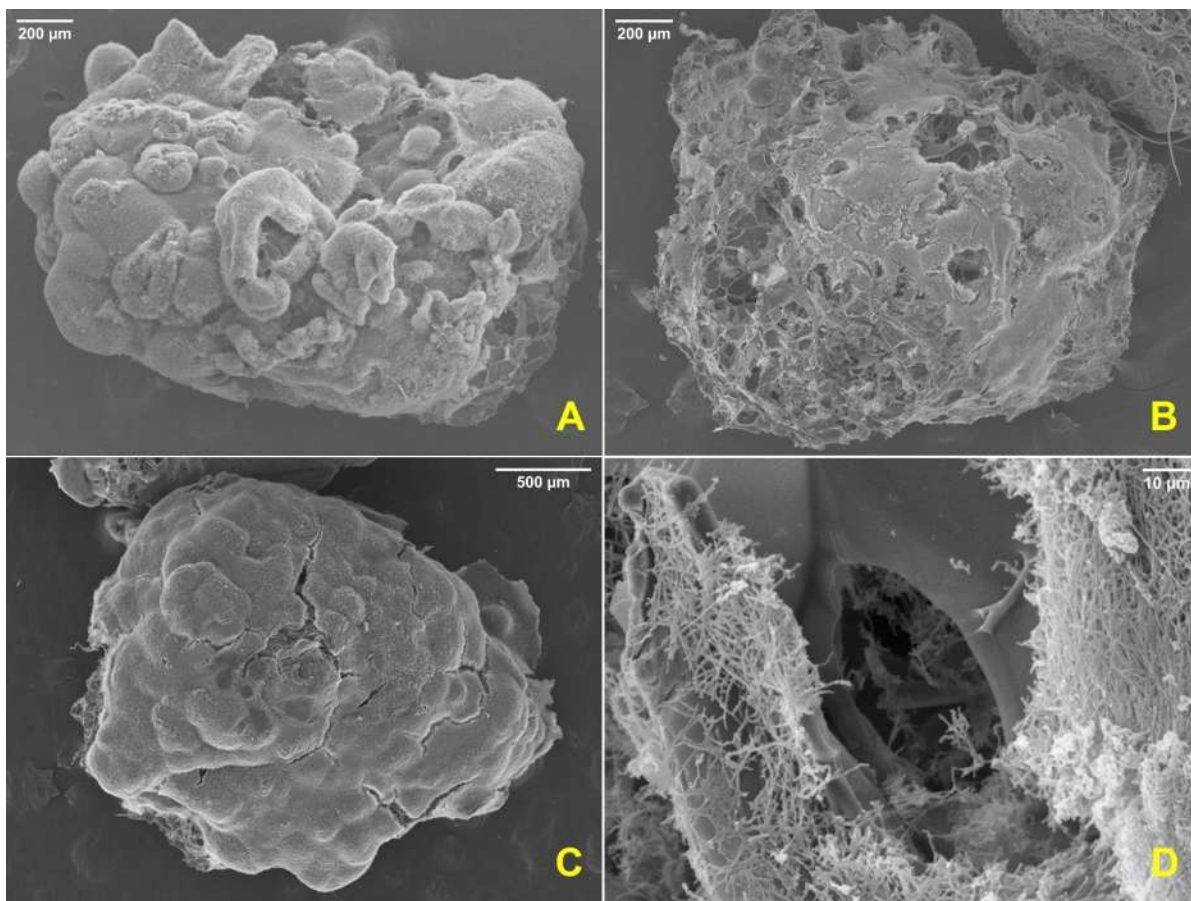


Fig. 2 Formación de biopelícula sobre perlita. **A.** cepa ARI_A20-3. **B.** cepa ARI_A20-5. **C.** cepa A30-32. **D.** cepa A20-5, se observan hifas de actinobacteria externas y al interior del poro de la perlita.

Para verificar la diferencia con la no formación exitosa de una biopelícula se indujo bajo las mismas condiciones y al azar la biopelícula de algunas actinobacterias que estaban reportadas como no formadoras de biopelícula en el capítulo III, que fueron la cepa ARI_A7-3 y ARI_A13-11 y se llevaron a observación por SEM, donde se observó que no hubo una colonización exitosa por parte de las actinobacterias, dejando casi al descubierto todos los poros (Fig. 3A y 3C). Al hacer un acercamiento se encontró una baja población de bacterias, pero sin evidencia de formación de biopelícula (Fig. 3B y 3D). Así se corrobora

que, las pruebas de formación de biopelícula presentadas en el capítulo II, ayudaron a tener una mejor orientación y discriminación para una correcta selección de las que son y no formadoras de biopelícula. Sin embargo, cabe destacar que los materiales de inducción fueron diferentes, ya que en la prueba de CV expuesta en el capítulo II, se llevó a cabo sobre una superficie de polipropileno y en este caso es un mineral. Por lo tanto, no se descarta que algunas cepas puedan tener afinidad por la perlita y hayan sido reportadas como negativas en la prueba de CV. Sin embargo, en este caso la formación de biopelículas sobre perlita fue consistente con las pruebas de formación de biopelícula, principalmente con la prueba de CV.

Para algunas especies de *Streptomyces*, la formación de pellets es más común cuando las bacterias tienen contacto con partículas más pequeñas, dando como resultado la formación de grandes pellets libres sin adherirse a ninguna superficie [31]. Así ocurrió en el presente trabajo con algunos aislamientos ensayados. El desarrollo de la biopelícula de *Streptomyces* parece ser un aspecto normal del ciclo de vida de estas bacterias, aunque hay pocos datos al respecto. Se comprende muy poco acerca de porqué algunas de las especies de este género son formadoras de biopelícula y otras no, pero al parecer está relacionado con los polímeros de superficie extracelular involucrados en la formación de pellets de *Streptomyces* [31].

De acuerdo con los resultados de este trabajo, las condiciones de nutrición y el vehículo o superficie podría ser la causa de la no formación de biopelícula de algunas especies. Sin embargo, el cambio de vehículo por un sustrato rico y modificar las condiciones de nutrición y/o condiciones de crecimiento podría mejorar la formación de biopelículas de esas especies.

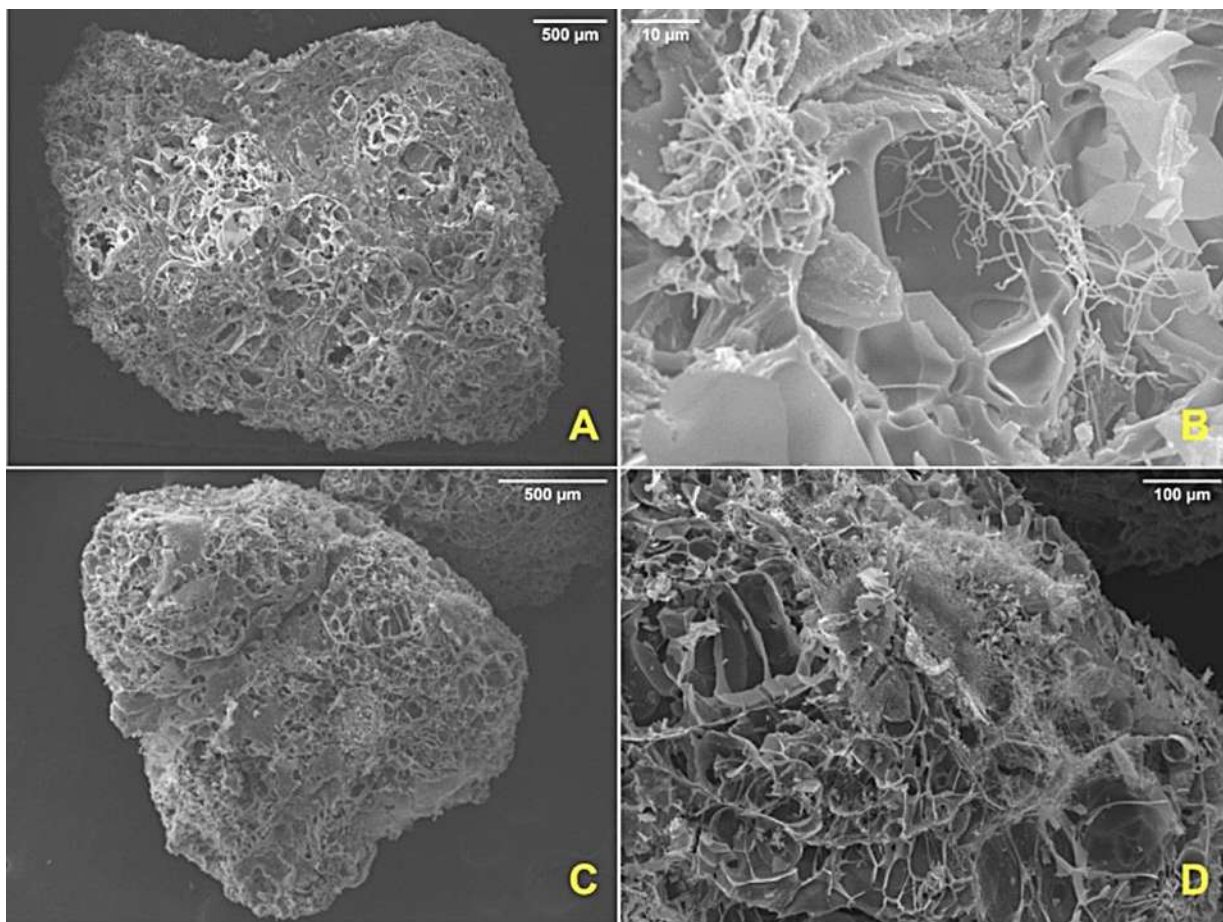


Fig. 3 No formación exitosa de biopelícula sobre perlita. **A.** cepa ARI_A7-3. **B.** cepa ARI_A7-3. **C.** cepa ARI_A13-11. **D.** cepa ARI_A13-11.

Como parte del análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM), se buscó un área libre de biopelícula (Fig. 4, flecha en amarillo) y se hizo un microanálisis elemental de la perlita (EDS-SEM), aunque la perlita ya está completamente caracterizada elementalmente [39,40] se quiso constatar que se trata del mismo material conformado en su mayoría por dióxido de silicio (Fig. 5, Tabla 2).

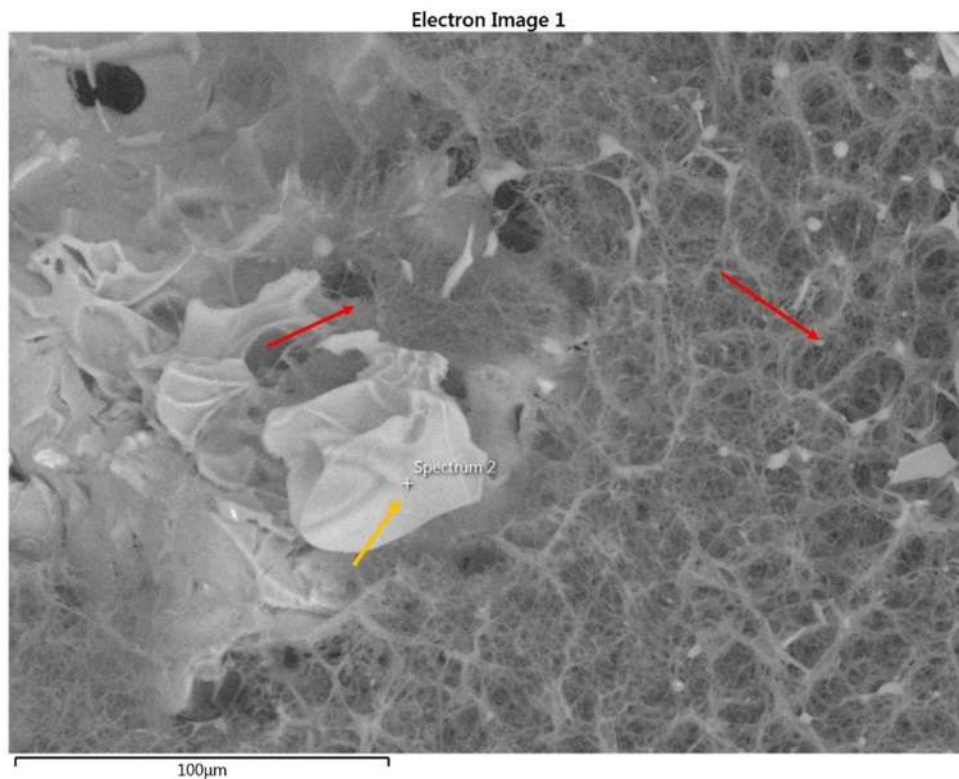


Fig. 4 Micrografía de la perlita EDS-SEM (HighVac. 20.0kV). Área del análisis, flecha amarilla. Biopelícula, flechas rojas.

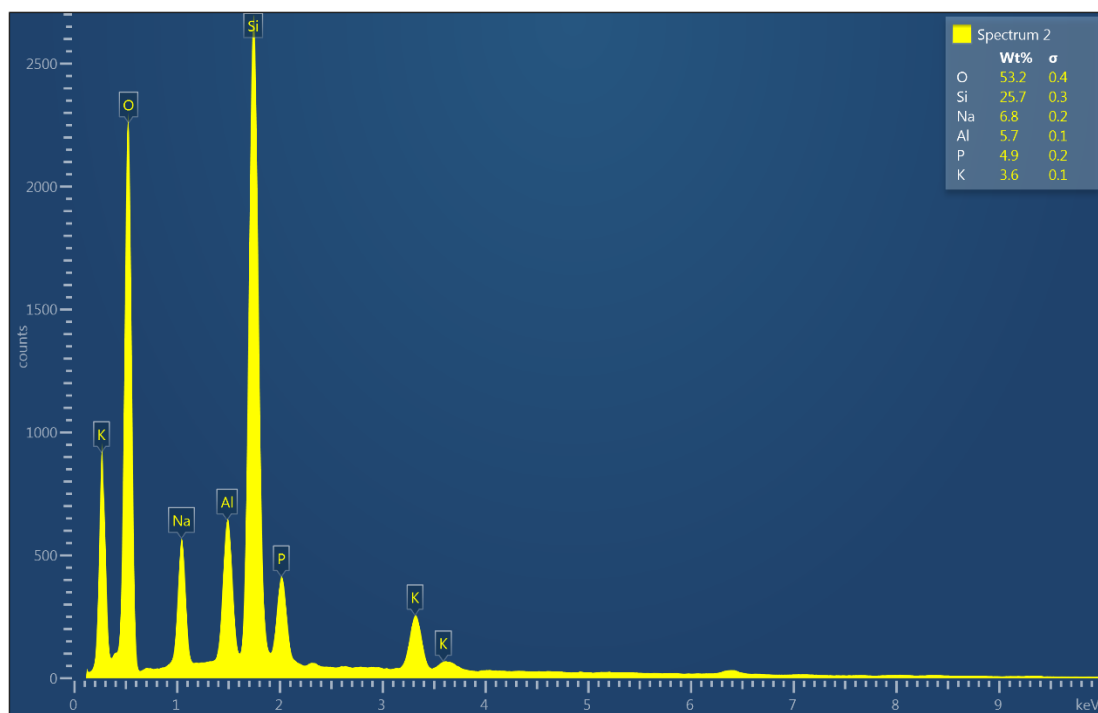


Fig. 5 Espectro de microanálisis elemental de la perlita por SEM-EDS.

