



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

---

---

**PRODUCCIÓN DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO EN CEPAS  
BACTERIANAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

**NADIA QUITERIO FLORES**

ASESOR:

**DR. GUSTAVO YÁÑEZ OCAMPO**

COASESORA:

**DRA. LAURA ALEJANDRA SÁNCHEZ PAZ**

EDO. MÉXICO, MÉXICO, 2023

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	7
ÍNDICE DE TABLAS.....	9
RESUMEN.....	11
<i>Abstract</i> .....	12
1. INTRODUCCIÓN .....	13
2. MARCO TEÓRICO .....	14
2.1 Suelo.....	14
2.1.1 Macro y micronutrientes del suelo para el crecimiento vegetal.....	14
2.1.2 Rizosfera.....	15
2.1.3 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) .....	16
2.1.4 Bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) .....	17
2.1.5 Relaciones raíz - microorganismo.....	18
2.2 Fitohormonas .....	20
2.2.1 Auxinas: el ácido indol-3-acético (AIA) .....	20
2.2.2 Producción de ácido indol-3-acético (AIA) en bacterias.....	21
2.2.3 Biosíntesis de ácido indol-3-acético (AIA) en bacterias: rutas dependientes de L-triptófano (Trp) .....	21
2.2.3.1 Ruta del ácido indol-3-pirúvico (AIP) .....	22
2.2.3.2 Ruta del indol-3-acetamida (IAM) .....	22
2.2.3.3 Ruta del indol-acetaldoxima (IAOx) / indol-3-acetonitrilo (IAN) .....	23
2.2.4 Cuantificación de la producción de ácido indol-3-acético (AIA) por espectrofotometría .....	24
2.3 Caracterización bioquímica de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) .....	25
2.3.1 Medios de cultivo para la caracterización bioquímica de bacterias .....	25
2.3.1.1 Agar hierro triple azúcar (TSI).....	26
2.3.1.2 Hidrólisis de almidón.....	27
2.3.1.3 Citrato de Simmons.....	28
2.3.1.4 Ácido indol-3-acético (AIA) .....	29
2.3.1.5 Sulfuro indol movilidad (SIM) .....	31
2.3.1.6 Motilidad indol ornitina (MIO).....	32
2.3.1.7 Reducción de nitratos .....	34

2.3.1.8	<i>Catalasa</i> .....	35
2.3.1.9	<i>Oxidasa</i> .....	35
2.3.2	Tinción de Gram .....	36
<b>2.4</b>	<b>Biotecnología agrícola</b> .....	<b>37</b>
2.4.1	Biofertilizantes .....	38
2.4.2	Aplicación de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV), productoras de ácido indol-3-acético (AIA), como biofertilizantes .....	39
<b>3.</b>	<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>40</b>
<b>4.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>42</b>
<b>5.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>43</b>
<b>5.1</b>	<b>General</b> .....	<b>43</b>
<b>5.2</b>	<b>Específicos</b> .....	<b>43</b>
<b>6.</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>43</b>
<b>7.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>44</b>
<b>7.1</b>	<b>Material biológico</b> .....	<b>44</b>
<b>7.2</b>	<b>Reactivación del material biológico</b> .....	<b>44</b>
7.2.1	Procedimiento de reactivación en agar nutritivo .....	44
7.2.2	Procedimiento de reactivación en agar Pikovskaya .....	45
<b>7.3</b>	<b>Caracterización bioquímica del cepario de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF)</b> .....	<b>45</b>
7.3.1	Agar hierro triple azúcar (TSI) .....	45
7.3.2	Hidrólisis de almidón .....	46
7.3.3	Citrato de Simmons .....	47
7.3.4	Ácido indol-3-acético (AIA) .....	47
7.3.5	Sulfuro indol movilidad (SIM) .....	48
7.3.6	Movilidad indol ornitina (MIO) .....	49
7.3.7	Reducción de nitratos .....	49
7.3.8	Catalasa .....	50
7.3.9	Oxidasa .....	51
7.3.10	Tinción de Gram .....	51
<b>7.4</b>	<b>Caracterización macroscópica</b> .....	<b>51</b>
<b>7.5</b>	<b>Producción de inóculo en el medio de cultivo caldo PY</b> .....	<b>51</b>
<b>7.6</b>	<b>Construcción de la curva de calibración de ácido indol-3-acético (AIA)</b> .....	<b>52</b>

<b>7.7</b>	<b>Comparación de la producción de ácido indol-3-acético (AIA) entre las cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF)</b> .....	<b>53</b>
<b>7.8</b>	<b>Diseño experimental para las cinéticas de producción de ácido indol-3-acético (AIA)</b> .....	<b>53</b>
7.8.1	Cinéticas de producción de ácido indol-3-acético (AIA) .....	54
7.8.1.1	<i>Cuantificación del crecimiento bacteriano</i> .....	54
7.8.1.2	<i>Cuantificación de AIA bacteriano producido</i> .....	55
7.8.1.3	<i>Determinación del pH en el medio de cultivo</i> .....	55
<b>7.9</b>	<b>Análisis estadístico</b> .....	<b>55</b>
<b>8.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>56</b>
<b>8.1</b>	<b>Caracterización macroscópica y bioquímica del cepario de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF)</b> .....	<b>56</b>
<b>8.2</b>	<b>Comparación de la producción de ácido indol-3-acético (AIA) entre las cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF)</b> .....	<b>62</b>
8.2.1	Selección de la cepa bacteriana solubilizadora de fosfato (BSF) con mayor producción de ácido indol-3-acético (AIA).....	63
<b>8.3</b>	<b>Cinéticas de producción de ácido indol-3-acético (AIA)</b> .....	<b>64</b>
8.3.1	Cuantificación del crecimiento bacteriano .....	64
8.3.2	Cuantificación de ácido indol-3-acético (AIA) bacteriano producido.....	67
8.3.3	Determinación del pH en el medio de cultivo .....	71
<b>9.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>73</b>
<b>10.</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>74</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Vía del ácido indol-3-pirúvico (AIP). <b>Trp:</b> L-triptófano; <b>IAAId:</b> indol-3-acetaldehído; <b>AIA:</b> ácido indol-3-acético (Duca <i>et al.</i> , 2014).....	22
<b>Figura 2.</b> Vía del indol-3-acetamida (IAM). <b>Trp:</b> L-triptófano; <b>IAN:</b> indol-3-acetonitrilo; <b>IAOx:</b> indol-3-acetaldoxima; <b>AIA:</b> ácido indol-3-acético (Duca <i>et al.</i> , 2014).....	23
<b>Figura 3.</b> Vía del indol-acetaldoxima (IAOx) / indol-3-acetonitrilo (IAN). <b>Trp:</b> L-triptófano; <b>AIA:</b> ácido indol-3-acético (Duca <i>et al.</i> , 2014).....	24
<b>Figura 4.</b> Prueba bioquímica agar hierro triple azúcar (TSI). <b>A:</b> el microorganismo no fermenta azúcares; <b>B:</b> el microorganismo solo fermenta glucosa; <b>C:</b> el microorganismo fermenta las tres azúcares; <b>D:</b> el microorganismo produce ácido sulfhídrico (H <sub>2</sub> S); <b>E:</b> el microorganismo produce gas durante el proceso de fermentación de las azúcares. Figura creada con BioRender ( <a href="https://biorender.com/">https://biorender.com/</a> ).....	27
<b>Figura 5.</b> Prueba bioquímica hidrólisis de almidón. <b>(+)</b> Positiva; <b>(-)</b> Negativa. Figura creada con BioRender ( <a href="https://biorender.com/">https://biorender.com/</a> ).....	28
<b>Figura 6.</b> Prueba bioquímica citrato de Simmons. <b>(+)</b> Positiva; <b>(-)</b> Negativa. Figura creada con BioRender ( <a href="https://biorender.com/">https://biorender.com/</a> ).....	29
<b>Figura 7.</b> Prueba bioquímica de ácido indol-3-acético (AIA). <b>(+)</b> Positiva; <b>(-)</b> Negativa. Figura creada con BioRender ( <a href="https://biorender.com/">https://biorender.com/</a> ).....	30
<b>Figura 8.</b> Prueba bioquímica sulfuro indol movilidad (SIM). <b>A:</b> negativa para producción de ácido indol-3-acético (AIA), ácido sulfhídrico (H <sub>2</sub> S) y movilidad; <b>B:</b> positiva para producción de H <sub>2</sub> S; <b>C:</b> positiva para producción de AIA; <b>D:</b> positiva para movilidad. Figura creada con BioRender ( <a href="https://biorender.com/">https://biorender.com/</a> ).....	32
<b>Figura 9.</b> Prueba bioquímica motilidad indol ornitina (MIO). <b>A:</b> negativa para la actividad enzimática ornitina descarboxilasa, producción de ácido indol-3-acético (AIA) y movilidad; <b>B:</b> positiva para la actividad enzimática ornitina descarboxilasa; <b>C:</b> positiva para la producción de AIA; <b>D:</b> positiva para movilidad. Figura creada con BioRender ( <a href="https://biorender.com/">https://biorender.com/</a> ).....	33
<b>Figura 10.</b> Prueba bioquímica reducción de nitratos. <b>(+)</b> Positiva; <b>(-)</b> Negativa. Figura creada con BioRender ( <a href="https://biorender.com/">https://biorender.com/</a> ).....	34
<b>Figura 11.</b> Prueba bioquímica catalasa. <b>(+)</b> Positiva; <b>(-)</b> Negativa. Figura creada con BioRender ( <a href="https://biorender.com/">https://biorender.com/</a> ).....	35

<b>Figura 12.</b> Prueba bioquímica oxidasa. <b>(+)</b> Positiva; <b>(-)</b> Negativa. Figura creada con BioRender ( <a href="https://biorender.com/">https://biorender.com/</a> ).....	36
<b>Figura 13.</b> Tinción de Gram. <b>Izquierda:</b> bacterias Gram positivas (+); <b>Derecha:</b> bacterias Gram negativas (-). Figura creada con BioRender ( <a href="https://biorender.com/">https://biorender.com/</a> ).....	37
<b>Figura 14.</b> Diseño experimental para las cinéticas de producción de ácido indol-3-acético (AIA). <b>A:</b> para la cepa seleccionada; <b>B:</b> para la cepa <i>E. coli</i> ATCC 25922 (control positivo). <b>Trp:</b> L-triptófano; <b>R1, 2 y 3:</b> replicas experimentales de los tratamientos (500, 1000 y 1500 µg/mL de Trp); <b>DO:</b> densidad óptica; <b>x3:</b> número de repeticiones analíticas para cada parámetro monitoreado. Figura creada con BioRender ( <a href="https://biorender.com/">https://biorender.com/</a> ). .....	54
<b>Figura 15.</b> Caracterización macroscópica de las cuatro cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) y la cepa <i>E. coli</i> ATCC 25922, en agar nutritivo, 24 h después de la incubación. <b>A:</b> fotografía de las colonias bacterianas de la cepa <i>E. coli</i> ATCC 25922, que ejemplifican el tamaño pequeño, forma redonda, coloración blanquecina y opaca; <b>B:</b> fotografía de una colonia de la cepa 4, que ejemplifica el tamaño mediano, forma irregular, coloración beige y opaca.....	57
<b>Figura 16.</b> Producción de ácido indol-3-acético (AIA) por las cuatro cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) y el control positivo <i>E. coli</i> ATCC 25922, en caldo triptófano marca Condalab® .....	63
<b>Figura 17.</b> Análisis estadístico de la producción de ácido indol-3-acético (AIA) por las cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) a las 72 h de incubación, en caldo triptófano marca Condalab® .....	64
<b>Figura 18.</b> Cuantificación del crecimiento bacteriano por densidad óptica (DO) en el medio de cultivo caldo PY adicionado con tres concentraciones de L-triptófano (Trp), para la cepa 2 y el control positivo <i>E. coli</i> ATCC 25922. <b>A:</b> con 500 µg/mL de Trp; <b>B:</b> con 1000 µg/mL de Trp; <b>C:</b> con 1500 µg/mL de Trp.....	66
<b>Figura 19.</b> Concentración de ácido indol-3-acético (AIA) bacteriano en el medio de cultivo caldo PY, adicionado con tres concentraciones de L-triptófano (Trp), para la cepa 2 y el control positivo <i>E. coli</i> ATCC 25922. <b>A:</b> con 500 µg/mL de Trp; <b>B:</b> con 1000 µg/mL de Trp; <b>C:</b> con 1500 µg/mL de Trp. ....	69

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Ácidos orgánicos y sus rutas biosintéticas en bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) (Paredes-Mendoza y Espinosa-Victoria, 2010).....	18
<b>Tabla 2.</b> La naturaleza de la resistencia sistémica inducida (RSI) en plantas (Van Loon, 2007).....	19
<b>Tabla 3.</b> Biofertilizantes a base de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV), productoras de ácido indol-3-acético (AIA), utilizados en la agricultura (Ona <i>et al.</i> , 2003).....	39
<b>Tabla 4.</b> Antecedentes de la cuantificación de ácido indol-3-acético (AIA) producido por rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV), a través de métodos espectrofotométricos (Erturk <i>et al.</i> , 2010; Lwin <i>et al.</i> , 2012; Meliani <i>et al.</i> , 2017; Kumari <i>et al.</i> , 2018; Sherpa <i>et al.</i> , 2021).....	40
<b>Tabla 5.</b> Composición, en gramos, del agar nutritivo comercial Condalab <sup>®</sup> , para su preparación en un litro de agua destilada (Condalab, 2021). ....	44
<b>Tabla 6.</b> Composición, en gramos, del medio sólido agar Pikovskaya, para su preparación en un litro de agua destilada (Hernández-Leal <i>et al.</i> , 2011; Aguilar-Rivera, 2020).....	45
<b>Tabla 7.</b> Composición, en gramos, del medio comercial agar hierro triple azúcar (TSI) BD Bioxon <sup>®</sup> , para su preparación en un litro de agua destilada (BD Bioxon, 2003; Hajna, 2003). ....	46
<b>Tabla 8.</b> Reactivos y procedimientos para la preparación de 100 mL de agar almidón (Saavedra, 2017; Condalab, 2021).....	46
<b>Tabla 9.</b> Composición, en gramos, del reactivo Lugol, para su preparación en 100 mL de agua destilada (Ramírez-Gama <i>et al.</i> , 2008).....	47
<b>Tabla 10.</b> Composición, en gramos, del medio comercial agar citrato de Simmons BD Bioxon <sup>®</sup> , para su preparación en un litro de agua destilada (MacWilliams, 2009; BD Bioxon, 2015).....	47
<b>Tabla 11.</b> Composición, en gramos, del medio comercial caldo triptófano Condalab <sup>®</sup> , para su preparación en un litro de agua destilada (Condalab, 2019). ....	48
<b>Tabla 12.</b> Composición del reactivo de Kovacs (Ramírez-Gama <i>et al.</i> , 2008).....	48
<b>Tabla 13.</b> Composición, en gramos, del medio comercial sulfuro indol movilidad (SIM) BD Bioxon <sup>®</sup> , para su preparación en un litro de agua destilada (BD Bioxon, 2008).....	48

<b>Tabla 14.</b> Composición, en gramos, del medio comercial movilidad indol ornitina (MIO) BD Bioxon®, para su preparación en un litro de agua destilada (BD Bioxon, 2007).....	49
<b>Tabla 15.</b> Composición, en gramos, del medio líquido caldo nitratos, para su preparación en 30 mL de agua destilada (Viera-Oramas <i>et al.</i> , 2014). .....	50
<b>Tabla 16.</b> Composición de los reactivos de Griess A y B (Ramírez-Gama <i>et al.</i> , 2008)....	50
<b>Tabla 17.</b> Composición, en mililitros, de la solución de peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) (Reiner, 2010).....	50
<b>Tabla 18.</b> Composición, en gramos, del medio de cultivo caldo PY, para su preparación en un litro de agua destilada (Aguilar-Rivera, 2020). .....	52
<b>Tabla 19.</b> Composición, en mililitros, del reactivo de Salkowski (Gordon y Weber, 1950).	52
<b>Tabla 20.</b> Caracterización macroscópica de las cuatro cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) y la cepa <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	56
<b>Tabla 21.</b> Caracterización bioquímica de las cuatro cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) y la cepa <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	58
<b>Tabla 22.</b> Ceparío de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) identificadas a través del análisis del gen 16S rRNA (Sánchez-González <i>et al.</i> , 2023).....	61
<b>Tabla 23.</b> Velocidad de producción de ácido indol-3-acético (AIA), a las 24 h de incubación, para la cepa 2 y el control positivo <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	71
<b>Tabla 24.</b> Cuantificación del pH en el medio de cultivo caldo PY adicionado con 500, 1000 y 1500 µg/mL de L-triptófano (Trp), para el control negativo, la cepa 2 y el control positivo <i>E. coli</i> ATCC 25922, a las 0 y 96 h de incubación. ....	71

## RESUMEN

Las bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) sintetizan ácido indol-3-acético (AIA) a partir del L-triptófano (Trp). El AIA bacteriano mejora el crecimiento en cultivos de importancia económica, principalmente mediante el aumento en el número y longitud de las raíces. Por esta razón, las BSF son potencialmente atractivas en la biotecnología agrícola como biofertilizantes. En el presente trabajo se evaluó la producción de AIA en cuatro cepas BSF, mediante cinéticas en medio líquido, para su aplicación como biofertilizantes. Inicialmente, las BSF se caracterizaron mediante pruebas bioquímicas de interés biotecnológico. Asimismo, se realizó una caracterización macroscópica de las colonias en crecimiento de las BSF. Se confirmó la producción de AIA en las cuatro cepas de BSF y, de manera cuantitativa se evaluó el AIA producido mediante el método espectrofotométrico del reactivo de Salkowski. Posteriormente, con una prueba de rangos múltiples LSD de Fisher (95% de confianza), se seleccionó a la BSF que mostró una mayor producción de AIA. Las cinéticas de producción de AIA se llevaron a cabo con la cepa seleccionada. Para ello, se trabajaron tres tratamientos, en el medio de cultivo caldo PY, adicionado con 500, 1000 y 1500 µg/mL de Trp. En cada tratamiento se monitoreó el crecimiento bacteriano por densidad óptica (DO), la producción de AIA por el método de Salkowski y el pH del medio de cultivo. Los resultados obtenidos en este trabajo evidenciaron que las cuatro cepas de BSF muestran propiedades bioquímicas de interés biotecnológico, como la utilización de diversas fuentes de carbono y síntesis de enzimas contra el daño oxidativo. Las cuatro cepas de BSF produjeron AIA; sin embargo, la cepa 2 fue la que demostró una mayor producción de AIA con 4.5 µg/mL; mientras que las cepas 1, 3 y 4 produjeron 3.5, 3.0 y 3.7 µg/mL de AIA, respectivamente, a las 72 h de incubación. La evaluación del crecimiento bacteriano demostró que la producción de AIA está asociada con el crecimiento celular. Lo mismo ocurre con el pH del medio de cultivo, el cual disminuyó al mismo tiempo que la cepa 2 comenzó a sintetizar AIA. En cuanto a las cinéticas de producción de AIA, en los tratamientos con 500 y 1000 µg/mL de Trp en el medio de cultivo caldo PY, la cepa 2 produjo 2.2 y 4.0 µg/mL de AIA, respectivamente, a las 96 h de incubación. En el tratamiento con 1500 µg/mL, la cepa 2 produjo 4.2 µg/mL de AIA, a las 24 h de incubación. Estos datos sugieren que la cantidad de AIA producido es directamente proporcional al Trp adicionado al medio de cultivo. En conclusión, de las cuatro cepas de BSF, la cepa 2 fue la que demostró una mayor producción de AIA. Además, exhibió actividades metabólicas de interés biotecnológico como la síntesis de enzimas catalasa y oxidasa, descarboxilación del aminoácido L-ornitina (Orn) y utilización de fuentes de carbono tanto orgánicas como inorgánicas. Por lo tanto, la cepa 2 es potencialmente prometedora para su aplicación en la biotecnología agrícola como biofertilizante.

## *Abstract*

Phosphate solubilizing bacteria (PSB) synthesize indole-3-acetic acid (IAA) from L-tryptophan (Trp). Bacterial IAA improves growth in economically important crops, mainly by increasing the number and length of roots. Therefore, PSB are potentially attractive in agricultural biotechnology as biofertilizers. In the present work, the production of IAA by four PSB strains was evaluated, through kinetics in liquid medium, for its application as biofertilizers. Initially, the PSB were characterized by biochemical tests with interest in biotechnology. Likewise, a macroscopic characterization of the growing colonies of the BSF was carried out. The production of IAA by the four PSB strains was confirmed, and the IAA produced was quantitatively evaluated by the Salkowski reagent spectrophotometric method. With a Fisher's LSD multiple range test (95% confidence), the PSB that exhibited the highest IAA production was selected. The IAA production kinetics were carried out with the selected strain. For this, three treatments were worked in PY broth culture medium, added with 500, 1000, and 1500  $\mu\text{g/mL}$  of Trp. In each treatment, bacterial growth was monitored by optical density (OD), IAA production by the Salkowski method, and pH of the culture medium. The results obtained in this work showed that the four PSB strains exhibit biochemical properties of biotechnological interest, such as using various carbon sources and enzyme synthesis against oxidative damage. All four PSB strains produced IAA; however, strain 2 was the one that showed the highest IAA production with 4.5  $\mu\text{g/mL}$ ; while strains 1, 3, and 4 produced 3.5, 3.0, and 3.7  $\mu\text{g/mL}$  of IAA, respectively, after 72 h of incubation. The evaluation of bacterial growth demonstrated that the production of IAA is associated with cell growth. The same occurs with the pH of the culture medium, which decreased while strain 2 began to synthesize IAA. Regarding the kinetics of IAA production, in the treatments with 500 and 1000  $\mu\text{g/mL}$  of Trp in PY broth culture medium, strain 2 produced 2.2 and 4.0  $\mu\text{g/mL}$  of IAA, respectively, at 96 h of incubation. In the treatment with 1500  $\mu\text{g/mL}$ , strain 2 produced 4.2  $\mu\text{g/mL}$  of IAA, after 24 h of incubation. These data suggest that the amount of IAA produced is directly proportional to the Trp added to the culture medium. In conclusion, of the four BSF strains, strain 2 was the one that showed the highest IAA production. In addition, it exhibited metabolic activities of biotechnological interest such as the synthesis of catalase and oxidase enzymes, decarboxylation of the amino acid L-ornithine (Orn), and utilization of both organic and inorganic carbon sources. Therefore, strain 2 is potentially promising for its application in agricultural biotechnology as a biofertilizer.

## 1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha incrementado considerablemente la demanda alimenticia, por lo que, a su vez, la producción agrícola se ha intensificado. Para hacer frente a esto, los productores se han vuelto cada vez más dependientes a los agroquímicos (fertilizantes y plaguicidas) (Gavrilescu y Chisti, 2005; Grageda-Cabrera *et al.*, 2012).

No obstante, el uso intensivo de fertilizantes en los cultivos ha causado serios problemas que afectan no solo a la salud humana, sino también, a la calidad del suelo. El fósforo es un macronutriente que, cuando se adiciona en forma de fertilizante, se adsorbe, por lo que aproximadamente el 80% no está disponible (Grageda-Cabrera *et al.*, 2012).

Debido a esto, se presenta una exigencia creciente, por parte de los mismos agricultores y consumidores, del empleo de nuevos métodos que reemplacen o, al menos, complementen las estrategias ya existentes basadas en productos químicos sintéticos (Gavrilescu y Chisti, 2005; Grageda-Cabrera *et al.*, 2012).

La biotecnología agrícola es un conjunto de herramientas y disciplinas destinadas, principalmente, a lograr un mayor rendimiento de los cultivos a través, por ejemplo, del aumento en el contenido de fósforo disponible; alternativa que puede contribuir a reemplazar a los agroquímicos convencionales (Ningsih-Susilowati *et al.*, 2002; Thieman y Palladino, 2010).

Desde esta perspectiva, se está explorando la biodiversidad de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV), específicamente de las bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF), ya que presentan diferentes actividades metabólicas, tales como la solubilización de fósforo, fijación de nitrógeno, producción de sideróforos, síntesis de ácido indol-3-acético (AIA), así como, la producción de metabolitos con actividad antagónica (antibióticos y quitinasas). Gracias a esto pueden ser consideradas como biofertilizantes (Berg, 2009; Thieman y Palladino, 2010).

Para que las BSF se apliquen como biofertilizantes en la agricultura, idealmente deberían mostrar más de una de las actividades metabólicas antes mencionadas. En particular, es deseable la solubilización de fósforo y producción de fitohormonas como las auxinas; siendo la más crucial de estas, el AIA, el cual se sintetiza a partir del metabolismo del aminoácido triptófano. El AIA estimula la germinación de semillas, así como, mejora el crecimiento en muchos cultivos de importancia económica al incrementar la longitud de las raíces (Sharma *et al.*, 2002; Gavrilescu y Chisti, 2005; De Souza *et al.*, 2015).

Hoy en día, la utilización de inoculantes bacterianos atrae cada vez mayor atención como una alternativa económica y segura con respecto a los agroquímicos; lo que podría contribuir significativamente a reducir su uso en todo el mundo. Por esta razón, en el presente trabajo se estudia la producción de AIA por cuatro cepas bacterianas solubilizadoras de fosfato, aisladas del suelo, con uso potencial en la biotecnología agrícola.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Suelo

El suelo es un cuerpo natural que cubre la mayor parte de la superficie terrestre. Posee las condiciones adecuadas para que exista una gran diversidad microbiana capaz de realizar procesos que ayudan al sostenimiento de este. Se encuentra conformado por rocas y distintas capas, u horizontes, que pueden componerse de materia orgánica y/o minerales. En el suelo se desarrollan la mayor parte de los ciclos vitales microbianos, además, es una importante fuente de macro y micronutrientes. Entre las funciones del suelo destacan su capacidad para actuar como regulador del ciclo del agua, retener sustancias y favorecer la transpiración de aire a través de la superficie, así como, de actuar como amortiguador frente a agentes nocivos. Estas condiciones hacen posible la presencia de diferentes microorganismos que por las funciones metabólicas que cumplen, aumentan la cantidad de nutrientes asimilables para la planta, fortalecen la relación simbiótica con las raíces y, por ende, promueven el crecimiento vegetal (Corrales-Ramírez *et al.*, 2014).

#### 2.1.1 Macro y micronutrientes del suelo para el crecimiento vegetal

El efecto de los nutrientes en el crecimiento y desarrollo de las plantas se ha estudiado durante más de 350 años. Hoy en día, se han descubierto más de cien elementos químicos, pero solo diecisiete de ellos, denominados como nutrientes esenciales para el crecimiento vegetal, interfieren en los diferentes estadios y funciones de la planta (Coruzzi y Bush, 2014).

La clasificación de un elemento como esencial se lleva a cabo a partir de cuatro criterios: 1) la planta no puede completar su ciclo de vida (semilla a semilla nueva) sin él, 2) la función del elemento no puede ser reemplazada por otro elemento, 3) el elemento está directamente involucrado en el crecimiento y reproducción de la planta y 4) la mayoría de las plantas necesitan este elemento para sobrevivir (Jones y Jacobse, 2001; Coruzzi y Bush, 2014).

