



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE FIJACIÓN
BIOLÓGICA DE NITRÓGENO DE UN CEPARIO
OBTENIDO DE SUELO RIZOSFÉRICO DE
DIFERENTES REGIONES DEL
ESTADO DE PUEBLA**

Tesis presentada para obtener el título de
LIC. EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

IRVING URIEL MERINO ESPINOZA

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. VIANEY MARÍN CEVADA

CODIRECTOR DE TESIS:

DR. LUIS ERNESTO FUENTES RAMÍREZ



13 DE NOVIEMBRE DEL 2020

Este trabajo fue realizado con el apoyo de la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado como parte de proyecto de investigación VIEP (100523154-VIEP2018) y del programa Haciendo Ciencia en la BUAP Primavera 2019 (00104); trabajo que fue realizado en el Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias y los laboratorios de biotecnología vegetal, biotecnología de alimentos en el edificio Multilaboratorios 6 de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Ana Lilia y Enrique por brindarme todo el apoyo y los medios necesarios para estudiar la licenciatura que elegí.

A mis compañeros de laboratorio Indira, Citlali y Paco por ayudarme incondicionalmente con cada duda que se me presentó.

A Emy por ser mi mano derecha, colaborar y ayudarme a resolver problemas desde otro punto de vista.

Al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas – ICUAP, el Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana y sus profesores por permitirme usar sus equipos y realizar este trabajo en sus instalaciones.

A la Dra. María Esperanza Martínez Romero y al Dr. Marco Antonio Rogel Hernández del Centro de Ciencias Genómicas por permitirnos utilizar los equipos para cromatografía de gases.

A la Dra. Ivonne Pérez Xochipa y al Lic. Daniel Martínez Pérez por permitirme usar los laboratorios de biotecnología de alimentos en el EMA-06 de la BUAP y guiarme en los experimentos de análisis proximal.

Al Dr. Carlos Alberto Contreras Paredes por permitirme usar los laboratorios de biotecnología vegetal en el EMA-06 de la BUAP instruirme en mi rama terminal y junto con la Dra. Dalia Molina Romero apoyarme con la revisión del escrito final.

A mi codirector de tesis el Dr. Luis Ernesto Fuentes Ramírez por su ingenio para enseñarme nuevos conocimientos, su apoyo para la realización - perfeccionamiento del trabajo y su iniciativa para entablar buenas relaciones.

Y especialmente a mi directora de tesis la Dra. Vianey Marín Cevada por haberme guiado en cada parte del proceso, por instruirme en cada nueva técnica, por su disposición para aclarar cada duda, por su confianza en mí, su paciencia en cada equivocación y su enorme entusiasmo en cada resultado.

Contenido

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Diversidad microbiana en el suelo	2
Interacción microorganismo – planta	2
Bacterias promotoras del crecimiento vegetal	3
Fijación biológica de nitrógeno como mecanismo promotor de crecimiento vegetal	3
Otros mecanismos promotores de crecimiento vegetal	6
Producción de amonio	6
Producción de sideróforos	7
Solubilización de fosfatos	8
El grupo <i>Burkholderia sensu lato</i>	9
Características del género	10
ANTECEDENTES	11
<i>Burkholderia</i> como biofertilizante	11
<i>Burkholderia</i> como PGPB	12
Cepario de <i>Burkholderia</i>	13
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
HIPOTESIS	14
OBJETIVOS	15
General	15
Particulares	15
DIAGRAMA DE TRABAJO	16
METODOLOGÍA	17
Reactivación del cepario	17
Generación de ceparios de trabajo	20
Solubilización de fosfatos	20
Producción de sideróforos	21
Caracterización de los sideróforos con grupos catecol.	21
Producción de amonio	22
Producción de AIA	22
Detección del gen <i>nifH</i>	22
Preparación del templado para la PCR	23
Amplificación del gen <i>nifH</i> vía PCR	23
Separación electroforética de los productos de la PCR	24

Secuenciación del gen <i>nifH</i> _____	24
Ensayo de reducción de acetileno (ARA) _____	25
Antagonismo _____	25
Evaluación de promoción de crecimiento en fase de germinación _____	26
Evaluación de la capacidad promotora vegetal en cultivo hidropónico. _____	26
Pruebas organolépticas _____	27
Análisis químico proximal _____	28
Análisis estadístico _____	29
RESULTADOS _____	29
Solubilización de fosfatos _____	29
Prueba preliminar _____	29
Evaluación de la capacidad de solubilización de fosfatos _____	30
Producción de sideróforos _____	32
Caracterización de los sideróforos con grupos catecol. _____	32
Producción de amonio _____	34
Producción de IAA _____	36
Detección del gen <i>nifH</i> _____	38
Secuenciación del gen <i>nifH</i> _____	39
Capacidad fijadora de nitrógeno _____	40
Antagonismo _____	41
Ensayo de promoción de crecimiento en fase de germinación _____	43
Crecimiento <i>in planta</i> _____	45
Pruebas organolépticas _____	49
Análisis químico proximal _____	50
DISCUSIÓN _____	51
PERSPECTIVAS _____	57
CONCLUSIONES _____	58
BIBLIOGRAFÍA _____	59
ANEXOS _____	73
Medios de cultivo _____	73
I. Agar Baz _____	73
II. Agar Luria-Bertani modificado _____	73
III. Agar Luria-Bertani modificado para viales _____	73
IV. Caldo NBY _____	74
V. Caldo Luria-Bertani modificado _____	74

VI.	Caldo Luria-Bertani modificado + glicerol _____	74
VII.	Medio mínimo M9 _____	75
VIII.	National Botanical Research Institute´s Phosphate Growth Medium (Medio NBRIP) _____	75
Tablas, gráficas y apoyos visuales _____		76
IX.	Cálculo del índice de solubilización de fosfatos. _____	76
X.	Sales minerales usadas en los sistemas hidropónicos _____	76
XI.	Secuencias de dinitrogenasa _____	77
XII.	Alineamiento de nitrogenasas _____	79
XIII.	Tabla compiladora de pruebas _____	80
XIV.	Seguimiento del crecimiento en hidropónia _____	82
XV.	Hoja de evaluación organoléptica _____	83
GLOSARIO DE ABREVIATURAS _____		84

RESUMEN

En el presente trabajo se determinaron y cuantificaron las características promotoras vegetales de cepas bacterianas del grupo *Burkholderia sensu lato* obtenido de diferentes regiones del estado de Puebla. Todos los aislamientos mostraron características propias de bacterias promotoras vegetales o PGPB (Plant Growing Promoting Bacteria), tales como solubilización de fosfatos, presencia de genes de fijación de nitrógeno y secreción de sideróforos, de amonio y de indoles. Así mismo, con experimentos *in vivo* se evaluó el efecto en la germinación de semillas de lechuga (*Lactuca sativa var Parris island*) y la promoción del crecimiento vegetal. El efecto de las cepas GB42, GB70 y GB94 en semillas de lechuga promovió el crecimiento vegetal, incluso se observó la aceleración de la germinación, así como un efecto positivo en el crecimiento de las plántulas. La adición de estos inóculos bacterianos incrementó ligeramente la concentración de minerales con respecto a plantas sin el inóculo, manteniendo las características organolépticas a excepción del sabor. De manera interesante, el inóculo GB42 + GB70 mejoró el crecimiento de las plantas, usando menos nutrientes en el sistema hidropónico con respecto al control negativo.

INTRODUCCIÓN

Diversidad microbiana en el suelo

El suelo superficial u horizonte A es el hábitat microbiano más poblado y diverso. En él se encuentran grandes y distintas comunidades microbianas que intervienen en procesos de vital importancia para el ecosistema, desde el reciclaje de elementos en los ciclos biogeoquímicos hasta la descomposición de compuestos antropogénicos de reciente creación (Martinko *et al.*, 2004).

Sin incluir las poblaciones de virus, las bacterias son por lo regular la mayor comunidad de microorganismos en el suelo, llegando a alcanzar poblaciones que exceden las 10^{10} células por gramo (incluyendo bacterias cultivables y no cultivables), seguido de los reinos arquea y fungi. (Pepper *et al.*, 2014).

La mayor parte del crecimiento microbiano tiene lugar en la superficie de los agregados de suelo, encontrados normalmente en la rizosfera. Estos agregados generan microambientes muy variados en donde se encuentran diferentes tipos de microorganismos y que tienen en común dos factores que influyen en la gran actividad microbiana del suelo, la disponibilidad de agua y el balance de nutrientes (Martinko *et al.*, 2004).

En cuanto a la estructura de las comunidades en el suelo, el género *Arthrobacter* representa hasta el 40% del total de bacterias cultivables, seguido de *Streptomyces* (20%), *Pseudomonas* (20%) y *Bacillus* (10%) (Pepper *et al.*, 2014). Esos microorganismos heterótrofos participan en funciones ecológicas de reciclado de nutrientes, biodegradación y biocontrol de patógenos. Las poblaciones de *Burkholderia* presentan concentraciones de aproximadamente 10^5 UFC.g⁻¹ en suelos de pH neutro (determinadas por métodos de cultivo; Draghi *et al.*, 2018 y Pallud *et al.*, 2001) y su población disminuye en suelos ácidos (Salles *et al.*, 2006) en los que se encuentra en mayor medida *B. ambifaria* (Draghi *et al.*, 2018).

Interacción microorganismo – planta

La competencia por nutrientes en el suelo es constante, la mayoría de los suelos no contienen nutrientes o sustratos en abundancia para los microorganismos pues las comunidades microbianas utilizan rápidamente cualquier sustancia presente en él.

En contraste, la rizosfera es un hábitat en el suelo donde los sustratos son abundantes y hay poca necesidad de competir por ellos, aumentando la actividad, diversidad y cantidad de carga microbiana (Pepper *et al.*, 2014). La rizosfera comprende las pequeñas zonas que rodean inmediatamente las raíces de las plantas en el suelo, en las que los tipos, números y actividades de los microorganismos difieren de los del suelo en general (Meek *et al.*, 2008).

Actualmente se ha dividido en tres partes de acuerdo a su proximidad e influencia desde la raíz. La endorizosfera que incluye porciones del córtex y endodermis en donde los microorganismos habitan los apoplastos; el rizoplano como zona directamente adyacente a la raíz incluyendo la epidermis y el mucilago; y la ectorizosfera que se extiende desde el rizoplano hacia el suelo (David Jr, 2015). Entre las comunidades microbianas en este hábitat se encuentra el grupo de bacterias llamadas PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria), o bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Las PGPB son un pequeño grupo de rizobacterias, en su mayoría gramnegativas (2 – 5 % del total de bacterias en el suelo) que promueven el crecimiento vegetal (Antoun, 2013) por diferentes mecanismos: (1) fijación de nitrógeno, (2) incremento en la disponibilidad de nutrientes en la rizosfera, (3) inducción del crecimiento radicular, (4) promoción de otras relaciones simbióticas benéficas del hospedero y (5) combinación de estos modos de acción (Vessey, 2003).

Estos mecanismos ayudan a las plantas a incrementar su salud, masa, volumen, generar resistencia a condiciones de estrés, tener mayor éxito reproductivo, entre otras mejoras fisiológicas. Por ello se han realizado esfuerzos para encontrar bacterias capaces de llevar a cabo uno o varios de estos mecanismos y poder producirlas en grandes cantidades para ser usadas como biofertilizantes.

Fijación biológica de nitrógeno como mecanismo promotor de crecimiento vegetal

El nitrógeno es el séptimo elemento de la tabla periódica, es el cuarto elemento más abundante en los sistemas biogeoquímicos y el más abundante (en forma de

dinitrógeno N_2) en la atmósfera (78.08% en volumen) (Cleaves, 2015). A pesar de ser el elemento más abundante sólo puede ser incorporado por algunos seres vivos con los mecanismos para este fin. Sólo ciertas bacterias, cianobacterias y arqueobacterias poseen el complejo enzimático de la fijación de nitrógeno (Olivares, 2015).

Dentro de los elementos del ciclo del nitrógeno participan distintos tipos de bacterias y hongos saprofitos que degradan proteínas liberando sus residuos al suelo. Los grupos amino de los aminoácidos son liberados en forma de amonio (NH_4^+) al suelo (proceso de amonificación) y posteriormente oxidados a nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-) (nitrificación). Las plantas y algunos hongos heterótrofos asimilan el nitrato como fuente principal de nitrógeno permitiendo el paso de nitrógeno a animales o volviéndolo a incorporar al suelo en forma de proteínas. Por otro lado, la completa oxidación de nitrato genera óxido nitroso (N_2O) en el proceso llamado desnitrificación que puede escapar a la atmósfera y convertirse en gas nitrógeno (N_2). El gas nitrógeno solo puede regresar al suelo y a la cadena alimenticia mediante la fijación de nitrógeno (de N_2 a NH_3) por parte de bacterias fijadoras, fertilizantes o relámpagos (Figura 1).

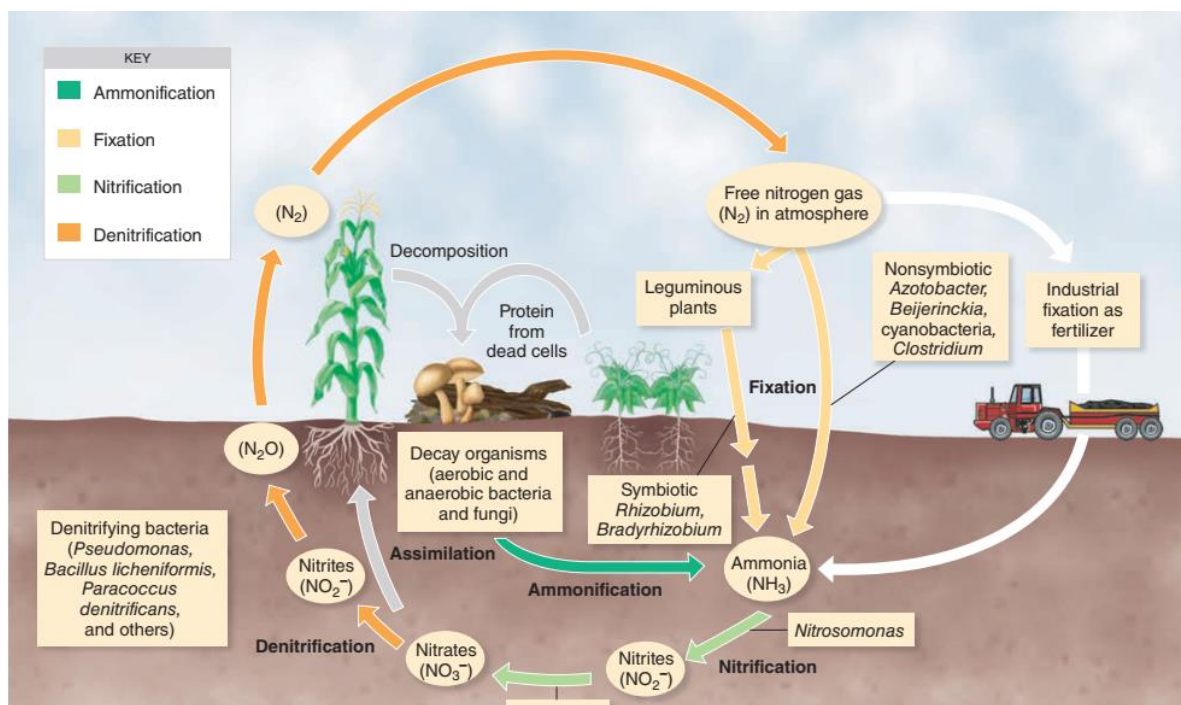


Figura 1 Ciclo del nitrógeno, tomado de Ratledge, 1983.

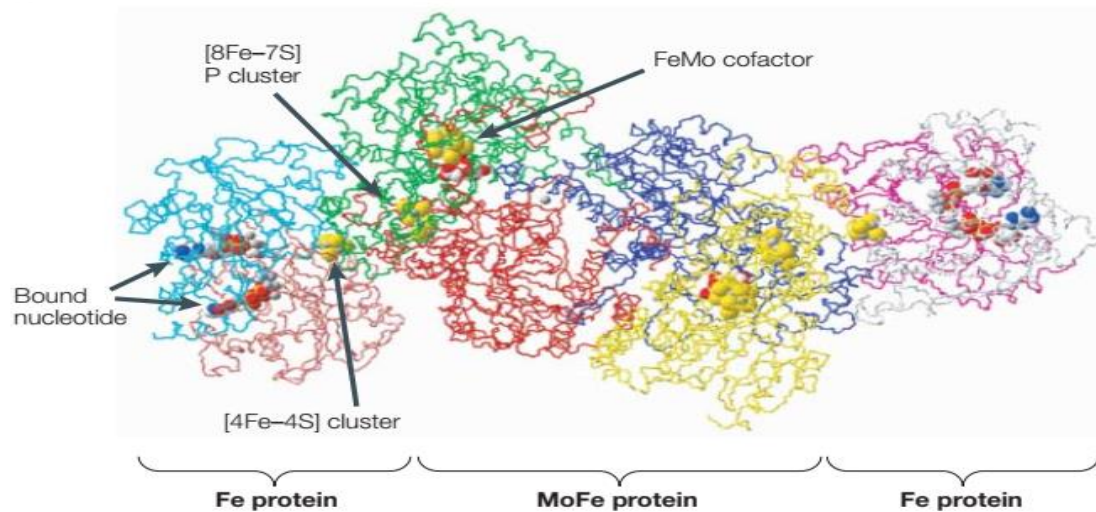


Figura 2 Complejo nitrogenasa, cada subunidad del tetrámero dinitrogenasa (proteínas verdes, rojo, azul y amarilla) recibe 2 electrones de la dinitrogenasa reductasa (proteínas cian, café, magenta y gris) para reducir nitrógeno (N_2) y dos protones ($2 H^+$) en el centro activo (FeMo cofactor) a dos moléculas de amonio ($2 NH_4^+$), en un proceso dependiente de 16 ATP. Tomado de Dixon y Kahn, 2004.

El nitrógeno se encuentra en todas las proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos y enzimas que constituyen a los seres vivos y a los virus (Nelson y Cox, 2011). El nitrógeno en forma de amonio (NH_4^+), nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-) o como parte de alguna de las biomoléculas antes mencionadas es incorporado en el metabolismo de los seres vivos. Las plantas y ciertos hongos son organismos autótrofos que toman el nitrógeno del suelo introduciéndolo en las cadenas tróficas. Las plantas superiores lo hacen ingresándolo por la raíz en forma de nitrato (NO_3^-) o bien de amonio (NH_4^+), ambos se utilizan para la síntesis de aminoácidos en las raíces (Bresinsky *et al.*, 2013) y son usadas en distintos procesos metabólicos. Por lo que una disponibilidad adecuada de este nutriente resulta en una alta asimilación en los tejidos vegetales, produciendo individuos con mayor salud, masa, vigor y volumen.

Alrededor del 60% del nitrógeno disponible en suelo para las plantas proviene de la fijación biológica de nitrógeno (Baca *et al.*, 2000). De este porcentaje la mayoría se encuentra en forma de nitrato, pues aunque el amoniaco puede ser utilizado por la mayoría de seres vivos, las bacterias nitrificantes son tan abundantes y activas que prácticamente todo el amoniaco que llega al suelo se convierte en nitrato (Bresinsky *et al.*, 2013; Nelson y Cox, 2011). La fijación biológica bacteriana de nitrógeno es

llevada a cabo por un complejo enzimático lábil al oxígeno que depende de dos enzimas, la dinitrogenasa tetramérica (M_r 240,000) que contiene 2 Mo, 32 Fe y 30 S, y la dinitrogenasa reductasa (M_r 60,000) dímero formado por dos subunidades con un centro activo de Fe_4-S_4 y dos sitios de unión a ATP ([Figura 2](#)) (Bresinsky *et al.*, 2013; Olivares, 2015).

La fijación biológica del nitrógeno se lleva a cabo por una forma altamente reducida de la dinitrogenasa y precisa ocho electrones: seis para la reducción del N_2 (con triple enlace) y dos para formar una molécula de H_2 . La dinitrogenasa se reduce por transferencia de electrones procedentes de la dinitrogenasa reductasa, el tetrámero de la dinitrogenasa tiene dos sitios de unión para la dinitrogenasa reductasa. Los ocho electrones se transfieren a la dinitrogenasa de uno en uno. La forma reducida transfiere electrones y la forma oxidada se disocia para dar paso a un ciclo, cada ciclo necesita de dos moléculas de ATP por la reductasa dimérica, su fuente de electrones proviene de ferredoxina, flavodoxina y quizás otras fuentes, el aceptor final de electrones es el piruvato (Dixon y Kahn, 2004; Nelson y Cox, 2011).

Otros mecanismos promotores de crecimiento vegetal

Producción de amonio

El amoniaco (NH_3) es un compuesto químico conformado por nitrógeno e hidrogeno que en condiciones estándar de temperatura y presión existe como un gas (Smirnov, 2015), aunque puede disolverse rápidamente en agua y dar lugar a la formación del ion amonio (NH_4^+) coexistiendo con su forma gaseosa (NH_3) (Lagowski, 2007). Esta molécula llega al suelo por distintos procesos bióticos como la deposición de materia fecal en el suelo (mineralización), la descomposición y oxidación de proteínas animales y vegetales (mineralización y oxidación bacteriana), la hidrolisis de urea, fijación de nitrógeno atmosférico (fijación biológica) y la reducción de nitritos por bacterias (desnitrificación) (Bashkin, 2006). También se dan procesos abióticos: como la reducción de nitrito (NO_2^-) por hierro ferroso en suelo, la hidrolisis de cianuro de hidrógeno (HCN) presente en la atmosfera y la solubilización del amoniaco atmosférico por la lluvia (Arbestain *et al.*, 2008).

La liberación biológica de amoniaco puede producirse tras la lisis celular de cualquier organismo e incorporarse al suelo y también como producto de desecho metabólico bacteriano. En el suelo el amonio se encuentra en concentraciones muy bajas ya que es rápidamente oxidado a nitrato (NO_3) por bacterias/arqueas oxidantes de amonio (Ouyang *et al.*, 2017).

Producción de sideróforos

El hierro es un elemento esencial para un amplio rango de funciones celulares, su capacidad para aceptar y donar electrones de forma inmediata lo han hecho un componente indispensable como sitio activo en un amplio número de enzimas (Habashi y City, 2013). Entre sus funciones más relevantes destacan ser el cofactor de grupo hemo en hemoglobinas y mioglobinas de vertebrados, formar parte de las ferritinas y ser el cofactor en el centro activo de mono- y dioxigenasas (Bertini y Rosato, 2010; Habashi y City, 2013), enzimas que añaden grupos hidroxilo en distintas rutas metabólicas incluidas las de asimilación de carbohidratos y lípidos.

La obtención de hierro por parte de las plantas permite su entrada a la biosfera en donde es necesario para las funciones ya descritas. En las plantas el hierro es necesario para la asimilación de carbono, azufre y nitrógeno, funciones llevadas a cabo en los plastidios, organelos que requieren numerosas proteínas con cúmulos de hierro (Barton y Abadía, 2006). Desafortunadamente a condiciones de pH fisiológico el hierro tiende a precipitar y generar formas insolubles (Andrews, 2006) y en el suelo el hierro no se encuentra en su forma asimilable para las plantas (ion férrico, Fe^{3+}) en grandes cantidades, pues tiende a interactuar con los ácidos húmicos en la materia orgánica y formar complejos con el hierro en estado ferroso (Amils *et al.*, 2015).

Es por ello que las plantas han desarrollado mecanismos de transporte y almacenamiento para la regulación de la concentración de este elemento (Barton y Abadía, 2006). La toma de este elemento representa un serio desafío para los organismos que cohabitan en el suelo (incluidas las plantas) y debido a que se encuentra en forma no disponible en la rizosfera (forma precipitados por arriba de pH 4) los microorganismos poseen mecanismos para poder asimilar el hierro férrico

(Fe³⁺), captándolo del medio a pesar de que existan altas concentraciones de su forma reducida (ion ferroso, Fe²⁺) u otros iones (Kraemer, 2011).

Estos mecanismos de toma de hierro reducido implican la exudación de sideróforos, que están diseñados para unirse al hierro en estado férrico (Fe³⁺) en un espacio extracelular con suficiente afinidad y especificidad para asegurar la formación de complejos con hierro férrico. Otros mecanismos para tomar hierro del suelo dependen de la acidificación del medio y secreción de ligandos con menos afinidad al hierro, los cuales también podrían tomar otros iones (Kraemer, 2011).

Los sideróforos no tienen una estructura química concreta, por ello se les ha definido como moléculas de bajo peso molecular capaces de unirse con una alta afinidad al hierro (Lankford y Byers, 1973), los rangos de peso molecular van de 600 a 1500 daltons y son secretados por transporte activo (Clark, 2004). Actualmente se sabe que hay más de 500 sideróforos de los cuales hasta 2010 se habían caracterizado 278 a nivel estructural (Hider y Kong, 2010), la mayoría tiene afinidad por los dos iones de hierro, aunque pueden quelar otros metales, pero los receptores de membrana solo aceptarán el complejo con hierro férrico. Se clasifican por el tipo de grupo químico funcional que se acompleja con el hierro, la mayoría de autores los clasifican en cinco grupos: hidroxamatos, catecolatos, carboxilatos, hidroxicarboxilatos y sideróforos con grupos mixtos (Clark, 2004; Kraemer, 2011); siendo los catecolatos los que mayor afinidad presentan al hierro (Hofte, 1993).

Solubilización de fosfatos

El fósforo es un elemento presente en todas las células vivientes, principalmente en forma de ortofosfato (PO₄³⁻), ion que puede ser transportado en solución por la célula para cumplir funciones vitales del organismo, entre ellas: formar parte de ésteres de fosfato, azúcares o alcoholes, fosfolípidos, nucleótidos de fosfopiridina (NAD y NADH), ácidos nucleicos y fosfatos de inositol. Estas funciones son llevadas a cabo únicamente por el fósforo gracias a la resistencia de su ion a la polarización y ataque nucleofílico (Blake *et al.*, 2008; Nelson y Cox, 2011). En las plantas constituye uno de los tres grandes macronutrientes necesarios su óptimo desarrollo, representando el 0.1 – 0.4% del peso seco de una planta.