Tabla 2

Análisis Elemental de perlita por SEM-EDS.

ELEMENTO	% EN PESO	% ATÓMICO
O	53.21	66.50
Na	6.83	5.94
Al	5.73	4.24
Si	25.72	18.31
P	4.92	3.18
K	3.59	1.84
Total:	100.00	100.00

Finalmente, se buscó otra superficie de perlita poco colonizada para medir el diámetro de algunos poros (Fig. 6A), pensando en la conformación de biopelícula interna y externa. Los poros son áreas que brindan protección a los microorganismos contra condiciones hostiles [8]. Se encontraron medidas de entre 20-105 micras, recordemos que la hifa de una actinobacteria es < de 1

micrómetro. Se hizo un acercamiento en uno de los poros, constatando la presencia de numerosas hifas (Fig. 6B, flechas en amarillo).

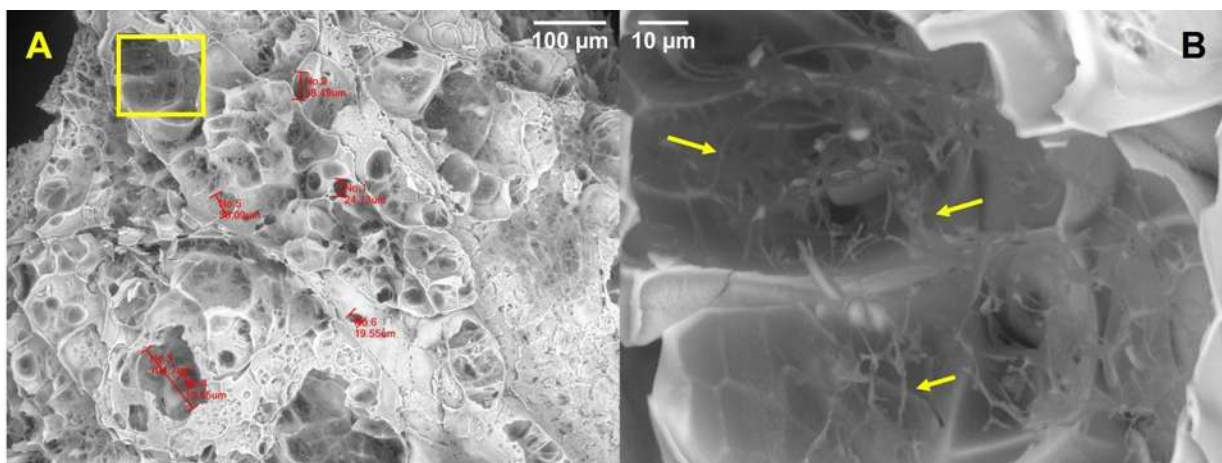


Fig. 6 Superficie porosa de perlita. **A.** Medición de algunos poros presentes en la perlita. **B.** Acercamiento del recuadro amarillo de la Fig. 7A, se muestran hifas en el interior del poro, flechas en amarillo.

4.2. Bio-inoculante en biopelícula: pruebas de invernadero

4.2.1. Suelo y biocarbón

El suelo se analizó antes de su uso por el Centro de Innovación y Desarrollo Agropecuario de Michoacán, A.C. (CIDAM), según estándares de ensayo nacionales e internacionales, se encontraba en el límite de la nutrición en general (Tabla 3).

Tabla 3

Análisis de suelo para el ensayo en maceta.

COMPOSICIÓN	ppm	NIVELES ppm	NIVELES DE SUELO
Fósforo	15.0	15.0-30.0	Bajo
Sodio	110.0	<150	En nivel
Potasio	300	100-250	Alto
Calcio	1,480.00	1500-3500	Bajo
Magnesio	450.00	200-500	En nivel
Hierro	40.00	5.0-30.0	Alto
Zinc	2.0	1.3-5.0	En nivel
Cobre	5.0	0.8-3.0	Alto
Manganeso	4.70	5.0-15.0	Bajo
Nitrógeno	12.5	10.1-20.0	Muy deficiente
pH	6.2	6.0-7.5	Ligeramente ácido

ppm, partes por millón.

Respecto al biocarbón, posterior pirólisis se llevó una muestra a microscopía electrónica de barrido para observación de superficie y porosidad aparente (Fig. 8A y 7B) donde se encontraron poros de diversos tamaños, pero abundando los de tamaño entre 11 y 27 micras (Fig. 7C y 7D).

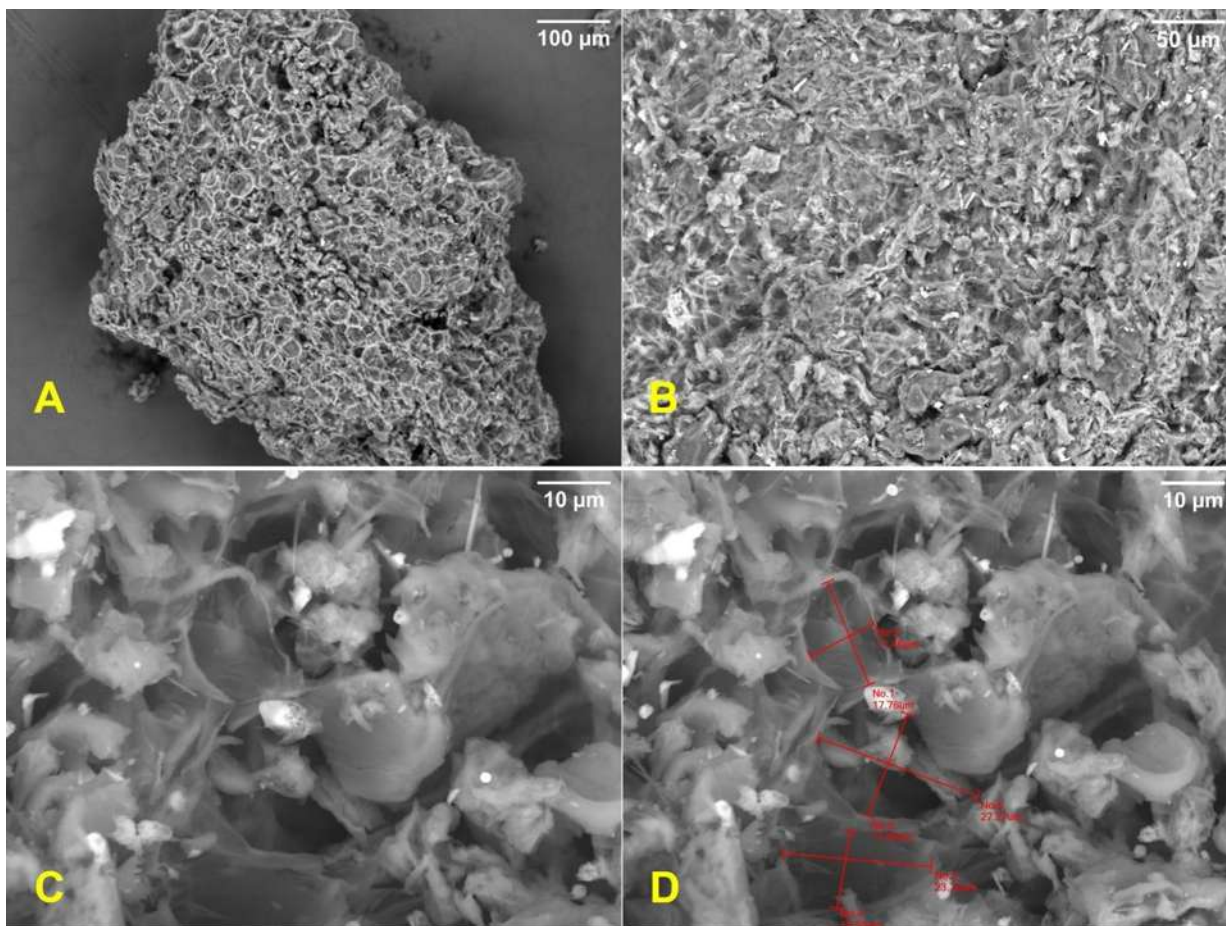


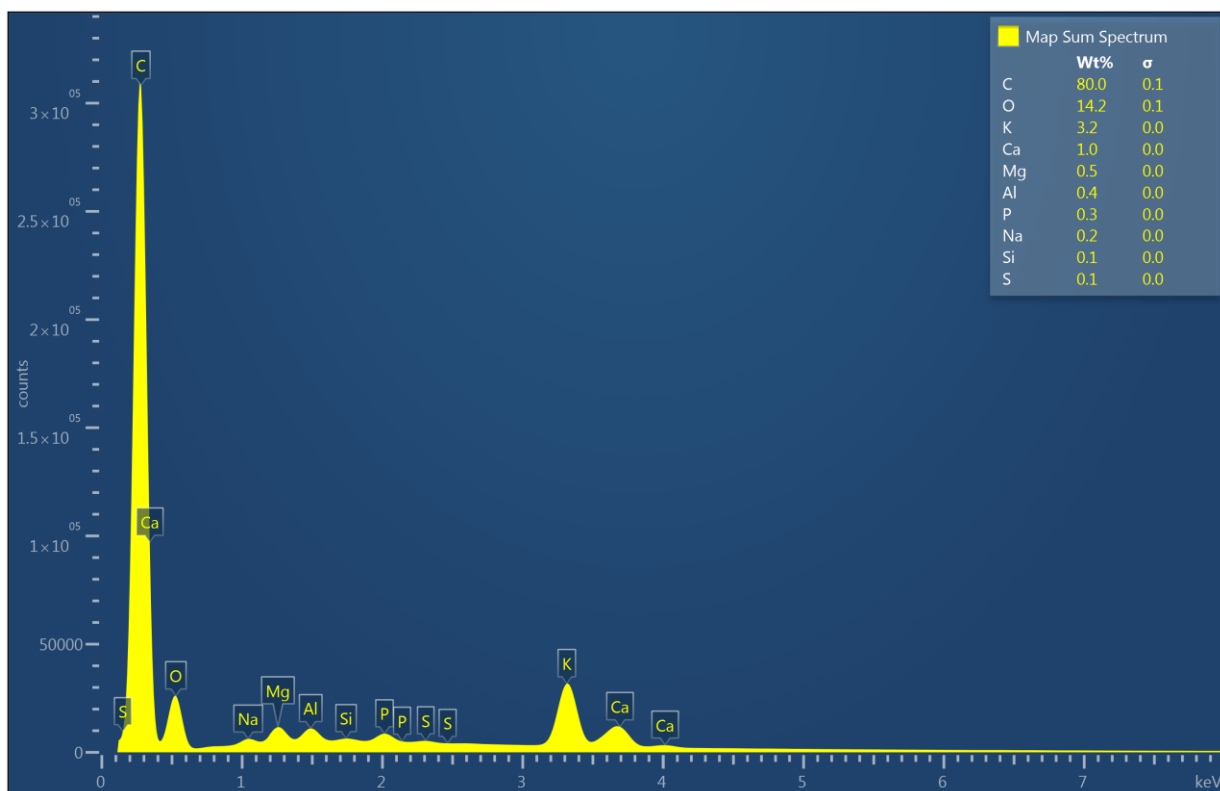
Fig. 7 Análisis de biocarbón mediante SEM (HighVac. 20.0kV). **A.** Partícula de biocarbón posterior pirólisis. **B.** Superficie de biocarbón. **C.** Acercamiento para la visualización de poros. **D.** Medición de algunos poros de la zona de la imagen C.

Se hizo también un análisis microelemental por EDS-SEM donde se observa que su composición mayoritaria es el carbono, seguida por el oxígeno y potasio, conteniendo otros 8 micro-elementos en menor proporción (Tabla 4, Fig. 8).

Tabla 4

Análisis microelemental del biocarbón por SEM-EDS.

ELEMENTO	% EN PESO	% ATÓMICO
C	77.51	84.73
O	15.45	12.68
Na	0.15	0.08
Mg	0.48	0.26
Al	0.46	0.22
Si	0.07	0.03
P	0.24	0.10
S	0.06	0.03
Cl	0.05	0.02
K	4.56	1.53
Ca	0.98	0.32
Total:	100.00	100.00

**Fig. 8** Espectro de microanálisis elemental de la biocarbón por SEM-EDS.

El biocarbón se llevó a análisis, recién terminado el proceso de pirólisis y posterior al tratamiento de invernadero, con la interacción planta-microorganismo con la finalidad de analizar si hubo un cambio en el mismo al interaccionar en la rizósfera.

En la Figura 9 se muestran los espectros de IR correspondientes a las muestras de biocarbón obtenido de cáscara de aguacate (biochar) y de biocarbón sometido a tratamiento en la rizósfera por 12 semanas en invernadero (biochar control). Al hacer la comparación entre los espectros de ambas muestras, prácticamente no se observan diferencias en los grupos funcionales de cada uno de ellos, lo cual indica que el tratamiento del biochar en suelo no tuvo un efecto significativo en las propiedades de la química de superficie del material carbonoso. Por otro lado, en la muestra de biocarbón (biochar) se observan grupos funcionales característicos de este tipo de material; por ejemplo, la banda a 748 cm^{-1} corresponde a las vibraciones de enlaces del tipo $=\text{C-H}$, relacionados con alquenos o compuestos aromáticos en el biocarbón, más específicamente relacionados con lignina y celulosa [53,54]. De manera similar, las bandas presentes en el intervalo de 1008 a 1031 cm^{-1} , corresponden al estiramiento del enlace C-O relacionado con compuestos alifáticos o ésteres. La banda a 1373 cm^{-1} corresponde al enlace $-\text{CH}_2$, característico del material [55]. La banda presente en 1557 cm^{-1} está relacionada también con estiramiento del enlace C-O pero corresponde en este caso a ácidos carboxílicos presentes en su estructura [56].