De esta manera, tres de los diecisiete elementos esenciales, carbono (C), hidrógeno (H) y oxígeno (O), representan aproximadamente el 95% de la biomasa vegetal y son considerados nutrientes no minerales porque se derivan del aire y el agua. Al resto, se les conoce como nutrientes minerales. Dichos nutrientes no minerales, junto al nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S), son denominados macronutrientes, los cuales comprenden el 0.1 - 5% del tejido vegetal seco. De estos, el N, P y K, a menudo se clasifican como macronutrientes primarios, ya que sus deficiencias son más comunes que las de los macronutrientes secundarios (Ca, Mg y S). Por su parte, los micronutrientes, que comprenden menos del 0.025% del tejido vegetal seco, incluyen al boro (B), cloro (Cl), cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), níquel (Ni) y zinc (Zn) (Jones y Jacobse, 2001; Macedo-Ferreira, 2012).

Los nutrientes, ubicados en diferentes zonas del suelo, se mueven libremente a través de las raíces. Por ello, algunas plantas extienden sus raíces tanto lateral como verticalmente a medida que esta va creciendo (Jones y Jacobse, 2001).

### 2.1.2 Rizosfera

El concepto de rizosfera fue introducido por primera vez por Hiltner (1904), para describir a la zona estrecha del suelo que rodea las raíces de la planta en donde las poblaciones de microorganismos son estimuladas por las actividades de las mismas raíces. Este concepto se ha ampliado para incluir a las zonas del suelo en el que las propiedades físicas, químicas y biológicas también se ven modificadas por el crecimiento vegetal (Hiltner, 1904; Richter-Heitmann *et al.*, 2016).

En la rizosfera conviven una gran cantidad de microorganismos como bacterias, hongos, protozoos y algas, denominados, en conjunto, como rizobioma, y referidos por Berendsen *et al.* (2012) como el segundo genoma de una planta (Saharan y Nehra, 2011; Berendsen *et al.*, 2012).

El sistema de raíces de las plantas es su principal medio de exudación hacia la rizosfera. Estos exudados regulan indirectamente los impactos de los procesos bióticos y abióticos al determinar una comunidad microbiana, afectar el control contra los herbívoros y cambiar las propiedades fisicoquímicas del suelo rizosférico para beneficio de la planta (Olanrewaju *et al.*, 2018; Sasse *et al.*, 2018).

Además, el crecimiento de los sistemas radiculares vegetales está controlado por diferentes propiedades fisicoquímicas del suelo, las cuales, a su vez, están parcialmente modificadas e influenciadas por las propias raíces (Sasse *et al.*, 2018).

El rizobioma, está conformado no sólo por un conjunto de microorganismos beneficiosos, sino también, por un grupo de microorganismos no beneficiosos. Por tal razón, será el genotipo de la planta, las especies y los componentes del suelo quienes determinarán en gran medida al rizobioma vegetal, de modo que, los microorganismos se vuelven específicos de su bioma. De esto dependerá si se forma una asociación positiva, que involucra simbiosis del hospedador; negativa, que involucra patógenos y depredadores; o neutral. Ya sea de forma positiva o negativa, el microbioma de la raíz afecta el crecimiento de las plantas y su tolerancia al estrés (Olanrewaju *et al.*, 2018).

Las bacterias son los microorganismos más abundantes en la rizosfera, gran parte de ellas influyen, en mayor medida, en el crecimiento y funcionamiento vegetal de manera eficaz, al aumentar la resistencia a los patógenos de las plantas, retener más agua, absorber y utilizar más nutrientes. Las plantas, por su parte, exudan una variedad de metabolitos de carbono que actúan como fuente de alimento, así como, de energía para los microorganismos (Saharan y Nehra, 2011; Olanrewaju *et al.*, 2018).

Los exudados de las raíces tienen la capacidad de repeler o atraer microorganismos, vinculando varias interacciones que ocurren en la rizosfera, ejerciendo así un efecto significativo en la salud general de las plantas. En este sentido, si bien el conocimiento de la bioquímica, biología y genética del desarrollo de las raíces ha aumentado significativamente en los últimos años, los procesos involucrados en las interacciones del rizobioma, como consecuencia de la secreción de exudados, aún no se comprenden del todo (Olanrewaju *et al.*, 2018; Anne-Cotton *et al.*, 2019).

### 2.1.3 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV)

Hiltner (1904) descubrió que la rizosfera, es decir, la capa del suelo influenciada por la raíz es mucho más rica en bacterias que el resto del suelo. La densidad poblacional de bacterias en la rizosfera puede ser hasta 100 veces mayor que en el suelo y, aproximadamente el 15% de la superficie de la raíz, está cubierta por microcolonias (Hiltner, 1904).

Estos microbiomas de la rizosfera se benefician porque las raíces de las plantas secretan metabolitos y compuestos orgánicos (aminoácidos, ácidos grasos, nucleótidos, ácidos orgánicos, fenoles, reguladores del crecimiento, poliaminas, esteroides, azúcares, vitaminas) que son utilizados como nutrientes (Van Loon, 2007; Lugtenberg y Kamilova, 2009).

Basándose en sus experimentos, Kloepper y Schroth (1981) denominaron a las rizobacterias que ejercen un efecto positivo sobre las plantas y van desde los mecanismos de influencia directa hasta efectos indirectos, como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) (Kloepper y Schroth, 1981).

Las RPCV también pueden definirse como la parte indispensable de la microbiota de la rizosfera que, cuando se cultiva en asociación con las plantas hospedantes, estimulan el crecimiento del hospedador. Varios géneros bacterianos como *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* y *Serratia* son considerados como RPCV (Saharan y Nehra, 2011; Bhattacharyya y Jha, 2012).

Las RPCV protegen a la planta de patógenos a través de la inducción de fitoalexinas antimicrobianas y emisión de compuestos orgánicos volátiles (COV) (Van Loon, 2007).

Además, mejoran el crecimiento en muchos cultivos de importancia económica mediante la producción de sideróforos, fijación de nitrógeno atmosférico, asimilación de fósforo y producción de fitohormonas como las auxinas (Saharan y Nehra, 2011).

Dentro de las auxinas, la molécula más importante es el ácido indol-3-acético (AIA). Este AIA es catalizado a partir del aminoácido L-triptófano (Trp) por un grupo de enzimas denominado triptofanasas, entre las que destaca la enzima triptofanasa A (TnaA) (Van Loon, 2007; Bhattacharyya y Jha, 2012).

El AIA bacteriano promueve el crecimiento tanto de las raíces primarias, como de las raíces secundarias, lo que permite que haya una mejor absorción de nutrientes por parte de la planta. De esta manera, la aplicación de RPCV en la agricultura moderna, ha demostrado efectos positivos sobre cultivos de trigo, papa, maíz, chicharos y pepino (Yu y Lee, 2013).

#### 2.1.4 Bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF)

El fósforo (P) es el segundo elemento inorgánico esencial para todas las formas de vida. Se trata de un componente indispensable en moléculas como el ácido ribonucleico (RNA), ácido desoxirribonucleico (ADN) y adenosín trifosfato (ATP). No obstante, es uno de los macronutrientes que con mayor frecuencia resulta limitante en los suelos (Paredes-Mendoza y Espinosa-Victoria, 2010).

El P disponible es absorbido por las plantas en forma de fosfato de dihidrógeno ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) en suelos ácidos, y como fosfato de hidrógeno ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) en suelos alcalinos. Debido a esto, fácilmente es convertido en complejos insolubles, como fosfatos de hierro (Fe), aluminio (Al) o manganeso (Mn) en suelos ácidos, y fosfatos de calcio (Ca) o magnesio (Mg) en suelos alcalinos. Asimismo, algunos compuestos orgánicos (incorporados a la biomasa o materia orgánica del suelo) e inorgánicos (principalmente en forma de complejos minerales insolubles), son las principales fuentes de P en el suelo. Por lo tanto, su disponibilidad dependerá de su solubilidad (Paredes-Mendoza y Espinosa-Victoria, 2010; De Souza *et al.*, 2015).

Algunos microorganismos participan en la solubilización del fósforo inorgánico (Pi) y en la mineralización del fósforo orgánico (Po), así como, en su inmovilización. En particular, las bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) solubilizan fosfatos inorgánicos (fosfato bicálcico, fosfato tricálcico, fluorapatita, cloroapatita, hidroxiapatita) mediante la producción y liberación de ácidos orgánicos (Tabla 1), lo cual depende del pH y la mineralogía del suelo (Paredes-Mendoza y Espinosa-Victoria, 2010).

Existen dos mecanismos para que esto ocurra. El primero de estos consiste en un intercambio del ácido; por ejemplo, los iones hidrógeno ( $\text{H}^+$ ) provenientes del citrato se intercambian por el P ligado a cristales de hidróxido de aluminio [ $\text{Al}(\text{OH})_3$ ] o trihidróxido de hierro [ $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ], reduciéndolos y liberando al P (Paredes-Mendoza y Espinosa-Victoria, 2010; De Souza *et al.*, 2015).

El segundo mecanismo depende de la concentración de los ácidos orgánicos producidos por las BSF, el cual involucra la formación de complejos con los iones de metales provenientes de la roca fosfórica. Por su parte, el fósforo orgánico es mineralizado, principalmente, por las enzimas denominadas fosfatasa ácida y alcalina (Paredes-Mendoza y Espinosa-Victoria, 2010).

**Tabla 1.** Ácidos orgánicos y sus rutas biosintéticas en bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) (Paredes-Mendoza y Espinosa-Victoria, 2010).

Ácido	Fórmula	Ruta biosintética	Bacteria productora
Acético	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	Oxidación incompleta de azúcares	<i>A. aceti</i> y <i>P. fluorencens</i>
Láctico	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	Fermentación láctica primaria	<i>B. liqueniformis</i> y <i>B. amyloliquefaciens</i>
Oxálico	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Ácidos tricarboxílicos	<i>P. fluorescens</i>
Cítrico	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	Ácidos tricarboxílicos	<i>E. herbicola</i> y <i>Y. lipolytica</i>
Butírico	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	Oxidación anaerobia del piruvato	<i>B. liqueniformis</i> y <i>B. amyloliquefaciens</i>
Succínico	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	Ciclo del glioxilato	<i>P. putida</i> y <i>P. fluorescens</i>
Málico	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	Ácidos tricarboxílicos	<i>B. megaterium</i>
Glucónico	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	Oxidación directa de la glucosa	<i>E. herbicola</i> , <i>P. cepacia</i> y <i>B. cepacia</i>
Fumárico	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	Ácidos tricarboxílicos	<i>P. aeruginosa</i>

Las BSF pertenecen al grupo de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV). Existen 13 géneros con capacidad para solubilizar fosfato, los cuales son: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Mesorhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Erwinia* (Zaidi *et al.*, 2009; Paredes-Mendoza y Espinosa-Victoria, 2010; De Souza *et al.*, 2015).

Estas bacterias son capaces de adaptarse, colonizar y persistir en la rizosfera, lo que permite que el P solubilizado sea fácilmente absorbido por las raíces de las plantas y utilizado para su desarrollo (Zaidi *et al.*, 2009; Paredes-Mendoza y Espinosa-Victoria, 2010; De Souza *et al.*, 2015).

#### 2.1.5 Relaciones raíz - microorganismo

De acuerdo con Whipps (2001), existen tres categorías básicas de interacciones que generalmente se dan entre las rizobacterias y las plantas en crecimiento: neutras, negativas y positivas (Whipps, 2001).

La mayoría de las rizobacterias asociadas con plantas son comensales, es decir, establecen una interacción inocua con las plantas hospedadoras que no muestra ningún efecto visible sobre su crecimiento y fisiología general. En interacciones negativas, las rizobacterias fitopatógenas producen sustancias fitotóxicas que afectan negativamente en el crecimiento y fisiología de las plantas. Frente a estas bacterias deletéreas, existen algunas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) que ejercen un desarrollo positivo de la planta a través de mecanismos directos como solubilización de nutrientes, fijación de nitrógeno, producción de reguladores del crecimiento, etc. O por mecanismos indirectos como la estimulación del desarrollo de micorrizas, exclusión competitiva de patógenos y eliminación de sustancias fitotóxicas (Bhattacharyya y Jha, 2012).

Las plantas en la rizosfera comprenden interacciones raíz - raíz, raíz - insecto y raíz - microorganismo. Las comunidades microbianas de la rizosfera están fuertemente asociadas con el ciclo biogeoquímico de nutrientes como el carbono (C), fósforo (P), nitrógeno (N) y azufre (S); la eliminación de toxinas y la producción de fitohormonas, así como, de antibióticos (Van Loon, 2007; Bhattacharyya y Jha, 2012).

Asimismo, muchas RPCV aprovechan los productos del metabolismo de otros microorganismos y los exudados vegetales como fuentes de carbono y energía. Por lo tanto, la rizosfera ha aparecido como un entorno ecológico versátil y dinámico de intensas interacciones planta - microorganismo (Bhattacharyya y Jha, 2012).

Las RPCV tienen la capacidad de antagonizar a los patógenos de la planta mediante la producción de antibióticos y la secreción de enzimas líticas. Estas actividades son particularmente importantes en la rizosfera, donde los hongos patógenos son atraídos por las raíces de las plantas (Van Loon, 2007).

Las RPCV reducen la actividad de los microorganismos patógenos no solo a través del antagonismo microbiano, sino también, activando a la planta para que se defienda mejor. Este fenómeno, denominado resistencia sistémica inducida (RSI) (Tabla 2), fue descrito por primera vez por Van Peer *et al.* (1991) (Van Peer *et al.*, 1991).

La RSI confiere a la planta una mayor capacidad defensiva. Tras la infección con un patógeno desafiante, esta capacidad defensiva mejorada se manifiesta como una reducción en la tasa de desarrollo de la enfermedad, lo que resulta en menos plantas enfermas o en una gravedad menor de la enfermedad. Una vez inducida la RSI, las plantas permanecen protegidas durante una parte considerable de su vida (Van Peer *et al.*, 1991; Van Loon, 2007).

Cuando se ve afectada la actividad RSI por cambios en el entorno de la rizosfera, se activa un mecanismo denominado *quórum sensing* (QS). El QS es un sistema regulador importante en las poblaciones bacterianas. Les permite ajustar su metabolismo a condiciones de hacinamiento u otros cambios en el entorno biótico - abiótico (Van Loon, 2007).

**Tabla 2.** La naturaleza de la resistencia sistémica inducida (RSI) en plantas (Van Loon, 2007).

---

**Características de la resistencia sistemática inducida:**

- La capacidad defensiva de la planta está mejorada a través del estrés.
- La capacidad de mejoramiento defensivo está expresado sistémicamente a través de la planta.
- La RSI es activada contra hongos, bacterias, virus y, a veces, nematodos e insectos.
- Una vez inducida, la RSI se mantiene por largos periodos.

**Mecanismos de la resistencia sistemática inducida:**

- De desarrollo: ligada a la promoción del crecimiento.
  - Ambiental: asociada con el antagonismo microbiano en la rizosfera.
  - Bioquímica: inducción de fitoalexinas.
-

## 2.2 Fitohormonas

En el siglo XIX, Charles Darwin sugirió por primera vez que existían compuestos químicos capaces de estimular el crecimiento en los cultivos vegetales. Desde entonces, se han llevado a cabo una gran cantidad de investigaciones enfocadas en el estudio del impacto estimulante de las hoy conocidas como fitohormonas (Han *et al.*, 2018).

Las fitohormonas son mensajeros químicos, en plantas, involucrados en un amplio espectro de procesos tanto fisiológicos como bioquímicos. Contribuyen a la regulación de quiescencia, germinación de semillas, formación de raíces, floración, ramificación, macollamiento y maduración de frutos. Además, aumentan la resistencia a factores ambientales e inducen o suprimen la expresión de genes, síntesis de enzimas, pigmentos y metabolitos (Tsavkelova *et al.*, 2006).

Según la clasificación convencional, existen cinco grupos de fitohormonas: 1) auxinas, 2) ácido abscísico, 3) citoquininas, 4) giberelinas y 5) etileno. Muchos microorganismos asociados a plantas son, por sí mismos, capaces de sintetizar fitohormonas, las cuales fungen como mediadores entre las comunicaciones planta - microorganismo. La capacidad de sintetizar hormonas vegetales, entre las que destacan las auxinas, es una propiedad importante de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) (Tsavkelova *et al.*, 2006; Davies, 2010; Han *et al.*, 2018).

### 2.2.1 Auxinas: el ácido indol-3-acético (AIA)

Las auxinas fueron las primeras hormonas vegetales identificadas. Desempeñan funciones vitales en casi todos los procesos del crecimiento y vida diaria de una planta (Ali *et al.*, 2017).

Las auxinas son responsables de la división, extensión y diferenciación de células y tejidos vegetales. Las fitohormonas de este grupo también estimulan la germinación de semillas, aumentan la tasa de formación tanto del xilema como de las raíces, controlan los procesos de tropismo, florecimiento y fructificación, participan en la formación de pigmentos fotosintéticos, biosíntesis de varios metabolitos y mejoran la resistencia a los factores de estrés (Tsavkelova *et al.*, 2006; Davies, 2010).

La auxina más común, de origen natural, es el ácido indol-3-acético (AIA). El AIA se reportó por primera vez en plantas, a finales del siglo XIX, por el botánico alemán Julian von Sachs, quien propuso que esta sustancia, formadora de órganos endógenos, se mueve por toda la planta en respuesta a la luz y gravedad. Esta idea fue apoyada por Charles y Francis Darwin, quienes observaron la inclinación de las plantas hacia la luz debido a una señal, que luego se identificó como AIA (Duca *et al.*, 2014; Ali *et al.*, 2017).

Aunque se sabe que las plantas también se ven estimuladas por otras auxinas, el AIA muestra mayor actividad. Esta fitohormona juega un papel central en la división celular, elongación, desarrollo de frutos y senescencia, así como, en la iniciación de raíces, hojas y flores (Tsavkelova *et al.*, 2006).

Particularmente, en dicotiledóneas, el AIA induce específicamente la formación de raíces laterales; mientras que, en las monocotiledóneas induce la formación de raíces adventicias. Además, el AIA coordina tanto el crecimiento cambial como el desarrollo vascular (Tsavkelova *et al.*, 2006; Duca *et al.*, 2014).

Algunas bacterias son capaces de sintetizar y liberar AIA en las inmediaciones de las raíces de las plantas. No obstante, la producción del AIA microbiano variará entre las diferentes especies, cepas y disponibilidad de sustrato (Ahmad *et al.*, 2005; Shahab *et al.*, 2009; Hiep-Han *et al.*, 2011; Mohite, 2013).

### 2.2.2 Producción de ácido indol-3-acético (AIA) en bacterias

El ácido indol-3-acético (AIA) es la auxina más abundante en las plantas. Se ha informado que numerosas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV), incluidas bacterias Gram positivas y Gram negativas, son capaces de sintetizar AIA (Mohite, 2013).

El AIA bacteriano estimula la formación de pelos radiculares y aumenta el número y longitud de las raíces laterales, así como, de las raíces primarias. Asimismo, estimula el alargamiento celular modificando condiciones como el aumento del contenido osmótico y permeabilidad del agua (Duca *et al.*, 2014; Ali *et al.*, 2017).

La síntesis bacteriana de AIA se lleva a cabo a través de al menos tres vías diferentes dependientes del aminoácido L-triptófano (Trp), un aminoácido esencial, apolar y poco usual (Mohite, 2013; Ali *et al.*, 2017).

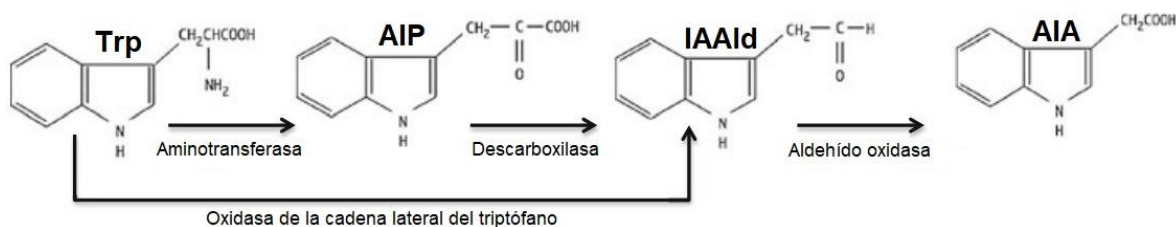
El tipo de vía a utilizar para sintetizar AIA está determinada por la naturaleza de las interacciones planta - microorganismo. La mayoría de las RPCV utilizan la vía del ácido indol-3-pirúvico (AIP), mientras que muchas bacterias patógenas producen AIA a través de la vía del indol-3-acetamida (IAM) (Ali *et al.*, 2017).

### 2.2.3 Biosíntesis de ácido indol-3-acético (AIA) en bacterias: rutas dependientes de L-triptófano (Trp)

Se han propuesto varias rutas de biosíntesis de ácido indol-3-acético (AIA) bacteriano. Estas pueden ser dependientes o independientes del aminoácido L-triptófano (Trp). No obstante, las vías dependientes del Trp son las más estudiadas. Hoy en día, se han postulado tres rutas de biosíntesis de AIA, dependientes del Trp: 1) vía del ácido indol-3-pirúvico (AIP), 2) vía del indol-3-acetamida (IAM) y 3) vía del indol-acetaldoxima (IAOx) / indol-3-acetonitrilo (IAN) (Jordán y Casaretto, 2006; Mohite, 2013; Duca *et al.*, 2014).

### 2.2.3.1 Ruta del ácido indol-3-pirúvico (AIP)

En la ruta biosintética del ácido indol-3-pirúvico (AIP), el L-triptófano (Trp) es desaminado a AIP por una aminotransferasa (enzima bacteriana asociada a plantas). Posteriormente, una enzima descarboxilasa convierte el AIP en indol-3-acetaldehído (IAAld), el cual se oxida para convertirse en ácido indol-3-acético (AIA) mediante una enzima aldehído oxidasa (Figura 1) (Zhao, 2012; Duca *et al.*, 2014; Kasahara, 2015).



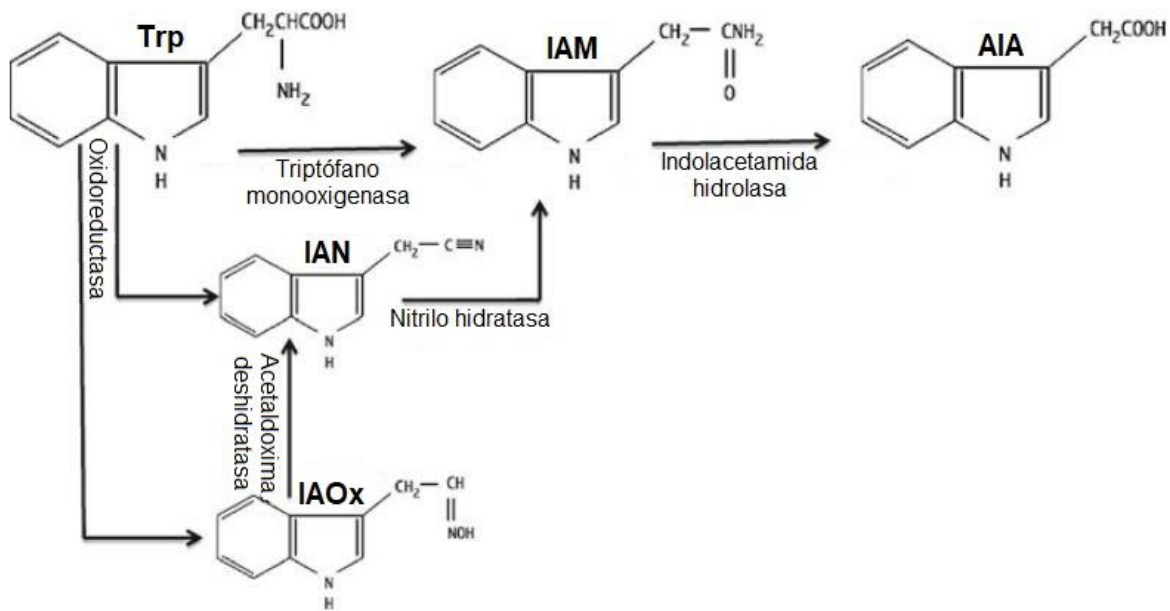
**Figura 1.** Vía del ácido indol-3-pirúvico (AIP). **Trp:** L-triptófano; **IAAld:** indol-3-acetaldehído; **AIA:** ácido indol-3-acético (Duca *et al.*, 2014).

Asimismo, existe una vía alterna, denominada ruta de la oxidasa de la cadena lateral del L-triptófano, en la que el Trp se convierte directamente en IAAld por la actividad enzimática de una monooxigenasa (Figura 1). Esta vía se ha informado en cepas bacterianas de *Pseudomonas fluorescens*, como *P. fluorescens* HP72, *P. fluorescens* CHA0 y *P. fluorescens* Pf-5 (Zhao, 2012; Duca *et al.*, 2014; Kasahara, 2015).

### 2.2.3.2 Ruta del indol-3-acetamida (IAM)

La vía del indol-3-acetamida (IAM) se ha descrito principalmente en bacterias fitopatógenas; no obstante, algunas bacterias fitosimbióticas también pueden expresar esta ruta biosintética (Zhao, 2012; Duca *et al.*, 2014; Kasahara, 2015).

En la vía del IAM, el ácido indol-3-acético (AIA) se sintetiza a partir de una reacción de dos pasos. En primer lugar, la enzima triptófano-2-monooxigenasa convierte al L-triptófano (Trp) en el intermediario IAM. Después, la segunda reacción es catalizada por la enzima indolacetamida hidrolasa (específica para el IAM), que hidroliza el IAM para producir AIA (Figura 2) (Zhao, 2012; Duca *et al.*, 2014; Kasahara, 2015).



**Figura 2.** Vía del indol-3-acetamida (IAM). **Trp:** L-triptófano; **IAN:** indol-3-acetonitrilo; **IAOx:** indol-3-acetaldoxima; **AIA:** ácido indol-3-acético (Duca *et al.*, 2014).

En la actualidad, se han identificado dos genes que impulsan la vía del IAM: 1) *iaaM/tms-1*, que codifica la enzima triptófano-2-monooxigenasa y 2) *iaaH/tms-2*, que codifica la enzima indolacetamida hidrolasa (Zhao, 2012; Duca *et al.*, 2014; Kasahara, 2015).

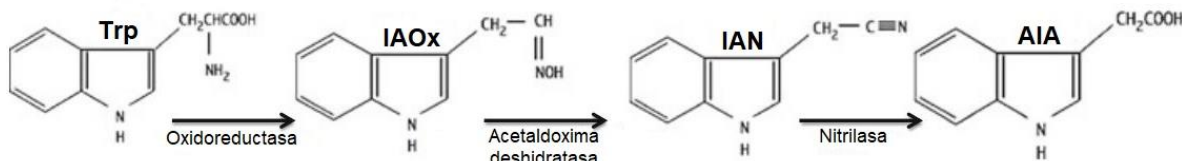
Por otro lado, las enzimas oxidorreductasa, acetaldoxima deshidratasa y nitrilo hidratasa, enlazan la vía del indol-acetaldoxima (IAOx) / indol-3-acetonitrilo (IAN) con la vía del IAM, por la cual también se sintetiza AIA (Figura 2) (Zhao, 2012; Duca *et al.*, 2014; Kasahara, 2015).

### 2.2.3.3 Ruta del indol-acetaldoxima (IAOx) / indol-3-acetonitrilo (IAN)

La vía del indol-acetaldoxima (IAOx) / indol-3-acetonitrilo (IAN) es la menos estudiada en bacterias. Sin embargo, se sabe que el primer paso para la síntesis de ácido indol-3-acético (AIA) a partir de esta vía es la conversión del L-triptófano (Trp) en IAOx por acción de una enzima oxidorreductasa (Zhao, 2012; Duca *et al.*, 2014; Kasahara, 2015).

