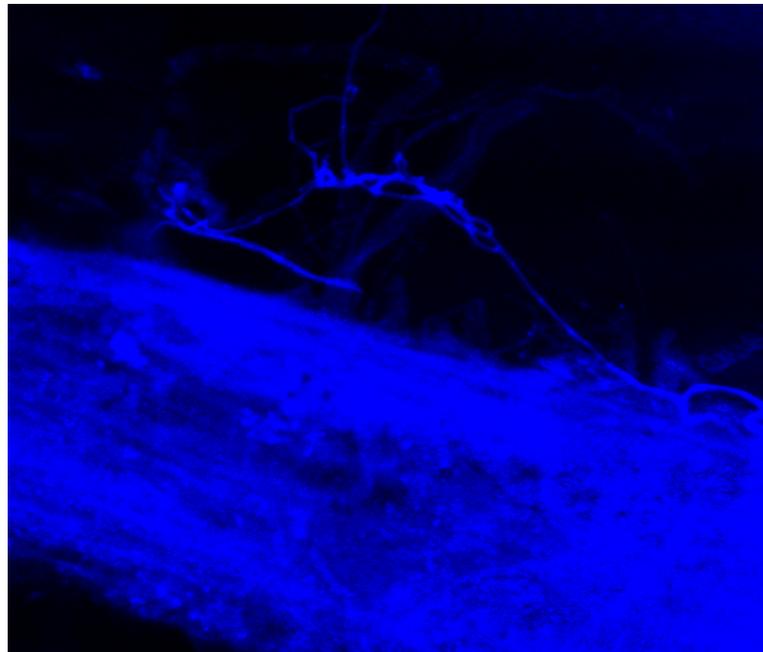




**Evaluación de caracteres PGPR en
Actinomicetos e Interacciones de estas
Rizobacterias con Hongos Formadores De
Micorrizas**



Marcela Franco Correa

Granada, 2008

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Marcela Franco Correa
D.L.: GR. 2750-2008
ISBN: 978-84-691-8252-9

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Fisiología Vegetal

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
ESTACION EXPERIMENTAL DEL ZAIDIN
Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos



**EVALUACIÓN DE CARACTERES PGPR EN
ACTINOMICETOS E INTERACCIONES DE ESTAS
RIZOBACTERIAS CON HONGOS FORMADORES DE
MICORRIZAS**

Tesis Doctoral

Marcela Franco Correa

Granada, 2008

**EVALUACIÓN DE CARACTERES PGPR EN
ACTINOMICETOS E INTERACCIONES DE ESTAS
RIZOBACTERIAS CON HONGOS FORMADORES DE
MICORRIZAS**

**Memoria que presenta la Licenciada
Marcela Franco Correa
para optar al grado de Doctor.**

Fdo.: Marcela Franco Correa

**Vº Bº
Director del trabajo**

**Fdo.: José-Miguel Barea Navarro
Profesor de Investigación del CSIC**

El trabajo experimental de investigación que se expone en la presente Memoria de Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín (C.S.I.C.), Granada-España, y en el Departamento de Microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá-Colombia. Fue financiado por la Vicerrectoría Académica de la Pontificia Universidad Javeriana con los proyectos de investigación 1441, 1608 y 040

***“Una búsqueda comienza siempre
con la suerte del principiante
y termina con la prueba
del conquistador”***

Paulo Coelho.

A mis padres y hermana

Agradecimientos

Cuando se hace algo en la vida que se convierte en un reto personal mas que en cualquier tipo de meta culminada, la satisfacción que se siente es infinita, y aprovecho este espacio para hacerles partícipe de esta alegría y agradecerles a todas las personas que recorrieron este largo camino cerca de mi. A quienes vieron la transición de la Marcela que comenzó a la que terminó.

Al Dr. José Miguel Barea, quien me dio la oportunidad de seguir y confió en mi sueño. Por su dedicación en los momentos en que más lo necesité, su paciencia y constancia en lograr que esto llegara a su fin.

A la Dra. Carmen Lluch-Plà, quien estuvo siempre apoyándome, pendiente de lo que necesitaba y dándome el ánimo para no bajarle el ritmo a mi trabajo.

Al Dr. Alberto Gómez, que siempre confió en que llegaría a este punto, me aconsejó y nunca me dejó desistir de mi sueño.

A la Vicerrectoría Académica de la Pontificia Universidad Javeriana, quien me apoyó laboral y económicamente en la ejecución de los proyectos de investigación que hicieron parte de esta tesis doctoral.

A la Dra. Susana Florentino, mi jefe y gran amiga, quien con sus palabras y apoyo incondicional, permitió que compaginara mi trabajo con el desarrollo experimental de esta tesis.

A la Dra. Maria Ximena Rodríguez, que con sus asesorías técnicas se logró gran parte del desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Juan Sanjuán, quien me permitió aprender algunas de las técnicas que aquí se desarrollaron, a su asesoría, sus consejos y su apoyo incondicional.

A la Dra. Maria José Lorite, quien me enseñó técnicas importantes para este trabajo, tuvo paciencia durante el entrenamiento y me abrió su corazón brindándome mucho cariño durante mi estancia.

A la Dra. Rosario Azcón, quien me asesoró en algunas de las técnicas aquí desarrolladas, una persona con un gran corazón que estuvo pendiente de mí cuando llegué a España.

A la Dra. Concepción Azcón, quien me guió en mis inicios en el trabajo con micorrizas y me dio la oportunidad de aprender de estos microorganismos.

A la Dra. Mayra Gavito, quien me enseñó el mundo de las micorrizas, a trabajar con ellas y a interpretar su comportamiento.

A los laboratorios e instituciones que donaron las diferentes cepas utilizadas como control en los diferentes ensayos: Laboratorio de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Sao Paulo (Brasil), CORPOICA, Universidad Militar Nueva Granada (Dr. José Fernando Mikán) y al Lab. de Biotecnología de la Pontificia Universidad Javeriana, especialmente a la Dra. Aura Marina Pedroza, por sus consejos y asesorías. Al Laboratorio de Herpetología de la Pontificia Universidad Javeriana por el préstamo del programa Arc View GIS versión 3.1®.

A Gladys Cardona quien me colaboró en la asesoría técnica de algunos de los análisis realizados.

A Paqui, por sus palabras, sus consejos, su gran ayuda en la parte final de este trabajo, por su amistad.

A mis grandes amigos que me han acompañado durante este largo proceso, a quienes me apoyaron en los momentos más difíciles vividos en el inicio de este largo camino, a quienes siempre que regreso encuentro con los brazos abiertos, igual que ayer, como si no pasara el tiempo, quienes me han escuchado, me han divertido y me han animado todo el tiempo, a quienes considero mi familia española: Carmela, Iván, Adriana, Carlos, Nieves, Alejandro, Belén, Diana, Vanesa, Bea; y Pablo que en la distancia, siempre está presente.

A mis amigos más recientes que siempre tuvieron una palabra de apoyo o una sonrisa de ánimo: Carol, Jesús, Paloma, Sandra, Helena, Ismael, Mari Carmen, Ricardo, y mi compañerita de “absolut” Gloria.

A mis amigos de Colombia que me acompañaron en mis largas semanas sin descanso, me animaron, me empujaron y siempre estuvieron ahí para darme una mano: Martha, Juan David, Carolina, Mónica, Lore, Carlos Manuel, Andrés, Hugo, Juvenal, Carmen I. y Mary.

A mis estudiantes: Angélica, Christian, Mazo, Gutiérrez, Ortiz, Diana, Lorena, Lucy, Lina, Juanita, José y Susana, que sin su acompañamiento este camino se hubiera hecho eterno.

Y por último, pero no por ello el menos importante, a mis Padres, a mi hermana y a mi cuñado, quienes me han apoyado en todo lo que he querido hacer en la vida, me han impulsado en los momentos en que he intentado dar marcha atrás, me han aguantado en los días de gran cansancio y desesperación, a su inmenso cariño y apoyo incondicional. Por haber sufrido y reído conmigo, este éxito no es solo mio... es de los cinco.

GRACIAS A TODOS!!!!!!

I. INTRODUCCIÓN	24
1. Naturaleza, interés y finalidad de la investigación	25
2. Objetivos	27
2.1. Objetivo General.....	27
2.2. Objetivos Específicos	28
3. Antecedentes bibliográficos.....	28
3.1. El suelo y sus componentes microbianos	29
3.2. Hongos formadores de micorrizas	31
3.2.1. Conceptos Generales sobre Micorrizas	31
3.2.2. Hongos Formadores de Micorriza Arbuscular (MA)	34
3.2.2.1. Generalidades de los hongos que forman micorrizas arbusculares	34
3.2.2.2. Desarrollo de la simbiosis y morfología.....	35
3.2.2.3. Cambios en el estado fisiológico y hormonal de la planta	36
3.3. Actinomicetos	37
3.3.1. Características Generales.....	37
3.3.2. Condiciones de crecimiento.....	42
3.3.3. Ecología y distribución.....	43
3.3.4. Clasificación de los Actinomicetos	44
3.4. Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR)	46
3.4.1. Conceptos generales	46
3.4.2. Mecanismos implicados en la actividad PGPR	48
3.4.2.1. Producción de reguladores de Crecimiento Vegetal.....	48
3.4.2.2. Producción de Sideróforos.....	50
3.4.2.3. Fijación no simbiótica de nitrógeno	51
3.4.2.4. Solubilización de fosfatos insolubles	51
3.4.2.5. Producción de quitinasas	53
3.5. Interacciones entre MA y rizobacterias	54
3.5.1. Mycorrhiza helper bacteria (MHB)	54
3.5.2. Interacciones relacionadas con la promoción del crecimiento de las plantas.....	55
II. MATERIALES Y MÉTODOS	57
1. Material vegetal y toma de muestras rizosféricas	59
1.1. Caracterización de la población vegetal seleccionada.....	59
1.2. Toma de muestra de suelo rizosférico	59
2. Aislamiento y cuantificación de microorganismos.....	60
2.1. Aislamiento de hongos MA.....	60
2.2. Aislamiento de actinomicetos.....	60

3. Identificación morfológica de esporas de hongos MA.....	61
4. Identificación de los actinomicetos	61
4.1. Caracterización morfológica	61
4.1.1. Caracterización macroscópica.....	61
4.1.2. Caracterización microscópica	61
4.2. Caracterización bioquímica.....	62
4.3. Identificación molecular	62
4.3.1. Extracción de DNA.....	62
4.3.2. Amplificación y purificación del ADNr 16S a partir de las extracciones de ADN de los actinomicetos aislados.....	63
4.3.3. Análisis de restricción de los productos de PCR de ADNr 16S de los actinomicetos aislados.....	64
4.3.4. Secuenciación del ADNr 16S de los actinomicetos seleccionados como promotores de crecimiento	65
4.4. Conservación de las cepas de actinomicetos.....	66
5. Evaluación <i>in vitro</i> de actividades de los actinomicetos relacionadas con la promoción de crecimiento vegetal	66
5.1. Capacidad para la solubilización de fósforo	66
5.2. Capacidad para fijar nitrógeno.....	67
5.2.1. Crecimiento en medios sólidos libres de nitrógeno	67
5.2.2. Crecimiento en medio líquido libre de nitrógeno	67
5.2.3. Prueba de reducción del acetileno (acrónimo del inglés ARA)	68
5.2.4. Detección de genes <i>nifH</i>	68
5.3. Producción de Acido Indol Acético (AIA)	69
5.4. Producción de Sideróforos	70
5.5. Producción de quitinasas.....	71
5.5.1. Preparación de la quitina coloidal.....	71
5.5.2. Evaluación cualitativa de la actividad quitinasa	71
5.5.3. Evaluación de la producción de quitinasas	71
5.5.4. Concentración de quitinasas.....	72
5.5.5. Evaluación de la actividad enzimática de las quitinasas.....	72
6. Inoculación de los microorganismos.....	73
6.1. Características del suelo empleado en los ensayos en maceta.....	73
6.2. Inóculo micorrícico	73
6.2.1. Características del inóculo MA empleado en el ensayo	73
6.2.2. Producción de inóculo micorrícico	73
7. Preparación del material vegetal y desarrollo de los ensayos de inoculación.....	74
7.1. Planta hospedadora	74
7.2. Esterilización de las semillas	74

7.3. Germinación de las semillas	74
7.3.1. Ensayo de germinación <i>in vitro</i>	74
7.3.2. Ensayo de germinación en maceta.....	75
7.3.3. Ensayos de inoculación microbiana en maceta	75
8. Establecimiento de actinomicetos en la rizosfera y sus interacciones con hongos MA	76
8.1. Pruebas de establecimiento a nivel rizosférico de los actinomicetos seleccionados	76
8.1.1. Análisis de población en la rizosfera.....	78
8.1.2. Análisis de la población en rizoplana	78
8.1.3. Análisis de la población en el suelo.....	78
8.2. Observación microscópica de las raíces	79
8.2.1. Microscopía de campo claro y oscuro	79
8.2.2. Microscopía confocal	79
8.3. Obtención de esporas y esporocarpos de hongos MA mediante la técnica de tamizado húmedo y decantación.....	79
8.4. Efectos de los actinomicetos sobre la germinación de las esporas y el crecimiento micelial de los hongos MA	80
9. Diseño estadístico	81
III. RESULTADOS.....	83
Capítulo 1: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LOS MICROORGANISMOS	85
1.1 Localización geográfica del muestreo	85
1.1.1. Introducción.....	85
1.1.2. Parte Experimental	86
1.1.2.1. Metodología.....	86
1.1.2.2. Resultados.....	88
1.2. Aislamiento e identificación de los actinomicetos	89
1.2.1.1. Identificación microscópica.....	90
1.2.1.2. Identificación química	92
1.2.1.3. Identificación Molecular.....	93
1.2.2. Parte Experimental	94
1.2.2.1. Metodología.....	94
1.2.2.2. Resultados y Discusión.....	96
1.3. Aislamiento y caracterización de los hongos MA	121
1.3.1. Introducción.....	121
1.3.2. Parte Experimental	125
1.3.2.1. Metodología.....	125
1.3.2.2. Resultados.....	126

Capítulo 2: DETERMINACION <i>IN VITRO</i> DE CARACTERISTICAS PGPR DE LOS ACTINOMICETOS AISLADOS.....	129
2.1. Evaluación de la capacidad solubilizadora de fósforo	130
2.1.1. Introducción	130
2.1.2. Parte Experimental.....	130
2.1.2.1. Metodología	130
2.1.2.2. Resultados y discusión	132
2.2. Caracterización de los actinomicetos como fijadores libres de nitrógeno..	138
2.2.1. Introducción	138
2.2.2. Parte experimental.....	139
2.2.2.1. Metodología	139
2.2.2.2. Resultados y discusión	141
2.3. Producción de ácido indol acético	153
2.3.1. Introducción	153
2.3.2. Parte experimental.....	153
2.3.2.1. Metodología	153
2.3.2.2. Resultados y discusión	153
2.4. Producción de sideróforos.....	158
2.4.1. Introducción	158
2.4.2. Parte experimental.....	158
2.4.2.1. Metodología	158
2.4.2.2. Resultados y discusión	159
2.5. Producción de quitinasas.....	163
2.5.1. Introducción	163
2.5.2. Parte experimental.....	163
2.5.2.1. Metodología	163
2.5.2.2. Resultados y discusión	165
Capítulo 3: INTERACCIONES DE ACTINOMICETOS Y HONGOS MA, Y SUS EFECTOS SOBRE EL DESARROLLO DE PLANTAS DE TREBOL	172
3.1. Introducción	172
3.2. Parte Experimental.....	173
3.2.1. Metodología	173
3.2.1.1. Elaboración del semillero y diseño experimental	173
3.2.1.2. Preparación de inóculos e inoculación de plántulas con cepas de Actinomicetos y Micorrizas	174
3.2.1.3. Evaluación de los efectos de la inoculación.....	175
3.2.2. Resultados y discusión	175

3.2.2.1. Efectos de los actinomicetos sobre la germinación de las esporas y el crecimiento del micelio de <i>Glomus</i> FC8 sp.	175
3.2.2.2. Interacción de los actinomicetos con plantas de trébol	176
3.2.2.3. Interacción de los actinomicetos con los hongos MA y sus efectos sobre el crecimiento y nutrición de las plantas de trébol	182
IV. DISCUSIÓN GENERAL	191
V. CONCLUSIONES	199
VI. BIBLIOGRAFÍA	203
ANEXOS	229

I. INTRODUCCIÓN

***“El guerrero es transparente en
sus acciones y secreto
en sus planes”***

Paulo Coelho

1. Naturaleza, interés y finalidad de la investigación

El mal uso agrícola de los suelos, que desafortunadamente ocurre en diferentes zonas cultivables, ha ido intensificando los problemas de fertilidad en los mismos. Particularmente, el uso intensivo de los fertilizantes y productos fitosanitarios químicos ha conllevado a elevar los costos de producción de muchos alimentos y otros derivados de la Agricultura haciéndolos poco competitivos en el mercado. Los manejos agrícolas más sostenibles preconizan la disminución de agroquímicos, como alternativa al uso de estos compuestos, estrategias que cada día cobran más interés. En relación con los manejos sostenibles en agricultura, la posibilidad de usar técnicas basadas en el manejo de microorganismos que usualmente viven asociados a las plantas, ocurre en virtud de las acciones positivas que se sabe realizan. En efecto, determinados microorganismos que se desarrollan en asociación con las raíces de las plantas, en la llamada rizosfera, están involucrados en la promoción de crecimiento vegetal mediante un amplio rango de actividades. Estas acciones incluyen la estimulación de los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes, mejora de la salud de la planta y la calidad estructural del suelo, factores claves de la fertilidad del mismo.

Como consecuencia de lo anterior se hace necesario entender los diferentes factores que regulan la actividad microbiana relacionada con el mantenimiento de la fertilidad del suelo y la nutrición vegetal. Es así que muchas investigaciones han intentado enfocarse en la búsqueda de microorganismos con habilidad para mejorar el enraizamiento, disolver el fósforo mineral no asimilable por la planta, fijar nitrógeno de la atmósfera, producir sideróforos, interactuar con otros microorganismos, entre otras actividades.

En este contexto, es de reseñar los pocos estudios publicados sobre los actinomicetos, bacterias conocidas por desarrollar diversas actividades en el ecosistema, tales como el mejoramiento de la estructura del suelo y producción de compuestos bioactivos con actividad antagonista contra microorganismos patógenos, siendo los principales productores de antibióticos. Particularmente, se han descrito actividades que pueden catalogar a los actinomicetos como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: PGPR (del inglés “Plant Growth Promoting Rhizobacteria”).

Dado que en investigaciones de ecología microbiana en la rizosfera es importante considerar la interacción entre los diferentes microorganismos, especialmente entre aquellos que benefician a las plantas y pueden mejorar la productividad agrícola, se debe

incluir a los hongos formadores de micorrizas arbusculares. Las micorrizas son asociaciones simbióticas que se establecen entre las raíces de las plantas y ciertos hongos del suelo. Estas simbiosis desempeñan un papel clave en el ciclado de nutrientes en el ecosistema y en la protección de las plantas frente a estreses ambientales. La mayoría de las especies de plantas silvestres y cultivadas forman micorrizas, siendo las llamadas “micorrizas arbusculares” (MA) las más comunes y, concretamente, las que forman las plantas de interés agronómico, entre ellas cereales, leguminosas, hortícolas y frutales. Debido a los efectos de las MA, enfocados hacia la biofertilización, fitoestimulación y bioprotección de los cultivos (como después se detalla al analizar los Antecedentes Bibliográficos del tema), se acepta que el manejo apropiado de esta simbiosis puede permitir una reducción significativa de fertilizantes y fungicidas químicos, aspectos claves en una producción sostenible en agricultura, con los consiguientes beneficios ecológicos y económicos.

Teniendo en cuenta los antecedentes citados se decidió acometer una investigación para incrementar los conocimientos sobre actinomicetos, bacterias comunes en el suelo y que ayudan a mantener el equilibrio ecológico en zonas con una alta explotación agrícola. La idea es estudiar la posibilidad de que puedan ser utilizadas en un futuro como biofertilizante, de ahí el interés de poder caracterizar estas bacterias como PGPR y dilucidar su comportamiento en cuanto a sus interacciones con las MA para poder conocer si puede ocurrir una relación sinérgica (benéfica o antagonista) entre estos dos grupos microbiológicos.

Se pretende que esta investigación incluya aspectos de interés prioritario en el campo de las Ciencias Medioambientales, y concretamente, de cómo los cambios que se están produciendo en el medio ambiente, y que previsiblemente van a continuar en un futuro próximo debido a actividades humanas poco controladas, van a afectar el funcionamiento y estabilidad de las comunidades vegetales. Esto está generando la necesidad de encontrar microorganismos altamente establecidos en el suelo, con actividades metabólicas para ser utilizadas en beneficio de las plantas y que no perjudiquen a microorganismos benéficos como lo son los hongos formadores de micorrizas.

Para poder reunir varios aspectos relacionados con la promoción de crecimiento e interacción con hongos MA se eligió un modelo de planta de rápido crecimiento como es el trébol, para luego continuar en un futuro, las pruebas en cultivos de alto interés agrícola, particularmente en Colombia.

En concreto el estudio propuesto se centra en las interacciones de las comunidades vegetales, utilizando una planta modelo como *Trifolium repens* L., con microorganismos del suelo como las MA y los actinomicetos, microorganismos que, como se ha comprobado por separado, juegan un papel clave en el mantenimiento del equilibrio ecológico a nivel rizosférico y, en general, en la estabilidad de los ecosistemas terrestres. Es así que se propone expandir las fronteras del conocimiento en relación con las estrategias en las interacciones entre las MA y los actinomicetos e investigar las posibles limitaciones existentes.

El estudio de la diversidad genética en microorganismos como los actinomicetos tiene gran importancia en la sostenibilidad de los suelos colombianos, para poder en un futuro cercano presentarlos como un recurso clave a nivel de biotecnología agrícola, y así mismo, poder determinar los diferentes patrones que presenten estos microorganismos y su interacción con los hongos MA y las plantas que permitan utilizarlos para el seguimiento de los efectos del cambio ambiental global.

En conclusión, el tema propuesto pretende realizar un aporte importante en el conocimiento de los actinomicetos y sus interacciones con las raíces vegetales micorrizadas. Esto permitirá dilucidar el posible impacto directo sobre la fisiología de una planta como el trébol, y generar una base metodológica para continuar profundizando en plantas de interés económico (con especial referencia a Colombia), aportando una caracterización funcional, no descrita en profundidad hasta ahora, para este grupo bacteriano.

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

La presente Tesis Doctoral propone como Objetivo General “analizar diferentes actividades metabólicas de aislados de actinomicetos autóctonos de suelos colombianos, que permitan fundamentar la catalogación de estos microorganismos como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, es decir como PGPR, así como investigar sus interacciones con hongos formadores de MA”.

2.2 Objetivos Específicos

Para profundizar en ese Objetivo General, se proponen los siguientes Objetivos Específicos:

- 1- Determinar la presencia de actinomicetos en la rizosfera de plantas de trébol (*Trifolium repens* L.) crecidas en condiciones naturales en suelos de Colombia.
- 2- Identificar los actinomicetos aislados, hasta nivel de género, siguiendo criterios morfológicos, bioquímicos y moleculares.
- 3- Caracterizar morfológicamente los hongos formadores de micorrizas arbusculares aislados de la rizosfera de plantas de trébol crecidas en condiciones naturales en suelos de Colombia.
- 4- Evaluar la capacidad de las diferentes cepas de actinomicetos para solubilizar fosfatos, fijar nitrógeno atmosférico, producir ácido indol acético y sideróforos, atributos de PGPR.
- 5- Analizar las posibles interacciones existentes entre los actinomicetos y los hongos MA aislados, y su efecto sobre la planta hospedadora, así como seleccionar la mejor asociación hongo MA + actinomicetos, en cuanto a su capacidad como biofertilizantes.

3. Antecedentes bibliográficos

En la presente memoria, que recoge las investigaciones que constituyen esta Tesis Doctoral, se ofrece en primer lugar, el análisis de los Antecedentes Bibliográficos centrada en los dos tipos de microorganismos objeto de estudio: los hongos formadores de micorrizas arbusculares (MA) y las bacterias filamentosas englobadas bajo el nombre genérico de actinomicetos. Sin embargo, y dado que se busca establecer funciones PGPR para los actinomicetos, se presenta también un análisis de los antecedentes sobre rizobacterias. Posteriormente, se muestran los diversos ensayos realizados, que se agrupan en Capítulos Experimentales, en cada uno de estos se presenta una breve Introducción referente a los Antecedentes Bibliográficos específicos del Capítulo correspondiente.

3.1. El suelo y sus componentes microbianos

El suelo corresponde a la parte más externa de la corteza terrestre. Puede ser considerado como un sistema de interacción entre una fase sólida, formada por materia mineral y orgánica, una fase líquida y una fase gaseosa. La materia mineral viene dada por las rocas del subsuelo y los procesos edáficos que hayan tenido lugar en su formación. La materia orgánica procede de la actividad de los organismos vivos del suelo, y su composición y cantidad resulta ser variable. Este sistema complejo alberga una gran cantidad y variedad de especies vegetales, animales y microbianas. Estos organismos establecen relaciones entre si en formas variadas y complejas, que contribuyen también a generar las características propias de cada suelo mediante la modificación de las fases sólida, líquida y gaseosa del mismo. Los microorganismos resultan ser de gran importancia pues se relacionan con procesos de edafogénesis; ciclos biogeoquímicos de elementos como carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre, fósforo, hierro y otros metales; fertilidad de las plantas y protección frente a patógenos; degradación de compuestos xenobióticos; entre otros (Ben-Omar *et al.*, 1997; Nogales, 2005).

Se considera que el suelo es uno de los ambientes más complejos en cuanto a vida microbiana se refiere, que puede contener cerca de 10^9 células bacterianas/gramo de suelo y un estimado de 10^4 especies microbianas diferentes por gramo de suelo (Cavaletti *et al.*, 2006).

A inicios del siglo XX, Hiltner introdujo el término *rizosfera* para describir la zona del suelo afectada por el desarrollo de las raíces, las cuales inducen la proliferación de los microorganismos. Las actividades metabólicas de tales poblaciones estimuladas, tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo, en la rizosfera son de vital importancia para el desarrollo de las plantas (Azcón-Aguilar *et al.*, 2002). El incremento de la actividad microbiana en la rizosfera, es ejercido por el suministro de compuestos orgánicos (solubles o insolubles) que aportan los exudados radicales y otros materiales, en general, residuos vegetales o microbianos, recibe el nombre de *efecto rizosférico*.

Desde el punto de vista de sus relaciones con la planta cabe considerar tres grandes grupos de microorganismos (Barea & Azcón-Aguilar, 1982):

- (a) saprofitos, microorganismos que obtienen su fuente nutricional a partir de compuestos orgánicos procedentes de residuos animales, vegetales o microbianos.

(b) simbioses parasíticas o "patógenas", causantes de enfermedades a las plantas

(c) simbioses mutualistas o simplemente "simbioses", como se les denomina en la literatura científica, los cuales benefician el desarrollo y nutrición vegetal.

En resumen, las acciones que desarrollan los microorganismos en la rizosfera, y que resultan beneficiosos en los sistemas suelo-planta, pueden concretarse en las siguientes:

- *Estimulación de la germinación de las semillas y del enraizamiento.* Realizadas por los microorganismos (fitoestimuladores) productores de hormonas, vitaminas y otras sustancias.

- *Incremento en el suministro/disponibilidad de nutrientes.* Este efecto deriva del protagonismo de los microorganismos (biofertilizantes) en los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes.

- *Mejora de la estructura del suelo.* Mediante la formación de agregados estables como consecuencia del crecimiento microbiano (mejoradores de agroecosistemas).

- *Protección de la planta frente a estreses bióticos y abióticos.* Actividad microbiana que emana de fenómenos de antagonismo microbio-microbio (biopesticidas, agentes de control biológico de patógenos) o de eliminación de productos xenobióticos (biorremediadores) o incremento de la resistencia/tolerancia a salinidad, sequía, degradación de sistemas, entre otros (mejoradores ecofisiológicos).

El término "*rizobacteria*" refiere la capacidad de dichos microorganismos para colonizar preferencialmente las interfases suelo-raíz, donde mantienen poblaciones de individuos a un nivel que permite su efectividad (Kloepper *et al.*, 1991; Barea *et al.*, 2005).

Los hongos micorrizógenos y las bacterias fijadoras de N₂ son los componentes más destacados entre los simbioses mutualistas. Los hongos de la micorriza, una vez que colonizan de forma biotrófica la raíz, desarrollan un micelio externo que la conecta con los microhábitats del suelo tanto rizosférico como, fundamentalmente, el no-rizosférico, lo que les permite desarrollar actividades tales como el ciclado de nutrientes (P y N fundamentalmente), protección frente a estreses bióticos y abióticos, conservación del suelo (formación de agregados), establecimiento de las plántulas, reguladores de la sucesión vegetal, entre otros. Las bacterias simbióticas fijadoras de N₂ (*Rhizobium*,

Frankia y cianobacterias) efectúan su relevante función en la rizosfera de plantas de interés tanto en agrosistemas como en ecosistemas naturales (Barea & Olivares, 1998).

3.2. Hongos formadores de micorrizas

3.2.1. Conceptos Generales sobre Micorrizas

Las micorrizas son asociaciones simbióticas mutualistas entre ciertos hongos del suelo y la mayoría de las plantas que existen en la naturaleza. El 80-90% de las familias botánicas forman esta asociación simbiótica (Smith & Read, 1997). El término “micorriza”, procedente del griego “mykos”, hongo y “rhiza”, raíz, fue utilizado en primera instancia por Frank en el año 1885, pero hasta mediados del siglo XX no se empezó a poner de manifiesto el significado y la importancia de estas asociaciones, así como su presencia en la casi totalidad de los ecosistemas suelo-planta (Barea & Jeffries, 1995; Azcón & Barea, 1997).

Una vez establecido el contacto hongo-raíz, el hongo coloniza biotróficamente la corteza de la raíz, llegando a ser parte de dicho órgano, y desarrolla un extenso micelio externo que actúa como un sistema radical complementario y altamente efectivo, que ayuda a la planta a adquirir nutrientes minerales y agua del suelo (Hause *et al.*, 2007; Lerat *et al.*, 2003; Vierheilig *et al.*, 2002). De hecho, esta simbiosis se considera la parte metabólicamente más activa de los órganos de absorción de nutrientes por las plantas al interactuar íntimamente con los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes.

Las micorrizas mejoran el enraizamiento de las plantas, gracias a la producción de hormonas, vitaminas y otras sustancias fitoactivas; mejoran la estructura del suelo al participar en la formación de agregados estables; protegen a la planta de estreses bióticos y abióticos ambientales, por lo cual estos hongos pueden generar la reducción sustancial de agroquímicos (principalmente compuestos xenobióticos); y favorecen la diversidad de las comunidades vegetales (van Tichelen *et al.*, 2001; Azcón-Aguilar *et al.*, 2002; Ruiz-Lozano, 2003; Jeffries *et al.*, 2003; Lum & Hirsch, 2003; Rillig, 2004; van der Heijden, 2004; Govindarajulu *et al.*, 2005; Barea *et al.*, 2005). A su vez, la planta hospedadora le proporciona al hongo fuentes de carbono procedentes de la fotosíntesis y un nicho ecológico protegido (Smith & Read, 2008).