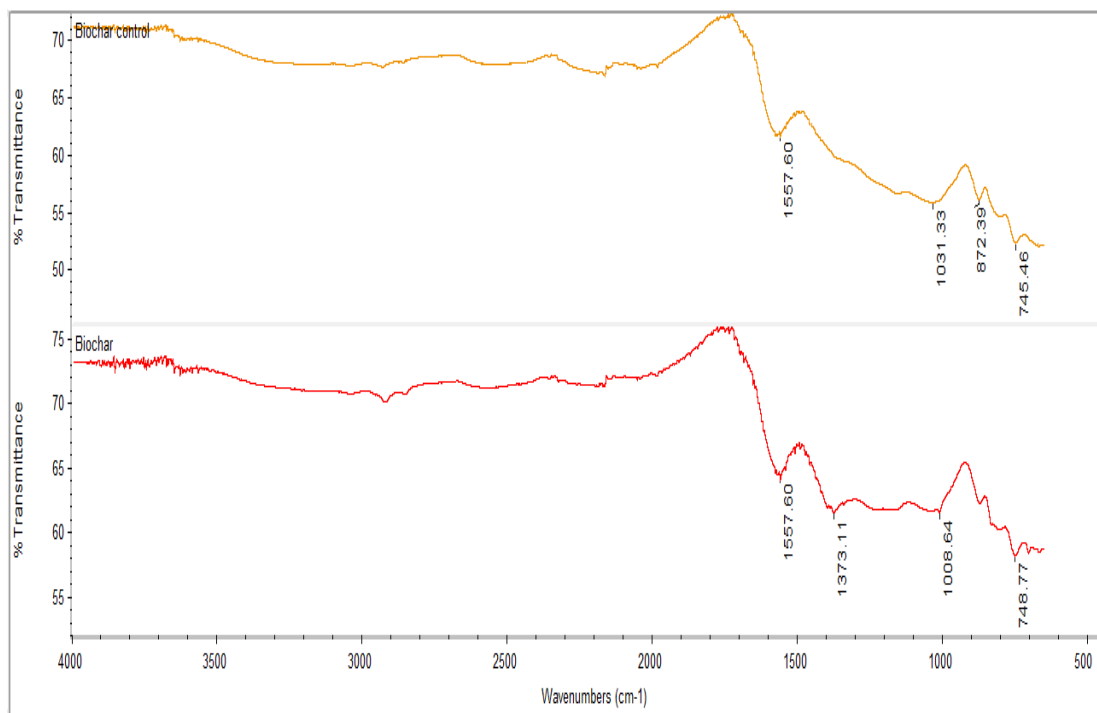


Fig. 9 Espectros de infrarrojo de muestras de Biochar y Biochar control.

En la Figura 10 se observan los espectros IR de las muestras de biocarbón control (biochar control) y la muestra de biocarbón obtenida posterior al Tratamiento 1 (T1). Al hacer la comparación de ambos espectros, se pueden observar diferencias significativas, en particular en la muestra T1, donde se observa la desaparición de las bandas en el intervalo de 745 a 1031 cm^{-1} , características del biocarbón; lo anterior indica que los grupos funcionales implicados en la adsorción de compuestos involucrados con el crecimiento vegetal y/o bacteriano son aquellos relacionados con las bandas de vibración de grupos funcionales en este intervalo. La banda a 1557 cm^{-1} , coincidente con ácidos carboxílicos mostró un ligero desplazamiento (1622 cm^{-1}), lo cual sugiere la interacción de estos grupos funcionales del material en procesos de formación de complejos por adsorción de compuestos generados en el crecimiento bacteriano o vegetal. Por otro lado, una banda amplia a 3271 cm^{-1} apareció en el biocarbón posterior al tratamiento con bacterias durante el crecimiento vegetal (T1). Por lo

general, este tipo de bandas se relacionan con grupos –OH, los cuales pueden provenir de ácidos carboxílicos y compuestos volátiles [53,55,56].

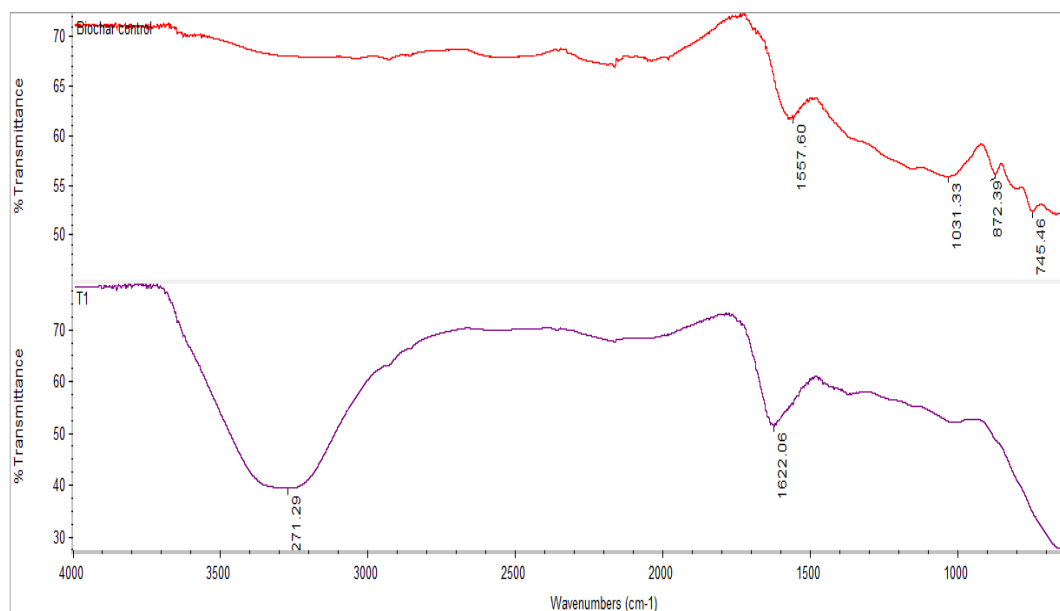


Fig. 10 Espectros de infrarrojo de las muestras de Biochar control y T1.

Se ha reportado que las actinobacterias tienen mecanismos de comunicación (Quorum Sensing) en la rizósfera, entre ellas y cuando estas se encuentran interactuando con las raíces de las plantas. Entre las moléculas involucradas se encuentran la γ -butirolactona (casi exclusiva del phylum), metil-enomicin furanos, AI-2 y Acil Homoceryl-Lactona (AHL) [57], la alteración en las bandas o el reporte de adsorción sugiere la posible presencia de estas moléculas por grupos funcionales, sin embargo, para confirmar se sugiere el uso de un equipo de HPLC.

4.2.2. Ensayo del inoculante en biopelícula en maceta

Transcurridas las 12 semanas, tiempo de vida de ambas plantas utilizadas trigo (*T. aestivum*) y frijol mungo o soya verde (*V. radiata*), las plantas se llevaron al laboratorio para realizar las mediciones y observaciones correspondientes por tratamiento.

Entre las mediciones que se hicieron al trigo, se evaluaron: altura de la planta, desde principio del tallo a la punta de la arista mayor de la espiga, espiga completa, espiga base que constituyen las glumas, sin aristas (que denominamos espiga sola), biomasa total en peso seco y biomasa de raíz en peso seco.

Los controles fueron comparados entre ellos por ANOVA de una vía y comparación de medias de Tukey-Kramer y Dunnett con una $p < 0.05$ en donde en los tres controles no se encontraron diferencias significativas sobre el resultado de las variables, por lo que las diferencias de aditivos como la perlita y el biocarbón no interfieren con la variable respuesta. Al analizar la comparación entre los controles, estos aparecieron ligados con una misma letra en todos los parámetros de medición de las variables por lo que se consideran “inocuos” es decir, que es válido tomar cualquiera de ellos para usarlo como comparativo con los análisis de los tratamientos. Se decidió tomar el C0 para comparación de Tukey-Kramer y Dunnett con respecto a los tratamientos en la Figura 11 se muestra un ejemplo del análisis de los controles. Los niveles unidos por una misma letra, se comportan estadísticamente de la misma forma.

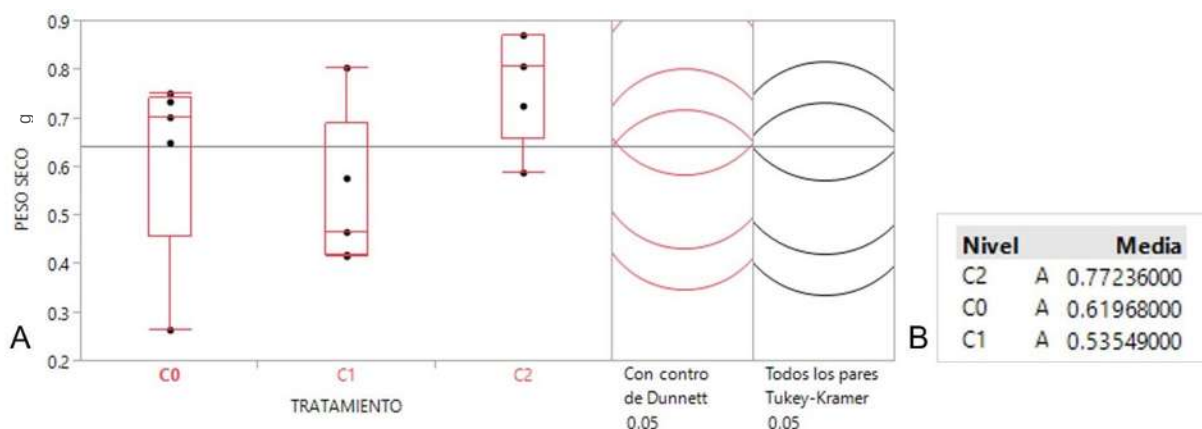


Fig. 11 Comparación entre controles de *T. aestivum*. **A.** Análisis de ANOVA de una vía Dunnett. **B.** Comparación de medias con el control Tukey-Kramer.

De la misma forma, se hizo un análisis de ANOVA de una vía y comparaciones de medias de Tukey-Kramer y Dunnett con una $p < 0.05$ utilizando el C0 para la comparación entre tratamientos (Fig. 13A y 13B). En la figura 12 se observa de una manera más clara las diferencias significativas que existen en la altura entre tratamientos (enlazados con una letra a) y con respecto a los controles (enlazados con una letra b). Los niveles no enlazados por la misma letra son significativamente distintos.



Fig. 12 Evidencia de la altura con los tratamientos entre el bioinoculante y *T. aestivum*.

Para la espiga se hicieron dos mediciones, la primera corresponde a la espiga completa, y la segunda únicamente las glumas sin la arista (denominada en los estadísticos como espiga sola), debido a que pudiera haber variaciones en el número de granos por espiga y/o tratamiento. En cuanto a la espiga completa y de manera visual en las espigas de los tratamientos mostrados en la imagen de la figura 13, la única que destaca es la correspondiente a T1, pero al revisar las mediciones con los análisis de ANOVA, Tukey-Kramer y Dunnett en comparación

con el control con una $p < 0.05$, vemos que T1, T2 y T5 ocupan las posiciones con mejores tamaños, y todas tienen diferencias significativas con respecto al control (Fig. 14A).



Fig. 13 Tamaños de la espiga según los tratamientos entre el bioinoculante y *T. aestivum* y con respecto a los controles.

Las diferencias entre el control y los diferentes tratamientos con los inoculantes en biopelícula y sus efectos sobre *T. aestivum* se muestran en la Figura 14, donde los niveles no ligados por la misma letra son significativamente diferentes según un análisis ANOVA de una vía y una comparación de medias con el control en Tukey-Kramer. Las medidas evaluadas de altura, espiga completa, espiga base y biomasa total no fueron significativamente diferentes entre ellas, pero si con respecto al control. En la variable biomasa de raíz, T2, T1 y T6 fueron similares entre ellos y diferentes de T3, T4, T5 y T7, todos fueron diferentes del control. Esto significa que todos los tratamientos mejoran el crecimiento de las plantas en comparación con las plantas sin tratamiento con inoculante en biopelícula. Las cepas seleccionadas en este estudio mostraron resultados sobresalientes para *T. aestivum*.

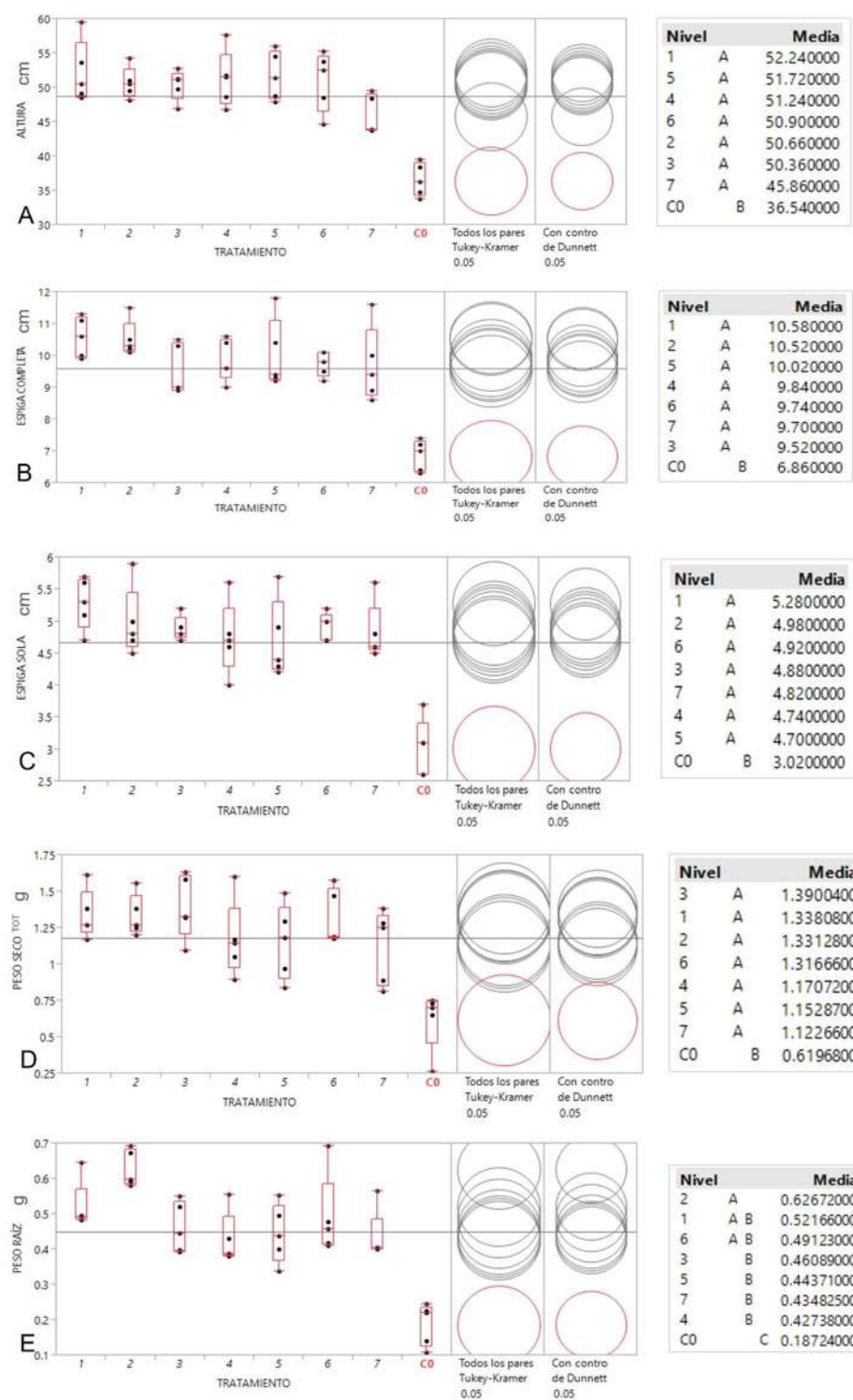


Fig. 14 Efectos del crecimiento de *T. aestivum* en la interacción con los tratamientos del inoculante en biopelícula. A. Altura (cm). B. Espiga completa (cm). C. Base de la espiga (cm). D. Biomasa total en peso seco (g). E. Biomasa de raíz (g).