Después, el intermediario IAOx se convierte en IAN mediante la enzima acetaldoxima deshidratasa, la cual es codificada por genes *oxd*. En un último paso, el IAN se convierte en AIA por la enzima nitrilasa (Figura 3) (Zhao, 2012; Duca *et al.*, 2014; Kasahara, 2015).

En bacterias, las enzimas nitrilasas desempeñan una función muy importante en la síntesis de fitohormonas, así como, en la asimilación de nutrientes y desintoxicación por nitrilos exógenos y endógenos (Zhao, 2012; Duca *et al.*, 2014; Kasahara, 2015).



**Figura 3.** Vía del indol-acetaldoxima (IAOx) / indol-3-acetonitrilo (IAN). **Trp:** L-triptófano; **AIA:** ácido indol-3-acético (Duca *et al.*, 2014).

Dado que el AIA bacteriano es el principal promotor de crecimiento en plantas, es indispensable que se comprenda el impacto de su aplicación como biofertilizante en la agricultura, a fin de reemplazar a los agroquímicos convencionales (Zhao, 2012; Duca *et al.*, 2014; Koga *et al.*, 2014; Kasahara, 2015).

#### 2.2.4 Cuantificación de la producción de ácido indol-3-acético (AIA) por espectrofotometría

La espectrofotometría es una técnica empleada para medir la interacción de las moléculas con la radiación electromagnética (la luz) (Arenas-Sosa y López-Sánchez, 2004).

Estudia los fenómenos de la interacción de la luz con la materia, por lo que tiene un papel importante en el desarrollo de la bioquímica; por ejemplo, se ha utilizado para medir velocidades de reacción catalizadas por enzimas, medir concentraciones de compuestos y determinar conformaciones estructurales, así como, interacciones moleculares (Arenas-Sosa y López-Sánchez, 2004).

Por su parte, la espectrofotometría de absorción se emplea en moléculas disueltas en un solvente transparente. De acuerdo con la ley de Beer - Lambert, la absorbancia de un soluto depende linealmente de la concentración. Por ende, cualquier metabolito, o compuesto orgánico e inorgánico, que absorba a cierta longitud de onda, se puede medir por espectrofotometría (Arenas-Sosa y López-Sánchez, 2004; Pan *et al.*, 2010).

El ácido indol-3-acético (AIA) bacteriano se puede cuantificar espectrofotométricamente por el método del reactivo de Salkowski, el cual genera una coloración que absorbe la luz roja a 530 - 600 nm. De esta manera, y construyendo una curva de calibración, se puede determinar la concentración de AIA producido (Di Martino *et al.*, 2003; Hiep-Han *et al.*, 2011).

El procedimiento general consiste en cultivar e incubar a las bacterias en un medio adicionado con L-triptófano (Trp), a 28 °C, durante aproximadamente 4 días. Después, el caldo se centrifuga con la finalidad de eliminar toda la biomasa y un mL del sobrenadante se mezcla con 2 mL del reactivo de Salkowski, bajo condiciones de oscuridad. El desarrollo de un color rojizo - rosado indica producción de AIA. La densidad óptica (DO) se registra a 530 nm después de 30 - 120 min del desarrollo de color y el nivel de AIA producido se evalúa mediante un gráfico AIA estándar (Ahmad *et al.*, 2005; Shahab *et al.*, 2009; Mohite, 2013).

### **2.3 Caracterización bioquímica de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV)**

Las pruebas bioquímicas son técnicas que permiten determinar características particulares del metabolismo microbiano, con la finalidad de caracterizar e identificar a un microorganismo en estudio. Algunas de estas pruebas son métodos rápidos que evalúan la presencia de enzimas en cuestión de segundos o algunas pocas horas (Fernández-Olmos *et al.*, 2010).

Otras pruebas requieren, para su lectura, el crecimiento del microorganismo con una incubación previa de 18 - 48 h, perteneciendo a este grupo la mayoría de los ensayos que detectan componentes metabólicos o determinan la sensibilidad de una bacteria a una sustancia dada (Fernández-Olmos *et al.*, 2010).

En la actualidad, se han desarrollado muchas técnicas de alta tecnología, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés); no obstante, las pruebas bioquímicas se siguen aplicando ampliamente para la caracterización de diversos microorganismos debido a los bajos costos económicos, confiabilidad y fácil reproducibilidad (Pitt y Barer, 2012; Talaiekhosani *et al.*, 2015).

#### **2.3.1 Medios de cultivo para la caracterización bioquímica de bacterias**

Los medios de cultivo permiten el desarrollo metabólico microbiano a partir de un sustrato compuesto por agua (H<sub>2</sub>O), nutrientes esenciales como el carbono (C) y nitrógeno (N), nutrientes específicos (aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, azúcares, sueros) y agar base. En dicho sustrato, los microorganismos en crecimiento forman masas celulares, denominadas colonias, que se desarrollan a partir de una célula original (Zimbro *et al.*, 2009; Arora, 2013; Barrero-Cuevas, 2016).

La gran diversidad metabólica bacteriana ha impulsado el desarrollo de una amplia gama de medios de cultivo, los cuales son clasificados, según su utilidad, en: 1) medios nutritivos, que permiten el crecimiento de la mayoría de los microorganismos por solo contener nutrientes esenciales; 2) medios de enriquecimiento, que contienen nutrientes específicos, además de los básicos, para permitir el desarrollo de bacterias exigentes; 3) medios selectivos, que presentan algún compuesto que impide el desarrollo de microorganismos no deseados, lo que permite que la bacteria que se desea cultivar, lo haga con mayor facilidad; y 4) medios diferenciales, los cuales contienen sustancias que ponen de manifiesto alguna característica específica de la especie bacteriana en estudio (Barrero-Cuevas, 2016).

A continuación, se describen las pruebas bioquímicas, basadas en medios de cultivo diferenciales, empleadas en este trabajo para la caracterización bioquímica con interés biotecnológico del cepario de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF).

#### 2.3.1.1 Agar hierro triple azúcar (TSI)

La prueba agar hierro triple azúcar (TSI) se utiliza en la diferenciación de bacterias con capacidad para fermentar azúcares (glucosa, lactosa y/o sacarosa) y producir ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ). En los microorganismos, los azúcares desempeñan un papel muy importante en un sinnúmero de procesos metabólicos; no obstante, solo las bacterias mejor adaptadas son capaces de crecer utilizando diferentes carbohidratos como fuentes de energía (MacFaddin, 2003).

Algunos azúcares, como la glucosa, entran directamente a la vía metabólica de Embden - Meyerhof - Parnas para producir ácido pirúvico, el cual es degradado a través del ciclo de Krebs para rendir dióxido de carbono ( $CO_2$ ), agua ( $H_2O$ ) y energía. Sin embargo, para que azúcares como la lactosa y sacarosa (compuesto ambos por moléculas de glucosa) puedan ser utilizados por las bacterias como fuentes de carbono y energía, primero deben catabolizarse mediante enzimas como la  $\beta$ -glucosidasa y sacarosa sintasa (MacFaddin, 2003).

El medio TSI está compuesto por glucosa, lactosa, sacarosa y rojo de fenol, el cual sirve para detectar la fermentación de estos carbohidratos. Además, para evaluar la producción de  $H_2S$  contiene tiosulfato de sodio ( $Na_2S_2O_3$ ), sulfato de hierro ( $FeSO_4$ ) y amonio ( $NH_4^+$ ) (Hajna, 2003).

La producción de  $H_2S$  se lleva a cabo a partir del  $Na_2S_2O_3$ . El  $FeSO_4$  y  $NH_4^+$  fungen como fuente de iones  $Fe^{3+}$ , los cuales se combinan con el  $H_2S$  bacteriano y producen sulfuro de hierro ( $FeS$ ), proporcionando al medio un color negro (Hajna, 2003).

Por su parte, la fermentación de los carbohidratos se indica mediante la producción de gas y un cambio en el pH del indicador, lo que a su vez genera un cambio en la coloración del agar, de rojo (alcalino) a amarillo (ácido) (MacFaddin, 2003).

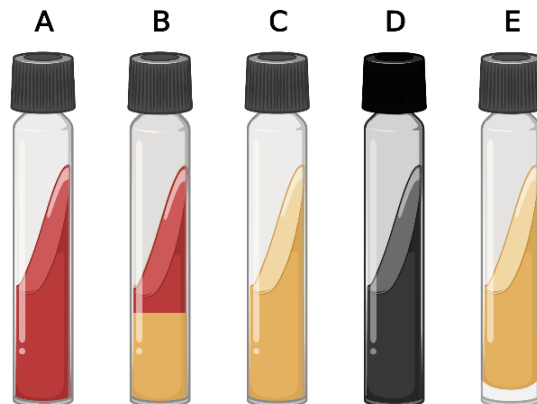
No obstante, la cantidad de ácido producida en el agar durante la fermentación de la glucosa es tan pequeña que se oxida rápidamente, lo que muchas veces provoca que el medio permanezca de color rojo. Tras agotar la cantidad limitada de glucosa, las bacterias capaces de hacerlo comenzarán a utilizar lactosa y/o sacarosa como fuentes de carbono (Hajna, 2003).

Esta técnica consiste en inocular por punción y estría, con un cultivo puro de 18 - 24 h, el agar TSI previamente esterilizado. Luego, se incuba a 37 °C durante 24 h (Hajna, 2003).

Una vez transcurrido dicho tiempo, si tanto la superficie del medio como el fondo son alcalinos (pico rojo / fondo rojo), el microorganismo no es capaz de fermentar azúcares (Figura 4A). Si la superficie es alcalina y el fondo ácido (pico rojo / fondo amarillo), el microorganismo solo es capaz de fermentar glucosa (Figura 4B). Si tanto la superficie como el fondo son ácidos (pico amarillo / fondo amarillo), el microorganismo es fermentador de glucosa, lactosa y/o sacarosa (Figura 4C) (Hajna, 2003).

La producción de H<sub>2</sub>S se manifiesta por el ennegrecimiento del agar (Figura 4D) (Hajna, 2003).

Además, si se observa la presencia de burbujas o la ruptura del medio, significa que el microorganismo produjo gas durante las fermentaciones (Figura 4E) (Hajna, 2003).



**Figura 4.** Prueba bioquímica agar hierro triple azúcar (TSI). **A:** el microorganismo no fermenta azúcares; **B:** el microorganismo solo fermenta glucosa; **C:** el microorganismo fermenta las tres azúcares; **D:** el microorganismo produce ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S); **E:** el microorganismo produce gas durante el proceso de fermentación de las azúcares. Figura creada con BioRender (<https://biorender.com/>).

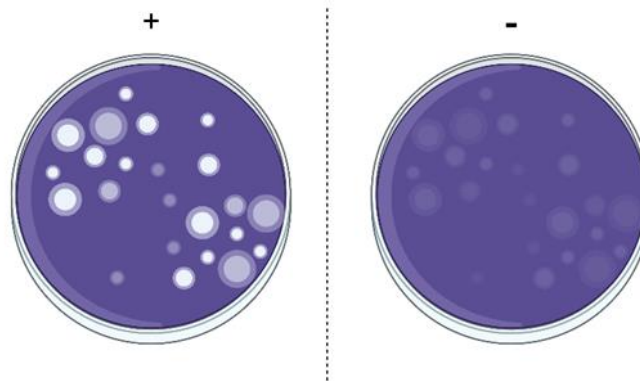
### 2.3.1.2 Hidrólisis de almidón

La prueba bioquímica hidrólisis de almidón se emplea para evidenciar la utilización del almidón, un carbohidrato complejo compuesto de moléculas de glucosa unidas entre sí por enlaces glicosídicos ( $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6), como fuente de carbono (Evans *et al.*, 2004).

El almidón, al igual que la glucosa, lactosa y sacarosa, puede ser aprovechado por algunos microorganismos para obtener energía. El proceso de hidrólisis enzimática del almidón consiste en romper las moléculas de este polisacárido hasta obtener glucosa utilizando dos enzimas, la  $\alpha$ -amilasa, secretada únicamente por bacterias, y la amiloglucosidasa. De esta manera, la glucosa obtenida puede entrar a la vía de Embden - Meyerhof - Parnas y, posteriormente, al ciclo de Krebs (MacFaddin, 2003; Evans *et al.*, 2004; Hemraj *et al.*, 2013).

En el laboratorio, esta prueba se lleva a cabo en agar almidón estéril. Por el método de estría o en una sola línea horizontal en el centro de la caja de Petri, se inocula al microorganismo problema (previamente aislado en un cultivo puro de 18 - 24 h), y se incuba durante 48 h a 37 °C (Evans *et al.*, 2004; Hemraj *et al.*, 2013).

Transcurrido dicho tiempo, el medio se empapa en Lugol y se drena el exceso. La presencia de yodo genera una coloración azul oscuro en el agar almidón, mientras que alrededor de las colonias con actividad amilolítica se forma un halo blanquecino (Figura 5) (Evans *et al.*, 2004; Hemraj *et al.*, 2013).



**Figura 5.** Prueba bioquímica hidrólisis de almidón. (+) Positiva; (-) Negativa. Figura creada con BioRender (<https://biorender.com/>).

### 2.3.1.3 Citrato de Simmons

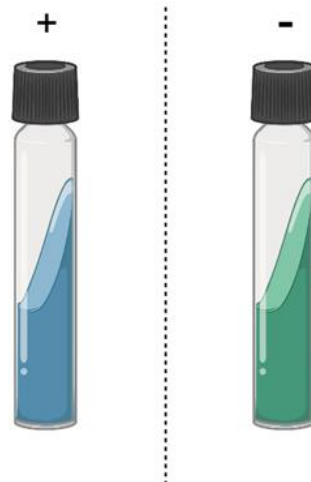
La prueba bioquímica citrato de Simmons permite evaluar la capacidad de los microorganismos para aprovechar al citrato como única fuente de carbono y al fosfato monoamónico ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ) como única fuente de nitrógeno (MacWilliams, 2009; Talaiekhosani *et al.*, 2015).

En bacterias, el metabolismo del citrato se lleva a cabo a través del ciclo de Krebs sin la participación de la coenzima A. Por ello, es necesaria la actividad enzimática citrato permeasa, la cual conduce al desdoblamiento del citrato para generar oxalacetato y piruvato (MacFaddin, 2003; MacWilliams, 2009).

El piruvato, en presencia de un medio alcalino, da origen a ácidos orgánicos que son utilizados por las bacterias como fuentes de carbono. Dicho metabolismo genera carbonatos y bicarbonatos alcalinos, los cuales reaccionan con el azul de bromotimol, indicador de pH añadido al medio de cultivo, lo que provoca que este vire a color azul (MacFaddin, 2003; MacWilliams, 2009).

El método más común consiste en preparar agar citrato de Simmons en tubos de ensayo. El medio se deja enfriar en posición inclinada y se inocula por estría con un cultivo puro de 18 - 24 h. La reacción de utilización de citrato requiere oxígeno y, por lo tanto, si se usan tubos con tapones de rosca, deben colocarse sin apretar. El microorganismo problema se incuba a 37 °C durante 24 - 48 h (MacWilliams, 2009).

Una prueba positiva se determina por el vire del indicador de pH a color azul (Figura 6). No obstante, si la bacteria creció en el medio, pero no hay vire, la prueba se sigue considerando como positiva, pues esto quiere decir que la bacteria sí aprovechó al citrato como única fuente de carbono y que el reactivo azul de bromotimol utilizado pudo estar caduco. Por su parte, una prueba es negativa cuando el medio de cultivo permanece sin cambios (Figura 6) (MacWilliams, 2009).



**Figura 6.** Prueba bioquímica citrato de Simmons. (+) Positiva; (-) Negativa. Figura creada con BioRender (<https://biorender.com/>).

#### 2.3.1.4 Ácido indol-3-acético (AIA)

La prueba del ácido indol-3-acético (AIA) es un ensayo cualitativo utilizado con la finalidad de evaluar la capacidad microbiana para producir AIA a partir del aminoácido L-triptófano (Trp) como precursor (Sanabria-Gómez y Acevedo, 2001; Lopardo *et al.*, 2016; Muso-Jam y Acosta-Hurtado, 2017).

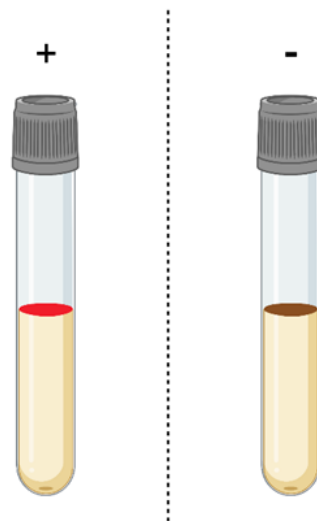
Las distintas enzimas intracelulares que participan en el proceso de producción de AIA adoptan el nombre global de triptofanasas. Las bacterias que poseen este grupo de enzimas son capaces de hidrolizar y desaminar al Trp para producir ácido pirúvico, amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) y AIA (Sanabria-Gómez y Acevedo, 2001; Lopardo *et al.*, 2016).

El ácido pirúvico generado es metabolizado mediante la vía de Embden - Meyerhof - Parnas o en el ciclo de Krebs, de los que se obtiene dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ) y una gran cantidad de energía (Sanabria-Gómez y Acevedo, 2001; Lopardo *et al.*, 2016; Muso-Jam y Acosta-Hurtado, 2017).

El  $\text{NH}_3$  puede usarse en la síntesis de nuevos aminoácidos. Por su parte, el AIA producido se detecta en el medio de cultivo mediante la adición del reactivo de Ehrlich o de Kovacs, compuestos principalmente por *p*-dimetilamino benzaldehído, el cual reacciona con el anillo aromático del AIA para formar un complejo color rojo (Sanabria-Gómez y Acevedo, 2001; Lopardo *et al.*, 2016; Muso-Jam y Acosta-Hurtado, 2017).

La técnica consiste en inocular al microorganismo problema en un caldo nutritivo adicionado con el aminoácido Trp, en tubos de ensayo. Luego, se incuban a 37 °C durante 18 - 24 h (Sanabria-Gómez y Acevedo, 2001; Lopardo *et al.*, 2016).

Al finalizar este período, para interpretar los resultados se adicionan unas gotas del reactivo de Ehrlich o Kovacs. La prueba es positiva si se genera un halo rojizo en la superficie del medio de cultivo. En contraste, la prueba se considera negativa si se genera un halo color marrón, o del color del reactivo utilizado, en la superficie del medio (Figura 7) (Sanabria-Gómez y Acevedo, 2001; Lopardo *et al.*, 2016).



**Figura 7.** Prueba bioquímica de ácido indol-3-acético (AIA). (+) Positiva; (-) Negativa. Figura creada con BioRender (<https://biorender.com/>).

### 2.3.1.5 Sulfuro indol movilidad (SIM)

El medio sulfuro indol movilidad (SIM) es un agar multitest que se utiliza para evaluar la movilidad bacteriana, al mismo tiempo que se determina la producción de ácido indol-3-acético (AIA) y ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ) (MacWilliams, 2009; Hemraj *et al.*, 2013).

La movilidad se identifica a través del crecimiento bacteriano; si la bacteria crece en la línea de inoculación, la movilidad es negativa (Figura 8A), pero si el crecimiento se difunde más allá de la línea de punción, la movilidad se determina positiva (Figura 8D) (MacWilliams, 2009; Hemraj *et al.*, 2013).

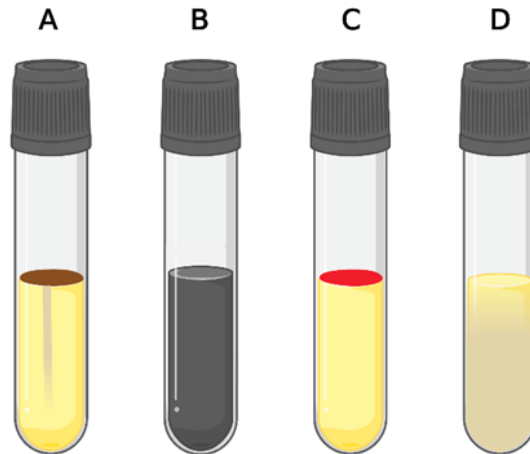
En cuanto a la producción de AIA, esta se lleva a cabo en bacterias por la desaminación e hidrólisis del aminoácido L-triptófano (Trp). La detección de AIA se realiza mediante la adición del reactivo de Ehrlich o Kovacs, el cual, en condiciones ácidas, genera una coloración rojiza en la superficie del medio de cultivo (Figura 8C) (MacWilliams, 2009; Hemraj *et al.*, 2013).

Por su parte, la producción de  $H_2S$  se identifica con el ennegrecimiento del medio de cultivo (Figura 8B) de la misma manera que en la prueba bioquímica agar hierro triple azúcar (TSI) (Hajna, 2003; MacWilliams, 2009).

El  $H_2S$  es producido por bacterias con capacidad para liberar enzimáticamente el azufre de los aminoácidos azufrados (metionina y cisteína). Las enzimas responsables de esta actividad son la cisteína desulfhidrasa y la tiosulfato reductasa (MacFaddin, 2003).

De acuerdo con MacFaddin (2003), en medios de cultivo como el TSI, la sacarosa puede suprimir los mecanismos enzimáticos responsables de la producción de  $H_2S$ . En contraste, las reacciones de producción de  $H_2S$  se intensifican en medios de cultivo semi-sólidos como el SIM debido a la carencia de este carbohidrato (MacFaddin, 2003).

Para esta prueba, el agar SIM, previamente esterilizado, se inocula (con una colonia aislada de 18 - 24 h) por punción a dos tercios de profundidad del medio de cultivo. Luego se incuba a 37 °C durante 24 h o hasta que el crecimiento sea evidente. Transcurrido dicho tiempo se observan los resultados y, para comprobar la presencia de AIA, se agregan unas gotas del reactivo de Ehrlich o de Kovacs (Hemraj *et al.*, 2013).



**Figura 8.** Prueba bioquímica sulfuro indol movilidad (SIM). **A:** negativa para producción de ácido indol-3-acético (AIA), ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S) y movilidad; **B:** positiva para producción de H<sub>2</sub>S; **C:** positiva para producción de AIA; **D:** positiva para movilidad. Figura creada con BioRender (<https://biorender.com/>).

#### 2.3.1.6 Motilidad indol ornitina (MIO)

La prueba bioquímica motilidad indol ornitina (MIO) se utiliza para evaluar la motilidad bacteriana, al mismo tiempo que la producción de ácido indol-3-acético (AIA) y la actividad enzimática ornitina descarboxilasa (MacFaddin, 2000).

La motilidad, al igual que en la prueba sulfuro indol movilidad (SIM), se determina a través del crecimiento bacteriano en el medio de cultivo. Asimismo, la detección de AIA se lleva a cabo mediante la adición del reactivo de Ehrlich o Kovacs (MacFaddin, 2000).

Por su parte, para evaluar la actividad enzimática ornitina descarboxilasa, el medio MIO está constituido por glucosa, L-ornitina (Orn) y púrpura de bromocresol. La glucosa es la fuente de carbono fermentable, el aminoácido Orn es el sustrato para la detección de la enzima ornitina descarboxilasa y el púrpura de bromocresol es el indicador de pH, el cual, en un medio alcalino es color morado y en un medio ácido vira a color amarillo (MacFaddin, 2000; MacWilliams, 2009).

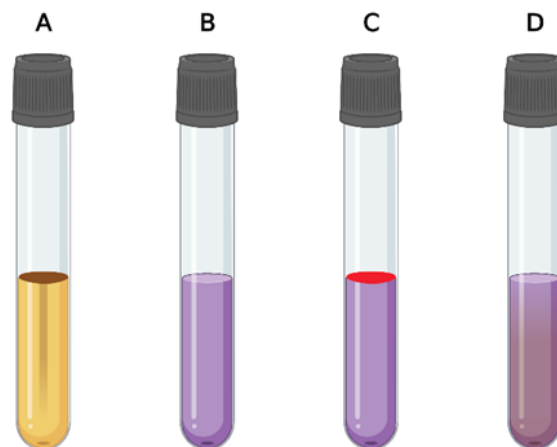
Las descarboxilasas son enzimas adaptativas o inducidas, es decir, solo se forman cuando un microorganismo es cultivado en un ambiente ácido. Por esta razón, durante la fermentación de la glucosa se acidifica el medio de cultivo, lo que desata la actividad enzimática ornitina descarboxilasa. Durante la descarboxilación de la Orn, se forma la poliamina putrescina y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), con la consecuente alcalinización del medio (MacFaddin, 2000; MacWilliams, 2009).

En esta técnica, el agar MIO, previamente esterilizado, se distribuye en tubos de ensayo, los cuales se dejan enfriar en posición vertical. Posteriormente, se inoculan, por punción, a dos tercios de profundidad del agar. El microorganismo de interés se incuba a 37 °C durante 24 h (MacWilliams, 2009).

Transcurrido dicho tiempo, si el agar se observa de color amarillo, el microorganismo es negativo a la actividad de la ornitina descarboxilasa, pues durante la acidificación del medio por la fermentación de la glucosa, no se desató dicha actividad enzimática (Figura 9A). En contraste, si el agar es color morado, el resultado se considera positivo, ya que la enzima ornitina descarboxilasa llevó a cabo la descarboxilación del aminoácido Orn, lo que alcaliniza el medio de cultivo (Figura 9B) (MacFaddin, 2000; MacWilliams, 2009).

En cuanto a los resultados de la movilidad bacteriana, esta se considera positiva si el crecimiento se produjo más allá de la línea de punción (Figura 9D). En cambio, la movilidad se determina negativa si la bacteria creció sobre la línea de inoculación (Figura 9A) (MacFaddin, 2000; MacWilliams, 2009).

Por último, para comprobar la producción de AIA, se agregan unas gotas del reactivo de Ehrlich o de Kovacs al agar, si se forma un halo color rojo en la superficie del medio, el resultado para la producción de AIA es positivo (Figura 9C). No obstante, si se forma un halo color marrón o del mismo color que del reactivo, la producción de AIA es negativa (Figura 9A) (MacFaddin, 2000; MacWilliams, 2009).



**Figura 9.** Prueba bioquímica motilidad indol ornitina (MIO). **A:** negativa para la actividad enzimática ornitina descarboxilasa, producción de ácido indol-3-acético (AIA) y movilidad; **B:** positiva para la actividad enzimática ornitina descarboxilasa; **C:** positiva para la producción de AIA; **D:** positiva para movilidad. Figura creada con BioRender (<https://biorender.com/>).

### 2.3.1.7 Reducción de nitratos

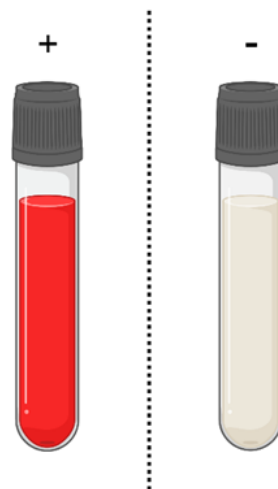
La prueba reducción de nitratos permite evaluar la capacidad de algunos microorganismos para reducir al nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) en nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ). Dicha reducción, por lo general, está mediada en condiciones de anaerobiosis por la enzima nitrato reductasa, la cual utiliza al  $\text{NO}_3^-$  como aceptor de electrones a fin de proporcionar energía a la célula (MacFaddin, 2003; Buxton, 2011).