Se reconocen tres tipos de micorriza, siguiendo criterios estructurales, funcionales y taxonómicos (Smith & Read, 1997):

- a) Endomicorrizas: son las más extendidas en la naturaleza cuya característica principal es que sus hifas penetran en el interior de las células del córtex y/o epidermis de la raíz. Otra característica es que no forman manto de hifas que cubren las raíces. Dentro de este grupo se distinguen tres subgrupos:
- a. Ericoides. Características de las plantas de la familia de las Ericáceas y los hongos pueden pertenecer a los phyla Ascomycota o Basidiomycota. Los hongos presentan una gran versatilidad en cuanto al uso de fuentes de N y P (origen orgánico o inorgánico). Esta característica fúngica confiere parte de la capacidad a las plantas para crecer en suelos con un elevado contenido de materia orgánica (Pearson & Read, 1975; St-John *et al.*, 1985).
 - b. Orquidioides: Formadas entre plantas de la familia Orquidiaceae y hongos del phylum Basidiomycota. Como características morfológicas del hongo cabe resaltar que tras penetrar en las células de la raíz forma ovillos dentro de la célula hospedadora previa invaginación de la membrana plasmática, así como agregados poco organizados de hifas que liberan los nutrientes cuando degeneran (Smith, 1966).
 - c. Arbusculares. Los hongos implicados pertenecen al phylum Glomeromycota (Shüßler *et al.*, 2001b). Se trata de hongos microscópicos, en contraste con los demás hongos formadores de micorrizas, que son setas o trufas. La principal característica morfológica de la colonización de la corteza de la raíz por estos hongos es su ramificación dicotómica repetida una vez que han penetrado en las células de dicha corteza, para la formación de los arbusculos, estructuras típicas de la colonización de dichos hongos. Algunas especies de estos hongos forman otras estructuras en el interior de la raíz llamadas vesículas, que contienen sustancias de reserva.
- b) Ectomicorrizas: Se presentan en especies de plantas con interés forestal como Fagáceas, Betuláceas, Pináceas, entre otras familias, lo que supone el 3% de especies vegetales micorrizables. Se caracterizan principalmente porque las hifas del hongo limitan su desarrollo a los espacios intercelulares del córtex,

sin penetrar las células vegetales de la raíz, dando lugar a una estructura característica denominada red de Hartig (Smith & Read, 1997). Los hongos que forman este tipo de micorrizas pertenecen al phylum Basidiomycota, aunque también algunos están clasificados en el Ascomycota.

- c) Ectendomicorrizas: presentan características comunes con los dos tipos de micorrizas expuestos anteriormente y son las menos extendidas. Con las ectomicorrizas tienen en común que pueden formar un “manto” más o menos desarrollado y red de Hartig, y con las endomicorrizas, que existe penetración de las hifas en las células de la corteza formando enrollamientos u ovillos (Yu *et al.*, 2001). Los hongos pertenecen al phylum Basidiomycota y las plantas son fundamentalmente arbutoides o monotropales.

Como se indicó anteriormente, la mayoría de las especies de plantas silvestres y cultivadas forman micorrizas, siendo las llamadas “micorrizas arbusculares” (MA) las más comunes y, concretamente, las que forman las plantas de interés agronómico, entre ellas cereales, leguminosas, hortícolas y frutales. Se ha confirmado que más del 80% de las especies forman las MA (Brundrett *et al.*, 1996; Smith & Read, 1997; Barea & Honrubia, 2004). Dado que este es el tipo de micorrizas que forman las plantas objeto de estudio, como ocurre con la inmensa mayoría de las especies de interés agronómico, serán las que constituyen objeto de la presente investigación, referidas con el acrónimo MA, como viene haciéndose en apartados anteriores de esta Memoria Doctoral.

En resumen, y de acuerdo con la información recientemente revisada (Jeffries *et al.*, 2003; Lum & Hirsch, 2003; Rillig, 2002 y 2004; Van der Heijden, 2004; Govindarajulu *et al.*, 2005; Barea *et al.*, 2005), las MA realizan las siguientes acciones en los sistemas suelo-planta:

- *Mejoran el enraizamiento de las plantas*, actividad basada en la producción de hormonas, vitaminas y otras sustancias fitoactivas, por parte de los hongos.
- *Incrementan el suministro de nutrientes a las plantas*, efecto que deriva del protagonismo de los hongos micorrícicos en los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes en el sistema suelo-planta.
- *Mejoran la estructura del suelo*, como consecuencia de la contribución de la micorriza en la formación de agregados estables y, por tanto, en la calidad del mismo.

- *Protegen a la planta frente a estreses bióticos y abióticos*, actividad con la que la simbiosis micorrícica contribuye a los procesos de control biológico de patógenos, o a incrementar la resistencia/tolerancia de las plantas a salinidad, sequía, estados de deficiencia en nutrientes, exceso de metales pesados, degradación del suelo, entre otros.
- *Favorecen la diversidad de las comunidades de plantas y la sucesión vegetal*, ya que cada planta muestra un nivel de compatibilidad mayor con determinados ecotipos de hongos micorrícicos, por lo que la conservación de la diversidad de estos hongos, beneficia la diversidad y sucesión de las plantas.

3.2.2. *Hongos Formadores de Micorriza Arbuscular (MA)*

3.2.2.1. Generalidades de los hongos que forman micorrizas arbusculares

Los hongos MA no poseen una reproducción sexual conocida, producen esporas de resistencia que se forman sobre hifas vegetativas, son multinucleadas aunque el número de núcleos es variable pudiendo llegar hasta 20 000 núcleos por espora (Smith & Read, 2008). Los hongos MA se consideran simbioses obligados por lo que solo pueden completar su ciclo de vida en presencia de la planta hospedadora (Barea & Azcón-Aguilar, 1983). Estos hongos se mantienen en el suelo en forma de esporas, redes de micelio, o colonizando raíces activas o fragmentos de estas que permanecen en el suelo. Estos son los propágulos capaces de iniciar la formación de una nueva micorriza. Cuando estos propágulos se activan producen un micelio mediante el cual el hongo contacta y coloniza la raíz, llegando a ser parte integrante de dicho órgano. Posteriormente, el hongo desarrolla un micelio externo que se extiende varios centímetros desde la superficie de la raíz y alcanza dimensiones de alrededor de un metro de hifas por centímetro de raíz micorrizada.

El proceso por el cual el hongo coloniza la raíz (tratado más en detalle a continuación) va a dar lugar a una estructura tridimensional que conecta la planta con los microhábitats del suelo, más eficaz que la propia raíz para extraer nutrientes y agua del mismo. El establecimiento de la micorriza da lugar a cambios en la fisiología de la planta hospedadora, lo cual permite que las plantas micorrizadas se desarrollen mejor y muestren un nivel de resistencia/tolerancia a los estreses ambientales (Sylvia & Williams,

1992; Ruíz-Lozano *et al.*, 1995 y 2001; Jeffries *et al.*, 2003; Ruíz-Lozano, 2003; Barea *et al.*, 2005; Alguacil *et al.*, 2006).

3.2.2.2. Desarrollo de la simbiosis y morfología

La colonización del hongo MA se extiende por la epidermis y el parénquima cortical, nunca penetra en la endodermis ni en los tejidos vasculares y meristemáticos, sin producir alteraciones morfológicas distinguibles (Bonfante, 2001). Se presenta por tanto una diferencia marcada con las infecciones radicales de los hongos patógenos que si penetran en los haces conductores y meristemas (Tejeda-Sartorius *et al.*, 2008).

El proceso de formación de la simbiosis comienza con la germinación de las esporas de resistencia en el suelo, cuando las condiciones ambientales de temperatura y humedad son favorables (CO₂, temperatura, pH) (Bolan, 1991). Tras la emisión del tubo germinal, el micelio del hongo crece hasta encontrar una raíz hospedadora, donde forma entonces una estructura similar a un apresorio (Barea, 2001; Giovannetti *et al.*, 1993; Giovannetti *et al.*, 2002). En este punto termina la etapa independiente del hongo para pasar a la etapa totalmente dependiente, es así que el apresorio penetra la epidermis e inicia la colonización del tejido parenquimático de la raíz (Becard & Fortín, 1998). En la capa interna de este tejido se empiezan a formar unas estructuras típicas que se denominan ovillos o “coils”, se forman mediante circunvoluciones de hifas intracelulares y aunque no se conoce su función se ha propuesto que pueden estar implicados en una toma inicial de compuestos hidrogenocarbonatos (Smith & Read, 1997). A continuación las hifas penetran las células y se ramifican repetidamente en forma dicotómica para dar lugar a la estructura típica de la simbiosis: el arbusculo, el cual presenta una vida inferior a 15 días (Beilby & Kidby, 1982). La hifa ramificada se encuentra rodeada por la membrana plasmática de las células del parénquima cortical, siendo el espacio apoplástico producido entre la membrana plasmática y el hongo de la zona de intercambio de nutrientes (Smith & Gianninazzi-Pearson, 1990). Las vesículas se forman generalmente en los extremos de las hifas del hongo y pueden producirse a lo largo de todo el parénquima cortical colonizado de forma intra y/o intercelulares (Abbott, 1982); presentan formas variadas según la especie (redondas, ovoides, alargadas, entre otras), suelen aparecer más tarde que los arbusculos y son consideradas órganos de reserva, principalmente de lípidos (Beilby & Kidby, 1982). Especies de los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora* no forman vesículas dentro de la raíz, pero en el micelio externo producen células auxiliares.

Todas las estructuras de colonización que presentan un mismo origen es lo que se denomina unidad de colonización (Wilson, 1984). A partir de esta unidad, comienza una fase de colonización exponencial, observándose un desarrollo mayor del hongo que de la raíz como consecuencia del establecimiento de esas primeras unidades de colonización. La colonización del hongo puede extenderse también mediante hifas exteriores (runners) por la superficie de la raíz y penetrar en ésta a intervalos irregulares (Sieverding, 1991). Una vez se logra una fase de estabilización de la colonización, se observa el crecimiento paralelo de la raíz y del hongo.

Cuando la colonización interna está bien establecida, las hifas del hongo pueden crecer externamente desde la raíz de la planta hacia el suelo (micelio externo) y explorar un volumen de suelo inaccesible a las raíces; con ello la planta aumenta considerablemente su superficie de absorción, de 100 a 1000 veces y por tanto su capacidad de captación de nutrientes (fósforo, zinc, cobre y amonio) y de agua (Sieverding, 1991; Bürkett & Robson, 1994). Arines *et al.* (1992) señalan la importancia del micelio extraradical en la estabilidad y mejora de las características físicas, químicas y biológicas del suelo. Otros estudios presentan grandes correlaciones entre el aumento de la concentración de hifas extraradicales de las MA y la formación de agregados estables en el suelo (Bethlenfalvay & Schüepp, 1994).

Las MA producen, normalmente, esporas a partir del micelio externo, y también en algunos casos, las forman en el interior de la raíz a partir del micelio interno. Las esporas de resistencia pueden permanecer inalteradas en el suelo por mucho tiempo, mientras que las hifas del hongo se colapsan tras una permanencia en el suelo de 2 a 4 semanas sino encuentran una raíz hospedadora (Bolan, 1991).

3.2.2.3. Cambios en el estado fisiológico y hormonal de la planta

Se ha descrito la capacidad de las MA para sintetizar fitohormonas tales como auxinas, citoquininas y giberelinas “*in vitro*” y otras sustancias que pueden alterar la morfología y fisiología de la raíz (Azcón-Aguilar & Barea, 1992, Azcón & El-Atrash, 1997). Como resultado se produce una modificación en la composición de los exudados radicales. Ello da lugar a la llamada “micorizosfera” o zona de la rizosfera bajo la influencia de la micorriza, donde la población microbiana difiere, no solo cuantitativa sino cualitativamente de la que se desarrolla en la propia rizosfera (Azcón-Aguilar & Barea, 1992; Linderman, 1988; Barea *et al.*, 2002).

3.3. Actinomicetos

Los actinomicetos representan un grupo ubicuo de microorganismos ampliamente distribuido en ecosistemas naturales y tienen gran importancia en la participación de la degradación de materia orgánica, además de ciertas propiedades fisiológicas que los hacen particulares (Ghanem *et al.*, 2000). En un principio los actinomicetos se incluyeron entre los hongos porque su morfología y desarrollo presentaban gran similitud, dotados de un micelio verdadero; debido a esto se les denominó “hongos radiados”. Sin embargo, hoy en día, y dado su carácter procariótico, se sustenta muy bien su clasificación como bacterias (Koneman, 2001; Prescott, 2002).

Estos microorganismos resultan ser abundantes en suelos, tanto o más que las mixobacterias (Ben-Omar *et al.*, 1997), sin embargo, también se encuentran en ambientes acuáticos, dulces y marinos (Leiva *et al.*, 2004). Dentro de sus características particulares presentan un olor típico a suelo húmedo por la producción de un metabolito llamado geosmina, adicionalmente presentan una actividad metabólica alta, producen terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares con las que son capaces de degradar la materia orgánica de origen vegetal y animal (Ezziyani *et al.*, 2004). Como la gran mayoría de bacterias que son abundantes en suelo, presentan un importante papel ecológico en el mismo (Ben-Omar *et al.*, 1997).

3.3.1. Características Generales

Los actinomicetos constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos; son bacterias Gram positivas que se caracterizan por su capacidad de formar filamentos ramificados. El orden de los Actinomycetales comprende 63 géneros constituyendo, aproximadamente del 20-60% de la población microbiana del suelo (Ezziyani *et al.*, 2004).

En la actualidad, los actinomicetos se encuentran incluidos en el dominio bacteria (Figura 1) debido a varias razones: la pared celular está compuesta por peptidoglicano, el diámetro de sus hifas es inferior al de los hongos (0.5 a 2.0 μm), son sensibles a los antimicrobianos pero presentan resistencia a los antifúngicos y la disposición de su material genético es típicamente procariótica (Sylvia, 2005), aunque se caracterizan por presentar un alto contenido de guanina y citosina en su ADN, encontrándose entre el rango de 51 a 78% G+C. Estas bacterias son aerobias y algunas anaerobias, pudiéndose encontrar en animales o en el hombre; son heterótrofas, por lo cual pueden utilizar fuentes

de carbono simples, complejas y compuestos moleculares orgánicos tales como ácidos, azúcares, polisacáridos, lípidos, proteínas e hidrocarburos alifáticos. Utilizan como fuentes de nitrógeno amonio, nitratos, aminoácidos, peptonas y un gran número de proteínas (Leveau & Bouix, 2000). Frecuentemente, alcanzan grandes densidades poblacionales en suelos con alto contenido de materia orgánica y amplias reservas de carbono asimilable y humus (Fernández, 1988).

Existen tres factores que influyen en la distribución y en la actividad de muchos actinomicetos en el suelo: el pH, la temperatura y el tipo de suelo, particularmente su composición. La taxonomía de los actinomicetos ha avanzado mucho durante los últimos treinta años, al mismo tiempo que el número de géneros de este grupo, cuyo aumento debe atribuirse en gran parte al interés industrial que poseen. En la Figura 1 se presenta un árbol filogenético con la descripción del número de géneros, órdenes y subórdenes (Prescott, 2002).

La mayoría de los actinomicetos son mesófilos y su crecimiento se registra entre 25°C a 30°C, en temperaturas inferiores a 5°C el crecimiento es nulo prácticamente y temperaturas superiores a 55°C solo algunas especies termofílicas de *Streptomyces* sp., *Thermomonospora* sp. y *Thermoactinomyces* sp. son capaces de crecer aunque el efecto de la alta temperatura posiblemente sea letal para el microorganismo si está acompañado de humedad (Stanley, 1994).

En relación con los requerimientos de oxígeno, estos microorganismos generalmente son aerobios creciendo en buena proporción en suelos drenados de granulación óptima que permiten un adecuado intercambio gaseoso. De acuerdo a la especie son afectados por la disminución en la concentración de oxígeno, debido a que algunos de ellos son microaerofílicos y toleran bajas presiones parciales de dicho gas en el suelo (Koneman, 2001).

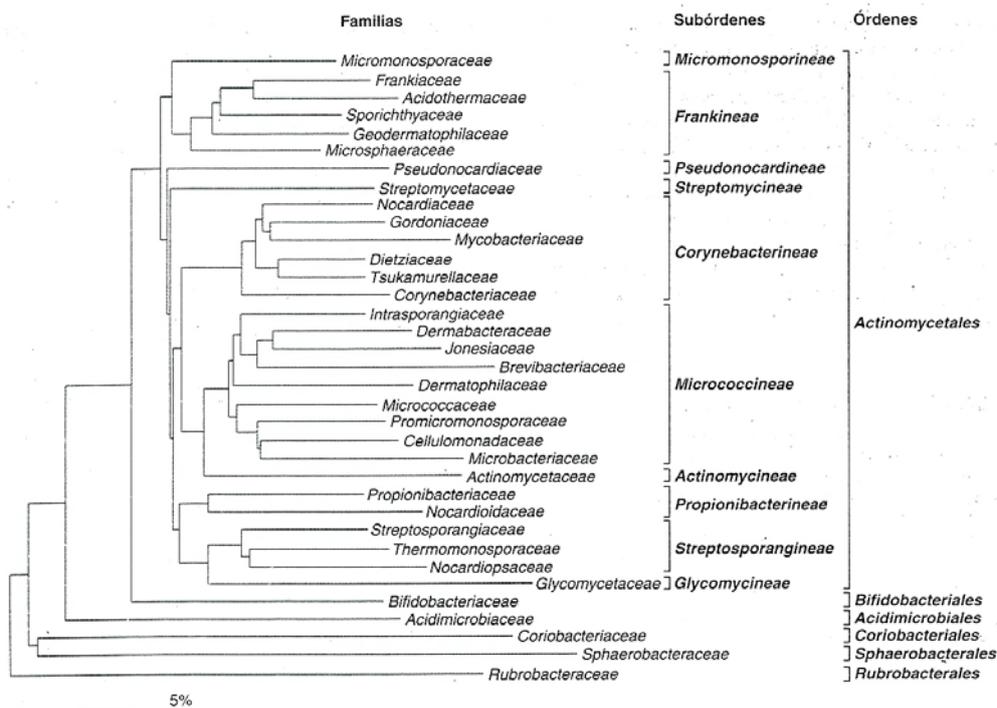


Figura 1. Relaciones taxonómicas y filogenéticas de la clase Actinobacteria (Prescott, 2002).

La composición de la pared celular de los actinomicetos varía mucho según los grupos y tiene una importancia taxonómica considerable. Cabe distinguir cuatro tipos principales de pared celular (Tabla 1).

Tabla 1. Tipos de paredes celulares de los actinomicetos (Prescott, 2002).

Tipos de pared celular	Isómero de ácido diamino-pimelico	Glicina en el puente interpeptídico	Azúcares característicos	Grupos representativos
I	L,L	+	NA	<i>Nocardioides</i> , <i>Streptomyces</i>
II	Meso	+	NA	<i>Micromonospora</i> , <i>Pilimelia</i> , <i>Actinoplanes</i>

Tabla 1. Tipos de paredes celulares de los actinomycetes (Prescott, 2002).

Tipos de pared celular	Isómero de ácido diamino-pimelico	Glicina en el puente interpeptídico	Azúcares característicos	Grupos representativos
III	Meso	-	NA	<i>Actinomadura</i> , <i>Frankia</i>
IV	Meso	-	Arabinosa, galactosa	<i>Saccharomonospora</i> , <i>Nocardia</i>
NA: no aplicable, o bien no se detecta un azúcar diferencial				

Las características, según la composición y estructura del peptidoglucano son (Prescott, 2002) (Tabla 1):

- La ubicación del aminoácido en la posición 3 de la cadena lateral del tetrapéptido.
- La presencia de glicina en los puentes interpeptídicos
- El tipo de azúcares que contiene el peptidoglucano.

Los actinomicetos predominan en forma libre en suelos secos y cálidos en cantidades de millones por cada gramo de suelo, se caracterizan por tener la capacidad de sintetizar antibióticos y se han descrito como posibles promotores de crecimiento vegetal (Tabla 2).

Tabla 2. Características de Actinobacterias (dimensiones, morfología, contenido G+C, requerimientos de oxígeno y otras características) (Prescott, 2002).

Género	Dimensiones (µm) y morfología	Contenido en G + C (%mol)	Requerimiento de oxígeno	Otras características distintivas
<i>Actinoplanes</i>	Micelio no fragmentado, ramificado, con poco crecimiento aéreo; forman esporangios; esporas móviles con flagelos polares.	72-73	Aerobios	Hifas a menudo con disposición en empalizada; muy coloreadas; paredes celulares de tipo II; se encuentran en el suelo y en la materia vegetal en descomposición.
<i>Arthrobacter</i>	0.8-1.2 x 1.0-8.0; las células jóvenes son bacilos regulares, las células viejas son cocos pequeños.	59-70 aprox.	Aerobios	Ciclo de crecimiento bacilo-coco; metabolismo respirador; catalasa positiva, fundamentalmente en el suelo.

Tabla 2. Características de Actinobacterias (dimensiones, morfología, contenido G+C, requerimientos de oxígeno y otras características) (Prescott, 2002).

Género	Dimensiones (μm) y morfología	Contenido en G + C (%mol)	Requerimiento de oxígeno	Otras características distintivas
<i>Bifidobacterium</i>	0.5-1.3 x 1.5-8; bacilos de forma variada, habitualmente curvos; inmóviles.	55-67	Anaerobios	Las células con ramificaciones parejas a menudo en V; fermentan carbohidratos a acetato y lactato, pero no a CO_2 ; catalasa negativa.
<i>Corynebacterium</i>	0.3-0.8 x 1.5-8.0; bacilos rectos o ligeramente curvos con puntas afiladas o en maza; inmóviles.	51-63	Anaerobios facultativos	Células a menudo dispuestas en V o en empalizada o células paralelas; catalasa positiva y fermentadoras; gránulos metacromáticos.
<i>Frankia</i>	Diámetro 0.5-2.0; hifas vegetativas con ramificación limitada o extensa, sin micelio aéreo; esporangios multiloculares.	66-71	Anaerobio o microaerófilo	Esporangiosporas inmóviles; habitualmente fija nitrógeno; paredes celulares tipo III; la mayoría de las cepas son simbióticas con plantas angiospermas.
<i>Micrococcus</i>	Diámetro 0.5-2.0; cocos en parejas, tétradas o racimos regulares; habitualmente inmóviles.	64-75	Aerobios	Colonias habitualmente amarillas o rojas; catalasa positiva, metabolismo respirador; se encuentra en piel de mamíferos y en el suelo.
<i>Mycobacterium</i>	0.2-0.6 x 1.0-10; bacilos rectos o ligeramente curvos, ramificados; ácido-alcohol resistentes; inmóviles y no esporulados.	62-70	Aerobios	Catalasa positiva; forman filamentos que se fragmentan con facilidad; paredes de alto contenido lipídico; algunos son parásitos.
<i>Nocardia</i>	Diámetro 0.5-1.2; hifas vegetativas amplias que se fragmentan a bacilos y cocos	64-72	Aerobios	Se forman hifas aéreas; catalasa positiva; pared celular tipo IV; ampliamente distribuido en el suelo.
<i>Propionibacterium</i>	Bacilos inmóviles pleomórficos de 0.5- 0.8 x 1-5, pueden ser bifidos o ramificados; no esporulados.	53-67	Anaerobios o aerotolerantes	La fermentación produce propionato y acetato, y a menudo gas; catalasa positivos.
<i>Streptomyces</i>	Diámetro 0.5-2.0; micelio vegetativo ampliamente ramificado; micelio aéreo que forma cadenas de entre 3 y muchas esporas.	69-78	Aerobios	Forman colonias discretas, coriáceas, opacas, que a menudo están pigmentadas; usa muchos compuestos orgánicos diferentes como alimento; microorganismos del suelo.

3.3.2. Condiciones de crecimiento

La adición de materia orgánica a los suelos estimula la multiplicación y actividad de los actinomicetos. Los suelos alcalinos y neutros resultan ser más favorables para el desarrollo de estas bacterias; el rango de pH óptimo para las actividades de estos microorganismos se encuentra entre 6.5 y 8.0; en suelos con pH por debajo de 5.0 es frecuente observar su ausencia. Los actinomicetos al ser principalmente aerobios se desarrollan favorablemente en suelos bien aireados; suelos con humedades entre el 80 y el 90% son perjudiciales para el crecimiento de los actinomicetos. El porcentaje de actinomicetos en la población total microbiana incrementa con la profundidad del suelo, sin embargo pueden ser encontrados en la superficie de éste. Los géneros *Streptomyces*, *Nocardia* y *Micromonospora* se encuentran frecuentemente como habitantes del suelo (Titus & Pereira 1999).

La mayoría de los actinomicetos crecen en medios como agar nutritivo, agar tripticosa soja, agar sangre o agar infusión cerebro corazón. Sin embargo, para la diferenciación y el desarrollo de esporas y/o pigmentos se necesita de medios suplementados con quitina coloidal, extracto de suelo, avena, almidón con sales inorgánicas, agar agua con determinados polisacáridos como fuente de carbono, extracto de levadura o peptona. Por ejemplo las colonias de algunas especies de *Streptomyces* que crecen como colonias duras, brillantes y pálidas en agar nutritivo; en medio avena o de sales inorgánicas con almidón pueden crecer como colonias amarillas brillantes con micelio aéreo pulverulento blanco (Berger *et al.*, 2000).

El crecimiento de las colonias de actinomicetos en medio sólido se puede ver a los 3 ó 4 días de incubación pero el desarrollo de micelio aéreo maduro con esporas puede tardar entre 7 y 14 días en desarrollarse, y en algunas cepas de crecimiento lento hasta más de un mes de incubación. El crecimiento en medios líquidos estacionarios se restringe a la formación de una película en la superficie o quizás un sedimento algodonoso dejando el medio líquido transparente. Por lo cual para el crecimiento en medios líquidos se recomienda una agitación a velocidades como 200 ó 250 rpm para suministrar la mejor aireación posible. A diferencia de las bacterias no filamentosas, los actinomicetos pueden crecer formando “pellets” o agrupaciones de filamentos en medios líquidos (Prescott, 2002). Se caracterizan por no producir mucopolisacáridos como otras bacterias como las mixobacterias (Ben-Omar *et al.*, 1997), de ahí que se observen en placas de agar como colonias secas y no cremosas.

3.3.3. Ecología y distribución

Los actinomicetos son microorganismos muy ubicuos que se encuentran en la gran mayoría de sustratos naturales, ampliamente distribuidos en una gran variedad de hábitats diferentes: suelo, agua marina, agua dulce, aire, estiércol, fango de los ríos y fondo de los lagos. Son saprófitos y algunas especies pueden provocar enfermedades a las plantas, animales domésticos e incluso al hombre (Martin 1981).

En el suelo se encuentran en casi todos los tipos y bajo condiciones extremas disminuyen levemente la concentración de la población. Su número varía en gran proporción según el caso, pero es común encontrarlos en suelos fértiles con concentraciones de 10^6 UFC·g⁻¹ de suelo seco. Por lo general se aíslan cepas de actinomicetos en la superficie del suelo y en profundidades entre 2 y 15 cm, más allá de esta profundidad disminuye la cantidad de éstos. El tamaño de la comunidad depende del tipo del suelo, particularmente de algunas de las características físicas, del contenido de materia orgánica y del pH del medio ambiente (Tate, 2000).

Los principales géneros que se aíslan a partir de suelos son *Nocardia*, *Streptomyces* y *Micromonospora*, que pueden estar presentes como conidias o como hifas vegetativas (Martin, 1981). Sin embargo, los métodos de aislamiento convencionales muestran que el 95% de los actinomicetos aislados a partir de suelo pertenecen al género *Streptomyces* (Lacey, 1973). El uso de técnicas moleculares para la detección de estas bacterias en diferentes ambientes ha mostrado la presencia de organismos de la clase Actinobacteria que no han podido ser aislados por técnicas tradicionales de cultivo. Ciertos de estos organismos no han sido identificados específicamente, y la posición filogenética de algunos subgrupos muestra que su divergencia corresponde con la de los géneros tradicionales de actinomicetos, indicando una estructura rica en organismos de esta clase y no cultivable en suelos (Rheims *et al.*, 1999).

Los actinomicetos son frecuentemente descritos como organismos de crecimiento lento que no compiten eficientemente con bacterias u hongos de rápido crecimiento por el carbono disponible en el suelo. Sin embargo, son microorganismos importantes en la mineralización del carbono y el nitrógeno, y en la descomposición de la materia orgánica presente en el suelo. La descomposición de la materia orgánica en el suelo es llevada a cabo por los actinomicetos gracias a la diversidad de enzimas hidrolíticas, ligninolíticas y por la capacidad de degradar compuestos recalcitrantes presentes en la materia orgánica que es mineralizada en el suelo (Sylvia, 1998).

Algunos géneros han sido reportados como fijadores de nitrógeno atmosférico, como *Frankia* y algunas cepas pertenecientes a las familias Thermomonosporaceae y Micromonosporaceae (Valdés *et al.*, 2005).

Los actinomicetos también han sido descritos como agentes de biocontrol por la capacidad de producir enzimas biodegradativas como quitinasas, glucanasas, peroxidasas y otras, involucradas en el papel del micoparasitismo que llevan a cabo estos microorganismos (Tokala *et al.*, 2002). El género *Streptomyces* ha sido descrito como colonizador de la rizosfera, capaz de ejercer biocontrol sobre hongos fitopatógenos, producir sideróforos, sustancias promotoras del crecimiento vegetal *in vitro*, promover la nodulación y ayudar a los bacteriodes de *Rhizobium* a la asimilación del hierro en la fijación de nitrógeno en leguminosas, lo cual contribuye indirectamente a la promoción de crecimiento vegetal (Tokala *et al.*, 2002).

3.3.4. Clasificación de los Actinomicetos

La clasificación de los actinomicetos ha ido evolucionando a medida que se han generado nuevas técnicas de clasificación. El gran interés que generaron los actinomicetos por la gran diversidad de metabolitos secundarios y terapéuticos, especialmente el género *Streptomyces*, hizo que se desarrollaran rápidamente estudios de carácter citológico y fisiológico pero no ampliamente los de clasificación (Hopwood, 2003).

Los criterios de clasificación utilizados se han basado en la quimiotaxonomía, donde se estudian los componentes de la pared bacteriana (Tabla 1), el tipo de peptidoglicano incluyendo azúcares e isómeros de ácido diaminopimélico (DAP), el patrón de los ácidos grasos y de fosfolípidos de membrana, las menaquinonas y su grado de hidrogenación, contenido y tipo de ácidos micólicos, y el porcentaje molar de relación Guanina - Citosina (mol% G+C) del ADN (Goodfellow & Cross, 1984; McNeil & Brown, 1994). Otro criterio que se ha usado para la clasificación es la fagotipificación, aprovechando la especificidad por el hospedador de los actinofagos, con lo cual se ha conseguido identificar hasta nivel de género y especie, especialmente para el género *Streptomyces* (Wellington & Williams, 1981).