La imagen de la figura 15, muestra la evidencia visual de las diferencias entre la biomasa de la raíz entre tratamientos en fresco, pero los análisis se hicieron en el peso seco de raíz, retirando los remanentes de suelo que aún se observan en la imagen.

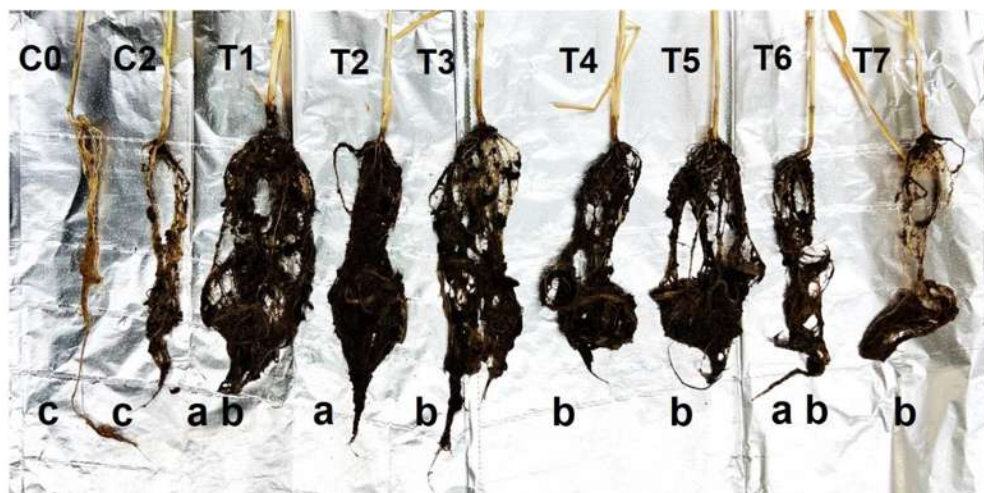


Fig. 15 Biomasa de la raíz según los tratamientos entre el bioinoculante y *T. aestivum* y con respecto a los controles.

La Tabla 5 muestra el porcentaje de promoción del crecimiento de las plantas. El control se tomó como el 100% de crecimiento de la planta sin estimulación con bacterias y se consideró como punto de partida para determinar el porcentaje de aumento de la biomasa vegetal para su posterior uso en la comparación de los valores medios entre tratamientos con el inoculante en biopelícula en *T. aestivum*.

Tabla 5. Porcentaje de PGP y comparación de medias de Tukey-Kramer y Dunnett entre los tratamientos en *T. aestivum*.

TRATAMIENTO	%ALTURA	%ESPIGA COMPLETA	%ESPIGA SOLA	%PESO SECO	%PESO RAÍZ
T1	142.96a*	154.22a*	174.83a*	215.93a*	282.36b*
T2	138.64a	153.35a*	164.90a*	214.83a*	334.71a*
T3	137.82a	138.77a	161.58a	224.31a*	246.14b
T4	140.22a*	143.44a	156.95a	188.92a	228.25b
T5	141.54a*	146.06a*	155.62a	186.04a	236.97b
T6	139.29a	141.98a	162.91a*	212.47a	262.35ab*
T7	125.50a	141.39a	159.60a	181.16a	232.22b
C0	100.00b	100.00b	100.00b	100.00b	100.00b

*corresponde a las 3 primeras posiciones de incremento en porcentaje con respecto al control en la comparación de medias de Tukey-Kramer y Dunnett $p < 0.05$.

Todos los tratamientos mostraron evidencia de promoción del crecimiento de las plantas, considerando un incremento en porcentaje, los resultados sobresalientes fueron más evidentes en T1 y T2. Estos resultados fueron consistentes con las pruebas *in vitro* del reto planta- microorganismo con la planta modelo *A. thaliana* y con las pruebas PGP expuestos en el capítulo III. Se ha informado un aumento del 15 al 30 % en la altura y del 148% en la biomasa total con *T. aestivum* en comparación con el control utilizando 10^8 esporas de especies de *Streptomyces* [58,59]. En este estudio se observó un incremento medio en altura entre 140% y 200% en biomasa total, con un incremento de biomasa de raíces superior al 300% utilizando *Streptomyces flaveolus* (ARI_A20-5). Mientras que al utilizar a *Streptomyces aureus* T3 (ARI_A30-32), se observó un aumento de más del 220 % para la biomasa total; esta cepa también mejoró los siguientes parámetros: altura y espiga completa cuando se combinó con *S. griseorubens* T1 (ARI_A20-3) en el tratamiento T5, en comparación con el control. Ambas cepas, *S. flaveolus* y *S. aureus*, mostraron una actividad significativa como promotores del crecimiento de las plantas incluso cuando estas cepas solo se habían utilizado principalmente por su potencial antimicrobiano y antifúngico contra patógenos

humanos [60–64]. Además, *S. aureus* se ha utilizado en la biorremediación del suelo [65,66]; esta cepa resultó ser un productor de sideróforo eficiente en este estudio.

Jog *et al.* [67] mejoraron el tratamiento de una especie de *Streptomyces* utilizando 10^6 células/biopelícula por maceta. Se reportaron resultados destacados incluso usándolo en consorcio con otro *Streptomyces* sp., como lo describe Panneerselvam *et al.* [68]. Ellos utilizaron *S. canus* en consorcio aplicado en campos de granada. Además, *S. griseorubens* (ARI_A20-3) mejoró significativamente el crecimiento de las raíces en comparación con los resultados informados por Boubekri *et al.* [69] utilizando el mismo microorganismo planctónico en trigo. Los resultados de este trabajo son mejores que los informados por Jog *et al.* [67] para tratamientos con una especie de *Streptomyces*, utilizando 10^6 células/biopelícula por maceta [59,66,67].

Es bien sabido que las dosis bajas de la auxina AIA promueven el crecimiento de la raíz primaria e inducen el desarrollo de la raíz lateral; sin embargo, los resultados en la tabla resumen del capítulo III, mostraron que ARI_A20-3 de T1 descrito como no productor de AIA (Tabla 5) [63,70], mostró un mayor porcentaje en peso de biomasa de raíces en comparación con ARI_A30-32 del T3 (descrito como productor de AIA). Este hecho sugiere que la promoción directa del crecimiento de las plantas también puede ocurrir al facilitar nutrientes a la raíz a través de otros mecanismos bien conocidos, como la fijación de nitrógeno, la adquisición de hierro por los sideróforos y la solubilización de fosfato [71], que se informaron en la Tabla resumen del capítulo III como atributos para estas cepas, entre otras no reportadas en este trabajo.

Entre las mediciones que se hicieron a *V. radiata* (Frijol mungo), se evaluaron; altura de la planta, el número de hojas, la biomasa total en peso seco y biomasa de raíz en peso seco.

Los controles fueron comparados entre ellos por ANOVA de una vía y comparación de medias de Tukey-Kramer y Dunnett con una $p < 0.05$ en donde en los tres controles no se encontraron diferencias significativas sobre el resultado de las variables, por lo que las diferencias de aditivos como la perlita y el biocarbón no interfieren con la variable respuesta. Al analizar la comparación entre los controles, estos aparecieron ligados con una misma letra en todos los parámetros de medición de las variables por lo que se consideran “inocuos” es decir, que es válido tomar cualquiera de ellos para usarlo como comparativo con los análisis de los tratamientos. Se decidió tomar el C0 para comparación de Tukey-Kramer y Dunnett.

De la misma forma, se hizo un análisis de ANOVA de una vía y comparaciones de medias de Tukey-Kramer y Dunnett con una $p < 0.05$ utilizando el C0 para la comparación entre tratamientos (Fig. 16). En la figura 17 se muestran los resultados de las diferencias entre el control y los diferentes tratamientos con los inoculantes en biopelícula y sus efectos sobre *V. radiata*. Los niveles no ligados por una misma letra son significativamente diferentes.

En el caso de la altura se destaca el tratamiento T2 encontrando diferencias significativas con respecto al control, al ubicarlo con la letra **a**, seguido por T5, T4 y T1 que son parecidas a **a**, pero también a **b** (Fig. 16A). Se evaluó también el número de hojas por planta, encontrando que no es una variable que pueda aportar ninguna diferencia significativa entre los tratamientos y el control (Fig. 16B), ya que el número de hojas fue relativamente, similar pero la diferencia radicaba en los tamaños de las mismas, esto que se incluyen en la variable de biomasa total en peso seco. Sin embargo, si consideramos las medias, se destaca en las primeras posiciones a T1, T2 y T4.

Las plantas completas fueron secadas como se indicó en la metodología para la medición de biomasa total en peso seco, previo a la pesada se retiraron los remanentes de suelo que aún quedaban posterior lavado en fresco, dejando únicamente la planta. Los análisis de ANOVA, Tukey-Kramer y Dunnett de los

tratamientos, arrojaron que T1 y T2 tuvieron el resultado más sobresaliente, siendo diferentes al control, mientras que los demás tratamientos fueron significativamente parecidos entre ellos y a su vez con el control (Fig. 17 letras en amarillo) (Fig. 16C y 16D).

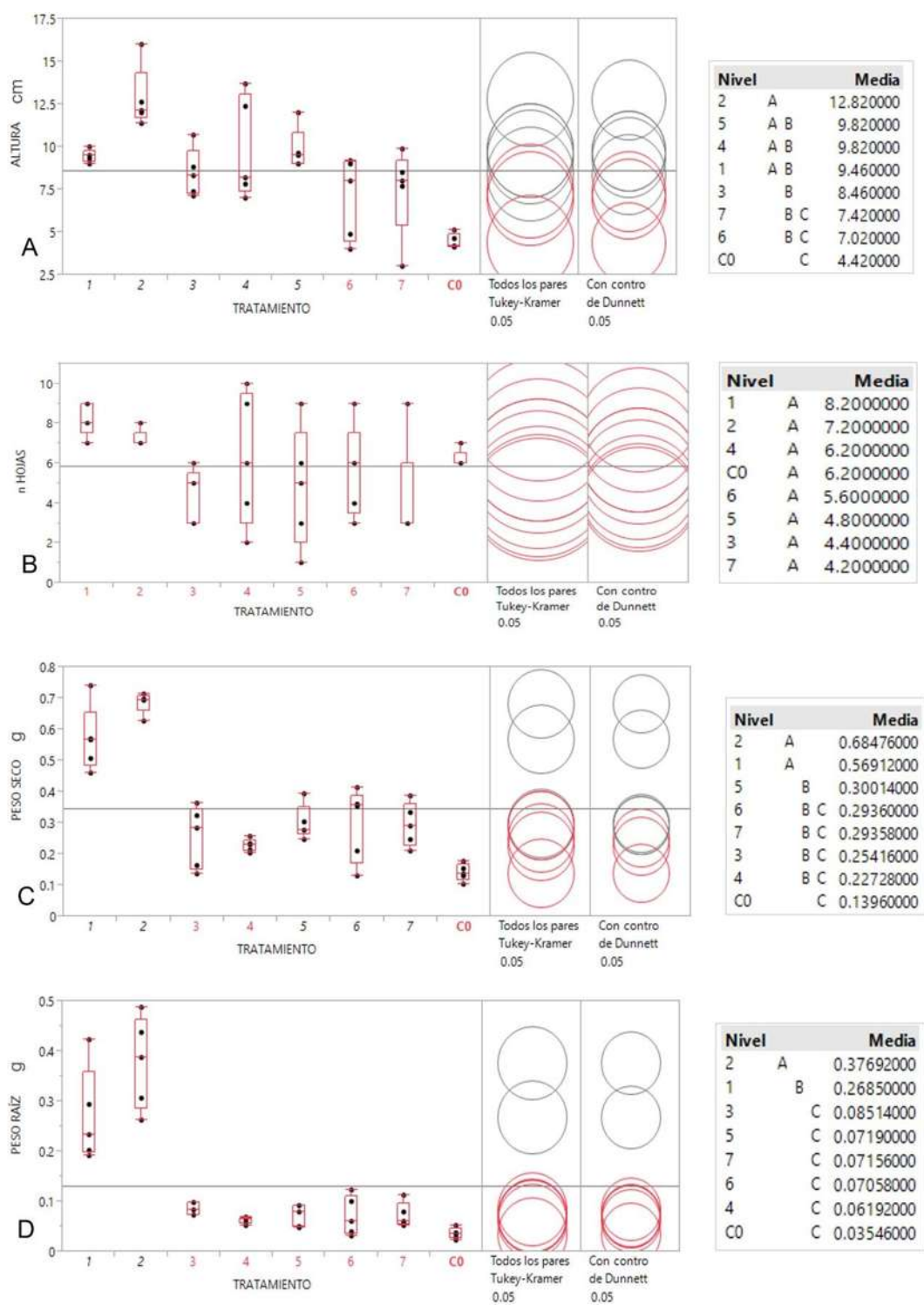


Fig. 16 Efectos del crecimiento de *V. radiata* en la interacción con los tratamientos del inoculante en biopelícula. A. Altura (cm). B. n° de hojas. C. Biomasa total en peso seco (g). D. Biomasa de raíz (g).

Posterior al pesado de la biomasa total de la planta, ésta, se seccionó para retirar la raíz y pesarla por separado para observar el efecto de los tratamientos únicamente en la interacción con la raíz y rizósfera. La imagen de la figura 22, muestra la evidencia visual de las diferencias entre la biomasa de la raíz entre tratamientos en fresco que no es muy evidente entre algunos de ellos, pero los análisis se hicieron en el peso seco de raíz, retirando los remanentes de suelo.

Al revisar los datos analizados de los pesos en seco de la biomasa de raíz de los tratamientos, observamos nuevamente que T1 y T2 continúan tomando las primeras posiciones encontrando diferencias significativas entre estos tratamientos y el control, y que los demás tratamientos son estadísticamente parecidos al control y se encuentran enlazados por una misma letra en los análisis de comparación de medias de Tukey-Kramer (Fig. 17, letras en negro) (Fig. 16D).



Fig. 17 Biomasa de tratamientos entre el bioinoculante y *V. radiata*. Letras en color amarillo representan la biomasa total en peso seco y letras en color negro la biomasa de raíz en peso seco. Los niveles no unidos por la misma letra son significativamente distintos.