Para las plantas y otros organismos autótrofos el fósforo juega un rol aún más importante ya que estos organismos no pueden obtener el fósforo de ninguna otra forma, dependen de solubilizar o encontrar la manera de solubilizar el fósforo inorgánico del suelo (en forma de minerales como la apatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH},\text{F})$) o de variscita ($(\text{Al},\text{Fe})\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y de ácidos inorgánicos como: ácido peroxifosfórico (H_3PO_5), anión fosfato de hidrógeno (HPO_4)⁻² o fosfato de dihidrógeno (H_2PO_4)⁻¹) (Blake *et al.*, 2008; Filippelli, 2009); de lo contrario no podrán continuar con su desarrollo (Montes, 2016). Es por ello que las plantas han generado distintos mecanismos mediante los cuales obtener el fósforo inorgánico del suelo, dos de ellos y los más importantes son la liberación de ácidos orgánicos, generalmente ácido glucónico y ácido 2-cetoglucónico (Rodríguez y Fraga, 2013), al suelo que generan la solubilización química del fósforo mediante solubilización por descenso de pH y la liberación de enzimas (fosfatasas) que catalizan la hidrólisis de P orgánico (Richardson y Simpson, 2011).

Sin embargo, la mayoría de las plantas no han logrado desarrollar estas estrategias de obtención de macronutrientes, por lo que han recurrido a diferentes mecanismos de estimulación, simbiosis o abastecimiento de bacterias presentes en su rizosfera que solubilicen el fósforo y logren transportar este elemento en forma de distintas moléculas a las vellosidades presentes en la raíz secundarias de las plantas, vellosidades encargadas de la toma de nutrientes (Azcón-Bieto y Talón, 2013; Rodríguez, Fraga, González, y Bashan, 2006). Entre los microorganismos que han sido descritos con esta capacidad solubilizadora de fosfato se encuentran bacterias de los géneros: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium* y *Erwinia* y que han sido agrupadas como bacterias PGPB solubilizadoras de fosfato (Rodríguez y Fraga, 2013; Rodríguez *et al.*, 2006).

El grupo *Burkholderia sensu lato*

El género *Burkholderia* fue acuñado por Yabuuchi *et al.*, 1992 cuando separó al género *Pseudomonas* en siete nuevos géneros (*Acidovorax*, *Aminobacter*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Deleya*, *Hydrogenophaga* y *Methylobacterium*) a partir del análisis de fragmentos codificantes de rRNA 16S y de los ácidos grasos en las

membranas lipídicas de las bacterias. Originalmente el género contenía a siete especies: dos patógenos de animales (*B. pseudomallei* y *B. mallei*), cuatro de plantas (*B. caryophylli*, *B. solanacearum*, *B. gladioli* y *B. cepacia*) y un patógeno oportunista humanos (*Burkholderia pickettii*) (Eberl y Vandamme, 2016); lo que llevó al género a tener una reputación de patogénico.

En años recientes la cantidad de especies en el género ha aumentado hasta 122 (LPSN, 2019) reclasificando las especies patógenas a otros géneros, demostrando en diversos estudios que la gran mayoría de ellas tiene un importante potencial biotecnológico como productoras de enzimas hidrolíticas, sustancias bioactivas, promotoras de crecimiento vegetal, degradadoras de compuestos xenobióticos y agentes de biocontrol. Todo ello gracias a los trabajos del profesor Jesús Caballero-Mellado quien dio luz a la separación de las especies no-patógenas de aquellas con capacidad para fijar nitrógeno (Paganin *et al.*, 2011).

A partir de estos trabajos pioneros se han descrito un número considerable de cepas del género capaces de fungir como PGPB, biofertilizantes y fitoestimuladores.

Características del género

Las bacterias del género *Burkholderia* se caracterizan por ser células individuales o pareadas y poseer forma bacilar recta o curvada. Miden de 0.5 - 1 x 1.5 - 4 µm, tienen uno o más flagelos polares, son gramnegativas, catalasa positivas, tienen metabolismo aerobio, su %G+C va de 59 a 69.6, tienen su genoma repartido en tres replicones con un tamaño total promedio de 7Mb y habitan distintos ambientes (Garrity *et al.*, 2005). Taxonómicamente pertenecen al dominio Bacteria, filo Proteobacteria, y Clase Betaproteobacteria.

Las diferencias entre las funciones ecológicas del género, mencionadas anteriormente, llevaron a realizar distintos intentos para establecer su separación taxonómica; primero se separaron en los clados I y II. El clado I contenía el llamado complejo BCC (*B. cenocepacia*) con las especies “patógenas”, el clado II contenía al grupo PBE (ambiental y benéfico asociado a plantas)(Suárez-Moreno *et al.*, 2012). Más tarde se sugirió con base en un multilocus de varios genes un grupo A y B, donde A contenía las especies que se asocian a plantas y saprófitas y B a las

especies patógenas (Estrada-De Los Santos *et al.*, 2013), incluso que estos dos grupos podrían ser géneros distintos. Tras ello se analizó el genoma entero de 92 cepas y se nombró al grupo B como *Burkholderia sensu stricto* (incluyendo a las verdaderas *Burkholderia*) y al grupo A como *Burkholderia sensu lato* (Beukes *et al.*, 2018), renombrándoles con géneros bacterianos como *Caballeronia* y *Paraburkholderia*. Recientemente los análisis filogenéticos realizados en 2018 por Estrada-de los Santos y cols. con secuencias de nucleótidos y aminoácidos han revelado la distinción de dos grupos más de *Burkholderia*, proponiendo a *Mycetohabitans* y *Trinickia* como dos nuevos géneros dentro del grupo.

El presente trabajo se enfoca en la evaluación de un cepario del grupo *Burkholderia*, obtenido en diferentes regiones del estado de Puebla, con el fin de identificar cepas que tengan un alto potencial biotecnológico para ser usadas como PGPB.

ANTECEDENTES

Burkholderia como biofertilizante

Un biofertilizante está definido como aquella sustancia que contiene organismos vivos la cual, al aplicarse a semillas, superficies vegetales o suelo, coloniza la rizosfera o el exterior de la planta y promueve su crecimiento por diferentes vías (Vessey, 2003).

La actividad de *Burkholderia* como un biofertilizante ha sido probada en co-inóculo con *Gluconacetobacter diazotrophicus* y *Azospirillum amazonense* en cañas micropropagadas (Oliveira *et al.*, 2002), observándose aumento en peso seco de las raíces. En otro experimento de inoculación de una legumbre comestible de Centroamérica con *Burkholderia* sp. MSSP en co-inóculo con *Sinorhizobium meliloti* PP3, *Rhizobium leguminosarum* Pcc y *Bacillus* sp. B1 se obtuvo un aumento de la biomasa, de los nódulos, el peso y biomasa de vainas de *Cajanus cajan* (Pandey y Maheshwari, 2007).

Recientemente se ha desarrollado una nueva forma para inmovilizar consorcios bacterianos de *Pantoea agglomerans* y *Burkholderia caribensis* usando nano fibras

que inmovilizan a las bacterias al inocularse en semillas, mejorando notablemente el número de hojas y peso seco de las plántulas (De Gregorio *et al.*, 2017).

Burkholderia como PGPB

Los primeros reportes de inoculación con *Burkholderia* señalaban que las cepas capaces de fijar nitrógeno eran simbioses endófitas asociadas a plantas como la caña (Azevedo *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2002). Conforme las investigaciones avanzaron se descubrió que algunas cepas de *Burkholderia* podían formar nódulos (simbiosis) con legumbres (Chen *et al.*, 2005) y otras se asociaban a plantas no-leguminosas (Estrada-De Los Santos *et al.*, 2001; Perin *et al.*, 2006).

Respecto a la fijación de nitrógeno se sabe que el género *Burkholderia* proviene de un ancestro que fijaba nitrógeno (Bontemps *et al.*, 2010). Esta característica se ha mantenido en algunos individuos y se ha perdido en otros (Suárez-Moreno *et al.*, 2012).

Se han descrito varias cepas con esta capacidad por ejemplo en Caballero-Mellado y cols (2007) se resalta la capacidad diazotrófica de 25 aislados de *Burkholderia* provenientes de rizoplasma de tomate, que además presentaron otras características de PGPB como solubilización de fosfatos, producción de sideróforos, actividad desaminasa y degradación de compuestos aromáticos.

Por su parte Khambalkar y Sridar, en 2015 también reportaron que cuatro de 22 cepas de *Burkholderia* aisladas en 10 diferentes cultivos, mostraron la capacidad para fijar nitrógeno sin encontrarse como consorcios bacterianos, (Wang *et al.*, 2015). Incluso destacan que estos simbioses podían incrementar la tasa de fotosíntesis y la biomasa de la planta huésped.

Otras características promotoras del crecimiento vegetal del género son la liberación de amonio dentro del género *Burkholderia* esta característica está relacionada con la actividad de la enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) desaminasa (codificada por el gen *acdS*) (Onofre-Lemus *et al.*, 2009), la cual cataliza la degradación del ACC en amonio y α -cetobutarato. Esta investigación ha demostrado que esta enzima es muy común en el género, convirtiéndose en una característica casi generalizada de *Burkholderia*. Aunque la principal función de la

enzima como promotora de crecimiento es la disminución de etileno en raíz, recientemente se ha descrito que está relacionada con la resistencia a sequía y tolerancia a altas concentraciones de sales (Maxton *et al.*, 2018). Por su parte Rahman y cols, (2017) encontraron que alrededor del 75% (31 de 41 cepas) de los aislados de *Burkholderia* de rizosfera de trigo tenían la capacidad para liberar amonio. Singha y cols (2017) también reportaron que alrededor del 80% de sus aislados del género son positivos a la liberación de amonio.

El género *Burkholderia* es capaz de producir sideróforos del tipo hidroxamatos en concentraciones de 0.23 a 8.31 μM (Caballero-Mellado, *et al.*, 2007). Los autores sugieren que la producción de estos sideróforos puede jugar un papel de biocontrol al monopolizar el hierro disponible del suelo. Lugtenberg y Kamilova (2009) también comprobaron la producción de sideróforos por parte de *B. phytofirmans*, *B. unamae*, *B. kururiensis*, *B. xenovorans*, *B. tropica*, y *B. silvatlantica*, aunque no los caracterizaron químicamente.

El género *Burkholderia* produce ácido fórmico, ácido cítrico y ácido glucónico que se libera al medio con el fin de solubilizar fosfato (Pande *et al.*, 2017). Estos ácidos separan, por cargas débiles, al fosfato de sus uniones con Calcio, Aluminio o Hierro, permitiendo su incorporación a la célula. Se ha probado que la liberación de ácido cítrico también ayuda a quelar hierro (función de sideróforo) (Thomas, 2007) y que el ácido glucónico está relacionado con la solubilización de hierro o aluminio en *Burkholderia metallica* F22 (Wang *et al.*, 2018).

Finalmente Suárez-Moreno y cols (2012) realizaron una recopilación en la que se enlistan 31 especies de *Burkholderia* que poseen diferentes mecanismos de PGPB, entre los que destacan la expresión de genes *nifH* y *acdS*, la capacidad para tolerar metales, degradar compuestos pesados e incluso biocontrol.

Cepario de *Burkholderia*

El origen del cepario a evaluar comenzó con el trabajo de tesis de (Antonio-Flores, 2015), quien estudió las características ecológicas del género *Burkholderia* y su distribución geográfica en el estado de Puebla, México; identificando con amplificación de genes 16S a 83 cepas *Burkholderia* provenientes de: cultivos

agrícolas (*Zea mays*, *Medicago sativa*), plantas silvestres (*Opuntia sp.*, *Agave sp.*, *Fabaceae spp.*, *Orchidaceae spp.*, *Bromelia sp.*, *Bryophyta sensu stricto.*, *Pinus sp.* y *Cedrus sp.*) y cuerpos de agua.

Este cepario fue ampliado por Vega-Aguilar en 2015 con 10 aislados identificados del género y provenientes de rizosfera de cultivos de interés agrícola. Finalmente Cervantes-Álvarez en 2016 determinó que 45 de 97 aislados acumulados en el cepario pertenecen a *Burkholderia sensu lato*.

En este trabajo de tesis se pretende evaluar el cepario de bacterias aisladas en el estado de Puebla en búsqueda de mecanismos PGPB con el fin de presentar cepas candidatas a ser usadas como biofertilizantes.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La población humana ha aumentado de manera exponencial en los últimos 50 años y con ello la necesidad de producir más alimentos, llevando a una sobreexplotación de los suelos agrícolas y a un uso desmedido de pesticidas y fertilizantes químicos (principalmente nitrogenados y fosforados). Si bien los fertilizantes químicos no representan un riesgo a la salud, sí necesitan de grandes cantidades de energía (Smith, 2002). Por otra parte, el uso desmedido de estos fertilizantes provoca cambios en las comunidades microbiológicas del suelo y eutrofización de cuerpos de agua por arrastre de nutrientes.

La aplicación de microorganismos como biofertilizantes que puedan hacer disponibles nutrientes para las plantas supone una alternativa eficaz y sustentable para desalentar el uso de fertilizantes químicos, e incluso reemplazarlos.

HIPOTESIS

El cepario de nuestro grupo de *Burkholderia sensu lato* contiene rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal, entre ellas algunas con la capacidad para fijar biológicamente el nitrógeno atmosférico.

OBJETIVOS

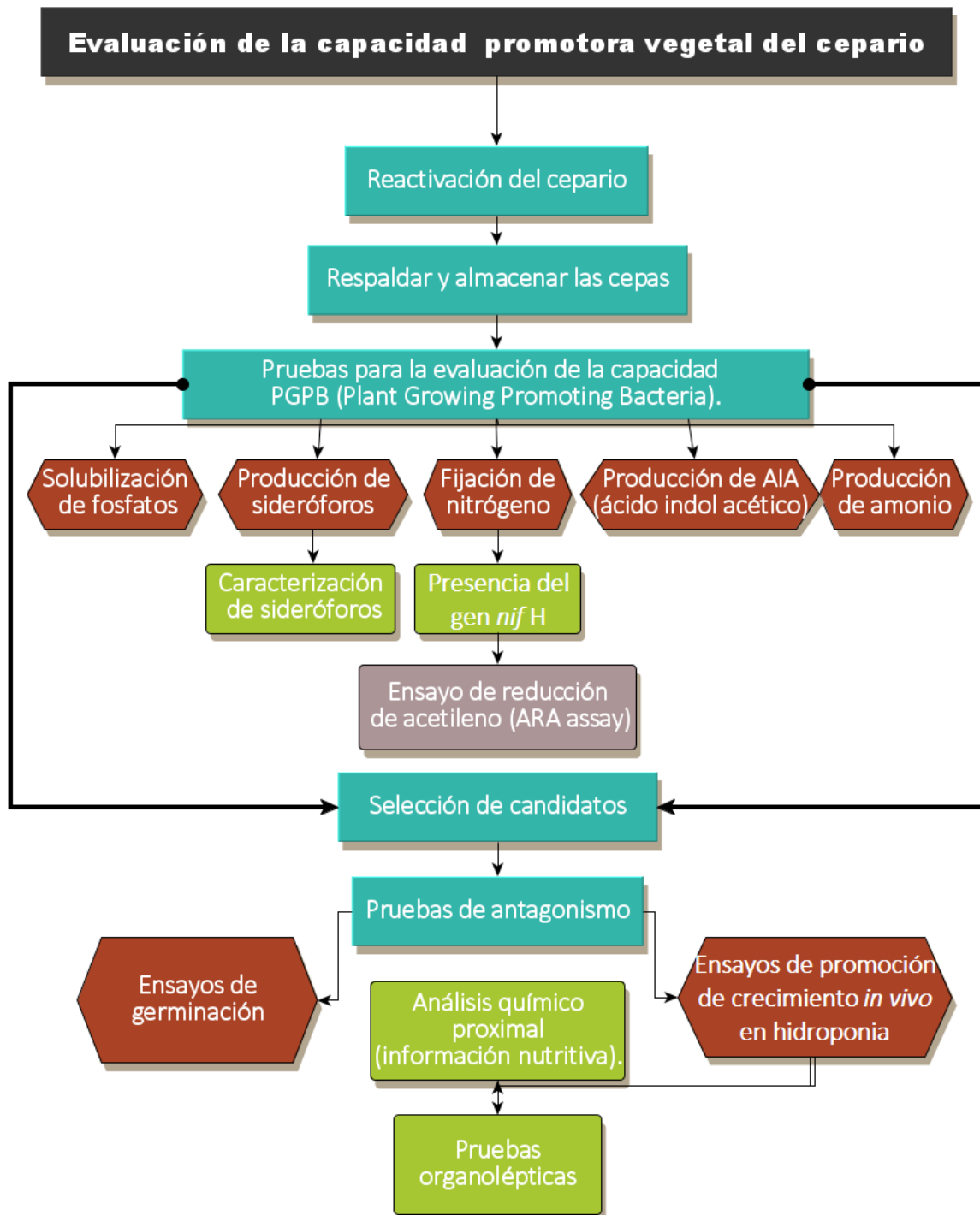
General

- Evaluar la capacidad promotora de crecimiento vegetal de un cepario de bacterias pertenecientes al grupo *Burkholderia sensu lato* asociado a rizósfera.

Particulares

- Examinar y comparar la capacidad fijadora de nitrógeno, solubilizadora de fosfatos, productora de sideróforos, amonio y ácido indolacético *in vitro*.
- Seleccionar a la cepa o cepas bacterianas candidatas con potencial para uso como biofertilizante y probar sus efectos benéficos *in vitro* e *in vivo* con ensayos de germinación y desarrollo desde emergencia hasta la cosecha de lechuga (*Lactuca sativa* var. Parris island) en cultivo hidropónico.
- Determinar la calidad nutricional y organoléptica de la plantas inoculadas.

DIAGRAMA DE TRABAJO



METODOLOGÍA

La composición detallada de los medios de cultivo, y soluciones se encuentra en los [anexos I](#) a [VIII](#).

Reactivación del cepario

Se reactivó el cepario con 45 cepas identificadas por Cervantes-Álvarez (2016) ([Tabla 1](#)). El cepario se encontraba a -80°C, por lo que cada cepa se reactivó en 3 mL de caldo LB modificado con ácido succínico a 28 °C por 24 h bajo agitación. Algunas cepas como GB62, GB130, GB137 y GB203 fueron reactivadas en caldo NBY pues no crecieron en el medio LB directamente desde la reactivación. Tras la reactivación en NBY pudieron ser cultivadas en LB modificado.

Tabla 1 Lista de las cepas que conforman el cepario evaluado y sus características de aislamiento.

Información de las cepas						
N°	Cepa	Zona geográfica	Origen	Clima	pH del suelo	Parentesco
1	GA01	La Paz Tlaxcolpan	Rizosfera de maíz (<i>Zea mays</i>)	Seco/semiseco	5.2	<i>Burkholderia contaminans</i>
2	GA2 β	La Paz Tlaxcolpan	Rizosfera de leguminosa (<i>Fabaceae</i>)	Seco/semiseco	7.3	<i>Burkholderia gladioli</i>
3	GA04	La Paz Tlaxcolpan	Rizosfera de maíz (<i>Zea mays</i>)	Seco/semiseco	5.2	<i>Burkholderia gladioli</i>
4	GA06	La Paz Tlaxcolpan	Rizosfera de maíz (<i>Zea mays</i>)	Seco/semiseco	5.2	<i>Burkholderia gladioli</i>
5	GA10	La Paz Tlaxcolpan	Rizosfera de maíz (<i>Zea mays</i>)	Seco/semiseco	5.2	<i>Burkholderia contaminans</i>
6	GA29	La Paz Tlaxcolpan	Rizosfera de maíz (<i>Zea mays</i>)	Seco/semiseco	5.2	<i>Burkholderia contaminans</i>
7	GB23	Chignahuapan	Rizosfera de helecho (<i>Filicopsida</i>)	Templado subhúmedo	4.81	<i>Paraburkholderia phytofirmans</i>
8	GB25	Chignahuapan	Rizosfera de pino (<i>Pinus</i> sp.)	Templado subhúmedo	5.21	<i>Caballeronia cordobensis</i>
9	GB33	Chignahuapan	Suelo de laguna/maíz (<i>Zea mays</i>)	Templado subhúmedo	6.05	<i>Paraburkholderia ginsengisoli</i>

10	GB34	Chignahuapan	Suelo de laguna/maíz (<i>Zea mays</i>)	Templado subhúmedo	6.05	<i>Paraburkholderia ginsengisoli</i>
11	GB42	Chignahuapan	Rizosfera de helecho (<i>Filicopsida</i>)	Templado subhúmedo	5.51	<i>Paraburkholderia dipogonis</i>
12	GB45	Chignahuapan	Rizosfera de helecho (<i>Filicopsida</i>)	Templado subhúmedo	5.51	<i>Paraburkholderia sedimnicola</i>
13	GB51	Chignahuapan	Rizosfera de helecho (<i>Filicopsida</i>)	Templado subhúmedo	5.51	<i>Paraburkholderia phytofirmans</i>
14	GB53	Chignahuapan	Rizosfera de helecho (<i>Filicopsida</i>)	Templado subhúmedo	5.51	<i>Paraburkholderia sedimnicola</i>
15	GB62	Chignahuapan	Rizosfera de helecho (<i>Filicopsida</i>)	Templado subhúmedo	5.51	<i>Paraburkholderia sedimnicola</i>
16	GB70	Chignahuapan	Rizosfera de pino (<i>Pinus sp.</i>)	Templado subhúmedo	5.18	<i>Paraburkholderia phytofirmans</i>
17	GB81	Chignahuapan	Rizosfera de pino (<i>Pinus sp.</i>)	Templado subhúmedo	5.18	<i>Paraburkholderia aromaticivorans</i>
18	GB87	Chignahuapan	Rizosfera de pino (<i>Pinus sp.</i>)	Templado subhúmedo	5.18	<i>Paraburkholderia caffeinilytica</i>
19	GB90	Chignahuapan	Rizosfera de pino (<i>Pinus sp.</i>)	Templado subhúmedo	5.18	<i>Burkholderia stabilis</i>
20	GB91	Chignahuapan	Rizosfera de pino (<i>Pinus sp.</i>)	Templado subhúmedo	5.18	<i>Paraburkholderia terrae</i>
21	GB93	Chignahuapan	Rizosfera de pino (<i>Pinus sp.</i>)	Templado subhúmedo	5.18	<i>Paraburkholderia ribeironis</i>
22	GB94	Chignahuapan	Rizosfera de pino (<i>Pinus sp.</i>)	Templado subhúmedo	5.18	<i>Burkholderia catarinensis</i>
23	GB99	Chignahuapan	Rizosfera de Maguey (<i>Agave sp.</i>)	Templado subhúmedo	5.88	<i>Paraburkholderia aromaticivorans</i>
24	GB100	Chignahuapan	Rizosfera de Maguey (<i>Agave sp.</i>)	Templado subhúmedo	5.88	<i>Paraburkholderia terrae</i>

25	GB127	Chignahuapan	Rizosfera de Orquídea (<i>Orchidaceae</i>)	Templado subhúmedo	5.77	<i>Caballeronia glathei</i>
26	GB130	Chignahuapan	Rizosfera de Orquídea (<i>Orchidaceae</i>)	Templado subhúmedo	5.77	<i>Caballeronia glathei</i>
27	GB137	Chignahuapan	Rizosfera de Bromelia (<i>Bromelia</i> sp.)	Templado subhúmedo	5.77	<i>Caballeronia terrestris</i>
28	GB148	Chignahuapan	Rizosfera de Bromelia (<i>Bromelia</i> sp.)	Templado subhúmedo	5.77	<i>Paraburkholderia ribeironis</i>
29	GB148A	Chignahuapan	Rizosfera de Bromelia (<i>Bromelia</i> sp.)	Templado subhúmedo	5.77	<i>Paraburkholderia ribeironis</i>
30	GB152	Chignahuapan	Rizosfera de Bromelia (<i>Bromelia</i> sp.)	Templado subhúmedo	5.77	<i>Paraburkholderia sedimnicola</i>
31	GB169	Chignahuapan	Rizosfera de Pino (<i>Pinus</i> sp.)	Templado subhúmedo	5.21	<i>Paraburkholderia ginsengisoli</i>
32	GB183	Chignahuapan	Rizosfera de Pino (<i>Pinus</i> sp.)	Templado subhúmedo	5.21	<i>Paraburkholderia ginsengisoli</i>
33	GB190	Chignahuapan	Rizosfera de Pino (<i>Pinus</i> sp.)	Templado subhúmedo	5.21	<i>Paraburkholderia sedimnicola</i>
34	GB196	Chignahuapan	Rizosfera de Pino (<i>Pinus</i> sp.)	Templado subhúmedo	5.21	<i>Caballeronia jiangsuensis</i>
35	GB197	Chignahuapan	Rizosfera de Pino (<i>Pinus</i> sp.)	Templado subhúmedo	5.21	<i>Paraburkholderia ginsengisoli</i>
36	GB203	Chignahuapan	Rizosfera de Pino (<i>Pinus</i> sp.)	Templado subhúmedo	5.21	<i>Paraburkholderia sedimnicola</i>
37	D328	Cuetzalan	Rizosfera de Blueberry (<i>Vaccinium corymbosum</i>)	Cálido húmedo	6.25	<i>Paraburkholderia terrae</i>
38	D335	Cuetzalan	Rizosfera de Chile canario (<i>Capsicum pubescens</i>)	Cálido húmedo	5.54	<i>Burkholderia metallica</i>
39	D336	Cuetzalan	Rizosfera de Chile canario (<i>Capsicum pubescens</i>)	Cálido húmedo	5.54	<i>Burkholderia metallica</i>

40	D409	Cuetzalan	Rizosfera de Café (<i>Coffea</i> sp.)	Cálido húmedo	4.7	<i>Paraburkholderia susongensis</i>
41	D411	Cuetzalan	Rizosfera de Café (<i>Coffea</i> sp.)	Cálido húmedo	4,7	<i>Burkholderia arboris</i>
42	D416	Cuetzalan	Rizosfera de ajo (<i>Allium sativum</i>)	Cálido húmedo	5.2	<i>Burkholderia contaminans</i>
43	D422	Cuetzalan	Rizosfera de Orquídea (<i>Orchidaceae</i>)	Cálido húmedo	4.97	<i>Paraburkholderia hospita</i>
44	D424	Cuetzalan	Rizosfera de Orquídea (<i>Orchidaceae</i>)	Cálido húmedo	4.97	<i>Paraburkholderia dipogonis</i>
45	D425	Cuetzalan	Rizosfera de Alcatraz (<i>Zantedeschia</i> sp.)	Cálido húmedo	4.91	<i>Paraburkholderia hospita</i>

Generación de ceparios de trabajo

Para realizar las diferentes evaluaciones a las cepas se generaron ceparios de trabajo y de almacén en microtubos 1mL con medio LB modificado.

