

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



**Producción de Auxinas por Bacterias Solubilizadoras de Fósforo**

Por:

**ELOY CUEVAS GONZÁLEZ**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA**

Saltillo, Coahuila, México

Febrero del 2013

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

**Producción de Auxinas por Bacterias Solubilizadoras de Fósforo**

Por:

**ELOY CUEVAS GONZÁLEZ**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA**

Aprobada

Dr. Edmundo Mario Rodríguez Campos  
Asesor Principal

Dr. Manuel De La Rosa Ibarra  
Coasesor

Dra. Erika Vázquez Guzmán  
Coasesor

Dr. Leobardo Bañuelos Herrera  
Coordinador de la División de Agronomía

Coordinación  
División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Febrero del 2013

## **Agradecimientos**

**A Dios** nuestro señor por seguir brindándome vida y fuerzas para continuar con cada sueño, así como haberme iluminado en mi corta vida y por dado la oportunidad de vivir cada uno de los instantes, buenos y malos, que marcaron mi vida.

**A la Dra. Erika Vázquez Guzmán** por su gran ayuda, paciencia, preocupación y comprensión.

**Al Dr. Manuel de la Rosa Ibarra** por aceptarme como uno más de sus tesis, así como su apoyo y disponibilidad para poder realizar este trabajo ya que sin su ayuda no hubiese sido posible terminarlo.

**Al Dr. Edmundo Rodríguez Campos** por darme la oportunidad de formar parte del proyecto y asesorar este proyecto de tesis.

**A mis Padres** por darme su apoyo incondicional durante toda mi vida, por siempre procurar mi bienestar y por haber confiado en mí para ver culminada mi preparación profesional.

**A mis Hermanos** por nunca dejarme solo aunque hubiera distancia de por medio, por estar presentes en cada una de las adversidades; por darme fuerza y valor.

**A mi Princesa**, por estar ahí cuando más lo necesite, por creer en mí y hacer que creyera en mi mismo; por ver en mi lo que nadie más, por todo eso y más.

**A mis Amigos**, los que son, los que fueron, los recientes, los antiguos, a todos y cada uno de ellos y no hace falta que sean nombrados o enlistados en una página, porque un papel no resume los momentos, las dificultades, las alegrías, las discusiones o los enredos en los que estuvieron presentes; en verdad gracias.

**A mis compañeros de carrera** que de uno u otro modo estuvieron siempre presentes como participes o como testigos de mi desarrollo.

## **Dedicatoria**

### ***A mis padres***

**A mi Padre** el Sr. Pablo Cuevas Castellanos, por ser el hombre que nos has dado todo, sacrificándose a sí mismo, con único afán de sacar a la familia adelante, por ser mi ejemplo a seguir con muchos valores y virtudes, demostrando siempre que con voluntad se puede hacer hasta lo que parece imposible. Por ser la persona a quien más admiro, porque sin usted no habría llegado hasta aquí, gracias papá.

**A mi Madre**, Sra. Nieves González Zarate, por procurarme siempre, por estar conmigo en las buenas y en las malas durante toda mi vida, por escucharme, por estar ahí, y en su momento también las ausencias, por formarme como un hombre con principios y valores.

**A mis Hermanos:** Víctor, Esperanza (mi segunda madre, quien me lleno de comprensión, cariño y cuidados), Alejandro, Daniel, Mariela, Francisco Eduardo, Aimé y Raymundo, gracias por su apoyo incondicional, por estar siempre conmigo, entenderme en mis malos ratos y aunque han existido discusiones y diferencias siempre daré gracias a Dios por tenerlos como hermanos.

**A mi Sobrina** Alison Arleth Cuevas González por su ternura y formar parte muy importante de mis alegrías.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>3</b>
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
<b>3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>3</b>
<b>4. REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>4</b>
4.1 IMPORTANCIA DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO .....	4
4.1.1 Acido indolacético.....	5
4.2 RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL.....	9
4.2.1 Competencia en la Rizósfera.....	11
4.2.1.1 Acción bioprotectante de las PGPB .....	11
4.2.2 Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal .....	12
4.2.2.1 Mecanismos de acción directa.....	12
4.2.2.2 Mecanismos de acción indirecta.....	15
4.2.3 Biosíntesis de reguladores del crecimiento vegetal.....	15
4.2.3.1 Biosíntesis de auxinas por bacterias.....	16
4.3 MÉTODOS DE DETECCIÓN DE REGULADORES DE CRECIMIENTO VEGETAL.....	17
4.3.1 Cromatografía en Capa fina (TLC) .....	17
4.3.2 Cromatografía líquida de alta presión (HPLC).....	18
4.4 PRODUCCIÓN DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO .....	19
4.4.1 Modo de Acción de las auxinas en la planta.....	21
4.4.1.1 Efectos en la Planta .....	21
4.5 BACTERIAS COMO BIOFERTILIZANTES .....	22
4.5.1 Biofertilizantes comerciales con distribución en México a base de bacterias promotoras del crecimiento.....	24
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
5.1 REACTIVACIÓN Y OBTENCIÓN DEL INÓCULO PARA LA FERMENTACIÓN.....	27
5.2 PREPARACIÓN DE LOS MATRACES PARA LA FERMENTACIÓN .....	28
5.3 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO INDOLACÉTICO .....	29
5.4 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC).....	30

<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>33</b>
6.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	33
6.2 FERMENTACIÓN .....	36
6.3 PRODUCCIÓN DE ÁCIDO INDOLACÉTICO .....	37
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>42</b>
<b>8. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>42</b>
<b>9. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>43</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efectos de los reguladores de crecimiento en las plantas.....	5
Tabla 2. Cepas probadas para determinar la producción de ácido indolacético ...	26
Tabla 3. UFC por cepa en cada uno de los medios utilizados. ....	35
Tabla 4. Cepas probadas en cada uno de los seis ensayos realizados. ....	38
Tabla 5. Cepas con Rf de los indoles encontrados diferentes al AIA .....	41

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de: a) Ácido indolacético, b) Triptófano. ....	6
Figura 2. Rutas metabólicas propuestas para la biosíntesis del ácido indol acético por las plantas, propuestas por Mashiguchia <i>et al.</i> , (2011), las flechas gruesas indican las funciones propuestas de las enzimas principales involucradas. TAA1, aminotransferasa del triptófano; YUC, flavin monooxigenasa; AMI1, amidasa 1 de arabidopsis; Trp, triptófano; TAM, triptamina; IPA, ácido 3-indolpirúvico; IAAld, Indol 3-acetaldehído; IAM, indol 3-acetamida; IAN, indol 3-acetonitrilo; IAOx, indol 3-acetaldoxima. ....	7
Figura 3. Respuesta en el crecimiento de los órganos de las plantas a diferentes concentraciones de auxinas. ....	8
Figura 4. Rutas de síntesis del ácido indolacético en microorganismos (tomada de Yang, 2007). ....	9
Figura 5. Extracción con acetato de etilo utilizando embudo de separación, que posteriormente se colocó en tubos cónicos de 50 mL para después ser evaporado hasta sequedad por arrastre con aire o nitrógeno. ....	29
Figura 6. a) Placa de TLC de sílica gel marcada con los puntos y las distancias correspondientes entre ellos para realizar la cromatografía. b) Placa de sílica gel sometida a fase móvil. ....	30
Figura 7. Aspersión con reactivo de Ehmann para revelar la placa de sílica gel. .	31
Figura 8. Etapas 1 y 2 de la reacción <i>p</i> -dimetil aminobenzaldehído+indol. Los grupos CH <sub>2</sub> en cualquiera de las formas pirrólicas permiten la condensación con el aldehído en un método en dos etapas que se producen inmediatamente cuando se emplea el reactivo <i>p</i> -dimetilamino-benzaldehído en HCl concentrado. ....	32
Figura 9. a) Placa de MA donde se muestran las colonias aisladas de una de las cepas probadas, b) Tubos de ensayo donde se muestran los cultivos utilizados para inocular los matraces con medio CCM. ....	33
Gráfica 1. Análisis del efecto de la cantidad de inóculo inicial en el crecimiento de las bacterias en el medio de fermentación. ....	34
Gráfica 2. Relación entre el pH y el número de células en los matraces después de la fermentación. ....	36
Figura 10. a) Cromatograma en capa fina, corrida en fase acetato de etilo: cloroformo: ácido acético (55:35:10) y revelada con el reactivo de Ehmann, las muestras son de izquierda a derecha ácido indolacético, triptófano y ácido naftalenacético. b) Cromatograma donde se muestra la reacción positiva del	

reactivo de Ehmann a la presencia de índoles en la cepa CBLA-221 con un Rf de 0.79 al igual que el AIA. .... **37**

Figura 11. Cepas que resultaron positivas en la producción de AIA, la línea roja marca el Rf de 0.79 para el ácido indolacético. .... **39**

Figura 12. Cromatograma de cepas que mostraron presencia de indoles diferentes al AIA. .... **40**

## RESUMEN

En el presente trabajo, realizado en el laboratorio de Agrobiotecnología del Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, se evaluaron 36 bacterias solubilizadoras de fósforo para estudiar su capacidad de síntesis de Ácido Indol Acético. Se utilizó el medio básico CCM para el desarrollo de las bacterias y cromatografía en capa fina como técnica cualitativa de detección; la fase móvil utilizada fue acetato de etilo: cloroformo: ácido acético (55:35:10) y las placas se revelaron con el reactivo de Ehmman. En algunas de las cepas probadas el número de bacterias fue menor al esperado ya que no se adaptaron bien al medio de fermentación, sin embargo, la cantidad bastó para la realización de los ensayos correspondientes.

El AIA tuvo una movilidad relativa (Rf) de 0.79 en este sistema. 13 cepas (36%) resultaron positivas para la producción de ácido indolacético. Estas cepas solubilizadoras de fósforo, que además tienen la capacidad de producir AIA son buenas candidatas para un producto biofertilizante. Aunque las cepas CBLA-104 y 223 son enterobacterias y por lo tanto no pueden ser utilizadas directamente como biofertilizantes, no se desecha la posibilidad del uso del extracto del medio de fermentación de estas cepas como un producto promotor del crecimiento vegetal.

**Palabras clave:** Bacterias, Cepas, Cromatografía, Ácido indolacético, Biofertilizante

## 1. INTRODUCCIÓN

Los fitorreguladores son sustancias orgánicas sintetizadas por las plantas, que tienen la capacidad de modificar los procesos fisiológicos en concentraciones mucho más bajas que los nutrientes o las vitaminas, se clasifican en cinco grandes grupos que son: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno y los inhibidores o retardantes del crecimiento (Weaver, 1982). Estos fitorreguladores son utilizados en la agricultura para mejorar las cosechas y para manipular algunas respuestas fisiológicas de las plantas. La eficiencia de estas fitohormonas de origen biológico, ha sido comprobada en diversos estudios en los que se ha demostrado que su aplicación produce un aumento en el rendimiento y calidad de las cosechas (Frankenberger & Arshad, 1995).

Estos compuestos reguladores, no solo pueden ser aplicados por el hombre sino que también se ha reportado su síntesis por los microorganismos de la rizósfera, siendo el ácido indolacético la auxina más común, aunque también se han encontrado ácido naftalenacético y ácido indolbutírico. Los microorganismos de la rizósfera tienen relaciones con su planta hospedera que pueden ser de daño o beneficio, entre las relaciones dañinas se puede mencionar a microorganismos que causan la pudrición de la raíz y entre las relaciones benéficas más importantes están aquellas en las que los microorganismos ayudan a fijar o solubilizar nutrientes que la planta pueda aprovechar. Ejemplos de estas relaciones las presentan los microorganismos de los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, etc. (Patten & Glick, 1996).

Existen cepas de bacterias que son capaces de aumentar el desarrollo de las raíces y el rendimiento de diferentes especies vegetales. Existe una cepa de *Enterobacteria* que es promotora del crecimiento de las plantas (PGPB), que fue aislada de la rizósfera de plantas de trigo, es capaz de fijar N<sub>2</sub> y producir auxinas y citocininas (Kampfer *et al.*, 2005). Castillo *et al.*, (2005) trabajaron con *Rhizobium sp* en caldos de fermentación para cuantificar el contenido de auxinas utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

Por otro lado, el Nitrógeno y el Fósforo son los dos nutrientes más limitantes para el desarrollo de las plantas, por lo que el estudio de microorganismos que ayuden a la asimilación de estos nutrientes es importante y más en esta época donde el uso indiscriminado de productos químicos y fertilizantes, ha ocasionado un desequilibrio de la microbiota nativa que cumple funciones muy importantes con las plantas cultivadas, provocando con esto bajos rendimientos en los cultivos.

Por lo anterior, la síntesis microbiológica de fitohormonas puede constituir una alternativa viable en el contexto de una agricultura ecológica sostenible ya que la aplicación de caldos de fermentación que contengan estos productos, reducirá el impacto ambiental y su obtención a escala industrial resultaría económicamente más atractiva. En el Laboratorio de Agrobiotecnología del Departamento de Ciencias Básicas de esta Universidad, se está trabajando en la búsqueda y desarrollo de un biofertilizante a base de bacterias solubilizadoras de fósforo y se han encontrado hasta la fecha nueve cepas del género *Pseudomonas* y *Acinetobacter* que han demostrado su eficiencia en la solubilización del fósforo *in vitro* y en la asimilación del fósforo por plantas de tomate.