La serología ha sido también utilizada para la clasificación de los actinomicetos, así como el desarrollo de pruebas bioquímicas rápidas para la identificación de los miembros de la familia *Actinomycetaceae* y otras bacterias relacionadas como es el caso del sistema

API ZYM, y el desarrollo de sustratos cromogénicos y fluorogénicos para la detección de enzimas bacterianas que permitan una rápida y acertada clasificación (McNeil & Brown, 1994).

La clasificación del género *Streptomyces* se inicia en 1964 con el proyecto internacional de *Streptomyces* (ISP del inglés “Internacional *Streptomyces* Project”) para introducir un criterio estándar en la determinación de especies de este género. Mediante la utilización de varias características fenotípicas se consiguió reducir la cantidad de especies de *Streptomyces* de 463 a 142 de la versión del Manual de Sistemática Bacteriológica de Bergey del año 1972 al año 1989. Adicionalmente, existían aislamientos que no concordaban con las matrices de identificación. Hoy en día, para la clasificación de especies de *Streptomyces*, se deben utilizar métodos quimiotaconómicos y moleculares, junto con los métodos de taxonomía numérica basados en criterios fenotípicos (Wellington & Anderson, 2001).

La aplicación de técnicas moleculares al análisis de genomas bacterianos ha contribuido considerablemente a la taxonomía bacteriana (Wellington & Anderson, 2001). Filogenéticamente los actinomicetos forman una subdivisión de los organismos del dominio *Bacteria*, diferente de los formadores de endosporas y de los cocos Gram positivos (Figura 2).

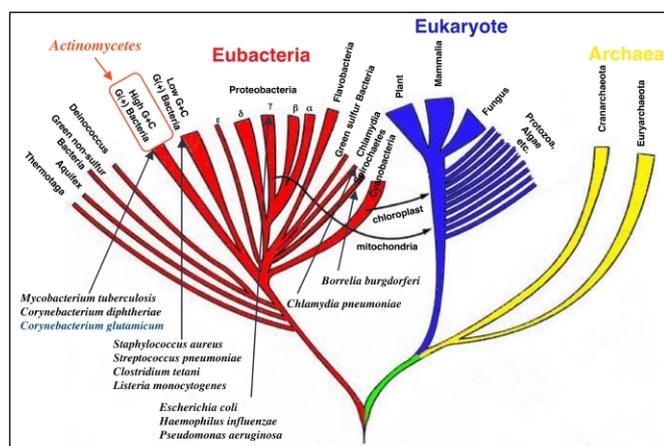


Figura 2. Árbol filogenético de los organismos tomado de: Kitasato University, (2007)

Las subunidades 16S y 23S del ADN_r son moléculas razonablemente grandes y por consiguiente contienen información suficiente para llevar a cabo comparaciones

significativas. Dado que el ADNr 16S es más manejable que el 23S para la experimentación, se está utilizando extensamente para estudios filogenéticos (Madigan *et al.*, 1998). La secuencia de nucleótidos del ADNr 16S está altamente conservada en algunas regiones y contiene regiones variables y las tasas de mutación son relativamente bajas. Un gran número de secuencias están disponibles en las bases de datos, lo que facilita la identificación de regiones con secuencias únicas por medio de alineamientos (Rosado *et al.*, 1997). Particularmente, los genes codificantes para la subunidad 16S del ADNr contienen regiones con secuencias altamente conservadas y regiones muy variables, las cuales permiten la medida de relaciones filogenéticas entre taxa cercanos o distantes y la capacidad de resolver el dominio, división, familia, clase, orden, género y especie de los microorganismos analizados (Penny & Haldeman, 1997).

3.4. Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR)

3.4.1. Conceptos generales

Las bacterias que colonizan la raíz y su zona de influencia (suelo rizosférico) son denominadas “rizobacterias” (Kloepper, 1994 y 1996). Las Rizobacterias beneficiosas conocidas en la literatura con el acrónimo PGPR (del inglés “Plant Growth Promoting Rhizobacteria”) desempeñan funciones claves para la planta tales como: (i) *control biológico de los patógenos* mediante efectos antagonistas o de Inducción de Resistencia Sistémica (van Loon *et al.*, 1998), (ii) *incremento de la biodisponibilidad de elementos minerales* como por ejemplo la solubilización de fosfatos, fijación de nitrógeno, o (iii) *la fitoestimulación* al propiciar la emergencia o el enraizamiento. La fitoestimulación provocada por la inoculación de PGPR ocurre por varios mecanismos. Uno de ellos se basa en la síntesis de sustancias reguladoras de crecimiento, como giberelinas, citoquininas y auxinas, las cuales estimulan la densidad y longitud de los pelos radicales, lo que incrementa a su vez la capacidad de absorción de agua y nutrientes y permite que las plantas sean más vigorosas, productivas y tolerantes a condiciones climáticas adversas, como la sequía. La literatura científica que describe tales actividades es amplia (Kloepper *et al.*, 1991; Hass, 1991; O’Gara *et al.*, 1994; Welller & Thomashow, 1994; Glik, 1995; Van de Broek & Vanderleyden, 1995; Bashan & Holguin, 1998; Barea, 2000; Gutierrez-Mañero *et al.*, 2001 y 2002; Probanza *et al.*, 2002; de Boer *et al.*, 2003; Persello-Cartieaux *et al.*, 2003; Barea *et al.*, 2004; Zahir *et al.*, 2004; Gamalero *et al.*, 2004).

Las PGPR están asociadas a muchos tipos de plantas y se encuentran comúnmente presentes en diversos ambientes. Algunas rizobacterias colonizan la superficie de la raíz y la interfase del suelo subsiguiente; algunas otras pueden tener características endofíticas en raíz, vástago, hojas, tubérculos y otros órganos (Compant *et al.*, 2005). Las PGPR deben cumplir tres características intrínsecas: (i) ser capaces de colonizar la raíz y/o su zona de influencia; (ii) sobrevivir y multiplicarse en los micro-hábitat asociados a la superficie de la raíz donde compiten con la microbiota natural, al menos el tiempo suficiente para ejercer de forma efectiva su actividad promotora del crecimiento y (iii) estimular el crecimiento vegetal (Kloepper, 1994).

En el proceso de colonización de la raíz o rizosfera la bacteria es atraída por quimiotaxis basada en compuestos presentes en los exudados radicales, para posteriormente unirse a la superficie radical. Algunas bacterias como por ejemplo *Azospirillum* spp., pueden incluso llegar a penetrar en la raíz y colonizar los espacios intercelulares, aunque no forman estructuras especializadas como ocurre en el caso de la asociación *Rhizobium*-Leguminosa. Dentro de este grupo se encuentran especies pertenecientes a los géneros *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Xanthomonas*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Burkholderia* y *Bacillus* (Kloepper *et al.*, 1989; Bashan & Levany, 1990; Okon & Lavandera, 1994; Tang, 1994; Barea *et al.*, 2004).

En resumen, se acepta que las PGPR pueden afectar al crecimiento de las plantas, bien de forma directa mediante el suministro de determinados compuestos a las planta, o facilitando la captación de nutrientes solubles del suelo (como hace *Azospirillum* spp.), o bien pueden actuar de forma indirecta evitando los efectos deletéreos de uno o más organismos fitopatógenos (fundamentalmente *Pseudomonas* spp.), de ahí que actualmente se tienda a clasificar o dividir a las PGPR en dos grupos: “PGPB” (del inglés “Plant Growth Promoting Bacteria”) y “Biocontrol-PGPB” (Bashan & Holguin, 1998; Cattelan *et al.*, 1999). El cambio del término “PGPR” por “PGPB” se debe a que muchas bacterias que ejercen efectos beneficiosos sobre la planta no son buenas colonizadoras. Bashan & Levany (1990) defienden la actuación conjunta de diversos mecanismos, siendo los mecanismos individuales menos importantes que si operan de manera conjunta.

En lo referente a los efectos indirectos son de destacar los basados en la producción de antibióticos y cianuros de hidrógeno (HCN) que generan un decrecimiento en la

población de fitopatógenos (Zahir, 2004). La producción de sideróforos es la base de otra actividad de las PGPR ya que estos metabolitos que actúan mediante dos mecanismos: la captación de hierro que puede beneficiar directamente a la planta aumentando la disponibilidad del elemento o indirectamente como agente patógeno para otros microorganismos o plagas por cumplir esta misma labor.

La conjunción de todos los mecanismos de acción ha dado como resultado la promoción evidente del crecimiento en plantas, un incremento en la emergencia, el vigor y el peso de plántulas, un mayor desarrollo en sistemas radiculares y un incremento hasta de 30% en la producción de cultivos de interés comercial, tales como papa, rábano, tomate, trigo y soja (Jiménez, 2001).

3.4.2. Mecanismos implicados en la actividad PGPR

Aunque brevemente mencionados en el apartado anterior (Numeral 3.4.1), en este apartado se amplía la información sobre los mecanismos implicados en la actividad PGPR.

3.4.2.1. Producción de reguladores de Crecimiento Vegetal

Al ser este un mecanismo destacado de la actividad PGPR, se ofrece previamente una breve reseña al significado de estas sustancias en la planta.

La formación de órganos en la planta y su consecuente desarrollo, están mediados por factores internos de vital importancia. Los reguladores del crecimiento en las plantas (PGR del inglés “Plant Growth Regulators”) son conocidos como hormonas vegetales; pequeñas moléculas que afectan el desarrollo y crecimiento vegetal a muy bajas concentraciones (García Breijo, 2006). Se sabe que los niveles endógenos hormonales generan cambios en los procesos fisiológicos, que repercuten en la floración, fructificación y rebrote de hojas principalmente. Las hormonas vegetales pertenecen a cinco grupos conocidos de compuestos que ocurren en forma natural, cada uno de los cuales exhibe propiedades fuertes de regulación en el crecimiento de las plantas. En estos grupos se incluyen auxinas, etileno, giberelinas (GA), citoquininas y ácido abscísico, todas son moléculas que se encuentran en un rango de peso molecular entre 28 Da (etileno) y 346 Da (GA) (Kamara, 2001). En el presente estudio se concede a las auxinas un interés preferencial por lo que se amplía algo la información sobre esta fitohormona.

La auxina típica es el ácido indol acético (AIA), hormona de la cual aun se conoce poco sobre los mecanismos de su expresión, metabolismo, transporte y distribución final. Su efecto en las células es controlar los tropismos que se manifiestan como inclinaciones, giros o curvaturas del tallo y desarrollo del sistema radical. Se conoce que esta hormona vegetal otorga beneficios a la planta puesto que su división a nivel celular incrementa, lo cual se representa en un aumento de tamaño de los frutos y número de hojas (Uggla *et al.*, 1996; Garcia Breijo, 2006).

La promoción del desarrollo del sistema radical característico de este tipo de reguladores de crecimiento vegetal, es uno de los parámetros utilizados para determinar la efectividad de determinadas bacterias rizosféricas (Fett *et al.*, 1987; Torres-Rubio *et al.*, 2000). El rápido establecimiento de raíces, ya sea por elongación de la raíz primaria o por surgimiento de raíces laterales secundarias, permite a las semillas jóvenes tener pronto un acceso a nutrientes y agua provenientes de su medio ambiente (Patten & Glick, 2002).

El AIA es similar en estructura al aminoácido triptófano, y probablemente es éste el precursor del AIA formado en la planta viva; aunque se conocen cuatro vías de formación de dicha auxina cada una de ellas con un intermediario distinto (García Breijo, 2006). Diferentes grupos de plantas emplean diversas rutas para producir AIA a partir del triptófano. En bacterias, la producción de AIA ocurre a partir del triptófano por medio de la indol-acetamida que se encuentra implicada en la generación de tumores en la planta; existe una ruta alternativa tomada por otras bacterias que involucra la utilización del ácido 3 indol pirúvico como intermediario (Figura 3) (Fett *et al.*, 1987; Patten & Glick, 2002).

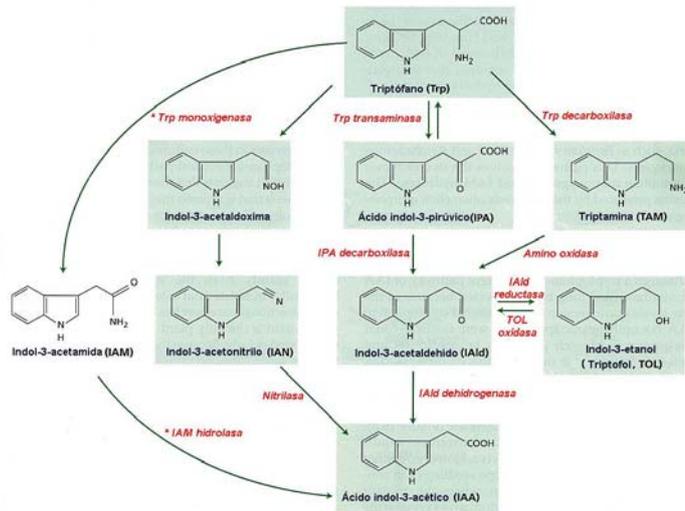


Figura 3. Biosíntesis del ácido indol acético (indol 3-acetato; auxina) a partir de triptófano en plantas y en bacterias. Las enzimas que sólo se presentan en bacterias están marcadas con un asterisco. El NAD⁺ y el NADP⁺ se sintetizan también a partir del triptófano; tomado de García Breijo (2006).

3.4.2.2. Producción de Sideróforos

Los sideróforos son compuestos producidos por diferentes microorganismos en el suelo que basan su actividad en fenómenos de quelación, un fenómeno rutinario en los sistemas biológicos (Neilands, 1995; Sánchez, 2006). La gran mayoría de los microorganismos fijadores de nitrógeno producen sideróforos para obtener el hierro, elemento necesario para llevar a cabo la fijación de N, ya que la enzima nitrogenasa, que está compuesta de varias unidades protéicas, requiere 36 átomos de hierro para su correcto funcionamiento (Sylvia, 2005).

Teniendo en cuenta la importancia del hierro en las funciones vitales de los microorganismos en general, se entiende la eficiencia de los mecanismos de captación generados por estos mismos. Las bacterias aerobias y las aerobias facultativas tienen una alta afinidad por los sistemas transportadores de hierro, razón por la cual se excretan sideróforos que auxilian la toma eficiente de este elemento (Jurkevitch *et al.*, 1992). Existen varios trabajos donde se menciona la capacidad por parte de los actinomicetos de capturar hierro de su hábitat, por medio de ciertos tipos de sideróforos. Así, especies de *Nocardia*, *Streptomyces* y *Arthrobacter* se han descrito como productoras de sideróforos de tipo hidroxamato (Müller & Raymond, 1984; Müller *et al.*, 1984).

Diversos estudios han demostrado que entre las diferentes clases de sideróforos existentes, los primeros identificados son los de tipo catecol (Figura 4a) e hidroxamato (Figura 4b) (Neilands, 1995). Recientemente se han descrito ciertos α -cetoácidos con características y actividad similar a la de los sideróforos.

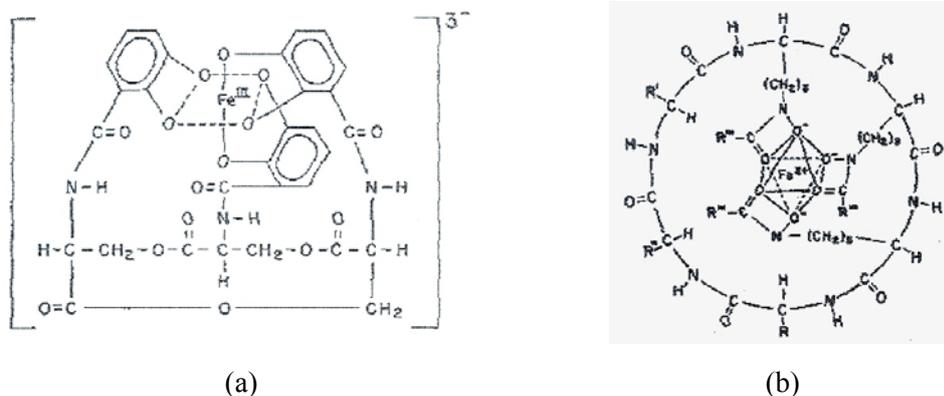


Figura 4. Estructura química de sideróforos. a) Estructura general de enterobactina férrica, un sideróforo tipo Catecol. b) Estructura general de ferricrom, un sideróforo tipo hidroxamato (Neilands, 1995)

3.4.2.3. Fijación no simbiótica de nitrógeno

La fijación de nitrógeno atmosférico (N_2) es un proceso indispensable para el desarrollo de la planta; dicho elemento es primordial en la formación de estructuras moleculares como los ácidos nucleicos, aminoazúcares, aminoácidos, entre otros. A nivel microbiano, el complejo nitrogenasa ha sido ampliamente estudiado en la fijación del elemento, pues se presenta en varias bacterias de tipo rizosférico. La fijación biológica de nitrógeno con microorganismos del suelo es considerada uno de los principales mecanismos por el cual las plantas encuentran beneficio de la asociación, uno de los beneficios más estudiados es la relación mantenida con microorganismos diazotróficos, que proveen a la planta de nitrógeno y esta en retorno, proporciona fuente de carbono disponible por los exudados (Zahir, 2004).

3.4.2.4. Solubilización de fosfatos insolubles

El fósforo después del nitrógeno, es el nutriente inorgánico más requerido por plantas y microorganismos, y en suelo es el factor limitante del desarrollo vegetal a pesar de ser

abundante tanto en formas inorgánicas como orgánicas. No es posible capturarlo biológicamente del aire como ocurre con el nitrógeno (Alexander, 1980; Nautiyal, 1999). Las concentraciones de P en las soluciones del suelo son pequeñas, desde 0.01 a 0.3 mg P·L⁻¹ (Ozanne, 1980). Aunque el fósforo presente en la solución del suelo es solo una parte pequeña del contenido total del P en el suelo, es de esa parte de donde las plantas toman la mayoría de sus requerimientos en P inmediatos (Bolán, 1991). En ausencia de niveles significativos de P inorgánico relativamente lábil, de manera que en todos los suelos es constante la razón P inorgánico lábil/P en solución (Stewart & Sharpley, 1987). La solución del P en el suelo solamente es adecuada si el P inorgánico lábil es solubilizado al menos tan rápidamente como las raíces pueden extraerlo del suelo (Russell, 1980). Cuando las plantas toman P de la solución del suelo, el P utilizado, es repuesto a partir de las formas lábiles y moderadamente lábiles de P inorgánico. Cuando estas fuentes están agotadas entonces la fuente de P no lábil es el factor que determina la concentración de P soluble en el suelo (Stewart & Sharpley, 1987).

Los concentración de P asimilable es muy baja, normalmente en niveles que varían entre 5 y 30 mg·kg⁻¹. Estos índices bajos del nutriente se deben a que el fósforo soluble reacciona con iones como el calcio, el hierro o el aluminio que provocan su precipitación o fijación, disminuyendo su disponibilidad para las plantas. Los fosfatos inorgánicos aplicados como fertilizantes químicos también son inmovilizados en el suelo y como consecuencia no son solubles para ser aprovechados por los cultivos (Alexander, 1980; Atlas, 2002). La disponibilidad del fósforo inorgánico depende de diferentes factores como: los fluidos y minerales presentes en el suelo, el pH, la actividad microbológica, la presencia de enzimas y ácidos orgánicos, y la intensidad de la demanda del nutriente. Los agentes de origen biológico son posibles de manejar y prácticamente tienden a mantener el fósforo en sus estados de mayor disponibilidad, incrementando y manteniendo altas tasas de mineralización e inmovilización. Por lo tanto, los microorganismos son fundamentales para asegurar un mejor y mayor uso del fósforo en el suelo. El mantenimiento de altas tasas de nutrientes limitantes es un desafío grande para los agricultores, quienes se ven obligados a implementar técnicas, que en algunas ocasiones, no resultan muy benéficas para el mismo suelo (Azcón & Barea, 1997, Atlas, 2002; Nautiyal *et al.*, 2000).

El propósito principal de las bacterias solubilizadoras de fosfato es optimizar la disponibilidad para la planta de dicho elemento en el suelo, lo que como resultado genera

un incremento en el rendimiento de cosechas ya que cambia las formas insolubles del P en el suelo en formas solubles (Chen *et al.*, 2006)

3.4.2.5. Producción de quitinasas

La quitina es un homopolímero formado por residuos de N-acetil-D-Glucosamina con enlaces β -1,4. Es el recurso renovable más abundante después de la celulosa. Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza como un componente estructural de crustáceos, hongos, protozoos e insectos (Hoster *et al.*, 2005).

La quitina y sus derivados presentan un especial interés por encontrarse involucrados en diferentes actividades biológicas como inmunoadyuvantes, floculantes de lodos en aguas residuales y disminución del uso en agroquímicos. El uso comercial de la quitina se centra en la necesidad de desarrollar soluciones enzimáticas de quitinasas estables y de bajo costo, los residuos de mariscos han reportado ser una adecuada fuente de quitina, lo cual promueve aún más el valor económico de los productos marinos (Wang & Chang, 1997).

La quitina es hidrolizada por un complejo quitinasa que comprende tres enzimas: exoquitinasa, endoquitinasa y quitobiasa, la primera de estas libera dímeros solubles de bajo peso molecular, la segunda libera multidímeros de N-Acetil glucosamina y la última hidroliza quitobiasas de N-Acetil glucosamina (Gomes *et al.*, 2000).

Las quitinasas son glicosil hidrolasas y se encuentran presentes en una gran variedad de organismos tales como bacterias, hongos, insectos, plantas y animales. Estas enzimas juegan papeles fisiológicos y ecológicos importantes. Los invertebrados requieren quitinasas para la degradación parcial de sus exoesqueletos viejos y las plantas como un mecanismo de defensa contra hongos patógenos (Hoster *et al.*, 2005). Las bacterias producen quitinasas principalmente para degradar quitina y usarla como fuente de energía. Adicionalmente, algunas quitinasas de bacterias quitinolíticas, son agentes potenciales para el control biológico de enfermedades de plantas causadas por diversos hongos fitopatógenos, pues hidrolizan la quitina presente en la pared celular del hongo. Las bacterias fitopatógenas también pueden ser controladas por estas enzimas quitinasas debido a que algunas presentan actividad lisozimal, lo cual permite la degradación de la pared celular bacteriana (De la Cruz *et al.*, 1992). Estas enzimas pertenecen a muchas especies bacterianas, entre las más conocidas se encuentran los géneros *Aeromonas*, *Serratia*, *Myxobacter*, *Vibrio*, *Streptomyces* y *Bacillus* (Hoster *et al.*, 2005).

Los actinomicetos se consideran los organismos dominantes en la descomposición de quitina en el suelo (Ames, 1989), en especial el género *Streptomyces* ha sido descrito como microorganismo productor de enzimas extracelulares líticas entre las que se encuentran las quitinasas, son catalogados como agentes antagonistas prometedores para el biocontrol, debido a la reacción de hidrólisis que catalizan estas enzimas sobre el micelio de los hongos en suelos ácidos y hojarasca (Gomes *et al.*, 2001).

3.5. Interacciones entre MA y rizobacterias

3.5.1. Mycorrhiza helper bacteria (MHB)

El concepto de “mycorrhiza helper bacteria” (MHB) fue introducido en un “Tansley Review”: *Helper Bacteria: una nueva dimensión de la simbiosis micorrícica* (Garbaye, 1994), que ha conllevado a nuevas investigaciones en el sistema modelo planta-hongo, en cuanto al significado de estas bacterias que promocionan la formación de las micorrizas y ocasionan muchos efectos fisiológicos de la interacción mutualista. El concepto de MHB es genérico, este depende del tipo de simbiosis micorrícica pero no de la posición taxonómica de la bacteria. En relación con las MA, han sido descritos muchos ejemplos (Abdel-Fattal & Mohamedin, 2000; Barea *et al.*, 2005; Artusson *et al.*, 2006). Ciertos actinomicetos (*Rhodococcus*, *Streptomyces* y *Arthrobacter*) han sido identificados como bacterias que se asocian al micelio de hongos ectomicorrícicos (Burke *et al.*, 2006), y solo hay una referencia de *Streptomyces coelicolor* asociado a *Glomus intraradices* en cultivos de sorgo (Abdel-Fatah & Mohamedin, 2000).

En general, se conoce la capacidad de algunos microorganismos para influir en la formación y el funcionamiento de las simbiosis MA, mediante actividades de distinta índole como son la activación de propágulos infectivos del hongo en estadios presimbóticos (Azcón-Aguilar & Barea, 1996; Giovannetti *et al.*, 2002), facilitar la formación de puntos de entrada en la raíz (Azcón-Aguilar *et al.*, 1986a; Linderman, 1988; Vivas *et al.*, 2003) e incrementar la tasa de crecimiento (Mosse, 1959; Mayo *et al.*, 1986; Carpenter-Boggs *et al.*, 1995).

Se ha descrito que la trehalosa (carbohidrato resultante de la transformación de carbono vegetal a carbono fúngico) puede estar implicada en la selección de comunidades específicas bacterianas en la micorizosfera de árboles forestales (Frey *et al.*, 1997; Izumi *et al.*, 2006; Uroz *et al.*, 2007). Adicionalmente se ha encontrado que este carbohidrato

ayuda a la formación de películas bacterianas sobre las células hifales (Frey-Klett *et al.*, 2007).

Las MHB mejoran la formación de la micorriza aunque una misma MHB puede beneficiar la micorrización para determinados hongos y ser negativa para otros (Garbaye & Duponnois, 1992; Tarka & Frey-Klett, 2008). Lo anterior refleja la especificidad fúngica por aislado, que ejemplifica la distancia genética entre aislamientos de diferente origen. Recientemente, Riedlinger *et al.* (2006) identificaron un antibiótico nuevo (auxofurán) responsable de la promoción del crecimiento del hongo ectomicorrícico *Amanita muscaria* generado por la bacteria *Streptomyces* sp. AcH505, el cual actúa de forma benéfica frente al hongo y a su proceso de micorrización.

Dentro de los mecanismos que presentan las MHB se encuentran:

- a. *Promoción del establecimiento de la simbiosis por estimulación de la extensión micelial.* La germinación de las esporas y el crecimiento micelial son mejorados por la producción de factores de crecimiento (Hildebrandt *et al.*, 2006; Keller *et al.*, 2006; Riedlinger *et al.*, 2006).
- b. *Incremento del contacto y colonización raíz – hongo.* Incremento del número de raíces laterales, mediado por la producción de fitohormonas (Bending *et al.*, 2002; Aspray *et al.*, 2006). Mejora de la colonización radical por inducción de la producción de flavonoides (Xie *et al.*, 1995).
- c. *Reducción del impacto a factores ambientales adversos sobre el micelio del hongo micorrícico.* Las bacterias pueden realizar una detoxificación de suelos, restaurando la conductividad del mismo, de forma similar lo liberan de la contaminación generada por metales pesados (Brulé *et al.*, 2001) y reducen las concentraciones de compuestos fenólicos antagonistas producidos por los mismos hongos micorrícicos (Duponnois & Garbaye, 1990).

3.5.2. Interacciones relacionadas con la promoción del crecimiento de las plantas

Los microorganismos rizosféricos tienen también efecto sobre el crecimiento de las plantas, llegándose a registrar un efecto de sinergismo, donde la presencia de la MA y del otro microorganismo produce un incremento del crecimiento, vigor y protección de la planta (Barea *et al.*, 2005; Artursson *et al.*, 2006). Estos efectos están basados en

actividades tales como la adquisición de nutrientes, inhibición del crecimiento de hongos patogénicos (Budi *et al.*, 1999) y mejora de la ramificación radicular (Gamalero *et al.*, 2004).

En adición a estos efectos producidos por la bacteria sobre los hongos MA, la micorriza a su vez, produce un impacto en la composición de comunidades bacterianas (Artursson *et al.*, 2005). Este impacto puede ser retransmitido a través de la raíz de la planta porque el establecimiento de la micorriza ha demostrado cambiar la composición química de los exudados de la raíz y éstas son a menudo una fuente de alimentos a las bacterias asociadas en la micorrizosfera (Azcón-Aguilar & Bago, 1994; Barea, 1997; Gryndler, 2000; Artursson *et al.*, 2006). Sin embargo, los cambios en la composición y la actividad del hongo MA en las comunidades bacterianas, también se le han atribuido a interacciones más directas, incluyendo la competición para los elementos inorgánicos (Christensen & Jakobsen, 1993).

Aunque hay numerosos estudios referentes a las interacciones de los hongos MA y rizobacterias, asociaciones entre MA y actinomicetos se conocen escasamente, por lo que se requieren investigaciones que permitan la confirmación experimental adicional sobre actividades y mecanismos relacionados. Las investigaciones en micorrizas deben por lo tanto esforzarse hacia una comprensión mejorada de los mecanismos funcionales involucradas en las interacciones en la micorrizosfera, para poder desarrollar la biotecnología *ad hoc* que permita aplicar las combinaciones optimizadas de microorganismos como inoculadores eficaces dentro de sistemas sostenibles de la producción vegetal (Andrade *et al.*, 1997; Artursson *et al.*, 2006).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

***“El mundo está en las manos de aquellos
que tienen el coraje de soñar y corren
el riesgo de vivir sus sueños”***

Paulo Coelho

En este Capítulo se describen las metodologías generales seguidas en el presente trabajo Doctoral, reservando aspectos más específicos para los Capítulos Experimentales correspondientes.

1. Material vegetal y toma de muestras rizosféricas

1.1. Caracterización de la población vegetal seleccionada

Se escogió como planta modelo la especie vegetal *Trifolium repens* L. (trébol blanco) por su capacidad de formar agrupaciones casi puras. Se identificaron parches coetáneos de esta especie, en por lo menos cinco zonas con poca vegetación y predominancia de pasturas en los municipios de Maripi, Sopó, Tocancipá, La Calera, Pacho, Medina, Tausa y en las capitales de Tunja y Bogotá situados en los Departamentos de Cundinamarca y Boyacá (Colombia). Cada parche se desarrolla en planos aluviales con unas características de drenaje y suelo uniforme en toda su extensión. Estas características son las recomendadas para el muestreo de microorganismos rizosféricos (Kang & Mills, 2004). Las poblaciones se desarrollan en pisos térmicos entre los 2000 y 2600 msnm. Una vez se ubicó el parche, se procedió a efectuar el levantamiento siguiendo la metodología de Braun & Blanquet (Matteucci & Colma, 1978) que permitió detectar el grado de dominancia de la especie de trébol, para descartar la participación de otras especies arbóreas y arbustivas dentro del parche, que puedan incidir sobre la cobertura total del rizoplano y eventualmente sobre el tipo de microorganismos asociados a este (Kottke, 2002).

1.2. Toma de muestra de suelo rizosférico

Se tomaron muestras de suelo rizosférico de trébol blanco (*Trifolium repens* L.) para el aislamiento de los microorganismos en áreas donde se desarrollaban las poblaciones seleccionadas de dicha especie. En cada uno de los lugares de muestreo se determinó la posición geográfica por medio de un sistema de posicionamiento global (GPS).