Para la realización de este cepario se tomó cada colonia bacteriana crecida en placas Petri, se inocularon por duplicado tubos de ensaye de 10 mL con 3 mL de caldo LB y se colocaron en agitación por 24-48 h, hasta alcanzar el mayor grado de turbidez. Posteriormente se tomó 1 mL de caldo LB de los cultivos crecidos y se centrifugaron a 10,000 rpm, este paso fue realizado dos veces. Se decantó el sobrenadante y el pellet bacteriano fue re-suspendido en 1 mL de caldo LB adicionado con 30% glicerol, para cada cepa se preparó un duplicado, los microtubos fueron almacenados a -80 °C.

Solubilización de fosfatos

Para evaluar la capacidad solubilizadora de fosfatos del cepario se usó el agar NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate Growth Medium) que es una modificación realizada por Nautiyal, (1999) al medio Pikovskaya (PKV).

Este medio contiene difosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) como única fuente de fósforo. Las bacterias que se inoculan en el medio cuentan con la capacidad para solubilizar

fosfato y liberar ácidos orgánicos, oxo ácidos, enzimas hidrolasas u otros metabolitos secundarios como iones de hierro o quelantes con actividad redox (Estrada *et al.*, 2013; Restrepo-Franco *et al.*, 2015) que finalmente generaran una disminución en el pH del medio debido a la liberación de protones (H⁺) y la actividad redox de los metabolitos. Esta disminución en el pH puede visualizarse por el cambio de coloración de azul a amarillo en el medio, debido a que contiene el indicador de pH azul de bromotimol que genera un halo de transparencia.

Se usó el índice de solubilización de fosfatos descrito por Nwanyanrou, Umeh, y Sapele, (1996) como medida cuantitativa de la capacidad de secreción y solubilización de fosfatos por parte de las cepas.. El índice de solubilización tiene por formula: $IS = DT(DC+DH)/DC$. De la cual se usarán las siguientes abreviaturas: diámetro total (DT), diámetro de la colonia (DC), diámetro del halo de solubilización (DH) e índice de solubilización (IS).

Producción de sideróforos

Para detectar a las cepas productoras de sideróforos se usó la prueba CAS (Schwyn y Neillands, 1987), como la describe Caballero-Mellado y cols, (2007) y sin agregar PIPES. El medio contiene un complejo de hierro férrico con cromo azurol S (sonda CAS) y HDTMA (Bromuro de hexadeciltrimetilamoniac). Este complejo muestra coloración azul que cambia a amarillo cuando está presente algún ligando que secuestre el hierro debido a la reducción del cromazurol S por la formación de un complejo binario con el HDTMA. Esta prueba evalúa la liberación de sideróforos al medio, virándolo a amarillo por la presencia de tipos específicos de sideróforos como: hidroxamatos, catecoles o carboxilatos.

Caracterización de los sideróforos con grupos catecol.

Se caracterizaron los sideróforos con grupos catecoles por ser los que mayor afinidad tienen al hierro. Para ello se utilizó la prueba de Arnow (Arnow, 1937), la cual se utiliza cuando ya se ha detectado la producción de sideróforos en las bacterias a evaluar, pues solo determina la producción de catecoles, no de ligandos que secuestren al hierro.

La prueba es un ensayo colorimétrico que usa un ácido nitroso, el cual al reaccionar con el anillo catecol genera un complejo de color amarillo a naranja. También debe realizarse con las bacterias crecidas en un medio mínimo para permitir la liberación de sideróforos y tener un color transparente en los cultivos.

Producción de amonio

Para evaluar la producción de amonio se realizó el ensayo Nessler modificado por (Cappuccino. y Sherman, 2014) utilizando una solución de 0.09 M de tetrayoduromercuriato (II) de potasio ($K_2 [HgI_4]$) en 2.5 M de hidróxido de potasio (KOH), reactivo que en presencia de amoniaco o ion amonio se torna de color amarillo-naranja. Esta prueba mide rangos de concentración de amonio, importante destacar que para esta prueba los cultivos deben encontrarse en medios nutritivos o que no contengan sales de amonio (como la mayoría de los medios mínimos).

Producción de AIA

La detección indirecta de ácido indolacético producido por las bacterias se realizó con un ensayo colorimétrico usando el reactivo Salkowski (Gordon y Weber, 1951) con las modificaciones realizadas por Husen, (2003) quien describe como cuantificar por espectrofotometría el AIA producido. Se adaptaron los medios nutritivos y mínimos usados por Husen, (2003) a los medios usados para *Burkholderia* en este trabajo.

Detección del gen *nifH*

Para detectar la presencia del complejo nitrogenasa se realizó la amplificación del gen *nifH* por PCR con las condiciones y oligonucleótidos descritos por Poly y cols. (2001). El producto de esta amplificación debe generar un fragmento de alrededor de 360 bp.

Las cepas de *Burkholderia caryophylli* LMG 2155 y *Burkholderia trópica* MTO293 que contenían el gen *nifH* (basado en la búsqueda de secuencias del gen en NCBI) fueron reactivadas y usadas como control para estandarizar el programa de PCR, estableciendo que usado DNA de *Burkholderia trópica* MTO293 las bandas del fragmento esperado eran las más definidas.

Preparación del templado para la PCR

Para la realización de las PCR, se prepararon cultivos de cada una de las cepas a evaluar, los cultivos fueron lavados como se describe a continuación.

1. Las cepas, incluidos los controles positivos, fueron cultivadas en tubos de ensaye de 10 mL con 3 mL de caldo LB modificado y puestos en agitación a 28°C por 24 – 48 h hasta que todos tuvieran la misma turbidez.
2. Se pasó 1 mL de cada cultivo a un microtubo y se centrifugaron a 10 000 rpm. El pellet bacteriano fue re-suspendido con 1 mL de MgSO₄•7H₂O 1 M por dos veces.
3. Después de la segunda centrifugación, el pellet fue re-suspendido en 1 mL de agua PiSA estéril.
4. Esta suspensión celular se diluyó en una proporción 1:10 y se usó 1 µL por cada reacción de PCR.

Amplificación del gen *nifH* vía PCR

Una vez establecida la T_m ideal de los oligonucleótidos, y a *Burkholderia trópica* MTO293 como el control positivo, se usó la mezcla para la PCR descrita en la [tabla 2](#) ajustando a un volumen final de 10 µL por cada reacción.

Tabla 2 Reactivos presentes en la mezcla para la reacción de polimerasa en cadena

Reactivo	Concentración	Volumen
dNTP's	1.25 mM	1 µL
Taq Pol		.1 µL
Oligonucleótido Forward	100 pM	.5 µL
Oligonucleótido Reverse	100 pM	.5 µL
DNA		1 µL
Buffer		1 µL
H ₂ O		5.9 µL
Volumen final:		10 µL

En la mezcla de reacción se añadió la enzima Dream Taq Pol de Thermo Fisher (5 U/ μ L) usando su solución amortiguadora concentrada 10X, los oligonucleótidos Pol F (TGCGAYCCSAARGCBGACTC) y Pol R (ATSGCCATCATYTCRCCGGA) (Poly *et al.*, 2001) para la detección de un fragmento de 360 bp del gen *nifH*. En la amplificación para secuenciación cambio el par de primers PolF y PolR debido a la baja resolución de los fragmentos secuenciados, en cambio se usó el par: IGK-Poly (TAC GGY AAR GGB GGY ATC GG) y PolR (Poly *et al.*, 2001) que generan un fragmento de alrededor de 460 bp del gen *nifH*.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador BIORAD C1000 con un ciclo inicial de 3 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de 1 min 94 °C, 1 min a 55 °C y 2 min a 72°C; seguidos de un paso final de extensión a 72°C por 5 min.

Separación electroforética de los productos de la PCR

Los 10 μ L de cada reacción se mezclaron con 1 μ L de Gel Red™ y se colocaron en un gel de agarosa al 1% llevando a cabo la separación por electroforesis a 600 mA, 85 V por 23 min, en cada corrimiento electroforético se realizó considerando como control negativo 9 μ L de agua mezclado con 1 μ L de Gel Red como control positivo (*Burkholderia trópica* MTO293), al término de la electroforesis el gel fue visualizado en un transiluminador a 254 nm., como marcador de referencia de pares de bases se mezcló 1 μ L de Gene Ruler™ 1 kb Plus con 9 μ L de dH₂O y se colocó en cada gel.

Secuenciación del gen *nifH*

El producto de PCR de las cepas que resultaron portadoras del gen *nifH* fue re-amplificado con el par de primers IGK-Poly y PolR (Poly *et al.*, 2001) y purificado con Recovery Kit de Zymo para su posterior secuenciación por MacroGen (www.macrogen.com).

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con BLASTx v2.2.25 (Altschul *et al.*, 1990; Gish & States, 1993) para corroborar que a nivel de aminoácidos correspondieran a nitrogenasas. Se realizó un alineamiento múltiple de nucleótidos con el algoritmo MAFFT v7 con secuencias de nitrogenasas obtenidas en NCBI de

géneros representativos bacterianos fijadores de nitrógeno y un cúmulo de secuencias de los géneros *Burkholderia* y *Paraburkholderia* (números de acceso en [anexo XI](#)), el alineamiento fue realizado con el software Jalview v2.11.1.2 (Waterhouse *et al.*, 2009).

A partir del alineamiento múltiple se generó un árbol filogenético por método de máxima probabilidad (Maximum likelihood Tree) con Bootstrap 100 mediante el software de MEGA X v10.2.0 (Kumar *et al.*, 2018), usando los contigs o consensos de la secuenciación y delimitando las secuencias alineadas al tamaño de los fragmentos obtenidos por secuenciación (~460 pb).

Ensayo de reducción de acetileno (ARA)

Las cepas en las que se detectó la presencia del gen *nifH* fueron sometidas al ensayo ARA (Acetylene reduction assay), la finalidad de esta prueba es medir de forma indirecta la actividad enzimática de la nitrogenasa y por tanto la cantidad de nitrógeno fijado por las bacterias. El método se basa en los hallazgos de Hardy y cols (1968) quienes demostraron la versatilidad que el complejo enzimático de la nitrogenasa tiene para reducir distintos sustratos además del nitrógeno (N₂), que es reducido a amonio (NH₃); entre ellos el acetileno (C₂H₂) que se ve reducido en etileno (C₂H₄).

Para realizar el ensayo se usó la metodología propuesta por (Burriss, 1972), con las modificaciones de temperatura, tiempo de incubación y fuente de carbono de acuerdo con De Los Santos-Villalobos y cols. (2015); Estrada-De Los Santos y cols. (2001).

Antagonismo

Se valoró el antagonismo entre las cepas con el mayor potencial para ser candidatas a biofertilizantes, con ello se buscó saber si pueden desarrollarse en co-cultivos que conjunten y complementen su capacidad promotora de crecimiento vegetal. El ensayo fue llevado a cabo usando agar doble capa (Muñoz-Rojas *et al.*, 2005), acoplándolo a caldo y agar LB.

Evaluación de promoción de crecimiento en fase de germinación

Las cepas con potencial biotecnológico fueron cultivadas individualmente y como co-inóculos ([figura 3](#)), cuando no existió antagonismo, para valorar sus efectos



Figura 3. Combinaciones de inóculos y co-inóculos a utilizar en el ensayo de germinación. Cada hexágono representa una combinación y cada combinación se evaluó 3 veces para asegurar reproducibilidad.

promotores de crecimiento vegetal en la germinación de semillas. Se usaron semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L. var parris island) por ser una especie hortícola bien adaptada al clima de la región, de rápida germinación (alrededor de 7 días), sensible a pequeños cambios ecotoxicológicos, de fácil manejo, bajo costo de mantenimiento y pocos requerimientos especiales. El protocolo usado para medir la promoción del crecimiento vegetal fue una conjunción de los métodos usados por distintos autores (Aponte *et al.*, 2017; Ikuma & Thimann, 1964; Peñaloza *et al.*, 2005).

Evaluación de la capacidad promotora vegetal en cultivo hidropónico.

Se evaluó la capacidad promotora vegetal de las cepas fijadoras de nitrógeno en cultivos hidropónicos de lechuga. Para la realización de este ensayo se usaron semillas del mismo lote que en el ensayo de promoción de crecimiento en fase germinativa.

1. 200 semillas de *Lactuca sativa* var. Parris Island fueron preenfriadas, esterilizadas y puestas a germinación con fotoperiodo de 8 h luz/16 h oscuridad.
2. Cuando la tercera hoja real se desarrolló se extrajeron con cuidado las plántulas del semillero y se lavaron cuidadosamente sus raíces en agua destilada.
3. Las raíces lavadas se inocularon con los cultivos bacterianos a evaluar a una concentración de 1×10^6 UFC/mL en 100 mL de caldo LB modificado. Para el co-inóculo se usaron 50 mL las dos cepas a 1×10^6 UFC/mL, se incluyó un control negativo que fue tratado en LB modificado estéril.
4. Las plantas fueron trasladadas a cuatro sistemas hidropónicos (un control y tres para los inóculos bacterianos), bajo la concentración de sales sugerida para lechuga por Resh, (2012), los sistemas fueron mantenidos a la intemperie con malla sombra 30%.
5. Cada semana se eligieron al azar tres plantas de cada grupo para hacer mediciones de longitud (total, de la planta y de las raíces), peso (húmedo y seco) y número de hojas.
6. La última medición se realizó a los 42 días, obedeciendo a los parámetros de producción que establecen como momento de cosecha la fase de desarrollo de cabeza (hojas más anchas que largas).

Las lechugas restantes se llevaron a refrigeración por tres días para pruebas posteriores.

Pruebas organolépticas

Se evaluó las características organolépticas de las plantas, se usaron lechugas orejonas (*Lactuca sativa* var parris island) crecidas previamente, después de la cosecha fueron transportadas al laboratorio (por 90 minutos aproximadamente), almacenadas dentro de bolsas estériles y puestas en refrigeración (4°C) por tres días, se incluyó una lechuga comercial como control.

Las lechugas fueron lavadas con agua e hipoclorito de sodio durante 5 min, removiendo las hojas externas dañadas y sucias. Las plantas de lechuga enteras

fueron colocadas en contenedores plásticos, y se dejaron escurriendo por 10 min a temperatura ambiente (~20 °C), se colocaron de 2-3 plantas por contenedor (Esparza *et al.*, 2013).

Las sesiones de evaluación sensorial fueron conducidas al día 1 de almacenamiento en refrigeración, se usó el método publicado por Espinosa Manfugás y cols, (1999) para pruebas escalares tipo hedónicas, el método asigna 7 puntos de valor a la prueba.

La evaluación sensorial se realizó con 53 panelistas consumidores no entrenados que eran estudiantes, profesores y staff del laboratorio de alimentos, Multilaboratorios 6 de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, a los cuales se les entregó la hoja de evaluación organoléptica ([anexo XV](#)). El día de la prueba sensorial los panelistas fueron acomodados en mesas de trabajo, donde se les proporcionaron vasos desechables (en los cuales se encontraba la muestra y unas pinzas), hojas de respuesta, agua y galletas saladas para neutralizar el sabor de cada muestra.

Los atributos sensoriales se calificaron con valores en una escala de 1 a 7, donde 1= “Me desagrada mucho”, 4= ni me agrada ni me desagrada, y 7= “Me gusta mucho”.

Análisis químico proximal

Se realizó la determinación de los componentes nutricionales principales en las lechugas: humedad, cenizas (minerales), lípidos, proteínas y carbohidratos.

Las pruebas se realizaron acorde a las normas oficiales mexicanas vigentes usando 95 °C para desecar la muestra en la termobalanza (estándar de la termobalanza usada), 5 h de lavado en el sistema Soxhlet con éter etílico y calcinación a 500 °C por 8 h en la mufla tras carbonización. Solo la determinación de proteínas no se realizó conforme a las normas oficiales, para ello se usó el método de Lowry modificado por Hartree, (1972).

Análisis estadístico

El análisis de resultados y la generación de gráficos se llevó a cabo con el software estadístico R v4.0.0 (R Core Team, 2019), mediante las librerías *car* (Fox y Weisberg, 2019), *reshape2* (Wickham, 2007) para el análisis de datos y *ggplot2* (Wickham, 2016) para la generación de gráficos.

Los datos recabados fueron comparados por grupo y experimento con las pruebas estadísticas: ANOVA, Welch's ANOVA y Kruskal Wallis dependiendo de la distribución y homocedasticidad de cada conjunto de datos, siempre con $p < 0.05$. El reporte de resultados en tablas sigue la estructura de promedio \pm desviación estándar, cada experimento se llevó a cabo por triplicado a menos que se indique lo contrario.

RESULTADOS

Solubilización de fosfatos

Prueba preliminar

Se realizó un primer cribado analizando todas las cepas disponibles junto con tres cepas tipo usadas como controles: cepa 4, *Burkholderia cepacia* ATCC 25416; cepa 18, *Burkholderia tropica* Moc 725; cepa 20 *Burkholderia unamae* Mtl-641 y *Pseudomonas* sp. como control negativo, mediante la prueba de solución de fosfatos en agar NBRIP. Los resultados de la prueba se muestran en la tabla compiladora de pruebas ([anexo XIII](#)), la prueba se tomó como positiva (+) solo si se generó el halo de transparencia en el medio NBRIP; si en el medio existió crecimiento sin generación de halo la prueba se toma como negativa (-), claramente aquellas cepas que no prosperaron también se tomaron como resultado negativo (-). En la [figura 4](#) se muestran las placas Petri con el halo de las pruebas positivas, las pruebas negativas y las cepas que crecieron, pero sin generar halo.

Tras estos resultados preliminares de la prueba se acordó usar como control positivo a la cepa 20 (*Burkholderia unamae* Mtl-641) y se realizó una segunda prueba para evaluar en las mismas condiciones de concentración celular y tiempo de crecimiento a las cepas que resultaron positivas, los resultados permitieron obtener un índice de solubilización. Este indicador no se logró evaluar con la prueba preliminar, pues los inóculos no habían sido ajustados a una misma densidad óptica.

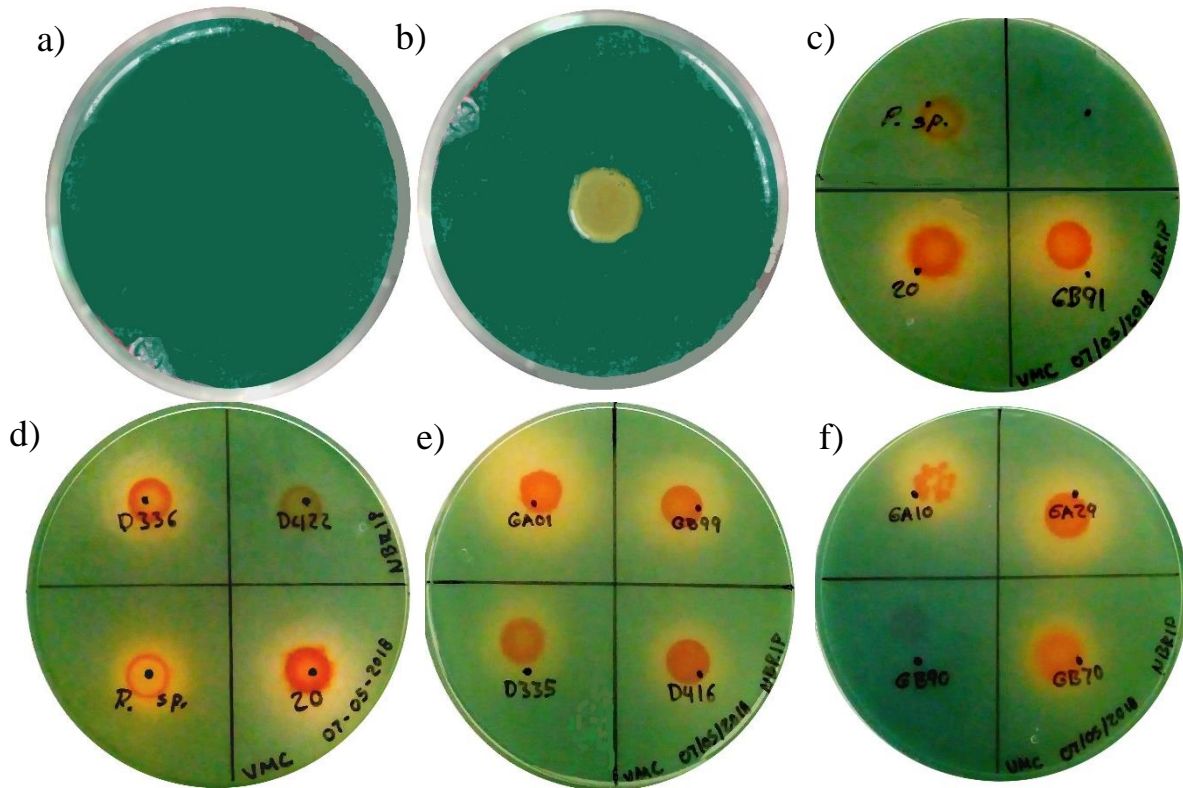


Figura 4 Se muestran seis fotos de placas con agar NBRIP como ayuda visual. La placa a) muestra una placa de resultado negativo, en la que la colonia inoculada no logra crecer a falta de capacidad para obtener fosforo inorgánico, b) muestra una placa negativo pues no existe halo, pero en la que la colonia bacteriana logró crecer; a partir de aquí se muestran las placas usadas en la evaluación de la capacidad solubilizadora, c) se observan los halos generados por las cepas 20 (control) y GB91, d) se observan los halos generados por las cepas D336 y 20, e) se observan los halos generados por las cepas GA01, GB99, D335, D416 y f) se observan los halos generados por las cepas GA10, GA29 y GB70.

Se determinó que las cepas :GA01, GA10, GA29, GB70, GB91, GB99, D335, D336, D416 correspondientes al 20% del cepario ([figura 5](#)) eran capaces de solubilizar fosfatos, mientras que las cepas GB90 y D422, que corresponden al 2.44% del cepario, pueden crecer en un medio sin fosfato biodisponible.

Evaluación de la capacidad de solubilización de fosfatos

Las cepas que resultaron ser positivas en el primer cribado fueron candidatas a una segunda evaluación, en esta evaluación se ajustó la densidad óptica de los inóculos a 0.1 con 620 nm de longitud de onda. El ajuste de densidad óptica garantiza que existe la misma cantidad de bacterias o al menos una cantidad muy similar en todos los inóculos.

Los resultados de la segunda evaluación junto con los datos y cálculo del índice de solubilización se encuentran en la [tabla 3](#).

Tabla 3 Se muestran los resultados de la segunda evaluación a las cepas que mostraron la capacidad de solubilizar fosfato inorgánico. Estos resultados se tomaron 10 días después de la inoculación. Como controles se utilizaron la cepa 20 (control positivo y *Pseudomonas* sp. (control negativo)).

Cepa	Datos para evaluar solubilización de fosfatos		
	Diámetro de la colonia (mm)	Radio del halo de solubilización (mm)	Índice de solubilización
<i>Pseudomonas</i> sp. (control -)	9.02 ±0.00	-	-
20 (control +)	11.33 ±1.53	5.17 ±0.29	1.91
GA01	10.00 ±0.00	8.67 ±0.58	2.73
GA10	10.00 ±0.00	4.67 ±0.58	1.93
GA29	10.00 ±0.00	6.67 ±0.58	2.33
GB70	13.33 ±0.58	3.67 ±0.58	1.55
GB90	8.67 ±0.58	-	-
GB91	9.66 ±0.58	7.00 ±0.00	2.45
GB99	9.33 ±0.58	6.00 ±0.00	2.29
D335	9.67 ±0.58	5.67 ±1.15	2.17
D336	9.83 ±0.29	5.00 ±1.00	2.02
D416	9.33 ±0.58	3.67 ±0.58	1.79
D422	9.00 ±0.00	-	-

La segunda evaluación fue realizada con un control negativo (*Pseudomonas* sp), un control positivo (cepa 20), las diez bacterias que resultaron positivas en la prueba preliminar y dos cepas más (GB90 y D422) para descartar su capacidad solubilizadora de fosfatos pues tuvieron un crecimiento significativo en la prueba anterior. Los resultados de la segunda prueba ([Tabla 3](#)), en la que se calculó el índice de solubilización de fosfatos mostró valores desde 1.55 a 2.73. Las cepas GA01, GA29, GB91, GB99 y D335 presentaron una capacidad de solubilizar fosfato mayor al control positivo (halo de 5.17 mm de radio). En cuanto al índice de solubilización, 6 de las 10 cepas (cepas GA01, GA29, GB91, GB99, D335 y D336) tienen un índice mayor a 2.