## **2. OBJETIVO GENERAL**

Demostrar que las bacterias solubilizadoras de fósforo aisladas de la rizósfera de plantas tienen la capacidad de producir sustancias que promueven el desarrollo de las raíces.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Establecer el protocolo para el ensayo de producción de auxinas *in vitro*.
- Establecer el protocolo para la determinación por TLC de auxinas.
- Determinar la capacidad de producción de ácido indolacético por cepas de BSF en fermentaciones *in vitro*.

## **3. HIPÓTESIS**

Algunas bacterias solubilizadoras de fósforo tienen además la capacidad de producir reguladores de crecimiento como el ácido indolacético.

## 4. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1 IMPORTANCIA DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO

Los reguladores de crecimiento son aquellos compuestos que afectan diversos procesos en las plantas, cuando son producidos de manera endógena en las plantas se les denomina hormonas vegetales o fitohormonas, cuando se aplican de manera exógena para producir un efecto en el desarrollo de las plantas se denominan reguladores de crecimiento, este último término también se utiliza cuando las hormonas de las plantas son producidas por microorganismos de la rizósfera (Armenta *et al.*, 2010), los reguladores de crecimiento se clasifican dependiendo de su efecto en las plantas como promotores (auxinas, giberelinas, citocininas), inhibidores (ácido abscísico y su precursor xantosina), etileno y otras sustancias reguladoras; estos compuestos existen usualmente en las plantas y cultivos a concentraciones menores a 1  $\mu\text{M}$  y se encuentran en las partes de la planta creciendo activamente, las hojas jóvenes y las yemas apicales son particularmente ricas en auxinas, mientras que las raíces jóvenes tienen un alto contenido de giberelinas y citocininas, las frutas y las semillas son generalmente ricas en todas las hormonas (Naqvi, 2002). En la tabla 1 se muestran algunos ejemplos de reguladores de crecimiento y su efecto.

Muchas bacterias que se desarrollan en el suelo de la rizósfera, dentro o sobre las raíces de las plantas tienen efecto en el desarrollo de dichas plantas y son conocidas con el nombre genérico de bacterias promotoras del crecimiento o PGPB por sus siglas en inglés. La investigación en este campo se ha incrementado desde que Kloepper y colaboradores acuñaron el término en los 70's (Kloepper y Schroth, 1978), los mecanismos por los cuales ejercen sus efectos son muy amplios y van desde la fijación de nitrógeno, aumento en la disponibilidad de nutrientes, modificación de la morfología de las raíces, hasta la producción de sustancias reguladoras del crecimiento. La investigación de algunos mecanismos responsables del incremento en la asimilación de nutrientes se ha incrementado recientemente debido al interés de utilizar este tipo de microorganismos como biofertilizantes.

**Tabla 1.** Efectos de los reguladores de crecimiento en las plantas.

Tipo de regulador de crecimiento	Efecto en la planta	Ejemplo
Auxinas	Inducen la producción de raíces adventicias y el enraizamiento de esquejes, inducen el crecimiento de tallos y coleóptilos, regulan la dominancia apical	Acido Indolacético Acido indolbutírico Acido naftilacético
Giberelinas	Promueven la floración, estimulan la germinación de las semillas, estimulan el crecimiento del tallo de las plantas	Acido giberélico GA <sub>4</sub> y GA <sub>7</sub>
Citocininas	Estimulan la retención de clorofila, promueven la división celular y el cuajado de frutos, promueven el desarrollo de los cloroplastos y la expansión celular	6 bencilaminopurina Furfuril-aminopurina Zeatina
Compuestos que generan etileno	Se utilizan para promover la abscisión y de este modo facilitar la cosecha mecanizada especialmente en cítricos, el etileno induce la expansión celular lateral, rompe la dormancia en algunas semillas	Ácido-2-cloroetil-fosfónico (Ethefon).
Inhibidores del transporte hormonal	Provocan efectos en el crecimiento y la morfogénesis, p. ej. Al bloquear el movimiento de la auxina desde la yema terminal, provoca que se formen ramas laterales	Acido N-m-tolileftalmico Acido 2,3,5-triiodobenzoico
Retardantes del crecimiento	Inhiben la división celular y la expansión celular en la región subapical del tallo, obteniéndose plantas con entrenudos más cortos, sus efectos son reversibles al aplicar giberelinas	Cloruro de 2-cloroetiltrimetil amonio
Inhibidores del crecimiento y enanizantes	Sus efectos son similares a los de los retardantes, pero sus efectos no son reversibles	6-hidroxi-3-(2H)-piridazinona
Esterilizantes masculinos	Se utilizan para producir semillas híbridas	Sal trietanolamina del 2,3-dicloro iso butirano

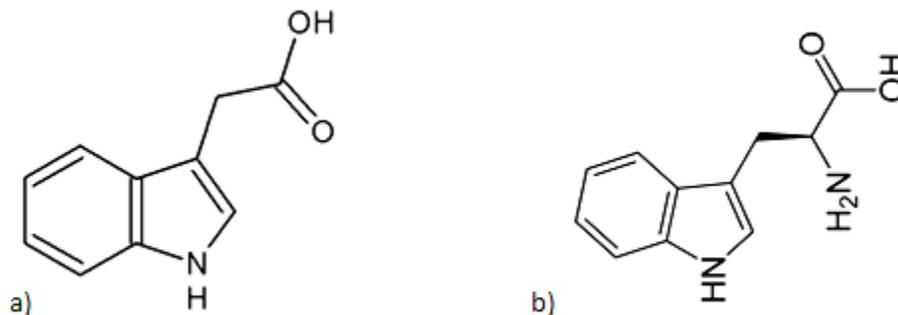
Luckwill, 1994

#### 4.1.1 Acido indolacético

Se denomina típicamente auxinas a aquellos compuestos que estimulan la elongación celular, pero las auxinas también influyen un amplio rango de respuestas en el crecimiento y desarrollo, las primeras investigaciones que se hicieron en este tipo de compuestos no tenían claro de que sustancia se trataba,

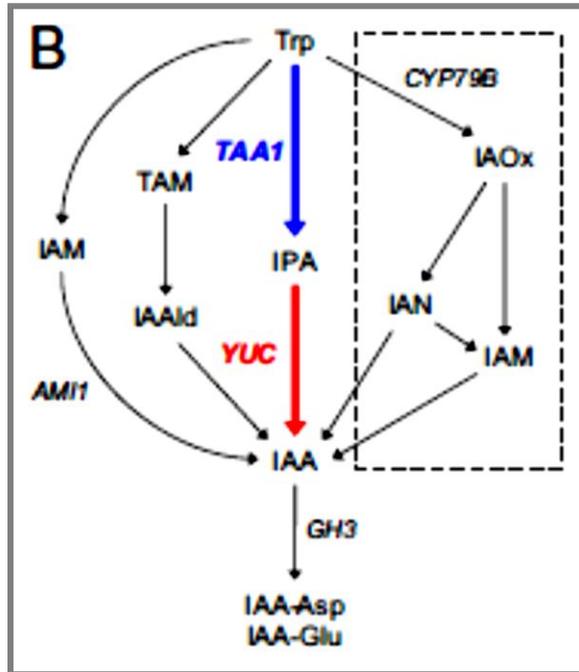
en 1919 Paál concluyó en sus investigaciones que “La punta de la hoja es el centro regulatorio del crecimiento, en él, una sustancia (o mezcla) se forma y es secretada internamente, y esta sustancia se distribuye igualmente por todos lados, moviéndose hacia abajo por el tejido vivo”, y no fue sino hasta 1946 que se hizo una identificación química del ácido indolacético (IAA) presente en las plantas.

Después del IAA, se identificaron otros compuestos con estructura similar y que presentan las mismas respuestas, entre ellos se puede mencionar al ácido 4-cloroindolacético, ácido fenilacético y el indolbutírico. Se han realizado estudios genéticos y enzimáticos que han demostrado que las enzimas triptófano aminotransferasa de *Arabidopsis* (TAA) y la flavin monooxigenasa de *Yucca*, (YUC), son requeridas para la biosíntesis del IAA, estudios bioquímicos también han demostrado que el triptófano es el principal precursor del IAA en las plantas.



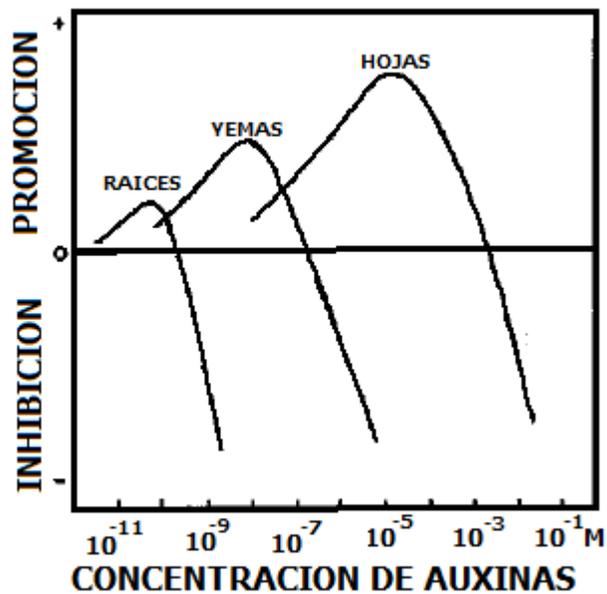
**Figura 1.** Estructura química de: **a)** Ácido indolacético, **b)** Triptófano.

Se han propuesto otras rutas de biosíntesis, pero no se han demostrado con bases genéticas. En la figura 2 se muestran las cuatro rutas que hasta la fecha se han propuesto para la biosíntesis de IAA en las plantas, el recuadro con líneas discontinuas se refiere a una ruta metabólica propuesta, pero que está presente en muy pocas especies (Mashiguchia *et al.*, 2011).



**Figura 2.** Rutas metabólicas propuestas para la biosíntesis del ácido indolacético por las plantas, propuestas por Mashiguchia *et al.*, (2011), las flechas gruesas indican las funciones propuestas de las enzimas principales involucradas. TAA1, aminotransferasa del triptófano; YUC, flavin monooxigenasa; AMI1, amidasa 1 de arabidopsis; Trp, triptófano; TAM, triptamina; IPA, ácido 3-indolpirúvico; IAAld, Indol 3-acetaldehído; IAM, indol 3-acetamida; IAN, indol 3-acetonitrilo; IAOx, indol 3-acetaldoxima.

La respuesta de las plantas a las auxinas depende de la concentración, en la figura 3 se muestra la respuesta de varios órganos a varias concentraciones de IAA, se puede observar que dependiendo del órgano, a bajas concentraciones el efecto del IAA es de promoción del crecimiento, pero a altas concentraciones se vuelve inhibitorio (Leopold, 1960).

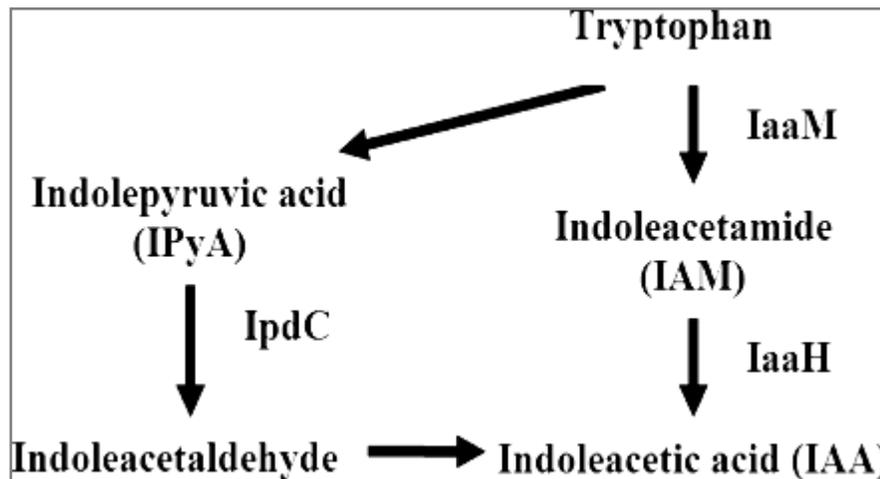


**Figura 3.** Respuesta en el crecimiento de los órganos de las plantas a diferentes concentraciones de auxinas.

Después de su primera identificación, el IAA ha sido aislado de filtrados de bacterias, hongos y plasmolisados de levaduras, algunos patógenos de plantas lo producen para modular el crecimiento en las plantas, por ejemplo *Agrobacterium tumefaciens*, que penetra en los tejidos vegetales causando una proliferación celular. Durante el contacto con las células vegetales la bacteria transfiere a las células vegetales un plásmido llamado Ti (inductor de tumores). Éste se integra en el ADN del cromosoma de la célula vegetal. El plásmido transferido o t-ADN contiene los genes oncogénicos (onc) cuya expresión provoca una mayor producción de hormonas de crecimiento, que son las que inducen las divisiones celulares que dan origen a la formación del tumor o agalla.

*Pseudomonas* y *Agrobacterium* utilizan la triptófano-2-monooxigenasa (iaaM) para convertir el triptófano a indol-3-acetamida (IAM), la cual es subsecuentemente hidrolizada a IAA por una hidrolasa (iaaH) (figura 4). Hasta la fecha esta vía es la única completamente conocida dependiente de triptófano, la ruta de síntesis del indol-3-piruvato (IPA) se ha encontrado en algunos

microorganismos, aunque esta ruta aun no está clara, se sabe que la descarboxilasa de IPA convierte a este compuesto en indol-3-acetaldehido, la descarboxilasa ha sido clonada de *Enterobacter cloacae* y *Azospirillum brasilense*, pero los genes que convierten el triptófano a IPA y las enzimas que transforman el IAAlD a IAA aun no han sido concluyentemente identificadas en los microorganismos (Zhao, 2010).