La reducción del  $\text{NO}_3^-$  también puede derivar en nitrógeno molecular ( $\text{N}_2$ ), según el sistema enzimático del microorganismo y la atmósfera en la que crece. No obstante, el principal subproducto generado por bacterias es el  $\text{NO}_2^-$  (MacFaddin, 2003; Buxton, 2011).

Para revelar la presencia de  $\text{NO}_2^-$  se emplean los reactivos de Griess A y B, los cuales están compuestos por ácido sulfanílico ( $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}$ ) y  $\alpha$ -naftilamina ( $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NH}_2$ ), respectivamente. Dichos reactivos reaccionan con el  $\text{NO}_2^-$  en el medio de cultivo y forman un compuesto azoico color rojo (Buxton, 2011).

La técnica consiste en distribuir el caldo nitratos, previamente esterilizado, en tubos de ensayo con tapón de rosca. Después, se inoculan con colonias aisladas de 18 - 24 h. Y, posteriormente, el microorganismo de interés se incuba a  $37^\circ\text{C}$  durante 12 - 24 h (Buxton, 2011).

Transcurrido dicho tiempo, se añaden dos gotas de cada uno de los reactivos de Griess (A y B). Si el medio vira a color rojo, la reducción de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$  es positiva. En cambio, si después de haber agregado los reactivos de Griess A y B, no hay vire en el medio, la reducción se considera negativa (Figura 10) (Buxton, 2011).



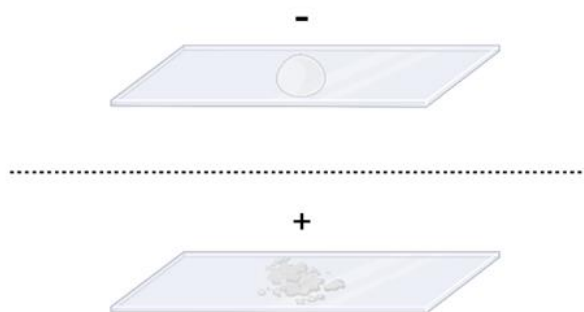
**Figura 10.** Prueba bioquímica reducción de nitratos. (+) Positiva; (-) Negativa. Figura creada con BioRender (<https://biorender.com/>).

### 2.3.1.8 Catalasa

Para sobrevivir, los microorganismos dependen de mecanismos de defensa que les permitan reparar o escapar del daño oxidativo provocado por el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Hemraj *et al.*, 2013).

Algunas bacterias aerobias y anaerobias facultativas expresan enzimas como la catalasa, la cual facilita la desintoxicación celular neutralizando los efectos bactericidas del  $H_2O_2$  mediante su descomposición en agua ( $H_2O$ ) y oxígeno molecular ( $O_2$ ). En virtud de ello, la prueba bioquímica catalasa permite evaluar dicha actividad enzimática en un microorganismo de interés (Reiner, 2010).

El método general consiste en colocar una colonia pura de la bacteria problema en un portaobjetos limpio y agregar un par de gotas de  $H_2O_2$  al 3%. Un resultado positivo se evidencia por la rápida formación de burbujas. Mientras que una respuesta negativa se evidencia por la ausencia de estas (Figura 11) (Reiner, 2010; Hemraj *et al.*, 2013).



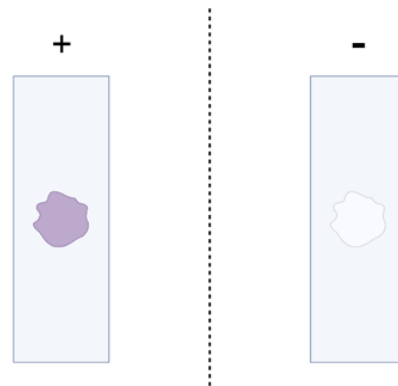
**Figura 11.** Prueba bioquímica catalasa. (+) Positiva; (-) Negativa. Figura creada con BioRender (<https://biorender.com/>).

### 2.3.1.9 Oxidasa

La prueba bioquímica oxidasa evalúa la presencia de la enzima citocromo *c* oxidasa en microorganismos aerobios y anaerobios facultativos, los cuales obtienen su energía a través de la respiración (Shields y Cathcart, 2010).

En este proceso, la citocromo *c* oxidasa cataliza la oxidación del citocromo *c* al mismo tiempo que se reduce el oxígeno molecular ( $O_2$ ) para formar agua ( $H_2O$ ). En la prueba de laboratorio, a menudo se utiliza el reactivo N, N, N', N'-tetrametil-*p*-fenilendiamina (TMPD) como donante artificial de electrones. Una vez que el TMPD es oxidado por el citocromo *c*, cambia de incoloro (estado reducido) a un compuesto azul oscuro o púrpura (estado oxidado) (Shields y Cathcart, 2010; Hemraj *et al.*, 2013).

La técnica más sencilla consiste en colocar una pequeña colonia pura del microorganismo problema en una pieza cuadrada de papel filtro Whatman. Luego, se añaden unas gotas del reactivo TMPD. Cuando la reacción es positiva, rápidamente se producirá un color violeta que se intensificará hacia el azul oscuro o púrpura. No obstante, si la reacción no ocurre después de dos minutos de haber agregado el reactivo TMPD, la prueba debe ser considerada como negativa (Figura 12) (Hemraj *et al.*, 2013).



**Figura 12.** Prueba bioquímica oxidasa. (+) Positiva; (-) Negativa. Figura creada con BioRender (<https://biorender.com/>).

### 2.3.2 Tinción de Gram

La tinción de Gram es una técnica de microscopía óptica que permite diferenciar a las bacterias en dos grandes grupos según la estructura de su pared celular. A las bacterias que presentan dos membranas lipídicas, entre las que se localiza una fina pared celular de peptidoglicanos, se les denomina Gram negativas (Beveridge, 2001).

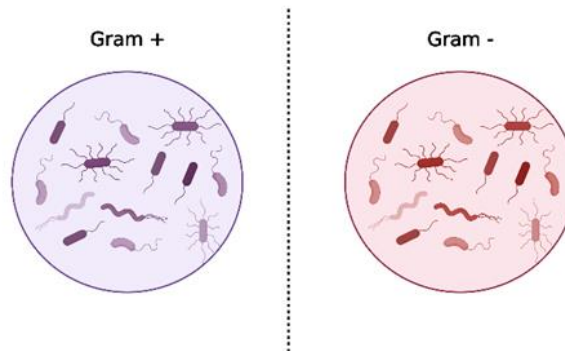
La composición de la pared celular de estas bacterias no les permite retener el colorante de tinción primario (cristal violeta, de color morado), por ello se tiñen con el colorante secundario (safranina, de color rojo). En contraste, a las bacterias que presentan solo una membrana lipídica y una pared celular de peptidoglicanos mucho más gruesa, que atrapa el colorante de tinción primario (cristal violeta), se les denomina Gram positivas (Figura 13) (Beveridge, 2001; Moyes *et al.*, 2009).

Adicionalmente, la tinción de Gram revela la morfología celular general de las bacterias, lo que permite etiquetarlas como bacilos, cocos o espirales. Además, dicha tinción es útil para la clasificación inicial de microorganismos nuevos o desconocidos (Beveridge, 2001; Moyes *et al.*, 2009).

El método general consiste en colocar una pequeña suspensión de bacterias en un portaobjetos de vidrio limpio, las cuales se fijan mediante calentamiento suave (Beveridge, 2001; Moyes *et al.*, 2009).

Después, se añaden a la muestra unas gotas de cristal violeta y se deja reposar durante 1 min. Luego, se añaden unas gotas de Lugol directamente al cristal violeta para que actúe como mordiente durante 2 min. La mezcla cristal violeta - Lugol se vierte del portaobjetos y se lava rápidamente con agua destilada, seguido de alcohol - acetona durante 20 s (Beveridge, 2001; Moyes *et al.*, 2009).

El portaobjetos se vuelve a lavar con agua destilada, se le añaden unas gotas de safranina a la muestra y se deja actuar durante 2 min. Después, se enjuaga el portaobjetos con agua destilada, se seca con un papel filtro y se observa bajo el microscopio óptico (Beveridge, 2001).



**Figura 13.** Tinción de Gram. **Izquierda:** bacterias Gram positivas (+); **Derecha:** bacterias Gram negativas (-). Figura creada con BioRender (<https://biorender.com/>).

En la actualidad, se ha informado que una gran proporción de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV), productoras de AIA, son Gram negativas. No obstante, también existen diversas investigaciones sobre bacterias Gram positivas, productoras de AIA, en suelos (Kumar *et al.*, 2011; Fan *et al.*, 2012).

## 2.4 Biotecnología agrícola

Los sistemas biológicos son particularmente atractivos debido a que utilizan recursos básicos de organismos vivos, o sus derivados, para generar una amplia gama de productos o procesos (Gavrilescu y Chisti, 2005).

A lo largo del tiempo, estos procesos se han ido perfeccionando a través de técnicas desarrolladas por un área relativamente nueva, conocida como biotecnología. La biotecnología se define, comúnmente, como toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos, o el producto de los mismos, para el desarrollo de un bien o servicio (Gavrilescu y Chisti, 2005).

La biotecnología ha tenido un gran impacto en la agricultura gracias al desarrollo de cultivos híbridos, el aumento de la resistencia a plagas y enfermedades, la mejora del valor nutricional, así como, el aumento en la eficiencia de absorción de nutrientes por las plantas (Sharma *et al.*, 2002).

En virtud de ello, la biotecnología agrícola se define como un conjunto de herramientas y disciplinas, destinadas a modificar organismos, (semillas, plantas, microorganismos del suelo) a fin de mejorar los sistemas agrícolas existentes (Sharma *et al.*, 2002; Thieman y Palladino, 2010).

Hoy en día, los avances en la biotecnología agrícola se han centrado en el desarrollo de inoculantes microbianos, constituidos principalmente por rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV), capaces de reemplazar a los agroquímicos convencionales, los cuales son una fuente importante de contaminación en suelos (Ningsih-Susilowati *et al.*, 2002; De Souza *et al.*, 2015).

#### 2.4.1 Biofertilizantes

En las últimas décadas, conforme se ha incrementado la demanda alimenticia, se ha intensificado la producción agrícola. Para hacer frente a esto, los productores se han vuelto cada vez más dependientes de los agroquímicos (Viscardi *et al.*, 2016).

El uso intensivo de dichos compuestos provoca serios problemas que afectan no solo a la calidad del medioambiente, sino también, a la salud humana. Por esta razón, se presenta la exigencia creciente, por parte de agricultores y consumidores, del desarrollo de nuevos métodos sostenibles que reemplacen o, al menos, complementen las estrategias ya existentes basadas en productos químicos (Pérez-García *et al.*, 2011; Viscardi *et al.*, 2016).

La biotecnología agrícola ha impulsado al desarrollo de inoculantes microbianos, los cuales mejoran el rendimiento de los cultivos a través de la síntesis de fitohormonas y absorción de nutrientes del suelo. Estos se dividen en tres categorías: 1) bioestimuladores, 2) fitoestimuladores y 3) biofertilizantes, siendo este último el de mayor interés. La interpretación del término biofertilizante es muy amplia; no obstante, puede definirse como aquellos productos que contienen microorganismos y que, al ser inoculados, pueden vivir asociados o en simbiosis con las plantas, lo que beneficia tanto a su nutrición como a su protección (Ningsih-Susilowati *et al.*, 2002; Berg, 2009; Grageda-Cabrera *et al.*, 2012).

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) contribuyen al desarrollo de biofertilizantes gracias a su capacidad para producir fitohormonas, controlar o inhibir la actividad de patógenos, mejorar la estructura del suelo, acelerar la germinación de semillas, mejorar la emergencia de las plántulas y promover el crecimiento de las raíces (Hayat *et al.*, 2010; De Souza *et al.*, 2015; Viscardi *et al.*, 2016).

## 2.4.2 Aplicación de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV), productoras de ácido indol-3-acético (AIA), como biofertilizantes

El término rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) engloba a todas las bacterias del suelo capaces de mejorar el crecimiento de las plantas a través de mecanismos como la fijación de nitrógeno, síntesis de vitaminas y enzimas, solubilización de fósforo inorgánico (Pi), mineralización de fósforo orgánico (Po), secreción de sideróforos y, especialmente, producción de fitohormonas como el ácido indol-3-acético (AIA) (Sharma *et al.*, 2002; De Souza *et al.*, 2015).

El AIA bacteriano es responsable de incrementar el desarrollo del sistema radicular de las plantas, lo que permite una mejor absorción de agua y nutrientes por parte de estas (Sharma *et al.*, 2002; Ona *et al.*, 2003; Gavrilesco y Chisti, 2005).

Actualmente, la aplicación en la agricultura de RPCV, productoras de AIA, aumentó sustancialmente gracias al desarrollo de diversos biofertilizantes que compiten en el mercado contra los fertilizantes convencionales (Tabla 3) (Ona *et al.*, 2003).

Dichos biofertilizantes, además de ser económicos, han demostrado que favorecen el rendimiento y desarrollo de cultivos de importancia económica como el maíz, arroz, papa, trigo, tomate, frijol y soya (Ona *et al.*, 2003; Berg, 2009; Hayat *et al.*, 2010; Pérez-García *et al.*, 2011; Viscardi *et al.*, 2016).

**Tabla 3.** Biofertilizantes a base de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV), productoras de ácido indol-3-acético (AIA), utilizados en la agricultura (Ona *et al.*, 2003).

RPCV	Modo de acción	Cultivo
<i>Bacillus</i> sp.	Producción de AIA y solubilización de Pi	Maíz, arroz, trigo y caña de azúcar
<i>Pseudomonas</i> sp.	Producción de AIA y protección contra patógenos	Tomate, tabaco, pepino y garbanzo
<i>Rhizobium</i> sp.	Producción de AIA, citoquininas y giberelinas	Canola, soya, frijol, maíz y chicharos
<i>Enterobacter</i> sp.	Producción de AIA y protección contra patógenos	Arroz, lechuga, trigo, soya y rábano

Por esta razón, la utilización de biofertilizantes e inoculantes microbianos está atrayendo cada vez más atención como una alternativa económica y sostenible con el medio ambiente, lo que podría reducir significativamente el uso de los agroquímicos en todo el mundo. En este contexto, la biotecnología agrícola jugará un papel importante en la producción de alimentos en un futuro próximo (Sharma *et al.*, 2002; Gavrilesco y Chisti, 2005; Berg, 2009).

### 3. ANTECEDENTES

En la última década, se ha incrementado el interés por la exploración del potencial biotecnológico de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) en la agricultura sostenible. Entre los mecanismos más importantes para la promoción vegetal se encuentran la solubilización de fosfatos y producción de auxinas como el ácido indol-3-acético (AIA). El AIA producido por bacterias actúa en la planta para estimular la elongación radicular, mejorando así la absorción de minerales y nutrientes del suelo. Experimentalmente, la producción de esta fitohormona por RPCV se ha cuantificado mediante métodos espectrofotométricos (Tabla 4) (Kang *et al.*, 2006; Erturk *et al.*, 2010; Lwin *et al.*, 2012; Meliani *et al.*, 2017).

**Tabla 4.** Antecedentes de la cuantificación de ácido indol-3-acético (AIA) producido por rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV), a través de métodos espectrofotométricos (Erturk *et al.*, 2010; Lwin *et al.*, 2012; Meliani *et al.*, 2017; Kumari *et al.*, 2018; Sherpa *et al.*, 2021).

Autor	Medio de cultivo	L-triptófano (g/L)	Condiciones de incubación	Longitud de onda (nm)	Cepa	AIA (µg/mL)
Erturk <i>et al.</i> 2010	Caldo Soja Trypticaseína	0.025	27 °C, por 7 días	530	<i>P. polymyxa</i>	32.8
					<i>B. subtilis</i>	22.4
					<i>B. megaterium</i>	25.3
					<i>B. simplex</i>	33.6
Lwin <i>et al.</i> 2012	Caldo Nutritivo	0.500	30 °C, por 10 días	530	R1	97.2
					R2	21.2
					R3	52.6
					R4	21.1
					R5	43.3
					R6	17.4
					R7	28.4
					R8	15.0
					R9	32.0
Meliani <i>et al.</i> 2017	Medio Mínimo de Sales	0.200	30 °C, por 2 días	530	<i>P. putida</i>	116.0
					<i>P. fluorescens</i>	89.0
Kumari <i>et al.</i> 2018	Caldo Nutritivo	1.000	30 °C, por 2 días	535	<i>P. aeruginosa</i>	111.9
					<i>B. subtilis</i>	45.6
Sherpa <i>et al.</i> 2021	Caldo LB	0.100	30 °C, por 5 días	530	<i>B. cereus</i>	66.5
					<i>B. mycoides</i>	45.1

Como se muestra en la Tabla 4, los trabajos recopilados se centran en la biosíntesis de AIA a través de las rutas dependientes del L-triptófano (Trp). Las concentraciones de dicho metabolito en los diferentes medios de cultivo empleados van desde 0.025 a 1.000 g/L, lo que permite evaluar la cantidad de AIA producido con respecto a la concentración de Trp en el medio. Además, los medios de cultivo seleccionados deben ser medios con la cantidad de nutrientes mínimos necesarios para el crecimiento de las bacterias (Erturk *et al.*, 2010; Lwin *et al.*, 2012; Meliani *et al.*, 2017; Kumari *et al.*, 2018; Sherpa *et al.*, 2021).

En la Tabla 4 también se observa que la temperatura promedio de incubación de las RPCV es de 30 °C; no obstante, el tiempo de incubación varía de los 2 a los 10 días. Este último parámetro es de gran importancia porque está estrechamente relacionado con la eficiencia de producción de AIA (Erturk *et al.*, 2010; Lwin *et al.*, 2012; Meliani *et al.*, 2017; Kumari *et al.*, 2018; Sherpa *et al.*, 2021).

Asimismo, de acuerdo con los datos recopilados en la Tabla 4, la cepa más eficiente es la reportada por Meliani *et al.* (2017), *Pseudomonas putida*, la cual produjo 116.0 µg/mL de AIA, con una concentración de 0.200 g/L de Trp en el medio de cultivo, en un periodo de incubación de 2 días. Por su parte, Kumari *et al.* (2018), emplearon la cepa *Pseudomonas aeruginosa*, la cual produjo 111.9 µg/mL de AIA, con 1.000 g/L de Trp adicionado al medio, durante el mismo periodo de tiempo (Erturk *et al.*, 2010; Lwin *et al.*, 2012; Meliani *et al.*, 2017; Kumari *et al.*, 2018; Sherpa *et al.*, 2021).

Otro aspecto por destacar es que la mayoría de las RPCV, señaladas en la Tabla 4, pertenecen al género de *Bacillus* sp., el cual ha sido ampliamente estudiado para su aplicación como biofertilizante debido a su capacidad para solubilizar fósforo inorgánico (Pi) y producir fitohormonas, tales como el AIA (Kang *et al.*, 2006; Erturk *et al.*, 2010; Lwin *et al.*, 2012; Meliani *et al.*, 2017; Kumari *et al.*, 2018; Sherpa *et al.*, 2021).

De esta manera, el propósito de esta tesis se enfoca en la producción de AIA por cuatro cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF), promotoras del crecimiento vegetal, aisladas del suelo.

## 4. JUSTIFICACIÓN

El ácido indol-3-acético (AIA) juega un papel crucial en la división celular y el desarrollo de raíces en las plantas. Además, controla aspectos del crecimiento en los cultivos agrícolas. Esta fitohormona puede ser producida por algunas bacterias con capacidad para solubilizar fósforo inorgánico (Pi). Por lo tanto, las bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF), que muestran ambas actividades, representan un recurso natural que biotecnológicamente puede ser aprovechado para su aplicación como biofertilizantes (Saghir-Khan *et al.*, 2007; Lara *et al.*, 2011; Mehmood *et al.*, 2018).

A fin de emplear BSF, productoras de AIA, como biofertilizantes, es fundamental que se estudie su capacidad metabólica, rendimiento y eficiencia, a través de cinéticas en medio líquido, con diferentes concentraciones del aminoácido precursor del AIA, el L-triptófano (Trp). Por esta razón, su aplicación biotecnológica pretende satisfacer la demanda alimenticia y disminuir gradualmente el uso de fertilizantes químicos. De esta manera, la síntesis bacteriana de AIA demostraría efectos positivos en la productividad de cultivos de importancia económica como el maíz, trigo, tomate, papa y arroz. Dicha iniciativa va de la mano con el Objetivo 2 (Hambre Cero) de la Agenda 2030 sobre el Desarrollo Sostenible, aprobada por la Organización de las Naciones Unidas (ONU, 2015), el cual se centra en asegurar la sostenibilidad de los sistemas de producción de alimentos al implementar prácticas agrícolas que aumenten la productividad y producción, contribuyan al mantenimiento de los ecosistemas, fortalezcan la capacidad de adaptación al cambio climático y mejoren progresivamente la calidad del suelo (Ondarza-Beneitez, 2016; Moreno-Reséndez *et al.*, 2018; Valverde-Lucio *et al.*, 2020; Bargaz *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021).

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 General**

Evaluar la producción de ácido indol-3-acético en cuatro cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato, mediante cinéticas en medio líquido, para su aplicación en la biotecnología agrícola.

### **5.2 Específicos**

Caracterizar propiedades de interés para la biotecnología agrícola, mediante pruebas bioquímicas aplicadas a cuatro cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato.

Comparar la producción de ácido indol-3-acético entre cuatro cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato, para la selección de la cepa con mayor producción.

Evaluar la producción de ácido indol-3-acético con la cepa bacteriana seleccionada, a través de cinéticas con tres concentraciones de L-triptófano.

## **6. HIPÓTESIS**

La producción de ácido indol-3-acético por las bacterias solubilizadoras de fosfato se incrementa con el incremento en la concentración de L-triptófano en el medio de cultivo.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Material biológico

Se emplearon cuatro cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) en medio sólido y líquido Pikovskaya, aisladas por Aguilar-Rivera (2020) de suelos cultivados con papa en el nevado de Toluca. Estas cepas forman parte del cepario del laboratorio de Edafología y Ambiente, de la Facultad de Ciencias en la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx). Asimismo, como control positivo se empleó la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922, proporcionada por la doctora Laura Alejandra Sánchez Paz, de la Facultad de Ciencias, UAEMéx (Aguilar-Rivera, 2020).

### 7.2 Reactivación del material biológico

Se realizaron resiembras, en cajas de Petri con agar nutritivo, de las cuatro cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) y el control positivo *E. coli* ATCC 25922, con la finalidad de contar con cepas de 24 h, adecuadas para llevar a cabo las diferentes pruebas bioquímicas, al igual que las cinéticas en medio líquido caldo PY. De la misma manera, se hicieron resiembras de las cuatro cepas de BSF, en agar Pikovskaya, con el objetivo de confirmar la solubilización de fosfato.

#### 7.2.1 Procedimiento de reactivación en agar nutritivo

Para la reactivación de las bacterias se empleó el agar nutritivo comercial Condalab® (Tabla 5), previamente esterilizado en autoclave (121 °C y 15 lb/pulg<sup>2</sup>, durante 15 min). La temperatura de crecimiento de las bacterias del suelo oscila entre los 25 y 35 °C. Mientras que la temperatura óptima de crecimiento de algunas enterobacterias, como *E. coli*, es de 37°C. Por esta razón, las cuatro cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) se incubaron a 28 °C, durante 24 h. La cepa *E. coli* ATCC 25922 se incubó a 37 °C, durante 24 h. Este procedimiento se llevó a cabo previo a su utilización en las pruebas bioquímicas y cinéticas de producción de ácido indol-3-acético (AIA) en el medio de cultivo líquido caldo PY (Cuong y Phuong-Hoa, 2021; Wu *et al.*, 2021).

**Tabla 5.** Composición, en gramos, del agar nutritivo comercial Condalab®, para su preparación en un litro de agua destilada (Condalab, 2021).

Composición	g/L
Agar bacteriológico	15.0
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0
Extracto de carne	3.0
Digerido enzimático de tejido animal	5.0

## 7.2.2 Procedimiento de reactivación en agar Pikovskaya

Las cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) fueron resembradas en el medio de cultivo agar Pikovskaya (ver composición en Tabla 6) para comprobar su actividad solubilizadora. Este es un medio selectivo debido a que la fuente de fósforo empleada es insoluble. Para su utilización, previamente se esterilizó en autoclave, a 121 °C y 15 lb/pulg<sup>2</sup>, durante 15 min. La confirmación de la actividad solubilizadora fue positiva debido a la presencia de halos traslucidos alrededor de las colonias de BSF incubadas a 28 °C, durante 7 días (Aguilar-Rivera, 2020).

**Tabla 6.** Composición, en gramos, del medio sólido agar Pikovskaya, para su preparación en un litro de agua destilada (Hernández-Leal *et al.*, 2011; Aguilar-Rivera, 2020).

Composición	g/L
Agar bacteriológico	15.0
Fosfato tricálcico [Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ]	5.0
Glucosa	10.0
Sulfato de amonio [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	5.0
Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> )	0.1
Cloruro de potasio (KCl)	0.2
Extracto de levadura	0.5

## 7.3 Caracterización bioquímica del cepario de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF)

### 7.3.1 Agar hierro triple azúcar (TSI)

Para caracterizar a las bacterias por su capacidad para fermentar azúcares (glucosa, lactosa y sacarosa) y producir ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S), se utilizó el medio comercial agar hierro triple azúcar (TSI) BD Bioxon<sup>®</sup> (Tabla 7). Este se esterilizó en autoclave, a 121 °C y 15 lb/pulg<sup>2</sup>, durante 15 min. Las cuatro cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) se incubaron a 28 °C, durante 24 h. La cepa *E. coli* ATCC 25922 se incubó a 37 °C, durante 24 h. La fermentación de los carbohidratos se observó mediante la producción de gas y un cambio en el color del indicador de pH. La producción de H<sub>2</sub>S se evidenció por el ennegrecimiento del medio (Hajna, 2003).

**Tabla 7.** Composición, en gramos, del medio comercial agar hierro triple azúcar (TSI) BD Bioxon®, para su preparación en un litro de agua destilada (BD Bioxon, 2003; Hajna, 2003).

Composición	g/L
Digerido pancreático de caseína	10.0
Digerido péptico de tejido animal	10.0
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0
Lactosa	10.0
Sacarosa	10.0
Glucosa	1.0
Sulfato ferroso de amonio [Fe(SO <sub>4</sub> )(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> )]	0.2
Tiosulfato de sodio (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	0.2
Rojo de fenol	0.025
Agar bacteriológico	13.0

### 7.3.2 Hidrólisis de almidón

La prueba para determinar la capacidad bacteriana para hidrolizar almidón se llevó a cabo en el medio agar almidón (ver preparación en Tabla 8). El agar se esterilizó en autoclave, a 121 °C y 15 lb/pulg<sup>2</sup>, durante 15 min. Las cuatro cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) se incubaron a 28 °C, durante 24 h. La cepa *E. coli* ATCC 25922 se incubó a 37 °C, durante 24 h. Transcurrido dicho tiempo, se añadieron unas gotas de Lugol (ver composición en Tabla 9) al agar. La formación de halos blanquecinos alrededor de las colonias bacterianas en crecimiento indicó actividad amilolítica (Evans *et al.*, 2004; Saavedra, 2017).