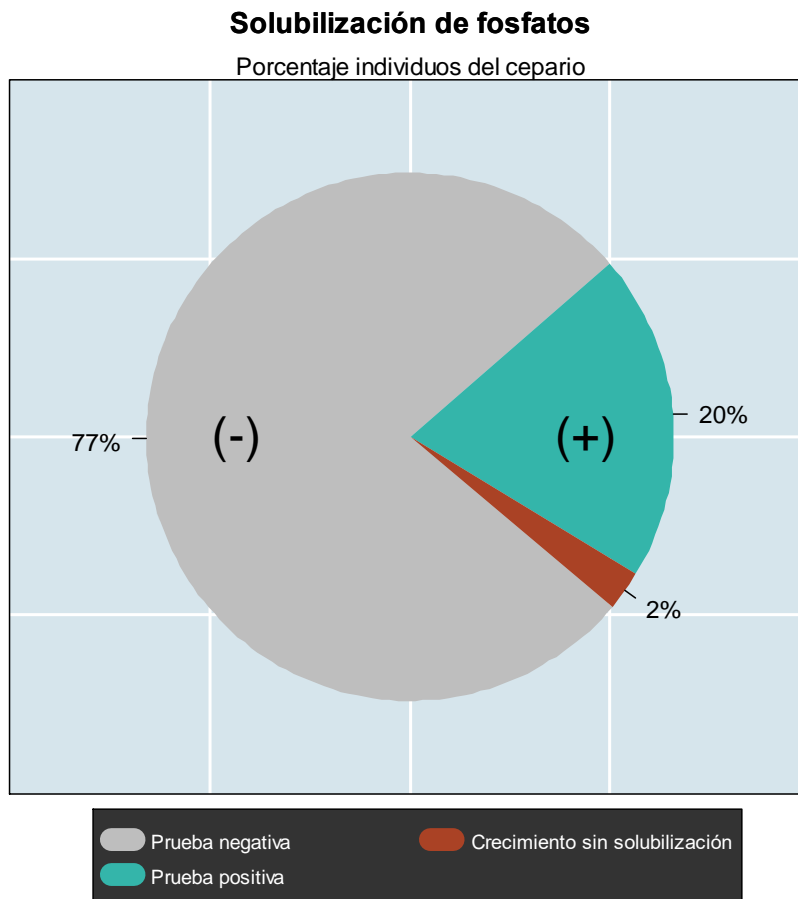


Figura 5 Gráfico circular que indica el porcentaje de individuos en el cepario que son capaces de solubilizar fosfatos o crecer en ausencia de fosfato soluble.

Producción de sideróforos

Para evaluar la producción de sideróforos se empleó la prueba CAS, aquellos cultivos que desarrollaron coloración diferente al azul marino (control negativo), son capaces de liberar sideróforos y quelar hierro, (figura 6). En la tabla compiladora (anexo XIII) se clasifica como + si el viraje fue verde, ++ si fue amarillo o +++ si fue naranja. Basados en estos datos el 86.66% del cepario (39 cepas) puede quelar hierro en mayor o menor medida (figura 8). Sólo las cepas GB53, GB137, GB190, D411, D424 y D425 no produjeron sideróforos.

Caracterización de los sideróforos con grupos catecol.

Las cepas que resultaron productoras de sideróforos fueron sometidas al ensayo de Arnow (figura 7) para caracterizar aquellas que produjeran los sideróforos más

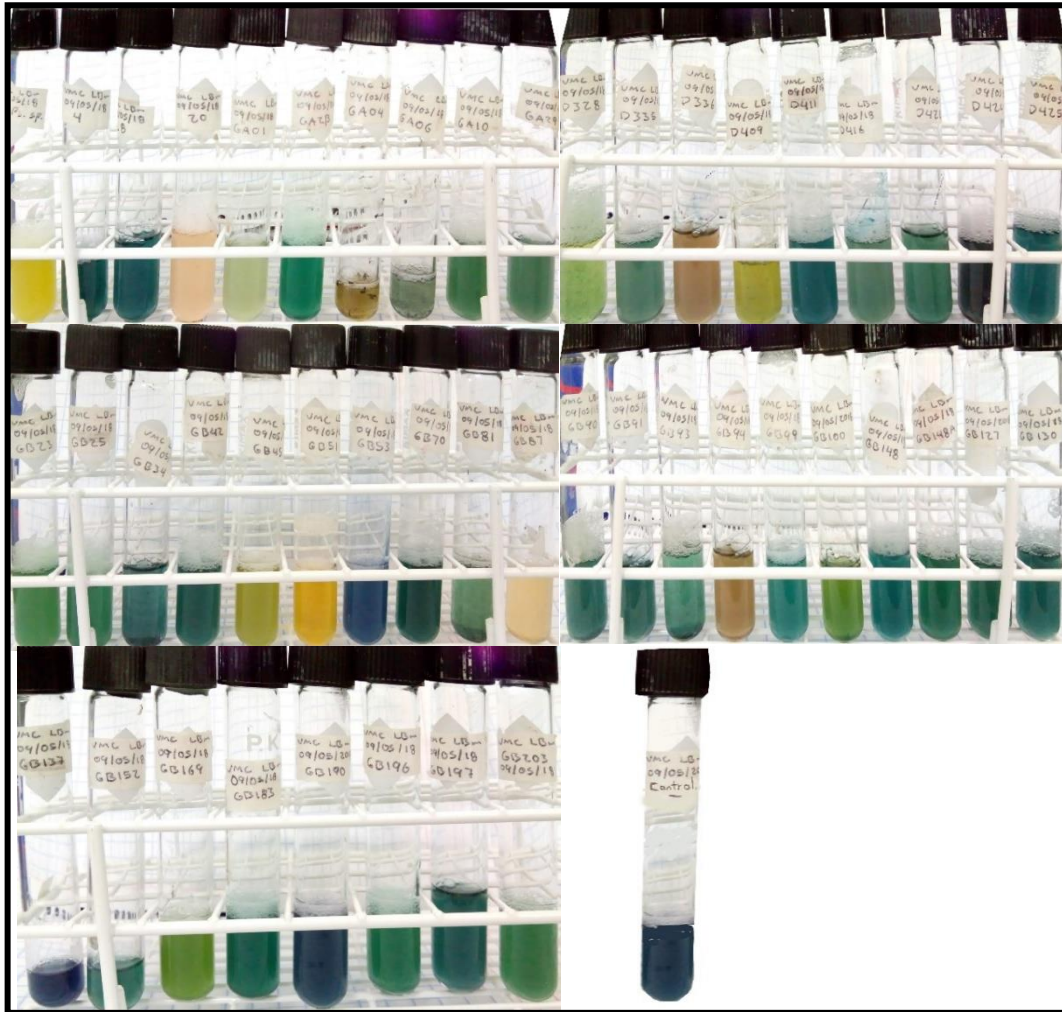


Figura 6. Resultados de la prueba CAS. De izquierda a derecha y de arriba hacia abajo se encuentran las cepas control, el grupo A, grupo D, grupo B y al final el control negativo.

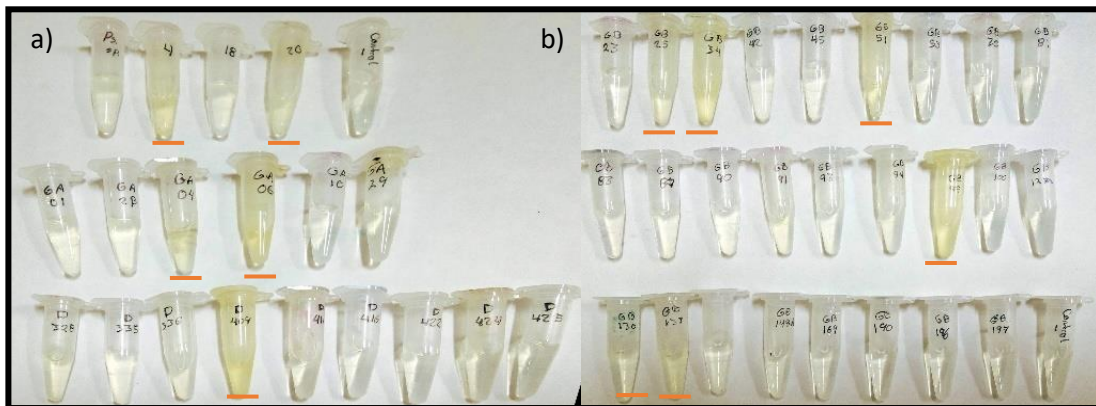


Figura 7 Resultados de la prueba de Arnow. Se marca con una línea roja aquellos cultivos que presentaron prueba positiva al virar a amarillo tras la aplicación de Nitrato de molibdeno. Del lado a) se encuentran las cepas tipo, el grupo A y el grupo D, del lado b) las cepas del grupo B

eficientes para captar hierro por poseer el anillo catecol. Las cepas GA04, GA06, GB25, GB34, GB51, GB99, GB127, GB130 y D409 fueron caracterizadas por

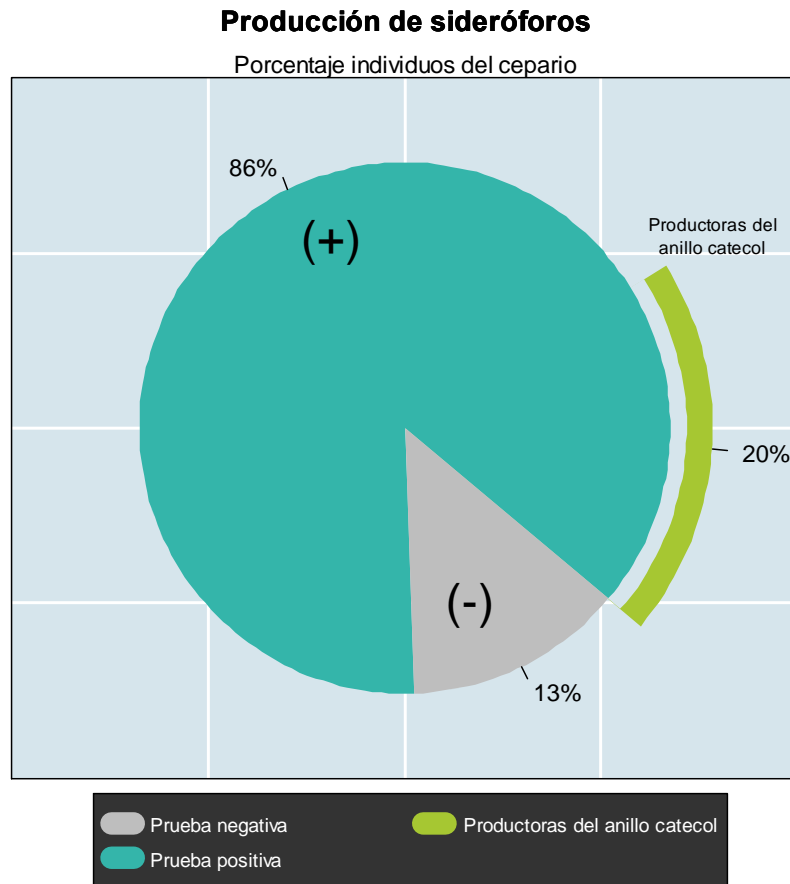


Figura 8 Gráfico circular que indica el porcentaje de individuos en el cepario que son capaces de producir sideróforos y que porcentaje de ellos produce sideróforos de tipo catecol.

generar sideróforos con anillo catecol y representan el 20% del cepario, y el 23% de las cepas que pueden sintetizar sideróforos, además se encontró que las cepas tipo 4 (*B. cepacia*) y 20 (*B. unamae*) también producen el anillo catecol.

Producción de amonio

De acuerdo con el reactivo de Nessler, casi todas las cepas (43 cepas) liberaron amonio, excepto la GB23 y la D425 (el 4% del cepario). Las cepas: GA04, GA06, GB87, GB99, GB169 y GB203, que representan el 13% mostraron tener la mayor capacidad para liberar este compuesto (con una producción de 1.5 mg/L de amonio), seguidas de las cepas: GA2 β , GB25, GB51, GB91, GB93, GB100, GB127, GB148, GB148A, GB183, GB190, GB196, D328, D335, D422 y D424 (con una producción de 1.0 mg/L de amonio) correspondientes al 35% del cepario.

La prueba fue tomada como positiva cuando se observó un cambio de coloración en el medio, diferenciándose del control negativo (medio estéril con 25 μ L del reactivo de Nessler), la prueba fue realizada por duplicado. Las pruebas hechas con distintas cepas fueron tomadas como positivas al generar distintas tonalidades de amarillo, estas fueron comparadas con una paleta de colores que relaciona la tonalidad del ensayo con la concentración de amoniaco/amonio presente en la solución ([Figura 9](#)). Esta relación de concentración a base de la coloración se pone a detalle en la tabla compiladora ([anexo XIII](#)) y en la [Figura 10](#) se muestra el porcentaje de bacterias del cepario acorde a la concentración de amonio.

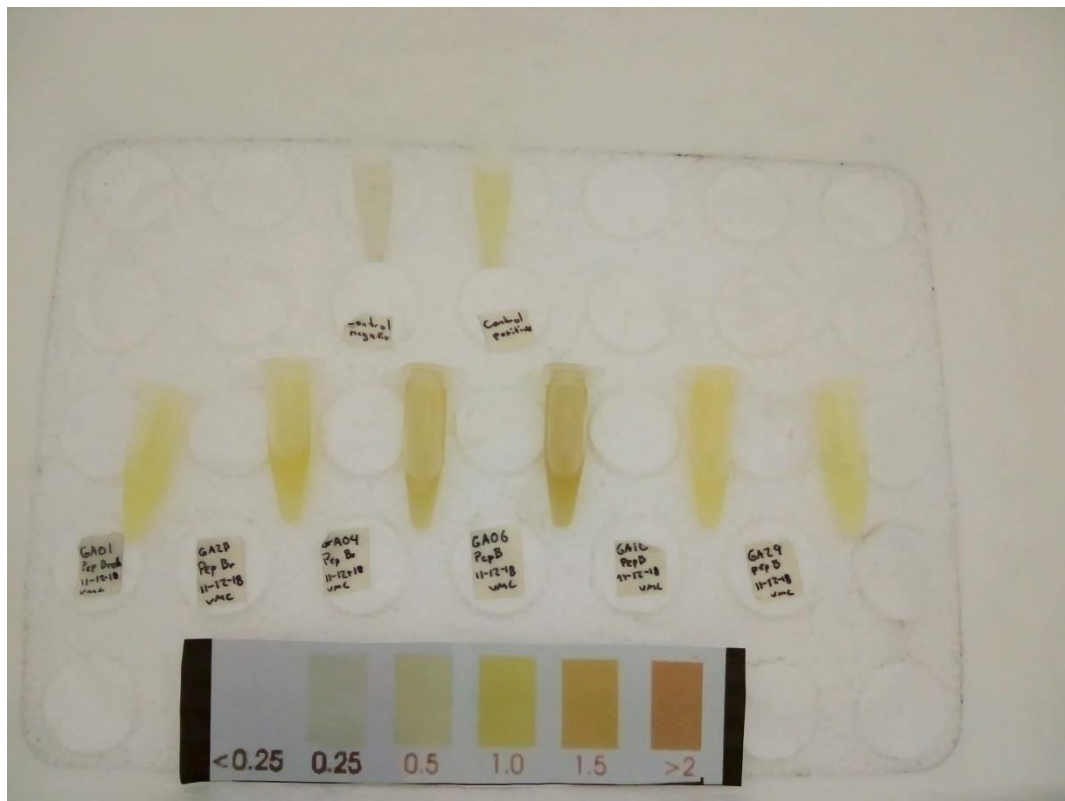


Figura 9 Resultados de la prueba de Nessler. La concentración aproximada de amonio liberado fue calculada comparando una paleta de colores para el reactivo comercial, En ella se muestran valores que van desde $<0.25\text{mg/L}$ de $\text{NH}_3 + \text{NH}_4$ hasta $>2\text{ mg/L}$. En la parte de arriba se encuentran el control negativo (medio mínimo + reactivo de Nessler) y el control positivo (medio mínimo + 10 mg de nitrato de amonio)

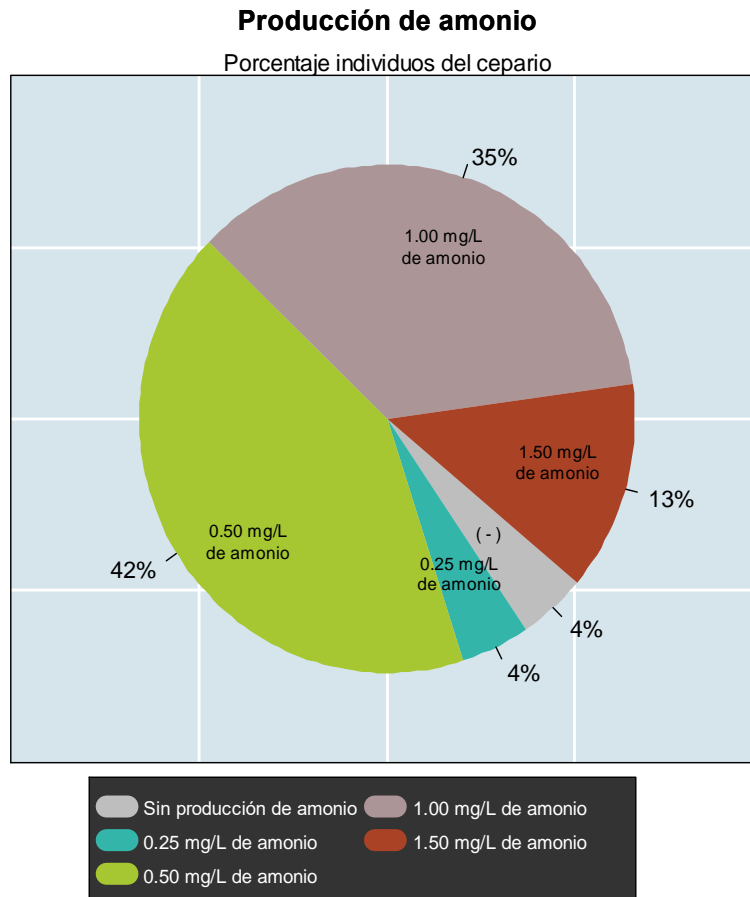


Figura 10 Gráfico circular que indica el porcentaje de individuos en el cepario que son capaces de liberar amonio al medio, el gráfico categoriza la liberación de amonio en rangos de concentración.

Producción de IAA

La cuantificación de índoles se utilizó como una mediada indirecta de la cantidad de IAA producido por las bacterias. Al detectar la concentración de índoles con el espectrofotómetro se genera cierto error debido a que el reactivo Salkowski es fotosensible, por ello a pesar de que al parecer todas las cepas fueron capaces de sintetizar esta fitohormona, se considerará un error de $10 \mu\text{g. mL}^{-1}$, error que, aunque no se evidenció en el control negativo, podría estar presente.

Sólo 9 de las 45 cepas no fueron capaces de sintetizar este metabolito, ello supone que el 80% del cepario sintetiza AIA, sobresaliendo la cepa GA2 β que generó más de 100 g. mL^{-1} , valor promedio por arriba de lo reportado para este género bacteriano (Batista et al., 2018; Khan et al., 2017). En la [Figura 11](#) se puede observar la reacción colorimétrica de la prueba, y en la [Figura 12](#) los datos se

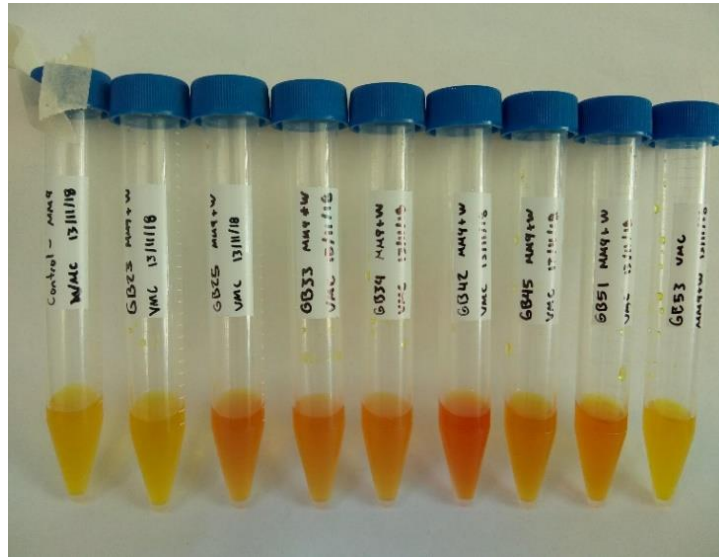


Figura 11 De izquierda a derecha el control negativo y un conjunto de cepas. Al aplicar el reactivo de Salkowski sobre los cultivos celulares se genera una coloración naranja-rosada si existe presencia de indoles. Como se puede observar las diferencias son muy notorias en algunas pruebas respecto al control negativo. A pesar de que se observan 2 pruebas totalmente negativas (iguales al control) se obtiene absorbancia de ellas al analizarlas, estas pruebas fueron las que se tomaron como error.

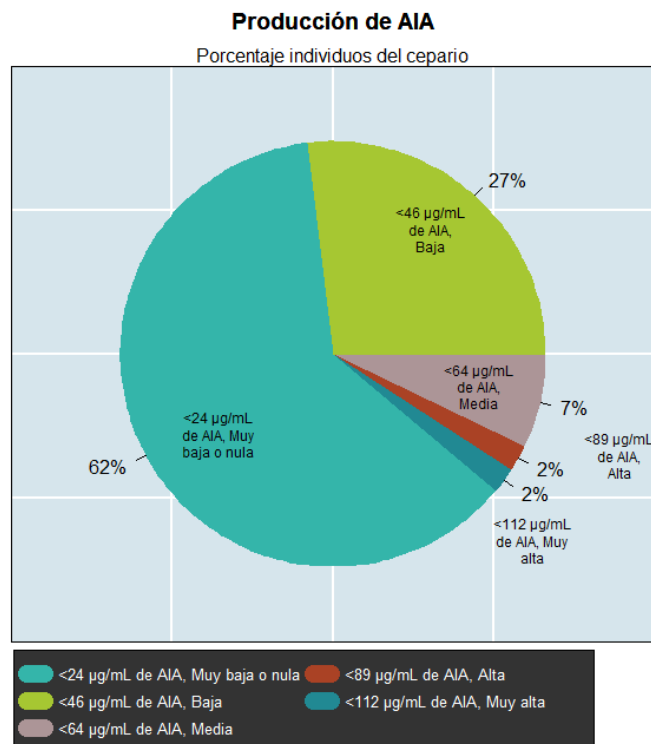


Figura 12 Porcentaje de individuos en el cepario que son capaces de sintetizar ácido indol acético a partir de L-triptófano. Casi todas las cepas produjeron AIA en mayor o menor medida, el grafico categoriza por concentración el porcentaje de individuos.

agruparon en categorías acorde a las concentraciones de AIA producidas por las cepas, los datos completos se encuentran en la tabla compiladora ([anexo XIII](#)).

Detección del gen *nifH*

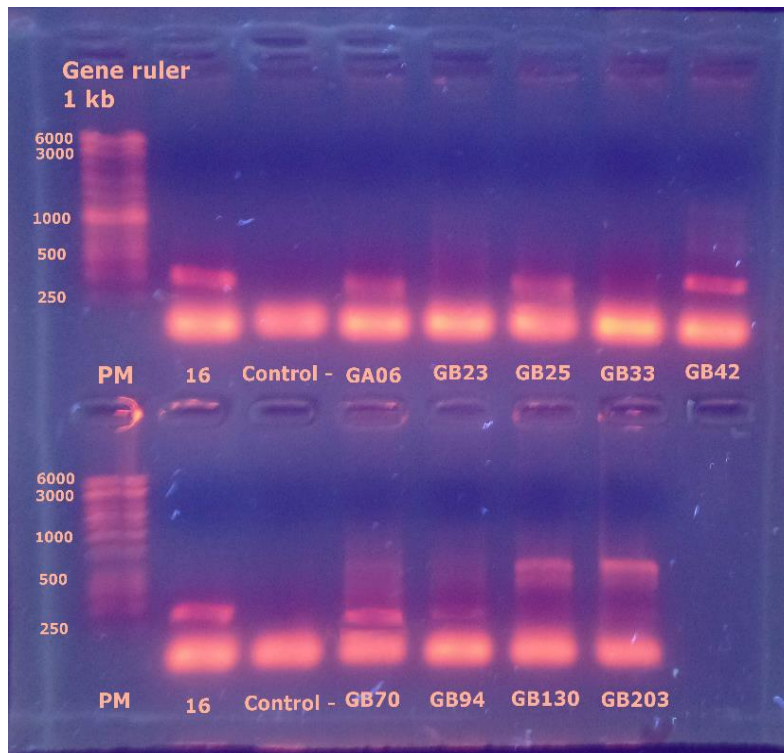


Figura 13 Corrimiento electroforético de amplificación de *nifH*. De izquierda a derecha en cada fila está el marcador de peso molecular, el control positivo *Burkholderia trópica* MTO293 (clave 16) y el control negativo. (indica cual es la banda de *nifH*)

De acuerdo a los resultados de las PCR's, las cepas GA06, GB25, GB42, GB70 y GB94 son portadoras del gen *nifH* (figura 13), dado que se observa una banda de aproximadamente 300 bp similar al control positivo. También se puede observar la amplificación de un fragmento a partir de las cepas GB130 y GB203, sin embargo, este no puede ser tomado como positivo dado su tamaño (alrededor de 700 – 800 bp).

Se realizó un alineamiento del gen 16S de las bacterias con las secuencias obtenidas previamente por Cervantes-Álvarez, (2016) para actualizar la probable especie a la que pertenecen, identificando a *B. gladioli* para GA06, *Caballeronia cordobensis* para GB25, *Paraburkholderia dipogonis* para GB42, *Paraburkholderia phytotfirmans* para GB70 y *B. catarinensis* para GB94.