**Figura 4.** Rutas de síntesis del ácido indolacético en microorganismos (tomada de Yang, 2007).

#### 4.2 RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, Plant Growth Promoting Rhizobacteria), son capaces de colonizar los sistemas radicales de las plantas y promover el crecimiento de éstas. Tienen la capacidad de alterar el crecimiento de los tejidos vegetales directa o indirectamente; indirectamente las PGPR juegan un papel importante en la disminución o prevención de fitopatógenos que puedan atacar las plantas; mientras que directamente las PGPR promueven el crecimiento de la planta al sintetizar compuestos (por ejemplo

reguladores del crecimiento vegetal) que le facilitan a la planta la toma de nutrientes del ambiente (Gray & Smith, 2004).

La investigación en este campo se ha incrementado desde que Kloepper y colaboradores acuñaron el término en los 70's (Kloepper y Schroth, 1978), los mecanismos por los cuales ejercen sus efectos son muy amplios y van desde la fijación de nitrógeno, aumento en la disponibilidad de nutrientes, modificación de la morfología de las raíces, hasta la producción de sustancias reguladoras del crecimiento. La investigación de algunos mecanismos responsables del incremento en la asimilación de nutrientes se ha incrementado recientemente debido al interés de utilizar este tipo de microorganismos como biofertilizantes.

Las PGPRs sintetizan compuestos como auxinas y compuestos parecidos a las giberelinas que aumentan la tasa de germinación de las semillas y el desarrollo de pelos radiculares que ayudan a la planta a crecer al aumentar la capacidad de absorber (Hasan, 2002).

El término biofertilizante se utiliza comúnmente para designar el uso de microorganismos para mejorar la disponibilidad y asimilación de los nutrientes minerales presentes en el suelo por las plantas. Sin embargo, Vessey (2003) sugiere que el término biofertilizante se utilice como aquel producto que contiene microorganismos vivos, los cuales al ser aplicados al suelo, a las semillas o a la superficie de las plantas, colonizan la rizósfera o el interior de la planta y promueven el crecimiento incrementando la disponibilidad y asimilación de los nutrientes primarios por la planta hospedera (Vessey, 2003). En base a esta definición no se debe utilizar el término biofertilizante para designar productos conteniendo compuestos orgánicos para mejorar la calidad del suelo, pero si para designar aquellos microorganismos que incrementen el crecimiento de las plantas al reemplazar los nutrientes del suelo (por fijación biológica de nitrógeno), o aumentando la disponibilidad de los nutrientes (p. ej. al aumentar la solubilización de fósforo) o bien incrementen el acceso a los nutrientes (al incrementar el área superficial de la raíz). No todas las PGPB son biofertilizantes. Uno de los efectos más reportados en el uso de bacterias promotoras del crecimiento es el aumento

en el peso seco (Vessey & Buss, 2002) y el aumento del área superficial de la raíz (Fallik *et al.*, 1994), estos cambios se han atribuido principalmente a la producción de ácido indolacético por las bacterias de la rizósfera. Mehnaz *et al.*, (2001) reporta la producción de ácido indolacético por *Aeromonas veronii* y el aumento de la raíz en plantas de arroz causadas por la inoculación de estas plantas por la bacteria. Biswas *et al.*, (2000) asimismo reporta que dos bacterias del género *Rhizobium* promueven el crecimiento de plantas de arroz y que estas resultaron positivas en la producción de ácido indolacético en el laboratorio.

#### **4.2.1 Competencia en la Rizósfera**

Las PGPBs, en general son colonizadoras altamente agresivas por lo cual suelen desplazar microorganismos o especies deletéreas de la microflora de la raíz desencadenando con ello un descenso de las poblaciones de hongos y bacterias rizosféricas. Una bacteria altamente competitiva tiene un rápido crecimiento, es móvil y presenta quimotaxis por los exudados radicales. Solamente del 8 al 20% de la superficie de las raíces es colonizada por bacterias, siendo las zonas de mayor exudación las que presentan mayor colonización (Kapulnik, 2002).

##### **4.2.1.1 Acción bioprotectante de las PGPB**

La actividad bioprotectante se caracteriza por el control de organismos causantes de enfermedad en especies vegetales. Esta actividad ha sido reportada en géneros bacterianos como *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Enterobacter* y *Agrobacterium* (Ping, 2004).

Los mecanismos descritos para el control biológico abarcan diversos grados de interacción entre los cuales la competencia por espacio y nutrientes, la inducción de resistencia sistémica y la síntesis de metabolitos secundarios, son los más importantes (Waisel *et al.*, 2002).

## **4.2.2 Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal**

Tien *et al.*, (1979) sugirieron que las fitohormonas podrían ser las responsables del mejor crecimiento de la raíz y de la parte aérea de las plantas. Esto se debe a que los efectos de la inoculación son similares a los que se observan cuando las plantas son tratadas con estas sustancias.

El mecanismo estudiado con mayor amplitud ha sido la producción de auxinas, especialmente de ácido indol acético (Jain & Patriquin, 1985). Este compuesto es producido por las bacterias logrando un aumento en el contenido de fitohormonas de las plantas produciendo la estimulación del crecimiento (Bar & Okon, 1992).

Los mecanismos de acción de las PGPR pueden clasificarse en directos e indirectos, y cada uno de ellos puede actuar de manera independiente y diferente (Solano, 2000).

### **4.2.2.1 Mecanismos de acción directa.**

A este grupo pertenecen aquellos metabolitos producidos por la bacteria capaces de estimular el crecimiento vegetal (Kloepper, 1993). Totalmente independientes de la población microbiana edáfica y del soporte edáfico. Tal es que caso de:

- Fijación de nitrógeno de forma asociativa,
- Producción de reguladores de crecimiento vegetal como auxinas, giberelinas y citoquininas, entre otras.
- Inhibición de síntesis de etileno.
- Aumento en la permeabilidad de la raíz.

El tipo de mecanismo de acción que utilice cada especie de bacteria promotora del crecimiento vegetal, es difícil de estimar ya que cada bacteria en particular puede afectar el crecimiento de la planta de diferentes maneras y con diferentes mecanismos de acción (Kloepper, 1993; Solano, 2000).

El mecanismo de acción directo de las PGPR por excelencia es la producción de reguladores de crecimiento vegetal (Brown, 1974; Solano, 2000; Tien *et al.*, 1979).

Entre las bacterias con reconocida actividad como productoras de reguladores de crecimiento se encuentran los géneros *Azospirillum* y *Azotobacter* los cuales al penetrar la raíz producen giberelinas, auxinas, citocininas, ácido abscísico y fijan nitrógeno, lo que las convierte en excelentes biofertilizantes. Para el género *Pseudomonas* también se ha reportado la capacidad de producción de auxinas y giberelinas (Vargas *et al.*, 2001).

Es así como bacterias promotoras de crecimiento vegetal, han mostrado efectos benéficos por la producción de reguladores del crecimiento vegetal, como las giberelinas y auxinas, tal es el caso de *Azospirillum sp.*, *Pseudomonas sp.*, y *Azotobacter sp.*, entre otros géneros reconocidas como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Cassan *et al.*, 2001).

Desde 1934 cuando Kögl, Haagen-Smit y Erxleben, obtuvieron AIA purificado de orina, identificada como auxina, empezaron los estudios alrededor de su actividad y biosíntesis (Baca & Elmerich, 2007), y con ellos la aparición de trabajos en los que se reportaba a bacterias y hongos (Baca & Elmerich, 2007; Cassan *et al.*, 2001) como productores de auxinas, los cuales son asociados a la rizósfera de las plantas, reconociendo que el 80% de las PGPR o bacterias asociadas a la rizósfera son capaces de producir Acido Indol Acético (AIA) (Zakharova *et al.*, 1999). Las investigaciones que se han producido no solo involucran la biosíntesis bacteriana de este regulador, o su actividad fisiológica en las plantas, si no que establecen la relación que las bacterias productoras de

reguladores de crecimiento vegetal puede generar con la planta y entender la dinámica de funcionamiento rizobacteria-planta (Zakharova *et al.*, 1999).

Las bacterias del género *Azospirillum* y *Azotobacter* son rizobacterias gram negativas, fijadoras de nitrógeno de vida libre, y que se han encontrado en relación estrecha con las raíces de las plantas; además son capaces de promover el crecimiento de las plantas a través del mejoramiento del desarrollo de las raíces (Bahat-Samet *et al.*, 2004). Se han detectado tres tipos de sustancias promotoras de crecimiento producidas por bacterias del género *Azospirillum*; auxinas, citocininas y giberelinas. Se asume que los reguladores de crecimiento vegetal producidos por bacterias causan cambios detectados en la morfología de las raíces luego de ser inoculadas con *Azospirillum sp.*, que pueden generar un aumento en la absorción de minerales (Bahat-Samet *et al.*, 2004).

Investigaciones enfocadas a la biosíntesis de AIA en *Azospirillum brasilense* ponen de manifiesto varias rutas de biosíntesis dependientes de triptófano, y utilizándolo como modelo en el estudio de biosíntesis de AIA en bacterias (Zakharova *et al.*, 1999).

La aplicación de PGPR en plantas cultivadas, es uno de los más prometedores métodos para aumentar la producción agrícola (Strigul & Kravchenko, 2005), aunque existen problemas para la introducción de estos microorganismos al suelo ya que en varios casos éstos no sobreviven allí, o no realizan la función esperada al incorporarlos. Es conocido que organismos benéficos, introducidos a la rizósfera, son afectados por distintos factores tanto bióticos como abióticos. Dentro de los factores abióticos se encuentran la temperatura del suelo, el pH de este mismo, la disponibilidad de oxígeno, la disponibilidad de nutrientes, el contenido de agua, el tipo de suelo, la textura y estructura del suelo. Gracias a la gran abundancia de microorganismos en la rizósfera inducidos por la liberación de compuestos orgánicos por las plantas, se incluyen una serie de factores bióticos que afectan la supervivencia de las PGPR en el suelo, dentro de éstas se incluye predación por nemátodos y protozoos, actividad de bacteriófagos, competencia microbiana por recursos e interacciones

directas como inhibición de la actividad microbiana por producción de antibióticos y sinergismo o incremento de nutrientes disponibles (Strigul & Kravchenko, 2005).

#### **4.2.2.2 Mecanismos de acción indirecta.**

Los mecanismos indirectos son aquellos en donde la estimulación del crecimiento ocurre de manera indirecta, y la bacteria libera sus metabolitos al medio edáfico afectando otros factores rizosféricos, los cuales se revierten en una mejora o estimulación del crecimiento de la planta por ejemplo (Kloepper, 1993; Solano, 2000):

- Producción de sustancias capaces de movilizar nutrientes de tipo aminoácido, sideróforos o ácidos orgánicos que liberaran fósforo, hierro y/o aluminio (Cattelan *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 1994).

- Influyen en la producción de fitoalexinas, compuestos utilizados para la defensa de la planta, respuesta inducida por lipopolisacáridos producidos por bacterias en el rizoplasma (Agrios, 2004; Cattelan *et al.*, 1999; Loon, 2007).

- Algunas bacterias pueden hidrolizar moléculas producidas por patógenos como *Pseudomonas cepacia* y *P. solanacearum*, son capaces de hidrolizar el ácido fusárico, liberar  $\beta$  1,3–glucanasa inhibiendo el desarrollo de la pared fúngica de hongos fitopatógenos como *Phytophthora ultimum* y *Rhizoctonia solani* (Cattelan *et al.*, 1999; Loon, 2007; Schnider *et al.*, 1994; Solano, 2000).

#### **4.2.3 Biosíntesis de reguladores del crecimiento vegetal**

La habilidad que muestran los microorganismos para sintetizar reguladores de crecimiento vegetal es muy conocida, las cuales se producen en asociación con las plantas, estableciendo relaciones de tipo benéfico, o de parasitismo en donde las bacterias u hongos sintetizan estos reguladores o compuestos similares con estructuras químicas de acción similar, para estimular los tejidos hospederos.

A la lista de microorganismos productores de reguladores se suman bacterias, actinomicetes, algas y hongos los cuales pueden producir diferentes tipos de regulador y en diferentes concentraciones (Baca & Elmerich, 2007; Tsavkelova *et al.*, 2005).

#### **4.2.3.1 Biosíntesis de auxinas por bacterias**

Las auxinas son derivadas del triptófano (Trp), por varias rutas metabólicas, pero solo puede ser sintetizado funcionalmente por rutas dependientes de Trp.

En microorganismos se han propuesto, al menos tres vías metabólicas para la biosíntesis del ácido indol acético (AIA) a partir de triptofano (Trp), denominadas vía del indol 3-piruvico (AIP), ácido 3-acetamida (IAM) y la vía de la triptamina (Tam) (Cheryl & Glick, 1996). Adicionalmente se ha descrito una vía que no requiere de este precursor para la biosíntesis del AIA y que se denominada vía independiente del Trp. A pesar de esta diversidad, en el metabolismo procariótico la biosíntesis parece seguir dos rutas predominantes: la ruta de la indol 3-acetamida (IAM) y la del ácido indol 3-pirúvico (IPA) por encima de la vía de la triptamina (Tam) y de la vía independiente de triptófano.