En la Tabla 6, se muestra un resumen de los análisis estadísticos obtenidos de las variables medidas, los valores y variables con asterisco indican las primeras 3 posiciones ocupadas en la comparación de medias de los análisis de Tukey-Kramer y Dunnett.

A diferencia del trigo, en este modelo de planta si se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de bioinoculantes con *V. radiata*, estas diferencias marcaron al tratamiento **T1 y T2** como diferentes al control y entre los demás tratamientos, ya que estos dos tratamientos fueron consistentes en todas las variables, por lo que fue notable su efecto positivo con respecto al control, por lo que confirma lo previamente expuesto con el reto in vitro planta-microorganismo con la planta modelo *A. thaliana* y las pruebas de promoción de crecimiento vegetal planteados en el **capítulo III**.

Tabla 6

Porcentaje de incremento en el crecimiento vegetal con respecto al control y análisis de medias de Tukey-Kramer y Dunnett.

TRATAMIENTO	%ALTURA	%PESO SECO	%PESO RAÍZ
T1	214.03a	407.68a*	757.19a*
T2	290.05ab*	490.52a*	1062.94b*
T3	191.40b	182.06bc	240.10c*
T4	222.17ab*	162.81bc	174.62c
T5	222.17ab*	215b*	202.76c
T6	158.82bc	210.32bc	199.04c
T7	167.87bc	196.39bc	201.80c
C0	100	100	100
*3 primeras posiciones de incremento en porcentaje con respecto al control.			

La soya es una leguminosa cuyos requerimientos nutricionales son mayores a los del trigo y presentó un poco más de dificultades para germinar, sin embargo, al analizar la biomasa total de la planta esta nos indica incrementos mayores al 400% en la biomasa vegetal en peso seco y superiores a 750% en el caso de la

biomasa de raíz en el caso de T1 y T2 con respecto al control, por lo que se considera que los mecanismos de promoción para el crecimiento vegetal son eficientes aún a pesar de que no hubo colonización endófitica en los tratamientos a excepción de T2 donde se ve también relacionado con los mayores incrementos en la biomasa vegetal (Tabla 6), encontrando similitudes con Wahyudi *et al.* [72], en cuyo trabajo, de un total de 53 aislados de actinobacterias, que colonizaban la rizósfera de soya sin ser endofíticas, de las cuales seleccionaron 5 pertenecientes al género *Streptomyces*, estas resultaron buenas en la promoción del crecimiento vegetal e incrementaron la biomasa total de la planta, basando su promoción en la producción de AIA, fijación de nitrógeno y solubilización de fosfato principalmente, debido a los requerimientos de la soya [72].

Horstmann *et al.* [73], reportaron a su vez un incremento de 17.97% en biomasa total en peso seco a los 45 días al inocular utilizar cepas de *Streptomyces* para impregnar semillas de soya [73], por su parte Adhilakshmi *et al.* [74], obtuvo incrementos de entre 74-78% sobre el control al usar *Streptomyces* sp. en semilla y en condiciones de invernadero adicionando 10^9 células planktónicas/maceta con respecto al control en un periodo de 30 días [74]. En el presente trabajo obtuvimos incrementos mayores de hasta un 400% con respecto al control, germinando la semilla en contacto directo con las biopelículas de actinobacterias en suelo.

El análisis de viabilidad microbiana se llevó a cabo durante el tratamiento de 12 semanas (el tiempo de vida de la planta es de 110 días de germinación a cosecha), las evaluaciones de cuenta viable se hicieron al inicio, a la mitad del tratamiento y al final del mismo.

En el caso de *T. aestivum*, se presentó en todos los casos una elevación de 2 a 3 órdenes de magnitud exponencial hacia arriba; es decir, la población de actinobacterias no disminuyó y, contrario a eso, se multiplicó, siendo una evidencia de interacción positiva con la planta pues la mayoría de los inoculantes

que no se encuentran en biopelícula disminuyen sus cuentas viables durante el tratamiento con la planta [75].

En el caso de la cuenta viable con *V. radiata*, el incremento fue menor, de 1 a 2 órdenes de magnitud exponencial, pero si se observó una cuenta aumentada en ambos casos (Tabla 7).

Tabla 7.

Dinámica de población de las cepas de actinobacteria inoculadas por tratamientos usando *T. aestivum* (Ta) and *V. radiata* (Vr). (3 réplicas por tratamiento).

TRATAMIENTO	SEM	UFC/g SUELO RIZOSFÉRICO	TRATAMIENTO	SEM	UFC/g SUELO RIZOSFÉRICO
T1 (Ta)	0	3.0 x 10E6d	T1 (Vr)	0	3.1 x 10E6d
	6	6.5 x 10E7c		6	3.5 x 10E7c
	12	6.7 x 10E8b		12	7.2 x 10E7c
T2 (Ta)	0	4.6 x 10E6d	T2 (Vr)	0	3.6 x 10E6d
	6	7.0 x 10E6d		6	8.6 x 10E7c
	12	3.3 x 10E8b		12	2.5 x 10E7c
T3 (Ta)	0	2.5 x 10E6d	T3 (Vr)	0	2.4 x 10E6d
	6	1.6 x 10E8b		6	8.5 x 10E7c
	12	1.3 x 10E9a		12	1.3 x 10E9a
T4 (Ta)	0	2.0 x 10E6d	T4 (Vr)	0	2.5 x 10E6d
	6	5.4 x 10E6d		6	6.15 x 10E7c
	12	2.3 x 10E8b		12	3.3 x 10E7c
T5 (Ta)	0	3.5 x 10E6d	T5 (Vr)	0	4.0 x 10E6d
	6	1.6 x 10E8b		6	1.4 x 10E8b
	12	1.4 x 10E9a		12	5.8 x 10E8b
T6 (Ta)	0	3.0 x 10E6d	T6 (Vr)	0	2.0 x 10E6d
	6	1.2 x 10E7c		6	3.0 x 10E8b
	12	1.1 x 10E9a		12	8.8 x 10E8b
T7 (Ta)	0	3.5 x 10E6d	T7 (Vr)	0	3.5 x 10E6d
	6	1.6 x 10E8b		6	1.6 x 10E8b
	12	6.7 x 10E8b		12	1.1 x 10E8b

SEM, semana.

Para cada variable experimental y tiempo de muestreo, los valores medios seguidos de la misma letra no son una diferencia significativa en P = 0.05.

Las cuentas viables microbianas más elevadas que las inoculadas de origen nos indica el éxito en la colonización de la rizósfera por parte de los microorganismos.

Si comparamos los resultados de Daza *et al.*, utilizaron perlita como vehículo para un inoculante utilizando a *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. tropici*, *Bradyrhizobium japonicum* y *Bacillum megaterium* de forma planctónica en semillas de soya, resultando una estabilidad que logró mantener los microorganismos viables a una temperatura de entre 4-28 °C con una reducción de 3 log en 32 días sobre la semilla [75]. En el caso de Daza la viabilidad se vio reducida en 3 log en 32 días, y al compararlo con las formulaciones empleadas en ambos modelos de plantas, las viabilidades se mantuvieron e incrementaron en un periodo de 82 días casi el triple de tiempo logrado por Daza [75].

Khabazi *et al.* [39], por su parte emplearon la perlita pulverizada en polvo con residuos orgánicos como soporte de la bacteria *B. japonicum* para emplearse como biofertilizante logrando tener buenos resultados, pero indicando la caída de la viabilidad después de 4 semanas [39]. Por su parte, Albareda *et al.* [40], encontraron que la perlita presentó resultados similares a las bases de biofertilizantes en composta y turba que son las que han ido consideradas de las mejores opciones con la bacteria *B. japonicum* con viabilidades adecuadas de 1×10^9 UFC/g⁻¹ por un periodo de 6 meses [40]. Las viabilidades reportadas por Albareda son bastante buenas considerando que se trata de biofertilización en forma planctónica, en este trabajo se logró llegar a niveles iguales o cercanos en un periodo de tiempo más corto y considerando la permanencia de las esporas en el vehículo de perlita. Por lo que se espera que la viabilidad se mantenga por un mayor periodo de tiempo.

Este comportamiento se podría atribuir a que cuando la biopelícula se integró en el vehículo de perlita, las hifas lograron penetrar en la estructura del material, aprovechando su porosidad (Figura 2D) y brindando una mejor protección a las hifas o esporas remanentes contra hostiles. condiciones en la rizósfera, como el pH, la desecación, los depredadores y la radiación UV [37,76]. Este comportamiento podría explicarse ya que la perlita es un material inocuo con agua retenida dentro de su estructura. Hasta donde sabemos, ningún estudio anterior con biopelículas en este tipo de material utilizado como portador de actinobacterias ha producido tales resultados.

Aunque el biocarbón fue introducido en los experimentos únicamente como testigo de las interacciones de la rizósfera, estudios y publicaciones previas han demostrado que la utilización del biocarbón resulta en un incremento en la conservación de la viabilidad de la biomasa bacteriana en un rango del 10% [77] al 30 % [78], por lo que no se descarta que pueda ser una ayuda en la consistencia de la viabilidad. Dentro de las bacterias beneficiadas en el incremento de su población fueron las actinobacterias de los géneros *Mycolisibacteria*, *Streptosporangium*, *Actinomadura*, *Actinoallomurus* y *Streptomyces* [42].

Una vez suspendido el experimento de invernadero y posterior a la semana 12, las perlitas del inoculante en biopelícula se recuperaron de la rizósfera de cada uno de los tratamientos de ambas plantas, se fijaron y deshidrataron según lo descrito en la sección de metodología para su observación en SEM al alto vacío y utilizando un voltaje de aceleración de 15- 20 kV.

En todos los casos, el mineral no estaba cubierto por biopelícula en un primer plano (Fig. 18A), pero al hacer acercamientos, fue posible visualizar grandes cantidades de esporas entre los poros y la superficie (Fig. 18B) e incluso gran población de esporas donde se encontraba mejor adherida la biopelícula como se muestran en los ejemplos de las figuras 18C (flechas amarillas) y D. Además de que fue fácil distinguir la diferencia entre las esporas pertenecientes a

cada una de las cepas en los distintos tratamientos (Fig.18 E y F) y fue posible también identificar los componentes residuales de la matriz de la biopelícula con algunas esporas aun adheridas a ella (Fig. 19). Las esporas son una forma de resistencia de vida y pueden permanecer en esta fase durante varios años hasta que las condiciones de germinación vuelvan a ser adecuadas [51]; por lo que se sugiere que se podría asegurar su permanencia en la rizósfera entre 9 y 12 años en el suelo al utilizar este tipo de mineral como vehículo y por su conversión a esporas, según estudios de conservación *in vitro* realizados por Filippova *et al.* [79].

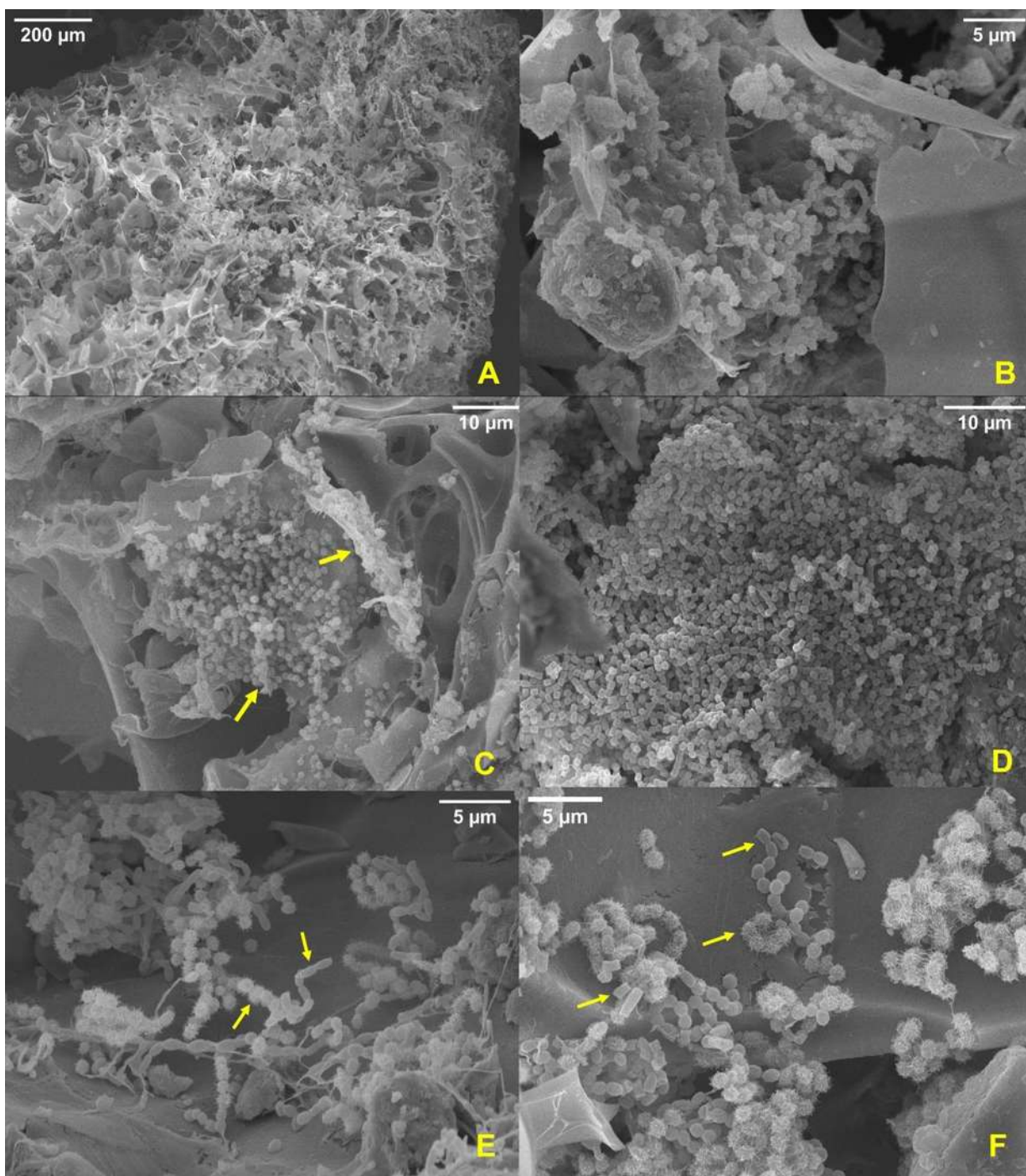


Fig. 18 Análisis de SEM del inoculante en biopelícula sobre perlitas post tratamiento en maceta. A. Aspecto general de las perlitas recuperadas post tratamientos (95x). B. Tratamiento 1 (3,000x), ARI_A20-3 C. Tratamiento 2 (1,600x), remanente de biopelícula de ARI_A20-5 (flechas amarillas). D. Tratamiento 3 (2,000x), ARI_A30-32. E. Tratamiento

4 (3,500x), dos diferentes esporas de ARI_A20-3 y ARI_A20-5 (flechas amarillas). F. Tratamiento 7 (3,700x), tres diferentes esporas de ARI_A20-3, ARI_A20-5 y ARI_A30-32 (flechas amarillas).