Secuenciación del gen *nifH*

Las secuencias obtenidas a partir de los fragmentos amplificados del gen *nifH* fueron alineados junto con 33 secuencias de nitrogenasas ([anexo XI](#) y [XII](#)) que se descargaron de la base de datos de NCBI y se realizó un análisis para establecer la

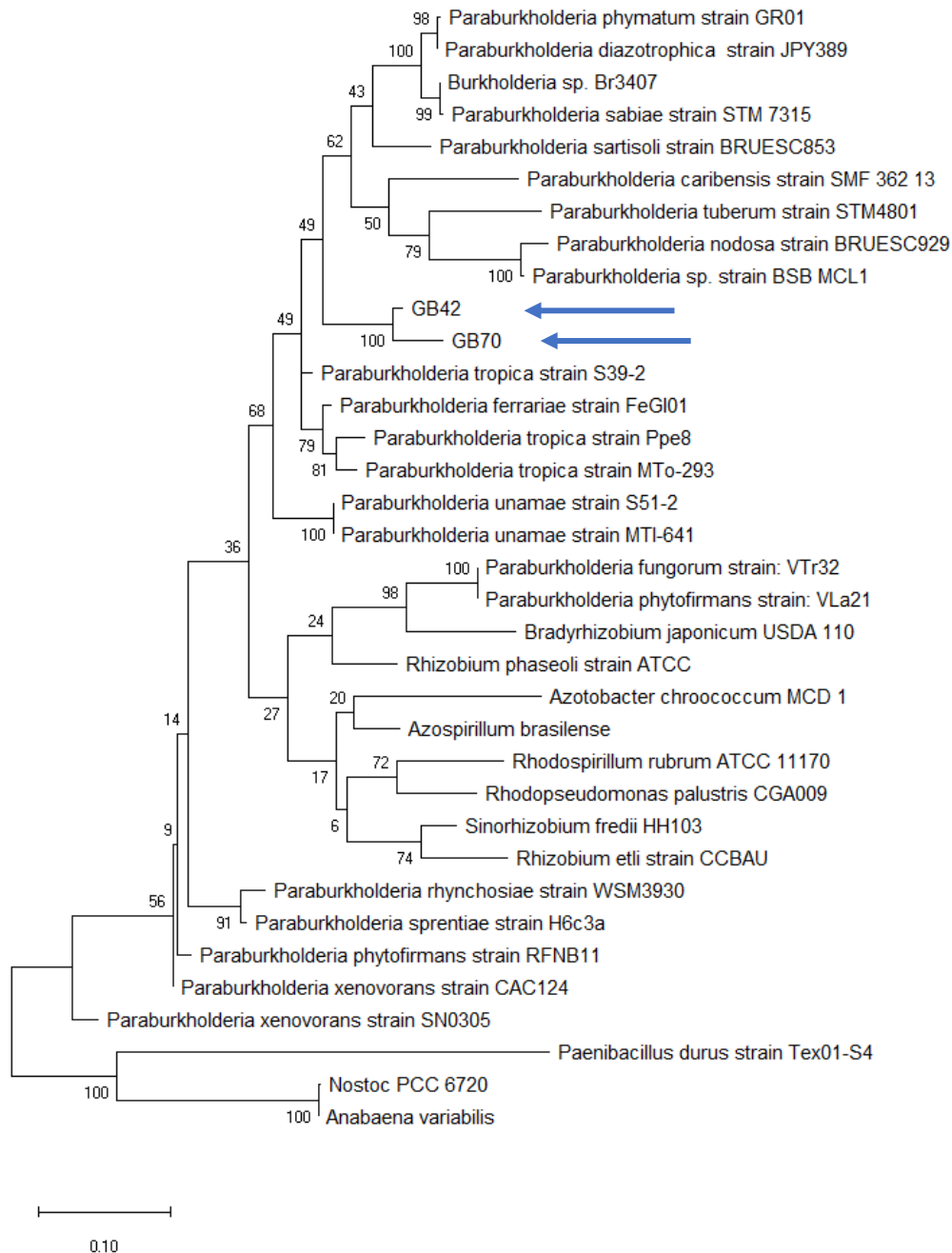


Figura 14 Dendrograma generado a partir del alineamiento de las secuencias del gen *nifH* de las cepas GB42 y GB70 (flechas azules) con distintas secuencias *nifH* de *Burkholderia*, *Paraburkholderia*, y distintos organismos fijadores de nitrógeno, entre ellos cianobacterias.

relación filogenética entre dichas proteínas mediante un filograma ([figura 14](#)). La distribución de ramas en el árbol filogenético obtenido confirma la relación entre las nitrogenasas presentes en el cepario (cepas GB42 y GB70) y las nitrogenasas reportadas en el género *Paraburkholderia* ([anexo XII](#)).

Se optó por presentar a dos cepas: GB42 y GB70, mostradas con flechas azules, en el dendrograma debido a la similitud que presentaron con las secuencias de *Paraburkholderia*, se usó la secuencia consenso o contig de los fragmentos amplificados del gen *nifH* empalmado sus secuencias forward y reverse .

Acorde a lo esperado las secuencias de GB42 y GB70; las secuencias se organizaron dentro de un clado conformado por *Paraburkholderiales*, entre las que se encuentran según Beukes et al., (2018) organismos ambientales (*P. sartisoli*), noduladores (*P. diazotrophica*, *P. phymatum* y *P. caribensis*) y presentaron una mayor identidad con las nitrogenasas de *Paraburkholderias* catalogadas como noduladoras + diazótrofes (*P. phymatum*, *P. nodosa* y *P. tuberum*). Al mismo tiempo las secuencias se ubicaron en clados distantes de organismos ambientales + patógenos (*P. fungorum*, *P. rhynchosiae*), diazótrofes de vida libre (*P. xenovorans*) y otros noduladores como *P. sprentiae*. Sugiriendo una relación entre las cepas GB42 y GB70 con la capacidad diazótropa asociada a plantas.

Las secuencias *nifH* de todas estas bacterias fueron enraizadas con las de cianobacterias como *Anabaena* y *Nostoc*, con las cuales se presentó poca similitud.

Capacidad fijadora de nitrógeno

La capacidad para fijar nitrógeno de las cinco cepas que resultaron positivas a portar el gen *nifH* se determinó indirectamente por ensayo de reducción de acetileno ([Tabla 4](#)). Las cepas estudiadas mostraron actividad similar a la reportada por Estrada-De Los Santos y cols. (2001), con concentraciones desde 48 hasta 436 nmoles C₂H₄ h⁻¹.

Tabla 4 Concentración de etileno generado (en nanomoles de etileno por hora) en la prueba de reducción de acetileno, el etileno es una medida indirecta de la actividad de la nitrogenasa.

Cepa	Etileno generado (nmoles C ₂ H ₄ /h)	
	Promedio ± Des. Estándar	
GA06	74.14	26.20
GB25	65.69	31.46
GB42	46.76	1.85
GB70	44.46	9.33
GB94	56.40	36.40
16	89.83	28.20
<i>E. coli</i>	--	--

Antagonismo

Para elegir a las cepas con potencial biotecnológico se elaboró una tabla compiladora de pruebas, en ella se compararon las características promotoras de crecimiento vegetal poniendo mayor importancia a la capacidad de fijación biológica de nitrógeno. Se seleccionaron cinco cepas: GA06, GB25, GB42, GB70 y GB94, de las cuales la GA06 y la GB25 disminuyeron la germinación de las plántulas en experimentos preliminares.

La [tabla 5](#) muestra la existencia de antagonismo entre las cepas que mostraron ser las mejores candidatas a promotores de crecimiento vegetal con la finalidad de utilizarlas como un multi-inoculante o un co-inoculante. La primera capa contiene metabolitos de una sola cepa y la segunda capa es inoculada con las diferentes cepas a evaluar. Si no existe un crecimiento celular, se puede hablar de antagonismo.

Tabla 5 Resultados de antagonismo. Un signo negativo (-) indica que no existió inhibición de crecimiento, un signo positivo (+) indica que la cepa antagonista, columnas 2 a 6, inhibe el crecimiento de la cepa en la columna 1.

Cepa inhibida	Antagonista				
	GA06	GB25	GB42	GB70	GB94
GA06	-	-	-	-	-
GB25	-	-	-	-	+
GB42	+	-	-	-	-
GB70	+	-	-	-	-
GB94	+	-	-	-	-

Como puede observarse en la [tabla 5](#) y en la [figura 15](#) la cepa GA06 inhibe el crecimiento de casi todas las cepas evaluadas, excepto el de la cepa GB25, la cual es inhibida por la cepa GB94.

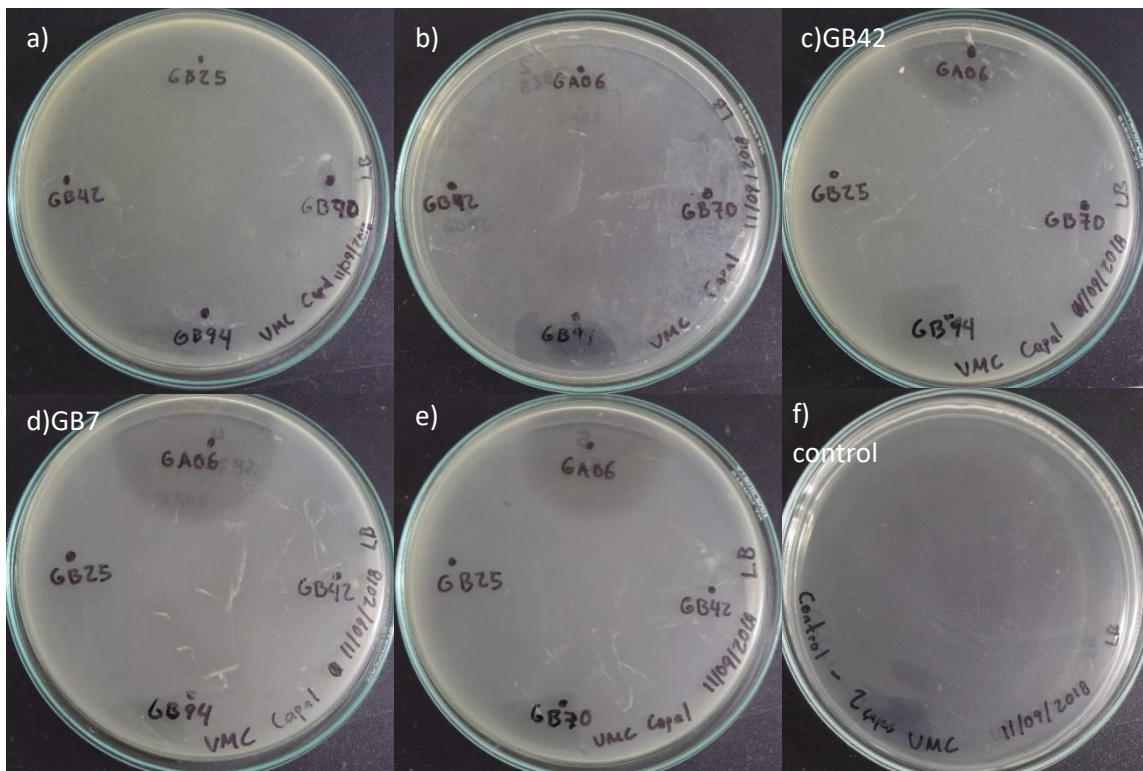


Figura 15 Se muestran las pruebas de inhibición tras la producción de metabolito por 48h y de la cepa a evaluar por 24h. El antagonismo entre cepas se denota por la inhibición de crecimiento celular en forma de un halo de transparencia. De izquierda a derecha se muestra el crecimiento de la capa 2 o la capa que contenía las cepas a evaluar a) GA06 que no fue inhibida, b) GB25 que fue inhibida por GB94, c) GB42, d) GB70 y e) GB94 que fueron inhibidas por GA06 y f) muestra el crecimiento celular sin inhibición de GB70.



Figura 16 Conjunto de imágenes del primer ensayo de germinación, cada cepa fue evaluada individualmente. Se puede apreciar que GA06 y GB25 causaron la disminución en el desarrollo de las plántulas y el nulo crecimiento de sus raíces, mientras que GB42 y GB94 si tuvieron efectos promotores de crecimiento. En orden los tratamientos fueron a – b) Control negativo (sin inóculo), c-d) GA06, e – f) GB25, g -h) GB42. I-j) GB94.

La cepa que fue más sensible a los metabolitos de GA06 fue GB70, presentando un halo de inhibición promedio de 3.03 cm de diámetro; GA06 no fue inhibida por los metabolitos de ninguna bacteria.

Ensayo de promoción de crecimiento en fase de germinación

Este ensayo se llevó a cabo dos veces, pues los primeros resultados se tomaron como preliminares.

Como se denota en la [tabla 6](#) y en la [figura 16](#), las semillas de *Lactuca sativa* var Parris Island inoculadas con las cepas GA06 y GB25 presentaron síntomas que evidencian enfermedad en la planta, como necrosis en cotiledones e hipocótilo, nulo desarrollo de la raíz, cotiledones adheridos entre sí y color amarillento señalando una leve clorosis. Cabe destacar que en todos los grupos e incluso en el control se presentaron semillas dañadas, sin embargo, no con los síntomas generados por las cepas GA06 y GB25.

Con estos resultados se optó por eliminar a estas dos cepas de los ensayos posteriores, dejando sólo a tres candidatas: GB42, GB70 y GB94.

Tabla 6 Resultados preliminares de la prueba de germinación. Se realizó el experimento con cada cepa de manera individual para evaluar sus efectos en la germinación por separado.

Tratamiento	Medición				
	% de germinación	Longitud total cm	Longitud del hipocótilo cm	Longitud de raíz cm	Raíces secundarias
Control -	37.93 ±0.58	14.09 ±1.38	4.98 ±0.53	4.70 ±0.52	0.16 ±0.28
GA06	10.00 ±0.58	1.66 ±2.88	0.33 ±0.57	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00
GB25	31.81 ±2.33	9.67 ±0.33	2.80 ±0.50	1.44 ±0.34	0.00 ±0.00
GB42	34.61 ±3.00	19.90 ±1.01	7.89 ±0.29	1.80 ±0.35	1.06 ±0.11
GB94	50.00 ±3.67	12.16 ±3.25	3.71 ±0.34	2.91 ±0.43	2.22 ±0.27

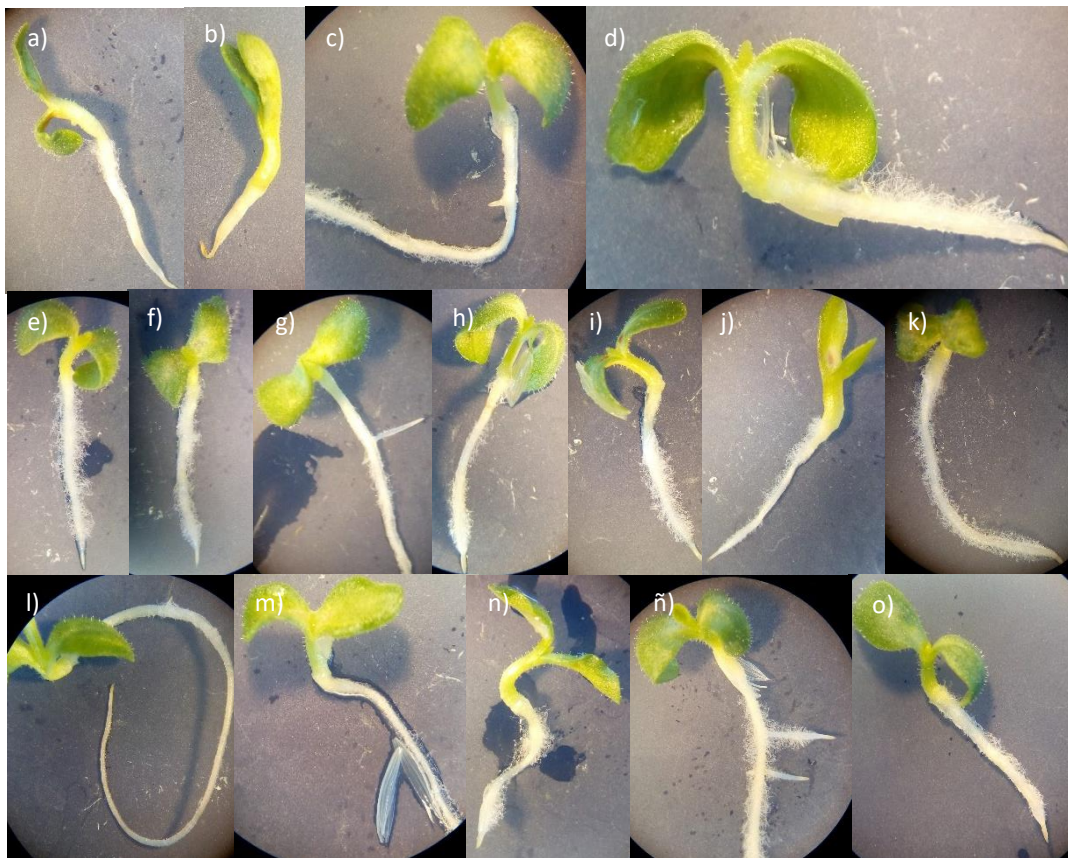


Figura 17 Conjunto de imágenes del tercer ensayo de germinación. Se evaluó a las cepas GB42, GB70, GB94 y todas sus combinaciones incluidas las tres juntas. El inóculo con las tres cepas presentó el mayor rango de germinación y la mayor cantidad de individuos con raíces secundarias, el inóculo GB42 + GB94 presentó la mayor longitud total y los inóculos GB42 + 94 y GB70 + GB94 presentaron la mayor longitud en raíz. En orden los inóculos son a-b) Control negativo, c-d) GB42, e-f) GB70, g-h) GB94, i-j) GB42 + GB70, k-l) GB42 + GB94, m-n) GB70 + GB94, ñ-o) GB42 + GB70 + GB94.

El segundo ensayo de germinación se llevó a cabo con estas tres cepas y sus diferentes co-inóculos, incluyendo las tres cepas simultáneamente. Cabe destacar

que el inóculo con las tres cepas obtuvo muy buenos mejorando en cuatro de los cinco parámetros con respecto al control, destacando incluso en la producción de raíces secundarias; el co-inóculo de GB42 + GB94 aumentó la longitud de la raíz y fue el que mayor longitud total presentó; por su parte los co-inóculos de GB42 + GB70 y GB70 + GB94 también presentaron valores superiores al control negativo.

[Tabla 7](#) y [figura 17](#).

Tabla 7 Resultados del segundo experimento de germinación. Se usaron las cepas que de forma individual en los resultados preliminares promovieron el desarrollo de la plántula. El inóculo se llevó a cabo con las 3 cepas promotoras, sus combinaciones en binas y un inóculo con las tres.

Tratamiento	Medición				
	% de germinación	Longitud total (cm)	Longitud del hipocótilo (cm)	Longitud de raíz (cm)	Raíces secundarias
Control -	55.56 ±10.18	1.06 ±0.14	0.32 ±0.09	0.49 ±0.06	0.00 ±0.00
GB42	60.00 ±0.00	1.48 ±0.45	0.27 ±0.12	1.20 ±0.48	1.00 ±0.00
GB70	60.00 ±0.00	1.40 ±0.10	0.23 ±0.06	0.93 ±0.21	0.00 ±0.00
GB94	57.78 ±7.70	1.43 ±0.20	0.22 ±0.03	0.90 ±0.10	0.33 ±0.58
GB42 + GB70	57.78 ±3.85	1.13 ±0.48	0.27 ±0.08	0.70 ±0.76	0.00 ±0.00
GB42 + GB94	57.78 ±3.85	1.95 ±0.42	0.32 ±0.12	1.23 ±0.30	0.00 ±0.00
GB70 + GB94	57.78 ±3.85	1.88 ±0.16	0.26 ±0.07	1.32 ±0.25	0.67 ±1.15
GB42 + GB70 + GB94	62.22 ±16.77	1.45 ±0.13	0.32 ±0.03	0.87 ±0.12	1.33 ±0.58

Crecimiento *in planta*

Al analizar el crecimiento de los cuatro grupos de plantas desde el día 0 (el día en que se trasplantó al sistema hidropónico) se hizo evidente que el grupo inoculado con GB70 tuvo la menor tasa de crecimiento en los seis parámetros de medición, por otro lado, GB42 tuvo con mediciones superiores al control negativo y el co-inóculo de GB42 + GB70 presenta los valores más altos en casi todas las mediciones ([anexo XIV](#)). Las curvas de crecimiento presentan comportamientos distintos entre el control negativo, GB42 y GB70, pero la curva del co-inóculo presenta un comportamiento similar a GB70 desde el día 0 hasta el día 21; y desde

el día 21 hasta el final de las mediciones presentó una curva con comportamiento similar a la de GB42.

Tabla 8 Resultados de mediciones del día de cosecha de las lechugas.

Tratamiento	Medición día 42 (cosecha/día final)					
	N° de hojas	Longitud de las raíces (cm)	Longitud de la planta (cm)	Longitud total (cm)	Peso húmedo (g)	Peso seco (g)
Control -	12.82 ±0.34 ^a	71.90 ±1.86 ^{a,b,c}	34.25 ±0.89 ^a	106.15 ±2.75 ^{a,b}	236.33 ±6.12 ^{a,b,c}	15.60 ±0.40 ^{a,b}
GB42	12.81 ±0.61	86.45 ±4.12 ^a	36.61 ±1.74	123.06 ±5.86 ^a	341.00 ±16.24 ^a	16.31 ±0.78
GB70	10.05 ±0.31 ^a	49.70 ±1.52 ^b	30.25 ±0.93 ^a	79.95 ±2.45 ^b	172.33 ±5.28 ^b	7.88 ±0.24 ^a
GB42 + GB70	13.66 ±0.76	62.94 ±3.49 ^c	35.42 ±1.97	98.36 ±5.46	278.66 ±15.47 ^c	11.41 ±0.63 ^b

El análisis de los resultados se llevó a cabo utilizando los datos del día final, pues pretendíamos evaluar el efecto de los tratamientos sobre el cultivo, no del tiempo sobre el cultivo. Los resultados se observan en la [figura 19](#) y los datos se muestran en la [tabla 8](#) y en la [figura 18](#), los grupos que son estadísticamente distintos se diferencian en cada columna con índices alfabéticos. La longitud de las raíces, longitud total y el peso húmedo de las plantas con el tratamiento con GB42 ([Tabla 8](#)) fue estadísticamente superior a los demás, pero el número de hojas y peso seco no fue superior al control negativo, aunque el co-inóculo presentó mayor número de hojas y mayor peso húmedo respecto al control. El tratamiento con GB70 resultó tener los menores índices de medición con respecto al control en todos los parámetros.

Tabla 9 Parámetros de concentración de nutrientes antes y después de colocar el cultivo de lechugas en el sistema hidropónico.

Tratamiento	Conductividad Eléctrica EC ($\mu\text{S}/\text{cm}$) a 20°C	
	Inicial	Final
Control -	1890 ±4.00	1300 ±4.00
GB42	1890 ±4.00	1160 ±4.00
GB70	1890 ±4.00	1440 ±4.00
GB42 + GB70	1890 ±4.00	1370 ±4.00

Para tener un panorama más amplio de las variables en el experimento se midió la conductividad eléctrica en el sistema hidropónico antes de colocar las plántulas y después de cosecharlas ([tabla 9](#)) la conductividad eléctrica permite llevar un control de los nutrientes en la solución nutritiva, las mediciones se llevaron a cabo con el

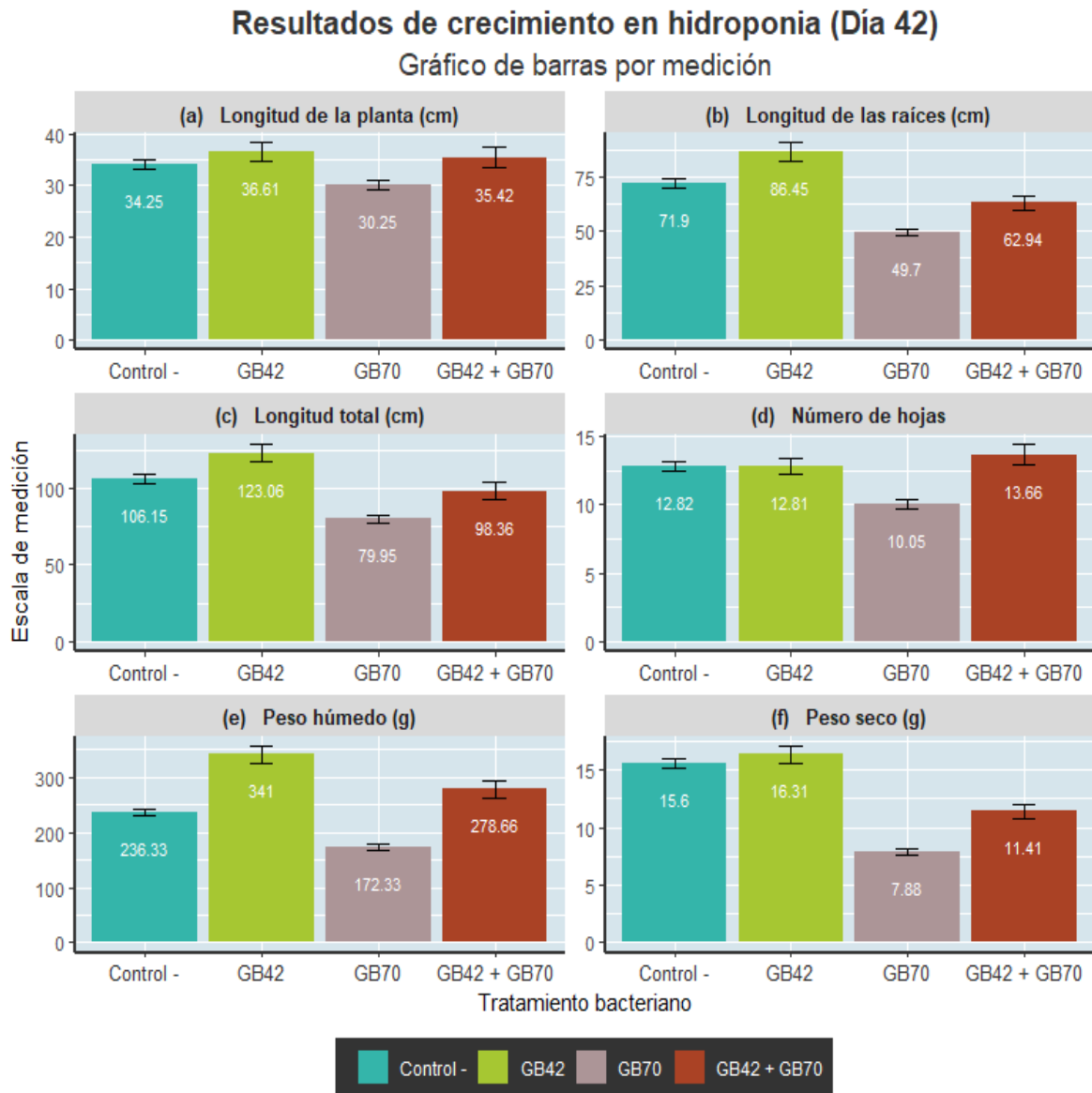


Figura 18 Gráfico de barras de las mediciones del día final en el sistema hidropónico

mismo nivel de agua. Al final del ensayo la solución de GB42 contenía la menor cantidad de nutrientes mientras que la solución de GB70 contenía la mayor cantidad.