Lambrecht *et al.*, (2000) han encontrado un patrón de biosíntesis de AIA característico de la interacción planta-microorganismo que depende específicamente de rol ecofisiológico de la especie bacteriana que interactúa, siendo estas fitopatogénicas o promotoras del crecimiento. Tal es el caso de *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Pseudomonas savastanoi* y *Erwinia herbicola*, todas especies fitopatogénicas que sintetizan el AIA de manera inducible por la vía de la indol 3-acetamida (IAM) y de manera constitutiva por la vía del indol 3-piruvico (IPA).

### **4.3 MÉTODOS DE DETECCIÓN DE REGULADORES DE CRECIMIENTO VEGETAL**

Los reguladores de crecimiento vegetal pueden ser producidos industrialmente usando procesos de fermentación y síntesis, y se han obtenido diferentes métodos para su obtención y purificación, es así como la cromatografía líquida de alta presión (HPLC), es un procedimiento que se emplea para la purificación y separación de giberelinas. Mientras que para su detección se han desarrollado diferentes métodos, como la cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía de gases (GC), cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) (Castillo & Martinez, 1997). De esta forma la producción *in vitro* de giberelinas por *Azospirillum sp.*, y el efecto de las mismas han sido estudiados por espectrometría de masas (MS) (Cassan, 2001).

Los métodos más usados hoy en día para el estudio de reguladores de crecimiento vegetal son HPLC y GC (Arteca, 1996). Se usa HPLC con muestras grandes y fáciles de detectar con espectrofotometría mientras que GC se usa con muestras pequeñas y volátiles.

#### **4.3.1 Cromatografía en Capa fina (TLC)**

La cromatografía de capa fina se ha utilizado en la separación y el análisis de muchos compuestos y es de acuerdo a éstos que se utilizan solventes específicos, siendo particularmente útil cuando se trata de sustancias no volátiles.

En esta técnica las separaciones se producen con base en distintos procesos como son adsorción, reparto, intercambio iónico y diferencia en el tamaño de las moléculas, lo que le confiere ventaja frente a otras técnicas ya que es más rápida y sensible debido a que la muestra se difunde menos, por lo cual pueden separarse cantidades menores y por que el revelado puede llevarse a cabo con reactivos muy sensibles como ácidos sulfúricos y clorosulfónico (Jork, 1991).

La técnica permite por tanto separaciones eficientes de mezclas complejas, identificación preliminar de sus constituyentes como detección de compuestos indeseables.

Los materiales y equipos que utiliza son similares a los utilizados en cromatografía en papel, pero utiliza sorbentes (fase estacionaria) en donde se agrupan adsorbentes, intercambiadores de iones y geles de filtración, entre ellos se encuentra el gel de sílice o ácido sílico, siendo este el más utilizado, el hidróxido de aluminio comúnmente llamado alúmina, Kieselgur o Tierra de Diatomeas se utiliza en separaciones por reparto de oligosacáridos, celulosa fibrosa o celulosa microcristalina y poliamida entre otros (Skoog & Leary, 1993).

#### **4.3.2 Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)**

Es utilizada por su alta eficiencia, resolución y velocidad de separación, es utilizada para separar reguladores vegetales de crecimiento de otros compuestos presentes en el extracto, al igual que por su capacidad para separar compuestos o impurezas, en donde puede observarse la alta resolución de la técnica. La HPLC tiene su origen en la cromatografía en columna clásica aunque tanto sus fundamentos como su desarrollo son similares a la cromatografía de gases. En este caso es la habilidad con que los constituyentes de la muestra se reparten entre las dos fases lo que condicionará la separación. La HPLC es comparable a la GC en velocidad, eficiencia y resolución y es inherentemente más versátil. No está limitada a muestras volátiles y térmicamente estables, y la elección de la fase estacionaria incluye sólidos adsorbentes, adsorbentes modificados químicamente, intercambiadores iónicos y materiales porosos, dando lugar a distintas modalidades (Piné *et al.*, 2009).

#### 4.4 PRODUCCIÓN DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO

Muchas sustancias orgánicas son capaces de regular el crecimiento vegetal debido a que afectan la fisiología de las plantas y sus procesos morfológicos a muy bajas concentraciones. Dentro del término PGPB gran parte de la actividad promotora de crecimiento recae en la síntesis por parte de los microorganismos de fitohormonas como auxinas, citocininas y giberelinas (Jagnow & David, 1991; Dobbelaere *et al.*, 2003).

La palabra auxina significa en griego 'crecer' y es dada a un grupo de compuestos que estimulan la elongación de las células. De estos, el AIA es la forma natural predominante. Aunque las auxinas se encuentran en toda la planta, las más altas concentraciones se localizan en las regiones meristemáticas que se encuentran en crecimiento activo, debido a que en dichos sitios se da su síntesis dentro de la plantas (Heldt *et al.*, 1997).

La principal auxina endógena es el ácido indol-3-acético (AIA). Es sintetizada a partir del L-triptófano, que puede estar libre o formando parte de proteínas. Por acción de una transaminasa se transforma en ácido indolpirúvico, el cual se descarboxila por acción de una descarboxilasa formándose indol-acetaldehído. Luego actúa una oxidasa que lo transforma en ácido indol acético. Existen otras vías de síntesis que conducen al compuesto mediante la formación intermedia de triptamina, o bien mediante un intermediario nitrílico. El AIA se puede transformar en ácido indol butírico por acción de una sintasa (Heldt *et al.*, 1997).

Los microorganismos que habitan en la rizosfera de varias plantas son capaces de estimular en ellas la producción de auxinas, gracias a su acción elicitora por la secreción de metabolitos secundarios producto de la asimilación de diversos exudados producidos por las plantas (Waisel *et al.*, 2002).

Así mismo, Los microorganismos también pueden producir AIA dentro de su metabolismo secundario. Las vías de síntesis de AIA por parte de los microorganismos son diversas y un gran número de genes está implicado en su

regulación y expresión; tal es el caso de la vía del indol-3-acetamida (IAM), común de los organismos fitopatógenos. Las bacterias benéficas sintetizan el AIA por la vía del ácido Indol 3 pirúvico (IpyA). Donde el L-Triptófano es oxidado finalmente a ácido indol acético. Los genes que codifican para la síntesis de AIA, se encuentran en plásmidos o integrados a los cromosomas (Kapulnik, 2002).

También existen evidencias de biosíntesis de AIA independiente del L-triptófano (cuyos precursores son el indol y el indol-3-glicerol fosfato), pero esta es poco conocida (Soberón *et al.*, 2005).

Las bacterias PGPR sintetizan AIA. Esta importante auxina secretadas por bacterias contribuiría al “pool” endógeno de hormonas de la planta, imitando el efecto de la aplicación de AIA exógeno (Glick *et al.*, 1999). De esta forma, el AIA bacteriano estimularía el desarrollo del sistema radical y el crecimiento general de la planta huésped. Al mismo tiempo, el consecuente incremento en la producción de metabolitos vegetales, utilizados por las bacterias para su propio crecimiento, pondría de manifiesto un beneficio recíproco en la relación planta-bacteria (Patten & Glick, 2002).

La promoción de crecimiento radical es uno de los principales factores por los cuales se evalúa el efecto benéfico de las distintas PGPR. En este sentido, la producción bacteriana de AIA y la alta sensibilidad de las raíces a dicha hormona sería fundamental en la respuesta a la inoculación. Bacterias que secretan bajos niveles de AIA ( $10^{-9}$  a  $10^{-12}$  M) estimularían la elongación de raíces, mientras que bacterias altamente productoras de auxinas promoverían la formación de raíces laterales o el desarrollo de pelos absorbentes (Glick *et al.*, 1999).

#### 4.4.1 Modo de Acción de las auxinas en la planta

Las auxinas actúan a nivel génico regulando la expresión de múltiples genes. El AIA se une a un receptor de naturaleza proteica, formando un complejo receptor-hormona de carácter reversible, específico, con alta afinidad y saturable. Este complejo activa un promotor que controla la expresión de los genes que codifican la síntesis de las enzimas catalizadoras de los compuestos de la pared (Hans *et al.*, 1997).

##### 4.4.1.1 Efectos en la Planta

Dentro de la acción fisiológica de las auxinas podemos nombrar su participación en la mitosis, alargamiento celular, formación de raíces adventicias, dominancia apical, gravitropismo, floración, emergencia y elongación radicular entre otros (Hans *et al.*, 1997).

Las bacterias asociadas o libres en el sistema planta-suelo presentan diferentes efectos sobre el material vegetal, producen fitohormonas, incrementan la velocidad de germinación de semillas, estimulan la formación de raíces, fortalecen los mecanismos naturales de defensa de la planta (resistencia sistémica), solubilizan nutrientes no disponibles para las plantas, incrementan la respuesta a la fertilización química u orgánica, reducen las pérdidas de N por lavado, aumentan la tolerancia al estrés hídrico y al ataque de plagas o enfermedades, entre otros (Kapulnik, 2002).

En los años 70`s se demostró que la baja tasa de germinación de algunas semillas de hortalizas podía ser aumentada mediante el tratamiento con cepas de *Pseudomonas sp.* (Kapulnik, 2002).

La inoculación de plantas jóvenes de sorgo y maíz con *Azospirillum sp.* ha tenido efectos marcados en la morfología de las raíces, favoreciendo la proliferación de pelos radicales, el aumento de la superficie radical y en términos generales un buen desarrollo del sistema de raíces. Este aumento de la superficie

radical le permite a la planta una mayor exploración del suelo y por ende tener mayor acceso a nutrientes y agua (Kapulnik, 2002).

Muchos de los microorganismos que son caracterizados como PGPB`s y que cumplen las características mencionadas anteriormente, son aislados tanto de suelo como de tejidos vegetales. Estos últimos son considerados como microorganismos endófitos. Los endófitos son un grupo específico de microorganismos (bacterias, actinomicetos y hongos) que pueden encontrarse en diferentes tipos de tejidos vegetales incluyendo los de semillas, frutos, hojas, tubérculos, tallos etc. Estos presentan una ocurrencia alta en los cultivos de importancia agrícola y alta relevancia en sus sistemas de producción (Surette & Sturtz, 2003).

#### **4.5 BACTERIAS COMO BIOFERTILIZANTES**

Con la necesidad de incrementar la producción en los cultivos, hace más de 70 años se inicio el uso indiscriminado de fertilizantes químicos, logrando aumentar la producción de alimentos. Esta revolución en la agricultura se denominó como uno de los procesos más ineficientes del mundo, por sus altos costos económicos y medioambientales; sin embargo este paquete tecnológico que contemplaba la modernización de la agricultura se masificó en todo el país. Estos fertilizantes químicos se integraron a las prácticas agrícolas en tierras de autoconsumo y comerciales, en minifundios y empresas agrícolas, en la producción de alimentos básicos y en forraje. Esta práctica fue fomentada y subsidiada por el Estado, ya que era considerada una forma rápida y económica de incrementar la producción sin percatarse que también sería una forma de acabar con el equilibrio ecológico. Los fertilizantes químicos se caracterizan por el bajo índice de aprovechamiento que tiene la planta, ya que solo se aprovecha entre el 30 y 40%, otra parte se desperdicia, se filtra y escurre para contaminar los mantos freáticos, ríos y cuerpos de agua o se pierde como gases contaminantes a

la atmosfera, contribuyendo a la degradación de la capa de ozono y al calentamiento global.

Las bacterias han sido utilizadas desde la antigüedad para mejorar la disponibilidad de los nutrientes, Teofrastus (372-287 A.C.) sugirió mezclar distintos suelos a fin de “remediar los defectos y agregar corazón al suelo” (Tisdale & Nelson, 1975). Se ha propuesto en diversos estudios que el establecimiento de las bacterias en el suelo que rodea a la raíz está altamente relacionado a cambios físicos o químicos en el suelo influenciados por la planta, los cambios observados son principalmente en el pH, el potencial del agua que rodea a la raíz, presión parcial de O<sub>2</sub>, etc., todos ellos causados por la planta (Eichorst, 2011; Krujatz *et al.*, 2012; Haichar *et al.*, 2008).

Existen dos mecanismos reportados como responsables de incrementar la disponibilidad de los nutrientes por la planta en la rizósfera: 1. La solubilización de las formas no disponibles de nutrientes, y 2. La producción de sideróforos que facilitan la asimilación de ciertos nutrientes como los iones férricos. El fósforo después del nitrógeno es el segundo elemento limitante en el desarrollo de las plantas, a pesar de que estas se desarrollen en suelos con altas cantidades de este elemento. Esto se debe a que el fósforo solo puede ser absorbido en sus formas solubles monobásico H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> y dibásico HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, pero estas formas están presentes en el suelo en muy bajas cantidades, a causa de la alta reactividad del ion fosfato, que al entrar en contacto con las partículas del suelo es fijado rápidamente por minerales de aluminio, hierro y calcio, lo que disminuye drásticamente su disponibilidad para las plantas. Las bacterias solubilizadoras emplean principalmente tres mecanismos para ayudar a las plantas en la asimilación de este nutriente, por la producción de ácidos orgánicos, la liberación de protones al medio y la producción de fosfatasas (Kim *et al.*, 1998).