Las muestras de suelo se tomaron a partir de una capa que no excedía los 20 cm de profundidad. Las muestras, que contenían aproximadamente 500 g, se colocaron en bolsa de plástico con cierre hermético, fueron transportadas en nevera a la menor brevedad, hasta el laboratorio de Microbiología Ambiental y de Suelos de la Pontificia Universidad Javeriana (Bogotá – Colombia) para su posterior procesamiento. Cada una de las

muestras fue debidamente marcada según su posición geográfica denotando grados, minutos, segundos, latitud y longitud, datos obtenidos satelitalmente y con los cuales se elaboró un mapa de la localización de los muestreos.

2. Aislamiento y cuantificación de microorganismos

2.1. Aislamiento de hongos MA

Las esporas de hongos MA se obtuvieron siguiendo la técnica de tamizado húmedo y decantación (Walker *et al.*, 1982). Esta técnica consiste en realizar una suspensión de 50-100 g de suelo en aproximadamente 100 ml de agua destilada y tras una centrifugación a 2000 rpm durante 3 minutos, se elimina el sobrenadante. Posteriormente, el depósito de centrifugación (“pellet”) se homogenizó en una solución de sacarosa al 50% y se centrifugó de nuevo a 2000 rpm por 3 minutos. El sobrenadante obtenido tras esta segunda centrifugación se tamizó a través de una serie de tamices de diámetro de poro decreciente (80 y 50 μm). En el tamiz inferior (50 μm) se retienen las esporas.

La extracción de los esporocarpos se realizó mediante la homogenización del suelo en agua y dejando reposar la mezcla durante 1 minuto. Luego se realizó el tamizado a través de un tamiz de 80 μm de poro.

Las esporas y esporocarpos recogidos de sus respectivos tamices se obtuvieron con ayuda de un microscopio estereoscópico y unas pinzas de relojero, y se transfirieron a placas petri con papel de filtro humedecido para su conservación a 4°C hasta posterior uso.

2.2. Aislamiento de actinomicetos

De cada una de las muestras de suelo se tomaron 10 g (previa homogenización de las muestras) y se adicionaron a 90 ml de agua peptonada al 0.1% p/v para realizar las diluciones seriadas, utilizando la misma solución diluyente, hasta llegar a una dilución de 10^{-8} . De las diluciones 10^{-4} a 10^{-8} se sembraron por triplicado en superficie 0.1 ml de la dilución sobre medio agar avena suplementado con nistatina al 0.1% como agente inhibidor de hongos (Anexo1). La suspensión se distribuyó sobre la superficie del agar de forma homogénea y luego se incubó a 22°C durante 10 días (Sylvia, 1998; Franco-Correa, 1999). Pasado el tiempo de incubación se seleccionaron las colonias según las características morfológicas que permitieron determinar los aislamientos de actinomicetos

(textura, coloración del micelio aéreo y de sustrato, forma y tamaño de la colonia, y la producción de pigmentos (Bergey & Hendricks, 1984). Posteriormente se realizó el recuento de la población y se purificaron los aislamientos en agar avena suplementado con nistatina al 0.1%.

3. Identificación morfológica de esporas de hongos MA

Se siguieron las metodologías de Koske & Tessier (1983) y Morton & Benny (1990). Las esporas extraídas se observaron al microscopio estereoscopio (0.25x a 4x) y se separaron en relación al tamaño, morfología y color. Para su observación al microscopio óptico (de 10x a 40x) las esporas se dispusieron en un portaobjetos inmersas en polivinil-ácido láctico-glicerol (PVLG) usado como medio de conservación (Anexo 2).

La observación al microscopio óptico permite determinar el número de capas que presentan las paredes de las esporas, las características de las mismas (color, reacción al reactivo de Melzer, entre otras), morfología de la hifa de sustentación, presencia/ausencia del sáculo esporogénico, cicatrices, y otras características determinantes en la caracterización de los hongos MA.

4. Identificación de los actinomicetos

4.1. Caracterización morfológica

4.1.1. Caracterización macroscópica

Se observaron las características de crecimiento a nivel macroscópico de cada una de las cepas crecidas en agar avena durante 8 días. Se tuvo en cuenta la textura de la colonia, color del anverso y producción de pigmentos difusibles al medio (Bergey *et al.*, 2000).

4.1.2. Caracterización microscópica

Las diferentes cepas de actinomicetos aisladas se sembraron de forma masiva en agar avena suplementado con nistatina al 0.1%. Al mismo tiempo se introdujeron en el medio laminillas (cubre-objetos) estériles con una inclinación de 45° aproximadamente con respecto a la superficie del agar (Figura 5). Las placas se incubaron a 22°C durante 15 días, al cabo de los cuales se tomaron las laminillas y se colocaron sobre una lámina

porta-objetos con cristal violeta para la observación al microscopio del micelio aéreo, micelio de sustrato y los propágulos formados (Bergey *et al.*, 2000).

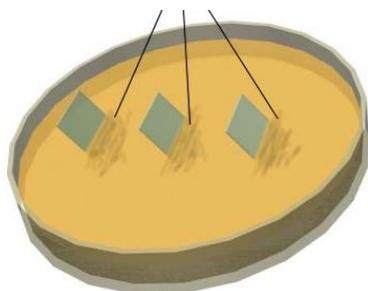


Figura 5. Esquema de la preparación de las láminas cubre objetos sobre medios agarizados para la visualización del crecimiento del micelio aéreo y de sustrato de los actinomicetos (Nguyễn *et al.*, 2006).

Se observaron las preparaciones utilizando microscopio de luz Olympus CH20 con objetivos de 40 y 100 aumentos. Los montajes con morfologías visibles de interés se fotografiaron con una cámara Olympus UDP 10 adaptada a un microscopio de luz Olympus CH30.

4.2. Caracterización bioquímica

La evaluación de actividades metabólicas determinantes para realizar la identificación de los actinomicetos se basó en la reducción de azúcares presentes en el Kit de pruebas bioquímicas BD BBL Crystal™ para la identificación de bacterias Gram positivas, suplementado con otras para completar la caracterización, dentro de las que se encuentra el kit de pruebas bioquímicas BD BBL Crystal™ E/NF (microorganismos entéricos no fermentadores).

4.3. Identificación molecular

Se siguió la metodología propuesta por Cook & Meyers (2003), realizándose a nivel de género mediante el uso de patrones de restricción de un segmento de la región DNAr 16S.

4.3.1. Extracción de DNA

Los aislados se hicieron crecer en 10 ml de medio ISP1 (Anexo 1) con agitación a 150 rpm (agitador orbital Barnstead/Lab-line, MAXQ 3000), a temperatura ambiente

durante 24 a 36 horas y se examinó la pureza mediante coloración de Gram. Se tomaron 4 ml del cultivo, se centrifugaron a 7500 g por 2 min, el “pellet” se lavó con 500 µl de tampón TE pH 7.7 (Anexo 2) y luego se resuspendió en 500 µl de tampón TE. Las muestras fueron incubadas a 100°C durante 10 min (baño termostático Elmasonic E30H), se dejaron enfriar por 5 min y se centrifugaron a 7500 g por 3 min (microcentrífuga Hettich, EBA 21). A continuación, se transfirieron 500 µl del sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo. Se adicionaron 500 µl de una solución de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) a cada muestra, se agitó en vórtex, se centrifugó por 10 min a 7500 g (microcentrífuga Hettich, EBA 21), se tomaron 450 µl del sobrenadante y posteriormente se adicionaron 500 µl de isopropanol absoluto. Se agitó y se llevó a incubar durante toda la noche a -20°C para la precipitación de los ácidos nucleicos. Las muestras se centrifugaron a 7500 g por 15 min (microcentrífuga Hettich, EBA 21) y el “pellet” resultante se lavó con 500 µl de etanol al 70%. Las muestras fueron resuspendidas en 200 µl de tampón TE pH 7.7 y se mantuvieron en congelación a -20°C (Sambrook *et al.*, 1989; Cook & Meyers, 2003).

4.3.2. Amplificación y purificación del ADNr 16S a partir de las extracciones de ADN de los actinomicetos aislados

A partir del ADN extraído de cada una de las cepas de los actinomicetos, se amplificó por PCR el gen codificante del ARNr 16S. Posteriormente se realizó la reacción de PCR para amplificar la región ADNr 16S. Lo anterior se llevó a cabo utilizando los “primers”:

- F1 (5'AGAGTTTGATCITGGCTCAG-3')
- R5 (5'-ACGGITACCTTGTTACGACTT'3') (I=inosina).

La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 50 µl así:

- 2U de Taq ADN polimerasa (Promega)
- 2 mM de MgCl₂ (Promega)
- 150 mM de cada dNTP (Promega)
- 0.5 mM de los primers F1 y R5
- 2 µl de ADN total extraído

El programa utilizado fue (Cook & Meyers, 2003):

denaturación inicial de 96°C por 2 min

30 ciclos de denaturación (96°C por 45s)

anillamiento (56°C por 30s)

extensión (72°C por 2 min)

extensión final (72°C por 5 min).

El volumen total de cada uno de los productos de PCR obtenido se separó en geles de agarosa Seakem LE (Cambrex) al 1% en tampón TAE 1X (Anexo 2) con bromuro de etidio en concentración 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. La electroforesis se llevó a cabo en cámara de electroforesis Termo Midicell primo EC 330 con una fuente de poder Power Pac Basic (Biorad) a 90 voltios, 200 miliamperios. Las bandas correspondientes al tamaño del ADNr 16S, 1500 a 1540 pb se cortaron y se colocaron en tubos eppendorf nuevos de 1.5 ml. Se utilizó el Kit de limpieza para productos de PCR a partir de geles de agarosa Wizard (Promega). Para verificar el tamaño de las bandas de los productos de PCR se utilizó el marcador de peso molecular de 100 pb (Promega) (Anexo 2).

A partir de los productos de PCR purificado de cada una de las muestras se tomaron alícuotas de 5 μl con 2 μl del tampón de carga Blue/Orange 6X (Promega) (Anexo 2) y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1X (Anexo 2) y bromuro de etidio en concentración 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ en las mismas condiciones que las usadas en la verificación de la calidad.

4.3.3. Análisis de restricción de los productos de PCR de ADNr 16S de los actinomicetos aislados

A partir de los productos de PCR limpios se tomaron 5 μl y se digirieron con 3U de la enzima *Sau3A1* en volumen final de 20 μl con el correspondiente tampón (Promega). Se analizó el resultado de la digestión de cada uno de los productos de PCR y a continuación se realizaron las restricciones con las respectivas endonucleasas de restricción utilizadas para la identificación del género según las claves dicótomas utilizadas por Cook y Meyers (2003) (Anexo 3). Se utilizó como control el producto de PCR de *Streptomyces coelicolor*, cepa identificada molecularmente y donada por el Laboratorio de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Sao Paulo (Brasil). Para todos

los ensayos de cortes con las enzimas de restricción se utilizó un volumen final de 20 μl con los respectivos tampones sugeridos por la casa comercial productora de las enzimas, 5 μl de los productos de PCR limpios y 3U de las enzimas de restricción correspondiente. Las condiciones de tiempo y temperatura de incubación de las digestiones se hicieron en baño termostático (Memmert WB 7) según la indicación de la casa comercial para cada enzima (Anexo 4). Todas las restricciones correspondientes para la identificación se realizaron por triplicado.

La separación de los fragmentos obtenidos luego de realizar el corte con las enzimas de restricción se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1X y bromuro de etidio en concentración 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. En los pozos iniciales de cada gel se incluyeron 4 μl del marcador de peso molecular 100 pb (Promega) (Anexo 2) en concentración 100 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ y 4 μl de un producto de PCR de ADNr 16S sin digerir. El análisis del tamaño de las bandas obtenidas en cada digestión se realizó en un documentador de geles Gel DocTM EQ System PC/Mac (BioRad) con el Software Quantity One.

4.3.4. Secuenciación del ADNr 16S de los actinomicetos seleccionados como promotores de crecimiento

Los productos de PCR del ADNr 16S purificados con el Kit de limpieza para productos de PCR Wizard (Promega) de las cepas de actinomicetos seleccionados como promotores de crecimiento vegetal y el control de *Streptomyces coelicolor* se enviaron a secuenciar a Macrogen (www.macrogen.com). Las secuencias fueron modificadas manualmente basándose en la calidad del cromatograma utilizando el programa de acceso libre por Internet ChromasPro versión 1.41 (Figura 6). El resultado de las secuenciaciones se analizó usando los servicios de la red informática BLAST en NCBI (Altschul *et al.*, 1997) y se alinearon con otras secuencias reportadas en bancos de genes de NCBI por medio del programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>).

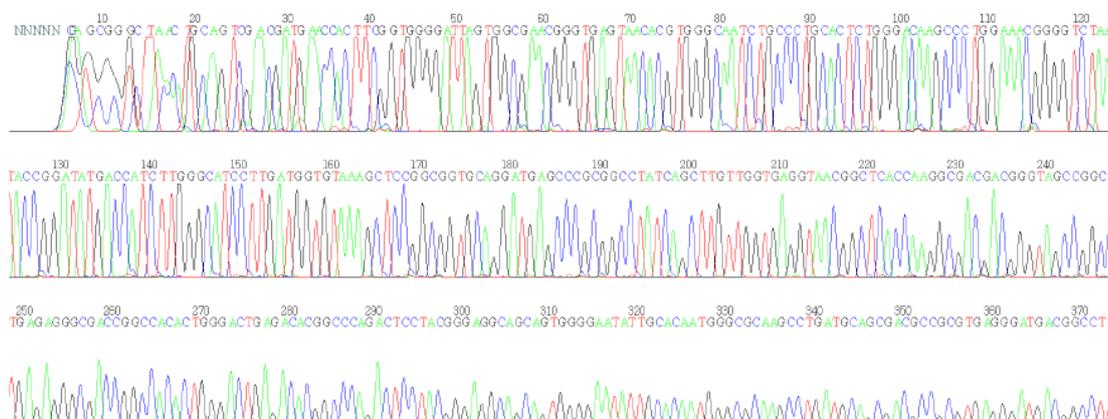


Figura 6. Cromatograma de la secuencia de *S. coelicolor* amplificado con el primer F1

4.4. Conservación de las cepas de actinomicetos

Para la conservación de los actinomicetos se utilizó 1 ml de glicerol a una concentración de 12% que se adicionó a tubos eppendorf de 1.5 ml, secos y estériles (Bayona, 2003). De cada una de las cepas de actinomicetos se realizó un raspado de la superficie con cuchillas quirúrgicas estériles, el cual fue colocado dentro de los tubos eppendorf homogenizándolo con el glicerol para su posterior almacenamiento a -20°C.

Para la conservación a corto plazo (subcultivo) se realizaron siembras masivas de cada una de las cepas aisladas en agar avena (tubos), se mantuvieron a temperatura de refrigeración (4°C) y se hicieron sub-cultivos cada 30 días (Monroy, 2002).

5. Evaluación *in vitro* de actividades de los actinomicetos relacionadas con la promoción de crecimiento vegetal

5.1. Capacidad para la solubilización de fósforo

La capacidad de la solubilización de P por parte de los actinomicetos se realizó según la técnica de Vásquez *et al.* (2000), partiendo de una suspensión en solución salina al 0.85% p/v de 10 ml con cada uno de los microorganismos determinando una

concentración de 3×10^8 células·ml⁻¹. En el medio Picovskaya suplementado con roca fosfórica y SRSM-1 (Anexo 1) (Atlas, 1995; Gunnarsson *et al.*, 2004) se adicionaron 50 µl de las suspensiones de células de actinomicetos, se incubaron a 22°C y se evaluó la formación de halos de solubilización medidos en mm, expresado en términos de zonas de aclaración, a los 4, 6, 8, 10, 12 y 14 días de crecimiento, con esta información se seleccionaron las mejores cepas solubilizadoras de fósforo.

Posteriormente, se midió la actividad enzimática de las fosfatasa mediante la técnica del *p*-nitrofenilfosfato (Otálora & Patiño, 2003), el cual se preparó a una concentración de 1 µmol·ml⁻¹. Con esta solución se realizó la curva patrón.

5.2. Capacidad para fijar nitrógeno

5.2.1. Crecimiento en medios sólidos libres de nitrógeno

Los actinomicetos aislados se sembraron por medio de la técnica de agotamiento en agar Ashby Nf y agar Nfb (Anexo 1) (Atlas, 1995; Gage, 2004; Valdés *et al.*, 2005) y se incubaron a 22°C observando su crecimiento durante 15 días de incubación. Pasado el tiempo de incubación se evaluó el desarrollo y crecimiento en la superficie del medio. Se realizaron pases sucesivos de los actinomicetos que presentaron crecimiento en los mismos medios de cultivo con el fin de asegurar que no existieran trazas de nitrógeno en el medio utilizado para el aislamiento. Se consideraron como microorganismos con capacidad de crecimiento en ausencia de nitrógeno a aquellos que crecieron sobre este medio de cultivo.

5.2.2. Crecimiento en medio líquido libre de nitrógeno

A los actinomicetos que evidenciaron crecimiento en los medios sólidos libres de nitrógeno se les realizó una curva de crecimiento en medio mineral líquido, el cual se preparó a partir de las soluciones stock: (1) K₂HPO₄ y KH₂PO₄ al 3%, (2) MgSO₄·7H₂O al 1.5% y (3) CaCl₂, FeCl₃ y NaCl a una concentración de 0.5%, 0.6% y 0.5% (p/v) respectivamente; no se empleó ninguna fuente de nitrógeno, y la fuente de carbono fue manitol al 2%. Se prepararon 15 erlenmeyer por cepa, manteniendo 1/3 de volumen de medio y se llevaron a agitar en un agitador orbital a 120 rpm (Barnstead/Lab – line, MAXQ 3000). Paralelamente se prepararon otros 15 erlenmeyer por cepa llenos a

capacidad y se dejaron en incubación a 22°C en estático, con el fin de generar una microaerofilia, ambiente propicio para el desarrollo de la actividad nitrogenasa.

5.2.3. Prueba de reducción del acetileno (acrónimo del inglés ARA)

Se realizó un recuento de propágulos de los actinomicetos en cámara de Neubauer hasta obtener una población inicial aproximada de 10^6 células·ml⁻¹. A continuación se sembraron por triplicado con esta concentración en medio sólido Nfb (Anexo 1). El pH del medio de cultivo fue 6.8 que se ajustó con ácido málico y KOH. Se incubaron los viales, con capacidad de 25 ml, durante 10 días a una temperatura de 22°C.

Cromatografía de gases. A cada vial inoculado se le extrajeron 25 µl de aire utilizando una Aguja Hewlett Packard, que fueron remplazados por 25 µl de acetileno. La toma de muestras se realizó a las 0, 2 y 5 horas después de inyectado el gas. Una vez cumplido cada uno de estos tiempos, el volumen de la muestra tomada fue de 25 µl, los cuales fueron inyectados en el cromatógrafo de gases Hewlett Packard Agilent 4890 D con detector de ionización en llama FID y detector de conductividad térmica TCD, gas de arrastre helio y software de adquisición de datos Clarity Lite. De igual forma se realizaron controles negativos a partir de viales con medio sin inocular a los mismos tiempos de incubación como viales sin medio de cultivo. La determinación de etileno se calculó interpolando el área del pico obtenido en una curva patrón que se preparó con etileno puro (Anexo 8). Conociendo el volumen del frasco y la concentración de células, se estableció la actividad reductora de acetileno en µmoles de etileno producidos por hora.

*5.2.4. Detección de genes *nifH**

Para la amplificación del gen *nifH* se siguió la metodología propuesta por Diallo *et al.* (2004), que consiste en realizar una PCR anidada con una secuencia de “primers” menos degenerada que la metodología propuesta por Burgman *et al.* (2004), permitiendo reducir el número de bandas producidas por el aislamiento. Durante esta primera reacción el objetivo fue amplificar un fragmento de 429 pb.

Para la *nifH* 1 ó PCR inicial se partió de 5 µl de ADN genómico, “primer forward” FGPH19 (5'- TAC – GGC – AAR – GGT – GGN – ATH – G - 3') y “primer reverse” PoIR (5'- ATS – GCC – ATC – ATY – NTCR – CCG - GA - 3') (INVITROGEN) a una concentración final de 0.5 µM, dNTP's 0.2 mM (INVITROGEN), MgCl₂ 2 mM

(INVITROGEN), Taq platinum 0.025 U (INVITROGEN), BSA 0.5% en un volumen final de 50 μ l.

La segunda reacción amplificó un fragmento de 320 pb. Para la *nifH* 2 se partió de 3 μ l del producto de la PCR *nifH* 1; primers PolF-GC (5' - TGC - GAY - CCS - AAR - GCB - GAC - TC - 3') y AQER (5' - G - ACG - ATG - TAG - ATY - TCC - TG - 3') (INVITROGEN) a una concentración final de 0.5 μ M, dNTP's 0.2 mM (INVITROGEN), MgCl₂ 2 mM (INVITROGEN), Taq platinum 0.025 U (INVITROGEN), BSA (INVITROGEN) al 0.03% en un volumen final de 50 μ l. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Denaturación inicial a 94°C x 5 min

Para la *nifH* 1:

30 ciclos a 94°C x 1min

58.3°C x 1 min

72°C x 2 min

extensión final a 72°C x 5 minutos.

Para la *nifH* 2:

25 ciclos a 94°C x 1 min

49.6°C x 1 min

72°C x 2 min.

Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 1.5%. El producto de amplificación específico para este gen fue evaluado en las 10 cepas que presentaron actividad nitrogenasa.

En ambas reacciones se empleó como control positivo *Pseudomonas aeruginosa* y como control negativo agua MiliQ.

5.3. Producción de Acido Indol Acético (AIA)

Para determinar el AIA, se adoptó la metodología descrita por Celis y Gallardo (2007). La prueba se hizo montando tres réplicas de las cepas que crecieron en medio Nfb. De cada cepa se inoculó 7.5 ml a una concentración de 10⁶ UFC·ml⁻¹ en 75 ml de

caldo B suplementado con triptona (Anexo 1). Se llevó a incubación a 22°C y a 125 rpm en un agitador orbital (Barnstead/Lab – line, MAXQ 3000) durante 15 días. La toma de muestras se realizó teniendo en cuenta los resultados que se obtuvieron de la estandarización de la técnica para estos microorganismos, donde se determinó que en los días 9, 10, 11 y 12, se tomarían 1.2 ml del cultivo y se centrifugarían a 3000 rpm (microcentrífuga Jouan A14) durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se transfirió 1 ml del sobrenadante a un tubo y se le adicionaron 2 ml del reactivo de Salkowsky (Anexo 2), se realizó una agitación en vórtex e incubación a temperatura ambiente (15°C–18°C) durante 30 min. Luego de la reacción se hizo la lectura de absorbancia de cada muestra a 530 nm en un espectrofotómetro (Genesys 20–ThermoSpectronic). El blanco de lectura se preparó con medio de cultivo estéril y el control positivo de reacción con solución patrón de AIA. Cada día de muestreo se realizó coloración de Gram para descartar cualquier tipo de contaminación. La cepa control para este ensayo fue *Azotobacter vinelandii* ATCC 12518. Para la determinación de la concentración de AIA en caldo de cultivo, se hizo una curva de calibración con patrón de ácido indol acético (Sigma).

5.4. Producción de Sideróforos

La prueba se efectuó utilizando tres réplicas de las cepas que crecieron en medio Nfb. De cada cepa se inoculó 7.5 ml a una concentración de 10^6 UFC·ml⁻¹ en 75 ml de medio descrito por Simon & Tessman (1963) modificado (Anexo 1). Se llevó a incubación a 22°C y a 250 rpm en un agitador orbital durante 15 días (Barnstead/Lab - line, MAXQ 3000). La toma de muestra se realizó en los días 9, 10, 11 y 12, teniendo en cuenta los resultados que se obtuvieron de la estandarización. En la toma de muestra se tomaron 1.2 ml del cultivo y se centrifugaron a 4000 rpm durante 6 min a temperatura ambiente. Posteriormente se transfirió 1 ml del sobrenadante a un tubo de ensayo y se le adicionó 1 ml de una solución de 5 mM de perclorato férrico en 0.14 M de ácido perclórico. Luego de la reacción se hizo la lectura de absorbancia de cada muestra a 480 nm (Atkin, 1970). El blanco de lectura se preparó con medio de cultivo estéril y el control positivo de reacción se realizó con solución patrón de sideróforos. Cada día de muestreo se realizó coloración de Gram para descartar cualquier tipo de contaminación. El control utilizado fue *Escherichia coli*, una cepa aislada de un paciente con infección urinaria (donada por el Dr. José F. Mikán, profesor de la Facultad de Medicina de la Universidad Militar Nueva Granada (Bogotá – Colombia)). Para la determinación de una

concentración aproximada de sideróforos producida por cada cepa, fue necesario realizar una curva de calibración partiendo de concentraciones conocidas de Desferal® (deferroxamina – Novartis) (Anexo 10).

Con los datos de absorbancia en función de la concentración se hizo una regresión lineal para determinar la ecuación de la recta. Se consideró una dispersión adecuada de los valores sobre la recta, por lo tanto se empleó dicha ecuación como el patrón de referencia para el cálculo de las concentraciones de sideróforos producidas por las cepas.

5.5. Producción de quitinasas

5.5.1. Preparación de la quitina coloidal

Se tomaron 10 g de quitina y se disolvieron en 100 ml de H₃PO₄ concentrado (85%), se dejaron en agitación a 4°C durante 48 h. Posteriormente el líquido resultante se filtró empleando fibra de vidrio y se adicionó etanol acuoso al 50%, la mezcla se puso en agitación hasta que se observó homogénea. Se realizaron lavados con agua destilada hasta alcanzar un pH cercano a la neutralidad. Se dializó contra agua destilada por 48 h y se diluyó la suspensión hasta 10 mg·ml⁻¹. Para prevenir la contaminación se adicionó cristal de thymol y se almacenó a 4°C (Skujins *et al.*, 1965, modificado por Rodríguez, 2000).

5.5.2. Evaluación cualitativa de la actividad quitinasa

Los actinomicetos se sembraron en medio mínimo que se preparó a partir de soluciones “stock” de: (1) K₂HPO₄ y KH₂PO₄ 30 g·l⁻¹, (2) MgSO₄·7H₂O 15 g·l⁻¹, (3) CaCl₂, FeCl₃ y NaCl a una concentración de 5 g·l⁻¹, 0.6 g·l⁻¹ y 5 g·l⁻¹ (p/v) respectivamente, suplementado con quitina coloidal al 1%. Como control se utilizó el medio mínimo suplementado con glucosa a una concentración de 10 g·l⁻¹, se incubaron a 22°C de 5 a 8 días. Pasado el tiempo de incubación se evaluaron los halos de hidrólisis producidos en el medio sólido, permitiendo una selección primaria de las cepas de actinomicetos, mediante la cuantificación del tamaño del halo.

5.5.3. Evaluación de la producción de quitinasas

Los actinomicetos se sembraron en medio mínimo que se preparó a partir de soluciones “stock” de: (1) K₂HPO₄ y KH₂PO₄ 30 g·l⁻¹, (2) MgSO₄·7H₂O 15 g·l⁻¹, (3)

CaCl₂, FeCl₃ y NaCl a una concentración de 5 g·l⁻¹, 0.6 g·l⁻¹ y 5 g·l⁻¹ respectivamente, suplementado con quitina coloidal al 1%. Como control se utilizó el medio mínimo suplementado con glucosa a una concentración de 10 g·l⁻¹, se incubaron a 22°C durante 8 días. Posteriormente se realizó la cuantificación de la actividad específica de la enzima y adicionalmente se realizaron pruebas de antagonismos contra hongos no formadores de micorriza cuya composición de pared principalmente era quitina para unos y celulosa para otros.

5.5.4. Concentración de quitinasas

Las cepas de actinomicetos que presentaron una producción significativa de quitinasas en medio mínimo suplementado con quitina coloidal 1% (p/v), fueron utilizadas para valorar la concentración de la enzima, siguiendo el protocolo de Hoster *et al.* (2005). Se tomó una asada de las colonias de actinomicetos crecidas en agar avena y se inoculó en medio mínimo líquido pH 6.8, suplementado con quitina coloidal 0.5% (p/v), y se dejó en agitación continua 180 rpm (Barnstead/Lab-line, MAXQ 3000) a temperatura ambiente durante 4 días. Las células fueron eliminadas por centrifugación a 16 300 g durante 15 min (SORVALL-RC-5B), posteriormente la enzima fue concentrada adicionando 561 g de sulfato de amonio sólido por cada 1 000 ml de sobrenadante, las proteínas precipitadas fueron recuperadas por centrifugación a 16 300 g por 30 min (SORVALL-RC-5B), posteriormente el “pellet” se resuspendió en una mínima cantidad de tampón fosfato de potasio 0.02 mM y se dializó a 4°C empleando la misma solución tampón, el dializado se centrifugó a 13 000 g por 30 min (SORVALL-RC-5B) para remover las partículas insolubles, el sobrenadante obtenido se empleó para el ensayo de actividad enzimática.

5.5.5. Evaluación de la actividad enzimática de las quitinasas

El ensayo de actividad quitinolítica se llevó a cabo siguiendo el método propuesto por Hoster *et al.* (2005). Para ello, se tomaron 0.5 ml de la solución enzimática y se adicionaron a 1 ml de tampón fosfato de potasio 20 mM pH 6, suplementado con quitina coloidal 0.3 % (p/v), posteriormente la mezcla fue incubada a 45°C por una hora. Se realizó una centrifugación a 16 300 g durante 15 min (SORVALL-RC-5B). Se determinó la concentración de azúcares reductores en el sobrenadante por la reacción de Somogyi-Nelson, utilizando una curva patrón de N-acetilglucosamina (GlcNAc), siguiendo el

protocolo de Rodríguez (2001). Igualmente se determinó la concentración de proteína en el sobrenadante por el método de Bradford (1976), las absorbancias leídas fueron convertidas a concentraciones de microgramos de proteína por microlitro en una curva de calibración de concentraciones conocidas de Albúmina Sérica Bovina. Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que generó la liberación de 1 μmol de GlcNAc en un minuto (Gomes *et al.*, 2000).

6. Inoculación de los microorganismos

6.1. Características del suelo empleado en los ensayos en maceta

Se utilizó un suelo proveniente de la Sabana de Bogotá denominado planti-tierra negra, proporcionado siempre por el mismo vivero. El suelo se utilizó en la mayoría de los ensayos en condiciones naturales, tamizado a través de una malla de 2 mm. Para la elaboración de los semilleros se mezcló con arena gruesa para mejorar la aireación, evitar la compactación y no demorar la germinación de las semillas.

En los ensayos en los que se necesitó eliminar los propágulos de los hongos formadores de MA el suelo fue tinalizado mediante la inyección de vapor fluyente durante hora y media por tres días continuos.

6.2. Inóculo micorrízico

6.2.1. Características del inóculo MA empleado en el ensayo

El inóculo utilizado proviene de la Sabana de Bogotá y fue obtenido a partir de muestras de la rizosfera de plantas de trébol. El hongo de referencia procede de la colección de hongos formadores de micorriza arbuscular de CORPOICA – Tibaitatá (Bogotá – Colombia). Las esporas se obtuvieron mediante la técnica de tamizado húmedo y decantación (Genderman & Nicholson, 1963). Posteriormente fueron identificados morfológicamente y a partir de estos se produjeron los inóculos puros utilizados.