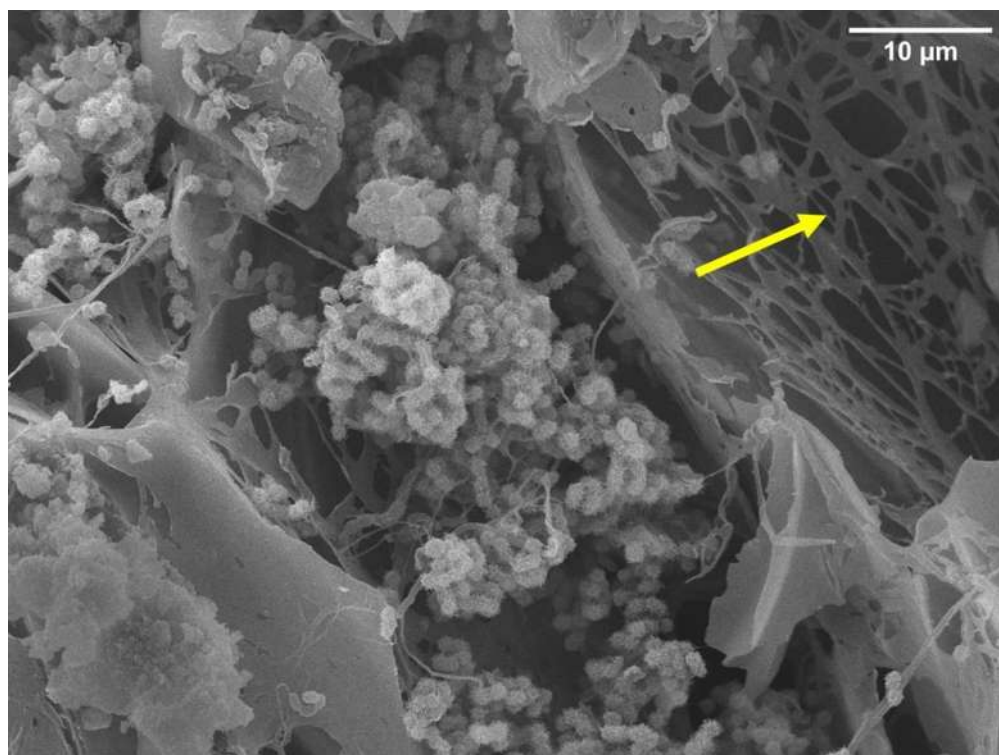


Fig. 19 Análisis de SEM del inoculante en biopelícula sobre perlitas post tratamiento en maceta. Remanente de biopelícula, tratamiento 7 (1,800X).

Aunque las actinobacterias se cultivaron por separado, este estudio proporciona evidencia fehaciente de que se llevó a cabo una interacción positiva, dando como resultado la formación de un consorcio exitoso entre las diferentes especies de *Streptomyces*, como se puede ver en la micrografía de la Figura 18E y F, donde se pueden observar claramente los diferentes tipos de esporas correspondientes a las diferentes especies utilizadas en los tratamientos (*S. griseorubens*, *S. flaveolus* y *S. aureus*).

Las perlitas post tratamiento fueron inoculadas nuevamente al azar en medio de cultivo EM para asegurar que estas estuvieran viables y se tratara del mismo microorganismo, situación que se constató también en el análisis de viabilidad microbiana (Tabla 7).

Una pequeña parte de las raíces de las plantas de los tratamientos, fue separada para hacer un estudio de colonización endófito por parte de las actinobacterias que formaron parte del bioinoculante, ya que ha sido demostrado que las actinobacterias habitan en la rizósfera de diferentes tipos de plantas en una íntima asociación y que son capaces de colonizar las raíces de manera endófito y los tejidos internos de las plantas saludables, esta colonización endófito por actinobacterias no es tan común (debido a que suele haber interacciones patógenas), sin embargo; ha sido reportada en algunas especies de género *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Nocardioides*, *Nocardia*, *Streptosporangium* y *Frankia* [11], cumpliendo un rol de defensa contra patógenos, tal es el caso de los hongos fitopatógenos en donde se ha demostrado que las actinobacterias reducen o eliminan la viabilidad del patógeno, así como los rangos de emisión de toxinas en la rizósfera [80] confiriéndoles resistencia inducida a las plantas y la regulación o promoción del crecimiento de sus hospederos [51].

La esterilización de la superficie de la raíz es un paso obligatorio para el aislamiento de actinobacterias endófitas en orden de eliminar todos los microorganismos superficiales que pudieran interferir con el ensayo [11]. Las raíces fueron analizadas para colonización endófito utilizando la metodología de Coombs y Franco [51]. Para constatar que la desinfección fue exitosa, las raíces tratadas fueron llevadas a SEM para asegurar que no había presencia de microorganismos superficiales (Fig. 20A y 20B), encontrando limpias las raíces.

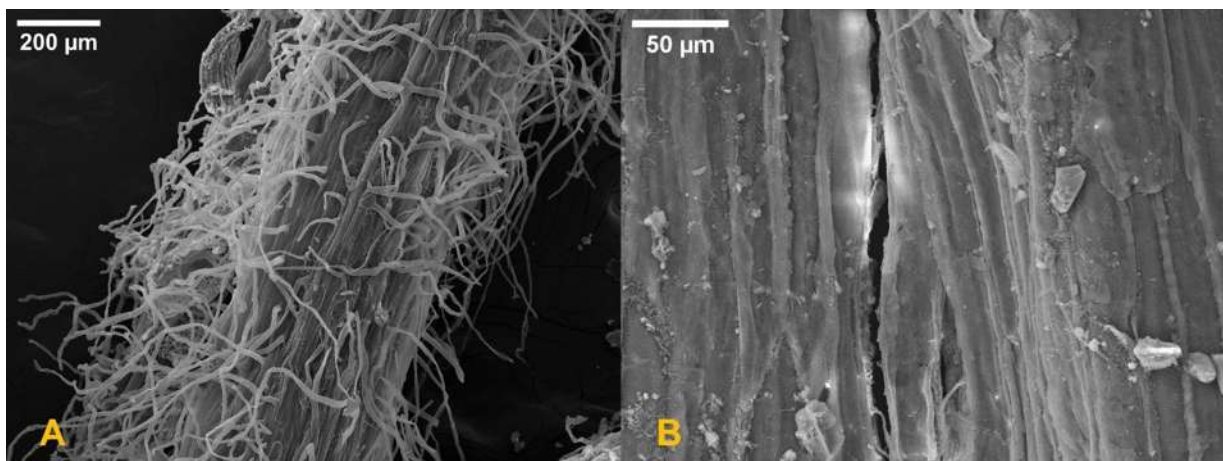


Fig. 20 Raíz de *T. aestivum*. Posterior desinfección. A. 85x. B 400x.

Los 7 tratamientos en trigo mostraron resultados positivos de colonización endófito en un 100% con la aparición de microcolonias sobre las raíces entre los 4-6 días. Se fijaron y analizaron usando SEM. Se analizaron diferentes ángulos de la raíz y/o superficie, se muestran algunos ejemplos de ellos en las micrografías de la Figura 21 donde se muestra cada una de las raíces de los tratamientos con salientes o colonización de hifas de actinobacterias (flechas amarillas), en el caso del tratamiento 3, se muestra cómo se observa una microcolonia saliente de la colonización endófito (Fig. 21C) y un acercamiento de la misma donde se puede visualizar a detalle que la microcolonia está constituida por hifas de actinobacterias (Fig. 21D) .

La colonización de actinobacterias en tejido de trigo sano sugiere que el huésped se beneficia de alguna manera. Dado que los *Streptomyces* son capaces de producir una amplia variedad de metabolitos antibacterianos, antifúngicos y reguladores del crecimiento de las plantas, la ventaja en esta situación podría ser un metabolito secundario producido por ellos. No todas las asociaciones son beneficiosas, y está el ejemplo de *Streptomyces scabies*, *S. acidiscabies* y *S. turgidiscabies* causantes de la sarna de la papa [51]. Por otro lado, este grupo de cepas puede colonizar el tejido interno del trigo debido a los atributos promotores

del crecimiento de la planta que se muestran en este trabajo, mejorando la absorción de nutrientes y produciendo metabolitos secundarios que pueden inhibir patógenos, lo que contribuye a la resistencia sistémica.

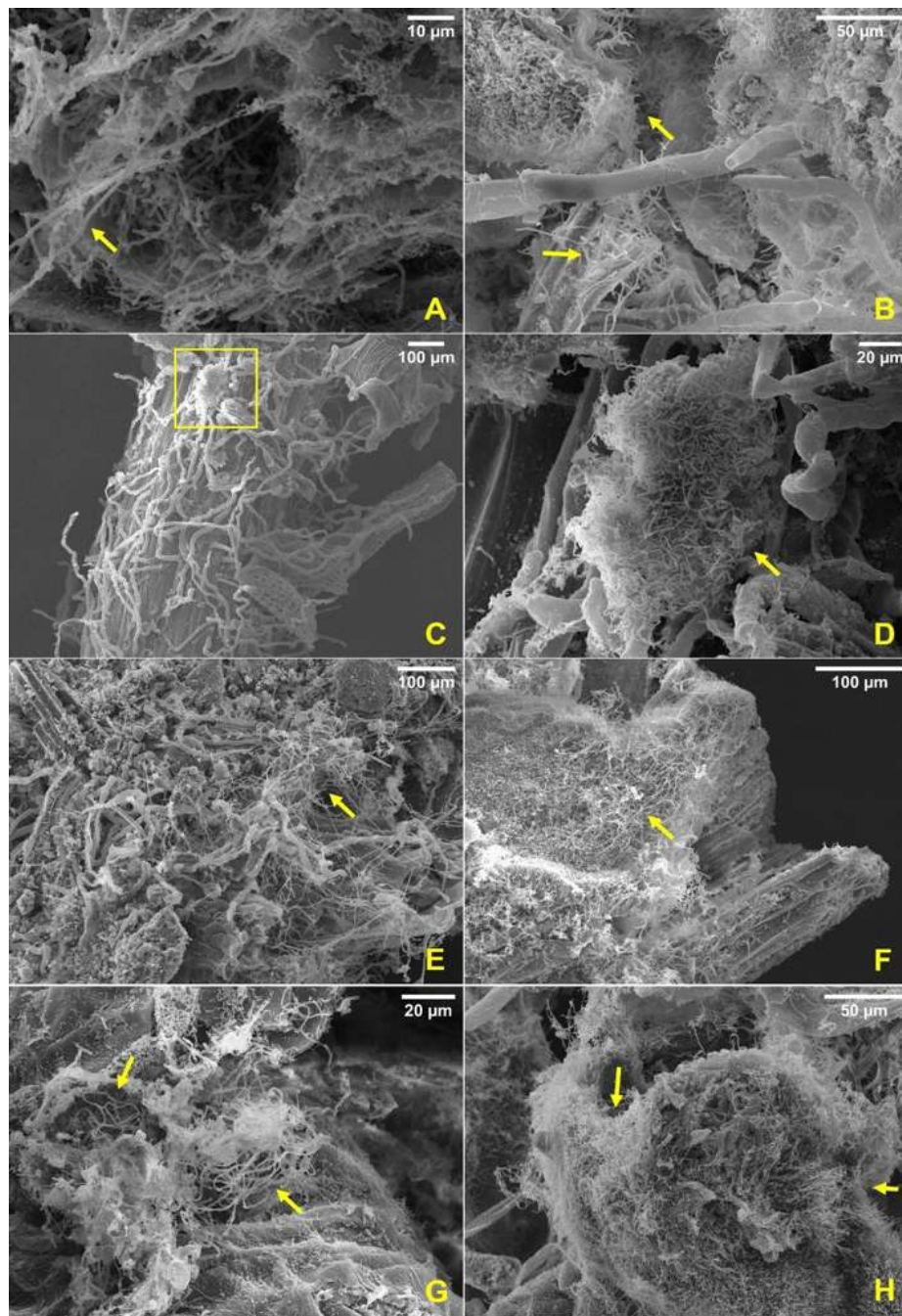


Fig. 21 Crecimiento de actinobacterias endófitas en raíz de *T. aestivum*. **A.** T1 corte transversal (1,300x). **B.** T2 cara lateral (500x). **C.** T3 micro-colonia saliente del crecimiento de actinobacterias endófitas sobre la raíz (100x) (Recuadro en amarillo). **D.** Acercamiento de la zona del recuadro amarillo de C, microcolonia (600x). **E.** T4 corte transversal (160x). **F.** T5 corte transversal (250x). T6 cara lateral (750x). T7 corte transversal (450x).

En el caso de las raíces del frijol mungo, se hizo el mismo tratamiento de desinfección para la búsqueda de actinobacterias endófitas, encontrando en primer lugar raíces sanas y sin presencia de microorganismos (Fig. 22A). Se revisaron las raíces de los 7 tratamientos, incluyendo los controles, pero no se encontró presencia de colonización o de hifas de actinobacterias a excepción de T2. Se muestra un ejemplo de micrografía con un corte transversal de T5 en la figura 22B, la raíz de T2 fue la única en la que se encontró colonización exitosa y abundante de actinobacterias endófitas (Fig. 22C).

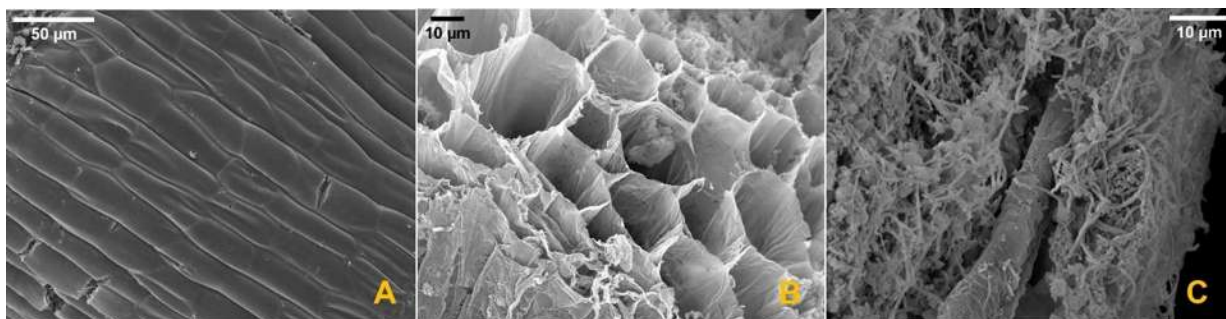


Fig. 22 Raíz de *V. radiata*. **A.** Observación superficial de raíz post tratamiento de desinfección. **B.** Corte trasversal de raíz sin evidencia de colonización endófitas, tratamiento T5. **C.** Colonización exitosa de actinobacterias endófitas, se muestra la sobrepoblación de hifas en el tratamiento T2.