Es muy común encontrar que las bacterias de la rizósfera presenten más de un modo de acción, por ejemplo Cattelan en 1999 reportó que de 23 aislados de la rizósfera que tenían características de biocontrol, casi todos presentaron más de un modo de acción de promoción del crecimiento, seis de ocho aislados fueron

positivos para la producción de la desaminasa del 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC, un precursor del etileno), cuatro de siete aislados fueron positivos para la producción de sideróforos, tres de cuatro aislados fueron positivos para la producción de glucanasas y dos de cinco aislados fueron positivos para la solubilización de fósforo, y todas ellas promovieron más de un aspecto del desarrollo de las plántulas de soya.

#### **4.5.1 Biofertilizantes comerciales con distribución en México a base de bacterias promotoras del crecimiento**

En México el uso de los biofertilizantes tuvo un auge en las décadas de los 70's y 80's con la utilización de inoculantes comerciales a base de *Rhizobium*, con lo que se logró fijación biológica de nitrógeno en soya y garbanzo, y con esto fue posible sustituir la fertilización nitrogenada en Sinaloa. Sin embargo, y a pesar del desarrollo de varios productos comerciales como el Hortic plus de Plant Health Care y otros desarrollados por el INIFAP, los productores mostraron poca aceptación a este tipo de productos, debido principalmente a la desconfianza de reducir la fertilidad del suelo y con ello sus ganancias. Esta desconfianza fue debido principalmente a la respuesta variable de estos productos, causada por las condiciones ambientales, el pH del suelo y a las especies de plantas en las que son aplicados (Armenta *et al.*, 2010). Solo recientemente y debido al aumento en la concientización en el cuidado del medio ambiente y a la evidencia del deterioro ambiental, aunado al auge de la agricultura orgánica, se ha logrado que los productores agrícolas vean con buenos ojos el uso de los biofertilizantes.

Actualmente en México es posible encontrar comercialmente agrobiológicos a base de microorganismos, los cuales declaran en su etiqueta la capacidad de promover el crecimiento de las plantas, entre estos se pueden mencionar el AgroBacilo y el Bacifol de la empresa Agrobiológica S. A. de C. V. con sede en Sinaloa, son productos a base de la bacteria *Bacillus subtilis* que previenen enfermedades por hongos, bacterias y *Melioidogyne*, debido a que la bacteria

produce antibióticos, quitinasas y celulasas. El Hortic plus mencionado anteriormente es producido por la empresa Plant Health Care y es distribuido a nivel nacional, reportan como agentes biológicos en el producto a bacterias del género *Bacillus* (*licheniformis*, *megaterium*, *polymixa*, *subtilis* y *thuringiensis*) con propiedades de fijación de nitrógeno, solubilizadoras de fósforo y promotoras del crecimiento.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Agrobiotecnología del Departamento de Ciencias Básicas de esta Universidad, donde se está trabajando en la búsqueda y desarrollo de un biofertilizante a base de bacterias solubilizadoras de fósforo. Se han encontrado, hasta la fecha, nueve cepas de bacterias del género *Pseudomonas* y *Acinetobacter* que han demostrado su eficacia en la solubilización de fósforo *in vitro* y en la asimilación de fósforo por plantas de tomate. Debido al hecho de que las bacterias de la rizósfera presentan, la mayoría de las veces, más de un mecanismo que promueve el crecimiento de las plantas, para este trabajo de tesis se seleccionaron 36 cepas bacterianas (Tabla 2) que presentaron los mejores resultados en la solubilización y asimilación de fósforo, todas fueron aisladas de la rizósfera de plantas de tomate para estudiar su capacidad de síntesis de ácido indolacético. Cabe mencionar que algunas de ellas todavía no se han identificado.

**Tabla 2.** Cepas probadas para determinar la producción de ácido indolacético

Cepa	Identificación (DNA 16s ribosomal)	Cepa	Identificación (DNA 16s ribosomal)
CBNG 14	<i>Pantoea ananatis</i>	CBLA 232	<i>Escherichia hermannii</i>
CBLA 91	<i>Pseudomonas sp.</i>	CBLA 233	<i>Escherichia hermannii</i>
CBLA 104	<i>Gamma proteobacterium</i>	CBLA 234	NO IDENTIFICADA
CBLA 117	<i>Pseudomonas monteilii</i>	CBLA 235	<i>Pantoea agglomerans</i>
CBLA 159	<i>Enterobacter sp.</i>	CBLA 238	NO IDENTIFICADA
CBLA 172	<i>Pseudomonas sp.</i>	CBLA 239	NO IDENTIFICADA
CBLA 177	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	CBLA 240	NO IDENTIFICADA
CBLA 183	<i>Pseudomonas sp.</i>	CBLA 242	NO IDENTIFICADA
CBLA 208	<i>Pseudomonas sp.</i>	CBLA 244	NO IDENTIFICADA
CBLA 215	<i>Pseudomonas koreensis</i>	CBLA 245	NO IDENTIFICADA
CBLA 216	<i>Pantoea agglomerans</i>	CBLA 246	NO IDENTIFICADA
CBLA 217	<i>Cronobacter sakasaki</i>	CBLA 247	NO IDENTIFICADA
CBLA 219	<i>Escherichia hermannii</i>	CBLA 249	NO IDENTIFICADA
CBLA 221	<i>Enterobacter aerogenes</i>	CBLA 251	NO IDENTIFICADA
CBLA 224	NO IDENTIFICADA	CBLA 252	NO IDENTIFICADA
CBLA 225	<i>Enterobacter oryzae</i>	CBLA 256	NO IDENTIFICADA
CBLA 228	NO IDENTIFICADA	CBLA 257	NO IDENTIFICADA
CBLA 231	<i>Pseudomonas sp.</i>	CBLA 258	NO IDENTIFICADA

Para el procedimiento todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico de las marcas Analytica, Jalmek, CTR y Fermont, el triptófano y el ácido indolacético fueron de la marca Sigma, el agar bacteriológico y el extracto de levadura fueron de la marca Bioxon.

## 5.1 REACTIVACIÓN Y OBTENCIÓN DEL INÓCULO PARA LA FERMENTACIÓN

Todas las cepas del proyecto estuvieron conservadas en el ultracongelador marca Thermo Fisher Scientific modelo Revco VALUE PLUS, a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para cualquier ensayo se tuvo un vial disponible a  $-20^{\circ}\text{C}$ , cuando fue necesario las cepas se reactivaron en cajas de Petri con medio MA sólido, siguiendo la técnica de estría cruzada: se esterilizó en la flama un asa de platino, después se tomó un cristal del criotubo donde estaba la cepa y se distribuyó sobre la placa de Petri, se hacen cuatro grupos de estrías cruzadas y de este modo es posible obtener colonias aisladas de la bacteria. Una vez distribuidas las asadas, las placas fueron incubadas de 24 a 48 horas en la incubadora Novatech a  $30^{\circ}\text{C}$ , después se tomó una colonia de la placa y se resuspendió en 5 mL de medio MA líquido, los tubos se incubaron a  $30^{\circ}\text{C}$  en el shaker/incubador marca Thermo Scientific modelo Max Q 5000 a 200 rpm, este tubo es el que sirvió como inóculo para los matraces con medio CCM. Los medios de cultivo utilizados se describen a continuación:

Medio MA sólido

Ingrediente	g/L
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.4
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2
NaCl	0.1
$\text{CaCl}_2$	0.02
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2
Ac. Málico	5
Extracto de levadura	2
KOH	4.5
Agar bacteriológico	15
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20 ppm

Medio MA líquido

Ingrediente	g/L
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.4
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2
NaCl	0.1
$\text{CaCl}_2$	0.02
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2
Ac. Málico	5
Extracto de levadura	2
KOH	4.5
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20 ppm

El medio de fermentación CCM (Córdova-Bautista *et al.*, 2009; Mehnaz *et al.*, 2001.) fue el utilizado para el desarrollo de las bacterias colocando el inóculo, este medio consistió de dos soluciones (A y B).

Solución A

Ingrediente	g/L
Triptófano	0.1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.9
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2
KCl	0.1
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.025
Na <sub>2</sub> FeEDTA	4.9
Sacarosa	5
Manitol	5
Cloruro de amonio	1
Agar	15
Agua destilada	1.0 L

Solución B

Ingrediente	g/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2
CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.06
Agua destilada	100 mL

## 5.2 PREPARACIÓN DE LOS MATRACES PARA LA FERMENTACIÓN

Antes de iniciar con las fermentaciones se hicieron pruebas para determinar la metodología a seguir para evaluar la producción de ácido indolacético, primero se prepararon las soluciones de los estándares de ácido indolacético y ácido naftalenacético y del triptófano, estas se prepararon en metanol a una concentración de 100 ppm cada una, se hicieron las cromatografías siguiendo una metodología reportada por Mehnaz (2001) en fase móvil metanol: ácido acético: agua (30:1:70). En esta prueba se encontró que el triptófano corrió con el frente del solvente y que el ácido indolacético tuvo un R<sub>f</sub> de 0.4.

Por lo anterior se determinó cambiar la fase móvil por una menos polar recurriendo a Barazani (1999), en dicha referencia se utiliza una fase móvil de acetato de etilo: cloroformo: hidróxido de amonio (55:35:10), en contraste a falta de hidróxido de amonio, este componente se cambió por ácido acético en la misma proporción, este cambio modificó la forma iónica del AIA de acetato a ácido provocando que la molécula en si fuera menos polar.

Dependiendo del número de cepas bacterianas en cada ensayo se prepararon matraces Erlenmeyer con 30 mL de medio CCM, tres por cada cepa y se les colocó tapón de algodón y papel celofán, se esterilizaron por 15 minutos a 120°C en autoclave.

Una vez enfriado el medio cada matraz se inoculó con 0.5 mL del inóculo preparado en medio MA líquido, se incubó por 4 días a 30°C en shaker a 200 rpm, después de este tiempo se le midió la densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro Genesys 10UV Scanning Thermo Scientific, para estimar la biomasa presente en cada matraz. Posteriormente se utilizó el potenciómetro 45-02-186 para medir el pH y determinar si se habían producido ácidos orgánicos. Se tomaron alícuotas de 10 mL de cada matraz para la evaluación de AIA.

### 5.3 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO INDOLACÉTICO

Las alícuotas de 10 mL se colocaron en tubos cónicos de 15 mL, se rotaron en una centrifuga Thermo Scientific SL 40 R a 3000 rpm por 15 minutos para separar las células, se separaron las células del sobrenadante, a este último se le ajustó el pH a 2.5-3.0 con HCl 1N y se colocó en un embudo de separación de 250 mL (figura 5). Se extrajo dos veces con 20 mL de acetato de etilo en cada una de las extracciones, se separó el acetato de la fase acuosa y se colocó en tubos cónicos de 50 mL. El acetato de etilo se evaporó por arrastre con aire o con nitrógeno hasta sequedad, el residuo se redisolvió en 1 mL de metanol y se metió al congelador en tubos Eppendorf.

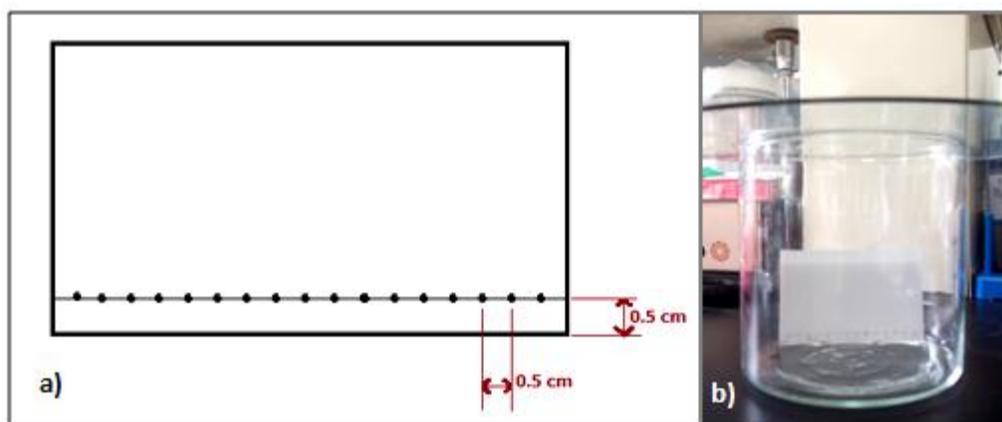


**Figura 5.** Extracción con acetato de etilo utilizando embudo de separación, que posteriormente se colocó en tubos cónicos de 50 mL para después ser evaporado hasta sequedad por arrastre con aire o nitrógeno.

## 5.4 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)

En placas de TLC de sílica gel de 5x10 cm, se marcó con lápiz como en la figura 6(a), a un centímetro de la base de la placa, se marcó una línea en todo lo largo, colocando puntos a 0.5 mm de distancia entre sí.

En cada punto de la placa se colocaron 5 $\mu$ l de la muestra a correr, la fase móvil utilizada fue acetato de etilo: cloroformo: ácido acético (55:35:10).



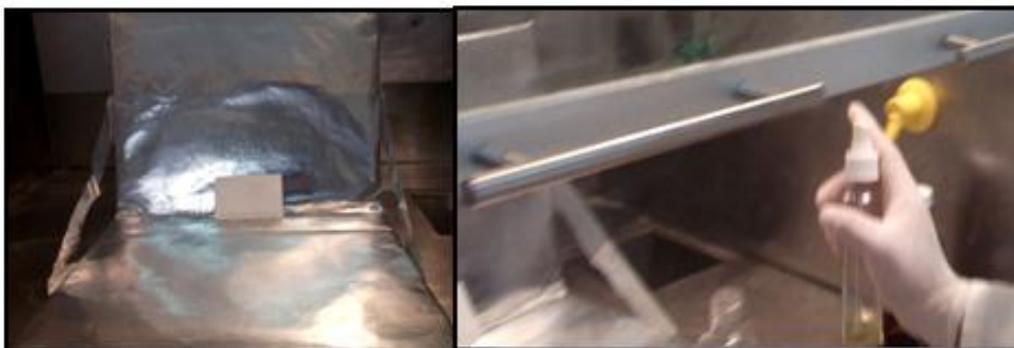
**Figura 6.** a) Placa de TLC de sílica gel marcada con los puntos y las distancias correspondientes entre ellos para realizar la cromatografía. b) Placa de sílica gel sometida a fase móvil.