**Tabla 8.** Reactivos y procedimientos para la preparación de 100 mL de agar almidón (Saavedra, 2017; Condalab, 2021).

Reactivos	Procedimientos
90 mL de agar nutritivo	Agregar 2.8 g de agar nutritivo comercial Condalab® (Tabla 5) en 90 mL de agua destilada. Disolver por calentamiento y agitación hasta el punto de ebullición.
10 mL de goma de almidón	Colocar 1 g de almidón en 10 mL de agua destilada fría y disolver los grumos. Agregar esta preparación a 90 mL de agua destilada hirviendo. Mezclar y llevar al punto de ebullición por 3 min. Incorporar a los 90 mL de agar nutritivo previamente preparados.

**Tabla 9.** Composición, en gramos, del reactivo Lugol, para su preparación en 100 mL de agua destilada (Ramírez-Gama *et al.*, 2008).

Composición	G
Yodo (I)	5.0
Yoduro de potasio (KI)	10.0

### 7.3.3 Citrato de Simmons

Para evaluar la capacidad de las bacterias para aprovechar al citrato como única fuente de carbono, se empleó el medio comercial agar citrato de Simmons BD Bioxon® (Tabla 10). El medio se esterilizó en autoclave, a 121 °C y 15 lb/pulg<sup>2</sup>, durante 15 min. Las cuatro cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) se incubaron a 28 °C, durante 24 h. La cepa *E. coli* ATCC 25922 se incubó a 37 °C, durante 24 h. El vire a color azul del indicador de pH evidenció la utilización del citrato como única fuente de carbono (MacWilliams, 2009).

**Tabla 10.** Composición, en gramos, del medio comercial agar citrato de Simmons BD Bioxon®, para su preparación en un litro de agua destilada (MacWilliams, 2009; BD Bioxon, 2015).

Composición	g/L
Fosfato de amonio dihidrogenado (NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1.0
Fosfato dipotásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1.0
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0
Citrato de sodio	2.0
Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> )	0.2
Azul de bromotimol	0.08
Agar bacteriológico	15.0

### 7.3.4 Ácido indol-3-acético (AIA)

La prueba de ácido indol-3-acético (AIA), para determinar la capacidad de las bacterias para producir dicha fitohormona, se llevó a cabo en el medio comercial caldo triptófano Condalab® (Tabla 11), previamente esterilizado en autoclave (121 °C y 15 lb/pulg<sup>2</sup>, durante 15 min). Las cuatro cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) se incubaron a 28 °C, durante 24 h. La cepa *E. coli* ATCC 25922 se incubó a 37 °C, durante 24 h. La producción de AIA se evidenció por la formación de un halo color rojizo en la superficie del medio después de haber agregado unas gotas del reactivo de Kovacs (ver composición en Tabla 12) (MacWilliams, 2009).

**Tabla 11.** Composición, en gramos, del medio comercial caldo triptófano Condalab®, para su preparación en un litro de agua destilada (Condalab, 2019).

Composición	g/L
Digerido pancreático de caseína	10.0
L-triptófano (Trp)	1.0
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0

**Tabla 12.** Composición del reactivo de Kovacs (Ramírez-Gama *et al.*, 2008).

Composición	Unidades
<i>p</i> -dimetilamino benzaldehído	5.0 g
Alcohol amílico (C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> OH)	75.0 mL
Ácido clorhídrico (HCl)	25.0 mL

### 7.3.5 Sulfuro indol movilidad (SIM)

Para caracterizar a las bacterias por su capacidad para moverse, así como para producir ácido indol-3-acético (AIA) y ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S) en una misma muestra, se utilizó el medio comercial sulfuro indol movilidad (SIM) BD Bioxon® (Tabla 13). El agar se esterilizó en autoclave, a 121 °C y 15 lb/pulg<sup>2</sup>, durante 15 min. Las cuatro cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) se incubaron a 28 °C, durante 24 h. La cepa *E. coli* ATCC 25922 se incubó a 37 °C, durante 24 h. La producción de AIA se evidenció por la formación de un halo color rojizo en la superficie del medio de cultivo después de haber agregado unas gotas del reactivo de Kovacs (ver composición en Tabla 12). La movilidad se determinó por el crecimiento bacteriano más allá de la línea de inoculación. Y, la producción de H<sub>2</sub>S se evidenció por el ennegrecimiento del agar (MacWilliams, 2009).

**Tabla 13.** Composición, en gramos, del medio comercial sulfuro indol movilidad (SIM) BD Bioxon®, para su preparación en un litro de agua destilada (BD Bioxon, 2008).

Composición	g/L
Peptona de caseína	20.0
Peptona de carne	6.1
Sulfato ferroso de amonio [Fe(SO <sub>4</sub> )(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> )]	0.2
Tiosulfato de sodio (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	0.2
Agar bacteriológico	3.5

### 7.3.6 Movilidad indol ornitina (MIO)

La prueba para caracterizar a las bacterias por su capacidad para moverse, al mismo tiempo que se evalúa la actividad enzimática ornitina descarboxilasa y la producción de ácido indol-3-acético (AIA), se llevó a cabo en el medio comercial movilidad indol ornitina (MIO) BD Bioxon® (Tabla 14). Este se esterilizó en autoclave, a 121 °C y 15 lb/pulg<sup>2</sup>, durante 15 min. Las cuatro cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) se incubaron a 28 °C, durante 24 h. La cepa *E. coli* ATCC 25922 se incubó a 37 °C, durante 24 h. La actividad de la enzima ornitina descarboxilasa se observó por el vire del indicador de pH a color violeta. La producción de AIA se evidenció por la formación de un halo color rojizo en la superficie del medio después de haber agregado unas gotas del reactivo de Kovacs (Tabla 12). La movilidad se determinó por el crecimiento bacteriano más allá de la línea de inoculación (MacFaddin, 2000).

**Tabla 14.** Composición, en gramos, del medio comercial movilidad indol ornitina (MIO) BD Bioxon®, para su preparación en un litro de agua destilada (BD Bioxon, 2007).

Composición	g/L
Digerido pancreático de caseína	9.5
Digerido pancreático de gelatina	10.0
Extracto de levadura	3.0
Glucosa	1.5
Clorhidrato de L-ornitina (Orn)	5.0
Púrpura de bromocresol	0.02
Agar bacteriológico	2.0

### 7.3.7 Reducción de nitratos

La capacidad bacteriana para reducir el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) se evaluó con la prueba reducción de nitratos. Para ello, se utilizó el medio líquido caldo nitratos, el cual se preparó conforme a la información de la Tabla 15. Después, se esterilizó en autoclave, a 121 °C y 15 lb/pulg<sup>2</sup>, durante 15 min. Las cuatro cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) se incubaron a 28 °C, durante 24 h. La cepa *E. coli* ATCC 25922 se incubó a 37 °C, durante 24 h. Transcurrido el periodo de incubación, se agregaron 2 gotas de los reactivos de Griess A y B (ver composición en Tabla 16). El cambio en la coloración del medio a rojo indicó la reducción del  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$  (Buxton, 2011).

**Tabla 15.** Composición, en gramos, del medio líquido caldo nitratos, para su preparación en 30 mL de agua destilada (Viera-Oramas *et al.*, 2014).

<b>Composición</b>	<b>g</b>
Extracto de Carne	0.09
Nitrato de Potasio (KNO <sub>3</sub> )	0.03
Peptona	0.15

**Tabla 16.** Composición de los reactivos de Griess A y B (Ramírez-Gama *et al.*, 2008).

<b>Composición</b>	<b>Unidades</b>
<b>Reactivo de Griess A:</b>	
Ácido sulfanílico (C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub> S)	1.5 g
Ácido acético (CH <sub>3</sub> COOH)	150.0 mL
<b>Reactivo de Griess B:</b>	
Dimetil- $\alpha$ -naftilamina	0.1 g
Ácido acético (CH <sub>3</sub> COOH) al 33%	150.0 mL

### 7.3.8 Catalasa

Para evidenciar la presencia de la enzima catalasa en las cuatro cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) y la cepa *E. coli* ATCC 25922, se utilizó una solución de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) preparada de acuerdo con la Tabla 17. Después, con un asa bacteriológica, se tomaron pequeñas muestras de biomasa, de cada una de las bacterias en estudio, y se colocaron en tubos de ensayo con 1 mL de la solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La formación de burbujas demostró la actividad enzimática catalasa (Reiner, 2010).

**Tabla 17.** Composición, en mililitros, de la solución de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Reiner, 2010).

<b>Reactivos</b>	<b>mL</b>
Peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) al 30%	1.0
Agua destilada	9.0

### 7.3.9 Oxidasa

Para caracterizar a las cuatro cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) y la cepa *E. coli* ATCC 25922, por la actividad enzimática citocromo *c* oxidasa, se utilizó el reactivo comercial N, N, N', N'-tetrametil-*p*-fenilendiamina (TMPD) BD Bioxon®. Se colocó una gota de este reactivo en una colonia aislada de cada una de las bacterias en estudio, previamente sembradas en agar nutritivo. La presencia de la enzima citocromo *c* oxidasa se evidenció por la formación de una coloración violeta en la colonia seleccionada (BD Bioxon, 2017).

### 7.3.10 Tinción de Gram

La tinción de Gram se llevó a cabo por el método de Beveridge (2001). Este procedimiento se realizó con cada una de las cuatro cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) y la cepa *E. coli* ATCC 25922. Las muestras se observaron a través de un microscopio óptico Olympus™ serie CHS con los aumentos 4x, 10x, 40x y 100x (Beveridge, 2001).

## 7.4 Caracterización macroscópica

La caracterización macroscópica se llevó a cabo con la finalidad de diferenciar a las bacterias de acuerdo con las características de las colonias en crecimiento. De esta manera, se evaluó el tamaño, forma, superficie, elevación, pigmentación, opacidad y consistencia, en las cuatro cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) y la cepa *E. coli* ATCC 25922, en agar nutritivo de 24 h (Shah *et al.*, 2020).

## 7.5 Producción de inóculo en el medio de cultivo caldo PY

Para la producción del inóculo bacteriano, las cuatro cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) y la cepa *E. coli* ATCC 25922 se reactivaron en el agar nutritivo comercial Condalab® (Tabla 5), de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente. Después, todas las cepas bacterianas se resembraron en el medio de cultivo líquido caldo PY (ver composición en Tabla 18), previamente esterilizado en autoclave a 121 °C y 15 lb/pulg<sup>2</sup>, durante 15 min. Las cuatro cepas de BSF se incubaron a 28 °C, durante 72 h. La cepa *E. coli* ATCC 25922 se incubó a 37 °C, durante 72 h.

**Tabla 18.** Composición, en gramos, del medio de cultivo caldo PY, para su preparación en un litro de agua destilada (Aguilar-Rivera, 2020).

Composición	g/L
Glucosa	5.0
Peptona de caseína	5.0
Extracto de levadura	3.0
Cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> )	0.1

## 7.6 Construcción de la curva de calibración de ácido indol-3-acético (AIA)

La concentración de ácido indol-3-acético (AIA) bacteriano producido se estimó utilizando dos curvas estándar de valores conocidos de AIA comercial marca Sigma-Aldrich® (0 - 10 µg/mL y 10 - 100 µg/mL). Para ello, se disolvieron 10 mg del AIA Sigma-Aldrich® en 10 mL de acetona, con la finalidad de obtener una solución stock de 1000 µg/mL. Posteriormente, a partir de la solución stock se llevaron a cabo las respectivas series de diluciones utilizando caldo PY (Tabla 18) para obtener las concentraciones 0, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 20, 50 y 100 µg/mL de AIA. Un mL de cada solución preparada se mezcló con 2 mL del reactivo de Salkowski (ver composición en Tabla 19), y se incubó en la oscuridad durante 30 min. El desarrollo de una coloración rosa - roja indicó la presencia de AIA. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro Thermo Spectronic™ Genesys 20, a 530 nm (Khan *et al.*, 2016).

**Tabla 19.** Composición, en mililitros, del reactivo de Salkowski (Gordon y Weber, 1950).

Composición	mL
Ácido sulfúrico (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	30.0
Cloruro de hierro (FeCl <sub>3</sub> ) 0.5 M	1.0
Agua destilada	50.0

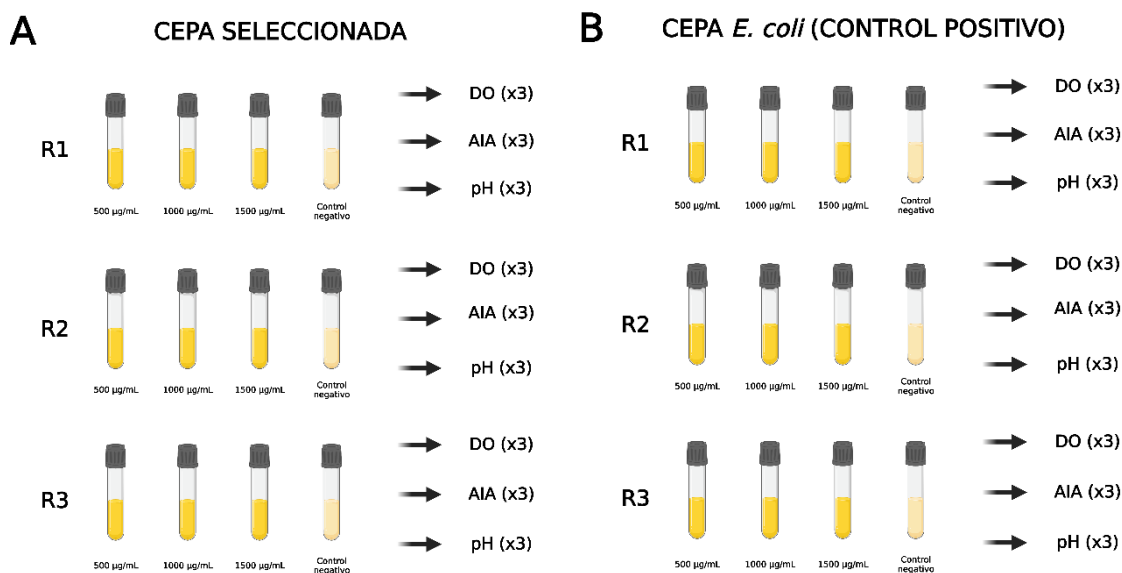
## **7.7 Comparación de la producción de ácido indol-3-acético (AIA) entre las cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF)**

Para seleccionar a la bacteria solubilizadora de fosfato (BSF) con mayor producción de ácido indol-3-acético (AIA), 500  $\mu\text{L}$  de cada una de las cuatro cepas de BSF y la cepa *E. coli* ATCC 25922, previamente producidas en el medio de cultivo caldo PY, se sembraron en el medio comercial caldo triptófano Condalab<sup>®</sup> (Tabla 11), esterilizado en autoclave a 121 °C y 15 lb/pulg<sup>2</sup>, durante 15 min. Las cuatro cepas de BSF se incubaron a 28 °C y la cepa *E. coli* ATCC 25922 se incubó a 37 °C, durante 72 h. El AIA producido se evaluó a las 0, 24, 48 y 72 h mediante el método espectrofotométrico del reactivo de Salkowski. Para ello, se centrifugaron 5 mL de cada una de las cepas bacterianas, a 3500 rpm, durante 20 min. Luego, se mezcló 1 mL del sobrenadante libre de células, de cada cepa bacteriana, con 2 mL del reactivo de Salkowski (Tabla 19), y se incubaron en la oscuridad durante 30 min. El desarrollo de una coloración rosa - roja indicó la producción de AIA. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro Thermo Spectronic™ Genesys 20, a 530 nm. Las concentraciones de AIA se calcularon con una curva estándar de valores conocidos de AIA (0 - 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Glickmann y Dessaux, 1995; Goswami *et al.*, 2014).

## **7.8 Diseño experimental para las cinéticas de producción de ácido indol-3-acético (AIA)**

Las cinéticas de producción de ácido indol-3-acético (AIA) se llevaron a cabo con la cepa que, de acuerdo con el procedimiento anterior, demostró una mayor producción de AIA. Asimismo, se trabajó con la cepa *E. coli* ATCC 25922 como control positivo y con el medio de cultivo caldo PY (Tabla 18), sin biomasa, como control negativo.

El diseño experimental fue completamente aleatorio. Se trabajaron tres tratamientos en el medio de cultivo caldo PY (Tabla 18) con tres concentraciones de L-triptófano (Trp): 500, 1000 y 1500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , con tres réplicas experimentales cada uno. De esta manera, para cada tratamiento se monitorearon, a las 0, 24, 48 y 96 h, los siguientes parámetros: crecimiento bacteriano por densidad óptica, producción de AIA por espectrofotometría y pH del medio de cultivo, con tres repeticiones analíticas cada uno (Figura 14).



**Figura 14.** Diseño experimental para las cinéticas de producción de ácido indol-3-acético (AIA). **A:** para la cepa seleccionada; **B:** para la cepa *E. coli* ATCC 25922 (control positivo). **Trp:** L-triptófano; **R1, 2 y 3:** replicas experimentales de los tratamientos (500, 1000 y 1500 µg/mL de Trp); **DO:** densidad óptica; **x3:** número de repeticiones analíticas para cada parámetro monitoreado. Figura creada con BioRender (<https://biorender.com/>).

### 7.8.1 Cinéticas de producción de ácido indol-3-acético (AIA)

De acuerdo con el diseño experimental, las cinéticas de producción de ácido indol-3-acético (AIA) se llevaron a cabo para cada uno de los tres tratamientos con concentraciones diferentes de L-triptófano (Trp) (500, 1000 y 1500 µg/mL). Cada tratamiento se ejecutó en tubos de ensayo con 10 mL del medio de cultivo caldo PY (Tabla 18) adicionado con Trp comercial marca DIBICO®. En cada tubo se inocularon 500 µL de la cepa seleccionada y la cepa *E. coli* ATCC 25922, ajustadas a la misma densidad óptica inicial; mientras que el control negativo se dejó sin inocular. La cepa seleccionada se incubó a 28 °C y la cepa *E. coli* ATCC 25922 a 37 °C, durante 96 h. El monitoreo del crecimiento bacteriano por densidad óptica (DO), la producción de AIA por espectrofotometría y el pH del medio de cultivo, se llevaron a cabo a la 0, 24, 48 y 96 h, por triplicado.

#### 7.8.1.1 Cuantificación del crecimiento bacteriano

El crecimiento bacteriano de la cepa seleccionada, del control positivo (la cepa *E. coli* ATCC 25922), y del control negativo (sin biomasa), se cuantificó por densidad óptica (DO), a 600 nm, en un espectrofotómetro Thermo Spectronic™ Genesys 20, para los tratamientos con 500, 1000 y 1500 µg/mL de L-triptófano (Trp), inoculados de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente, a las 0, 24, 48 y 96 h.

### 7.8.1.2 Cuantificación de AIA bacteriano producido

La producción de ácido indol-3-acético (AIA) bacteriano se determinó mediante el método espectrofotométrico del reactivo de Salkowski, para los tratamientos con 500, 1000 y 1500 µg/mL de L-triptófano (Trp). Se centrifugaron (a 3500 rpm, durante 20 min) 5 mL del medio de cultivo inoculado con la cepa seleccionada y la cepa *E. coli* ATCC 25922 (de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado 7.8.1 Cinéticas de producción de AIA), así como del control negativo (sin biomasa). Luego se mezcló 1 mL del sobrenadante libre de células, de cada cepa bacteriana, con 2 mL del reactivo de Salkowski (ver composición en Tabla 19), y se incubó en la oscuridad durante 30 min. El desarrollo de una coloración rosa - roja indicó la producción de AIA. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro Thermo Spectronic™ Genesys 20, a 530 nm. Las concentraciones de AIA se calcularon con una curva estándar de valores conocidos de AIA (0 - 10 µg/mL). A partir de este procedimiento también se evaluó la velocidad de producción de AIA (Glickmann y Dessaux, 1995; Goswami *et al.*, 2014).

### 7.8.1.3 Determinación del pH en el medio de cultivo

El pH del medio de cultivo se cuantificó, para los tratamientos con 500, 1000 y 1500 µg/mL de L-triptófano (Trp), inoculados con la cepa seleccionada y la cepa *E. coli* ATCC 25922 (de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente en el apartado 7.8.1 Cinéticas de producción de AIA), así como del control negativo (sin biomasa), con un potenciómetro Conductronic™ PH15, a las 0, 24, 48 y 96 h.

## 7.9 Análisis estadístico

Para la comparación de la producción de ácido indol-3-acético (AIA) entre las cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF), se realizó una ANOVA (5% de significancia) y una prueba de rangos múltiples LSD de Fisher (95% de confianza), con ayuda del software estadístico Statgraphics™ Centurion.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Caracterización macroscópica y bioquímica del cepario de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF)

La caracterización macroscópica en un medio de cultivo nutritivo únicamente describe las características fenotípicas de las colonias bacterianas en crecimiento. No distingue características metabólicas (Shah *et al.*, 2020).

En el presente trabajo, la caracterización macroscópica colonial de las cuatro cepas de BSF y la cepa *E. coli* ATCC 25922, se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito por Shah *et al.* (2020). Los resultados se exhiben en la Tabla 20 (Shah *et al.*, 2020).

Las colonias bacterianas de las cepas 1 y 3 se observaron de tamaño pequeño, forma redonda, superficie suave y elevada, color blanquecino opaco, así como de consistencia viscosa (Figura 15A).

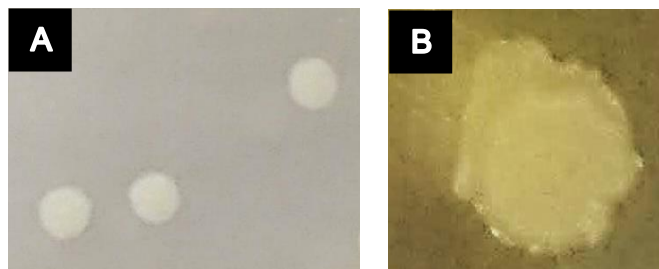
Las colonias de la cepa 2, de igual manera se observaron de tamaño pequeño, forma redonda, superficie suave y elevada, color blanquecino opaco; no obstante, la consistencia se percibió seca (Figura 15A).

Las colonias de la cepa 4 se observaron de tamaño mediano, forma irregular, superficie áspera y plana, color beige opaco, y de consistencia butirosa (Figura 15B).

Por su parte, las colonias de la cepa *E. coli* ATCC 25922, que se utilizó como control positivo, se observaron de tamaño pequeño, forma redonda, superficie suave y elevada, color blanquecino opaco, así como de consistencia cremosa (Figura 15A).

**Tabla 20.** Caracterización macroscópica de las cuatro cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) y la cepa *E. coli* ATCC 25922.

Característica	Cepa				
	1	2	3	4	<i>E. coli</i>
<b>Tamaño</b>	Pequeño	Pequeño	Pequeño	Mediano	Pequeño
<b>Forma</b>	Redonda	Redonda	Redonda	Irregular	Redonda
<b>Superficie</b>	Suave	Suave	Suave	Áspera	Suave
<b>Elevación</b>	Elevada	Elevada	Elevada	Plana	Elevada
<b>Coloración</b>	Blanquecina	Blanquecina	Blanquecina	Beige	Blanquecina
<b>Opacidad</b>	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca
<b>Consistencia</b>	Viscosa	Seca	Viscosa	Butirosa	Cremosa



**Figura 15.** Caracterización macroscópica de las cuatro cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) y la cepa *E. coli* ATCC 25922, en agar nutritivo, 24 h después de la incubación. **A:** fotografía de las colonias bacterianas de la cepa *E. coli* ATCC 25922, que ejemplifican el tamaño pequeño, forma redonda, coloración blanquecina y opaca; **B:** fotografía de una colonia de la cepa 4, que ejemplifica el tamaño mediano, forma irregular, coloración beige y opaca.

Los resultados de la caracterización bioquímica de las cuatro cepas de BSF y la cepa *E. coli* ATCC 25922, utilizada como control positivo, se resumen en la Tabla 21.

La prueba agar hierro triple azúcar (TSI), comprobó que las cuatro cepas de BSF y la cepa *E. coli* ATCC 25922, fueron positivas a la fermentación de glucosa, lactosa y sacarosa.

Durante la fermentación de estos azúcares, únicamente la cepa *E. coli* ATCC 25922 fue positiva a la producción de gas. Asimismo, tanto las cuatro cepas de BSF, como la cepa *E. coli* ATCC 25922, resultaron negativas a la producción de ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ), lo que significa que no presentan enzimas como la cisteína desulfhidrasa y tiosulfato reductasa, las cuales liberan el azufre de los aminoácidos azufrados (metionina y cisteína), produciendo  $H_2S$ . De acuerdo con MacFaddin (2003), estos resultados demuestran que las BSF llevan a cabo un metabolismo heterótrofo fermentativo con producción de ácidos orgánicos de manera aeróbica (MacFaddin, 2003).

Con la prueba hidrólisis de almidón (HA) se comprobó que las cuatro cepas de BSF y la cepa *E. coli* ATCC 25922 hidrolizan al almidón mediante un sistema enzimático que degrada polisacáridos hasta la obtención de azúcares y, a su vez, degrada los azúcares para la obtención de energía, con la consecuente producción de ácidos orgánicos (Panichikkal y Edayileveetil-Krishnankutty, 2020).

De esta manera, en las pruebas TSI y HA se destaca la actividad enzimática de las cuatro cepas de BSF para degradar exudados de las raíces de las plantas, como azúcares y polímeros orgánicos, los cuales son utilizados por algunas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*) como sustrato para el metabolismo de ácidos orgánicos. Estos ácidos orgánicos causan una disminución localizada en el pH del suelo, favoreciendo así la solubilización del fósforo inorgánico (Pi) (Wu *et al.*, 2017).

Asimismo, de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo y un estudio realizado por Panichikkal y Edayileveetil-Krishnankutty (2020), las BSF pueden utilizar diversas azúcares como fuentes de carbono y energía, lo que podría contribuir a la eficiencia general de la biosíntesis del ácido indol-3-acético (AIA). Por esta razón, la producción de AIA por BSF está influenciada por la disponibilidad de fuentes de carbono (Vyas y Gulati, 2009; Wu *et al.*, 2017; Panichikkal y Edayileveetil-Krishnankutty, 2020).

La prueba citrato de Simmons (CS), fue positiva en las cuatro cepas de BSF, lo que significa que son capaces de utilizar al citrato como única fuente de carbono. MacFaddin (2003), así como Vyas y Gulati (2009) sugieren que *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. son géneros bacterianos con una amplia capacidad metabólica, lo que explica que las BSF estudiadas puedan utilizar tanto fuentes de carbono orgánico, como inorgánico. Esta estrategia permite transformar fuentes de carbono complejas en productos fácilmente utilizables por otros microorganismos del suelo (MacFaddin, 2003; Vyas y Gulati, 2009).

**Tabla 21.** Caracterización bioquímica de las cuatro cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) y la cepa *E. coli* ATCC 25922.

Cepa	Prueba bioquímica															
	TSI			HA	CS	AIA	SIM			MIO		RN	C	Ox	TG	
	F	G	H <sub>2</sub> S				H <sub>2</sub> S	AIA	M	M	AIA					O
1	A/A	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	G-
2	A/A	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	G+
3	A/A	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	G-
4	A/A	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	G+
<i>E. coli</i>	A/A	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	G-

**NOTA:** (TSI) prueba agar hierro triple azúcar; (HA) prueba hidrólisis de almidón; (CS) prueba citrato de Simmons; (SIM) prueba sulfuro indol movilidad; (MIO) prueba motilidad indol ornitina; (RN) prueba reducción de nitratos; (C) prueba catalasa; (Ox) prueba oxidasa; (TG) tinción de Gram; (H<sub>2</sub>S) producción de ácido sulfhídrico; (F) fermentación de azúcares; (G) producción de gas en el proceso de fermentación de azúcares; (AIA) producción de ácido indol-3-acético; (M) movilidad bacteriana; (O) enzima ornitina descarboxilasa; (+) positiva; (-) negativa; (A/A) reacción ácida - ácida provocada por la fermentación de glucosa, lactosa y/o sacarosa; (G+) Gram positiva; (G-) Gram negativa.