6.2.2. Producción de inóculo micorrízico

Como planta hospedadora se utilizó igualmente *Trifolium repens* L. Las semillas se esterilizaron, pre-germinaron y plantaron. Como sustrato de crecimiento se empleó una

mezcla de suelo: vermiculita (1:1) estéril. Las plantas se inocularon con las esporas de cada uno de los morfotipos aislados y se dejaron crecer durante 6 meses bajo condiciones de invernadero. Se evaluó el nivel de colonización MA y el número de esporas producidas por gramo de suelo. A partir de estos cultivos se obtuvieron los inóculos micorrícicos correspondientes y se escogió el hongo para los siguientes ensayos.

7. Preparación del material vegetal y desarrollo de los ensayos de inoculación

7.1. Planta hospedadora

Como se ha indicado la planta seleccionada para la realización de los ensayos fue trébol blanco (*Trifolium repens* L.). Como se sabe, es una planta leguminosa conocida por establecer relaciones simbióticas con *Rhizobium* y hongos MA. Es una planta forrajera cosmopolita, es decir que crece en todos los climas, praderas, bordes de caminos, entre otros. La capacidad de crecer en diversos lugares le genera ventajas adicionales para las evaluaciones realizadas en diversos ensayos. Por lo anterior se ha elegido en varias ocasiones esta planta como modelo de estudios de invernadero al facilitar las condiciones como: no requerir grandes concentraciones de agua, con una baja necesidad de fertilización debido a su capacidad como fijadora de nitrógeno en condiciones simbióticas; es una planta que tolera bien los cambios de temperatura extremos y diferentes tipos de estreses.

7.2. Esterilización de las semillas

La esterilización de las semillas se realizó durante 15 minutos en hipoclorito comercial al 10%, tras lo cual se lavaron tres veces con abundante agua destilada estéril y se dejaron en imbibición durante 60 min a 50 rpm en un agitador orbital (Barnstead/Lab-line MAXQ 3000) (Kortemaa *et al.*, 1994).

7.3. Germinación de las semillas

7.3.1. Ensayo de germinación in vitro

Para conocer el porcentaje de germinación de las semillas de trébol blanco (*Trifolium repens* L.) se tomaron 10 semillas, se desinfectaron y se colocaron en caja de petri con

filtro de papel estéril al cual se le adicionó agua destilada estéril y se observó el desarrollo de las semillas durante 6 días (Figura 7). Los montajes de germinación de las semillas se realizaron por triplicado.

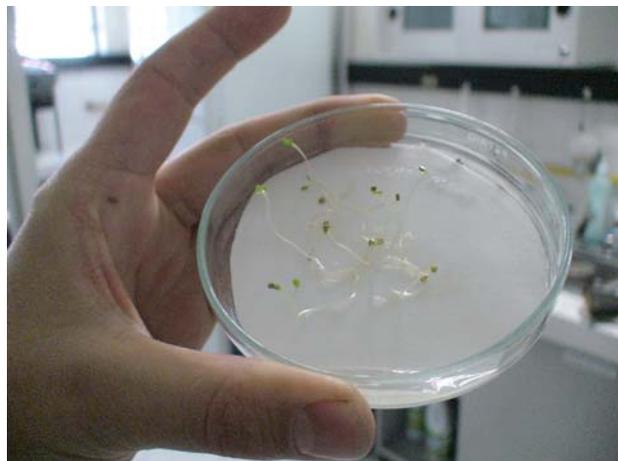


Figura 7. Montaje de germinación de las semillas de trébol blanco desinfectadas

7.3.2. Ensayo de germinación en maceta

Se preparó un semillero con semillas certificadas de *Trifolium repens* L., utilizando suelo tamizado pasteurizado y humedecido a capacidad de campo. Se prepararon dos tipos de semilleros, uno adicionado con las respectivas suspensiones de los actinomicetos seleccionados en concentración 10^6 células·ml⁻¹ (Merzaeva & Shirokikh, 2006), y el otro sin tratamiento con actinomicetos. Las semillas de trébol blanco (*Trifolium repens* L.) previamente desinfectadas e hidratadas (Kortemaa *et al.*, 1994) se sembraron en los semilleros para los diferentes tratamientos, incluido el control con solución salina estéril (Abdel & Mohamedin, 2000).

7.3.3. Ensayos de inoculación microbiana en maceta

Una vez germinadas estas semillas, las plántulas que presentaron una talla de 2 cm se transplantaron a macetas con suelo inoculado con actinomicetos (10^6 células·ml⁻¹), con inóculo de micorrizas (5 g/maceta) o con el de actinomicetos (10^6 células·ml⁻¹) y micorrizas (5 g/maceta). El diseño experimental se basó en una metodología de bloques completos, con 8 repeticiones según los tratamientos a evaluar: tratamiento con micorriza

(Hongo MA aislado de plantas de trébol), y en conjunto con los actinomicetos, un testigo comercial consistente de *Glomus mosseae* donado por CORPOICA – Tibaitatá y un testigo absoluto.

Finalizado el periodo de evaluación del crecimiento (6 meses) se retiraron las plántulas de las macetas y se lavaron los sistemas radicales con agua para retirar todas las partículas de suelo adheridas a las raíces. En todos los casos se separaron el sistema radical y aéreo de cada una de las plántulas y se colocaron en bolsas de papel de forma individual para secado en horno de convección (THERM 25EG) durante 24 horas a 60°C. El material vegetal seco se pesó en balanza analítica precisa XT220A. Se analizó la producción y distribución de la biomasa, el crecimiento y desarrollo radical, área foliar, absorción de nutrientes (N, P, K, Ca, Mg, Mn). El análisis del contenido foliar y disponibilidad en el suelo se realizó mediante técnicas de análisis químico como el método de Kjendahl, técnicas húmeda y absorción atómica. Adicionalmente se determinó del porcentaje de colonización de los hongos MA en las raíces de las plantas según la metodología de Giovannetti & Mosse (1980).

Los datos obtenidos a partir del análisis del efecto de los tratamientos de inoculación sobre el crecimiento de *Trifolium repens* L. se analizaron para encontrar si la distribución era de carácter normal y se realizó una hipótesis de contraste de tratamientos por medio de análisis de varianzas. La hipótesis que se formuló para el análisis fue:

H_0 : Todos los tratamientos son iguales

H_a : Al menos uno de los tratamientos es distinto de otro

La comparación de los tratamientos se realizó por medio de la prueba de comparación de medias de Tukey con un alfa de 0.05. Todos los análisis estadísticos se realizaron con la ayuda del programa estadístico SAS.

8. Establecimiento de actinomicetos en la rizosfera y sus interacciones con hongos MA

8.1. Pruebas de establecimiento a nivel rizosférico de los actinomicetos seleccionados

La prueba de establecimiento de los actinomicetos seleccionados se realizó observando el comportamiento de la concentración de las bacterias inoculadas, tanto en

suelo, como en rizosfera y rizoplana, durante 30 días, realizando muestreos cada 5 días. Se realizaron tres repeticiones de cada tratamiento con cada una de las cepas seleccionadas.

Para el montaje de la prueba se utilizaron tubos de ensayo de 20 mm de diámetro y 200 mm de altura, se llenaron hasta la mitad con aproximadamente 40 g de suelo tamizado estéril y se llevaron a capacidad de campo con las respectivas suspensiones de los actinomicetos seleccionados en concentración de 10^6 esporas y/o fragmentos de micelio·ml⁻¹ (Merzaeva & Shirokikh, 2006). El suelo se tamizó en un tamiz de 850 μ m y se esterilizó en bolsa de polipropileno calibre 2 con 3 ciclos de 20 libras por 20 minutos en autoclave y se verificó la esterilidad en medio de cultivo de avena.



Figura 8. Montaje de los tubos inoculados con suspensiones de actinomicetos para la prueba de establecimiento a nivel rizosférico de la cepa MCR24.

Las suspensiones de actinomicetos se realizaron tomando una muestra de micelio aéreo esporulado resuspendiéndola en solución salina estéril 0.85% y la concentración de los propágulos se estableció por medio de recuento en cámara de Neubauer (Bergey *et al.*, 2000).

Posteriormente se sembraron 3 semillas de trébol blanco previamente desinfectadas e hidratadas (Kortemaa *et al.*, 1994) en cada uno de los tubos de ensayo y se mantuvieron en condiciones controladas con ciclo luz día y oscuridad 12h/12h a temperatura ambiente con riego por aspersión cada 3 días (Merzaeva & Shirokikh, 2006). En cada uno de los

tiempos de muestreo se tomaron 4 tubos de ensayo por cada tratamiento incluyendo el control y se retiraron asépticamente las plantas de los tubos de ensayo de cada uno de los tratamientos para los análisis de concentración de los actinomicetos en el suelo, la rizosfera y el rizoplano (Figura 8).

8.1.1. Análisis de población en la rizosfera

En cada muestreo se separaron los sistemas radicales de las plantas de cada tratamiento y se colocaron en frascos con 90 ml de solución salina estéril 0.85% para luego ser llevados a un agitador durante 5 min (Merzaeva & Shirokikh, 2006). Posteriormente se realizaron diluciones seriadas decimales y siembras por triplicado en agar avena suplementado con nistatina al 0.1%. Las siembras fueron incubadas a temperatura ambiente durante 6 días.

8.1.2. Análisis de la población en rizoplana

Posterior a la agitación, los sistemas radicales se maceraron en un mortero estéril con 10 ml de solución salina estéril 0.85% (Merzaeva & Shirokikh, 2006). A partir del macerado se realizaron diluciones seriadas decimales y siembras por triplicado en agar avena suplementado con nistatina al 0.1% (Figura 9). Los medios de cultivo fueron incubados a temperatura ambiente durante 6 días.



Figura 9. Macerado de los sistemas radicales en solución salina estéril después del análisis de población en la rizósfera.

8.1.3. Análisis de la población en el suelo

Una vez retiradas de los tubos de ensayo las plantas utilizadas para los análisis de rizosfera y rizoplana, el suelo contenido en los 4 tubos de cada tratamiento se

homogenizó en condiciones de esterilidad y se tomaron 10 g de suelo para realizar diluciones seriadas decimales y siembras por triplicado en agar avena suplementado con nistatina al 0.1%. Los medios de cultivo fueron incubados a 22°C durante 6 días.

8.2. Observación microscópica de las raíces

8.2.1. Microscopía de campo claro y oscuro

Se realizaron evaluaciones en un microscopio Leitz ORTOPLAN®, utilizando un campo oscuro y contraste de fase a las muestras de raíces frescas con los diferentes tratamientos, se usaron longitudes focales entre 60 y 75 mm, apertura F/13 y F10, tiempo de exposición entre 4 a 60 seg, velocidad ISO-400, modo de medición de foco y el origen de luz fue de lámpara de tungsteno. Se obtuvieron fotografías utilizando una cámara SONY® DSC-R1 adaptada al microscopio.

8.2.2. Microscopía confocal

Las muestras de raíces con los diferentes tratamientos se evaluaron en fresco y la observación se realizó bajo autofluorescencia del material biológico utilizando un microscopio confocal META 510 Kart Zeitz®, el modo de scan que se utilizó fue plano, los filtros usados fueron Ch2: LP475, el objetivo fue LD Plan-Neofluar 40x/0.6 M27, con unos Beam Splitters: MBS: HFT 405/4088/561, DBS1 de espejo y DBS2 de NFT490, las longitudes de onda fueron: 405 nm (46.1%) y 408 nm (4.1%). Para la lectura de las imágenes se utilizó un software examinador de imágenes LSM Image Examine y Axion Vision LE.

8.3. Obtención de esporas y esporocarpos de hongos MA mediante la técnica de tamizado húmedo y decantación

El aislamiento de las esporas de los hongos MA se llevó a cabo siguiendo la metodología de tamizado y decantación (Genderman & Nicolson, 1963), modificada por Sieverding, (1983), con un reaislamiento de las esporas de los hongos MA para su observación microscópica, recuento y posterior identificación por caracterización morfológica de las esporas.

8.4. Efectos de los actinomicetos sobre la germinación de las esporas y el crecimiento micelial de los hongos MA

El ensayo se realizó con los aislados seleccionados (MCR9, MCR24 y MCR26). Se siguió la metodología de Azcón-Aguilar *et al.* (1986b). Las esporas de *Glomus* sp fueron aisladas a partir de los esporocarpos que fueron obtenidos de las muestras rizosféricas de *T. repens* L. donde se realizó la producción de inóculo de los hongos formadores de micorriza, tanto para el aislamiento del hongo MA aislado en campo para este estudio como el precedente de colección.

Las muestras de suelo rizosférico se guardaron en bolsas de polietileno a 4°C y los esporocarpos fueron almacenados en papel de filtro humedecido a 4°C. Las esporas fueron esterilizadas superficialmente con una solución que contenía 20 g·l⁻¹ de cloramina T, 200 mg·l⁻¹ de estreptomina y 1 gota·l⁻¹ de Tween 80 (Mosse, 1962) durante 20 min y posteriormente se lavaron 5 veces con agua destilada estéril.

Los tres aislados de actinomicetos se colocaron a crecer en medio Czapeck-Dox (Anexo 1) y se dejaron en crecimiento durante 8 días a temperatura ambiente y 150 rpm (agitador orbital Barnstead/Lab-line, MAXQ 3000). Los cultivos fueron centrifugados y las células se lavaron 3 veces con solución salina (0.1%). Las suspensiones de cada actinomiceto se ajustaron a una concentración de 10⁶ células·ml⁻¹. Se tomaron 50 µl de cada suspensión y por separado, cada una fue sembrada homogéneamente en cajas de petri con agar agua (Anexo 1) (Calvet *et al.*, 1992).

Seis esporas estériles de *Glomus* sp. fueron transferidas de forma individual a cada caja de petri inoculada con el actinomiceto correspondiente (MCR9, MCR24 ó MCR26). Estas esporas fueron colocadas sobre los vértices de un hexágono imaginario a una distancia de 3.5 cm aproximadamente. Se incubaron los cultivos duales a 25°C en oscuridad. Cada ensayo consistió de 3 réplicas por cada tratamiento y 5 controles con *Glomus* sp creciendo axénicamente. La germinación de las esporas se evaluó después de 32 días luego de la inoculación. Si se observaba un tubo germinal claramente se determinó que había germinación de la espora. El crecimiento hifal de las esporas de los hongos MA se midió por el método de intersección en microscopía óptica (Azcón-Aguilar *et al.*, 1986b).

Para examinar el efecto de los actinomicetos sobre la germinación de las esporas de hongos MA en suelo, se siguió la metodología utilizada por Barea *et al.* (1998). Cada unidad experimental consistió de una lámina que tenía dos membranas (diámetro 45 mm;

tamaño poro 0.45 μm) y se adicionaron entre las dos membranas 20 esporas estériles de *Glomus* sp. Paralelamente se preparó una caja de petri con 25 g de suelo, la lámina que contenía las dos membranas y el inóculo del hongo MA, fue colocada encima del suelo. A continuación, a las membranas, se le adicionó 1 ml de la suspensión de actinomiceto (10^7 células·ml⁻¹) que correspondía a cada ensayo (MCR9, MCR24 ó MCR26). Se adicionaron otros 25 g de suelo para cubrir la placa de la lámina y las membranas. El suelo fue humedecido con agua destilada estéril hasta capacidad de campo y las cajas fueron selladas con parafilm. Las cajas (15 réplicas por cada tratamiento) fueron incubadas a 25°C durante dos semanas.

Tras la incubación, se tomaron las láminas con las membranas que contenían el inóculo de los microorganismos, se abrieron los papeles de filtro y los tubos germinales fueron coloreados con azul de tripán (Phillips & Hayman, 1970). Se calculó el porcentaje de esporas germinadas para cada tratamiento. Todos los experimentos se repitieron dos veces y los datos para el nivel de germinación de cada tratamiento fueron sujetos a una prueba de hipótesis contra los datos control. El estadístico z fue tabulado con un nivel de significancia de 5%. Los datos del crecimiento micelial fueron procesados para un análisis de varianza y una prueba de Duncan ($P \leq 0.05$).

9. Diseño estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron mediante multifactor ANOVA y pruebas de rangos múltiples (método Duncan y LSD); por medio del sistema estadístico SAS. Así mismo para algunos casos se determinó si existía relación entre las variables por medio del coeficiente de correlación lineal de Pearson.

II. RESULTADOS

***“Nunca desistas de un sueño.
Sólo trata de ver las señales
que te lleven a él”***

Paulo Coelho

Capítulo 1: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LOS MICROORGANISMOS

En el presente capítulo se describen los experimentos diseñados para el aislamiento, caracterización e identificación de los microorganismos utilizados en este trabajo de investigación. Los resultados se agrupan en sub-capítulos sistematizados de la siguiente forma:

- 1.1. Localización geográfica del muestreo
- 1.2. Aislamiento e identificación de los actinomicetos
- 1.3. Aislamiento y caracterización de los hongos MA

En cada sub-capítulo se expondrán su correspondiente Introducción y Parte experimental específica de cada sub-capítulo, no expuesta con anterioridad en los Capítulos Generales de Introducción, Materiales y Métodos, y Discusión.

1.1 Localización geográfica del muestreo

1.1.1. Introducción

En un país como Colombia (Suramérica), con una ubicación geográfica singular la posibilidad de poseer una alta diversidad microbiológica es bastante alta. Dado que en este país se tiene registrada poca información a nivel microbiológico, se hace importante realizar una georeferenciación detallada de los aislamientos debido a que muchos de estos microorganismos pueden ser utilizados por la industria farmacéutica o agrícola en un futuro, y se hace necesario conocer con exactitud la localización de estos aislamientos.

En Colombia, donde la legislación en relación al acceso de recursos genéticos es muy estricta, se necesita tener un Sistema de Información Geográfica (GIS) bien implementado para que el Ministerio del Interior pueda mantener control sobre todos los recursos biológicos que el país posee, al conocer la información exacta del origen del material biológico.

El Instituto Alexander von Humboldt (2004), entidad encargada de coleccionar la información dada por las diferentes colecciones de organismos en Colombia, define un

sistema de información geográfica (SIG) como un conjunto de métodos, herramientas y datos que están diseñados para actuar de forma coordinada y para capturar, almacenar, analizar, transformar y presentar toda la información geográfica y de sus atributos con el fin de satisfacer múltiples propósitos.

Cuando se elaboran los sistemas de información geográfica (SIG) se puede obtener una variedad de funciones que permiten el análisis de datos de distribución biológica, el cual puede ser empleado para situar en un mapa las ubicaciones en donde se tomaron los datos/muestras con el fin de desarrollar planes y estrategias para actividades futuras. Esta operación permite generar un análisis profundo del objetivo que se quiere cumplir en el desarrollo de un método científico. También permite identificar áreas de elevada diversidad biológica, predecir la posibilidad de encontrar especies en áreas que aún no han sido exploradas, y estudiar la distribución de ciertos rasgos de interés a nivel biológico o geológico (Salem, 2003), específicamente en este caso, los datos de distribución microbiológica de actinomicetos en la región Andina Oriental Colombiana en el área de Cundinamarca y Boyacá.

1.1.2. Parte Experimental

1.1.2.1. Metodología

Incorporación de datos y construcción de matriz de información. Se procedió a organizar una matriz de datos, en la cual se utilizó una hoja de cálculo Excel® Microsoft® donde se incorporaron todos los datos pertenecientes a cada uno de los aislamientos de actinomicetos.

Manejo y estandarización de las coordenadas. Debido a que las colecciones científicas en años anteriores no disponían de acceso a herramientas como los GPS, gran cantidad de registros no poseen las coordenadas geográficas del lugar de su colección. Por tal razón, se incorporaron los siguientes criterios de clasificación y estandarización de los datos:

- *Coordenadas de campo:* Definidas por las coordenadas obtenidas directamente de las diferentes libretas de campo y para las cuales se tienen datos de localidades exactas.

- *Coordenadas de búsqueda:* Definidas por las coordenadas tomadas directamente de bibliografía especializada, en este caso, el Diccionario Geográfico del Instituto Agustín Codazzi (IGAC).

Criterios de transformación. Para la transformación de las coordenadas se utilizó un archivo en Excel® que incluye una serie de macros para la conversión de las coordenadas, archivo proporcionado por el Laboratorio de Herpetología de la Pontificia Universidad Javeriana (Colombia). Una vez realizada la transformación, las coordenadas se analizaron en el programa *ArcView GIS* versión 3.1® para Windows®. Esta conversión fue implementada en la matriz de datos de la siguiente manera: X (oeste), Y (norte) (Figura 10).

The screenshot shows a Microsoft Excel spreadsheet with the following data:

	K	L	M	N	O
1	Coordenadas búsqueda	X (Oeste)	Y (Norte)		
2	4° 09' N , 73° 38' W	-73,63	4,15		
3	4° 09' N , 73° 38' W	-73,63	4,15		
4	4° 09' N , 73° 38' W	-73,63	4,15		
5	4° 09' N , 73° 38' W	-73,63	4,15		
6	4° 09' N , 73° 38' W	-73,63	4,15		
7	4° 09' N , 73° 38' W	-73,63	4,15		
8	4° 09' N , 73° 38' W	-73,63	4,15		
9	4° 09' N , 73° 38' W	-73,63	4,15		
10	4° 09' N , 73° 38' W	-73,63	4,15		
11	4° 09' N , 73° 38' W	-73,63	4,15		
12	4° 09' N , 73° 38' W	-73,63	4,15		
13	4° 09' N , 73° 38' W	-73,63	4,15		
14	4° 09' N , 73° 38' W	-73,63	4,15		
15	4° 09' N , 73° 38' W	-73,63	4,15		
16	4° 09' N , 73° 38' W	-73,63	4,15		
17	4° 09' N , 73° 38' W	-73,63	4,15		

Figura 10. Conversión de coordenadas en X y Y en base a las coordenadas de búsqueda.

Posteriormente, se realizó la transformación de la matriz digitalizando los datos en el programa *ArcView* GIS versión 3.1® para Windows® mediante una conversión de la extensión de Excel (.xls) a una extensión del archivo (.dbf); esta última es reconocida por *ArcView* para la incorporación de datos y posterior graficación de los puntos en los diferentes mapas.

1.1.2.2. Resultados

A partir de las muestras de suelo tomadas de los diferentes puntos de muestreo demarcados por el sistema de información geográfica se realizó el mapa en el que se observan claramente los puntos donde fueron aisladas cada una de las cepas en la zona de Cundinamarca y Boyacá (Colombia) (Figura 11).

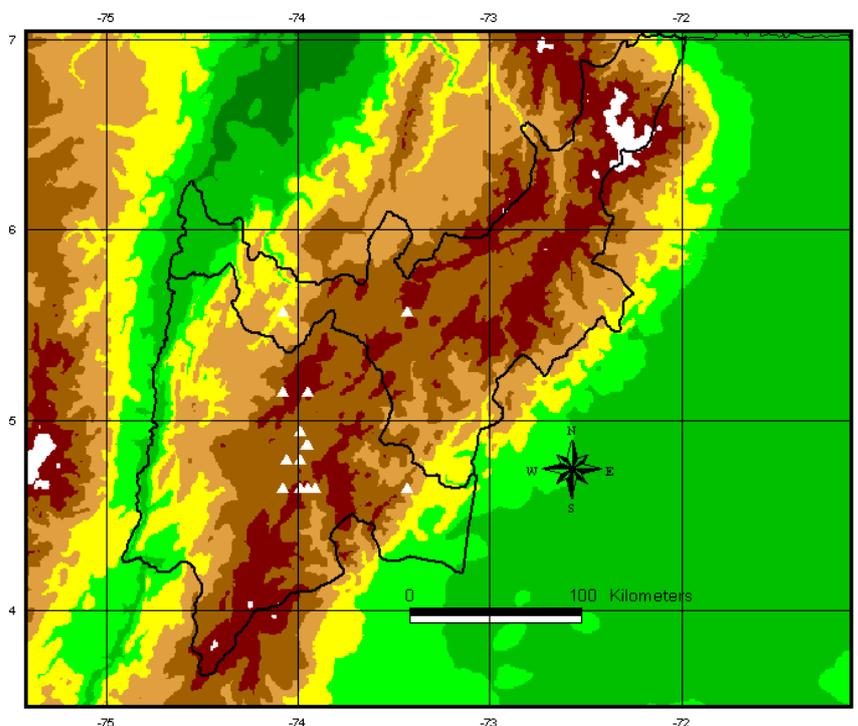


Figura 11. Localización de cada uno de los puntos de muestreo. Los triángulos presentan el lugar exacto de la toma de muestra

El muestreo se localizó a lo largo de la cordillera de los Andes Orientales que pasa sobre las provincias de Cundinamarca y Boyacá, determinando un rango de altitud entre los 2 000 y 2 600 msnm. Los muestreos de suelo se realizaron a una profundidad máxima de 20 cm en lugares donde no había laboreo del suelo, presentaba un parche coetáneo de vegetación de trébol sin otra vegetación cercana a mas de 2 m, solo pastura.

1.2. Aislamiento e identificación de los actinomicetos

1.2.1. Introducción

Como se indicó anteriormente, los actinomicetos son de crecimiento lento y requieren de una o dos semanas de incubación para permitir la diferenciación de sus colonias que difieren de las de otras bacterias. Una colonia típica de actinomiceto constituye una masa de filamentos ramificados que se originan de un propágulo o de un micelio. Las colonias de algunos géneros que se desarrollan sobre la superficie del agar pueden tener una consistencia firme y se adhieren fuertemente al sustrato solidificado; en alguno de estos géneros la superficie es pulverulenta (Figura 12).



Figura 12. Macroscopía de actinomiceto

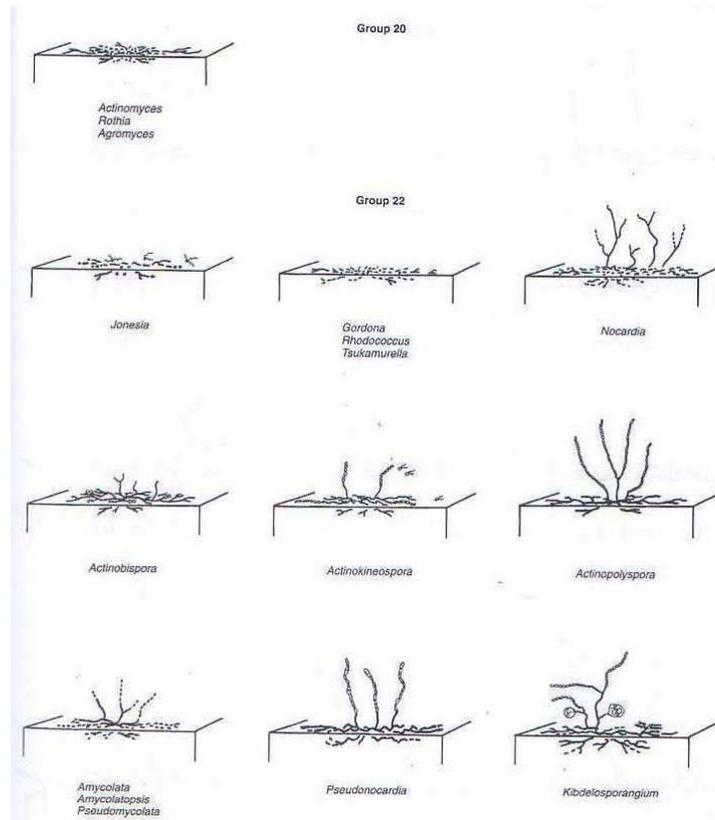
Los géneros predominantes de este grupo son *Nocardia* sp, *Streptomyces* sp y *Micromonospora* sp. Los actinomicetos están ubicados en el volumen IV del Manual de Bergey de la segunda edición (Stanier, 1996; Prescott, 2002).

Adicional al valor taxonómico de la identificación de actinomicetos por medio de la observación macro y microscópica, también hay que considerar los trabajos de identificación química, cromatografía (Hetch, 1976) y los estudios moleculares y genéticos (Takizawa, 1993; Patel, 2004).

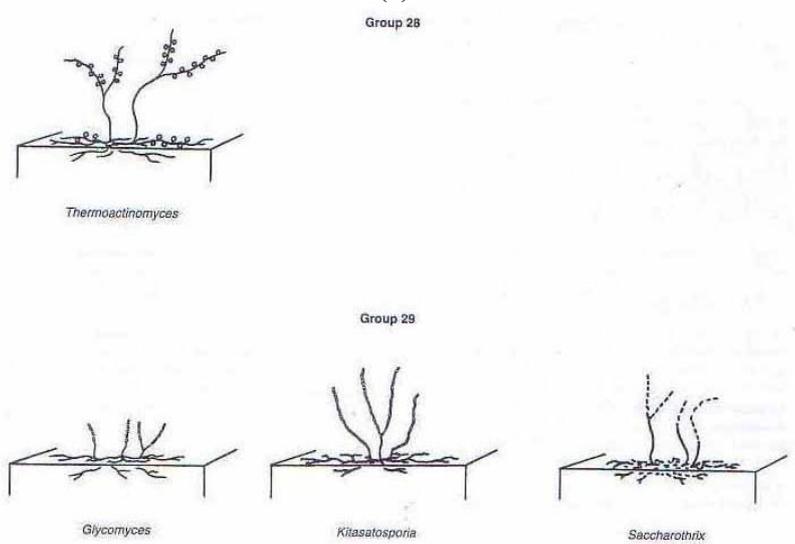
1.2.1.1. Identificación microscópica

Los actinomicetos son bacterias que producen filamentos delgados y ramificados que se desarrollan en micelios o filamentos individuales, asemejándose morfológicamente a las hifas de los hongos. Dichos filamentos pueden ser estables o fragmentarse en células cocoides o bacilares. Muchos de los actinomicetos del suelo producen sobre sus filamentos esporas asexuales, conocidas como conidios móviles o inmóviles, los cuales pueden desarrollarse de forma aislada, en pares, formando cadenas cortas o largas, o en una estructura especializada como esporangios (Bergey *et al.*, 2000)

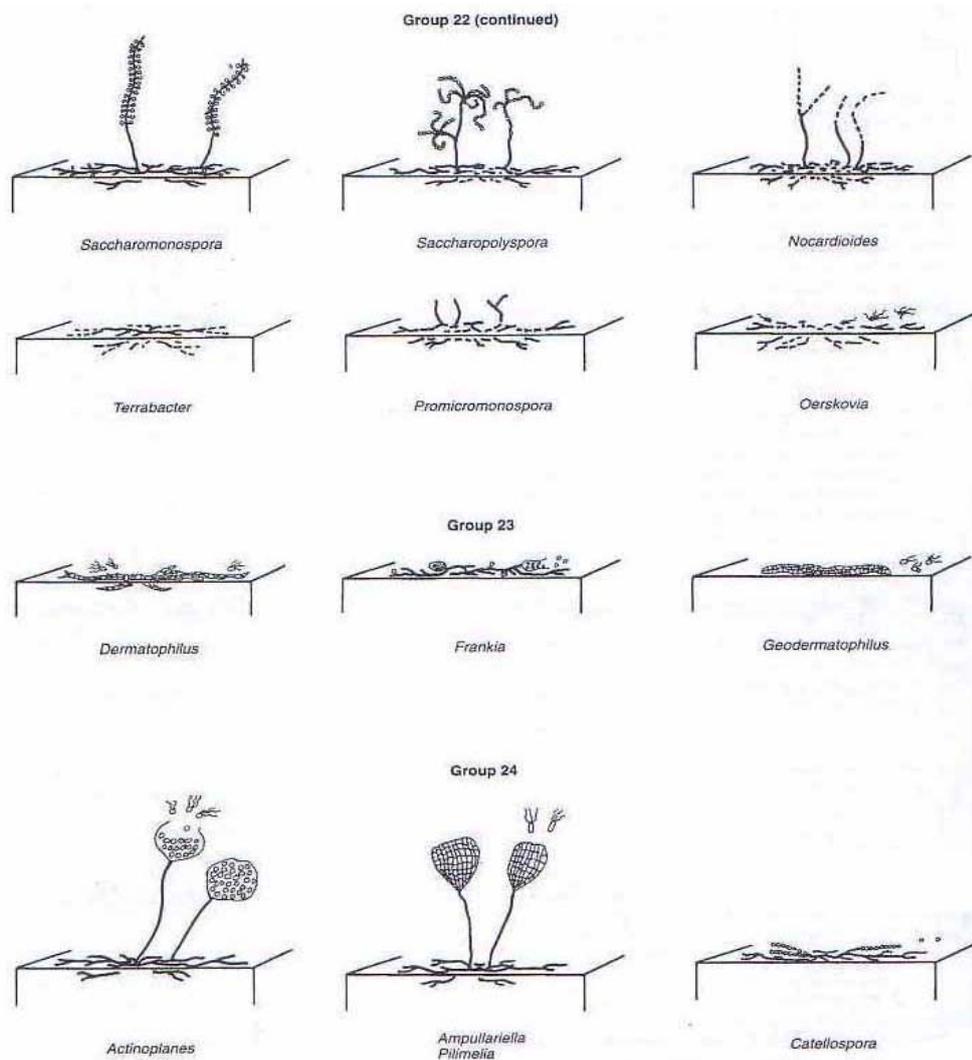
Para la determinación de los géneros se utilizan criterios físicos, fisiológicos, morfológicos, químicos y moleculares. El principal carácter físico considerado es la sensibilidad de las esporas al calor. Los caracteres morfológicos principales involucran el modo de septación de los filamentos, la presencia y la disposición del micelio inmerso en el sustrato o del micelio aéreo. Así mismo debe considerarse la presencia de esporangios, de esclerocios o sinemas, la presencia de conidios teniendo en cuenta su número, su movilidad, la disposición que tienen en los filamentos, y su forma y color. Igualmente la visualización de características como la ornamentación y/o disposición de las conidias es un criterio de clasificación a nivel de género y de especies. El Manual de Determinación Bacteriológica de Bergey agrupa a los actinomicetos según su crecimiento en 8 grupos como se muestran en la Figura 13 (Bergey *et al.*, 2000).