Las placas se revelaron por aspersion (figura 7) con el reactivo de Ehmann (Ehmann, 1977) que consta de las soluciones A y B en una proporción de 3:1.

A: 50 mL de etanol absoluto, 50 mL de HCl concentrado, 1 g de p-dimetil aminobenzaldehído.

B: 2,03 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 500 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  y 300 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado.

Las placas se calentaron en horno a 80°C para acelerar el secado.

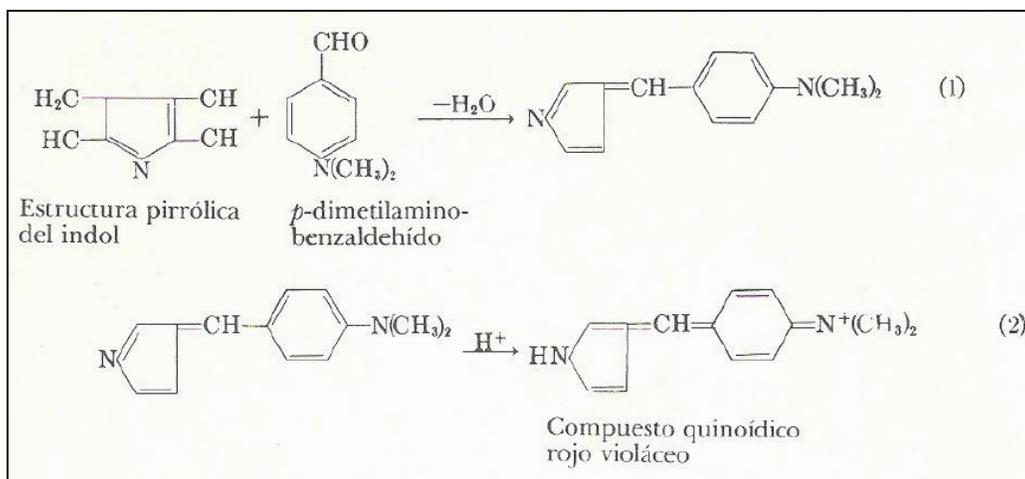


**Figura 7.** Aspersión con reactivo de Ehmann para revelar la placa de sílica gel.

El fundamento de la reacción de Ehmann consiste en que cuando el *p*-dimetil aminobenzaldehído reacciona con los indoles, cuando existe un indol, éste se combina con el aldehído que se encuentra en el reactivo para dar un color rojo en la capa de alcohol. Esta reacción se produce por un proceso de condensación. La reacción de color se basa en la presencia en la estructura pirrólica en el indol.

Las etapas 1 y 2 de la reacción (figura 8) se producen inmediatamente cuando se emplea el reactivo *p*-dimetilamino-benzaldehído en HCl concentrado. Los derivados del pirrol muestran las mismas reacciones de condensación siempre que tengan un grupo CH intacto en posición  $\alpha$  o  $\beta$  en relación con el grupo cíclico NH.

La capa alcohólica extrae y concentra el complejo de color rojo. Este complejo es soluble en éter etílico, alcohol etílico, alcohol isoamílico, alcohol amílico o alcohol butílico (Mac Faddin, 1984).



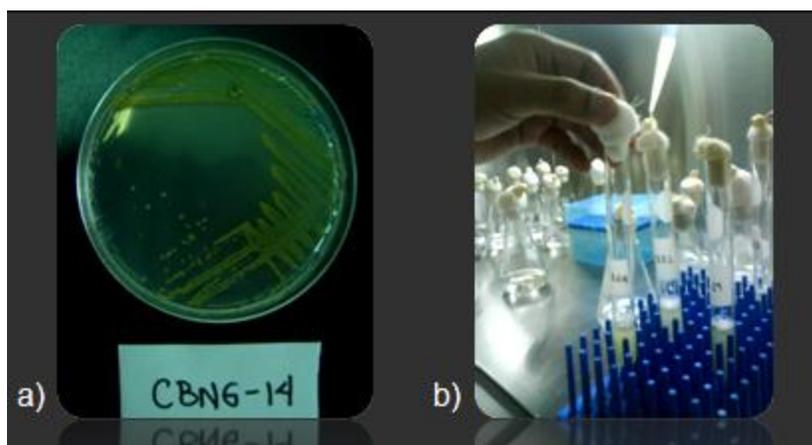
**Figura 8.** Etapas 1 y 2 de la reacción *p*-dimetil aminobenzaldehído+indol. Los grupos CH<sub>2</sub> en cualquiera de las formas pirrónicas permiten la condensación con el aldehído en un método en dos etapas que se producen inmediatamente cuando se emplea el reactivo *p*-dimetilamino-benzaldehído en HCl concentrado.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

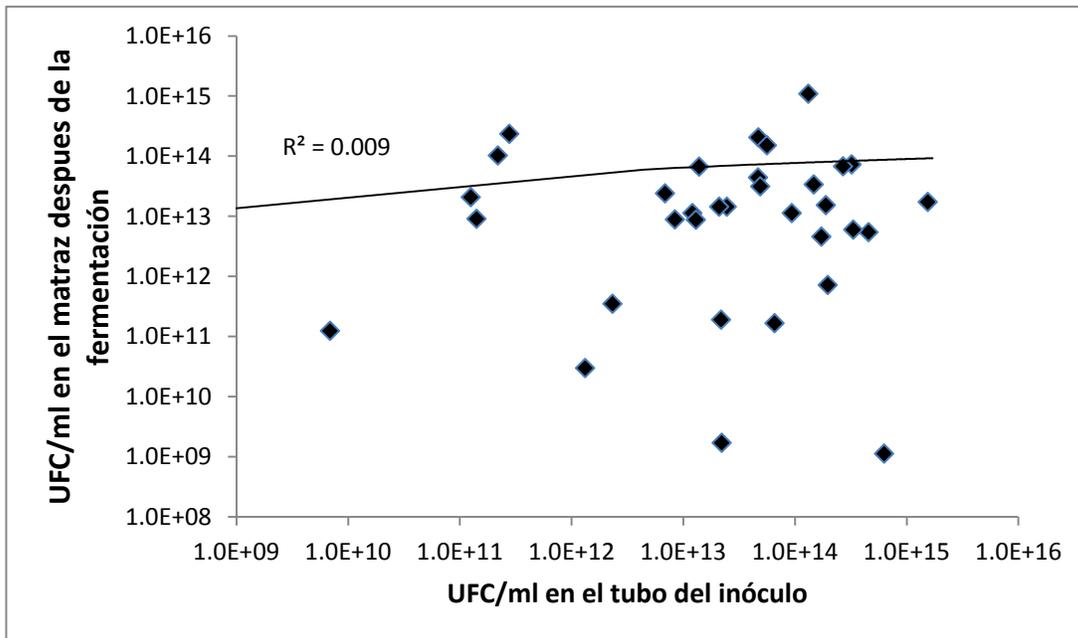
Los resultados obtenidos en el presente trabajo y comparados con los reportados para bacterias de la rizósfera demuestran una amplia evidencia de que algunos microorganismos del suelo están involucrados activamente en la síntesis de auxinas (Arshad & Frankenberger, 1998; Sarwar & Kremer, 1995).

### 6.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

En la figura 9(a) se observa una de las placas sembradas con la cepa CBNG-14, donde se muestra que con la técnica de estría cruzada es posible obtener cepas aisladas, por otro lado el medio MA utilizado demostró ser un medio adecuado para el crecimiento de las bacterias de la rizósfera, sin embargo, se encontró que algunas de las cepas utilizadas en este trabajo tuvieron problemas para adaptarse al medio de fermentación (CCM), en estas cepas el número de bacterias fue menor que el esperado, no obstante, un análisis de correlación (gráfica 1) demostró que el crecimiento alcanzado al final de la fermentación es independiente de la cantidad de inóculo sembrada, lo cual indica que mientras las bacterias estén en su fase de crecimiento exponencial son capaces de adaptarse y crecer eficientemente en el medio de fermentación.



**Figura 9.** a) Placa de MA donde se muestran las colonias aisladas de una de las cepas probadas, b) Tubos de ensayo donde se muestran los cultivos utilizados para inocular los matraces con medio CCM.



**Gráfica 1.** Análisis del efecto de la cantidad de inóculo inicial en el crecimiento de las bacterias en el medio de fermentación.

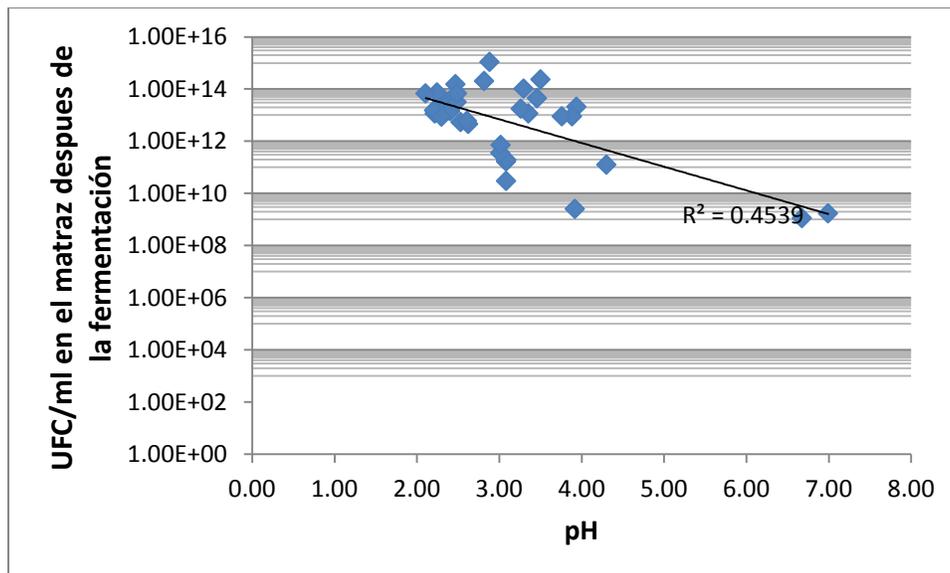
En la tabla 3 se enlistan las cepas probadas con su respectivo crecimiento en cada uno de los dos medios, es decir, en medio MA en la preparación del inóculo y en medio CCM en los matraces después de la fermentación. En comparación entre uno y otro medio, se observa que no hay una coherencia entre las cepas más favorecidas en cada uno de ellos, ya que no son las mismas cepas las de mayor crecimiento en MA que en CCM o viceversa. En la cepa 117, por ejemplo, el contraste de crecimiento entre un medio y el otro es muy marcado, siendo mucho mayor en MA. Sin embargo, en cepas como ésta que presentaron poco crecimiento en CCM la cantidad bastó para la realización del ensayo correspondiente.

**Tabla 3.** UFC por cepa en cada uno de los medios utilizados.

MEDIO MA		MEDIO CCM	
Cepa	UFC /mL en el tubo de inóculo	Cepa	UFC /mL en el matraz al final de la fermentación
91	4.73E+13	91	2.04E+14
104	1.22E+13	104	1.13E+13
117	2.22E+13	117	1.70E+09
159	4.59E+14	159	5.41E+12
172	1.26E+11	172	2.07E+13
208	2.78E+11	208	2.34E+14
215	4.69E+13	215	4.40E+13
216	3.23E+14	216	7.33E+13
217	5.63E+13	217	1.51E+14
219	1.48E+14	219	3.37E+13
221	9.43E+13	221	1.13E+13
221	1.55E+15	221	1.73E+13
221	6.91E+12	221	2.41E+13
225	2.47E+13	225	1.44E+13
225	2.11E+13	225	1.44E+13
228	2.71E+14	228	6.80E+13
231	1.90E+14	231	1.54E+13
232	1.30E+13	232	8.70E+12
234	2.20E+11	234	1.03E+14
235	1.33E+12	235	2.98E+10
238	1.42E+11	238	9.04E+12
239	6.89E+09	239	1.25E+11
240	1.33E+14	240	1.09E+15
242	6.59E+13	242	1.66E+11
244	2.20E+13	244	1.91E+11
245	6.29E+14	245	1.13E+09
246	2.34E+12	246	3.49E+11
247	8.75E+08	247	2.50E+09
249	4.93E+13	249	3.14E+13
251	1.39E+13	251	6.70E+13
252	1.98E+14	252	7.20E+11
256	1.73E+14	256	4.58E+12
257	3.34E+14	257	5.96E+12
258	8.43E+12	258	8.87E+12