Para confirmar la producción de AIA, se llevaron a cabo tres pruebas bioquímicas cualitativas: 1) prueba de AIA, 2) sulfuro indol movilidad (SIM) y 3) motilidad indol ornitina (MIO). La respuesta a la producción de AIA resultó positiva en las tres pruebas bioquímicas mencionadas, para las cuatro cepas de BSF y la cepa *E. coli* ATCC 25922.

Las bacterias del suelo son capaces de sintetizar AIA por al menos tres rutas metabólicas diferentes, dependientes del aminoácido L-triptófano (Trp). Las diversas enzimas involucradas en la biosíntesis del AIA se denominan triptofanasas (MacFaddin, 2003; Liu *et al.*, 2013).

El AIA bacteriano se ha estudiado ampliamente para su aplicación biotecnológica en la agricultura moderna, ya que desempeña un papel importante en la gametogénesis, embriogénesis, formación vascular y el desarrollo de flores (Bhattacharyya y Jha, 2012).

Además, promueve la formación de pelos radiculares y aumenta el número y longitud tanto de las raíces primarias como de las raíces laterales, lo que permite una mejor absorción de agua y nutrientes por parte de las plantas (Duca *et al.*, 2014).

De acuerdo con Bhattacharyya y Jha (2012), se han obtenido buenos resultados al aplicar RPCV, pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp., en cultivos comerciales de almendra, manzana, cereza, champiñón, durazno, pera, papa, fresa, tomate, cebada, frijol, algodón, cacahuete, arroz y soya. Por esta razón, es importante explotar la capacidad productora de AIA de las cuatro cepas de BSF, mediante cinéticas en medio líquido, para su futura aplicación en la biotecnología agrícola como biofertilizantes (Bhattacharyya y Jha, 2012; Wu *et al.*, 2021).

Con la prueba bioquímica SIM también se evaluó la producción de H<sub>2</sub>S y la movilidad bacteriana. Las cuatro cepas de BSF y la cepa *E. coli* ATCC 25922 fueron negativas a la producción de H<sub>2</sub>S, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en la prueba TSI. En cuanto a la movilidad, las cuatro cepas de BSF y la cepa *E. coli* ATCC 25922 son negativas a la movilidad, lo que sugiere que las cepas no cuentan con flagelos que les permitan desplazarse.

Adicionalmente, la prueba MIO confirmó la producción de AIA por parte de las cuatro cepas de BSF y el control positivo *E. coli* ATCC 25922. Al mismo tiempo se evaluó la movilidad bacteriana y la actividad enzimática ornitina descarboxilasa.

La movilidad bacteriana, al igual que en la prueba SIM, fue negativa para las cuatro cepas de BSF y la cepa *E. coli* ATCC 25922. En cuanto a la actividad de la enzima ornitina descarboxilasa, esta fue positiva tanto para las cuatro cepas de BSF, como para la cepa *E. coli* ATCC 25922.

La ornitina descarboxilasa es una enzima del grupo de las proteasas, que cataliza la hidrólisis total de proteínas en péptidos y aminoácidos. Estas enzimas se encuentran entre los tres principales grupos de enzimas industriales, que representan alrededor del 65% del comercio bruto de enzimas a nivel mundial, y se contemplan en el desarrollo de varias tecnologías de biorremediación. *Bacillus* sp. es indispensable para la producción de proteasas a nivel industrial debido a su rápido crecimiento, gran diversidad, facilidad de cultivo y manipulaciones genéticas (Mushtaq *et al.*, 2021).

En el suelo, las bacterias con actividad enzimática ornitina descarboxilasa son capaces de sintetizar, a partir de la descarboxilación de aminoácidos como la L-ornitina (Orn), poliaminas como la putrescina. Las poliaminas son pequeñas moléculas policatiónicas que portan grupos amino (Mushtaq *et al.*, 2021).

La putrescina, triamina espermidina y tetraamina espermina son las poliaminas más comunes. De acuerdo con Hebat-Allah *et al.* (2019), las poliaminas también promueven el crecimiento y desarrollo de los cultivos, actúan en la biosíntesis del ADN, ARN y proteínas, retrasan el envejecimiento de las plantas y mejoran la resistencia a las enfermedades. Además, se ha descrito la aparición de diafonía entre las poliaminas y fitohormonas como las giberelinas, auxinas y el etileno, pero los mecanismos intrínsecos que subyacen a tales interacciones todavía no están completamente establecidos (Tiburcio *et al.*, 2014; Alcázar y Tiburcio, 2018; Hebat-Allah *et al.*, 2019).

En cuanto a la prueba bioquímica reducción de nitratos (RN), únicamente la cepa 4 fue positiva. No obstante, esto no quiere decir que las cepas 1, 2 y 3 no sean fijadoras de nitrógeno, ya que esta prueba únicamente permitió determinar si las bacterias son capaces de actuar en alguna de las etapas del ciclo del nitrógeno (Stein y Klotz, 2016).

El ciclo del nitrógeno se divide en tres procesos: 1) fijación de nitrógeno molecular ( $N_2$ ), 2) nitrificación y 3) desnitrificación. Es en esta última etapa en donde algunas bacterias reducen el nitrato ( $NO_3^-$ ) a nitrito ( $NO_2^-$ ) y después realizan la desnitrificación del  $NO_2^-$  a  $N_2$  (Stein y Klotz, 2016).

Por esta razón, de acuerdo con los resultados obtenidos en la prueba RN, la cepa 4 forma parte del grupo de bacterias denominadas desnitrificantes, las cuales son indispensables en el proceso de desnitrificación del ciclo del nitrógeno (Stein y Klotz, 2016).

La disponibilidad del  $N_2$  es uno de los principales factores que limitan la productividad de los sistemas agrícolas de todo el mundo. Aunque el 78% de la atmósfera terrestre está compuesta por  $N_2$ , las plantas solo pueden utilizar al nitrógeno (N) en forma de nitratos ( $NO_3^-$  y  $NO_2^-$ ), amonio ( $NH_4^+$ ) y urea ( $CH_4N_2O$ ). Hoy en día, para satisfacer la demanda de N en los cultivos, se ha estudiado el uso potencial de RPCV, fijadoras de nitrógeno, como biofertilizantes, las cuales han demostrado su capacidad fijadora en cultivos como el arroz, maíz, trigo, soya y caña de azúcar (Masson-Boivin y Sachs, 2018; Nag *et al.*, 2019; Reis *et al.*, 2020).

La prueba catalasa (C) fue positiva para las cepas 1, 2, 3 y *E. coli* ATCC 25922, lo que sugiere que tienen un sistema enzimático capaz de degradar compuestos tóxicos derivados del estrés oxidativo (Israr *et al.*, 2016).

En las plantas, el estrés oxidativo promueve la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), como el superóxido ( $O_2^-$ ), ion peróxido ( $O_2^{2-}$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), los cuales pueden causar rupturas mutagénicas en las cadenas de ADN, oxidaciones en proteínas, así como la interrupción de rutas metabólicas (Israr *et al.*, 2016).

Dado a la interacción beneficiosa que existe entre las plantas y los microorganismos del suelo, las RPCV son capaces de activar genes codificadores de enzimas como la catalasa, que permite la eliminación de las ERO a través de la descomposición del  $O_2^-$  en  $H_2O_2$  y, del  $H_2O_2$  en agua ( $H_2O$ ) y oxígeno molecular ( $O_2$ ) (Israr *et al.*, 2016; Berrios y Rentsch, 2022).

Otro factor involucrado en la formación de ERO en las plantas, según Israr *et al.* (2016), es la deficiencia de nutrientes minerales como el fósforo (P). Por esta razón, la inoculación de BSF en suelos agrícolas deficientes de P, no solo permite la asimilación del fósforo inorgánico (Pi), sino también, mejora la actividad enzimática antioxidante en los cultivos vegetales (Israr *et al.*, 2016; Berrios y Rentsch, 2022).

Por otro lado, la prueba bioquímica oxidasa (Ox) resultó positiva para las cuatro cepas de BSF. Esta prueba permitió determinar la actividad enzimática citocromo *c* oxidasa en el cepario de BSF. La citocromo *c* oxidasa es una enzima propia de microorganismos aerobios y anaerobios facultativos que obtienen energía a través de la cadena respiratoria. Cataliza la reducción del O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O y energía aprovechable. De acuerdo con Iwata (1998), aquellas bacterias del suelo que participan en la etapa de desnitrificación en el ciclo del nitrógeno también son citocromo *c* oxidasa positivas. Sin embargo, para confirmar esto son necesarias más investigaciones al respecto (Iwata, 1998; von Wachenfeldt *et al.*, 2021).

La tinción de Gram (TG) se realizó para diferenciar a las cuatro cepas de BSF y la cepa *E. coli* ATCC 25922 de acuerdo con la composición bioquímica de su pared celular. Las cepas 1 y 3 resultaron bacilos cortos Gram negativos, con forma de bastón. Las cepas 2 y 4 correspondieron a bacilos largos Gram positivos, con forma de bastón. Por su parte, la cepa *E. coli* ATCC 25922 resultó un bacilo corto Gram negativo, con forma de bastón (Beveridge, 2001).

Adicionalmente, el cepario de BSF fue identificado previamente por Sánchez-González *et al.* (2023) mediante el análisis molecular basado en el gen 16S rRNA. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 22. Las cepas 1 y 3 mostraron similitudes con especies del género *Pseudomonas* sp., mientras que las cepas bacterianas 2 y 4 mostraron relación con el género *Bacillus* sp. De esta manera, los resultados de la caracterización bioquímica y macroscópica del cepario de BSF coinciden con lo reportado para los géneros *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. (Sánchez-González *et al.*, 2023).

**Tabla 22.** Cepario de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) identificadas a través del análisis del gen 16S rRNA (Sánchez-González *et al.*, 2023).

Cepa	Posible género	Cepas relacionadas	Query cover (%)	Identidad (%)
1	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas libanensis</i>	100	98.58
2	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus pumilus</i>	98	96.03
3	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas libanensis</i>	99	98.48
4	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus siamensis</i>	100	99.07

## 8.2 Comparación de la producción de ácido indol-3-acético (AIA) entre las cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF)

La comparación de la producción de ácido indol-3-acético (AIA) por el cepario de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) y la cepa *E. coli* ATCC 25922, empleada como control positivo, se llevó a cabo en el medio de cultivo comercial caldo triptófano Condalab® (Tabla 16), con la finalidad de seleccionar a la cepa que produjera mayor AIA.

En la Figura 16 se muestra que las cuatro cepas de BSF y la cepa *E. coli* ATCC 25922 produjeron AIA. La máxima producción de AIA fue dada por la cepa *E. coli* ATCC 25922, con 6.1 µg/mL de AIA, a las 72 h de incubación. Del cepario de BSF, las cepas 2 y 4, pertenecientes al género *Bacillus* sp., identificadas previamente por Sánchez-González *et al.* (2023), produjeron 4.5 y 3.7 µg/mL de AIA, respectivamente, a las 72 h de incubación. *Bacillus* sp. es una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal (RPCV) que estimula el crecimiento de las plantas a través de la solubilización de fósforo, así como de la producción de sideróforos y fitohormonas (Pindi *et al.*, 2014; Duca *et al.*, 2018; Daraz *et al.*, 2021).

De acuerdo con Idris *et al.* (2004), el AIA producido por *B. amyloliquefaciens*, promueve el crecimiento en coleótilos de *Zea mays* (maíz). Asimismo, Swain *et al.* (2007) reportaron un efecto positivo en el crecimiento de tubérculos comestibles de *Dioscorea rotundata* L. (ñame blanco) después de cultivarlos con la cepa productora de AIA, *B. subtilis* (Idris *et al.*, 2004; Swain *et al.*, 2007).

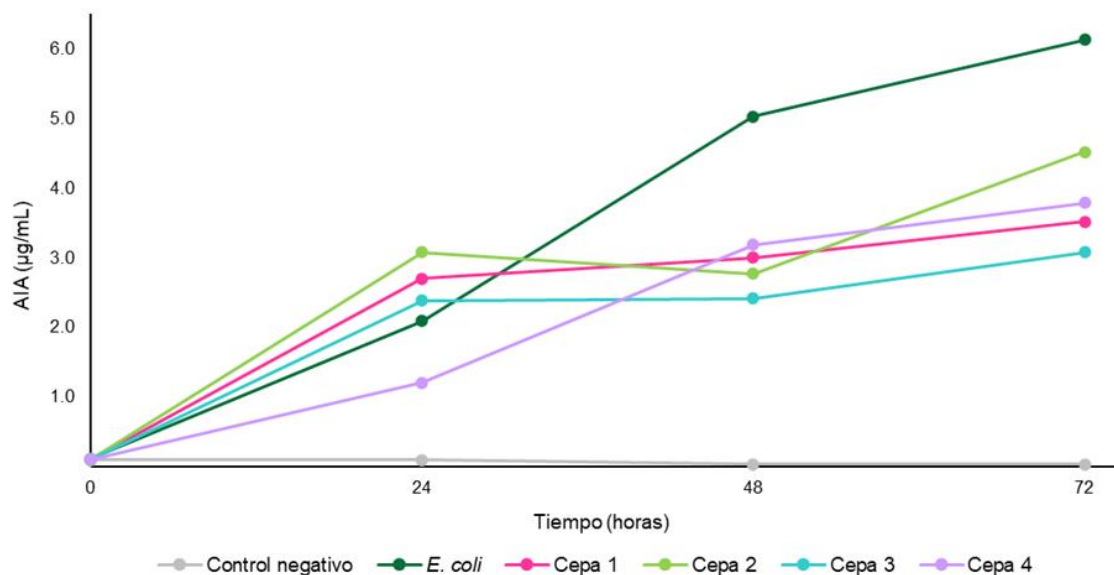
Por su parte, las cepas 1 y 3, pertenecientes al género *Pseudomonas* sp., mostraron una menor producción de AIA en comparación con las cepas 2 y 4. La cepa 1 produjo 3.5 µg/mL de AIA, mientras que la cepa 3 produjo 3.0 µg/mL de AIA, a las 72 h de incubación.

Se ha demostrado que las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* sp. protegen y mejoran el crecimiento de cultivos de importancia económica al incrementar la longitud de las raíces y el tallo de las plantas (Kalimuthu *et al.*, 2019).

En un estudio reportado por Kalimuthu *et al.* (2019), la inoculación de semillas de *Brassica napus* (canola) con la cepa *P. putida* GR12-2, productora de AIA, resultó en un aumento de 2 - 3 veces en la longitud de las raíces de las plántulas. Por su parte, Haas y Défago (2005) reportaron que varios aislamientos de *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* y *P. aureofaciens*, además de producir AIA, también producen sideróforos y enzimas contra el daño oxidativo, como la catalasa (Haas y Défago, 2005; Mishra *et al.*, 2009; Goswami *et al.*, 2013; Kalimuthu *et al.*, 2019).

Se estima que el 80% de las RPCV son capaces de producir AIA. De estas, las pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. predominan en la rizosfera. Diversas investigaciones sugieren que el AIA, producido tanto por *Bacillus* sp., como por *Pseudomonas* sp., promueve la germinación de semillas, participa en la diferenciación del tejido vascular y es responsable del gravitropismo de las raíces (Pindi *et al.*, 2014; Giassi *et al.*, 2016).

Además, estimula la formación de pelos radicales y aumenta el número y la longitud de las raíces laterales, en especial, de las raíces primarias. Por esta razón, en la agricultura moderna se han inoculado RPCV, productoras de AIA, en cultivos de sorgo, maíz, arroz, caña de azúcar, cebada y manzana, con la finalidad de estimular la germinación de semillas, acelerar el crecimiento de las plantas y aumentar la biomasa de las raíces (Pindi *et al.*, 2014; Giassi *et al.*, 2016).



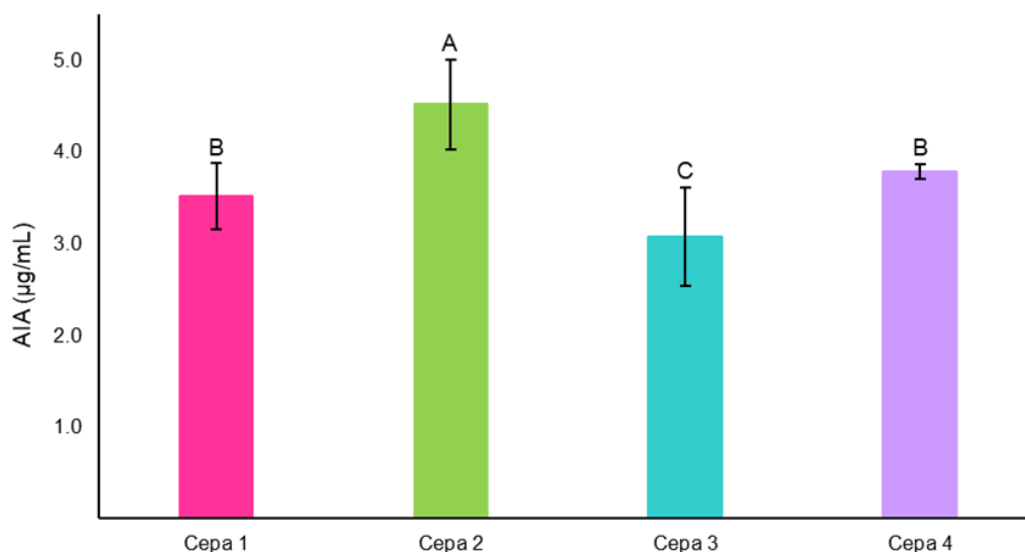
**Figura 16.** Producción de ácido indol-3-acético (AIA) por las cuatro cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) y el control positivo *E. coli* ATCC 25922, en caldo triptófano marca Condalab®.

### 8.2.1 Selección de la cepa bacteriana solubilizadora de fosfato (BSF) con mayor producción de ácido indol-3-acético (AIA)

Para seleccionar a la bacteria solubilizadora de fosfato (BFS) con mayor producción de ácido indol-3-acético (AIA), se realizó una prueba de rangos múltiples LSD de Fisher (95% de confianza). El resultado del análisis estadístico, que se observa en la Figura 17, arrojó que existen diferencias estadísticamente significativas entre la cepa 2 y el resto de las cepas de BFS. Por esta razón, se seleccionó a la cepa 2, identificada por Sánchez-González *et al.* (2023) como *Bacillus* sp., para continuar con los ensayos en las cinéticas de producción de AIA.

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) pertenecientes al género *Bacillus* sp., son ampliamente utilizadas en la agricultura como biofertilizantes debido a que son capaces de formar endosporas resistentes al calor y la desecación, lo que facilita su supervivencia durante largos períodos de tiempo (Idris *et al.*, 2007).

Además, la producción de fitohormonas (auxinas y giberelinas) y sideróforos, solubilización de fosfato y fijación de nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>), así como, la producción de antibióticos y enzimas líticas que actúan como control biológico de patógenos, permiten un mejor rendimiento de los cultivos, lo que las hace el género bacteriano más eficiente en comparación con el resto de las RPCV. De acuerdo con un estudio realizado por Chakraborty *et al.* (2006), la aplicación de *B. megaterium* en plantas de *Camellia sinensis* (planta del té), impulsó significativamente el crecimiento de estas en comparación con las plantas que no habían sido inoculadas con dicha bacteria (Chakraborty *et al.*, 2006; Idris *et al.*, 2007; Shao *et al.*, 2014; Chagas-Junior *et al.*, 2015; Bhargavi-Rayavarapu y Padmavathi, 2016).



**Figura 17.** Análisis estadístico de la producción de ácido indol-3-acético (AIA) por las cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) a las 72 h de incubación, en caldo triptófano marca Condalab®.

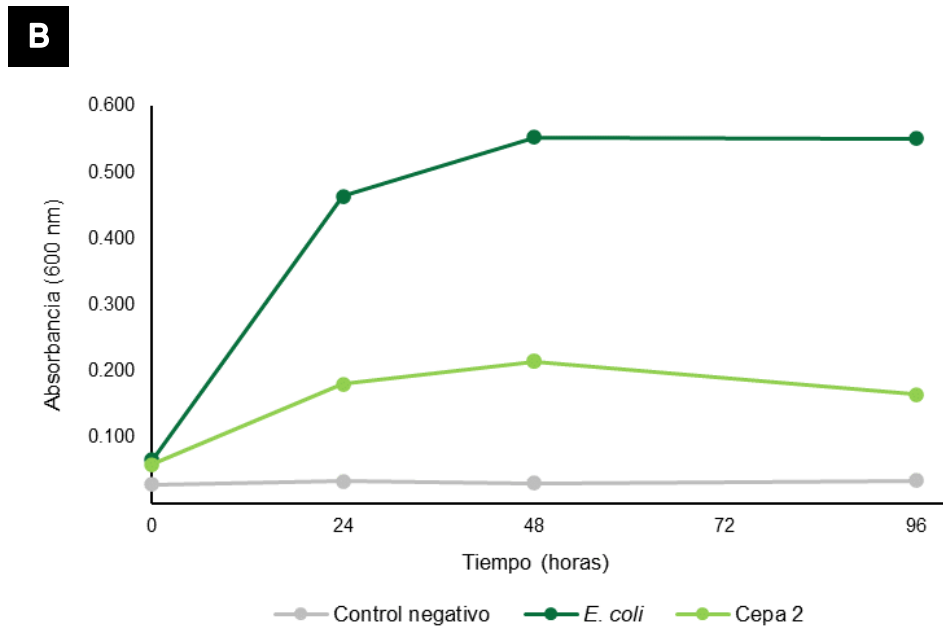
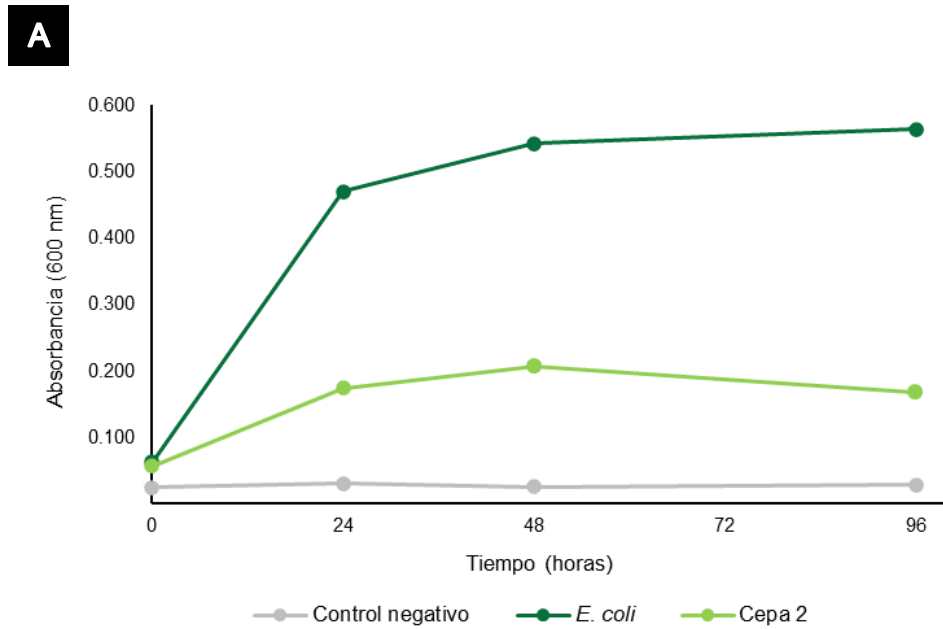
### 8.3 Cinéticas de producción de ácido indol-3-acético (AIA)

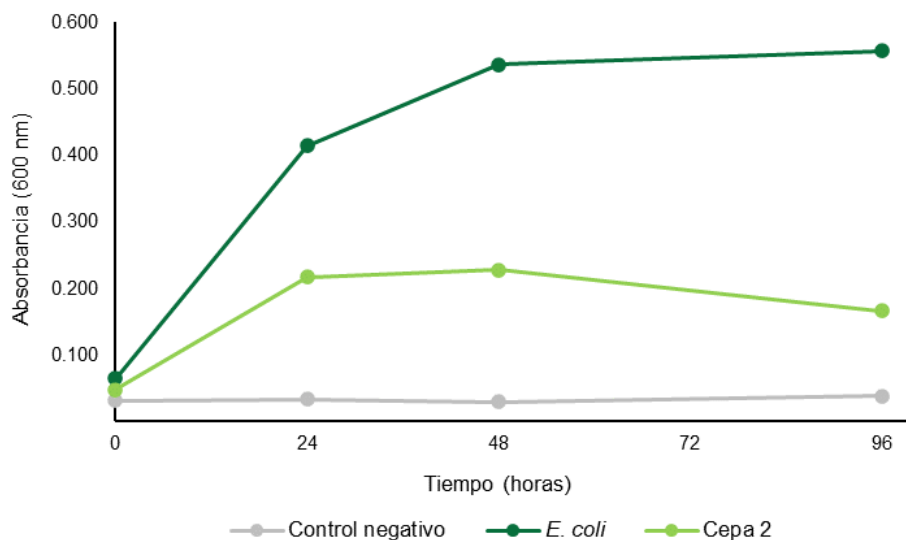
#### 8.3.1 Cuantificación del crecimiento bacteriano

El crecimiento bacteriano, medido por absorbancia a 600 nm, fue claramente mayor en la cepa *E. coli* ATCC 25922, con respecto a la cepa 2. Asimismo, dicho crecimiento bacteriano, para ambas cepas, fue similar en los tres tratamientos en el medio de cultivo caldo PY (ver composición en Tabla 18) adicionado con 500, 1000 y 1500 µg/mL de L-triptófano (Trp) (Figura 18).

En cada uno de los tratamientos, el crecimiento exponencial se llevó a cabo de las 0 h a las 24 h de incubación, tanto para la cepa *E. coli* ATCC 25922 como para la cepa 2 (Figura 18). La cepa *E. coli* ATCC 25922, utilizada como control positivo, inició la fase estacionaria a partir de las 48 h de incubación en los tres tratamientos (Figura 18).

Por su parte, para la cepa 2, en los tratamientos con 500 y 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Trp, la fase de muerte celular inició a las 48 h de incubación (Figura 18A y B); mientras que, en el tratamiento con 1500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Trp, la fase estacionaria fue de las 24 h a las 48 h de incubación, seguida de la fase de muerte, que comenzó a partir de las 48 h de incubación (Figura 18C).



**C**

**Figura 18.** Cuantificación del crecimiento bacteriano por densidad óptica (DO) en el medio de cultivo caldo PY adicionado con tres concentraciones de L-triptófano (Trp), para la cepa 2 y el control positivo *E. coli* ATCC 25922. **A:** con 500 µg/mL de Trp; **B:** con 1000 µg/mL de Trp; **C:** con 1500 µg/mL de Trp.

La producción de ácido indol-3-acético (AIA) bacteriano está asociada directamente con el crecimiento celular. De acuerdo con un estudio realizado por Bagheri *et al.* (2022), la cepa *Bacillus velezensis* aumentó significativamente el crecimiento celular durante las primeras 24 h de incubación, y luego, disminuyó constantemente, al igual que la producción de AIA (Bagheri *et al.* 2022).