(a)



(b)



(c)

Figura 13. Diagramas esquemáticos del crecimiento de micelio aéreo y de sustrato de géneros de Actinomicetos. (a) grupos 20 y 22. (b) grupos 26 y 29. (c) grupos 22, 23 y 24. Tomado de Bergey *et al.* (2000).

1.2.1.2. Identificación química

Para la identificación química de los actinomicetos se utilizan dos características básicas; la primera de ellas trata de dilucidar los componentes que se encuentran presentes en las paredes del microorganismo desconocido y la segunda es realizar un

diagnóstico de hidrólisis de azúcares que realice la célula. Es de vital importancia conocer los azúcares involucrados en el metabolismo de cada una de las especies de estos microorganismos. Este tipo de identificación, aunque no asegura de ninguna manera un estudio profundo del metabolismo bacteriano, si puede ayudar a dilucidar la actividad de una vía metabólica. Por esta razón, por ejemplo, es que algunos microorganismos son reconocidos por fermentar o no algún sustrato.

1.2.1.3. Identificación Molecular

La hibridación ADN-ADN del cromosoma bacteriano se ha utilizado para la determinación de la identidad de las especies principalmente en el género *Streptomyces* (Cook & Meyers, 2003). Tanto las técnicas basadas en el análisis de restricción enzimático sobre el ADN cromosomal total como el análisis de fragmentos de restricción de baja frecuencia (LFRFA del inglés “low-frequency restriction fragment analysis”), suministran un patrón de restricción que es útil para la clasificación (Anderson & Wellington, 2001). En el caso de LFRFA se digiere el ADN cromosomal total con endonucleasas de restricción y luego se corre en una electroforesis en gel de campo pulsado (PFEG). Aunque esta técnica ha sido útil para reflejar la heterogeneidad de algunos géneros no resuelve las relaciones interespecíficas y se cuestiona por los errores que se pueden generar por largas amplificaciones cromosomales o deleciones en el cromosoma (Rauland *et al.*, 1995). La restricción de ADN genómico en los actinomicetos no muestra una resolución suficiente para determinar las relaciones taxonómicas a nivel de especie (Cramer *et al.*, 1983; Atalan, 2001).

Otra técnica utilizable para la caracterización de actinomicetos es la basada en el análisis de polimorfismos de ADN amplificados al azar (RAPD del inglés “Randomly Amplified Polymorphic DNA”). Esta técnica de “fingerprinting” utiliza para su análisis por PCR previo un “primer” sencillo con una secuencia arbitraria de nucleótidos que amplifica ADN usando una baja temperatura de anillamiento para que los polimorfismos sean detectados. El patrón de productos de PCR amplificados provee las características de “fingerprinting” que permiten ver las diferencias cromosomales entre diferentes aislamientos pero se debe conocer la secuencia cromosomal previamente (Williams *et al.*, 1990). Sin embargo, esta técnica muestra algunas deficiencias como la variabilidad de los perfiles obtenidos al cambiar la concentración de ADN y/o la mezcla de reacción por lo cual se debe ser riguroso en la estandarización de este tipo de técnica. El RAPD ha sido

utilizado principalmente para la identificación de algunas especies, principalmente del género *Streptomyces* (Wellington & Anderson, 2001).

La secuenciación de ADNr 16S también ha sido utilizada para la caracterización de los actinomicetos ya que esta molécula es ubicua, altamente conservada en secuencia entre las bacterias y genéticamente estable. Esta técnica ha sido un parámetro de identificación diferencial entre el género *Streptomyces* principalmente, sin embargo la secuenciación de genes de ADNr 16S no ha sido eficiente en la definición de relaciones filogenéticas entre especies pertenecientes al mismo género (Woese, 1987).

El análisis de restricción de amplificadores de ADN ribosomal (ARDRA del inglés “Amplified rDNA Restriction Analysis”) es una técnica basada en la amplificación por PCR de las regiones variables de los genes codificantes de la subunidad 16S ó 18S del ADN ribosomal, usando “primers” homólogos que hibridizan con regiones conservadas del gen. Los amplificadores son digeridos con enzimas de restricción en sitios de reconocimiento de 4 pares de bases y separados por electroforesis en agarosa de alta resolución o poliacrilamida. La disimilitud en los patrones de corrida permite identificar diferencias en la estructura de las comunidades microbianas (Rosado *et al.*, 1997). El ARDRA ha sido utilizado ampliamente en la diferenciación de especies bacterianas dentro de géneros, como *Clostridium* (Gurtler *et al.*, 1991), y la diferenciación de cepas bacterianas entre especies, por ejemplo *Lactococcus* (Kohler *et al.*, 1991), *Campylobacter* y en grupos de levaduras (Laaser *et al.*, 1989). En el caso de los actinomicetos ha sido utilizada identificando especies aerobias de importancia médica como *Actinomadura*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolispora*, *Streptomyces* y *Tsukamurella*. Esta técnica es de elección para la identificación de actinomicetos a nivel de género y tiene la ventaja de ser económica y de poder ser realizada con equipos de biología molecular básicos (Cook & Meyers, 2003).

1.2.2. Parte Experimental

1.2.2.1. Metodología

Aislamiento de los actinomicetos. Se realizó el aislamiento de los actinomicetos por medio de la técnica de diluciones seriadas, como se explicó en el Capítulo General de Materiales y Métodos.

Identificación de los actinomicetos. Para la identificación de los actinomicetos se realizó una caracterización primaria a nivel macroscópico y microscópico, con lo cual se logró determinar algunos de los géneros predominantes. A continuación se realizó la caracterización bioquímica del metabolismo de los actinomicetos. Para el desarrollo de la técnica fueron utilizados los kits de identificación BBL Crystal™ Enteric/Nonfermenter y BBL Crystal™ Gram-Positive fabricados por la casa comercial Becton, Dickinson and Company®. Se utilizaron los dos tipos de kits (para Gram positivos y Gram negativos) debido a que en conjunto se amplía la variedad de azúcares que pueden ser tenidos en cuenta en la conformación de los perfiles metabólicos de cada una de las cepas escogidas.

Mediante la caracterización morfológica y bioquímica se lograron 30 aislados diferentes que fueron sometidos a pruebas de identificación molecular. Para ello, se hicieron crecer en caldo ISP1 para realizar la extracción de ADN de acuerdo al protocolo de Cook y Meyers (2003). Para evitar que la melanina producida por algunos actinomicetos, ocasione interferencia en la PCR, se realizó una modificación del protocolo de extracción adicionando limpieza con cloroformo/alcohol isoamílico (proporción 24:1), precipitación con isopropanol absoluto y un lavado con etanol al 70% (Sambrook *et al.*, 1989). Luego se realizó la identificación molecular según la metodología de Cook y Meyers (2003).

Para la amplificación del gen ARNr 16S de los actinomicetos se utilizaron los primers F1 y R5 los cuales son modificaciones de los primers fD1 y rP2 (Weisburg *et al.*, 1991). El primer F1 se une a la posición 7-26 y el primer R5 a la posición 1496-1476 del gen ARNr 16S de *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877T (rrnD operon; GenBank accession No. M27245). Los primers utilizados se diseñaron para amplificar casi toda la secuencia del gen ARNr 16S (Cook & Meyers, 2003). Estos autores crearon claves dicótomas para la identificación de géneros de actinomicetos por medio de los patrones de fragmentos de restricción del gen ARNr 16S utilizando las secuencias publicadas para actinomicetos en la base de datos del GenBank y realizando restricciones *in silico* con enzimas de restricción comercialmente conocidas y con reconocimiento específico de secuencia de 4, 6 u 8 pares de bases. Para la construcción de las claves dicótomas se utilizaron 13 endonucleasas que reconocen secuencias de corte por fuera de las regiones variables α , β , y γ del ARNr 16S de *Streptomyces*. La primera enzima de restricción que se usa en las claves dicótomas es *Sau3AI* ya que esta divide en 3 grandes grupos los géneros de actinomicetos. Cada grupo formado tiene a su vez diferentes endonucleasas de restricción para definir el género (Anexo 3).

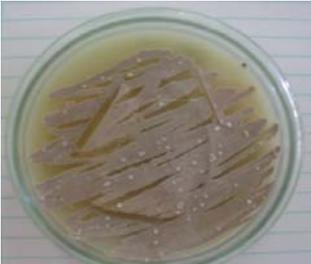
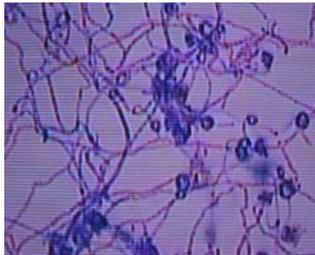
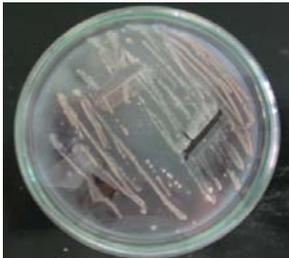
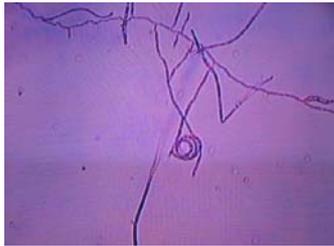
1.2.2.2. Resultados y Discusión

Caracterización morfológica a nivel macroscópico y microscópico. Pasado el tiempo de incubación, las colonias presuntivas de actinomicetos fueron identificadas teniendo en cuenta las características microscópicas y macroscópicas que los diferencian de las bacterias no filamentosas y los hongos. La microscopía confirmó que el 100% de los actinomicetos aislados fueron Gram positivos, presentaron filamentos delgados, ramificados, algunos largos otros cortos que se fragmentaban en unidades más pequeñas. Se tuvo en cuenta el tipo de micelio, vegetativo (fragmentado, no fragmentado) o aéreo (conidias simples, dobles o en cadenas largas o cortas), así mismo si éste era o no tortuoso.

La caracterización macroscópica de los 30 aislados de actinomicetos se realizó teniendo en cuenta la textura de las colonias, la coloración del micelio aéreo y de sustrato, la forma, el tamaño y/o la producción de pigmentos difusibles en el medio de cultivo. Las colonias presentaron un olor a suelo húmedo, característica representativa de éste grupo microbiano por la capacidad de producción de geosmina; estas características fueron determinantes para su identificación (Stanier, 1996; Sylvia, 2005).

A continuación se presenta una tabla resumen (Tabla 3) de las características microscópicas y macroscópicas de los actinomicetos aislados.

Tabla 3. Descripción macroscópica, microscópica e identificación presuntiva de géneros de los aislamientos de los actinomicetos (Crecimiento en Agar Avena; Coloración de Gram, Aumento 100X).

CEPA	CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS	CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS
MCR 1	<p>Colonia seca, pulverulenta, reverso de la colonia color naranja claro, anverso color café claro.</p>  <p>Colonias sobre agar avena con Nistatina</p>	<p>Micelio vegetativo ramificado no fragmentado, aéreo, cadenas largas de conidios, formando espirales. Posible género: <i>Streptomyces</i> sp</p>  <p>Actinomiceto 100x</p>
MCR 2	<p>Colonia seca, pulverulenta, reverso de la colonia violeta, anverso de color inicial café, esporulación blanca.</p>  <p>Colonias sobre agar avena con Nistatina</p>	<p>Micelio vegetativo no fragmentado, micelio aéreo fragmentado presentando cadenas de conidios largos en espiral. Posible género: <i>Streptomyces</i> sp.</p>  <p>Actinomiceto 100x</p>
MCR 3	<p>Colonia seca, pulverulenta, reverso color café, color inicial crema que al pasar el tiempo se torna marrón y blanco.</p>  <p>Colonias sobre agar avena con Nistatina</p>	<p>Micelio vegetativo sin fragmentación cadena de conidios (sencillas) formando espirales. Posible género: <i>Streptomyces</i> sp.</p>  <p>Actinomiceto 100x</p>

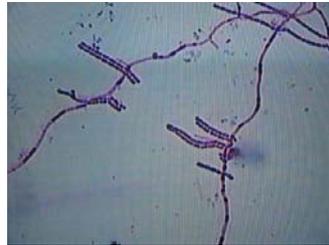
Colonia seca, pulverulenta, reverso de la colonia color café oscuro, color inicial verde oscuro, al pasar el tiempo de incubación se torna café con blanco.

MCR
4



Colonias sobre agar avena con Nistatina.

Micelio vegetativo no fragmentado, micelio aéreo fragmentado, cadenas largas de conidios ovalados.



Actinomiceto. 100x

Colonia seca, pulverulenta, reverso color naranja, al inicio textura cremosa, color inicial del anverso: rojo fucsia que a medida que pasa el tiempo se torna blanco a gris sin pigmento.

MCR
5



Colonias sobre agar avena con Nistatina

Conidios sencillos y dobles, pocos filamentos no ramificados.



Actinomiceto. 100x

Colonia seca, pulverulenta, colonia color plateado en el anverso, bordes blancos que al pasar el tiempo se torna blanca (puntos blancos) con reverso verde oscuro

MCR
6



Colonias sobre agar avena con Nistatina

Micelio vegetativo no fragmentado, cadena de conidios cortas, micelio aéreo tortuoso. Posible género: *Streptomyces* sp



Actinomiceto. 100x

Colonia seca pulverulenta, en el anverso la colonia toma un color rosado pálido que se torna blanco al pasar el tiempo

MCR
7



Colonias sobre agar avena con Nistatina

Micelio vegetativo sin fragmentar, cadena larga de conidios sin espirales



Actinomiceto. 100x

Colonia seca, pulverulenta, color del anverso rosado tenue, reverso de la colonia presenta una coloración café claro.

MCR
8



Colonias sobre agar avena con Nistatina

Micelio no fragmentado, tortuoso, y con espirales. Pocas conidias. Posible género: *Streptomyces* sp.



Actinomiceto. 100x

Colonia seca, pulverulenta, color del anverso gris plateado, el reverso toma un color café oscuro, la colonia es pequeña.

MCR
9



Colonias sobre agar avena con Nistatina

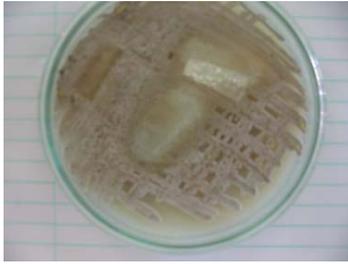
Cadena larga de conidios, micelio no fragmentado, tortuoso y en espiral. Posible género: *Streptomyces* sp.



Actinomiceto. 100x

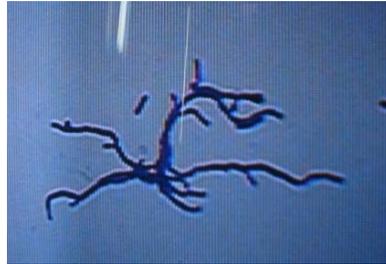
Colonia seca, pulverulenta, el anverso de color blanco gris que al pasar el tiempo se torna café, el reverso con color verde.

MCR
10



Colonias sobre agar avena con Nistatina

Micelio no fragmentado, tortuoso con formación de entramadas. Conidios sencillos, no en cadena.



Actinomiceto. 100x

Colonia seca, pulverulenta, anverso color marrón oscuro, bordes de blanco a crema con puntos blancos sobre el micelio, el reverso presenta color café.

MCR
11



Colonias sobre agar avena con Nistatina

Micelio vegetativo no fragmentado, micelio aéreo fragmentado con formación de espirales y forma tortuosa. Posible género: *Streptomyces* sp.



Actinomiceto. 100x

Colonia seca, el anverso color gris con bordes blancos, reverso color gris oscuro.

MCR
12



Colonias sobre agar avena con Nistatina

Filamentos largos, micelio no fragmentado, cadena corta de conidios.



Actinomiceto. 100x

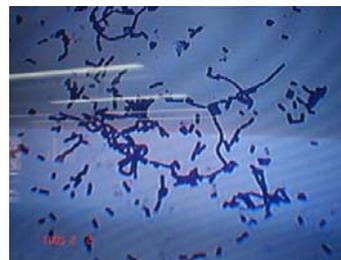
Colonia seca, pulverulenta, el anverso color naranja claro, el reverso color naranja oscuro que con el paso del tiempo las colonias se tornan plateadas con blanco.

MCR
13



Colonias sobre agar avena con Nistatina

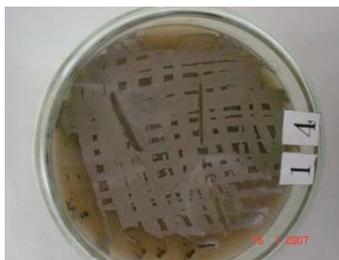
Poco micelio fragmentado, no tortuoso. Cadena larga de conidias (curvas).



Actinomiceto. 100x

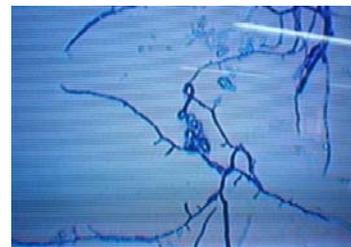
Colonia seca pulverulenta, sin pigmento difusible al medio de cultivo, el reverso color café claro, el anverso color gris y borde blanco; puntos negros sobre la colonia.

MCR
14



Colonias sobre agar avena con Nistatina

Micelio no fragmentado, de forma tortuosa y formación de espirales. Forma entramada. Cadenas cortas de conidias.



Actinomiceto. 100x

Colonia seca, pulverulenta, el anverso color café, sin pigmentación en el reverso.

MCR
16



Colonias sobre agar avena con Nistatina

Micelio no fragmentado, no tortuoso, formación de entramada. Cadenas largas de conidias. Posible género: *Streptomyces* sp.

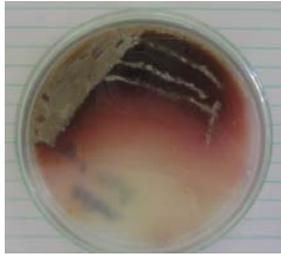


Actinomiceto. 100x

Resultados

Colonia seca, pulverulenta, con presencia de pigmento difusible al medio de color vino tinto, el reverso color vino tinto, el anverso con color inicial gris que se torna blanco.

MCR
17



Colonias sobre agar avena con Nistatina

Micelio vegetativo no fragmentado y micelio aéreo fragmentado, cadena lagas de conidias. Presencia de espirales. Posible género: *Streptomyces* sp.



Actinomiceto. 100x

Colonia seca pulverulenta, sin pigmento en el reverso, el anverso de color gris plateado y pasado el tiempo de incubación se torna blanco.

MCR
18



Colonias sobre agar avena con Nistatina

Conidios en cadena larga, micelio no fragmentado, tortuoso. Posible género: *Streptomyces* sp.



Actinomiceto. 100x

Colonia seca, pulverulenta, el anverso de color blanco a grisáceo, el reverso de color naranja.

MCR
19



Colonias sobre agar avena con Nistatina

Micelio vegetativo no fragmentado, micelio aéreo fragmentado con espirales, tortuoso. Posible género: *Streptomyces* sp.



Actinomiceto. 100x

Colonia seca, pequeña, pulverulenta, anverso

Micelio vegetativo no fragmentado, cadenas de

grisáceo a blanco, reverso se torna a color amarillo quemado.

MCR
20



Colonias sobre agar avena con Nistatina

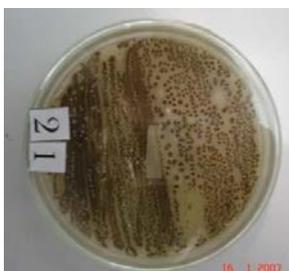
conidios largos, micelio aéreo fragmentado.
Posible género: *Streptomyces* sp



Actinomiceto. 100x

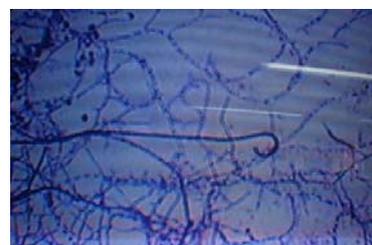
Colonia pequeña, anverso café, sin color en el reverso. Puntos blancos en la superficie (esporulación).

MCR
21



Colonias sobre agar avena con Nistatina

Micelio aéreo fragmentado, micelio vegetativo con fragmentación, conidios en cadena o en espiral. Posible género: *Streptomyces* sp



Actinomiceto. 100x

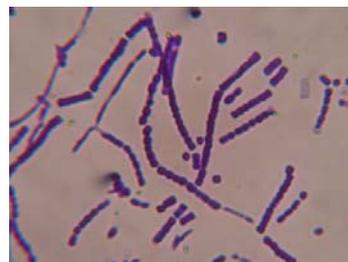
Colonias pequeñas, secas, el anverso de color blanco que con el tiempo se torna gris, sin pigmento en reverso.

MCR
22



Colonias sobre agar avena con Nistatina

Micelio vegetativo no fragmentado, micelio aéreo fragmentado, cadenas de conidios largos.
Posible género: *Streptomyces* sp.



Actinomiceto. 100x

Colonia pequeña, anverso blanco con puntos

Micelio aéreo fragmentado, micelio vegetativo

Resultados

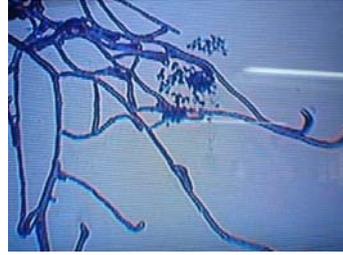
negros y grises. Reverso con pigmento color naranja difusible en el medio.

MCR
23



Colonias sobre agar avena con Nistatina

no fragmentado, cadena de conidios largos en espiral. Posible género: *Streptomyces* sp.



Actinomiceto. 100x

Colonia seca, pulverulenta, el anverso color gris, sin pigmentación en el reverso, sin pigmento difusible en el medio.

MCR
24



Colonias sobre agar avena con Nistatina

Filamentos, ramificados, pocos conidios, en su mayoría simples. No hay presencia de cadenas.



Actinomiceto. 100x

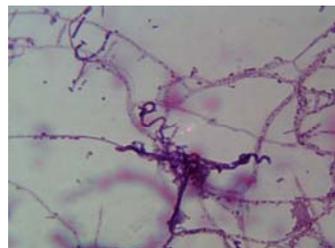
Colonia seca, pulverulenta, consistencia dura, anverso de color blanco tornándose con el tiempo a gris con borde blanco, el reverso con color naranja.

MCR
25



Colonias sobre agar avena con Nistatina

Micelio aéreo, filamentos fragmentados, tortuoso, con cadenas largas de conidios.

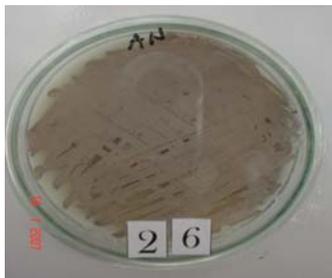


Actinomiceto. 100x

Colonia pequeña, seca, pulverulenta, anverso de color gris a morado, el reverso de color gris oscuro

Filamentos largos y fragmentados, micelio tortuoso, cadena de conidios cortas, sin espiral.

MCR
26



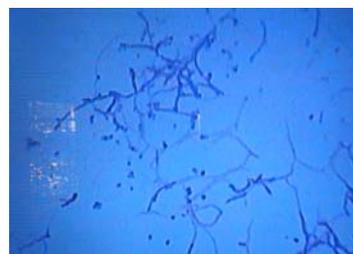
Colonias sobre agar avena con Nistatina

Actinomiceto. 100x

Colonia puntiforme, seca, pulverulenta, anverso de color verde con un halo delgado color verde claro, sin pigmento en el reverso.

Micelio aéreo no fragmentado; micelio vegetativo no fragmentado, no tortuoso, cadena de conidios cortos.

MCR
27



Colonias sobre agar avena con Nistatina

Actinomiceto. 100x

Colonia grande, seca, pulverulenta anverso blanco inicialmente tornándose con el tiempo de color gris. Reverso con pigmento verde oscuro.

Micelio aéreo tortuoso, filamentos largos, cadenas de conidios cortos, con espirales.

MCR
30



Colonias sobre agar avena con Nistatina

Actinomiceto. 100x

Resultados

Colonias secas, pulverulentas. Anverso inicialmente de color gris tornándose con el tiempo a un color blanco, el reverso de color gris.

MCR
31



Colonias sobre agar avena con Nistatina

Filamentos largos, pocos conidios sencillos, micelio tortuoso.



Actinomiceto. 100x

Colonias color naranja, aspecto áspero, el anverso color naranja, el reverso de color naranja.

MCR
32



Colonias sobre agar avena con Nistatina

Filamentos largos, pocos conidios simples, micelio tortuoso.



Actinomiceto. 100x

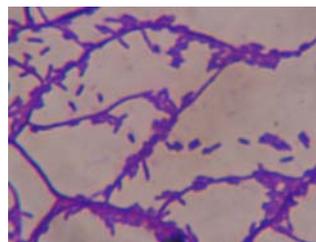
Colonias de aspecto cremoso, el anverso color gris oscuro, el reverso color gris oscuro.

MCR
33



Colonias sobre agar avena con Nistatina

Filamentos largos, cadena de conidios simples, micelio tortuoso.



Actinomiceto. 100x

Las características macroscópicas y microscópicas de los actinomicetos descritas en la Tabla 3 fueron comparadas con las características descritas por el Manual de determinación bacteriológica de Bergey (Bergey *et al.*, 2000). Los resultados de la microscopía muestran que solo las cepas MCR1, MCR2, MCR3, MCR6, MCR9, MCR11, MCR16, MCR17, MCR18, MCR19, MCR20, MCR21, MCR22 y MCR23 se pueden identificar con claridad como pertenecientes al género *Streptomyces*, el cual presenta características como la no fragmentación del micelio de sustrato, la fragmentación del micelio aéreo y la formación de cadenas de conidias en forma de cocos o bacilos en disposición de espiral. El resto de las cepas muestran las características microscópicas de actinomicetos más no permiten identificar claramente el género específico por la ausencia de estructuras características o porque las observadas están presentes en más de un género.

La caracterización microscópica de las cepas MCR24 y MCR26 se relacionan con varios grupos taxonómicos, debido a que no se observó un rasgo particular que permitió clasificarlas en un grupo específico. La cepa MCR24 presenta filamentos ramificados con pocas conidias, morfología asociable a grupos como *Nocardia*, *Actinopolyspora*, *Amycolata* o *Nocardioides*.

Caracterización de la actividad metabólica de los actinomicetos. En la Tabla 4 se exponen los resultados obtenidos a partir de la lectura de las baterías bioquímicas; no se observa uniformidad alguna en los resultados y por el contrario se evidencia que los microorganismos objeto de estudio utilizan diversas fuentes azucaradas.

Tabla 4. Resultados obtenidos con respecto a las lecturas de los patrones de azúcares en kits de identificación BBL Crystal™ Enteric/Nonfermenter y BBL Crystal™ Gram-Positive. (+: Fermenta; -: No Fermenta). Ad (adonitol), Ara (arabinosa), Fruc (fructosa), Gal (galactosa), Gli (glicerol), Inos (Inositol), Lac (lactosa), Mani (manitol), Mano (manosa), Ram (ramnosa), Sac (sacarosa), Sor (sorbitol), Esc (esculina), Cit (citrato).

cepa / azúcar	MCR 3	MCR 9	MCR1 0	MCR1 4	MCR1 6	MCR2 1	MCR2 4	MCR2 6	MCR2 7	MCR3 0	MCR3 2
Ad	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
Ara	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
Fruc	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-
Gal	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-

Resultados

cepa / azúcar	MCR 3	MCR 9	MCR1 0	MCR1 4	MCR1 6	MCR2 1	MCR2 4	MCR2 6	MCR2 7	MCR3 0	MCR3 2
Gli	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inos	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
Lac	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Mani	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
Man o	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-
Ram	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
Sac	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
Sor	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-
Urea	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Esc	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Cit	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+

Para realizar una aproximación al género de cada una de las especies se realizó una comparación entre la morfología y el patrón de azúcares obtenido para cada cepa; los datos de comportamiento bioquímico de cada grupo perteneciente a los actinomicetos fueron obtenidos a partir de Stanley (1994) en el libro Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

La cepa MCR3 presenta una morfología microscópica similar a *Streptomyces* caracterizada por la presencia de las espirales que forma; adicional a esto el comportamiento del patrón de azúcares observado en la Tabla 5 muestra similitud del 71,4% con microorganismos de la especie *Streptomyces tanashiensis*. La cepa MCR9 presenta una microscopía propia del género de *Streptomyces*, y su patrón de azúcares una similitud del 85,7% con cepas de la especie *Streptomyces nojiriensis*. La cepa MCR14 también evidencia algunos espirales en su conformación microscópica, lo que permite que sea agrupada en el género *Streptomyces* y asociada con la especie *Streptomyces sannanensis*, como consecuencia de su similitud del 85,7% en el patrón de azúcares

(Tabla 5); no es considerado un 100% debido a que la tabla de referencia no muestra resultado alguno sobre la galactosa (Stanley, 1994).