## 6.2 FERMENTACIÓN

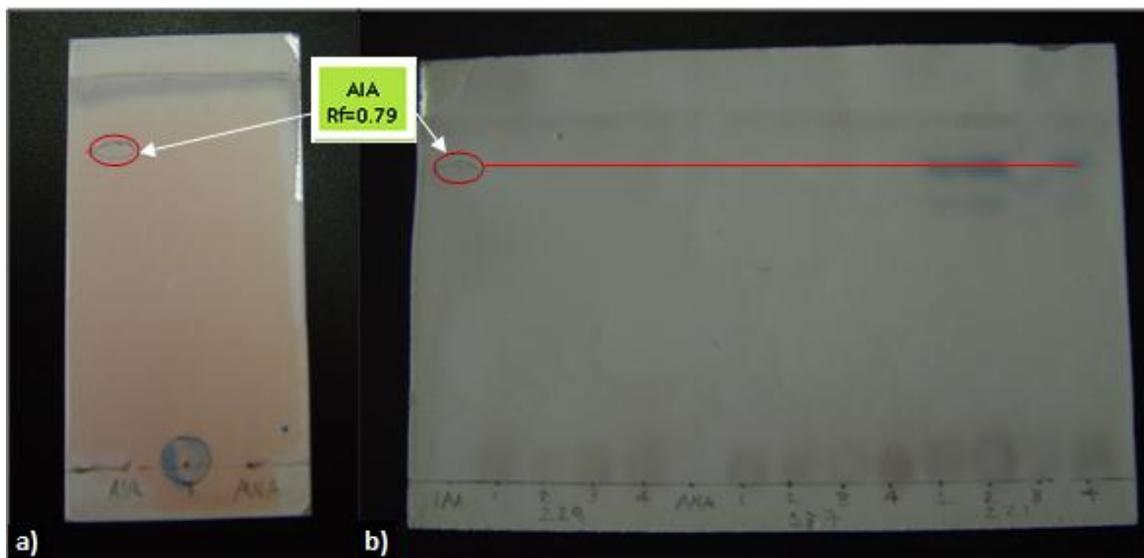
En la gráfica 2 se muestra el análisis de la relación entre el pH y el número de células en los matraces después de la fermentación, aunque el valor de  $R^2$  no es muy alto, se observa una tendencia en cuanto a mayor número de células mayor es la disminución de pH, lo que indica la liberación de protones causada por la producción de ácidos orgánicos, esto está de acuerdo al comportamiento reportado por Vyas *et al.*, (2009) en el que menciona la producción de ácidos orgánicos por bacterias procedentes de la rizósfera. Aunque no está claro el estado metabólico de las bacterias, por el tiempo de incubación se podría esperar que las células se encuentren en su fase estacionaria, sería necesaria una cinética de crecimiento en este medio para determinar si esto es así y de este modo evaluar el efecto del pH en la viabilidad de las células, que según los valores de pH observados es de esperarse que las células estuvieran muriendo, sin embargo eso escapa de los objetivos de esta tesis, en la cual no se determinan ni el tipo ni la concentración de ácidos producidos.



**Gráfica 2.** Relación entre el pH y el número de células en los matraces después de la fermentación.

### 6.3 PRODUCCIÓN DE ÁCIDO INDOLACÉTICO

En las primeras pruebas cromatográficas siguiendo la metodología reportada (Mehnaz, 2001) en fase móvil Metanol: ácido acético: agua (30:1:70) se encontró que el triptófano corrió con el frente del solvente y que el ácido indolacético tuvo un Rf de 0.4. El triptófano actúa como precursor principal en la vía de síntesis del ácido indolacético, debido a que es el origen del grupo indol presente en el AIA (Taiz & Zeiger, 2006; Vasanthakumar & Mcmanus, 2004; Zakharova *et al.*, 1999), por lo que fue importante considerar su comportamiento en estas pruebas. Al cambiar esta fase móvil por una menos polar de acuerdo a Barazani (1999), referencia donde se utiliza una fase móvil de acetato de etilo: cloroformo: hidróxido de amonio (55:35:10) y que en este trabajo se cambió a acetato de etilo: cloroformo: ácido acético en la misma proporción, la cromatografía mostró que el triptófano se quedaba en la base y que el ácido indolacético corría con un Rf de 0.79 (figura 10a), obteniendo una mejor calidad del cromatograma.



**Figura 10. a)** Cromatograma en capa fina, corrida en fase acetato de etilo: cloroformo: ácido acético (55:35:10) y revelada con el reactivo de Ehmann, las muestras son de izquierda a derecha ácido indolacético, triptófano y ácido naftalenacético. **b)** Cromatograma donde se muestra la reacción positiva del reactivo de Ehmann a la presencia de índoles en la cepa CBLA-221 con un Rf de 0.79 al igual que el AIA.

Debido a la capacidad del shaker (45 matraces), hubo necesidad de realizar diferentes ensayos para cubrir la totalidad de las cepas a probar, en el primer ensayo se encontró que una de las cepas que producían AIA (figura 10b) era la cepa CBLA-221 además de ser esta misma cepa con la que se obtenían resultados más concluyentes, por ello se tomó como control positivo para las siguientes fermentaciones. En la tabla 4 se muestran las cepas probadas en cada fermentación.

**Tabla 4.** Cepas probadas en cada uno de los seis ensayos realizados.

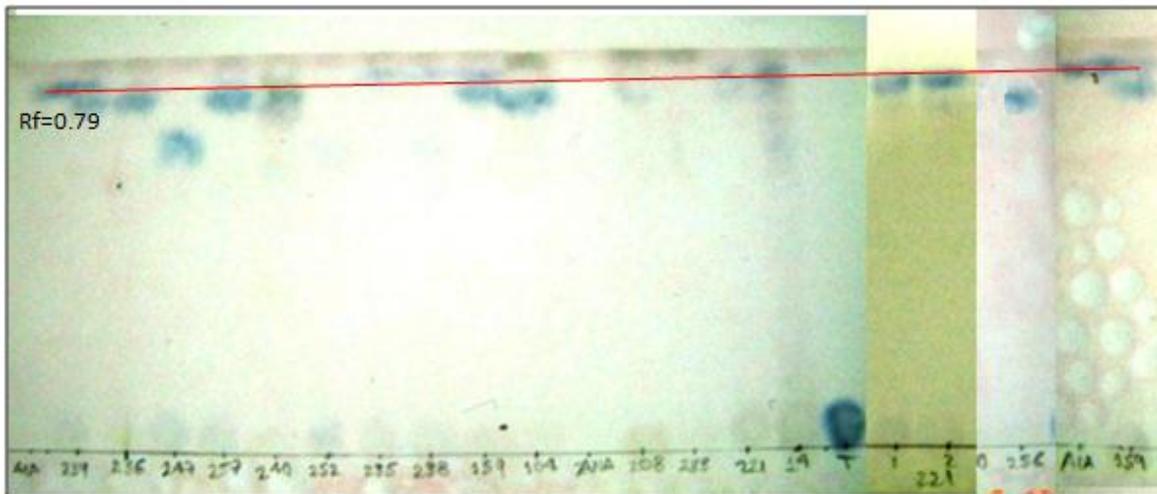
<b>Ensayo</b>	<b>Cepas probadas</b>
1	CBNG-14, CBLA-224, 221, 177 y 183
2	CBLA-233, 172, 104, 221, 234, 208 y 117
3	CBLA-91, 159, 216, 217, 219, 215, 225, 228 y 221
4	CBLA-231, 232, 235, 238 y 221
5	CBLA-240, 245, 247, 252, 256 y 257
6	CBLA-251, 242, 244, 246, 249, 258 y 239

En la figura 10b se observa la producción de AIA por la cepa CBLA-221 y el AIA en el primer punto de izquierda a derecha, aunque no se observa claramente en la foto, éste se marcó en la placa con un círculo a lápiz y en la imagen con un círculo de color rojo. También se puede observar la presencia de otro indol producido por la cepa 221, tema que se discutirá más adelante.

Las cepas que resultaron positivas para la producción de ácido indolacético fueron: CBNG-14, CBLA-104, 159, 208, 221, 233, 235, 236, 238, 239, 240, 252 y 256 que se muestran en el cromatograma de la figura 11, marcada con línea roja al nivel del Rf 0.79. Sin embargo, hubo cepas que no produjeron AIA, pero el cromatograma si presentaba reacción al reactivo de Ehmann dejando rastros al correr la muestra y teniendo un Rf diferente.

También se observó que no todas las cepas evaluadas produjeron AIA, se podría decir que la causa es la falta del pool enzimático necesario para su síntesis (Karadeniz *et al.*, 2006; Bric *et al.*, 1991).

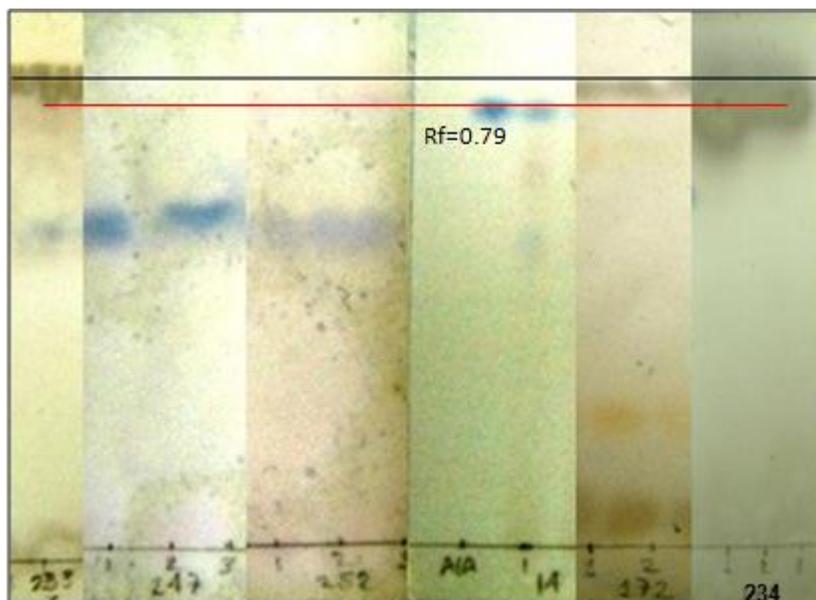
Quizá no haya una concordancia clara entre las concentraciones de AIA en los cromatogramas de las cepas, esto se podría presentar porque se pierde AIA en la extracción líquido-líquido con acetato de etilo, por ejemplo, el proceso de agitación en la extracción no es homogéneo entre todas las muestras, lo que no permite que las dos fases (acuosa y orgánica) tengan el mismo contacto.



**Figura 11.** Cepas que resultaron positivas en la producción de AIA, la línea roja marca el Rf de 0.79 para el ácido indolacético.

Las diferencias entre bacterias con capacidad para sintetizar AIA en medio de cultivo pueden deberse a las condiciones del mismo cultivo; por ejemplo, de la etapa de crecimiento, la constitución genética y la concentración del sustrato (Fallik *et al.*, 1989). En adición, se ha determinado que la cantidad de oxígeno y la limitación de nitrógenos en el suelo, elevan la producción de AIA y la fijación de nitrógeno (Frankenberger & Arshad, 1995).

En el cromatograma de la figura 12 se observa la producción de otros indoles con Rf diferentes a los del AIA. En las cepas CBLA-104 y 208 se distingue la producción de un indol con Rf de 0.77, incluso con la cepa CBLA-104 la producción de este indol fue mayor que la producción de AIA, sin embargo, el valor de Rf demuestra que dicho compuesto debe tener una estructura muy similar al del AIA. En la tabla 5 se muestran las cepas que produjeron otro tipo de indoles y sus Rf correspondientes. En la figura 12 es posible observar que la cepa CBLA-234 también modificó la estructura del triptófano y produjo un compuesto que corrió con el frente del solvente, lo cual indica que este compuesto es más apolar que el AIA, no obstante, con estos resultados es difícil determinar si dicho compuesto tiene actividad auxínica, por lo que sería necesaria una prueba *in vivo* para determinar la actividad de cada extracto.



**Figura 12.** Cromatograma de cepas que mostraron presencia de indoles diferentes al AIA.

**Tabla 5.** Cepas con Rf de los indoles encontrados diferentes al AIA

Cepa	Rf
14	0.726
221	0.76
104	0.77
208	0.77
234	0.868
172	0.897
247	0.789
252	0.763
240	0.815
257	0.846
256	0.868

## 7. CONCLUSIONES

Con estos resultados es posible concluir que de las cepas solubilizadoras de fósforo estudiadas en este trabajo, algunas de ellas tienen además la capacidad de producir ácido indolacético y que esta capacidad las hace mejores candidatas para su uso en un producto biofertilizante. Sin embargo, algunas cepas a pesar de resultar positivas para la producción de AIA, no pueden ser utilizadas en un producto comercial debido a ser enterobacterias y por ello existen regulaciones estrictas en cuanto a la presencia de este tipo de microorganismos en los productos alimenticios, sin embargo eso no descarta el posible uso de los extractos de la fermentación de estas cepas, si dichos extractos se usan libres de células.

## 8. RECOMENDACIONES

Debido a que en algunas cepas probadas en esta investigación se encontraron diferentes tipos de indoles, es recomendable como trabajo a futuro, estudiar los extractos de estas bacterias por HPLC, para determinar cuáles son los otros productos encontrados; además de esto se recomienda probar *in vivo* el efecto auxínico de los extractos, para determinar si es necesaria una modificación al proceso para la aplicación directa del fermentado a los cultivos.