De la misma manera, Sarmiento-López *et al.* (2022) reportaron que la producción de AIA en el medio de cultivo PYM disminuyó después de que la cepa *Bacillus circulans* E9 entrara en fase de muerte (Sarmiento-López *et al.*, 2022).

Durante el crecimiento exponencial bacteriano se activan las rutas biosintéticas del AIA por la desaminación del aminoácido Trp. No obstante, muchas veces, cuando el crecimiento celular empieza a llegar a la fase estacionaria, algunas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) activan un grupo de genes denominados *iac/iaa*, los cuales induce al catabolismo del AIA para obtener energía, lo que les permite seguir aumentando la biomasa microbiana y asegurar su supervivencia (Duca y Glick, 2020; Sarmiento-López *et al.*, 2022).

En el suelo, las bacterias que cuentan con dichos genes son capaces de utilizar como fuente de carbono al AIA que las plantas exudan de las raíces. De esta manera, las RPCV utilizan dicha fuente de carbono para sintetizar su propio AIA, y así, promover el crecimiento del sistema radicular de la planta huésped (Duca y Glick, 2020; Laird *et al.*, 2020; Sarmiento-López *et al.*, 2022).

### 8.3.2 Cuantificación de ácido indol-3-acético (AIA) bacteriano producido

La producción de ácido indol-3-acético (AIA) bacteriano se llevó a cabo en el medio de cultivo caldo PY (ver composición en Tabla 18) adicionado con L-triptófano (Trp) comercial marca DIBICO®. El AIA producido en los tratamientos con 500, 1000 y 1500 µg/mL de Trp se cuantificó mediante el método espectrofotométrico del reactivo de Salkowski (Glickmann y Dessaux, 1995; Goswami *et al.*, 2014).

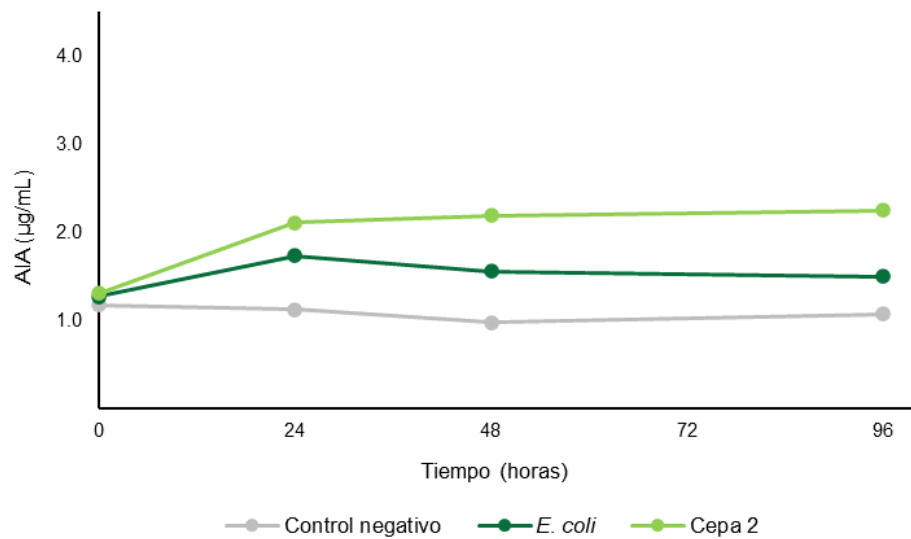
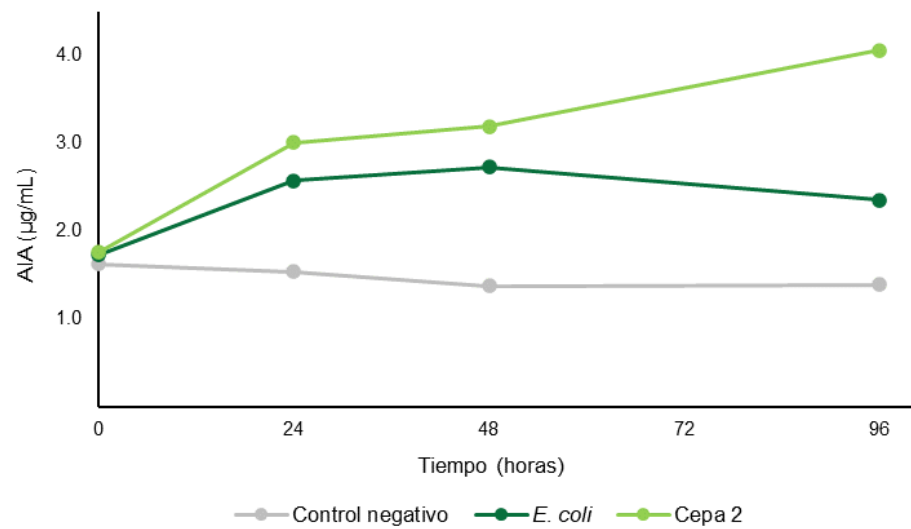
Los resultados de la cuantificación de la producción de AIA por la cepa 2 y la cepa *E. coli* ATCC 25922, empleada como control positivo, se muestran en la Figura 19. En comparación con la cepa *E. coli* ATCC 25922, la cepa 2 obtuvo una mayor producción de AIA en los tres tratamientos con diferentes concentraciones de Trp (Figura 19).

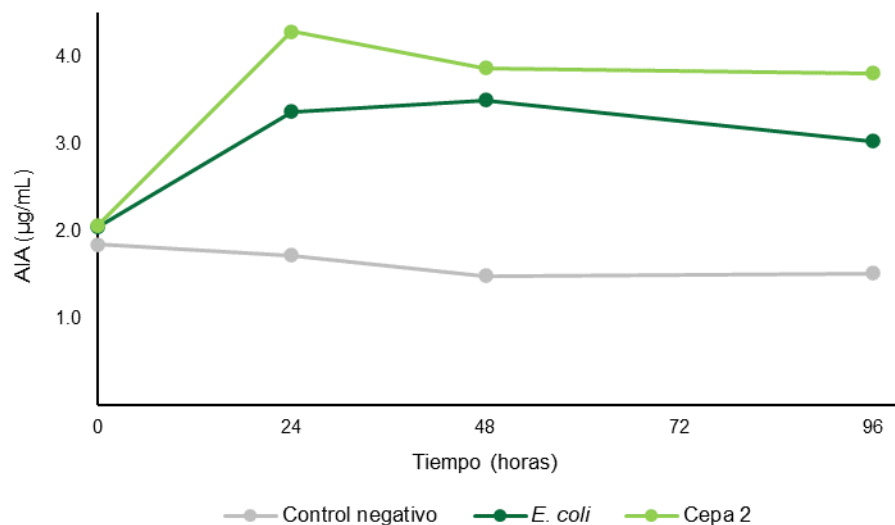
Para el tratamiento con 500 µg/mL de Trp, la cepa *E. coli* ATCC 25922 obtuvo una producción de AIA de 1.7 µg/mL, a las 24 h de incubación. Posteriormente, el AIA en el medio de cultivo caldo PY disminuyó a una concentración de 1.5 µg/mL, a las 96 h de incubación (Figura 19A).

En cuanto a los tratamientos con 1000 y 1500 µg/mL de Trp, el AIA producido fue de 2.7 y 3.4 µg/mL, respectivamente, a las 48 h de incubación (Figura 19B y C). Después de las 48 h de incubación, el AIA en el medio de cultivo caldo PY disminuyó a 2.3 y 3.0 µg/mL, respectivamente (Figura 19B y C). De acuerdo con Laird *et al.* (2020), la disminución de AIA en el medio de cultivo puede deberse a la capacidad de *E. coli* para aprovechar esta fitohormona como fuente de carbono y energía (Laird *et al.*, 2020; Lebrazi *et al.*, 2020).

En los tratamientos con 500 y 1000 µg/mL de Trp, la cepa 2 produjo 2.2 y 4.0 µg/mL de AIA, respectivamente, a las 96 h de incubación (Figura 19A y B). Para el tratamiento con 1500 µg/mL de Trp, la producción de AIA fue de 4.2 µg/mL, a las 24 h de incubación; no obstante, a partir de esta hora el AIA producido disminuyó hasta alcanzar una concentración de 3.8 µg/mL (Figura 19C).

Los resultados obtenidos de la cuantificación de AIA bacteriano confirmaron que la cantidad de AIA producida es directamente proporcional a la concentración de Trp en el medio de cultivo.

**A****B**

**C**

**Figura 19.** Concentración de ácido indol-3-acético (AIA) bacteriano en el medio de cultivo caldo PY, adicionado con tres concentraciones de L-triptófano (Trp), para la cepa 2 y el control positivo *E. coli* ATCC 25922. **A:** con 500 µg/mL de Trp; **B:** con 1000 µg/mL de Trp; **C:** con 1500 µg/mL de Trp.

El AIA actúa como regulador de muchos procesos biológicos involucrados en el desarrollo de las plantas. Generalmente, es sintetizado por bacterias rizosféricas, a partir de tres vías dependientes del aminoácido Trp: 1) vía del ácido indol-3-pirúvico (AIP), 2) vía del indol-3-acetamida (IAM) y 3) vía del indol-acetaldoxima (IAOx) / indol-3-acetonitrilo (IAN) (Lebrazi *et al.*, 2020).

Hoy en día, se ha informado que la cantidad de Trp, exudado por las raíces de las plantas, influye en los niveles de AIA producidos por las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV). No obstante, la concentración de Trp necesaria para la producción de AIA varía para cada cepa bacteriana (Lebrazi *et al.*, 2020; Durante-Batista *et al.*, 2021).

Durante-Batista *et al.* (2021) demostraron que la producción de AIA, por la cepa *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9, aumentó cuando la concentración de Trp en el medio de cultivo LB aumentó de 100 a 1000 µg/mL, correspondiendo a esta última concentración la máxima cantidad de AIA producida (0.2 µg/mL) (Durante-Batista *et al.*, 2021).

De la misma manera, Cuong y Phuong-Hoa (2021) observaron que la cantidad de AIA producida por *Bacillus* sp. aumentó al aumentar la concentración de Trp en el medio de cultivo, de 50 a 200 µg/mL (Cuong y Phuong-Hoa, 2021).

De acuerdo con Lebrazi *et al.* (2020), la producción de AIA por las RPCV puede diferir considerablemente entre géneros bacterianos, especies bacterianas o cepas de la misma especie (Lebrazi *et al.*, 2020).

Ghosh y Basu (2002) demostraron que *Rhizobium* sp., aislada de los nódulos de la raíz de *Dalbergia lanceolaria* (Takoli), produjo 45.0 µg/mL de AIA con una concentración de 2500 µg/mL de Trp. Por su parte, Shoukry *et al.* (2018) informaron que una cepa de *Rhizobium leguminosarum*, aislada de las raíces de *Acacia cyanophylla* (acacia azul), produjo 135.0 µg/mL de AIA con 2000 µg/mL de Trp (Ghosh y Basu, 2002; Shoukry *et al.*, 2018).

La capacidad de las RPCV para producir altas tasas de AIA no es un requisito para promover el crecimiento de las plantas. Diversos autores sugieren que el efecto beneficioso del AIA depende de la concentración empleada (Giassi *et al.*, 2016).

En bajas concentraciones, esta fitohormona puede estimular el crecimiento de las raíces, prevenir la abscisión de hojas y caída de frutos, así como promover la floración y fructificación (Duca *et al.*, 2018).

Sin embargo, en concentraciones más altas, puede tener un efecto inhibitorio sobre el crecimiento general de las plantas. Investigaciones recientes se han enfocado en esclarecer el umbral estimulador e inhibitorio del AIA (Bhutani *et al.*, 2018; Utami *et al.*, 2018).

No obstante, los resultados siguen siendo muy variables, ya que algunas plantas son más sensibles que otras al AIA. Yang *et al.* (1993) establecieron que una concentración de AIA de 8.7 a 175.0 µg/mL es adecuada para promover el desarrollo vegetal en semillas de *Glycine max* (soya). Por su parte, Inada y Shimmen (2000) informaron que concentraciones por encima de 0.1 µg/mL de AIA inhibían el desarrollo de las raíces en plántulas de *Lemna minor* (lenteja de agua) (Yang *et al.*, 1993; Inada y Shimmen, 2000).

En la actualidad, existen múltiples informes de bacterias rizosféricas (*Enterobacter*, *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*), ampliamente utilizadas en la agricultura, que secretan AIA a bajas concentraciones y, como consecuencia, benefician a la planta al estimular su crecimiento (Bharucha *et al.*, 2013).

No obstante, para el desarrollo de biofertilizantes a base de RPCV, productoras de AIA, es necesario que se lleven a cabo más investigaciones tanto *in vitro* como *in vivo* (Bharucha *et al.*, 2013; Utami *et al.*, 2018).

Con los datos obtenidos en las cinéticas de producción de AIA se calcularon las respectivas velocidades de producción de AIA para ambas cepas bacterianas (cepa 2 y cepa *E. coli* ATCC 25922).

Los resultados se muestran en la Tabla 23. Es notable la tendencia de que a mayor concentración de Trp, hay un incremento en la velocidad de producción de AIA, siendo la cepa 2 la que produce AIA a una mayor velocidad. Esto permitió confirmar que la velocidad de producción de AIA está en función de la concentración de Trp en el medio de cultivo.

**Tabla 23.** Velocidad de producción de ácido indol-3-acético (AIA), a las 24 h de incubación, para la cepa 2 y el control positivo *E. coli* ATCC 25922.

Cepa	Tratamiento		
	500 µg/mL	1000 µg/mL	1500 µg/mL
<b>Cepa 2</b>	0.088 µg/mL·h	0.125 µg/ mL·h	0.179 µg/mL·h
<i>E. coli</i>	0.073 µg/mL·h	0.107 µg/mL·h	0.140 µg/mL·h

### 8.3.3 Determinación del pH en el medio de cultivo

Los resultados de la cuantificación del pH en el medio de cultivo se resumen en la Tabla 24. Para la cepa 2, el pH inicial del medio de cultivo caldo PY, adicionado con 500, 1000 y 1500 µg/mL de L-triptófano (Trp), a las 0 h de incubación, fue de 6.6.

No obstante, una vez que la bacteria comenzó a sintetizar ácido indol-3-acético (AIA), el pH del medio de cultivo caldo PY disminuyó progresivamente hasta llegar a 6.0, 5.9 y 6.0, respectivamente, a las 96 h de incubación.

Lo mismo ocurrió con la cepa *E. coli* ATCC 25922, empleada como control positivo, la cual, para cada uno de los tres tratamientos (500, 1000 y 1500 µg/mL de Trp), mostró un pH inicial de 6.4 en el medio de cultivo caldo PY, a las 0 h de incubación. Después de la producción del AIA, a las 96 h de incubación, el medio de cultivo caldo PY alcanzó un pH de 4.6 en cada tratamiento (500, 1000 y 1500 µg/mL de Trp).

**Tabla 24.** Cuantificación del pH en el medio de cultivo caldo PY adicionado con 500, 1000 y 1500 µg/mL de L-triptófano (Trp), para el control negativo, la cepa 2 y el control positivo *E. coli* ATCC 25922, a las 0 y 96 h de incubación.

Cepa	Tratamiento					
	500 µg/mL		1000 µg/mL		1500 µg/mL	
	0 h	96 h	0 h	96 h	0 h	96 h
Control negativo	6.7 ± 0.0	6.6 ± 0.0	6.7 ± 0.0	6.6 ± 0.0	6.7 ± 0.0	6.6 ± 0.0
<b>Cepa 2</b>	6.6 ± 0.0	6.0 ± 0.1	6.6 ± 0.0	5.9 ± 0.0	6.6 ± 0.0	6.0 ± 0.1
<i>E. coli</i>	6.4 ± 0.0	4.6 ± 0.0	6.4 ± 0.0	4.6 ± 0.0	6.4 ± 0.0	4.6 ± 0.0

Uno de los parámetros más importantes para el crecimiento de las bacterias productoras de AIA y su actividad metabólica, es el pH, ya que este puede influir en la actividad de las enzimas requeridas durante la biosíntesis (Mohite, 2013).

De acuerdo con una investigación realizada por Ona *et al.* (2003), la acidificación del pH del medio de cultivo coincide con el momento en el que inicia la producción de AIA. Además, sugieren que el pH del medio, después de la producción de AIA, influye en la cantidad total de AIA producida. Por su parte, Wandira *et al.* (2021) demuestran que un rango óptimo para la producción de AIA por el género *Bacillus* sp. va de 4.0 a 9.0, no obstante, el valor óptimo de pH es 6.0; dichos resultados coinciden con lo reportado por Mohite (2013) y Acuña *et al.* (2011) (Ona *et al.*, 2003; Acuña *et al.*, 2011; Mohite, 2013; Wandira *et al.*, 2021).

Por esta razón, las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV), productoras de AIA, pertenecientes al género *Bacillus* sp. (*B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. siamensis*), son ampliamente utilizadas en la agricultura como biofertilizantes debido a su capacidad para formar esporas y resistir condiciones de crecimiento desfavorables, o factores de estrés, como las variaciones en el pH del suelo (Ona *et al.*, 2003; Bharucha *et al.*, 2013; Suliasih y Widawati, 2020).

## 9. CONCLUSIONES

Las cuatro cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) evaluadas en el presente trabajo fueron capaces de sintetizar ácido indol-3-acético (AIA) a partir del precursor L-triptófano (Trp).

La cepa 2, identificada por Sánchez-González *et al.* (2023) como *Bacillus* sp., demostró una mayor producción de AIA en comparación con el resto de las cepas de BSF.

Al aumentar la concentración de Trp en el medio de cultivo a 500, 1000 y 1500 µg/mL, la cantidad de AIA producido también aumentó.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que la concentración de Trp óptima para la producción de AIA por la cepa 2 es de 1000 µg/mL.

La cepa 2 exhibió propiedades bioquímicas de interés biotecnológico como la síntesis de enzimas catalasa y oxidasa, descarboxilación del aminoácido L-ornitina (Orn) y utilización de fuentes de carbono tanto orgánicas (glucosa, lactosa, sacarosa y almidón) como inorgánicas (citrato de sodio).

El género *Bacillus* sp. es uno de los grupos de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) más grande y potencialmente prometedor para su aplicación en la agricultura sostenible como biofertilizantes. Sin embargo, para que la cepa 2 pueda emplearse como bioinoculante en suelos agrícolas, es necesario expandir esta investigación a condiciones de campo.

## 10. REFERENCIAS

- Acuña, J.J., Jorquera, M.A., Martínez, O.A., Menezes-Blackburn, D., Fernández, M.T., Marschner, P., Greiner, R., y Mora, M.L. (2011). Indole Acetic Acid and Phytase Activity Produced by Rhizosphere Bacilli as Affected by pH and Metals. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, vol. 11 (3), pp. 1-12.
- Aguilar-Rivera, K.A. (2020). *Aislamiento de Bacterias Solubilizadoras de Fosfato, del Suelo Cultivado con Papa (Solanum tuberosum L.)* [Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de México].
- Ahmad, F., Ahmad, I., y Khan, M.S. (2005). Indole Acetic Acid Production by the Indigenous Isolates of *Azotobacter* and Fluorescent *Pseudomonas* in the Presence and Absence of Tryptophan. *Turkish Journal of Biology*, vol. 29, pp. 29-34.
- Alcázar, R., y Tiburcio A.F. (2018). Molecules for Sensing Polyamines and Transducing Their Action in Plants. En *Polyamines: Methods and Protocols* (pp. 25-35). New York, NY: Humana Press.
- Ali, S., Charles, T.C., y Glick, B.R. (2017). Endophytic Phytohormones and Their Role in Plant Growth Promotion. *Functional Importance of the Plant Microbiome*, vol. 6, pp. 89-105.
- Anne-Cotton, T.E., Pétriacq, P., Cameron, D.D., Al Meselmani, M., Schwarzenbacher, R., Rolfe, A.S., y Ton, J. (2019). Metabolic Regulation of the Maize Rhizobiome by Benzoxazinoids. *The ISME Journal*, vol. 13, pp. 1647-1658.
- Arenas-Sosa, I., y López-Sánchez, J.S. (2004). *Espectrofotometría de Absorción*. Cuernavaca, Morelos, México: Ediciones Universidad Nacional Autónoma de México, IBT.
- Arora, M. (2013). Cell Culture Media: A Review. *Labome: The world of laboratory*, vol. 3, pp. 1-29.
- Bagheri, N., Ahmadzadeh, M., Mariotte, P., y Salehi-Jouzani, G. (2022). Behavior and Interactions of the Plant Growth-Promoting Bacteria *Azospirillum oryzae* NBT506 and *Bacillus velezensis* UTB96 in a Co-Culture System. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 38 (101), pp. 101-113.
- Bargaz, A., Elhaissof, W., Khourchi, S., Benmrid, B., Borden, K.A., y Rchiad, Z. (2021). Benefits of Phosphate Solubilizing Bacteria on Belowground Crop Performance for Improved Crop Acquisition of Phosphorus. *Microbiological Research*, vol. 252, pp. 1-21.
- Barrero-Cuevas, L. (2016). *Microbiología clínica*. España: Editorial Síntesis.
- BD Bioxon. (2003). *Instrucciones de Uso - Medios en Placa Listos para Usar: BD Triple Sugar Iron Agar (TSI Agar)*. Heidelberg, Alemania.
- BD Bioxon. (2007). *Procedimientos de Control de Calidad: BBL Motility Indole Ornithine (MIO) Medium*. Country Clare, Irlanda.
- BD Bioxon. (2008). *Procedimientos de Control de Calidad: BBL SIM Medium*. Country Clare, Irlanda.
- BD Bioxon. (2015). *Procedimientos de Control de Calidad: BBL Simmons Citrate Agar Slants*. Dublín, Irlanda.
- BD Bioxon. (2017). *Reactivo Oxidasa - Gotario*. Country Clare, Irlanda.
- Berendsen, R., Pieterse, C., y Bakker, P. (2012). The Rhizosphere Microbiome and Plant Health. *Trends in Plant Science*, vol. 17 (8), pp. 478-486.
- Berg, G. (2009). Plant-Microbe Interactions Promoting Plant Growth and Health: Perspectives for Controlled Use of Microorganisms in Agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 84, pp. 11-18.
- Berrios, L., y Rentsch, J.D. (2022). Linking Reactive Oxygen Species (ROS) to Abiotic and Biotic Feedbacks in Plant Microbiomes: The Dose Makes the Poison. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23 (8), pp. 1-21.

- Beveridge, T.J. (2001). Use of the Gram Stain in Microbiology. *Biotechnic & Histochemistry*, vol. 76 (3), pp. 111-118.
- Bhargavi-Rayavarapu, V.G., y Padmavathi, T. (2016). *Bacillus* sp. as Potential Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *International Journal of Advanced Life Sciences*, vol. 9 (1), pp. 29-36.
- Bharucha, U., Patel, K., y Trivedi, U.B. (2013). Optimization of Indole Acetic Acid Production by *Pseudomonas putida* UB1 and its Effect as Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Mustard (*Brassica nigra*). *Agricultural Research*, vol. 2, pp. 215-221.
- Bhattacharyya, P.N., y Jha, D.K. (2012). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): Emergence in Agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 28, pp. 1327-1350.
- Bhutani, N., Maheshwari, J., Negi, M., y Suneja, P. (2018). Optimization of IAA Production by Endophytic *Bacillus* spp. from *Vigna radiata* for their Potential Use as Plant Growth Promoters. *Israel Journal of Plant Sciences*, vol. 65, pp. 83-96.
- Buxton, R. (2011). Nitrate and Nitrite Reduction Test Protocols. *American Society for Microbiology*, pp. 1-20.
- Chagas-Junior, A.F., de Oliveira, A.G., de Oliveira, L.A., dos Santos, G.R., Chagas, L.F.B., Lopes da Silva, A.L., y da Luz-Costa, J. (2015). Production of Indole-3-Acetic Acid by *Bacillus* Isolated from Different Soils. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, vol. 21 (2), pp. 282-287.
- Chakraborty, U., Chakraborty, B., y Basnet, M. (2006). Plant Growth Promotion *Camellia sinensis* by *B. magisterium*. *Journal of Basic microbiology*, vol. 46, pp. 186-195.
- Condalab. (2019). *Caldo de Cultivo Triptófano ISO*. Madrid, España.
- Condalab. (2021). *Agar Nutritivo Enriquecido con Cloruro Sódico ISO*. Madrid, España.
- Corrales-Ramírez, L.C., Arévalo-Gálvez, Z.Y., y Moreno-Burbano, V.E. (2014). Solubilización de Fosfatos: Una Función Microbiana Importante en el Desarrollo Vegetal. *Revista NOVA Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, vol. 12 (21), pp. 67-79.
- Coruzzi, G., y Bush, D.R. (2014). Nitrogen and Carbon Nutrient and Metabolite Signaling in Plants. *The Journal of Plant Physiology*, vol. 125, pp. 61-64.
- Cuong, P.V., y Phuong-Hoa, N. (2021). Assessment of Culture Conditions of *Bacillus* sp. DTAN1-M5 Strain for High Production of Indole-3-Acetic Acid. *Vietnam Journal of Science and Technology*, vol. 59 (3), pp. 312-323.
- Daraz, U., Li, Y., Sun, Q., Zhang, M., y Ahmad, I. (2021). Inoculation of *Bacillus* spp. Modulate the Soil Bacterial Communities and Available Nutrients in the Rhizosphere of Vetiver Plant Irrigated with Acid Mine Drainage. *Chemosphere*, vol. 263, pp. 1-11.
- Davies, P.J. (2010). The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions. *Plant Hormones*, vol. 1, pp. 1-15.
- De Souza, R., Ambrosini, A., y Passaglia, L. (2015). Plant Growth-Promoting Bacteria as Inoculants in Agricultural Soils. *Genetics and Molecular Biology*, vol. 38 (4), pp. 401-419.
- Di Martino, P., Fursy, R., Bret, L., Sundararaju, B., y Phillips, R.S. (2003). Indole can Act as an Extracellular Signal to Regulate Biofilm Formation of *Escherichia Coli* and other Indole-Producing Bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 49, pp. 443-449.
- Duca, D., Lorv, J., Patten, C.L., Rose, D., y Glick, B.R. (2014). Indole-3-Acetic Acid in Plant-Microbe Interaction. *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 106 (1), pp. 85-125.
- Duca, D.R., Rose, D.R., y Glick, B.R. (2018). Indole Acetic Acid Overproduction Transformants of the Rhizobacterium *Pseudomonas* sp. UW4. *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 111, pp. 1645-1660.