Figura 19 Fotografías de ejemplares de Lactuca sativa el día 42 de crecimiento, día de la medición final. Se observa una notable diferencia entre el tamaño y volumen de hojas y raíces del tratamiento GB42 respecto a los demás tratamientos.

Pruebas organolépticas

De los cinco parámetros evaluados en las pruebas organolépticas sólo una tuvo diferencias estadísticamente significativas, con respecto al sabor, la lechuga comercial mostró ser superior al control negativo, a GB42 y al co-inóculo GB42 + GB70. A pesar de ello, todos los tratamientos bacterianos fueron muy similares organolépticamente a la lechuga comercial, presentando valores promedio desde 4.23 a 5.56 en la escala del 1 al 7 en todas las pruebas.

Los resultados de la prueba se muestran en la [tabla 10](#), las diferencias estadísticas se muestran en la columna de sabor con índices alfabéticos entre los tratamientos, en la [figura 20](#) se aprecian diagramas de cajas y bigotes que muestran la distribución de resultados por cada prueba organoléptica.

Tabla 10 Resultados promedio de las pruebas organolépticas

Tratamiento bacteriano de la lechuga	Prueba Organoléptica				
	Apariencia	Color	Olor	Sabor	Textura
Control -	5.27 ±1.27	5.33 ±1.24	4.54 ±1.11	4.25 ±1.58 ^a	5.04 ±1.41
GB42	5.10 ±1.26	5.42 ±1.16	4.69 ±1.07	4.23 ±1.45 ^b	4.94 ±1.45
GB70	5.15 ±1.18	5.52 ±0.97	4.65 ±1.18	4.65 ±1.51	5.04 ±1.32
GB42 + GB70	5.15 ±1.15	5.21 ±1.20	4.96 ±1.18	4.50 ±1.5 ^c	5.02 ±1.38
Comercial	5.38 ±1.10	5.42 ±1.03	4.83 ±1.33	5.35 ±1.14 ^{a,b,c}	5.56 ±1.17

Distribución de resultados de pruebas organolépticas

Gráfico de cajas y bigotes por cada prueba

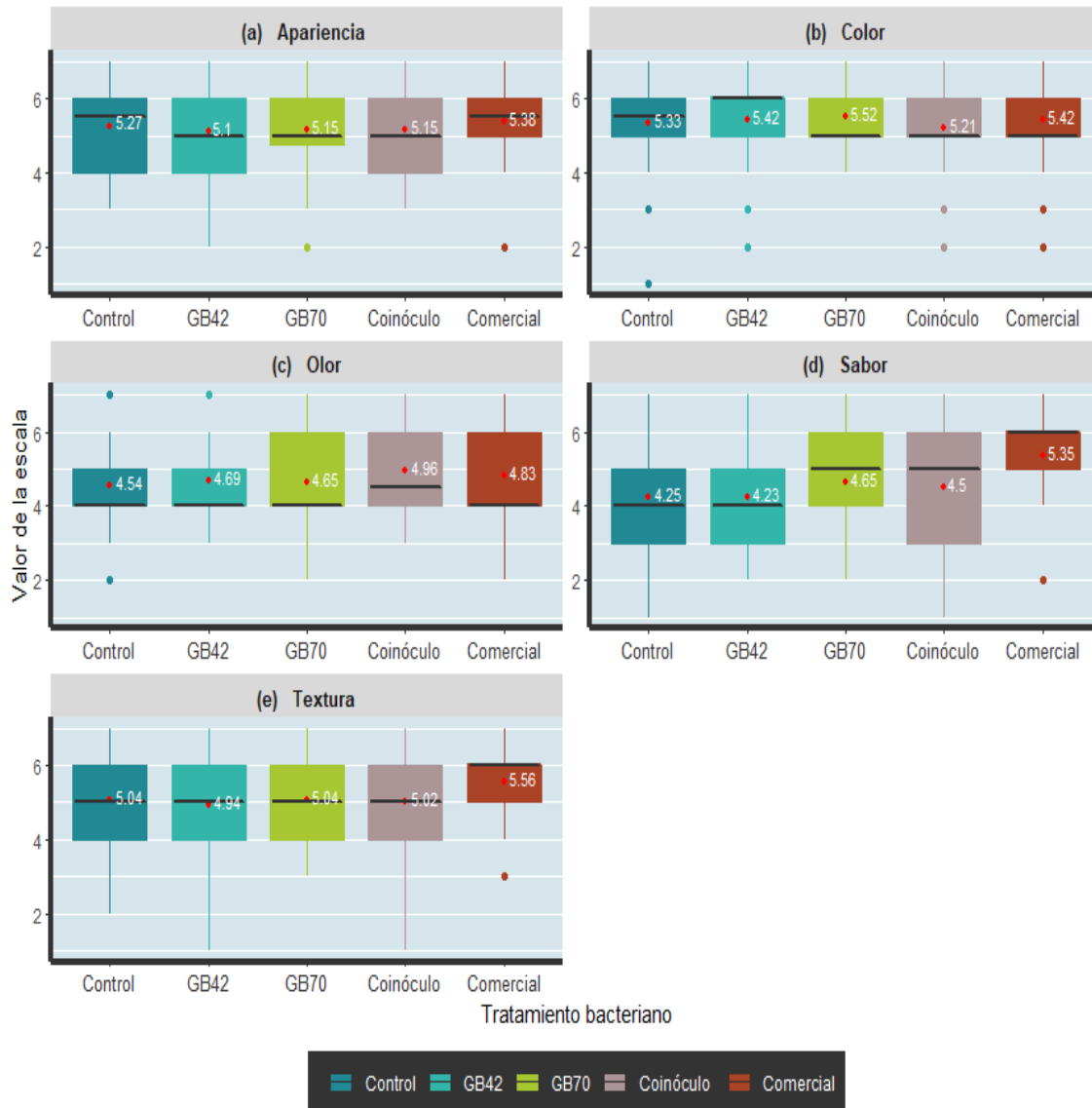


Figura 20 Gráficos de cajas y bigotes que muestran la distribución de resultados de pruebas organolépticas

Análisis químico proximal

Los resultados obtenidos se compararon con valores de referencia obtenidos en la base de datos USDA para composición de alimentos, usando los datos de lechuga orejona (romana o cos) (USDA National Nutrient Database for Standard Reference, 2019) ([Tabla 11](#)).

Tabla 11 Valores obtenidos en el análisis químico proximal.

Tratamiento	Valores nutritivos porcentuales				
	Humedad	Cenizas (minerales)	Lípidos	Proteínas	Carbohidratos
Control - GB42	92.60%	4.291% ^a	0.39% ^a	0.496% ^{ab}	4.99% ^a
GB70	93.91%	4.708%	0.44%	0.719%	2.99%
GB42 + GB70	93.73%	4.912% ^a	0.39% ^b	1.209% ^a	2.53% ^{ab}
Comercial	91.80%	4.514%	0.47%	0.915%	5.06% ^b
Valores de referencia	91.97%	4.610%	0.61% ^{ab}	0.995% ^b	4.58%
Método	94.61%	3.332%	0.30%	1.23%	3.29%
	Secado con termo balanza (Dirección general de normas, 1986)	Cenizas totales calcinación (Dirección general de normas, 1978a)	Método de Soxhlet (Dirección general de normas, 1978b)	Método modificado de Lowry (Hartree, 1972)	Diferencia matemática

Todas las muestras vegetales presentaron una cantidad estadísticamente igual de humedad, dato que puede tomarse como base para evidenciar que los análisis fueron realizados en la misma etapa de vida de anaquel, ya que la lechuga comercial podría haber estado un tiempo considerablemente mayor en refrigeración que los tres días de las lechugas hidropónicas. A pesar de que GB70 presentó los valores más bajos en crecimiento vegetal, fue el único tratamiento que fue estadísticamente mayor al control en cuanto a cantidad de minerales y proteínas totales, hecho que evidencia un mayor aprovechamiento de los nitratos y fuentes de nitrógeno por la planta. La lechuga comercial presentó la mayor cantidad de lípidos y fue significativamente mayor en proteínas al control negativo, por otro lado, el control negativo fue el tratamiento con menor cantidad de minerales, lípidos y proteínas.

DISCUSIÓN

Acorde a lo esperado, el cepario mostró contener organismos capaces de llevar a cabo mecanismos promotores de crecimiento vegetal. La evaluación de estos mecanismos fue realizada en lechuga por ser una planta muy sensible a la exposición de agentes fitotóxicos, como señala la Sociedad Americana para

Pruebas y materiales (ASTM por sus siglas en inglés) (Wun-cheng *et al.*, 1991). Aparentemente las plántulas inoculadas con las cepas GB42, GB70 y GB94 no presentaron afectaciones en el crecimiento o muestras de enfermedad.

La inoculación de semillas con las cepas GA06 y GB25 no fue exitosa, ya que en los experimentos de germinación las plántulas presentaron manchas necróticas en hojas y tallos, disminución de crecimiento radicular y clorosis en tejidos. Todos ellos síntomas parecidos a lo reportado con *B. gladioli* y *B. glumae* en cultivos hortícolas, donde se ha descrito a estos como signos como característicos del tizón (R. Nandakumar *et al.*, 2007; R. Nandakumar *et al.*, 2009) y el marchitamiento bacteriano (Gijon-Hernandez *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2005) de monocotiledóneas y dicotiledóneas incluso en etapa de germinación (Pedraza *et al.*, 2018).

En este estudio se encontraron diez cepas de las llamadas PGPB con capacidad solubilizadora de fosfato, de las cuales GA01, GA29, GB91, GB99, D335 y D336 mostraron índices de solubilización mayores a 2; parámetro que se considera óptimo para considerar a un organismo como PGPB (Nwanyanrou *et al.*, 1996). Aunado a ello, esta prueba evidencia la solubilización de fosfatos por ácidos orgánicos como el ácido glucónico y ácido 2-cetoglucónico (Rodríguez *et al.*, 2006); no por fosfatasas, hecho que refuerza la capacidad promotora vegetal de las cepas, pues si la solubilización fuera llevada a cabo por fosfatasas los iones con fósforo no serían liberados a la planta, la misma bacteria los utilizaría para sus funciones metabólicas (Richardson y Simpson, 2011).

Tras la realización de la primera prueba (cribado) se logró diferenciar a todas aquellas cepas con la capacidad para asimilar y/o solubilizar fosfato inorgánico. En esta primera prueba todas las bacterias que resultaron positivas ([figura 4](#)) mostraron un halo de solubilización de hasta tres veces el radio de la colonia, como lo mostró la cepa GA10. Este halo no podía tomarse como referencia para calcular el índice de solubilización (IS) ya que la densidad de bacterias en el inóculo no fue ajustada para ninguna placa y probablemente los halos con mayor radio podrían provenir de inóculos con mayor cantidad de bacterias viables o activas respecto a los demás inóculos. Debido a ello se realizó una segunda prueba en la que se pudiera evaluar

la solubilización anulando la variabilidad de UFC's del inóculo. Con los datos obtenidos hasta el momento se puede clasificar el cepario en tres grupos según el primer cribado, las bacterias que son solubilizadoras de fosfatos, aquellas que son capaces de asimilarlo, pero no solubilizarlo y aquellas que no son capaces de solubilizarlo ni de asimilarlo.

Como se esperaba los resultados de la segunda prueba contrastaron con los primeros, ya que el radio de los halos de solubilización disminuyó en la mayoría de los casos ajustándose a valores entre 0.82 veces (cepa GB70) y 1.75 veces (cepa GA01) el radio de la colonia, obteniéndose así un rango de IS entre 1.55 a 2.73.

Con base en los resultados puede catalogarse a las cepas GA01, GA10, GA29, GB70, GB91, GB99, D335, D336 y D416 como PGPB. Estas podrían ser aplicadas al campo para mejorar la producción agrícola, tal y como se ha llevado a cabo recientemente con el maíz y *B. vietnamiensis* (Pande *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2014). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Estrada y cols. (2013) quienes describieron la capacidad de *B. vietnamiensis* M6 para promover el crecimiento de plantas de arroz al generar diferentes compuestos promotores de crecimiento vegetal, entre ellos fosfato soluble. El índice de solubilización de fosfatos de esta cepa es de 2.30; Midekssa, Löscher, Schmitz, y Assefa, 2016 que reportan IS de 2.25 para *B. phytofirmans* y 1.46-2.66 para *B. terrícola*; y Ghosh, Barman, Mukherjee, y Mandal, 2016 que reportan IS de 2.5 para *B. tropica*, 2.37 para *B. unamae* y 2.33 para *B. cepacia*.

Por otro lado, más del 90% del cepario logró captar hierro del medio a través del secuestro de hierro férrico acomplejado (sideróforos). Según la revisión hecha por Thomas, en 2007 las bacterias del género *Burkholderia* han desarrollado diferentes mecanismos para captar el hierro, sintetizando hasta cuatro grupos de familias de sideróforos, entre estos se encuentran: la pioquelina (carboxilato presente en *B. cenocepacia*, *B. vietnamiensis* y *B. pseudomallei*), la ornibactina (sideróforo mixto que contiene hidroxamatos e hidroxicarboxilatos, producida en *B. pseudomallei*, *B. ambifaria*, *B. vietnamiensis*, *B. cepacia*, *B. cenocepacia*), la cepabactina, hidroxamato encontrado en cepas silvestres de *B. cepacia* y *B. vietnamiensis* y la

cepaciaquelina, un catecolato aislado de *B. ambifaria* cepa PHP7 (LMG 11351). Entre ellos, los carboxilatos son los grupos químicos más comunes en los sideróforos del género y los catecoles los menos comunes. Ello concuerda con el experimento realizado pues solo el 25% de las cepas productoras de sideróforos fueron positivas a la síntesis de catecoles.

El experimento que se llevó a cabo en este estudio no concuerda con lo reportado por Caballero-Mellado y cols. 2007 quienes reportan que *B. unamae* no cuenta con la capacidad para generar catecoles. Esto puede deberse a que distintos aislados muestran distintas capacidades para producir este metabolito, pues de los Santos-Villalobos, y cols. (2012), describieron que la cepa tipo *B. cepacia* XXVI solo generaba hidroxamatos y que ninguna cepa de *B. cepacia* tenía la capacidad de hacerlo. Sin embargo, más tarde Esmael *et al.*, 2016 demostró que *B. cepacia* LK29 cuenta con la capacidad para generar catecoles; Rosselló-Mora y Amann, 2001 explica este efecto de discrepancias entre cepas argumentando que, el conocimiento de las especies bacterianas está basado casi siempre en el análisis de un pequeño conjunto de aislados del grupo.

La evaluación de la capacidad de este cepario para producir sideróforos apoya la idea de que el género *Burkholderia* tiene un potencial explotable en cuanto a uso como promotor de crecimiento vegetal, en cuanto a este estudio se sugiere continuar determinando que grupos orgánicos están presentes estructuralmente en los ligandos secretados al medio por medio de espectrometría de masas, tal como sugieren Årstøl y Hohmann-Marriott, 2019, ya que la sensibilidad de detección de la prueba CAS (~80 nmol/L) puede dar origen a falsos negativos.

En cuanto a la producción de amonio por parte del cepario se ha comprobado que la mayoría de las cepas en esta prueba son capaces de liberar amonio, característica útil para su explotación como biofertilizante. No conocemos información cuantitativa sobre la producción de amonio por *Burkholderia spp*, aunque , así como Singha y cols. (2017) reportaron que todos los individuos del género *Burkholderia* evaluados (~más de 30) eran capaces de exudar amonio y esta descrito que realizan esta función normalmente (Groenhagen *et al.*, 2013). Nuestros

resultado se pueden comparar con lo descrito por Ren y cols. (2018) quienes marcan que los valores normales de concentración van desde 1.46 hasta 27.52 mg de amoníaco/kg de suelo, con una contribución promedio de 4 mg amoníaco/kg suelo por día de las bacterias litótrofas nitrificantes; aunque es necesario comprobar si la liberación de amonio al medio se da en condiciones normales en el suelo donde la toma de nutrientes es deficiente a comparación del medio de cultivo *in vitro* y en donde existe competencia por la ingesta de nutrientes.

Dentro del cepario se presentó un alto porcentaje de individuos productores de AIA e indoles relacionados, el 80% del cepario sintetizó y liberó este metabolito cuando estuvo presente su precursor químico, el L-triptófano, destacando la cepa GA2β que produjo una concentración de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, la mayoría de los individuos del cepario exudaron concentraciones entre 30 a 60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de AIA, datos que concuerdan con lo apuntado en literatura. Se ha reportado que las especies del género *Burkholderia* son capaces de exudar concentraciones desde 10 a casi 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de AIA (Rahman *et al.*, 2017), por su parte Singha y cols. (2017) reportan valores similares de producción de AIA, aunque en un caso excepcional la cepa PSBB1 de *Burkholderia cepacia* genera 81.6 $\mu\text{g ml}^{-1}$, cepa que además es capaz de crecer en suelos con altas concentraciones de glifosato (Shahid y Khan, 2018).

El comportamiento de la curva de crecimiento de las plantas inoculadas con el co-inóculo tiene similitud en los primeros 21 días con el crecimiento de las plantas inoculadas con GB70, posterior a los 21 días el crecimiento de las plantas con co-inóculo se asemeja a la curva de las plantas con GB42 ([anexo XIV](#)) este comportamiento puede deberse a una interacción de los cultivos bacterianos con los metabolitos que genera la planta, probablemente giberelinas según su etapa de crecimiento (Gholami *et al.*, 2009), de acuerdo a la fenología de la lechuga es a las 5 o 6 semanas (acorde a las 3 semanas en sistema hidropónico más 3 en semillero) cuando termina la fase de desarrollo de roseta y comienza a desarrollarse la cabeza, ensanchando y curvando hojas (Jenni y Bourgeois, 2008).

Es probable entonces que esta interacción entre las bacterias del co-inóculo brinde los metabolitos necesarios en cada etapa de crecimiento (GB70 durante las

primeras etapas y GB42 en las etapas posteriores), probablemente GB70 aportando fosfato, uno de los tres grandes macronutrientes necesarios para el desarrollo vegetal (Blake *et al.*, 2008) y GB42 produciendo auxinas como el AIA que promueven la elongación de meristemas apicales y raíces, mejorando la toma de nutrientes (Appanna, 2007). Esta hipótesis se puede confirmar visualizando la cantidad residual de nutrientes (sales minerales) solubilizados en los sistemas hidropónicos, mientras que el sistema de GB42 disminuyó considerablemente en nutrientes con respecto al control negativo, el sistema del co-inóculo terminó con más nutrientes de los sistemas hidropónicos que el control y presentó un desarrollo mayor a todos los demás tratamientos [tabla 9](#).

Dados los resultados el tratamiento con GB42 se perfilaría como el tratamiento más efectivo, pero este tuvo una longitud total mayor porque la longitud de sus raíces fue excesivamente mayor, probablemente debido a la liberación de AIA, lo que además incrementó su peso húmedo. Por ello se podría considerar al co-inóculo como el mejor tratamiento, pues a pesar de que no fue superior estadísticamente en ninguna prueba, sí presenta una longitud de planta igual al control y GB42 sin tener consigo la excesiva producción de raíces; esta gran producción de raíces por parte del tratamiento con GB42 llevó a la planta a tener un mayor peso húmedo, pero el co-inóculo fue estadísticamente similar a GB42 en cuanto a peso húmedo sin tener una cantidad excesiva de raíz y significativamente mayor al control negativo.

Además, las plantas crecidas con el co-inóculo en promedio generaron más hojas, tuvieron mayor cantidad de minerales que el control negativo y presentaron características organolépticas similares a la lechuga comercial, cabe destacar que las cinco lechugas usadas en las pruebas organolépticas contaron con la aceptación general de los degustadores.

Sin embargo, es preciso señalar que este proyecto no se midió la carga microbiana de las plantas usadas en el sistema hidropónico, por lo que no se puede asegurar completamente que los cambios observados en el crecimiento de los vegetales fueron causados en su totalidad por el inóculo de las cepas de *Burkholderia sensu*

lato. Es posible que existiera una interacción entre los inóculos y las bacterias nativas de la planta presentes dentro de sus semillas, interacción que pudo o no causar las diferencias percibidas durante el crecimiento de los vegetales.

Los mecanismos PGPB evaluados dejan en claro que el cepario cuenta con potenciales candidatos a ser biofertilizantes. Lamentablemente no existió una cepa que tuviera los máximos valores en cada prueba, parece que cada bacteria está bien adaptada a distintos hábitats y cumple una función muy específica dentro de este, como la cepa GA2 β que logra producir altas concentraciones de AIA, o la cepa GA06, que a pesar de dar positivo a la amplificación del gen *nifH* y presentar diferentes características promotoras de crecimiento fungió como patógeno en las pruebas de germinación.

PERSPECTIVAS

Hay diferentes ámbitos que aún quedan por evaluar, entre ellos los más destacables son:

- Encontrar los mecanismos y posibles rutas bioquímicas por los cuales los individuos del cepario pueden secretar sustancias promotoras de crecimiento vegetal.
- Describir los mecanismos de infección por los cuales GA06 y GB25 causan enfermedad en las plántulas de lechuga.
- Realizar un estudio complejo sobre la diversidad microbiana en las raíces de las plantas a través de su ciclo de vida, evaluando la permanencia del inóculo.
- Estimar la concentración bacteriana en raíces, su presencia en hojas, su interacción y posible antagonismo con patógenos de plantas dentro del sistema hidropónico.
- Evaluar la promoción de crecimiento vegetal con otro tipo de hortalizas, en diferentes épocas del año, y no sólo con los microorganismos fijadores de nitrógeno, sino también con los que resultaron tener valores altos en cada prueba PGPB.

- Comprobar que las cepas PGPB no sean patógenos humanos con capacidad de adquirir y expresar genes que formen parte de islas de patogenicidad.

Todo ello complementaria las acciones realizadas en este proyecto para ofrecer un biofertilizante eficaz, seguro y acorde con las necesidades actuales en el campo.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede manifestar que existen promotores de crecimiento vegetal en el cepario evaluado. En medio de cultivo, la mayoría de las cepas fueron capaces de secretar sideróforos, amonio y posiblemente AIA. Algunas de ellas solubilizaron fosfatos y mostraron actividad fijadora de nitrógeno. Por tanto, en el cepario existen cepas que pudieran ser probadas como biofertilizantes.

En cuanto a las cepas seleccionadas para estudios de crecimiento vegetal se probó que aumentan las características de longitud y peso, tanto en etapa de germinación como en desarrollo vegetal hasta la cosecha. Ello a pesar de que se evaluó el crecimiento en un sistema hidropónico y no en suelo. La obtención de estos valores consumió el objetivo principal del proyecto, encontrando que el co-inóculo evaluado parece ser la mejor opción para usar como biofertilizante, a pesar de no ser el tratamiento con los valores más altos en algunas pruebas.

Aunado al incremento en el desarrollo vegetal, se encontró que la inoculación optimizó el consumo de sales minerales del sistema hidropónico y mejoró el contenido nutricional de la cosecha sin cambiar sus propiedades organolépticas, variables relacionadas directamente, que implican reducción en costes y aumento de la calidad en la planta como producto final.

BIBLIOGRAFÍA

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Amils, R., Viso, M., & Encrenaz, T. (2015). Iron Cycle. In M. Gargaud, W. M. Irvine, R. Amils, H. J. (Jim) Cleaves, D. L. Pinti, J. C. Quintanilla, D. Rouan, T. Spohn, S. Tirard, & M. Viso (Eds.), *Encyclopedia of Astrobiology* (pp. 1261–1263). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-44185-5_810
- Andrews, N. C. (2006). Iron Metabolism. In *Principles of Molecular Medicine* (pp. 848–853). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-963-9_87
- Antonio-Flores, A. L. (2015). *Aislamiento e Identificación de especies pertenecientes al género de Burkholderia sp., en dos regiones del Estado de Puebla*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Antoun, H. (2013). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition* (Vol. 5). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01169-4>
- Aponte, A., Castillo, O., Cabrera, G., Pernia, M., & Hernandez, Y. (2017). Rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Azospirillum* sp. association enhances growth of *Lactuca sativa* L. under tropical conditions. *Journal of Central European Agriculture*, 18(2), 424–440. <https://doi.org/10.5513/JCEA01/18.2.1916>
- Appanna, V. (2007). Efficacy of phosphate solubilizing bacteria isolated from vertisols on growth and yield parameters of sorghum. *Research Journal of Microbiology*.
- Arbestain, M. C., Macías, F., Chesworth, W., Chesworth, W., Spaargaren, O., & Semoka, J. (2008). Nitrogen Cycle. In W. Chesworth (Ed.), *Encyclopedia of Soil Science* (pp. 491–494). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3995-9_381
- Arnow, L. E. (1937). Colorimetric determination of the components of 3,4-Dihydroxyphenylalanine tyrosine mixtures. *Journal of Biological Chemistry*, 86(2225), 531–537. <https://doi.org/10.1126/science.86.2225.176>
- Årstøl, E., & Hohmann-Marriott, M. F. (2019). Cyanobacterial siderophores—physiology, structure, biosynthesis, and applications. In *Marine Drugs*.