## 9. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. 2004. Plant Pathology. Quinta Edición. Editorial Elsevier Academic. Amsterdam. 922 pp.
- Armenta, A. D., García, C., Camacho, J. R., Apodaca, M. A., Montoya, L. G. y Nava, E. 2010. Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. Role of biofertilizers in the agricultural development in México. *Ra Ximhai*. 6 (1):51-56.
- Arshad, N., and Wt. Jr. Frankenberger, 1998. Plant Growth regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. *Adv. Agron.* 62: 146-151.
- Arteca, R. N. 1996. Plant Growth Substances Principles and Applications. Editorial Chapman & Hall. New York. 332 pp.
- Baca, B. E., and Elmerich C. 2007. Microbial production of plant hormones. En: Elmerich C., Newton WE, editors. Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers. pp. 113- 143.
- Bahat-Samet, E., Castro-Sowinski, S., Okon, Y. 2004. Arabinose Content of Extracellular Polysaccharide Plays a Role in Cell Aggregation of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters* (237):195 - 198.
- Bar, T., and Okon, Y. 1992. Tryptophan conversion to indole-3-acetic acid via indole-3-acetamide in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Can. J. Microbiol.* 39: 81-86.
- Barazani, O., and Friedman, J. 1999. Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? *Journal of Chemical Ecology*. 25 (10): 2397-2406.

- Biswas, J. C., Ladha, J. K. and Dazzo, F. B. 2000a. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. *Soil Sci. Soc. America J.*, 64: 1644–50.
- Bric, J. M., Bostock, R. M., Silvestone, S. E. 1991. Rapid In Situ Assay for Indoleacetic Acid production by Bacteria Immobilized on a Nitrocellulose Membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 57 (2): 535- 538.
- Brown, M. E. 1974. Seed and root bacterization. *Annual Review Phytopathology* 12: 181-197.
- Cassan, F., Bottini, R. Schneider, G., and Piccoli, P. 2001. *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum Lipoferum* Hydrolyze Conjugates of GA<sub>20</sub> and Metabolize The Resultant Aglycones To GA<sub>1</sub> in Seedlings of Rice Dwarf Mutants. *Plant Physiology*. (125) 2053-2058.
- Castillo, G., Altuna, B., Michelena, G., Sánchez Bravo, J., and Acosta, M. 2005. Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. In *Anales de Biología*. 27: 137-142.
- Castillo, G., Martinez, S. 1997. Reversed Phase C18 High-Performance Liquid Chromatography of Gibberelins GA<sub>3</sub> and GA<sub>1</sub>. *Journal of Chromatography A*. 782: 137-139.
- Cattelan, A. J., Hartel, P. G., Fuhrmann, J. J. 1999. Screening for Plant Growth–Promoting Rhizobacteria to Promote Early Soybean Growth, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 63: 1670–1680.
- Cheryl, P., and Glick, B. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42: 207-220.
- Córdova-Bautista, Y., Rivera-Cruz, M. C., Ferrera-Cerrato, R., Obrador-Olán, J. J., Córdova-Ávalos, V. 2009. Detección de bacterias benéficas en suelo con banano (*Musa AAA Simmonds*) cultivar 'Gran enano' y su potencial para

- integrar un biofertilizante. *Universidad y Ciencia. Trópico Húmedo*. 25 (3): 253-265.
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., and Okon, Y. 2003. Plant Growth Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences* 22: 107-143.
- Eichorst, S. A., Kuske, C. R., and Schmidt T. M. 2011. Influence of Plant Polymers on the Distribution and Cultivation of Bacteria in the Phylum *Acidobacteria*, *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (2):586-596.
- Fallik, E., Sarig, S., and Okon, Y. 1994. Morphology and physiology of plant roots associated with *Azospirillum*. In *Azospirillum/plant associations*. Ed. Y. Okon. CRC Press Boca Raton, FL USA. pp. 77–86.
- Frankenberger, Jr. W. T., and Arshad, M. 1995. Microbial Synthesis of Auxins. In: *Phytohormones in soils*. Frankenberger, Jr. W. T. and M. Arshad (Eds.). Marcel Dekker Inc. New York, USA. pp. 35-71.
- Glick, B. R., Patten, C. L., Holguin, G., and Penrose, D. M. 1999. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial College press. London. 270 pp.
- Gray, E., and Smith, D. 2005. Intracellular and Extracellular PGPR: Commonalities and Distinctions in the Plant-Bacterium signaling processes. *Soil Biology & Biochemistry*. (37) 395-402.
- Haichar, F. Z., Marol, C., Berge, O., Rangel-Castro, J. I., Prosser, J. I., Balesdent, J., Heulin, T., and Achouak, W. 2008. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The International Society for Microbial Ecology (ISME) Journal*. 2: 1221–1230.

- Hasan, H. A. H. 2002. Gibberellin and Auxin Production by Plant Root-Fungy and their Biosynthesis Under Salinity – Calcium Interaction. *Rostlinná Výroba*. (3) 101 -106.
- Heldt, H. W. 1997. *Plant Biochemistry & Molecular Biology*. Oxford University Press, Oxford. 522 pp.
- Jagnow, G., and David, W. 1991. *Bioteconología: Introducción con Experimento Modelo*. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 251 pp.
- Jain, D. K., and Patriquin, D. G. 1985. Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching of wheat root hairs. *Can. J. Microbiol.* 31: 206-210.
- Jones, D. L., Darrah, P:R., Kochian, L. V. 1994. Amino acid influx at the soil-root interface of *Zea mays* L. and its implications in the rhizosphere. *Plant and Soil*, 163 (1-12).
- Jork, H., Funk, W., Fischer, W., Wimmer, H., and Burns, D. T. 1991. Thin-layer chromatography. Reagents and detection methods. Physical and chemical detection methods: fundamentals, reagents I. Volume 1a: VCH, Weinheim, Germany. 464 pp.
- Kämpfer, P., Ruppel, S., and Remus, R. 2005. *Enterobacter radicincitans* sp. nov., a plant growth promoting species of the family Enterobacteriaceae. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(3): 213-221.
- Kapulnik, Y. 2002. Plant Growth Promoting by Rhizosphaera Bacteria. *Plant Roots The Hidden Half*. Ed Marcel Dekker. Nueva York. Estados Unidos de América. 869-887 pp.
- Karadeniz, A., Topcuglo, S., and Inan, S. 2006. Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 22:1061–1064.

- Kim, K. Y., Jordan, D., and McDonald, G. A. 1998. Effect of phosphatesolubilizing bacteria and vesicular–arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biol. Fertil. Soils*. 26: 79–87.
- Kloepper, J. W. 1993. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. In: Metting. *Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management*, Marcel Dekker Inc. New York, USA. pp. 255-274.
- Kloepper, J. W., and Schroth, M. N. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: *Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*. Gilbert-Clarey, Tours, France. pp. 879–882.
- Krujatz, F., Haarstrick, A., Nörtemann, B., and Greis, T. 2012. Assessing the Toxic Effects of Nickel, Cadmium and EDTA on Growth of the Plant Growth-Promoting *Rhizobacterium*, *Pseudomonas brassicacearum*, *Water Air Soil Pollut*. 223: 1281–1293.
- Lambrecht, M. Y., Okon, A., Vande, B. and Vanderleyden, J. 2000. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends Microbiol*. 8: 298-300.
- Leopold, A. C. 1960. *Auxins and Plant Growth*. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, California. 354 pp.
- Loon, L. C. 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur J Plant Pathol* 119:243–254.
- Lukwill, L. C. 1994. *Growth Regulators in Crop Production*. Primera Edición en español, Ed. Oikus-Tau. España. 59 pp.
- Mac Faddin, J. F. 1984. *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. pp. 104-111.

- Mashiguchia, K., Tanakaa, K., Sakaic, T., Sugawaraa, S., Kawaideb, H., Natsumeb, M., Hanadaa, A., Yaenaa, T., Shirasua, K., Yaod, H., McSteend, P., Zhao, Y., Hayashif, K., Kamiyaa, Y. and Kasahara, H. 2011. The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*, Proceedings of the National Academy of Sciences. 108 (45): 18512-18517.
- Mehnaz, S., Mirza, M. S., Haurat, J., Bally, R., Normand, P., Bano, A., and Mallik, K. A. 2001. Isolation and 16S rRNA sequence analysis of the beneficial bacteria from the rhizosphere of rice. Canadian Journal of Microbiology, 47 (2): 110-117.
- Naqvi, S. S. M. 2002. Plant Growth Hormones: Growth Promoters and Inhibitors. Capítulo 24 en Handbook of Plant and Crop Physiology. Segunda Edición. Ed. Pessarakli M., Editorial Marcel Dekker, Inc. New York, USA. pp. 527-556.
- Paal, A. 1918. Über phototropische reizleitung. Jahr. Wiss. Bot, 58, 406-458.
- Patten, C. H., and Glick, B. 2002. Role of *Pseudomonas putida* Indolacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. Appl. Environ. Microbiol. 68: 3795-3801.
- Patten, C. H., and Glick, BR. 1996. Bacterial biosynthesis of Indole-3-acetic acid (review). Canadian Journal of Microbiology, 42: 207-220.
- Piné, R., Corona, J. J., 2009. Técnicas de análisis del aceite de oliva. En Gutiérrez, A., Carretero, A. (Ed.). El Aceite de Oliva Virgen: Tesoro de Andalucía. Servicio de Publicaciones de la Fundación Unicaja. Málaga, España. pp. 247-286.
- Ping, L. 2004. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. Plant Science. Alemania. 9(8): 263-266.

- Sarwar, M., and Kremer, R. J. 1995. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method, *Lett. Appl. Microbiol.*, 20: 282-285.
- Schnider, U., Blumer, C., Troxler, J., Defago, G., and Haas, D. 1994. Overproduction of antibiotics 2,4 diacetylphloroglucinol and pyoluteorin in *Pseudomonas fluorescence* strain CHAO. Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization 120-121.
- Skoog, Douglas A., Leary, J. 1993. Análisis Instrumental. Cuarta edición. Mc Graw-Hill. Madrid, España. 935 pp
- Soberón, J. R., Quiroga, E. N., Sampietro, A. R., and Vattuore, M. A. 2005. Auxinas. Hipertextos del Área de Biología. República de Argentina. [En línea]  
[http://www.biologia.edu.ar/plantas/reguladores\\_vegetales\\_2005/tipos\\_de\\_reguladores\\_vegetales.htm](http://www.biologia.edu.ar/plantas/reguladores_vegetales_2005/tipos_de_reguladores_vegetales.htm)
- Solano, R. B. 2000. Estudio de la capacidad de dos cepas bacterianas del género “*Bacillus*” para promover el crecimiento vegetal. Tesis doctoral. Madrid Universidad San Pablo CEU. Facultad de Ciencias Experimentales y Técnicas. Madrid, España. 241 pp.
- Strigul, N., and Kravchenko, L. 2005. Mathematical modeling of PGPR inoculation in to the rhizosphere. *Environmental Modeling & Software*. 21(8): 1158-1171.
- Surette, M., and Sturtz, A. 2003. Bacterial endophytes in processing carrots (*Dacus carota* L. var. Sativus): their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. *Plant and soil*. 253: 381-390.
- Taiz, L., and Zeiger, E. 2006. *Plant Physiology*. 4<sup>th</sup> Edition. Editorial Sinauer, New York. 690 pp.

- Tien, T. M., Gaskins, M. H. and Hubbell, D. H. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 1016-1024.
- Tisdale, S. L., and Nelson, W. L. 1975. *Soil Fertility and Fertilizers*. 3<sup>rd</sup> Edition. Macmillan Publishing, New York, USA. 694 pp.
- Tsavkelova, E., Cherdyntseva, T., Netrusov, A. 2005. Auxin production by bacteria associated with orchid roots. *Microbiology.* 74: 46-53.
- Vargas, P. D., Cerrato, R. F., Suárez, J. A., and González, G. A. 2001. Inoculation of Plant Growth – Promoting Bacteria in Lettuce. *Instituto de Recursos Naturales, Colegio de Postgraduados* (19) 327-335.
- Vasanthakumar, A., and McManus P. 2004. Indole-3-Acetic Acid-Producing Bacteria Are Associated with Cranberry Stem Gall. *The American Phytopathological Society.* 94(11): 1164-1171.
- Vessey, J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers, *Plant and Soil.* 255: 571–586.
- Vessey, J. K., and Buss, T. J. 2002. *Bacillus cereus* UW85 inoculation effects on growth, nodulation, and N accumulation in grain legumes. *Controlled-environment studies. Can. J. Plant Sci.* 82:282–290.
- Vyas, P., and Gulati A. 2009. Organic acid production *in vitro* and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas BMC*. *Microbiology .* 9: 174-188.
- Waisel, Y., Eshel, A., and Kafkafi, U. 2002. *Plant Roots. The Hidden Half*. 3<sup>rd</sup> Edition. Marcel Dekker Inc. New York, USA. 1120 pp.
- Weaver, J. R. 1982. *Reguladores de Crecimiento de las Plantas en la Agricultura*. Editorial Trillas, S. A. México. 622 pp.

Yang, S., Zhang, Q., Guo, J., Charkowski, A. O., Glick, B. R., Ibekwe, A. M., Cooksey, D. A., and Yang, C. 2007. Applied and Environmental Microbiology. 73 (4): 1079–1088.

Zakharova, E. A., Shcherbakov, A., Vitaly, V., Nataliya, G. 1999. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. Insights from quantum chemistry. Eur. J. Biochem. 259: 572-576.

Zhao, Y. 2010. Auxin biosynthesis and its role in plant development, Ann Rev Plant Biol. Section of Cell and Developmental Biology, University of California, San Diego, La Jolla, California. 61: 49–64.