Otra cepa que presenta similitud morfológica con *Streptomyces* es la cepa MCR21. Su patrón de azúcares es igual a la ya citada especie *S. tanashiensis*, pero con la diferencia en que su variación se presenta en el resultado frente a la arabinosa (Tabla 5). La similitud obtenida fue del 85,7%. Finalmente se obtuvo el resultado de la cepa MCR30, que al igual que las anteriores también presenta una morfología similar a la del género *Streptomyces*. El patrón de azúcares evidencia un 100% de concordancia con cepas de tipo *Streptomyces cuspidosporus* (Stanley, 1994).

El comportamiento bioquímico de las cepas evidencia una uniformidad particular; solo exhiben la utilización de un tipo de azúcar. La cepa MCR9 metaboliza arabinosa, la cepa MCR14 el sorbitol (resultado no expresado en la tabla, ya que no hay patrón de comparación) y la cepa MCR21 la galactosa.

Tabla 5. Tabla comparativa entre las cepas MCR3, MCR9, MCR14, MCR21 y MCR30 con cepas del género *Streptomyces*, quienes presentan un patrón de azúcares superior al 70% de similitud. Ara (arabinosa), Fruc (fructosa), Gal (galactosa), Ino (Inositol), Mani (manitol), Ra (ramnosa), Sac (sacarosa)

cepa - azúcar	MCR 3	<i>S. tanashiensis</i>	MCR 9	<i>S. nojiriensis</i>	MCR 30	<i>S. cuspidosporus</i>	MCR 14	<i>S. sannanensis</i>	MCR 21	<i>S. tanashiensis</i>
Ara	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
Fruc	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Gal	+	+	-	-	+	+	-	NA	+	+
Ino	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Mani	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Ra	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Sac	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-

Las cepas MCR10, MCR16 y MCR32 presentan una morfología diferente; no muestran bucles lo que los descarta como microorganismos pertenecientes al género *Streptomyces* y por el contrario son micelios tortuosos y entramados. Esto permite que

sean asociados con microorganismos del género *Nocardia*. La cepa MCR10 presenta una similitud del 75% con respecto a *Nocardia rugosa*, la cepa MCR16 presenta una similitud del 87,5% con respecto a *Nocardia sulphurea* y la cepa MCR32 presenta una similitud del 87,5% con respecto a *Nocardia brevicatena* (Tabla 6).

Tabla 6. Tabla comparativa de las cepas MCR10, MCR16 y MCR32 con especies propias del género *Nocardia*.

CEPA/ AZUCAR	MCR10	<i>N. rugosa</i>	MCR16	<i>N. sulphurea</i>	CEPA/ AZUCAR	MCR32	<i>N. brevicatena</i>
Adonitol	+	+	-	-	Adonitol	-	-
Arabinosa	+	+	-	-	Arabinosa	-	-
Inositol	-	-	+	+	Inositol	-	-
Lactosa	-	-	-	-	Ramnosa	-	-
Ramnosa	+	+	-	-	Sorbitol	-	-
Sorbitol	+	-	-	-	Urea	-	-
Urea	+	+	+	-	Citrato	+	-
Citrato	+	-	+	+			

La cepa MCR10 presenta la particularidad de ser lactosa negativa, comportamiento propio del 90% del grupo; adicionalmente muestra un resultado positivo en el glicerol que no está presente en ninguna de las 9 especies citadas por Stanley (1994), lo que podría presumirse como una posible nueva especie o una especie con una variabilidad bioquímica frente a este sustrato, lo que indicaría la necesidad de realizar en futuros estudios una caracterización molecular de los genes involucrados en el metabolismo del glicerol o su uso como fuente de carbono.

La cepa MCR26 presenta un micelio tortuoso y fragmentado con pocas conidias. Su mecanismo metabólico solamente utiliza el sorbitol, que es un alcohol de azúcar. Estas particularidades, sumadas a su morfología hacen que pueda ser ubicado en el grupo de *Rhodococcus*, *Promicromonospora* o *Amycolaptosis*. Finalmente la cepa MCR27 que no presenta micelio tortuoso ni fragmentado, exhibe desarrollo de micelio aéreo y una pigmentación amarilla tenue junto a la colonia; si se tienen en cuenta tanto las

características macro y microscópicas obtenidas y se comparan con las presentadas por Stanley (1994), se puede presumir que esta cepa está asociada con el grupo *Pseudonocardia*. Con esta identificación preliminar se logró establecer el porcentaje de los diferentes géneros presentes en los suelos muestreados (Figura 14).

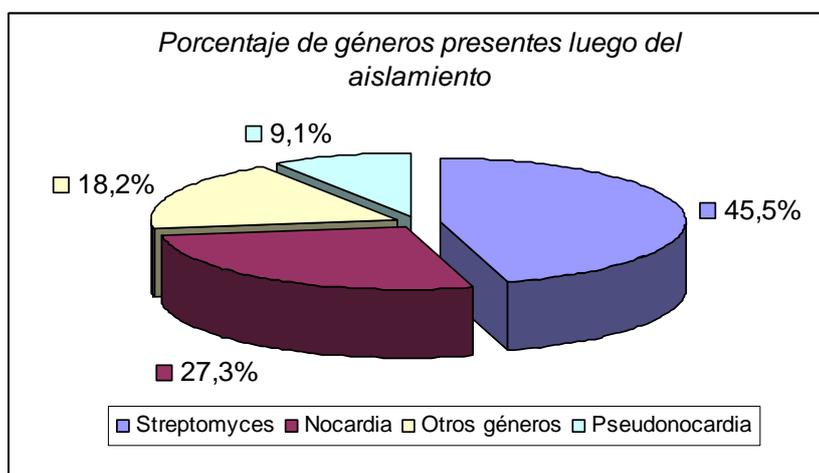


Figura 14. Porcentaje de microorganismos identificados de forma preliminar de acuerdo a los resultados obtenidos en su patrón de azúcares.

Identificación de los actinomicetos mediante el uso de herramientas moleculares. La amplificación del ADNr 16S generó fragmentos cuyos tamaños oscilaban entre 1500 pb y 1540 pb aproximadamente (Figura 15).

Los productos de amplificación del gen ARNr 16S de las cepas de actinomicetos aislados fueron digeridos con la endonucleasa de restricción *Sau3AI* y se agruparon de acuerdo a las claves dicótomas. Los amplificados digeridos que presentaron fragmentos de ADN inferiores a 750 pb se agruparon en el grupo 1 de identificación de género del tratamiento realizado con la enzima *Sau3AI* (Tabla 7) (Figura 16, línea 7) y aquellos que presentaron dos fragmentos distintos de ADN inferiores a 980 pb entre 980-760 pb y 350-300 pb se agruparon en el grupo 2 de identificación de género del tratamiento realizado con la enzima *Sau3AI* (Tabla 8) (Figura 16, línea 3). Ninguno de los aislamientos pertenece al grupo 3 de identificación de género del tratamiento realizado con la enzima *Sau3AI* que correspondería a fragmentos entre 980 pb y 1350 pb.

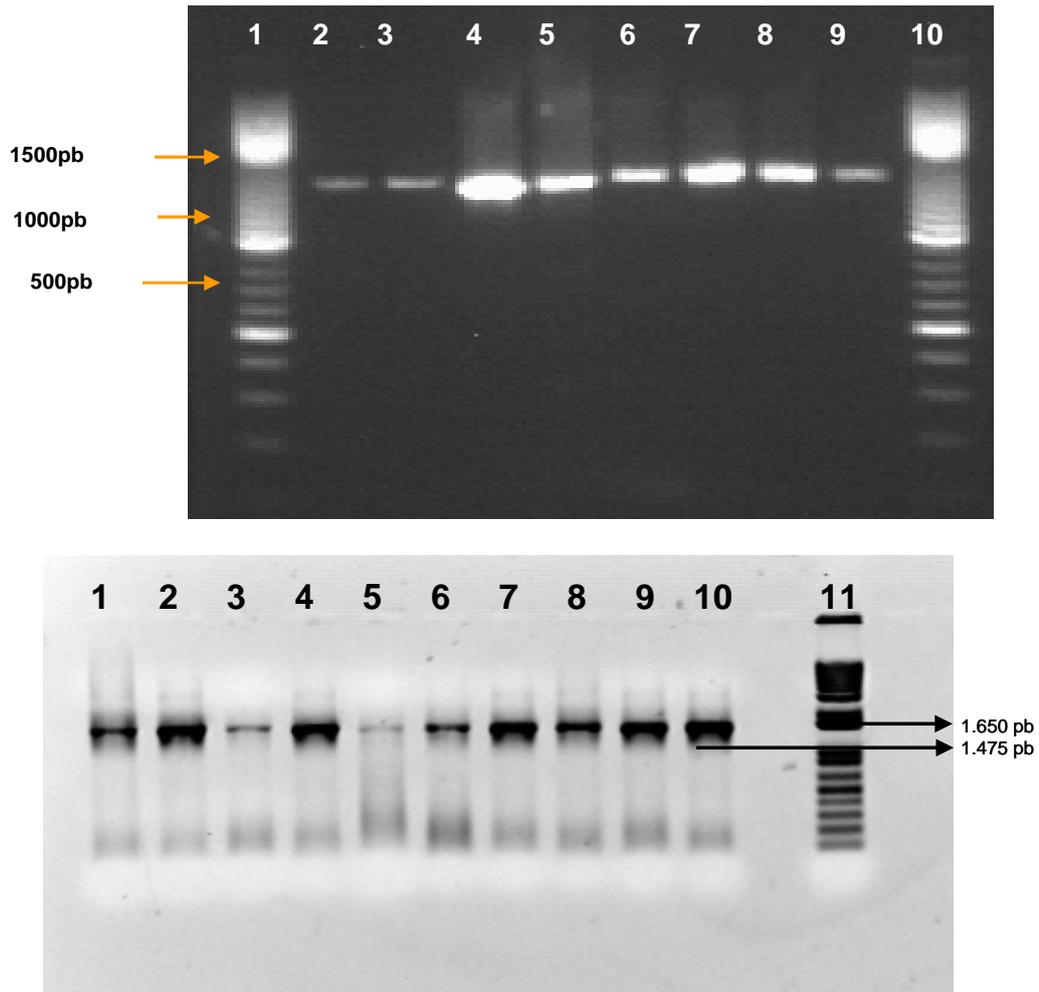


Figura 15. Amplificación del gen ADNr 16S.

(a) Líneas 1 y 10: patrón de peso molecular de 100bp (Promega), Línea 2: MCR1, Línea 3: MCR4, Línea 4: MCR5, Línea 5: MCR7, Línea 6: MCR9, Línea 7: MCR13, Línea 8: MCR14, Línea 9: MCR24. (b) Línea 10: patrón de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen) Línea 1: MCR3, Línea 2: MCR9, Línea 3: MCR10, Línea 4: MCR14, Línea 5: MCR21, Línea 6: MCR24, Línea 7: MCR26, Línea 8: MCR27, Línea 9: MCR30, Línea 10: MCR31

De acuerdo con las claves dicótomas (Cook & Meyers, 2003) hay que considerar el corte y no corte por las enzimas de restricción, así como el tamaño esperado de las bandas formadas en el caso de que la enzima de restricción tuviese la capacidad de cortar el

amplificado. Los resultados de las restricciones obtenidos en el presente estudio demuestran que aunque la correspondiente enzima de restricción digirió el amplificado no se produjeron los tamaños de bandas especificados por Cook & Meyers (2003) en sus claves dicótomas. Esto puede ser debido a mutaciones que alteran el tamaño de las bandas formadas. El análisis de tamaño de las bandas con el software Quantity One o que los genes ARNr 16S utilizados para la construcción de las claves dicótomas presentan diferencias pequeñas con los de las cepas aisladas. Un ejemplo de este caso es la cepa MCR9, la cual produjo bandas de 1119 pb y 510 pb con la enzima de restricción *KpnI* y según las claves dicótomas estas bandas deberían presentar tamaños entre 1000-1100 pb y 410-470 pb.

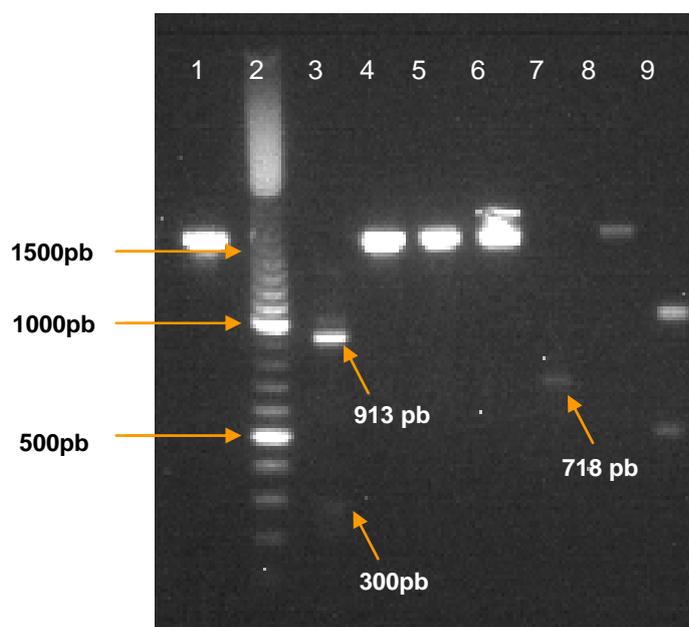


Figura 16. Digestiones del producto de PCR del gen ARNr 16S de las cepas MCR4 y MCR14. Línea 1: ADNr 16S sin digerir, Línea 2: Patrón de peso molecular de 100 pb, Línea 3: MCR4 + *Sau3AI*. Línea 4: MCR4 + *VspI*, Línea 5: MCR4 + *KpnI*. Línea 6: MCR4 + *SphI*, Línea 7: MCR14 + *Sau3AI*. Línea 8: MCR14 + *VspI*. Línea 9: MCR14 + *KpnI*.

Para cada uno de los grupos obtenidos se realizaron las digestiones correspondientes siguiendo las claves dicótomas hasta identificar el género del aislamiento (Anexo 3). En este estudio se utilizó la endonucleasa de restricción *VspI*, la cual es un isozómero de

Resultados

la enzima *AsnI* que se utiliza en las claves dicótomas. Los resultados de corte de los amplificadores del ADNr 16S se muestran en las Tablas 7 y 8 en donde se especifica el tamaño de las bandas formadas.

Tabla 7. Caracterización de actinomicetos pertenecientes al grupo 1 de identificación de género por corte con de *Sau3AI*. NA: No Aplica; NI: No se identifica; CA; *Streptomyces coelicolor*; CB; *Bacillus cereus*

Cepa	<i>Sau3AI</i>	<i>VspI</i>	<i>KpnI</i>	<i>SpHI</i>	<i>PstI</i>	Género
MCR 1	2 Bandas 669 y 533pb	No corte	2 Bandas 1113 y 462pb	2 Bandas 1232 y 394 pb	NA	<i>Streptomyces</i>
MCR 3	2 Bandas 613 y 277pb	No corte	No corte	NA	No corte	<i>Microbispora</i>
MCR 5	2 Bandas 700 y 300 pb	No corte	2 Bandas 1100 y 520 pb	No corte	NA	<i>Streptomyces</i>
MCR 6	Banda 684 pb	No corte	Banda 1079pb	2 Bandas 1141 y 400 pb	NA	<i>Streptomyces</i>
MCR 9	Banda 718 pb	No corte	2 Bandas 1119 y 510 pb	No corte	NA	<i>Streptomyces</i>
MCR 10	2 Bandas 652 y 162 pb	No corte	2 Bandas 1100 y 478 pb	2 Bandas 1141 y 406 pb	NA	<i>Streptomyces</i>
MCR 11	3 Bandas 636, 357 y 260 pb	No corte	Banda 1080 pb	No corte	NA	<i>Streptomyces</i>
MCR 12	Banda 655 pb	No corte	2 Bandas 1100 y 526 pb	No corte	NA	<i>Streptomyces</i>
MCR 13	Banda 673 pb	No corte	2 Bandas 1100 y 510 pb	No corte	NA	<i>Streptomyces</i>
MCR 14	Banda 718 pb	No corte	2 Bandas 1070 y 525 pb	No corte	NA	<i>Streptomyces</i>
MCR 16	Banda 673pb	No corte	Banda 1185 pb	Banda 1086 pb	NA	<i>Streptomyces</i>
MCR 17	Banda 690 pb	No corte	2 Bandas 1048 y 492 pb	No corte	NA	<i>Streptomyces</i>
MCR 18	2 Bandas 680 y 168 pb	No corte	Banda 1080 pb	No corte	NA	<i>Streptomyces</i>
MCR 19	2 Bandas 652 y 162 pb	No corte	2 Bandas 1158 y 531 pb	2 Bandas 1165 y 415 pb	NA	<i>Streptomyces</i>
MCR 20	Banda 770 pb	No corte	2 Bandas 1138 587pb	No corte	NA	<i>Streptomyces</i>
MCR 21	Banda 664 pb	No corte	Banda 1080 pb	No corte	NA	<i>Streptomyces</i>
MCR 23	2 Bandas 654 y 316 pb	No corte	2 Bandas 1009 y 485pb	No corte	NA	<i>Streptomyces</i>
MCR 26	Banda 587 pb	No corte	Banda 1026 pb	2 Bandas 1024 y 440pb	NA	<i>Streptomyces</i>
MCR 27	2 Bandas 600 y 389 pb	No corte	2 Bandas 853 y 768pb	No corte	NA	<i>Streptomyces</i>

Cepa	<i>Sau3AI</i>	<i>VspI</i>	<i>KpnI</i>	<i>SphI</i>	<i>PstI</i>	Género
MCR 30	2 Bandas 644 y 249 pb	No corte	2 Bandas 1068 y 450 pb	2 Bandas 1143 y 400pb	NA	<i>Streptomyces</i>
MCR 31	2 Bandas 610 y 391pb	No corte	2 Bandas 1019 y 437 pb	2 Bandas 1100 333pb	NA	<i>Streptomyces</i>
MCR 32	Banda 700pb	No corte	2 Bandas 1010 y 468 pb	2 Bandas 1349 y 130pb	NA	<i>Kitasatospora</i>
CA	Banda 715 pb	No corte	2 Bandas 988 y 421pb	No corte	NA	<i>Streptomyces</i>
CB	Banda 1574 pb	NA	NA	NA	NA	N.I

Tabla 8. Caracterización de actinomicetos pertenecientes al grupo 2 de identificación de género por corte con de *Sau3AI*. NA: No aplica

Cepa	<i>Sau3AI</i>	<i>VspI</i>	<i>KpnI</i>	<i>HindIII</i>	<i>SphI</i>	<i>PstI</i>	Género
MCR2	2 Bandas 970 y 218pb	Banda 1141 pb	No corte	NA	No corte	NA	<i>Actinoalloteichus</i> <i>Actinopolyspora</i> <i>Saccharopolyspora</i> <i>Thermocrispum</i>
MCR4	2 Bandas 913 y 283 pb	No corte	NA	No corte	No corte	No corte	<i>Thermobifida</i>
MCR7	3 Bandas 900, 655 y 300 pb	No corte	NA	No corte	No corte	2 Bandas 915 y 660 pb	<i>Thermomonospora</i>
MCR8	Banda 919 pb	No corte	NA	No corte	No corte	No corte	<i>Thermobifida</i>
MCR22	Banda 900 pb	No corte	NA	No corte	No corte	No corte	<i>Thermobifida</i>
MCR24	Banda 892 pb	No corte	NA	No corte	No corte	No corte	<i>Thermobifida</i>
MCR25	2 Bandas 919 y 544pb	Banda 1086 pb	No corte	NA	No corte	NA	<i>Actinoalloteichus</i> <i>Actinopolyspora</i> <i>Saccharopolyspora</i> <i>Thermocrispum</i>

Como controles para el análisis ARDRA se utilizaron ampliaciones de ADNr 16S de *Streptomyces coelicolor* y *Bacillus cereus* (Tabla 9). En el caso del *Streptomyces coelicolor* el patrón de corte con las diferentes enzimas de restricción clasifica esta cepa como perteneciente al género *Streptomyces* confirmando la validez de la identificación de este género por esta metodología. *Bacillus cereus* se utilizó como control en este estudio por ser una bacteria perteneciente al grupo de bacterias Gram positivas con bajo contenido de %G-C, lo cual lo hace relativamente distante al grupo de los actinomicetos (Chater & Hopwood, 1993). La amplificación del gen ARNr 16S de *B. cereus* se realizó igualmente con los primers F1 y R5, ya que estos primers son modificaciones de los primers universales para el dominio *Bacteria* diseñados por Weisburg *et al.* (1991). El

patrón de corte con las enzimas de restricción para *B. cereus* dio como resultado que no se presenta corte con la enzima *Sau3AI* y cortes diferentes en tamaño a las claves dicótomas con otras enzimas, por lo cual no se puede analizar con estas claves, y se confirma su uso preferiblemente para la identificación de géneros de actinomicetos.

Los resultados de la técnica de restricción enzimática, muestran que de los 30 actinomicetos aislados, 21 pertenecen al género *Streptomyces*, 1 pertenece al género *Microbispora*, 1 al género *Kitasatospora*, 4 al género *Thermobifida*, 1 al género *Thermomonospora*, y 2 aislamientos no se identifican completamente pero pueden ser pertenecientes a los géneros *Actinoalloteichus*, *Actinopolyspora*, *Saccharopolyspora* o *Thermocrispum*, 6.9% de los aislamientos (Tabla 9 y 10).

Para comparar los patrones de bandas obtenidos a partir de las restricciones sugeridas por Cook y Meyers, en sus claves dicótomas, se utilizaron secuencias de genes ADNr 16S obtenidas a partir del Gen Bank. La longitud de las secuencias utilizadas para los cortes se muestra en la Tabla 9 y se escogieron ya que estos géneros pertenecen cada uno a los tres grupos que se forman al realizar la digestión con la enzima *Sau3AI*. Los análisis de la restricción virtual se realizaron utilizando el programa CLC DNA Workbench 3.0.2 de acceso libre por Internet.

Tabla 9. Genes ARNr 16S de los microorganismos utilizados para la restricción virtual

Microorganismo	Número acceso en el Gen Bank	Secuencias (longitud en pares de bases)
<i>Kitasatospora</i> sp.	EU139032	Gen 16S ARN ribosomal (1374 bp)
<i>Thermobifida fusca</i>	AB006171	Gen 16S ARN ribosomal (1488 bp)
<i>Micromonospora</i> sp.	AY561829	Gen 16S ARN ribosomal (1475pb)

Los resultados de las restricciones virtuales para la secuencia de los géneros *Kitasatospora*, *Thermobifida* y *Micromonospora* se observan en la Tabla 10 y su mapa de restricción en el Anexo 5.

Comparando los resultados de las restricciones virtuales con las claves dicótomas se puede observar que para el género *Kitasatospora* el corte con la enzima *Sau3AI* generó bandas inferiores a 750 pb, por lo cual se clasificó en el grupo 1, no presenta corte con la enzima *AsnI* y se presentan cortes con las enzimas *KpnI* y *SphI* formando bandas de 453 y 921 pb, y 1001, 273 y 36 pb respectivamente. Las claves dicótomas reportan que el corte con la enzima *KpnI* debe generar bandas entre 1000 a 1100 pb y 410 a 470 pb y el corte con la enzima *SphI* bandas entre 1010 a 1350 pb y 170 a 260 pb. Los resultados de las

restricciones virtuales no coinciden en su totalidad con los resultados obtenidos ya que para la formulación de estas claves se utilizaron secuencias superiores a 1400 pb y la secuencia utilizada para la restricción virtual tiene una longitud de 1374 pb. Lo cual indica que para confirmar las claves dicótomas de estos autores con la restricción virtual de secuencias de ARNr 16S se necesita que estas secuencias sean superiores a 1400 pb.

Tabla 10. Resultados de las restricciones virtuales del gen ARNr 16S de secuencias obtenidas a partir del Gen Bank. NC: No corte, NA: No aplica

Género	<i>Sau3AI</i>	<i>AsnI</i>	<i>KpnI</i>	<i>SphI</i>	<i>HindIII</i>	<i>PstI</i>	<i>SnaBI</i>	<i>SalI</i>
<i>Kitasatospora</i> sp.	Bandas 7, 71, 572, 65,627, 45 pb	NC	Bandas 453, 921 pb	Bandas 1001, 273, 36 pb	NA	NA	NA	NA
<i>Thermobifida fusca</i>	Bandas 994, 320, 172 pb	NC	NC	NC	NC	NC	NA	NA
<i>Micromonospora</i> sp.	Bandas 7, 1260, 52, 156 pb	Bandas 554, 921 pb	NA	Bandas 916, 279, 838 pb	NA	NA	NC	Bandas 561, 914 pb

Los resultados de la restricción virtual de la secuencia de *Thermobifida fusca* muestran que el corte con la enzima *Sau3AI* genera bandas de 994, 320 y 172 pb, y que no presentan restricción con las enzimas *AsnI*, *KpnI*, *SphI*, *HindIII* y *PstI*. Las claves dicótomas reportan que para este género no se presenta restricción con ninguna de las enzimas mencionadas anteriormente y que para el corte con la enzima *Sau3AI* se deben generar bandas entre 980 a 780 pb y 350 a 300 pb. Comparando los resultados de la restricción virtual con las claves dicótomas no coinciden exactamente ya que la banda de más tamaño es de 994 pb y no de 980 pb como se esperaba. La razón por la cual se puede dar este resultado es que la secuencia de *Thermobifida fusca* (No. acceso en el Gen Bank [AB006171](#)) fue publicada en Septiembre del año 2007 y las claves dicótomas realizadas por Cook y Meyers son del año 2003.

Los resultados de la restricción virtual de la secuencia de *Micromonospora* sp muestran que el corte con la enzima *Sau3AI* genera bandas de 7, 1260, 52 y 156 pb, lo cual coincide con las claves dicótomas que clasifican a este género en el grupo 3 de corte con la enzima *Sau3AI* por presentar la banda más grande entre 980 y 1350 pb. El corte de la secuencia con la enzima *AsnI* genera dos bandas de 554 y 921 pb, con la enzima *SphI* tres bandas de 916, 279 y 838 pb, con la enzima *SalI* bandas de 914 y 561 pb, y con la

enzima *SnaBI* no presenta restricción. Estos resultados coinciden con las claves dicótomas que reportan bandas entre 960 a 900 pb y 590 a 470 pb para la enzima *AsnI*, bandas de 920 a 890 pb y 310 a 280 pb para la enzima *SphI*, bandas de 1040 a 900 pb y 560 a 540 pb para la enzima *SaII*, y no corte para la enzima *SnaBI* (Anexo 5).

La identificación a género se realizó para todos los aislamientos de actinomicetos por microscopía, bioquímicas y ARDRA, y solo para algunos de los aislamientos por secuenciación.

Los resultados de identificación de género de las cepas MCR1, MCR6, MCR11, MCR17, MCR18, MCR19, MCR20 y MCR23 (Tabla 11) utilizando solamente las características microscópicas y el análisis ARDRA coinciden en que pertenecen al género *Streptomyces* pues presentan micelio vegetativo ramificado no fragmentado y un micelio aéreo formando cadenas de conidias en espiral claramente visibles. En el caso de la identificación de género de la cepa MCR9 la microscopia, el análisis del ARDRA y las pruebas bioquímicas coinciden que pertenece al género *Streptomyces*.

Las cepas MCR5, MCR12, MCR13 y MCR31 se identificaron como pertenecientes al género *Streptomyces* (Tabla 11) solamente por el análisis ARDRA ya que no se realizó identificación bioquímica ni secuenciación del gen ARNr 16S y los resultados de la microscopía muestran un micelio vegetativo sin fragmentación, micelio aéreo fragmentado con producción de cadenas de conidias no formando espirales. Este tipo de microscopía no identifica completamente el género *Streptomyces*, sin embargo tampoco descarta que estas cepas pertenezcan a este género pues puede ocurrir que en el momento de la visualización microscópica las colonias de los montajes no estuviesen formando conidias o que las colonias no hubiesen tenido el tiempo necesario para diferenciar las cadenas de conidias producidas en forma de espiral. El género *Streptomyces* puede presentar una diferenciación de las cadenas de conidias que produce no solo espirales sino también cadenas de conidias con una disposición más lineal.

Las cepas MCR14, MCR26 y MCR30 se identifican como pertenecientes al género *Streptomyces* por los resultados obtenidos del análisis ARDRA y la identificación bioquímica. Las características microscópicas de estas cepas muestran la producción de un micelio vegetativo sin fragmentar, micelio aéreo fragmentado y producción de conidias de forma bacilar. Estas características microscópicas no descartan la posibilidad de que pertenezca al género *Streptomyces* por las mismas razones consideradas en el párrafo anterior.

La identificación de género para las cepas MCR7, MCR8 y MCR25 se realizó solo con las técnicas de microscopía y análisis ARDRA. Sin embargo solo se considera la identificación por el análisis ARDRA como géneros *Thermomonospora*, *Thermobifida* y *Saccharopolyspora* respectivamente. La microscopia muestra para el caso de la cepa MCR7 la formación de micelio vegetativo sin fragmentación, micelio aéreo fragmentado con conidias formando cadenas sin espirales, lo que no permite identificar microscópicamente al aislamiento pues las características microscópicas de este género deben mostrar la producción de esporas sencillas en el micelio aéreo, en algunos casos en el micelio de sustrato y fragmentación no visible de los dos micelios (Bergey & Hendricks, 1984).

La microscopia muestra para el caso de la cepa MCR8 micelio vegetativo sin fragmentación y micelio aéreo ligeramente fragmentado lo que no permite identificar microscópicamente al aislamiento debido a que las características microscópicas de este género son las mismas descritas para el género *Thermomonospora*, adicionalmente el género *Thermobifida* es relativamente nuevo y está formado por dos especies que antes eran clasificadas como *Thermomonospora*. La cepa MCR25 microscópicamente muestra micelio vegetativo sin fragmentar, micelio aéreo fragmentado y formación de conidias de forma bacilar lo que no permite identificar al aislamiento, pues las características microscópicas del género *Thermobifida* son diferentes (Bergey & Hendricks, 1984).