La resistencia a la colonización endófitas por parte de *V. radiata*, podría explicarse debido a que se ha reportado que esta planta en presencia de *Streptomyces* sp, induce a una elevada producción de peroxidasa y polifenol oxidasa, en el tejido del frijol mungo; haciendo a su vez, que se incrementen los niveles de contenido fenólico y fenil alanina liasa, en este proceso, se definirá el tipo de interacción del microorganismo con la planta, ayudado también por el quorum sensing aunque los mecanismos aun no son claros [74]. La interacción con las actinobacterias resulta benéfica ya que se ha propuesto como un mecanismo de biocontrol asociación planta-microorganismo contra patógenos,

específicamente hongos, dándose en esta interacción un intercambio de nutrientes y moléculas promotoras del crecimiento vegetal. Así, algunas especies lo hacen desde la rizósfera o colonizando la raíz de manera externa y algunas otras especies como es el caso del presente trabajo *S. flaveolus* o ARI_A20-5 que logran colonizar de manera endófito incrementando los beneficios PGP en la interacción. Ya se ha demostrado también, que las actinobacterias habitan la rizósfera de diferentes plantas en estrecha asociación y que pueden colonizar endófitamente las raíces y los tejidos internos de las plantas sanas [74], esta colonización endófito por actinobacterias no es común (porque suele haber interacciones patogénicas); sin embargo, se ha reportado en algunas especies de los géneros *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Nocardioide*s, *Nocardia*, *Streptosporangium* y *Frankia* [11], actuando como defensa de patógenos, como en el caso de los hongos fitopatógenos, donde se ha demostrado que las actinobacterias disminuyen o eliminan la viabilidad del patógeno y los rangos de emisión de toxinas en la rizósfera [74,80], confiriendo resistencia inducida a las plantas y regulando y mejorando el crecimiento de sus hospederos [51,74].

En el caso de la soya se han reportado pocos estudios de colonización endófito, pero en su mayoría reportan la presencia del género *Streptomyces*, [74,81], también es evidente que no todas las actinobacterias tienen la capacidad de colonizar ciertas plantas, ya que la interacción dependerá mucho de la interacción y comunicación entre la planta y los microorganismos en específico [81]. Se ha reportado también en soya que la presencia de actinobacterias endofíticas, depende del genotipo de la planta, edad y tejido, y al parecer también influye la estación del año [82].

Aun no se tiene claro cómo es que ocurre esta interacción de colonización endófito por actinobacterias, pero lo que sí es consistente son las evidencias de que éstas promueven el crecimiento y salud de la planta confiriendo resistencia inducida, además de fungir como agentes de biocontrol contra patógenos [11,80].

En este estudio se muestra que la colonización endófitica es exitosa en el trigo con estas bacterias en particular, no siento así para el caso de la soya, en donde sólo fue exitosa la colonización en T2, y esto concuerda con los efectos en la promoción de crecimiento vegetal en la soya, ya que fue la que obtuvo los mejores resultados a diferencia de los tratamientos que no tuvieron éxito en la colonización endófitica.

5. Conclusiones

Las cepas de actinobacterias probadas en este estudio mostraron una mejora sobresaliente en la supervivencia microbiana a largo plazo debido a su uso como inoculante en biopelícula en el mineral perlita como vehículo en comparación con las formulaciones generales que usan cultivos planctónicos. Además, la eficiencia del crecimiento de las plantas *Triticum aestivum* y *Vigna radiata* mejoró significativamente cuando se utilizó el inoculante biofilmado en condiciones de invernadero.

El uso de actinobacterias como inoculante sólido en biopelícula está relacionado con el éxito de la interacción beneficiosa planta-microorganismo mostrada por la colonización radicular endofítica y de la rizósfera. Además, asegura su permanencia en la rizósfera por mucho tiempo al mantener las esporas protegidas en el mineral perlita. En el presente estudio, se propone el uso de actinobacterias PGP como biofertilizante sólido en biopelícula utilizando perlita mineral como vehículo, como una alternativa para mejorar la producción de cultivos a largo plazo y asegurar la protección y la salud vegetal debido a sus múltiples beneficios.

Referencias

1. FAO, I. The State of Food Security and Nutrition in the World 2021: Transforming food systems for food security, improved nutrition and affordable healthy diets for all; *The State of Food Security and Nutrition in the World (SOFI)*; FAO: Rome, Italy, 2021; ISBN 978-92-5-134325-8.
2. FAO World Fertilizer Trends and Outlook to 2022. Rome. **2019**.
3. Carvalho, F.P. Agriculture, Pesticides, Food Security and Food Safety. *Environ. Sci. Policy* **2006**, 9, 685–692, doi:10.1016/j.envsci.2006.08.002.
4. Gupta, G.; Snehi, Dr.S.K.; Singh, V. Role of PGPR in Biofilm Formations and Its Importance in Plant Health. In; 2017; pp. 27–42 ISBN 978-1-119-24634-3.
5. Zakeel, M.C.M.; Safeena, M.I.S. Biofilmed Biofertilizer for Sustainable Agriculture. In Plant Health Under Biotic Stress: Volume 2: Microbial Interactions; Ansari, R.A., Mahmood, I., Eds.; *Springer: Singapore*, 2019; pp. 65–82 ISBN 9789811360404.
6. Rana, K.L.; Kour, D.; Yadav, A.N.; Yadav, N.; Saxena, A.K. Chapter 16 - Agriculturally Important Microbial Biofilms: Biodiversity, Ecological Significances, and Biotechnological Applications. In New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Biofilms; Yadav, M.K., Singh, B.P., Eds.; *Elsevier*, 2020; pp. 221–265 ISBN 978-0-444-64279-0.
7. Yadav, A.N.; Singh, J.; Rastegari, A.A.; Yadav, N. Plant Microbiomes for Sustainable Agriculture; *Springer Nature*, 2020; ISBN 978-3-030-38453-1.
8. Ajeng, A.A.; Abdullah, R.; Ling, T.C.; Ismail, S.; Lau, B.F.; Ong, H.C.; Chew, K.W.; Show, P.L.; Chang, J.-S. Bioformulation of Biochar as a Potential Inoculant Carrier for Sustainable Agriculture. *Environ. Technol. Innov.* **2020**, 20, 101168, doi:10.1016/j.eti.2020.101168.
9. Behera, B.; Das, T.K.; Raj, R.; Ghosh, S.; Raza, Md.B.; Sen, S. Microbial Consortia for Sustaining Productivity of Non-Legume Crops: Prospects and Challenges. *Agric. Res.* **2021**, 10, 1–14, doi:10.1007/s40003-020-00482-3.
10. Franco-Correa, M.; Quintana, A.; Duque, C.; Suarez, C.; Rodríguez, M.X.; Barea, J.-M. Evaluation of Actinomycete Strains for Key Traits Related with Plant Growth Promotion and Mycorrhiza Helping Activities. *Appl. Soil Ecol.* **2010**, 45, 209–217, doi:10.1016/j.apsoil.2010.04.007.
11. Govindasamy, V.; Franco, C.M.M.; Gupta, V.V.S.R. Endophytic Actinobacteria: Diversity and Ecology. In Advances in Endophytic Research; Verma, V.C., Gange, A.C., Eds.; *Springer India: New Delhi*, 2014; pp. 27–59 ISBN 978-81-322-1575-2.
12. Solanki, M.K.; Malviya, M.K.; Wang, Z. Actinomycetes Bio-Inoculants: A Modern Prospectus for Plant Disease Management. In Plant Growth Promoting Actinobacteria: A New Avenue for Enhancing the Productivity and Soil Fertility of Grain Legumes; Subramaniam, G., Arumugam, S., Rajendran, V., Eds.; *Springer: Singapore*, 2016; pp. 63–81 ISBN 978-981-10-0707-1.
13. Alonso, A.N.; Pomposiello, P.J.; Leschine, S.B. Biofilm Formation in the Life Cycle of the Cellulolytic Actinomycete *Thermobifida Fusca*. *Biofilms* **2008**, 1–11, doi:10.1017/S1479050508002238.
14. Bhatti, A.A.; Haq, S.; Bhat, R.A. Actinomycetes Benefaction Role in Soil and Plant Health. *Microb. Pathog.* **2017**, 111, 458–467, doi:10.1016/j.micpath.2017.09.036.

15. Amaresan, N.; Kumar, K.; Naik, J.H.; Bapatla, K.G.; Mishra, R.K. Chapter 8 - Streptomyces in Plant Growth Promotion: Mechanisms and Role. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*; Singh, B.P., Gupta, V.K., Passari, A.K., Eds.; Elsevier, 2018; pp. 125–135 ISBN 978-0-444-63994-3.
16. Prasanna, R.; Triveni, S.; Bidyarani, N.; Babu, S.; Yadav, K.; Adak, A.; Khetarpal, S.; Pal, M.; Shivay, Y.S.; Saxena, A.K. Evaluating the Efficacy of Cyanobacterial Formulations and Biofilmed Inoculants for Leguminous Crops. *Arch. Agron. Soil Sci.* **2014**, 60, 349–366, doi:10.1080/03650340.2013.792407.
17. Sharma, D.; Gahtyari, N.C.; Chhabra, R.; Kumar, D. Role of Microbes in Improving Plant Growth and Soil Health for Sustainable Agriculture. In *Advances in Plant Microbiome and Sustainable Agriculture: Diversity and Biotechnological Applications*; Yadav, A.N., Rastegari, A.A., Yadav, N., Kour, D., Eds.; Microorganisms for Sustainability; Springer: Singapore, 2020; pp. 207–256 ISBN 9789811532085.
18. Seneviratne, G.; Kecskés, M.; Kennedy, I. Biofilmed Biofertilisers: Novel Inoculants for Efficient Nutrient Use in Plants. *ACIAR Proc* **2008**, 130.
19. Seneviratne, G.; Weerasekara, M.L.M.A.W.; Seneviratne, K.A.C.N.; Zavahir, J.S.; Kecskés, M.L.; Kennedy, I.R. Importance of Biofilm Formation in Plant Growth Promoting Rhizobacterial Action. In *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*; Maheshwari, D.K., Ed.; Microbiology Monographs; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2010; Vol. 18, pp. 81–95 ISBN 978-3-642-13611-5.
20. Franco-Correa, M. Utilización de Los Actinomicetos En Procesos de Biofertilización. *Rev. Peru. Biol.* **2009**, 16, 239–242.
21. Palaniyandi, S.A.; Yang, S.H.; Zhang, L.; Suh, J.-W. Effects of Actinobacteria on Plant Disease Suppression and Growth Promotion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, 97, 9621–9636, doi:10.1007/s00253-013-5206-1.
22. Lasudee, K.; Tokuyama, S.; Lumyong, S.; Pathom-aree, W. Actinobacteria Associated With Arbuscular Mycorrhizal Funneliformis Mosseae Spores, Taxonomic Characterization and Their Beneficial Traits to Plants: Evidence Obtained From Mung Bean (*Vigna Radiata*) and Thai Jasmine Rice (*Oryza Sativa*). *Front. Microbiol.* **2018**, 9.
23. Costerton, J.W.; Geesey, G.G.; Cheng, K.-J. How Bacteria Stick. *Sci. Am.* **1978**, 238, 86–95.
24. Flemming, H.-C.; Leis, A. Extracellular Polymeric Substances - the Construction Material of Biofilms - Selected Proceedings of the 1st IWA International Conference on Microbial Extracellular Polymeric Substances, Held in Mulheim, Germany, 18-20 September 2000 - Preface. *Water Sci. Technol.* **2001**, 43, VII–IX.
25. Flemming, H.-C.; Wingender, J. The Biofilm Matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, 8, 623–633, doi:10.1038/nrmicro2415.
26. Bhattacharya, D.C. Biofilmed Biofertilizer: Promising Technology for Tomorrow. **2015**, 4.
27. Hettiarachchi, R.P.; Seneviratne, G.; Jayakody, A.N.; De Silva, E.; Gunatilake, P.; Edirimanna, V.; Thewarapperuma, A.; Chandrasiri, J.A.S.; Malawaraarachchi, G.C.; Siriwardana, N.S. Effect of Biofilmed Biofertilizer on Plant Growth and Nutrient Uptake of Hevea Brasiliensis Nursery Plants at Field Condition. *J. Rubber Res. Inst. Sri Lanka* **2018**, 98.
28. Buddhika, U.; Athauda, A.; Seneviratne, G.; Kulasooriya, S.; Abayasekara, C. Emergence of Diverse Microbes on Application of Biofilmed Biofertilizers to a Maize Growing Soil. *Ceylon J. Sci. Biol. Sci.* **2014**, 42, 87, doi:10.4038/cjsbs.v42i2.6612.