- Duca, D.R., y Glick, B.R. (2020). Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis and its Regulation in Plant-Associated Bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 104, pp. 8607-8619.
- Durante-Batista, B., Nóbrega-Dourado, M., Fernandes-Figueredo, E., Ockner, H.R., Rodrigues-Marques, J.P., Piotto, A.F., Bonatelli, M.L., Settles, M.L., Azevedo, J.L., y Quecine, M.C. (2021). The Auxin-Producing *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9 Promotes the Growth and Modifies the Root Architecture of Tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom). *Archives of Microbiology*, vol. 203, pp. 3869-3882.
- Erturk, Y., Ercisli, S., Haznedar, A., y Cakmakci, R. (2010). Effects of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on Rooting and Root Growth of Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) Stem Cuttings. *Biological Research*, vol. 43, pp. 91-98.
- Evans, J.J., Klesius, P.H., y Shoemaker, C.A. (2004). Starch Hydrolysis Testing of Multiple Isolates for Rapid Differentiation of *Streptococcus iniae*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, vol. 24 (5), pp. 231-239.
- Fan, B., Borriss, R., Bleiss, W., y Wu, X. (2012). Gram-positive Rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 Colonizes Three Types of Plants in Different Patterns. *The Journal of Microbiology*, vol. 50 (1), pp. 38-44.
- Fernández-Olmos, A., García de la Fuente, C., Saéz-Nieto, J.A., y Valdezate-Ramos, S. (2010). *Métodos de Identificación Bacteriana en el Laboratorio de Microbiología*. España: SEIMC.
- Gavrilescu, M., y Chisti, Y. (2005). Biotechnology: A Sustainable Alternative for Chemical Industry. *Biotechnology Advances*, vol. 23, pp. 471-499.
- Ghosh, A.C., y Basu, P.S. (2002). Growth Behaviour and Bioproduction of Indole Acetic Acid by a *Rhizobium* sp. Isolated from Root Nodules of a Leguminous Tree *Dalbergia lanceolaria*. *Indian Journal of Experimental Biology*, vol. 40, pp. 796-801.
- Giassi, V., Kiritani, C., y Kupper, K.C. (2016). Bacteria as Growth-Promoting Agents for Citrus Rootstocks. *Microbiological Research*, vol. 190, pp. 46-54.
- Glickmann, E., y Dessaux, Y. (1995). A Critical Examination of the Specificity of the Salkowski Reagent for Indolic Compounds Produced by Phytopathogenic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 61 (2), pp. 793-796.
- Gordon, S.A., y Weber, R.P. (1950). Colorimetric Estimation of Indoleacetic Acid. *Plant Physiology*, vol. 26 (1), pp. 192-195.
- Goswami, D., Pithwa, S., Dhandhukia, P., y Thakker, J.N. (2014). Delineating *Kocuria turfanensis* 2M4 as a Credible PGPR: A Novel IAA-Producing Bacteria Isolated from Saline Desert. *Journal of Plant Interactions*, vol. 9 (1), pp. 566-576.
- Goswami, D., Vaghela, H., Parmar, S., Dhandhukia, P., y Thakker, J.N. (2013). Plant Growth Promoting Potentials of *Pseudomonas* spp. Strain OG Isolated from Marine Water. *Journal of Plant Interactions*, vol. 8 (4), pp. 281-290.
- Grageda-Cabrera, A.O., Díaz-Franco, A., Peña-Cabriale, J.J., y Vera-Núñez, J.A. (2012). Impacto de los Biofertilizantes en la Agricultura. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, vol. 3 (6), pp. 1261-1274.
- Haas, D., y Défago, G. (2005). Biological Control of Soil-Borne Pathogens by Fluorescent *Pseudomonas*. *Nature Reviews Microbiology*, vol. 3 (4), pp. 307-319.
- Hajna, H. (2003). Triple Sugar Iron Agar (TSI Agar). *Becton, Dickinson and Company*, pp. 1-4.
- Han, X., Zeng, H., Bartocci, P., Fantozzi, F., y Yan, Y. (2018). Phytohormones and Effects on Growth and Metabolites of Microalgae: A Review. *Fermentation*, vol. 4 (25), pp. 1-15.

- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., y Ahmed, I. (2010). Soil Beneficial Bacteria and Their Role in Plant Growth Promotion: A Review. *Annals of Microbiology*, vol. 60, pp. 579-598.
- Hebat-Allah, A.H., Mekki, B.B., El-Sadek, M.E.A., y El-Lateef, E.E. (2019). Effect of L-Ornithine Application on Improving Drought Tolerance in Sugar Beet Plants. *Heliyon*, vol. 5, pp. 1-8.
- Hemraj, W., Diksha, S., y Avneet, G. (2013). A Review on Commonly Used Biochemical Test for Bacteria. *Innovare Journal of Life Science*, vol. 1 (1), pp. 1-7.
- Hernández-Leal, T., Carrión, G., y Heredia, G. (2011). Solubilización *In Vitro* de Fosfatos por una Cepa de *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Agrociencia*, vol. 45 (8), pp. 881-892.
- Hiep-Han, T., Jin-Hyung, L., Hwan-Cho, M., Wood, T.K., y Lee, J. (2011). Environmental Factors Affecting Indole Production in *Escherichia Coli*. *Research in Microbiology*, pp. 162 (2), pp. 108-116.
- Hiltner, L. (1904). About Recent Experiences and Problems in the Field of Soil Bacteriology with Special Consideration and Fallow. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft*, vol. 98, pp. 59-78.
- Idris, E.E., Bochow, H., Ross, H., y Borriss, R. (2004). Use of *Bacillus subtilis* as Biocontrol Agent. VI. Phytohormone-Like Action of Culture Filtrates Prepared from Plant Growth-Promoting *Bacillus amyloliquefaciens* FZB24, FZB42, FZB45 and *Bacillus subtilis* FZB37. *Journal of Plant Diseases and Protection*, vol. 111, pp. 583-597.
- Idris, E.E., Iglesias, D.J., Talon, M., y Borriss, R. (2007). Tryptophan-Dependent Production of Indole-3-Acetic Acid (IAA) Affects Level of Plant Growth Promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 20 (6), pp. 619-626.
- Inada, S., y Shimmen, T. (2000). Regulation of Elongation Growth by Gibberellin in Root Segments of *Lemna minor*. *Plant and Cell Physiology*, vol. 41 (8), pp. 932-939.
- Israr, D., Mustafa, G., Saifullah-Khan, K., Shahzad, M., Ahmad, N., y Masood, S. (2016). Interactive Effects of Phosphorus and *Pseudomonas putida* on Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Growth, Nutrient Uptake, Antioxidant Enzymes and Organic Acids Exudation. *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 108, pp. 304-312.
- Iwata, S. (1998). Structure and Function of Bacterial Cytochrome *c* Oxidase. *The Journal of Biochemistry*, vol. 123 (3), pp. 369-375.
- Jones, C., y Jacobse, J. (2001). Plant Nutrition and Soil Fertility. *Journal of the Montana State University*, vol. 2, pp. 1-12.
- Jordán, M., y Casaretto, J. (2006). Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. En *Fisiología Vegetal* (pp. 1-28). La Serena, Chile: Ediciones Universidad de La Serena.
- Kalimuthu, R., Suresh, P., Varatharaju, G., Balasubramanian, N., Rajasekaran, K.M., y Shanmugaiiah, V. (2019). Isolation and Characterization of Indole Acetic Acid (IAA) Producing Tomato Rhizobacterium *Pseudomonas* sp. VSMKU4050 and its Potential for Plant Growth Promotion. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, vol. 8 (6), pp. 443-455.
- Kang, B.R., Yang, K.Y., Cho, B.H., Han, T.H., Kim, I.S., Lee, M.C., Anderson, A.J., y Kim, Y.C. (2006). Production of Indole-3-Acetic Acid in the Plant-Beneficial Strain *Pseudomonas chlororaphis* O6 is Negatively Regulated by the Global Sensor Kinase GacS. *Current Microbiology*, vol. 52, pp. 473-476.
- Kasahara, H. (2015). Current Aspects of Auxin Biosynthesis in Plants. *Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry*, vol. 80, pp. 34-42.
- Khan, A.L., Halo, B.A., Elyassi, A., Ali, S., Al-Hosni, K., Hussain, J., Al-Harrasi, A., y Lee, I.J. (2016). Indole Acetic Acid and ACC Deaminase from Endophytic Bacteria Improves the Growth of *Solanum lycopersicum*. *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 21, pp. 58-64.

- Kloepper, J.W., y Schroth, M.N. (1981). Development of a Powder Formulation of Rhizobacteria for Inoculation of Potato Seed Pieces. *Phytopathology*, vol. 71 (6), pp. 590-592.
- Kloepper, J.W., y Schroth, M.N. (1981). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and Plant Growth Under Gnotobiotic Conditions. *Phytopathology*, vol. 71 (6), pp. 642-644.
- Kloepper, J.W., y Schroth, M.N. (1981). Relationship of *in vitro* Antibiosis of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria to Plant Growth and the Displacement of Root Microflora. *Phytopathology*, vol. 71 (10), pp. 1020-1024.
- Koga, J., Adachi, T., y Hidaka, H. (2014). IAA Biosynthetic Pathway from Tryptophan via Indole-3-Pyruvic Acid in *Enterobacter cloacae*. *Agricultural and Biological Chemistry*, vol. 55 (3), pp. 701-706.
- Kumar, A., Prakash, A., y Johri, B.N. (2011). *Bacillus* as PGPR in Crop Ecosystem. En *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems* (pp. 37-59). Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Springer.
- Kumari, P., Meena, M., y Upadhyay, R.S. (2018). Characterization of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) Isolated from the Rhizosphere of *Vigna radiata* (mung bean). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 16, pp. 155-162.
- Laird, T.S., Flores, N., y Leveau, J.H.J. (2020). Bacterial Catabolism of Indole-3-Acetic Acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 104, pp. 9535-9550.
- Lara, C., Oviedo, L., y Alemán, A. (2011). Aislados Nativos con Potencial en la Producción de Ácido Indol Acético para Mejorar la Agricultura. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, vol. 9 (1), pp. 17-23.
- Lebrazi, S., Fadil, M., Chraibi, M., y Fikri-Benbrahim, K. (2020). Screening and Optimization of Indole-3- Acetic Acid Production by *Rhizobium* sp. Strain Using Response Surface Methodology. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, vol. 18 (21), pp. 1-10.
- Liu, Y., Shi, Z., Yao, L., Yue, H., Li, H., y Li, C. (2013). Effect of IAA Produced by *Klebsiella oxytoca* Rs-5 on Cotton Growth Under Salt Stress. *The Journal of General and Applied Microbiology*, vol. 59, pp. 59-65.
- Lopardo, A.H., Predari, S.C., y Vay, C. (2016). *Manual de Microbiología Clínica de la Asociación Argentina de Microbiología: Enterobacterias*. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología.
- Lugtenberg, B., y Kamilova, F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, vol. 63, pp. 541-556.
- Lwin, K.M., Myint, M.M., Tar, T., y Moe-Aung, W.Z. (2012). Isolation of Plant Hormone (Indole-3-Acetic Acid - IAA) Producing Rhizobacteria and Study on their Effects on Maize Seedling. *Engineering Journal*, vol. 16 (5), pp. 137-144.
- Macedo-Ferreira, M.M. (2012). Sintomas de Deficiência de Macro e Micronutrientes de Plantas de Milho Híbrido BRS 1010. *AgroAmbiente*, vol. 6 (1), pp. 74-83.
- MacFaddin, J.F. (2000). Prueba de Descarboxilasa (Lisina-Ornitina-Arginina) y Prueba de Dihidrolasa (Arginina). En *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica* (pp. 113-127). Editorial Médica Panamericana.
- MacFaddin, J.F. (2003). *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica*. Editorial Médica Panamericana.
- MacWilliams, M.P. (2009). Citrate Test Protocol. *American Society for Microbiology*, pp. 1-7.
- MacWilliams, M.P. (2009). Indole Test Protocol. *American Society for Microbiology*, pp. 1-9.
- Masson-Boivin, C., y Sachs, J.L. (2018). Symbiotic Nitrogen Fixation by Rhizobia - The Roots of a Success Story. *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 44, pp. 7-15.

- Mehmood, U., Inam-ul-Haq, M., Saeed, M., Altaf, A., Azam, F., y Hayat, S. (2018). A Brief Review on Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): A Key Role in Plant Growth Promotion. *Plant Protection*, vol. 2 (2), pp. 77-82.
- Meliani, A., Bensoltane, A., Benidire, L., y Oufdou, K. (2017). Plant Growth-Promotion and IAA Secretion with *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*. *Research & Reviews: Journal of Botanical Sciences*, vol. 6 (2), pp. 16-24.
- Mishra, P.K., Mishra, S., Bisht, S.C., Selvakumar, G., Kundu, S., Bisht, J.K., y Gupta, H.S. (2009). Isolation, Molecular Characterization and Growth-Promotion Activities of a Cold Tolerant Bacterium *Pseudomonas* sp. NARs9 (MTCC9002) from the Indian Himalayas. *Biological Research*, vol. 42, pp. 305-313.
- Mohite, B. (2013). Isolation and Characterization of Indole Acetic Acid (IAA) Producing Bacteria from Rhizospheric Soil and its Effect on Plant Growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, vol. 13 (3), pp. 638-649.
- Moreno-Reséndez, A., García-Mendoza, V., Reyes-Carrillo, J.L., Vásquez-Arroyo, J., y Cano-Ríos, P. (2018). Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal: Una Alternativa de Biofertilización para la Agricultura Sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. 20 (1), pp. 68-83.
- Moyes, R.B., Reynolds, J., y Breakwel, D.P. (2009). Differential Staining of Bacteria: Gram Stain. *Current Protocols in Microbiology*, vol. 3 (8), pp. 1-8.
- Mushtaq, H., Jehangir, A., Ahmad-Ganai, S., Farooq, S., Ahmad-Ganai, B., y Nazir, R. (2021). Biochemical Characterization and Functional Analysis of Heat Stable High Potential Protease of *Bacillus amyloliquefaciens* Strain HM48 from Soils of Dachigam National Park in Kashmir Himalaya. *Biomolecules*, vol. 11 (117), pp. 1-26.
- Muso-Jam, E.F., y Acosta-Hurtado, C.I. (2017). *Evaluación de Bioaerosoles Asociados en el Sitio de Disposición Final de Residuos Sólidos en la Empresa Pública de Aseo y Gestión Ambiental del Cantón Latacunga (EPAGAL)*. [Tesis de Licenciatura, Universidad Técnica de Ambato].
- Nag, P., Shriti, S., y Das, S. (2019). Microbiological Strategies for Enhancing Biological Nitrogen Fixation in Nonlegumes. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 129 (2), pp. 186-198.
- Ningsih-Susilowati, D., Ida-Riyanti, E., Setyowati, M., y Mulya, K. (2002). Indole-3-Acetic Acid Producing Bacteria and its Application on the Growth of Rice. *Inventing Prosperous Future through Biological Research and Tropical Biodiversity Management*, vol. 9, pp. 1-9.
- Olanrewaju, O.S., Ayangbenro, A.S., Glick, R.B., y Babalola, O.O. (2018). Plant Health: Feedback Effect of Root Exudates-Rhizobiome Interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 103, pp. 1155-1166.
- Ona, O., Smets, I., Gysegom, P., Bernaerts, K., Van Impe, J., Prinsen, E., y Vanderleyden, J. (2003). The Effect of pH on Indole-3-Acetic Acid (IAA) Biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp7. *Symbiosis*, vol. 35, pp. 199-208.
- Ondarza-Beneitez, M.A. (2016). Biopesticidas: Tipos y Aplicaciones en el Control de Plagas Agrícolas. *Agroproductividad*, vol. 10 (3), pp. 31-36.
- Pan, X., Welti, R., y Wang, X. (2010). Quantitative Analysis of Major Plant Hormones in Crude Plant Extracts by High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Nature Protocols*, vol. 10 (5), pp. 986-992.
- Panichikkal, J., y Edayileveetil-Krishnankutty, R. (2020). Rhizobacterial Biofilm and Plant Growth Promoting Trait Enhancement by Organic Acids and Sugars. *Biofouling*, vol. 36 (8), pp. 990-999.
- Paredes-Mendoza, M., y Espinosa-Victoria, D. (2010). Ácidos Orgánicos Producidos por Rizobacterias que Solubilizan Fosfato: Una Revisión Crítica. *Terra Latinoamericana*, vol. 28 (1), pp. 61-70.
- Pérez-García, A., Romero, D., y de Vicente, A. (2011). Plant Protection and Growth Stimulation by Microorganisms: Biotechnological Applications of Bacilli in Agriculture. *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 22, pp. 187-193.

- Pindi, P.K., Sultana, T., y Vootla, P.K. (2014). Plant Growth Regulation of Bt-Cotton Through *Bacillus* Species. *3 Biotech*, vol. 4, pp. 305-315.
- Pitt, T.L., y Barer, M.R. (2012). Classification, Identification and Typing of Microorganisms. En *Medical Microbiology* (pp. 24-38). Londres, Inglaterra: Churchill Livingstone.
- Ramírez-Gama, R.M., Luna-Millán, B., Velázquez-Madrado, O., Vierna-García, L., Mejía-Chávez, A., Tsuzuki-Reyes, G., Hernández-Gómez, L., Müggelburg, I., Camacho-Cruz, A., y Urzúa-Hernández, M. del C. (2008). *Manual de Prácticas de Microbiología General*. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química: Laboratorio de Microbiología Experimental.
- Reiner, K. (2010). Catalase Test Protocol. *American Society for Microbiology*, pp. 1-9.
- Reis, C., Pacheco, F.S., Reed, S.C., Tejada, G., Nardoto, G.B., Forti, M.C., y Ometto, J.P. (2020). Biological Nitrogen Fixation Across Major Biomes in Latin America: Patterns and Global Change Effects. *Science of the Total Environment*, vol. 746, pp. 1-15.
- Richter-Heitmann, T., Eickhorst, T., Knauth, S., Friedrich, M.W., y Schmidt, H. (2016). Evaluation of Strategies to Separate Root-Associated Microbial Communities: A Crucial Choice in Rhizobiome Research. *Frontiers in Microbiology Journal*, vol. 7, pp. 1-11.
- Saavedra, S.L. (2017). *Manual para la Preparación de Medios de Cultivo*. Colombia: Universidad de Santander (UNDES).
- Saghir-Khan, M., Zaidi, A., y Wani, A.P. (2007). Role of Phosphate-Solubilizing Microorganisms in Sustainable Agriculture: A Review. *Agronomy for Sustainable Development*, vol. 27, pp. 29-43.
- Saharan, B.S., y Nehra, V. (2011). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research*, vol. 20 (11), pp. 1-30.
- Sanabria-Gómez, J., y Acevedo, D.M. (2001). *Manual de Laboratorio: Microbiología*. Universidad del Valle, Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería Recursos Naturales y del Ambiente, Área de Ingeniería Sanitaria y Ambiental: Laboratorio de Microbiología.
- Sánchez-González, M.E., Mora-Herrera, M.E., Wong-Villarreal, A., De La Portilla-López, N., Sánchez-Paz, L., Lugo, J., Vaca-Paulín, R., Del Águila, P., y Yáñez-Ocampo, G. (2023). Effect of pH and Carbon Source on Phosphate Solubilization by Bacterial Strains in Pikovskaya Medium. *Microorganisms*, vol. 11 (49), pp. 1-11.
- Sarmiento-López, L.G., López-Meyer, M., Maldonado-Mendoza, I.E., Quiroz-Figueroa, F.R., Sepúlveda-Jiménez, G., y Rodríguez-Monroy, M. (2022). Production of Indole-3-Acetic Acid by *Bacillus circulans* E9 in a Low-Cost Medium in a Bioreactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 134 (1), pp. 21-28.
- Sasse, J., Martinoia, E., y Northen, T. (2018). Feature Review Feed Your Friends: Do Plant Exudates Shape the Root Microbiome? *Trends in Plant Science*, vol. 23 (1), pp. 25-41.
- Shah, R.K., Raval, V.H., y Saraf, M. (2020). Biosynthesis and Purification of Indole-3-Acetic Acid by Halotolerant Rhizobacteria Isolated from Little Runn of Kachchh. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 23, pp. 1-6.
- Shahab, S., Ahmed, N., y Khan, N.S. (2009). Indole Acetic Acid Production and Enhanced Plant Growth Promotion by Indigenous Psbs. *African Journal of Agricultural Research*, vol. 11 (4), pp. 1312-1316.
- Shao, J., Xu, Z., Zhang, N., Shen, Q., y Zhang, R. (2014). Contribution of Indole-3-Acetic Acid in the Plant Growth Promotion by the Rhizospheric Strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. *Biology and Fertility of Soils*, vol. 51, pp. 321-330.
- Sharma, H.C., Crouch, J.H., Sharma, K.K., Seetharama, N., y Hash, C.T. (2002). Applications of Biotechnology for Crop Improvement: Prospects and Constraints. *Plant Science*, vol. 163, pp. 381-395.

- Sherpa, M.T., Bag, N., Das, S., Haokip, P., y Sharma, L. (2021). Isolation and Characterization of Plant Growth Promoting Rhizobacteria Isolated from Organically Grown High Yielding Pole Type Native Pea (*Pisum sativum* L.) Variety *Dentami* of Sikkim, India. *Current Research in Microbial Sciences*, vol. 2, pp. 1-11.
- Shields, P., y Cathcart, L. (2010). Oxidase Test Protocol. *American Society for Microbiology*, pp. 1-9.
- Shoukry, A.A., El-Sebaay, H.H., y El-Ghomary, A.E. (2018). Assessment of Indole Acetic Acid Production from *Rhizobium leguminosarum* Strains. *Current Science International*, vol. 7 (1), pp. 60-69.
- Stein, L.Y., y Klotz, M.G. (2016). The Nitrogen Cycle. *Current Biology*, vol. 26, pp. 94-98.
- Suliasih, y Widawati, S. (2020). Isolation of Indole Acetic Acid (IAA) Producing *Bacillus siamensis* from Peat and Optimization of the Culture Conditions for Maximum IAA Production. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, vol. 572, pp. 1-11.
- Swain, M.R., Naskar, S.K., y Ray, R.C. (2007). Indole-3-Acetic Acid Production and Effect on Sprouting of Yam (*Dioscorea rotundata* L.) Minisetts by *Bacillus subtilis* Isolated from Culturable Cowdung Microflora. *Polish Journal of Microbiology*, vol. 56 (2), pp. 103-110.
- Talaiekhosani, A., Alaei, S., y Ponraj, M. (2015). Guidelines for Quick Application of Biochemical Tests to Identify Unknown Bacteria. *Accounts of Biotechnology Research*, vol. 2 (29), pp. 65-82.
- Thieman, W.J., y Palladino, M.A. (2010). El Siglo de la Biotecnología y su Capital Humano. En *Introducción a la Biotecnología* (pp. 2-25). Madrid, España: Pearson Educación.
- Tiburcio, A.F., Altabella, T., Bitrián, M., y Alcázar, R. (2014). The Roles of Polyamines During the Lifespan of Plants: From Development to Stress. *Planta*, vol. 240, pp. 1-18.
- Tsavkelova, E.A., Klimova, S.Y., Cherdyntseva, T.A. y Netrusov, A.I. (2006). Microbial Producers of Plant Growth Stimulators and Their Practical Use: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, vol. 42 (2), pp. 117-126.
- Utami, D., Kawahata, A., Sugawara, M., Jog, R.N., Miwa, K., y Morikawa, M. (2018). Effect of Exogenous General Plant Growth Regulators on the Growth of the Duckweed *Lemna minor*. *Frontiers in Chemistry*, vol. 6, pp. 1-9.
- Valverde-Lucio, Y., Moreno-Quinto, J., Quijije-Quiroz, K., Castro-Landín, A., Merchán-García, W., y Gabriel-Ortega, J. (2020). Los Bioestimulantes: Una Innovación en la Agricultura para el Cultivo del Café (*Coffea arabica* L.). *Journal of the Selva Andina Research Society*, vol. 11 (1), pp. 18-28.
- Van Loon, L.C. (2007). Plant Responses to Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*, vol. 11 (9), pp. 243-254.
- Van Peer, R., Niemann, G.J., y Schippers, B. (1991). Induced Resistance and Phytoalexin Accumulation in Biological Control of *Fusarium* Wilt of Carnation by *Pseudomonas* sp. Strain WCS417r. *Phytopathology*, vol. 81 (7), pp. 728-734.
- Viera-Oramas, D.R., Zhurbenko, R.C., Cabrera-González, A.L., y Lobaina-Rodríguez, T. (2014). Combinaciones de Bases Nutritivas Empleadas en el Desarrollo del Medio Caldo Nitrato. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, vol. 33 (4), pp. 334-343.
- Viscardi, S., Venterino, V., Duran, P., Maggio, A., De Pascale, S., Mora, M.L., y Pepe, O. (2016). Assessment of Plant Growth Promoting Activities and Abiotic Stress Tolerance of *Azotobacter Chroococcum* Strains for a Potential Use in Sustainable Agriculture. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, vol. 16 (3), pp. 848-863.
- von Wachenfeldt, C., Hallgren, J., y Hederstedt, L. (2021). YtkA (CtaK) and YozB (CtaM) Function in the Biogenesis of Cytochrome *c* Oxidase in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, vol. 116 (1), pp. 184-199.
- Vyas, P., y Gulati, A. (2009). Organic Acid Production *in vitro* and Plant Growth Promotion in Maize Under Controlled Environment by Phosphate-Solubilizing Fluorescent *Pseudomonas*. *BMC Microbiology*, vol. 9 (174), pp. 1-15.

- Wandira, T.A., Aisyah, S.N., Oktavioni, M., Fatiah, R., y Jamsari, J. (2021). Different pH Levels Medium Effects in IAA Production of Phylloplane Bacterium *Serratia plymuthica* Strain UBCF\_13. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, vol. 741, pp. 1-9.
- Whipps, J.M. (2001). Microbial Interactions and Biocontrol in the Rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, vol. 52, pp. 487-511.
- Wu, H., Wu, L., Zhu, Q., Wang, J., Qin, X., Xu, J., Kong, L., Chen, J., Lin, S., Umar-Khan, M., Amjad, H., y Lin, W. (2017). The Role of Organic Acids on Microbial Deterioration in the *Radix pseudostellariae* Rhizosphere Under Continuous Monoculture Regimes. *Scientific Reports*, vol. 7 (3497), pp. 1-13.
- Wu, H., Yang, J., Shen, P., Li, Q., Wu, W., Jiang, X., Qin, L., Huang, J., Cao, X., y Qi, F. (2021). High-Level Production of Indole-3-Acetic Acid in the Metabolically Engineered *Escherichia coli*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 69, pp. 1916-1924.
- Yang, T., Law, D.M., Davies, P.J. (1993). Magnitude and Kinetics of Stem Elongation Induced by Exogenous Indole-3-Acetic Acid in Intact Light-Crown Pea Seedlings. *Plant Physiology*, vol. 102, pp. 717-724.
- Yu, M.S., y Lee, H.Y. (2013). Plant Growth Promoting Rhizobacterium *Proteus Vulgaris* JBLS202 Stimulates the Seedling Growth of Chinese Cabbage Through Indole Emission. *Plant Soil*, vol. 370, pp. 485-495.
- Zaidi, A., Saghir-Khan, M., Ahemad, M., Oves, M., y Wani, P.A. (2009). Recent Advances in Plant Growth Promotion by Phosphate-Solubilizing Microbes. *Microbial Strategies for Crop Improvement*, vol. 78, pp. 23-50.
- Zhang, X., Zhan, Y., Zhang, H., Wang, R., Tao, X., Zhang, L., Zuo, Y., Zhang, L., Wei, Y., y Li, J. (2021). Inoculation of Phosphate-Solubilizing Bacteria (*Bacillus*) Regulates Microbial Interaction to Improve Phosphorus Fractions Mobilization During Kitchen Waste Composting. *Bioresource Technology*, vol. 340, pp. 1-9.
- Zhao, Y. (2012). Auxin Biosynthesis: A Simple Two-Step Pathway Converts Tryptophan to Indole-3-Acetic Acid in Plants. *Molecular Plant*, vol. 5 (2), pp. 334-338.
- Zimbardo, M.J., Power, D.A., Miller, S.M., Wilson, G.E., y Johnson, J.A. (2009). *Manual of Microbiological Culture Media*. Estados Unidos: Becton, Dickinson and Company.