<https://doi.org/10.3390/md17050281>

- Azcón-Bieto, J., & Talón, M. (2013). Fundamentos de fisiología vegetal. In *INTERAMERICANA DE ESPAÑA, S. L.* (2nd ed., Vol. 1). Mc Graw Hill.
- Azevedo, J. L., Maccheroni, W., Pereira, J. O., & De Araújo, W. L. (2000). Endophytic microorganisms: A review on insect control and recent advances on tropical plants. In *Electronic Journal of Biotechnology*. <https://doi.org/10.2225/vol3-issue1-fulltext-4>
- Baca, B. E., Soto Urzúa, L., & Pardo Ruíz, M. P. A. (2000). Fijación Biológica del Nitrógeno. *Elementos N° 30*, 43–49.
- Barton, L. L., & Abadia, J. (2006). Iron nutrition in plants and Rhizospheric microorganisms. In *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms*. <https://doi.org/10.1007/1-4020-4743-6>
- Bashkin, V. N. (2006). *Modern Biogeochemistry* (Second edi). Springer. <https://doi.org/doi.org/10.1007/1-4020-4586-7>
- Batista, B. D., Lacava, P. T., Ferrari, A., Teixeira-Silva, N. S., Bonatelli, M. L., Tsui, S., Mondin, M., Kitajima, E. W., Pereira, J. O., Azevedo, J. L., & Quecine, M. C. (2018). Screening of tropically derived, multi-trait plant growth- promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability. *Microbiological Research*, 206(September 2017), 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.09.007>
- Bertini, I., & Rosato, A. (2010). The Role of Metals. In K. N. Timmis (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (Vol. 78, pp. 1025–1044). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_72
- Beukes, C. W., Palmer, M., Manyaka, P., Chan, W. Y., Avontuur, J. R., van Zyl, E., Huntemann, M., Clum, A., Pillay, M., Palaniappan, K., Varghese, N., Mikhailova, N., Stamatis, D., Reddy, T. B. K., Daum, C., Shapiro, N., Markowitz, V., Ivanova, N., Kyrpides, N., ... Steenkamp, E. T. (2018). Corrigendum: Genome data provides high support for generic boundaries in Burkholderia Sensu Lato [Front. Microbiol. 8, (2017), (1154)] doi: 10.3389/fmicb.2017.01154. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAR), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00373>
- Blake, G. R., Steinhardt, G. C., Pombal, X. P., Muñoz, J. C. N., Cortizas, A. M., Arnold, R. W., Schaetzl, R. J., Stagnitti, F., Parlange, J. -Y., Steenhuis, T. S., Chesworth, W.,

- Mualem, Y., Morel-Seytoux, H. J., Spaargaren, O., Chesworth, W., & Soon, Y. K. (2008). Phosphorus Cycle. In W. Chesworth (Ed.), *Encyclopedia of Soil Science* (pp. 547–555). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3995-9_433
- Bontemps, C., Elliott, G. N., Simon, M. F., Dos Reis Júnior, F. B., Gross, E., Lawton, R. C., Neto, N. E., De Fátima Loureiro, M., De Faria, S. M., Sprent, J. I., James, E. K., & Young, J. P. W. (2010). Burkholderia species are ancient symbionts of legumes. *Molecular Ecology*, *19*(1), 44–52. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04458.x>
- Bresinsky, A., Kořner, C., Kadereit, J. W., Neuhaus, G., & Sonnewald, U. (2013). *Strasbourg's Plant Sciences*. Springer. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-642-15518-5_5
- Burris, R. H. (1972). Nitrogen Fixation—Assay Methods and Techniques. *Methods in Enzymology*. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(72\)24088-5](https://doi.org/10.1016/0076-6879(72)24088-5)
- Caballero-Mellado, J., Onofre-Lemus, J., Estrada-De Los Santos, P., & Martínez-Aguilar, L. (2007). The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing Burkholderia species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(16), 5308–5319. <https://doi.org/10.1128/AEM.00324-07>
- Cappuccino., J. G., & Sherman, N. (2014). Microbiology: A Laboratory Manual. In *Clinical application* (Tenth Edit). Pearson.
- Cervantes-Álvarez, I. (2016). *Diversidad y filogenia de Burkholderia sp. aisladas en diferentes regiones del estado de Puebla* [Benemérita Universidad Autónoma de Puebla].
- Chen, W. M., De Faria, S. M., Straliootto, R., Pitard, R. M., Simões-Araújo, J. L., Chou, J. H., Chou, Y. J., Barrios, E., Prescott, A. R., Elliott, G. N., Sprent, J. I., Young, J. P. W., & James, E. K. (2005). Proof that Burkholderia strains form effective symbioses with legumes: A study of novel Mimosa-nodulating strains from South America. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7461-7471.2005>
- Clark, B. L. (2004). *Characterization of a Catechol-Type Siderophore and the Detection of a Possible Outer Membrane Receptor Protein from Rhizobium leguminosarum strain IARI 312*. 1–90.

- Cleaves, H. J. (Jim). (2015). Nitrogen. In M. Gargaud, W. M. Irvine, R. Amils, H. J. (Jim) Cleaves, D. L. Pinti, J. C. Quintanilla, D. Rouan, T. Spohn, S. Tirard, & M. Viso (Eds.), *Encyclopedia of Astrobiology* (pp. 1685–1687). Springer Berlin Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/978-3-662-44185-5_1061
- David Jr, H. M. (2015). The Rhizosphere - Roots , Soil and Everything In Between. *Nature Education Knowledge*.
- De Gregorio, P. R., Michavila, G., Ricciardi Muller, L., de Souza Borges, C., Pomares, M. F., Saccol de Sá, E. L., Pereira, C., & Vincent, P. A. (2017). Beneficial rhizobacteria immobilized in nanofibers for potential application as soybean seed bioinoculants. *PLOS ONE*, 12(5), e0176930. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176930>
- De Los Santos-Villalobos, S., Barrera-Galicia, C., Hernández-Rodríguez, L. E., & Peña-Cabriales, J. J. (2015). Potencial uso agro-biotecnológico de cepas del género Burkholderia aisladas de huertas de mango (*Mangifera indica* L.) v. Ataulfo en México. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 11(2), 78–86.
- de los Santos-Villalobos, S., Barrera-Galicia, G. C., Miranda-Salcedo, M. A., & Peña-Cabriales, J. J. (2012). Burkholderia cepacia XXVI siderophore with biocontrol capacity against Colletotrichum gloeosporioides. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(8), 2615–2623. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1071-9>
- Dirección general de normas. (1978a). NMX-F-066-S-1978. Determinación de cenizas en alimentos. *Norma Oficial Mexicana*, 3–6.
<http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-FF-038-2002.PDF>
- Dirección general de normas. (1978b). NMX-F-089-S-1978. Determinación de extracto etéreo (método Soxhlet) en alimentos. *Norma Oficial Mexicana*, 1–3.
- Dirección general de normas. (1986). NMX-F-083-1986. Determinación de humedad en productos alimenticios. *Norma Oficial Mexicana*, 1–3.
- Dixon, R., & Kahn, D. (2004). Genetic regulation of biological nitrogen fixation. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 2, Issue 8, pp. 621–631).
<https://doi.org/10.1038/nrmicro954>
- Draghi, W. O., Degrossi, J., Bialer, M., Brelles-Mariño, G., Abdian, P., Soler-Bistué, A., Wall, L., & Zorreguieta, A. (2018). Biodiversity of cultivable Burkholderia species in

- Argentinean soils under no-till agricultural practices. *PLoS ONE*, 13(7), 1–18.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200651>
- Eberl, L., & Vandamme, P. (2016). Members of the genus Burkholderia: good and bad guys. *F1000Research*, 5(May), 1007. <https://doi.org/10.12688/f1000research.8221.1>
- Esmaeel, Q., Pupin, M., Kieu, N. P., Chataigné, G., Béchet, M., Deravel, J., Krier, F., Höfte, M., Jacques, P., & Leclère, V. (2016). Burkholderia genome mining for nonribosomal peptide synthetases reveals a great potential for novel siderophores and lipopeptides synthesis. *MicrobiologyOpen*, 5(3), 512–526.
<https://doi.org/10.1002/mbo3.347>
- Esparza, J., Navarro, A., Kendall, P., Fortis, M., Preciado, P., & Meza, J. (2013). Aceptabilidad de lechuga de hoja fresca troceada , tratada con ácido ascórbico mediante hidrocenfriamiento * Acceptability of fresh cut leaf lettuce treated with ascorbic acid applied by hydrocooling Resumen. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 4(5), 767–778.
- Espinosa Manfugás, J., Raúl, C., & Torricella Morales, G. (1999). *Evaluación Sensorial de los Alimentos: Aplicación didáctica*. Editorial Universitaria.
- Estrada-De Los Santos, P., Bustillos-Cristales, R., & Caballero-Mellado, J. (2001). Burkholderia, a Genus Rich in Plant-Associated Nitrogen Fixers with Wide Environmental and Geographic Distribution. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2790–2798. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2790-2798.2001>
- Estrada-de los Santos, P., Palmer, M., Chávez-Ramírez, B., Beukes, C., Steenkamp, E. T., Briscoe, L., Khan, N., Maluk, M., Lafos, M., Humm, E., Arrabit, M., Crook, M., Gross, E., Simon, M. F., dos Reis Junior, F. B., Whitman, W. B., Shapiro, N., Poole, P. S., Hirsch, A. M., ... James, E. K. (2018). Whole genome analyses suggests that Burkholderia sensu lato contains two additional novel genera (Mycetohabitans gen. nov., and Trinickia gen. nov.): Implications for the evolution of diazotrophy and nodulation in the Burkholderiaceae. *Genes*. <https://doi.org/10.3390/genes9080389>
- Estrada-De Los Santos, P., Vinuesa, P., Martínez-Aguilar, L., Hirsch, A. M., & Caballero-Mellado, J. (2013). Phylogenetic analysis of burkholderia species by multilocus sequence analysis. *Current Microbiology*, 67(1), 51–60.
<https://doi.org/10.1007/s00284-013-0330-9>

- Estrada, G. A., Baldani, V. L. D., de Oliveira, D. M., Urquiaga, S., & Baldani, J. I. (2013). Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. *Plant and Soil*, 369(1–2), 115–129. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1550-7>
- Filippelli, G. M. (2009). Phosphorus Cycle. In V. Gornitz (Ed.), *Encyclopedia of Paleoclimatology and Ancient Environments* (pp. 780–783). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4411-3_186
- Fox, J., & Weisberg, S. (2019). *An {R} Companion to Applied Regression* (Third). Sage.
- Garrity, G. M., Bell, J. A., & Lilburn, T. (2005). Class II. Betaproteobacteria class. nov. In D. J. Brenner, N. R. Krieg, & J. T. Staley (Eds.), *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two The Proteobacteria Part C The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria* (Vol. 11, Issue 3, pp. 575–922). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-0-387-29298-4_2
- Gholami, A., Shahsavani, S., & Nezarat, S. (2009). The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. *World Academy of Science, Engineering and Technology*. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1083385>
- Ghosh, R., Barman, S., Mukherjee, R., & Mandal, N. C. (2016). Role of phosphate solubilizing *Burkholderia* spp. for successful colonization and growth promotion of *Lycopodium cernuum* L. (Lycopodiaceae) in lateritic belt of Birbhum district of West Bengal, India. *Microbiological Research*, 183, 80–91. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.011>
- Gijon-Hernandez, A., Teliz-Ortiz, D., Mejia-Sanchez, D., De La Torre-Almaraz, R., Cardenas-Soriano, E., De Leon, C., & Mora-Aguilera, A. (2011). Leaf stripe and stem rot caused by *Burkholderia gladioli*, a new maize disease in Mexico. *Journal of Phytopathology*. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01776.x>
- Gish, W., & States, D. J. (1993). Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/ng0393-266>
- Gordon, S. A., & Weber, R. P. (1951). Colorimetric Estimation of Indoleacetic Acid. *Plant Physiology*, 26(1), 192–195. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90514-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90514-5)

- Groenhagen, U., Baumgartner, R., Bailly, A., Gardiner, A., Eberl, L., Schulz, S., & Weisskopf, L. (2013). Production of Bioactive Volatiles by Different Burkholderia ambifaria Strains. *Journal of Chemical Ecology*, 39(7), 892–906. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0315-y>
- Habashi, F., & City, Q. (2013). *Encyclopedia of Metalloproteins* (R. H. Kretsinger, V. N. Uversky, & E. A. Permyakov (eds.); Vol. 02, Issue Iii). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1533-6>
- Hardy, R. W. F., Holsten, R. D., Jackson, E. K., & Burns, R. C. (1968). The acetylene - ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology*, 43(1968), 1185–1207. <https://doi.org/10.1104/pp.43.8.1185>
- Hartree, E. F. (1972). Determination of protein—Modification of Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, 48, 422–427.
- Hider, R. C., & Kong, X. (2010). Chemistry and biology of siderophores. *Natural Product Reports*, 27(5), 637–657. <https://doi.org/10.1039/b906679a>
- Hofte, M. (1993). Classes of microbial siderophores. In *Iron chelation in plants and soil microorganisms*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-079870-4.50006-5>
- Husen, E. (2003). Screening of Soil Bacteria for Plant Growth Promotion Activities in Vitro. *Indonesian Journal of Agricultural Science*, 4(1), 27–31. <https://doi.org/10.2108/ijas.v4n1.%p>
- Ikuma, H., & Thimann, K. V. (1964). Analysis of Germination Processes of Lettuce Seed by Means of Temperature and Anaerobiosis. *Plant Physiology*, 39(5), 756–767. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=550162&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Jenni, S., & Bourgeois, G. (2008). Quantifying phenology and maturity in crisphead lettuce. *HortTechnology*. <https://doi.org/10.21273/horttech.18.4.553>
- Khambalkar, P., & Sridar, R. (2015). Isolation and characterization of nitrogen fixing burkholderia Sp. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 8(3), 681. <https://doi.org/10.5958/2230-732X.2015.00076.5>
- Khan, M. M. A., Haque, E., Paul, N. C., Khaleque, M. A., Al-Garni, S. M. S., Rahman, M., & Islam, M. T. (2017). Enhancement of Growth and Grain Yield of Rice in Nutrient

- Deficient Soils by Rice Probiotic Bacteria. *Rice Science*, 24(5), 264–273.
<https://doi.org/10.1016/j.rsci.2017.02.002>
- Kraemer, S. M. (2011). Siderophores. *Encyclopedia of Geobiology*, 793–796.
https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9212-1_186
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lagowski, J. J. (2007). Liquid Ammonia. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry*, 37(2), 115–153.
<https://doi.org/10.1080/15533170601187474>
- Lankford, C. E., & Byers, B. R. (1973). Bacterial assimilation of iron. *Critical Reviews in Microbiology*. <https://doi.org/10.3109/10408417309108388>
- Lee, C. J., Lee, J. T., Kwon, J. H., Kim, B. C., & Park, W. (2005). Occurrence of bacterial soft rot of onion plants caused by *Burkholderia gladioli* pv. *alliiicola* in Korea. *Australasian Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1071/AP05024>
- LPSN. (2019). *List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN)*.
<http://www.bacterio.net/paraburkholderia.html>
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria Key Words. *Annual Review of Microbiology*.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>
- Martinko, J. M., Madigan, M. T., & Parker, J. (2004). *Brock, biología de los microorganismos*. (p. 1011).
- Maxton, A., Singh, P., & Masih, S. A. (2018). ACC deaminase-producing bacteria mediated drought and salt tolerance in *Capsicum annuum*. *Journal of Plant Nutrition*.
<https://doi.org/10.1080/01904167.2017.1392574>
- Meek, B. D., Chesworth, W., Spaargaren, O., & Herlihy, M. (2008). Rhizosphere. In W. Chesworth (Ed.), *Encyclopedia of Soil Science* (p. 608). Springer Netherlands.
https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3995-9_487
- Midekssa, M. J., Löscher, C. R., Schmitz, R. A., & Assefa, F. (2016). Phosphate

- solubilization and multiple plant growth promoting properties of rhizobacteria isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.) producing areas of Ethiopia. *African Journal of Biotechnology*, 15(35), 1899–1912. <https://doi.org/10.5897/AJB2015.15172>
- Montes, M. F. (2016). Phosphorus. In M. J. Kennish (Ed.), *Encyclopedia of Estuaries* (p. 484). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8801-4_174
- Muñoz-Rojas, J., Fuentes-Ramírez, L. E., & Caballero-Mellado, J. (2005). Antagonism among *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains in culture media and in endophytic association. *FEMS Microbiology Ecology*. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2005.02.011>
- Nandakumar, R., Rush, M. C., & Correa, F. (2007). Association of *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* with Panicle Blight Symptoms on Rice in Panama. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/pdis-91-6-0767c>
- Nandakumar, Rangaraj, Shahjahan, A. K. M., Yuan, X. L., Dickstein, E. R., Groth, D. E., Clark, C. A., Cartwright, R. D., & Rush, M. C. (2009). *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* cause bacterial panicle blight in rice in the Southern United States. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-9-0896>
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiologic Letters*, 170(436), 265–270. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2011). Principios de bioquímica de Lehninger. In *Principios de bioquímica de Lehninger* (p. 1274). <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Nwanyanrou, C. E., Umeh, S. I., & Sapele, A. (1996). Effect of Phosphate Solubilizing Bacteria on Growth Characteristics of Maize, Beans, and Groubnut in Potted Soil. *Nigerian Journal of Microbiology*, 29, 3159–3166.
- Olivares, J. (2015). Nitrogen Cycle, Biological. In M. Gargaud, W. M. Irvine, R. Amils, H. J. (Jim) Cleaves, D. L. Pinti, J. C. Quintanilla, D. Rouan, T. Spohn, S. Tirard, & M. Viso (Eds.), *Encyclopedia of Astrobiology* (pp. 1687–1688). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-44185-5_1063
- Oliveira, A. L. M., Urquiaga, S., Döbereiner, J., & Baldani, J. I. (2002). The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant*

and Soil, 242(2), 205–215. <https://doi.org/10.1023/A:1016249704336>

- Onofre-Lemus, J., Hernández-Lucas, I., Girard, L., & Caballero-Mellado, J. (2009). ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase activity, a widespread trait in Burkholderia species, and its growth-promoting effect on tomato plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(20), 6581–6590. <https://doi.org/10.1128/AEM.01240-09>
- Ouyang, Y., Norton, J. M., & Stark, J. M. (2017). Ammonium availability and temperature control contributions of ammonia oxidizing bacteria and archaea to nitrification in an agricultural soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 113, 161–172. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.06.010>
- Paganin, P., Tabacchioni, S., & Chiarini, L. (2011). Pathogenicity and biotechnological applications of the genus Burkholderia. *Central European Journal of Biology*, 6(6), 997–1005. <https://doi.org/10.2478/s11535-011-0072-2>
- Pallud, C., Viillard, V., Balandreau, J., Normand, P., & Grundmann, G. (2001). Combined use of a specific probe and PCAT medium to study Burkholderia in soil. *Journal of Microbiological Methods*. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(01\)00287-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(01)00287-1)
- Pande, A., Pandey, P., Mehra, S., Singh, M., & Kaushik, S. (2017). Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(2), 379–391. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.06.005>
- Pandey, P., & Maheshwari, D. K. (2007). Bioformulation of Burkholderia sp. MSSP with a multispecies consortium for growth promotion of *Cajanus cajan*. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(2), 213–222. <https://doi.org/10.1139/w06-118>
- Pedraza, L. A., Bautista, J., & Uribe-Vélez, D. (2018). Seed-born burkholderia glumae infects rice seedling and maintains bacterial population during vegetative and reproductive growth stage. *Plant Pathology Journal*. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.02.2018.0030>
- Peñaloza, P., Ramirez-Rosales, G., McDonald, M. B., & Bennett, M. A. (2005). Lettuce (*Lactuca sativa* L.) seed quality evaluation using seed physical attributes, saturated salt accelerated aging and the seed vigour imaging system. *Electronic Journal of Biotechnology*, 8(3), 299–307. <https://doi.org/10.2225/vol8-issue3-fulltext-11>

- Pepper, I. L., Gerba, C. P., & Gentry, T. J. (2014). Environmental Microbiology: Third Edition. In *Environmental Microbiology: Third Edition*.
- Perin, L., Martinez-Aguilar, L., Castro-Gonzalez, R., Estrada-de los Santos, P., Cabellos-Avelar, T., Guedes, H. V, Reis, V. M., & Caballero-Mellado, J. (2006). Diazotrophic Burkholderia Species Associated with Field-Grown Maize and Sugarcane. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3103–3110.
<https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3103-3110.2006>
- Poly, F., Monrozier, L. J., & Bally, R. (2001). Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of nifH genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology*, 152(1), 95–103. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(00\)01172-4](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(00)01172-4)
- R Core Team. (2019). *R: A Language and Environment for Statistical Computing* (R version 3.6.1 (2019-07-05)). R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>
- Rahman, C. H., Ahcene, B., Miloud, B., & Rachid, D. (2017). Screening and characterization of plant growth promoting traits of phosphate solubilizing bacteria isolated from wheat rhizosphere of Algerian saline soil. In *Malaysian Journal of Microbiology* (Vol. 13, Issue 2, pp. 124–131).
- Ratledge, C. (1983). Microbiology: An introduction. *Trends in Biotechnology*.
[https://doi.org/10.1016/0167-7799\(83\)90064-1](https://doi.org/10.1016/0167-7799(83)90064-1)
- Ren, M., Zhang, Z., Wang, X., Zhou, Z., Chen, D., Zeng, H., Zhao, S., Chen, L., Hu, Y., Zhang, C., Liang, Y., She, Q., Zhang, Y., & Peng, N. (2018). Diversity and contributions to nitrogen cycling and carbon fixation of soil salinity shaped microbial communities in Tarim Basin. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAR), 1–14.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00431>
- Resh, H. (2012). Nutrient Film Technique. In *Hydroponic Food Production*.
<https://doi.org/10.1201/b12500-7>
- Restrepo-Franco, G. M., Marulanda-Moreno, S., de la Fe-Pérez, Y., Díaz-de la Osa, A., Lucia-Baldani, V., & Hernández-Rodríguez, A. (2015). Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 46(1), 63–76.
<http://proxy.timbo.org.uy:443/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct>

=true&db=a9h&AN=108658147&lang=es&site=eds-live

- Richardson, A. E., & Simpson, R. J. (2011). Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability Update on Microbial Phosphorus. *Plant Physiology*, 156(3), 989–996. <https://doi.org/10.1104/pp.111.175448>
- Rodriguez, H., & Fraga, R. (2013). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.*, 17, 319–339.
- Rodríguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T., & Bashan, Y. (2006). Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil*, 287(1–2), 15–21. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9056-9>
- Rosselló-Mora, R., & Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(00\)00040-1](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(00)00040-1)
- Salles, J. F., Samyn, E., Vandamme, P., Van Veen, J. A., & Van Elsas, J. D. (2006). Changes in agricultural management drive the diversity of Burkholderia species isolated from soil on PCAT medium. *Soil Biology and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.06.018>
- Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophore. *Analytical Biochemistry*, 160, 47–56.
- Shahid, M., & Khan, M. S. (2018). Glyphosate induced toxicity to chickpea plants and stress alleviation by herbicide tolerant phosphate solubilizing Burkholderia cepacia PSBB1 carrying multifarious plant growth promoting activities. *3 Biotech*. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1145-y>
- Singha, B., Mazumder, P. B., & Pandey, P. (2017). Characterization of plant growth promoting rhizobia from root nodule of Mimosa pudica grown in Assam, India. *Journal of Environmental Biology*, 38(3), 441–447. <https://doi.org/10.22438/jeb/38/3/MS-243>
- Smirnov, A. (2015). Ammonia. In M. Gargaud, W. M. Irvine, R. Amils, H. J. (Jim) Cleaves, D. L. Pinti, J. C. Quintanilla, D. Rouan, T. Spohn, S. Tirard, & M. Viso (Eds.), *Encyclopedia of Astrobiology* (pp. 86–87). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-44185-5_1741
- Smith, B. E. (2002). Nitrogenase reveals its inner secrets. In *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1076659>

- Suárez-Moreno, Z. R., Caballero-Mellado, J., Coutinho, B. G., Mendonça-Previato, L., James, E. K., & Venturi, V. (2012). Common Features of Environmental and Potentially Beneficial Plant-Associated Burkholderia. *Microbial Ecology*, 63(2), 249–266. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9929-1>
- Thomas, M. S. (2007). Iron acquisition mechanisms of the Burkholderia cepacia complex. *BioMetals*, 20(3–4), 431–452. <https://doi.org/10.1007/s10534-006-9065-4>
- Vega-Aguilar, S. (2015). *Aislamiento e Identificación de especies pertenecientes al género Burkholderia, en tres regiones del Estado de Puebla* [Benemérita Universidad Autónoma de Puebla].
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255, 571–586. <https://doi.org/10.1023/a:1026037216893>
- Wang, B., Mei, C., & Seiler, J. R. (2015). Early growth promotion and leaf level physiology changes in Burkholderia phytofirmans strain PsJN inoculated switchgrass. *Plant Physiology and Biochemistry*, 86, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.11.008>
- Wang, Q., Gao, S., Ma, X., Mao, X., He, L., & Sheng, X. (2018). Distinct mineral weathering effectiveness and metabolic activity between mineral-weathering bacteria Burkholderia metallica F22 and Burkholderia phytofirmans G34. In *Chemical Geology* (Vol. 489, pp. 38–45). <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2018.05.016>
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
- Wickham, H. (2007). Reshaping Data with the {reshape} Package. *Journal of Statistical Software*, 21, 1–20.
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.
- Wun-cheng, W., Joseph, W. G., & Lower, W. R. (1991). *Plants for Toxicity Assessment: Second Volume* (J. Gorsuch, W. Lower, M. Lewis, S. Sandhu, & W. Wang (eds.)). ASTM International. <https://doi.org/10.1520/STP1115-EB>
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., & Arakawa, M. (1992). Proposal of Burkholderia a gen. nov. and Transfer of Seven

Species of the Genus *Pseudomonas* Homology Group II to the New Genus, with the Type Species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb.nov. *Microbiol. Immunology*, 36(12), 1251–1275.