29. Seneviratne, G.; Jayasinghearachchi, H.S. A Rhizobial Biofilm with Nitrogenase Activity Alters Nutrient Availability in a Soil. *Soil Biol. Biochem.* **2005**, *37*, 1975–1978, doi:10.1016/j.soilbio.2005.02.027.
30. Nadell, C.D.; Xavier, J.B.; Foster, K.R. The Sociobiology of Biofilms. *FEMS Microbiol. Rev.* **2009**, *33*, 206–224, doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00150.x.
31. El Othmany, R.; Zahir, H.; Ellouali, M.; Latrache, H. Current Understanding on Adhesion and Biofilm Development in Actinobacteria. *Int. J. Microbiol.* **2021**.
32. Seneviratne, G.; Weerasekara, M.L.M.A.W.; Seneviratne, K.A.C.N.; Zavahir, J.S.; Kecskés, M.L.; Kennedy, I.R. Importance of Biofilm Formation in Plant Growth Promoting Rhizobacterial Action. In *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*; Maheshwari, D.K., Ed.; *Microbiology Monographs*; Springer: Berlin, Heidelberg, 2011; pp. 81–95 ISBN 978-3-642-13612-2.
33. Seneviratne, G.; Jayasinghearachchi, H.S. Mycelial Colonization by Bradyrhizobia and Azorhizobia. *J. Biosci.* **2003**, *28*, 243–247, doi:10.1007/BF02706224.
34. Seneviratne, G.; Zavahir, J.S.; Bandara, W.M.M.S.; Weerasekara, M.L.M.A.W. Fungal-Bacterial Biofilms: Their Development for Novel Biotechnological Applications. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *24*, 739, doi:10.1007/s11274-007-9539-8.
35. Adak, A.; Prasanna, R.; Babu, S.; Bidiarani, N.; Verma, S.; Pal, M.; Shivay, Y.S.; Nain, L. Micronutrient Enrichment Mediated by Plant-Microbe Interactions and Rice Cultivation Practices. *J. Plant Nutr.* **2016**, *39*, 1216–1232, doi:10.1080/01904167.2016.1148723.
36. Tennakoon, P.L.K.; Rajapaksha, R.M.C.P.; Hettiarachchi, L.S.K. Tea Yield Maintained in PGPR Inoculated Field Plants despite Significant Reduction in Fertilizer Application. *Rhizosphere* **2019**, *10*, 100146, doi:10.1016/j.rhisph.2019.100146.
37. Malusá, E.; Sas-Paszt, L.; Ciesielska, J. Technologies for Beneficial Microorganisms Inocula Used as Biofertilizers Available online: <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2012/491206/> (accessed on 28 October 2020).
38. ROUGHLEY, R.J. THE PREPARATION AND USE OF LEGUME SEED INOCULANTS. *Plant Soil* **1970**, *32*, 675–701.
39. Khavazi, K.; Rejali, F.; Seguin, P.; Miransari, M. Effects of Carrier, Sterilisation Method, and Incubation on Survival of Bradyrhizobium Japonicum in Soybean (Glycine Max L.) Inoculants. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *41*, 780–784, doi:10.1016/j.enzmictec.2007.06.011.
40. Albareda, M.; Rodríguez-Navarro, D.N.; Camacho, M.; Temprano, F.J. Alternatives to Peat as a Carrier for Rhizobia Inoculants: Solid and Liquid Formulations. *Soil Biol. Biochem.* **2008**, *40*, 2771–2779, doi:10.1016/j.soilbio.2008.07.021.
41. Sun, D.; Hale, L.; Crowley, D. Nutrient Supplementation of Pinewood Biochar for Use as a Bacterial Inoculum Carrier. *Biol. Fertil. Soils* **2016**, *52*, 515–522, doi:10.1007/s00374-016-1093-9.
42. Anderson, C.R.; Condon, L.M.; Clough, T.J.; Fiers, M.; Stewart, A.; Hill, R.A.; Sherlock, R.R. Biochar Induced Soil Microbial Community Change: Implications for Biogeochemical Cycling of Carbon, Nitrogen and Phosphorus. *Pedobiol. - J. Soil Ecol.* **2011**, *5–6*, 309–320, doi:10.1016/j.pedobi.2011.07.005.
43. Spokas, K.A.; Cantrell, K.B.; Novak, J.M.; Archer, D.W.; Ippolito, J.A.; Collins, H.P.; Boateng, A.A.; Lima, I.M.; Lamb, M.C.; McAloon, A.J.; et al. Biochar: A Synthesis of Its Agronomic Impact beyond Carbon Sequestration. *J. Environ. Qual.* **2012**, *41*, 973–989, doi:10.2134/jeq2011.0069.

44. Quilliam, R.S.; Glanville, H.C.; Wade, S.C.; Jones, D.L. Life in the 'Charosphere' – Does Biochar in Agricultural Soil Provide a Significant Habitat for Microorganisms? *Soil Biol. Biochem.* **2013**, *65*, 287–293, doi:10.1016/j.soilbio.2013.06.004.
45. Hale, L.; Luth, M.; Kenney, R.; Crowley, D. Evaluation of Pinewood Biochar as a Carrier of Bacterial Strain *Enterobacter Cloacae* UW5 for Soil Inoculation. *Appl. Soil Ecol.* **2014**, *84*, 192–199, doi:10.1016/j.apsoil.2014.08.001.
46. Hale, L.; Luth, M.; Crowley, D. Biochar Characteristics Relate to Its Utility as an Alternative Soil Inoculum Carrier to Peat and Vermiculite. *Soil Biol. Biochem.* **2015**, *81*, 228–235, doi:10.1016/j.soilbio.2014.11.023.
47. Gul, S.; Whalen, J.K.; Thomas, B.W.; Sachdeva, V.; Deng, H. Physico-Chemical Properties and Microbial Responses in Biochar-Amended Soils: Mechanisms and Future Directions. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2015**, *206*, 46–59, doi:10.1016/j.agee.2015.03.015.
48. Ok, Y.S.; Uchimiya, S.M.; Chang, S.X.; Bolan, N. Biochar: Production, Characterization, and Applications; *CRC Press*, 2015; ISBN 978-1-4822-4230-0.
49. Anicua Sánchez, R.; Gutiérrez Castorena, M. del C.; Sánchez García, P.; Ortiz Solorio, C.; Volke Halle, V.H.; Rubiños Panta, J.E. Particule Size and Micromorphological Relation on Physical Properties of Perlite and Zeolite. *Agric. Téc. En México* **2009**, *35*, 147–156.
50. Kloster, N.S.; Azcarate, M.P.; Babinec, F.J.; Bono, A. Comparación de Técnicas de Medición Del PH Del Suelo: PH En Pasta de Saturación y En Relación Suelo: Agua 1: 2, 5. In Proceedings of the XXI Congreso argentino de Ciencia del Suelo. Semiarido un desafío para la ciencia del suelo; 2008; Vol. 13.
51. Coombs, J.T.; Franco, C.M.M. Isolation and Identification of Actinobacteria from Surface-Sterilized Wheat Roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 5603–5608, doi:10.1128/AEM.69.9.5603-5608.2003.
52. Janssen, P.H.; Yates, P.S.; Grinton, B.E.; Taylor, P.M.; Sait, M. Improved Culturability of Soil Bacteria and Isolation in Pure Culture of Novel Members of the Divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobia. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, doi:10.1128/AEM.68.5.2391-2396.2002.
53. Hamid Rajabi; Mojgan Hadi Moleh; Tirto Prakoso; Negin Ghaemi; Parthasarathi Mandal; Amanda Lea-Langton; Majid Sedighi Competitive Adsorption of Multicomponent Volatile Organic Compounds on Biochar. *Chemosphere* **2021**, *283*, 131288-, doi:10.1016/j.chemosphere.2021.131288.
54. Dataset on the Effect of Hardwood Biochar on Soil Gravimetric Moisture Content and Nitrate Dynamics at Different Soil Depths with FTIR Analysis of Fresh and Aged Biochar. Available online: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20203444479> (accessed on 26 July 2022).
55. Zolfi Bavariani, M.; Ronaghi, A.; Ghasemi, R. Influence of Pyrolysis Temperatures on FTIR Analysis, Nutrient Bioavailability, and Agricultural Use of Poultry Manure Biochars. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **2019**, *50*, 402–411, doi:10.1080/00103624.2018.1563101.
56. Alteration of Biochar Carbon Chemistry during Soil Incubations: SR-FTIR and NEXAFS Investigation - Mukome - 2014 - *Soil Science Society of America Journal* - Wiley Online Library Available online: <https://access.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2136/sssaj2014.05.0206> (accessed on 26 July 2022).

57. Polkade, A.V.; Mantri, S.S.; Patwekar, U.J.; Jangid, K. Quorum Sensing: An Under-Explored Phenomenon in the Phylum Actinobacteria. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, doi:10.3389/fmicb.2016.00131.
58. Srinivas, V.; Gopalakrishnan, S.; Kamidi, J.P.; Chander, G. Effect Of Plant Growth-Promoting Streptomyces Sp. On Plant Growth And Yield Of Tomato And Chilli. *Andhra Pradesh J Agril Sci* **2020**, 65–70.
59. Ferrer, C.M.; Olivete, E.; Orias, S.L.; Rocas, M.R.; Juan, S.; Dungca, J.Z.; Mahboob, T.; Barusrux, S.; Nissapatorn, V. A Review on Streptomyces Spp. as Plant-Growth Promoting Bacteria (PGPB). *Asian J Pharmacogn* **2018**, *2*, 32–40.
60. Naorungrote, S.; Chunglok, W.; Lertcanawanichakul, M.; Bangrak, P. Actinomycetes Producing Anti-Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus from Soil Samples in Nakhon Si Thammarat. *Walailak J. Sci. Technol. WJST* **2011**, *8*, 131–138.
61. Bologna, C.G.; Ursu, O.; Oprea, T.I.; Melançon, C.E.; Tegos, G.P. Emerging Trends in the Discovery of Natural Product Antibacterials. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2013**, *13*, 678–687, doi:10.1016/j.coph.2013.07.002.
62. Hu, Y.; Qi, Y.; Stumpf, S.D.; D'Alessandro, J.M.; Blodgett, J.A.V. Bioinformatic and Functional Evaluation of Actinobacterial Piperazate Metabolism. *ACS Chem. Biol.* **2019**, *14*, 696–703, doi:10.1021/acscchembio.8b01086.
63. Raubitschek, F.; Acker, R.F.; Waksman, S.A. Production of an Antifungal Agent of the Fungicidin Type by Streptomyces Aureus. *Antibiot. Amp Chemother.* **1952**, *2*, 179–183.
64. Wang, W.; Feng, M.; Li, X.; Chen, F.; Zhang, Z.; Yang, W.; Shao, C.; Tao, L.; Zhang, Y. Antibacterial Activity of Aureonuclemycin Produced by Streptomyces Aureus Strain SPRI-371. *Molecules* **2022**, *27*, 5041, doi:10.3390/molecules27155041.
65. Chen, S.; Lai, K.; Li, Y.; Hu, M.; Zhang, Y.; Zeng, Y. Biodegradation of Deltamethrin and Its Hydrolysis Product 3-Phenoxybenzaldehyde by a Newly Isolated Streptomyces Aureus Strain HP-S-01. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *90*, 1471–1483, doi:10.1007/s00253-011-3136-3.
66. Chen, S.; Luo, J.; Hu, M.; Lai, K.; Geng, P.; Huang, H. Enhancement of Cypermethrin Degradation by a Coculture of Bacillus Cereus ZH-3 and Streptomyces Aureus HP-S-01. *Bioresour. Technol.* **2012**, Complete, 97–104, doi:10.1016/j.biortech.2012.01.106.
67. Jog, R.; Pandya, M.; Nareshkumar, G.; Rajkumar, S. Mechanism of Phosphate Solubilization and Antifungal Activity of Streptomyces Spp. Isolated from Wheat Roots and Rhizosphere and Their Application in Improving Plant Growth. *Microbiology*, **2014**, *160*, 778–788, doi:10.1099/mic.0.074146-0.
68. Panneerselvam, P.; Selvakumar, G.; Ganeshamurthy, A.N.; Mitra, D.; Senapati, A. Enhancing Pomegranate (Punica Granatum L.) Plant Health through the Intervention of a Streptomyces Consortium. *Biocontrol Sci. Technol.* **2021**, *31*, 430–442, doi:10.1080/09583157.2020.1859095.
69. Boubekri, K.; Soumare, A.; Mardad, I.; Lyamlouli, K.; Hafidi, M.; Ouhdouch, Y.; Kouisni, L. The Screening of Potassium- and Phosphate-Solubilizing Actinobacteria and the Assessment of Their Ability to Promote Wheat Growth Parameters. *Microorganisms* **2021**, *9*, 470, doi:10.3390/microorganisms9030470.
70. Patten, C.L.; Glick, B.R. Role of Pseudomonas Putida Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 3795–3801, doi:10.1128/AEM.68.8.3795-3801.2002.
71. Viaene, T.; Langendries, S.; Beirinckx, S.; Maes, M.; Goormachtig, S. Streptomyces as a Plant's Best Friend? *FEMS Microbiol. Ecol.* **2016**, 92.

72. Wahyudi, A.T.; Priyanto, J.A.; Afrista, R.; Kurniati, D.; Astuti, R.I.; Akhdiya, A. Plant Growth Promoting Activity of Actinomycetes Isolated from Soybean Rhizosphere. Online *J Biol Sci* **2019**, *19*, 1–8.
73. Horstmann, J.L.; Dias, M.P.; Ortolan, F.; Medina-Silva, R.; Astarita, L.V.; Santarém, E.R. Streptomyces Sp. CLV45 from Fabaceae Rhizosphere Benefits Growth of Soybean Plants. *Braz. J. Microbiol.* **2020**, *51*, 1861–1871.
74. Adhilakshmi, M.; Paranidharan, V.; Balachandar, D.; Ganesamurthy, K.; Velazhahan, R. Suppression of Root Rot of Mung Bean (*Vigna Radiata* L.) by Streptomyces Sp. Is Associated with Induction of Peroxidase and Polyphenol Oxidase. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* **2014**, *47*, 571–583, doi:10.1080/03235408.2013.814826.
75. Daza, A.; Santamaría, C.; Rodríguez-Navarro, D.N.; Camacho, M.; Orive, R.; Temprano, F. Perlite as a Carrier for Bacterial Inoculants. *Soil Biol. Biochem.* **2000**, *32*, 567–572, doi:10.1016/S0038-0717(99)00185-6.
76. Anderson, G.G.; O'Toole, G.A. Innate and Induced Resistance Mechanisms of Bacterial Biofilms. In *Bacterial Biofilms*; Romeo, T., Ed.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2008; pp. 85–105 ISBN 978-3-540-75418-3.
77. Jeffery, S.; Verheijen, F.G.A.; Velde, M. van der; Bastos, A.C. A Quantitative Review of the Effects of Biochar Application to Soils on Crop Productivity Using Meta-Analysis. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2011**, *1*, 175–187, doi:10.1016/j.agee.2011.08.015.
78. Biederman, L.A.; Harpole, W.S. Biochar and Its Effects on Plant Productivity and Nutrient Cycling: A Meta-Analysis. *GCB Bioenergy* **2013**, *5*, 202–214, doi:10.1111/gcbb.12037.
79. Filippova, S.N.; Surgucheva, N.A.; Gal'chenko, V.F. Long-Term Storage of Collection Cultures of Actinobacteria. *Microbiology* **2012**, *81*, 630–637, doi:10.1134/S0026261712050062.
80. Zucchi, T. d.; De Moraes, L. a. b.; De Melo, I. s. Streptomyces Sp. ASBV-1 Reduces Aflatoxin Accumulation by Aspergillus Parasiticus in Peanut Grains. *J. Appl. Microbiol.* **2008**, *105*, 2153–2160, doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03940.x.
81. Kizuka, M.; Enokita, R.; Takahashi, K.; Okamoto, Y.; Otsuka, T.; Shigematsu, Y.; Inoue, Y.; Okazaki, T. Studies on Actinomycetes Isolated from Plant Leaves. *日本放線菌学会誌* **1998**, *12*, 89–91, doi:10.3209/saj.12_89.
82. Swarnalakshmi, K.; Senthilkumar, M.; Ramakrishnan, B. Endophytic Actinobacteria: Nitrogen Fixation, Phytohormone Production, and Antibiosis. In *Plant Growth Promoting Actinobacteria: A New Avenue for Enhancing the Productivity and Soil Fertility of Grain Legumes*; Subramaniam, G., Arumugam, S., Rajendran, V., Eds.; Springer: Singapore, 2016; pp. 123–145 ISBN 978-981-10-0707-1.