Zhao, K., Penttinen, P., Zhang, X., Ao, X., Liu, M., Yu, X., & Chen, Q. (2014). Maize rhizosphere in Sichuan, China, hosts plant growth promoting *Burkholderia cepacia* with phosphate solubilizing and antifungal abilities. *Microbiological Research*, 169(1), 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.07.003>

ANEXOS

Medios de cultivo

I. Agar Baz

Reactivo	1L
Ácido succínico	2 g
K ₂ HPO ₄	0.4 g
KH ₂ PO ₄	0.4 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
CaCl ₂	0.02 g
Na ₂ MoO ₄	0.002 g
FeCl ₃	0.01 g
Azul de Bromotimol	0.075 g
Agar	2.3 g

pH=5.7

II. Agar Luria-Bertani modificado

Reactivo	1L
Extracto de levadura	5 g
Peptona de caseína	10 g
Ácido succínico	0.05 g (0.05%)
Agar	17 g

pH=7.0

III. Agar Luria-Bertani modificado para viales

Reactivo	1L
Extracto de levadura	5 g
Peptona de caseína	10 g
Ácido succínico	0.05 g (0.05%)
Glicerol	25 mL (2.5%)
Agar	17 g

pH=7.0

IV. Caldo NBY

Reactivo	1L
Extracto de levadura	2 g
N broth	8 g
K ₂ HPO ₄	2 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
Glucosa	Glucosa
N Broth	
Glucosa	1 g
Peptona	15 g
NaCl	6 g
Extracto de levadura	3 g
pH=7.0	

V. Caldo Luria-Bertani modificado

Reactivo	1L
Extracto de levadura	5 g
Peptona de caseína	10 g
Ácido succínico	0.05 g (0.05%)
pH=7.0	

VI. Caldo Luria-Bertani modificado + glicerol

Reactivo	1L
Extracto de levadura	5 g
Peptona de caseína	10 g
Ácido succínico	0.05 g (0.05%)
Glicerol	300 mL (30%)
pH=7.0	

VII. Medio mínimo M9

Reactivo	1 L
Cloruro férrico (6.4g/L)	1 mL
Goodies	2.5 mL
Ácido succínico o azelaico (0.05g/L)	25 mL
Solución 10xM9	100mL
MgSO ₄ ·7H ₂ O 1M	1 mL
Agua	870.5 mL
Agar (opcional)	15g/L
Goodies (1 L)	
ZnCl ₂	50 mg
MnCl ₂	30 mg
BO ₃ OH	300 mg
CoCl ₂	200 mg
CuCl ₂ ·2H ₂ O	10 mg
NiCl ₂ ·6H ₂ O	20 mg
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	30 mg
Solución 10xM9	
Na ₂ HPO ₄	70 g
KH ₂ PO ₄	30 g
NaCl	5 g
NH ₄ Cl	10 g

VIII. National Botanical Research Institute's Phosphate Growth Medium (Medio NBRIP)

Reactivo	1L
MgCl ₂ ·6H ₂ O	5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O (10%)	2.5 mL

KCl (10%)	2 mL
NH ₄ SO ₄ (10%)	1 mL
Ca ₃ PO ₄ ₂	5 g
Glucosa	9 g
Agar	16 g
Azul de bromotimol	6 mL
pH=7.0	

Tablas, gráficas y apoyos visuales

IX. Cálculo del índice de solubilización de fosfatos.

Se muestran los valores obtenidos en el experimento y la forma en que se pueden usar para resolver el índice de solubilización. Se destaca que existen 6 cepas con un índice de solubilización mayor a dos

Cepa	Cálculos para la obtención del índice de solubilización.		
	DT	DC	IS
20 (control +)	21.67	11.33	1.91
GA01	27.34	10	2.73
GA10	19.34	10	1.93
GA29	23.34	10	2.33
GB70	20.67	13.33	1.55
GB91	23.67	9.67	2.45
GB99	21.33	9.33	2.29
D335	21.01	9.67	2.17
D336	19.83	9.83	2.02
D416	16.67	9.33	1.79

X. Sales minerales usadas en los sistemas hidropónicos

Concentración de las sales minerales usadas en cada uno de los 4 sistemas hidropónicos. Las sales usadas tuvieron una pureza grado investigación.

Sales usadas	Concentración en ppm	Nutriente aportado
Nitrato de potasio (KNO ₃)	165	NO ₃
Nitrato de calcio (Ca(NO ₃) ₂)		

Sulfato de amonio ((NH ₄) ₂ SO ₄)	29.64	NH ₄
Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)	50	PO ₄
Fosfato dihidrógeno cálcico (Ca(H ₂ PO ₄) ₂)	210	K
Nitrato de potasio (KNO ₃)	200	Ca
Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)	60	Mg
Nitrato de calcio (Ca (NO ₃) ₂)	113	SO ₄
Fosfato dihidrógeno cálcico (Ca(H ₂ PO ₄) ₂)	5	Fe
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ -7H ₂ O)	0.5	Mn
Sulfato de amonio ((NH ₄) ₂ SO ₄)	0.1	Cu
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ -7H ₂ O)	0.1	Zn
Cloruro Férrico (FeCl ₃ -6H ₂ O)	0.5	B
Cloruro Manganoso (MnCl ₂ -4H ₂ O)	0.05	Mo
Sulfato de cobre (CuSO ₄ -5H ₂ O)		
Cloruro de Zinc (ZnCl ₂)		
Ácido Bórico (H ₃ BO ₃)		
Molibdato de sodio (Na ₂ MoO ₄)		

XI. Secuencias de dinitrogenasa

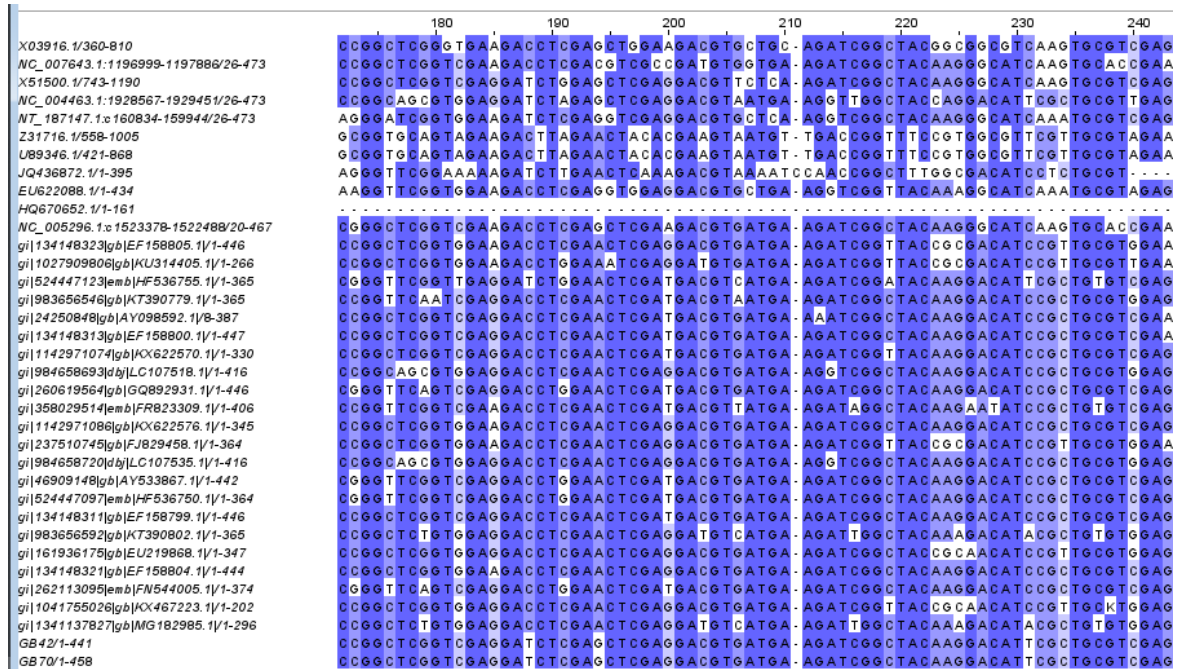
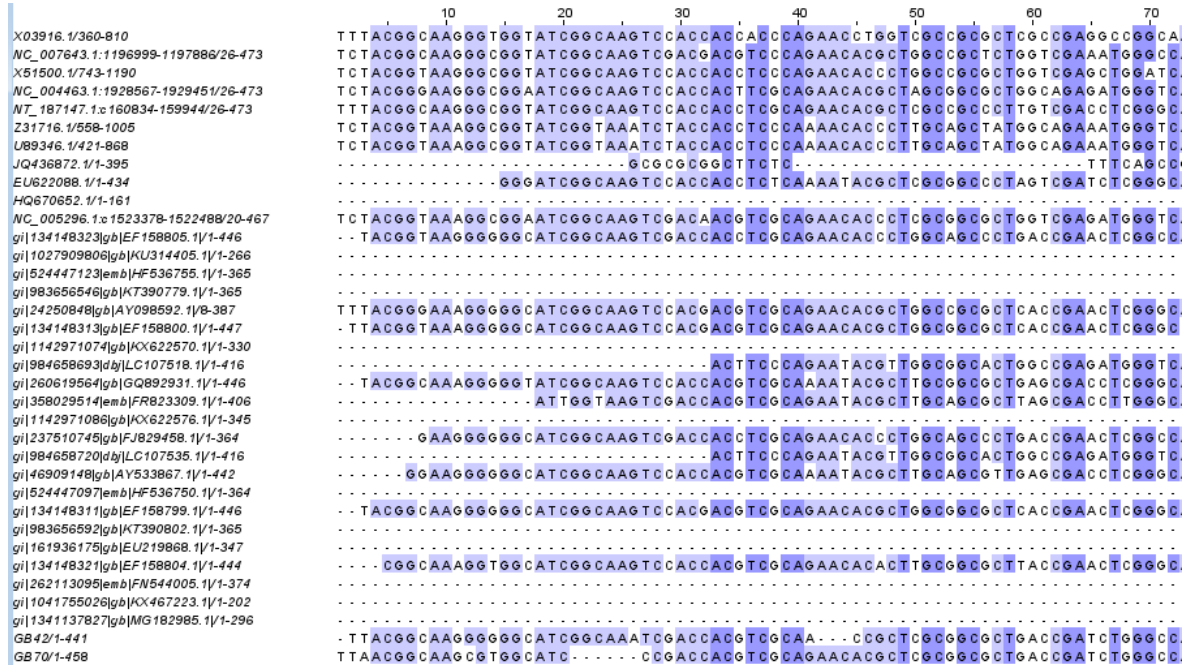
Números de acceso y el nombre de las secuencias usadas para el alineamiento múltiple de nitrogenasas con los fragmentos obtenidos del gen *nifH*.

Secuencias de nitrogenasas obtenidas en NCBI	
Número de acceso en base de datos NCBI	Nombre de la secuencia
U89346.1/1-1450	<i>Anabaena variabilis</i> dinitrogenase reductase (<i>nifH</i>) gene, complete cds
X51500.1/1-1826	<i>Azospirillum brasilense</i> <i>NifH</i> gene
X03916.1/1-1654	<i>Azotobacter chroococcum</i> MCD 1 <i>nifH</i> * gene for nitrogenase iron protein
NC_004463.1:1928567-1929451/1-885	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110 chromosome, complete genome <i>nifH</i>
gi 524447123 emb HF536755.1 /1-365	<i>Burkholderia caribensis</i> partial <i>nifH</i> gene for nitrogenase reductase, strain SMF 362_13
gi 262113095 emb FN544005.1 /1-569	<i>Burkholderia diazotrophica</i> partial <i>nifH</i> gene for nitrogenase reductase, strain JPY389
gi 134148311 gb EF158799.1 /1-855	<i>Burkholderia ferrariae</i> strain FeGI01 nitrogenase reductase (<i>nifH</i>) gene, partial cds
gi 983656592 gb KT390802.1 /1-375	<i>Burkholderia nodosa</i> strain BRUESC929 nitrogenase reductase (<i>nifH</i>) gene, partial cds
gi 260619564 gb GQ892931.1 /1-855	<i>Burkholderia phymatum</i> strain GR01 <i>NifH</i> (<i>nifH</i>) gene, partial cds
gi 237510745 gb FJ829458.1 /1-364	<i>Burkholderia phytofirmans</i> strain RFNB11 nitrogenase iron protein (<i>nifH</i>) gene, partial cds
gi 161936175 gb EU219868.1 /1-524	<i>Burkholderia rhynchosiae</i> strain WSM3930 <i>NifH</i> (<i>nifH</i>) gene, partial cds

gi 524447097 emb HF536750.1 /1-364	<i>Burkholderia sabiae</i> partial <i>nifH</i> gene for nitrogenase reductase, strain STM 7315
gi 983656546 gb KT390779.1 /1-375	<i>Burkholderia sartisoli</i> strain BRUESC853 nitrogenase reductase (<i>nifH</i>) gene, partial cds
gi 46909148 gb AY533867.1 /1-658	<i>Burkholderia</i> sp. Br3407 <i>NifH</i> (<i>nifH</i>) gene, partial cds
gi 134148313 gb EF158800.1 /1-856	<i>Burkholderia tropica</i> strain MTo-293 nitrogenase reductase (<i>nifH</i>) gene, partial cds
gi 24250848 gb AY098592.1 /1-387	<i>Burkholderia tropica</i> strain Ppe8 <i>NifH</i> gene, partial cds
gi 358029514 emb FR823309.1 /1-406	<i>Burkholderia tuberum</i> partial <i>nifH</i> gene for nitrogen fixation protein H, strain STM4801
gi 134148321 gb EF158804.1 /1-853	<i>Burkholderia unamae</i> strain MTI-641 nitrogenase reductase (<i>nifH</i>) gene, partial cds
gi 134148323 gb EF158805.1 /1-855	<i>Burkholderia xenovorans</i> strain CAC124 nitrogenase reductase (<i>nifH</i>) gene, partial cds
Z31716.1/1-2465	<i>Nostoc</i> PCC 6720 <i>nifH</i> , <i>nifD</i> , <i>nifU</i> genes
JQ436872.1/1-471	<i>Paenibacillus durus</i> strain Tex01-S4 nitrogenase iron protein (<i>nifH</i>) gene, partial cds
gi 984658693 dbj LC107518.1 /1-680	<i>Paraburkholderia fungorum</i> <i>nifH</i> gene for nitrogenase iron protein, partial cds, strain: VTr32
gi 984658720 dbj LC107535.1 /1-680	<i>Paraburkholderia phytofirmans</i> <i>nifH</i> gene for nitrogenase iron protein, partial cds, strain: VL21
gi 1341137827 gb MG182985.1 /1-296	<i>Paraburkholderia</i> sp. strain BSB_MCL1 nitrogenase reductase (<i>nifH</i>) gene, partial cds
gi 1041755026 gb KX467223.1 /1-202	<i>Paraburkholderia spreintiae</i> strain H6c3a nitrogenase reductase (<i>nifH</i>) gene, partial cds
gi 1142971074 gb KX622570.1 /1-330	<i>Paraburkholderia tropica</i> strain S39-2 dinitrogenase reductase (<i>nifH</i>) gene, partial cds
gi 1142971086 gb KX622576.1 /1-345	<i>Paraburkholderia unamae</i> strain S51-2 dinitrogenase reductase (<i>nifH</i>) gene, partial cds
gi 1027909806 gb KU314405.1 /1-266	<i>Paraburkholderia xenovorans</i> strain SN0305 nitrogenase iron protein (<i>nifH</i>) gene, partial cds
EU622088.1/1-725	<i>Rhizobium etli</i> strain CCBAU 65708 dinitrogenase reductase (<i>nifH</i>) gene, partial cds
HQ670652.1/1-468	<i>Rhizobium phaseoli</i> strain ATCC 14482 dinitrogenase reductase protein (<i>nifH</i>) gene, partial cds
NC_005296.1:c1523378-1522488/1-891	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> CGA009 complete genome
NC_007643.1:1196999-1197886/1-888	<i>Rhodospirillum rubrum</i> ATCC 11170 chromosome, complete genome <i>nifH</i>
NT_187147.1:c160834-159944/1-891	<i>Sinorhizobium fredii</i> HH103 plasmid pSfHH103d partial sequence, fragment 2

XII. Alineamiento de nitrogenasas

Ayuda visual para observar la identidad de las secuencias de GB42 y GB70 con otras secuencias de nitrogenasas. Mientras mas oscuro es el color mayor identidad nucleotidica existe entre las secuencias, GB42 y GB70 se encuentran en las ultimas dos filas de cada imagen, se muestran dos imágenes, la primera corresponde al inicio de las secuencias y la segunda a una parte intermedia de ellas. Se usò Jalview para hacer estas observaciones.



XIII. Tabla compiladora de pruebas

Esta tabla compila los resultados de todas las pruebas de caracterización de mecanismos PGPB y sirvió para elegir a los candidatos con mayor potencial biotecnológico. Se muestra la tabla compiladora con los valores obtenidos en cada prueba para las 45 cepas y un mapa de calor para visualizar rápidamente a las cepas con mejores resultados en cada prueba.

Tabla comparativa de pruebas PGPB realizadas en el cepario									
Cepa	Capacidad para solubilizar fosfato inorgánico (índice de solubilización)	Productora de sideróforos	Producción de anillo catecol	Producción de amonio	Concentración de amonio en mg/mL	Productor de AIA	Concentración de AIA en $\mu\text{mol/mL}$	Portador del gen <i>nifH</i>	Candidatas
GA01	2.29	+	-	+	0.5	+	12.65	-	+
GA2 β	-	+	-	+	1	+	111.55	-	
GA04	-	+++	+	+	1.5	+	42.30	-	
GA06	-	+	+	+	1.5	+	70.71	+	+
GA10	1.93	+	-	+	0.5	+	18.01	-	+
GA29	2.33	+	-	+	0.5	+	12.22	-	+
GB23	-	+	-	-	0	-	2.66	-	
GB25	-	+	+	+	1	+	25.97	+	+
GB33	-	+	-	+	0.5	+	16.38	-	
GB34	-	+	+	+	0.5	+	54.05	-	
GB42	-	+	-	+	0.5	+	43.65	+	+
GB45	-	++	-	+	0.5	+	24.32	-	
GB51	-	++	+	+	1	+	10.87	-	
GB53	-	-	-	+	0.25	-	2.50	-	
GB62	-	+	-	+	0.5	+	18.66	-	
GB70	1.55	+	-	+	0.5	+	17.11	+	+
GB81	-	+	-	+	0.5	+	23.05	-	
GB87	-	+	-	+	1.5	+	6.09	-	
GB90	-	+	-	+	0.5	+	15.88	-	
GB91	2.45	+	-	+	1	+	11.07	-	+
GB93	-	+	-	+	1	+	19.94	-	
GB94	-	+++	-	+	0.5	+	41.49	+	+
GB99	2.29	+	+	+	1.5	+	40.39	-	+
GB100	-	+	-	+	1	+	11.10	-	
GB127	-	+	+	+	1	-	12.11	-	
GB130	-	+	+	+	0.5	+	53.47	-	
GB137	-	-	-	+	0.5	+	30.35	-	
GB148	-	+	-	+	1	-	2.22	-	

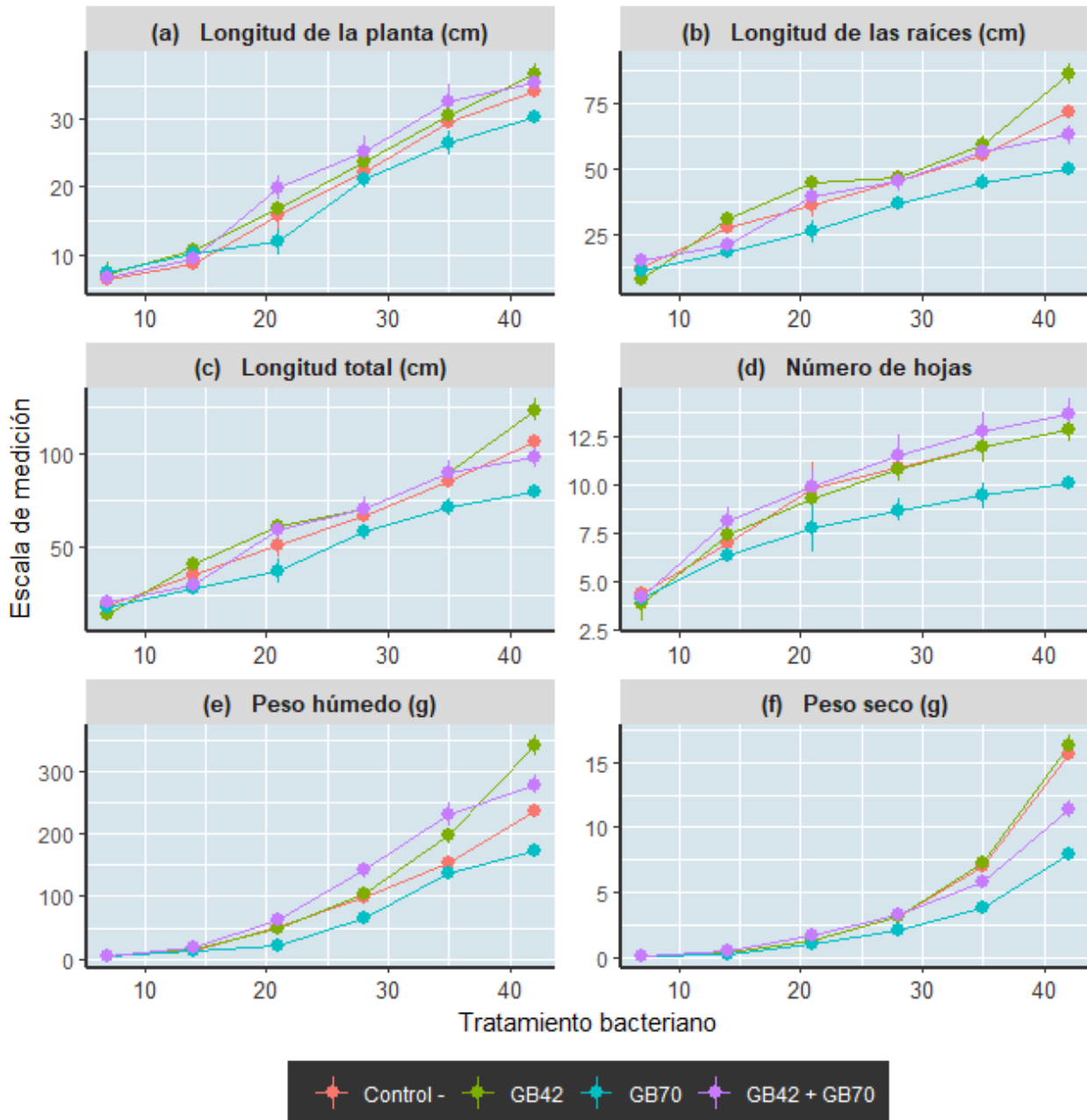
GB148A	-	+	-	+	1	-	10.50	-	
GB152	-	+	-	+	0.5	+	37.58	-	
GB169	-	+	-	+	1.5	+	54.57	-	
GB183	-	+	-	+	1	+	14.79	-	
GB190	-	-	-	+	1	-	5.29	-	
GB196	-	+	-	+	1	-	2.79	-	
GB197	-	+	-	+	0.25	+	7.22	-	
GB203	-	+	-	+	1.5	-	5.76	-	
D328	-	+	-	+	1	+	7.09	-	
D335	2.17	+	-	+	1	+	23.99	-	+
D336	2.02	+++	-	+	0.5	+	17.30	-	+
D409	-	++	+	+	0.5	+	14.22	-	
D411	-	-	-	+	0.5	+	39.67	-	
D416	1.79	+	-	+	0.5	+	29.18	-	+
D422	-	+	-	+	1	+	42.07	-	
D424	-	-	-	+	1	+	44.94	-	
D425	-	-	-	-	0	+	12.00	-	

XIV. Seguimiento del crecimiento en hidropónia

Gráfico que muestra los parámetros de medición en las plantas a través del tiempo desde el inicio del crecimiento en el sistema hidropónico hasta la cosecha en el día 42. Se puede observar un comportamiento similar entre el co-inóculo GB42 + GB70 y las gráficas individuales de GB42 y GB70.

Resultados de crecimiento en hidroponia

Gráfico de puntos por medición



XV. Hoja de evaluación organoléptica

Hoja de evaluación organoléptica entregada a los panelistas.

Fecha _____

Para la muestra recibida pruebe las 5 porciones de lechuga presentadas y complete la tabla con la siguiente escala numérica.

1 Me disgusta extremadamente, 2 Me disgusta mucho, 3 Me disgusta ligeramente, 4 Ni me gusta ni me disgusta, 5 Me gusta ligeramente, 6 Me gusta mucho, 7 Me gusta extremadamente

Lechuga	Apariencia	Color	Olor	Sabor	Textura
1					
2					
3					
4					
5					

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

- I. ACC: 1-Aminociclopropano-1-Carboxilato
- II. ARA: Ensayo de reducción de acetileno
- III. B.: Género *Burkholderia*
- IV. Bp: Pares de bases (Base pairs)
- V. CAS: Cromazurol S
- VI. Complejo BCC: Complejo *Burkholderia cenocepacia*
- VII. DC: Diámetro de la colonia
- VIII. ddH₂O: Agua bidestilada
- IX. DH: Diámetro del halo de solubilización
- X. DO: Densidad Óptica
- XI. DT: Diámetro total
- XII. h: horas
- XIII. HDTMA: Bromuro de hexadeciltrimetilamoniacó
- XIV. IS: Índice de solubilización
- XV. M: Molaridad química/ concentración molar
- XVI. Mb: Mega pares de bases
- XVII. mM: Concentración milimolar
- XVIII. MM9: Medio mínimo M9
- XIX. Mr: Masa molecular relativa
- XX. mg: Miligramos
- XXI. mL: Mililitros
- XXII. N: Normalidad química/ concentración normal
- XXIII. NCBI: The National Center for Biotechnology Information
- XXIV. L: Litros
- XXV. LB: Medio nutritivo Luria-Bertani o Lysogeny broth
- XXVI. PBE: Plant-associated beneficial and environmental group
- XXVII. PCR: Polimerase Chain Reaction
- XXVIII. PGPB: Bacterias promotoras de crecimiento vegetal (Plant Growing Promoting Bacteria).
- XXIX. pM: Concentración pico molar
- XXX. PO₄³⁻: Ion fosfato
- XXXI. Rpm: Revoluciones por minuto
- XXXII. rRNA: Ácido ribonucleico ribosomal
- XXXIII. µL: Microlitros
- XXXIV. %G+C: Porcentaje Guanina - Citocina