Tabla 11. Identificación a nivel de género de los diferentes aislamientos de Actinomicetos con las diferentes técnicas utilizadas N.R: No se realizó; NI: No es posible la identificación; CA; *Streptomyces coelicolor*

Cepa	Identificación Microscópica	ARDRA	Identificación Bioquímica	Análisis BLAST directo	Análisis BLAST delimitado (max % identidad)
MCR 1	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	N.R	N.R	N.R
MCR 2	<i>Streptomyces</i>	<i>Saccharopolyspora</i>	N.R	<i>Pseudomonas</i>	<i>Saccharopolyspora</i> (84%) <i>Streptomyces</i> (87%)
MCR 3	N.I	<i>Microbispora</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Serratia</i>	<i>Microbispora</i> (83%)
MCR 4	N.I	<i>Thermobifida</i>	N.R	<i>Pseudomonas</i>	<i>Thermobifida</i> (83%)
MCR 5	N.I	<i>Streptomyces</i>	N.R	N.R	N.R
MCR 6	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	N.R	N.R	N.R
MCR 7	N.I	<i>Thermomonospora</i>	N.R	N.R	N.R

Resultados

Cepa	Identificación Microscópica	ARDRA	Identificación Bioquímica	Análisis BLAST directo	Análisis BLAST delimitado (max % identidad)
MCR 8	N.I	<i>Thermobifida</i>	N.R	N.R	N.R
MCR 9	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	N.R	N.R
MCR 10	N.I	<i>Streptomyces</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i> (99%)
MCR 11	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	N.R	N.R	N.R
MCR 12	N.I	<i>Streptomyces</i>	N.R	N.R	N.R
MCR 13	N.I	<i>Streptomyces</i>	N.R	N.R	N.R
MCR 14	N.I	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	N.R	N.R
MCR 16	N.I	<i>Streptomyces</i>	<i>Nocardia</i>	N.R	N.R
MCR 17	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	N.R	N.R	N.R
MCR 18	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	N.R	N.R	N.R
MCR 19	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	N.R	N.R	N.R
MCR 20	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	N.R	N.R	N.R
MCR 21	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i> (96%)
MCR 22	<i>Streptomyces</i>	<i>Thermobifida</i>	N.R	N.R	N.R
MCR 23	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	N.R	N.R	N.R
MCR 24	N.I	<i>Thermobifida</i>	<i>Streptomyces</i>	N.R	N.R
MCR 25	N.I	<i>Saccharopolyspora</i>	N.R	N.R	N.R
MCR 26	N.I	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	N.R	N.R
MCR 27	N.I	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	No cultivable	<i>Streptomyces</i> (96%)
MCR 30	N.I	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	N.R	N.R
MCR 31	N.I	<i>Streptomyces</i>	N.R	N.R	N.R
MCR 32	N.I	<i>Kitasatospora</i>	<i>Nocardia</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>Nocardia</i> (85%) <i>Kitasatospora</i> (86%) <i>Streptomyces</i> (97%)
CA	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>S. coelicolor</i> (99%)

A la cepa MCR16 se le realizaron análisis microscópicos, ARDRA y bioquímicos los cuales no muestran una identificación clara de género ya que los resultados del análisis ARDRA la clasifican como *Streptomyces*, la identificación bioquímica como *Nocardia* y la microscopia no muestra características suficientes para identificar el género. Igualmente en el caso de la cepa MCR24 se realizaron los 3 análisis y los resultados clasifican a esta cepa como *Thermobifida* según el ARDRA, como *Streptomyces* según los resultados de las pruebas bioquímicas y sin resolver el género por la microscopia ya que esta no muestra características suficientes para ser clasificada. Las características microscópicas son micelio vegetativo sin fragmentar, micelio aéreo poco fragmentado y producción de conidias sencillas de forma redonda. Estas características microscópicas son más cercanas al género *Streptomyces* o *Nocardia* que al género *Thermobifida*.

Para poder determinar cual de los diferentes análisis de identificación presentó el resultado más preciso se alinearon las secuencias del gen ARNr 16S de la cepa MCR32 obtenidas a partir de los primers F1 y R5 con secuencias de este gen reportadas en el Gen Bank pertenecientes a los géneros *Kitasatospora*, *Nocardia* y *Streptomyces*. Los resultados de estos análisis muestran que las secuencias del gen ARNr 16S de la cepa MCR32 obtenidas a partir de los primers F1 y R5 tienen un porcentaje de identidad del 80 y 85% para el género *Nocardia*, del 86% y 89% para el género *Kitasatospora* y del 96 y 97% para el género *Streptomyces* respectivamente. Estos resultados muestran que la cepa MCR32 es posiblemente perteneciente al género *Streptomyces* basándose en el análisis BLAST de las secuencias obtenidas a partir de los primers F1 y R5 como la técnica más acertada para la identificación del género de esta cepa.

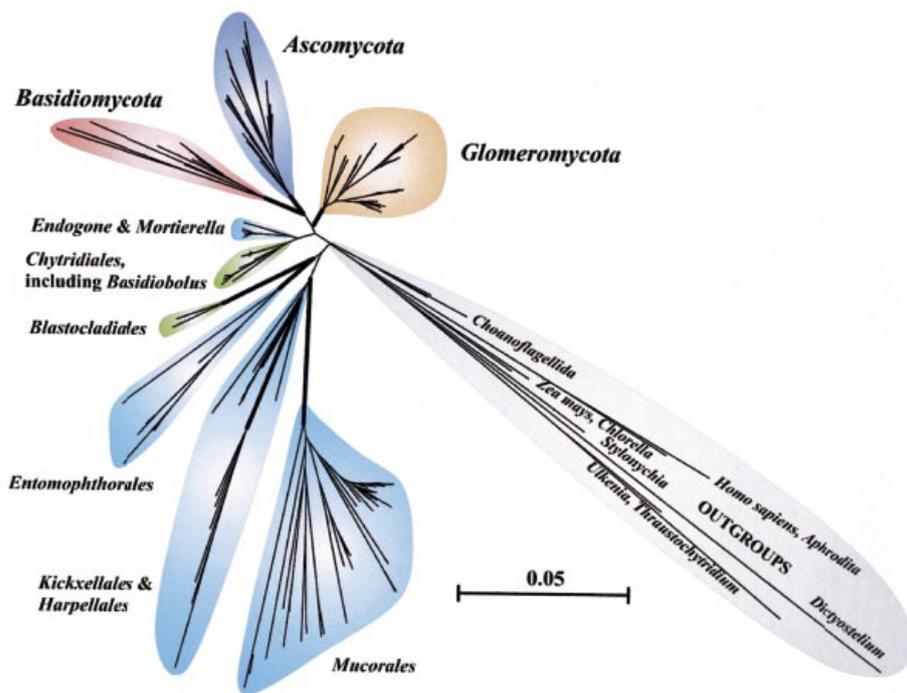
Una comparación detallada permite concluir que los resultados obtenidos son muy similares a los de varias especies de *Streptomyces*. Con la identificación preliminar de estas once especies de actinomicetos queda confirmada la predominancia de *Streptomyces* durante los screening en suelo rizosférico reportados por Zaitlin *et al.* (2004).

1.3. Aislamiento y caracterización de los hongos MA

1.3.1. Introducción

Los hongos formadores de micorriza arbuscular (MA) pertenecen al phylum Glomeromycota; este phylum fue creado hace unos años basándose en la secuencia de la subunidad pequeña del ARNr (Schüßler *et al.*, 2001a; Schüßler *et al.*, 2001b; Rosendahl,

2008). Incluye una sola clase, los Glomeromycetes y cuatro órdenes: Glomerales, Diversisporales, Paraglomales y Archaesporales (Figura 17). Un aspecto clave de esta nueva clasificación es que el género *Glomus*, antes clasificado en base a criterios morfológicos y estructurales, se ha escindido en tres grupos distintos: *Glomus* A, B y C. Los dos primeros están englobados en el orden Glomerales, mientras que *Glomus* C pertenece a los Diversisporales. Lo anterior permite intuir que bajo la aparente uniformidad de morfotipos de hongos micorrícicos se esconde una gran diversidad genética donde pueden quedar grupos aún por describir. Actualmente los Glomeromycota no presentan una afinidad a grupos filogenéticos en el Reino Hongos (James *et al.*, 2006). La interpretación de las homologías entre esporas de Glomeromycota y otras estructuras fúngicas es bastante compleja debido a que las esporas de Glomeromycota pueden representar diferentes características y estructuras morfológicas y funcionales (Rosendahl, 2008).



(a)

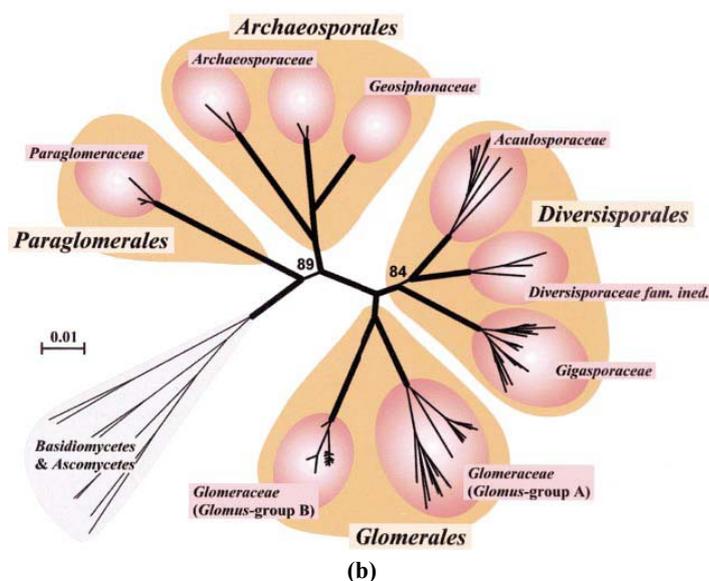


Figura 17 (a) Filogenia propuesta para los hongos formadores de micorrizas arbusculares basadas en las secuencias de la subunidad pequeña (SSU) del ARNr. (b) Estructura taxonómica propuesta del phylum Glomeromycota en base a las secuencias de la SSU del ARNr. Tomado de Schüßler *et al.* (2001b).

Con base en la morfología de las esporas, existen dos grupos: los géneros azigospóricos y los géneros que producen clamidosporas (González, 1996).

a) *Géneros azigospóricos:*

1. *Acaulospora*. El nombre proviene del Griego a (sin), caulos (tronco), y spora (espora), esto hace referencia a la formación de la espora sentada sobre la hifa (Sieverding & Toro 1988). *Acaulospora* fue descrita por Gerdemann & Nicolson en 1963 y revisado por Berch en 1985. Las esporas correspondientes a éste género son producidas individualmente en el suelo o en esporocarpos de varios centímetros de longitud, presentan formas globosas, subglobosas, elipsoides o ampliamente fusiformes, con contenido aceitoso. Nacen lateralmente de una hifa que sostiene un saco esporífero a donde es transferida la espora. La pared tiene dos grupos separables: una parte del grupo externo es parte de la hifa, la pared externa puede ser coloreada, laminada o compuesta de diferentes paredes, también puede ser ornamentada. El grupo interno tiene una pared que normalmente es membranosa, hialina, pueden ser laminadas, ornamentadas, tiñen de rosado, rojo

o púrpura con el reactivo Mezler (Sánchez de P., 1995). *Acaulospora mellea* fue descrita por Spain & Schenck en 1984. El color de las esporas va desde naranja pálido a café, con formas globosas, subglobosas y ocasionalmente irregulares. Su tamaño oscila entre 90 y 140 μm , con un promedio de 120 μm . Las estructuras subcelulares de las esporas, la pared, está conformada por tres láminas, la primera hialina, de forma rugosa; la segunda muy consistente de subcapas adherentes y superficie lisa, y la tercera, flexible de color amarillo pálido (INVAM 2008).

2. *Gigaspora*. Las esporas que forman parte de este género han sido llamadas Zigosporas (Nicolson & Gerdemann, 1968). La pared de las esporas de *Gigaspora* son continuas excepto por un poro ocluido. La espora nace de un suspensor bulboso unida a una estructura la cual generalmente tiene una delgada hifa que se extiende a la espora. No tiene fusión sexual y uno o más tubos germinales son producidos directamente a través de la pared de la espora cerca de la parte basal. Especies incluidas: *G. gigantes*, *G. margarita*, *G. candida*, *G. rusca* (Gerdemann & Trappe, 1974, citado por Schenck & Perez, 1990).

3. *Scutellospora*. Esporas producidas individualmente (o raramente en células corticales de la raíz) son largas y de forma variable, usualmente de forma globosa o subglobosa, ovoide, obovoide, piriforme o irregular, especialmente cuando se contrae durante su formación nacen de un suspensor bulboso unido a la célula como una hifa estrecha que se extiende en una o más proyecciones fijas unidas a esporas. La estructura de la pared de la espora es de dos tipos: con una o más membranas flexibles o con una pared cariácea en el interior de la espora. La germinación por medio de uno o más tubos germinativos forman cerca de la base de la espora un escudo de germinación, con una pared interna flexible, las células auxiliares nacen del suelo sobre una hifa. Etimología: *Scutellum* (pequeño escudo) *spora* (espora), haciendo referencia a la producción de un escudo de germinación en esporas miembros del género.

4. *Entrophospora*. La etimología corresponde al Griego *En* (dentro), *tropho* (que nutre o cría), *spora* (espora), haciendo referencia a la espora formada dentro de la hifa. Este género fue descrito por Ames & Schneider en 1979. Las esporas pertenecientes a este género son formadas dentro de una hifa que sostiene cerca un sáculo esporífero; la espora crece por flujo del contenido citoplasmático de dicho cuerpo hacia la misma, luego dilata la hifa y posteriormente, el sáculo

puede colapsarse y separarse de la espora (Sánchez de P., 1995). *Entrophospora colombiana* fue descrita por Spain & Schenck en 1984, presenta esporas de color salmón en estado inmaduro, y gradualmente toman una coloración blancuzca a hialina y su contenido es hidrolizado o desintegrado. Posee de tres a cuatro grupos de láminas conformando la pared esporal. Presentan formas subglobosas a ovoides, y su tamaño oscila entre 100-110 μm (INVAM 2008).

b) *Géneros clamidospóricos*

1. *Glomus*. La etimología corresponde al latín *Glomus* (bola de hielo), y hace referencia a la posible forma de un esporocarpo. *Glomus* fue descrito por Tulasne & Tulasne en 1845. Las especies de este género se encuentran en la mayoría de los hábitats de la naturaleza. Las clamidosporas nacen terminalmente en una hifa no diferenciada (raras veces dos o más), esporas no gametangiales en esporocarpos o individualmente en el suelo. El poro de la hifa conectada es cerrado por un septo o por el engrosamiento de la pared (Sánchez de P., 1995). El género posee un tamaño de esporas que oscila entre 60 y 260 μm , la mayoría de las especies presenta tres láminas, con características específicas para cada especie, al igual que su color, que está entre amarillo, beige, café y naranja (Sieverging & Toro 1988).

2. *Sclerocystis*. Posee clamidosporas ordenadas cara a cara en una sola capa elongada, radiada alrededor de un plexo central de la hifa. Etimología: *Sclero* (duro) *kystis* (vejiga) refiriéndose a un pequeño, duro y redondeado esporocarpo. *Sclerocystis* difiere de *Glomus* sólo en el ordenamiento de las esporas alrededor de plexo central. Esta diferencia es de cuestionable valor en la separación del género, además de que ésta puede llegar a ser un estado evolutivo en la morfología de los esporocarpos de *Glomus*.

1.3.2. Parte Experimental

1.3.2.1. Metodología

El aislamiento de los hongos MA se realizó mediante la técnica de tamizado húmedo y decantación (Walker *et al.*, 1982). Para la caracterización de las esporas extraídas de suelo, se siguió la metodología de Koske & Tessier (1983) y la de Morton (1990).

1.3.2.2. Resultados

Dentro de las 9 zonas muestreadas el mayor número de esporas extraídas del suelo lo presentó Pacho (Cundinamarca), mientras en Tunja y Maripi (los dos municipios pertenecientes al Departamento de Boyacá) presentaron menos esporas pero conservaron valores similares entre ellas (Figura 18).

Los géneros predominantes fueron caracterizados y se determinó que los géneros pertenecientes fueron: *Glomus* sp, *Entrophospora* sp, *Acaulospora* sp y *Sclerocystis* sp. (Figura 19).

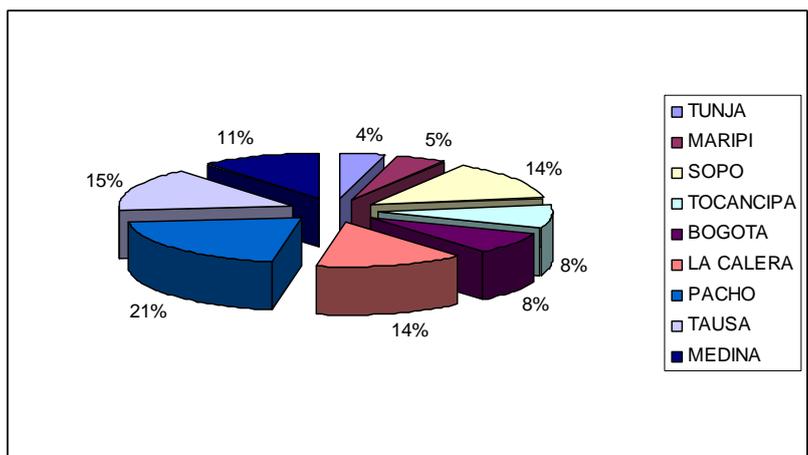


Figura 18. Porcentaje de esporas de hongos MA/100g de suelo en cada una de las regiones muestreadas de la zona Cundiboyacense.

En el municipio de Maripi se observó la presencia de hongos MA con presencia de hifas extramatriciales, las cuales en asociación con la planta, le permiten a estas aumentar en varios centímetros la longitud de su área de absorción y por tanto contribuyen a la explotación del suelo en la búsqueda de agua y nutrientes, dado que estos suelos presentan en su gran mayoría baja concentración de materia orgánica y se encuentran en proceso de desertificación. Se ha sugerido que las micorrizas pueden tener un comportamiento benéfico en los horizontes superficiales del suelo, principalmente en especies que desarrollan necromasa; favoreciendo los procesos de ciclado de nutrientes procedentes de la descomposición de la materia orgánica por microorganismos saprofitos,

lo cual estimula el crecimiento de las plantas (Bethlenfalvay & Schüepp, 1994; Barea *et al.*, 1995; Barea *et al.*, 2002).

En los municipios ubicados en el departamento de Boyacá se pudo observar una relación entre el tipo de suelo muestreado y el número de esporas/100 g de suelo, indicando que estos suelos presentan una baja concentración de hongos MA en relación con el departamento de Cundinamarca, donde zonas como en el municipio de Pacho se registró el mayor valor, este comportamiento tal vez se debe a la respuesta del hongo frente a condiciones ambientales que favorecen su propagación y desarrollo.

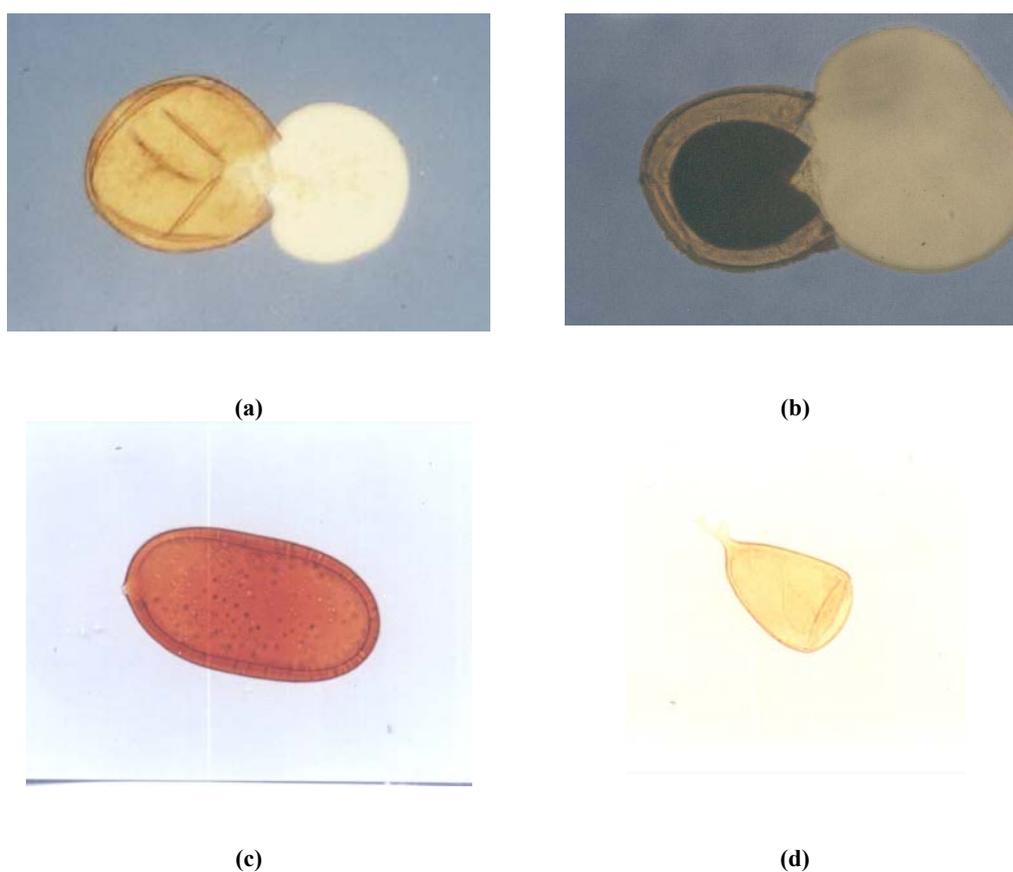


Figura 19. Esporas características de los hongos MA en Mezler. a) *E. colombiana* b) *Glomus* sp. c) *Sclerocystis* sp. d) *Acaulospora* sp.

La identificación se basó en las características morfológicas de las esporas, por tal razón se llegó a género únicamente.

Tabla 12. Caracterización de los géneros de hongos MA aislados.

Género	Micorrización	Esporas
<i>Glomus</i> sp	Presencia de arbusculos con ramificaciones cilíndricas. Presencia de vesículas de forma elipsoide y pared delgada	Terminales o intercalares. Capas de la pared continuas, delimitadas por un peridio hifal externo. Una sola pared, todas las capas se originan de la misma pared, capas variables entre 1 y 4, la capa mas externa se colorea de rosado pálido con reactivo de mezler. El tubo germinal se origina de una estructura de oclusion desde la capa más delgada de la hifa.
<i>Entrophospora</i> sp	Arbusculos similares a los de <i>Glomus</i> sp. Vesículas intraradicales polimórficas. Hifas intraradicales rectas y en espiral	Las esporas salen dentro de la hifa del sáculo esporífero. Dos capas de pared.
<i>Acaulospora</i> sp	Arbusculos similares a los de <i>Glomus</i> sp. Vesículas intraradicales polimórficas.	Esporas formadas en una hifa sustentora a partir de un sáculo esporífero. Salen lateralmente de la hifa del sáculo esporífero. La pared de la espora tiene 3 capas: una capa externa laminar frecuentemente pigmentada, una capa delgada de grosor variable, y una tercera. Las esporas germinan únicamente por la penetración directa del tubo germinal a través de la pared de la espora.
<i>Sclerocystis</i> sp	Formación de clamidosporas arregladas en una capa simple alrededor de un plexo de la espora libre. Forman clamidosporas blásticamente en el extremo de la hifa.	

La presencia de hongos MA indica la razón de cómo este tipo de asociación puede ser una de las estrategias de adaptación a las difíciles condiciones medioambientales presentes en los ecosistemas de bosque alto andino.

Capítulo 2: DETERMINACION *IN VITRO* DE CARACTERISTICAS PGPR DE LOS ACTINOMICETOS AISLADOS

En la literatura científica se han descrito actividades, propias de las PGPR, llevadas a cabo por actinomicetos. Entre otras, se ha observado la producción de sideróforos que secuestran el hierro necesario para el crecimiento de los patógenos (El-Tarabily, 2008), la producción de reguladores de crecimiento vegetal como el AIA (Zahir *et al.*, 2004) u otros reguladores hormonales y poliaminas (El-Tarabily *et al.*, 2003; Nassar *et al.*, 2003; Kurklinsky-Sobra *et al.*, 2004), o metabolitos antifúngicos (El-Tarabily, 2006). En este Capítulo se propone evaluar la capacidad de los actinomicetos objeto de estudio para llevar a cabo dichas actividades, junto con otras descritas para otras PGPR, tales como solubilización de P (Rodríguez & Fraga, 1999; El-Tarabily *et al.*, 2008; Barea *et al.*, 2008), fijación de N (Dobbelaere *et al.*, 2003, Valdés *et al.*, 2005) y la estimulación en la toma de hierro (Bertrand *et al.*, 2000; Mantelin & Touraine, 2004). La evaluación *in vitro* de dichas actividades que permitan catalogar a los actinomicetos en estudio como PGPR se exponen de forma sistematizada como se indica a continuación:

- 2.1. Evaluación de la capacidad solubilizadora de fósforo
- 2.2. Caracterización de los actinomicetos como fijadores libres de nitrógeno
- 2.3. Producción de ácido indol acético
- 2.4. Producción de sideróforos
- 2.5. Producción de quitinasas

2.1. Evaluación de la capacidad solubilizadora de fósforo

2.1.1. Introducción

Muchas bacterias y hongos son capaces de liberar ácidos orgánicos (oxálico, málico, succínico) procedentes de su metabolismo hidrocarbonato que solubilizan fosfatos insolubles y ponen a disposición de las plantas a dicho nutriente. Por lo tanto se considera, que la solubilización de distintas fuentes fosfatadas de origen inorgánico u orgánico por parte de los microorganismos del suelo es una alternativa fundamental en agricultura sostenible y preservación del medio ambiente (Alexander, 1980; Atlas, 2002; Barea *et al.*, 2007).

Krishna *et al.* (1982), describen la interacción entre una cepa de actinomicetos aislado de suelo, identificado como *Streptomyces cinnamomeous*, y hongos micorrízicos en la que se alude a efectos relacionados con la solubilización de P.

Existen diferentes métodos para seleccionar microorganismos del suelo solubilizadores de compuestos de fósforo insoluble, aunque se sabe que algunos microorganismos que solubilizan fósforo en condiciones de laboratorio no son capaces de hacerlo en el suelo, particularmente en los de pH alcalino. Este hecho podría explicarse por la baja secreción de ácidos orgánicos que producen los microorganismos en esos ambientes. Lo anterior es de considerar ya que sólo los ensayos de campo establecen si la capacidad solubilizadora de fósforo inorgánico de los organismos seleccionados *in vitro* realmente tiene efecto sobre plantas de interés comercial (Nautiyal, 1999).

2.1.2. Parte Experimental

2.1.2.1. Metodología

Evaluación cualitativa de la solubilización de fósforo *in vitro*. Para la determinación cualitativa de la actividad solubilizadora de fosfato fueron utilizados dos medios de cultivo que en su composición presentaban, además de sales, soluciones tampón y azúcar, fosfato tricálcico como fosfato inorgánico insoluble y un indicador de pH (púrpura de bromocresol) para evidenciar la producción de ácidos que se utilizarían en esta posible actividad (Picovskaya y SRS-1) (Anexo 1) (Atlas, 1995; El-Tarabily & Nassar, 2006).

Los distintos microorganismos se sembraron el mismo día por triplicado en los dos medios con el fin de brindar las mismas condiciones (incubación, almacenamiento y tiempo) a cada una de las cepas.

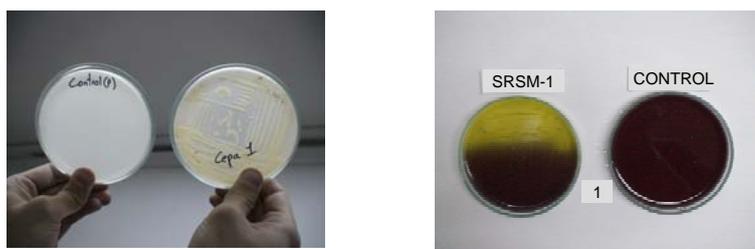
Cuantificación de la actividad fosfatasa: La cuantificación de la solubilización de fosfatos se llevó a cabo utilizando erlenmeyer (150 ml) que contenían 45 ml de medio Picovskaya (Anexo 1) en el caso de las cepas de actinomicetos y en Erlenmeyer de 250 ml se adicionaron 120 ml de medio de cultivo para el caso de *Azotobacter* sp (cepa de referencia, control positivo). En el caso de los actinomicetos se realizó una suspensión de conidios (10^6 conidios \cdot ml $^{-1}$) de cada una de las cepas en solución salina al 0.85% (p/v) (recuento en cámara de Neubauer), a partir de la cual se inocularon 4.5 ml correspondientes al 10% VET (volumen efectivo de trabajo) por erlenmeyer. En el caso de *Azotobacter* sp. se realizó una suspensión de células en solución salina al 0.85% (p/v) con una concentración de 10^6 células \cdot ml $^{-1}$; a partir de la cual se inocularon 12 ml correspondientes al 10% del VET por erlenmeyer.

Los cultivos con las cepas de actinomicetos fueron incubados a temperatura ambiente (15°C-18°C) a 100 rpm (Barnstead/Lab – line, MAXQ 3000), durante 8 días. Cada 24 horas se hizo un muestreo de 250 μ l del cultivo, al cual se le adicionó 321.5 μ l de *p*-nitrofenilfosfato al 0.08% (p/v) (Merck) preparado en tampón fosfato pH 7 (Anexo 2) como sustrato cromógeno. La reacción fue mantenida durante una hora a 35°C (Baño termostataado Elmasonic E30H). Se detuvo con 562.5 μ l de NaOH y se centrifugó a 8 000 rpm durante 10 min (Hettich, EBA 21). Finalmente se tomó el sobrenadante y se le midió la absorbancia a 450 nm (Thermo Cientific, Genesis Thermo) utilizando como blanco para la lectura el tampón fosfato. En el caso del cultivo de *Azotobacter* sp. la metodología utilizada para la incubación y muestreo fue la misma, pero el tiempo de incubación fue de 3 días y el muestreo fue realizado cada 4 horas según el procedimiento indicado anteriormente, por la tasa de crecimiento del microorganismo (Tabatai & Brenner, 1969). Los resultados obtenidos fueron comparados con la curva patrón obtenida a partir de diferentes concentraciones de *p*-nitrofenilfosfato (Merck).

Análisis Estadístico. Los resultados, que se expusieron mediante gráficas en barras, se compararon entre si, mediante el análisis realizado con la prueba del rango múltiple de Duncan para establecer la presencia o no de diferencias significativas entre las cepas de actinomicetos y el control.

2.1.2.2. Resultados y Discusión

Evaluación cualitativa de la solubilización de fósforo. En el medio Pikovskaya se observaron halos de solubilización en torno a la colonia; detectándose como una zona de “aclaramiento” (halo de solubilización) de fácil diferenciación con el medio de cultivo (Figura 20a). Por otra parte, el medio SRSM-1 hace notoria la producción de ácidos como mecanismo de solubilización gracias al viraje del indicador de pH, púrpura de bromocresol, y al halo de solubilización contiguo a la colonia (Figura 20b).



(a) (b)
Figura 20. Medios de cultivo que evidencian la solubilización de fosfato.
a) Medio Pikovskaya. b) Medio SRSM-1

Pasado el tiempo de incubación se observó que algunos actinomicetos provocaron un descenso del pH evidenciable en el medio SRSM-1 (Tabla 13). Este que es un hecho esperado gracias a la presencia de glucosa, ya que en su metabolización, a través de la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas, se producen moléculas de H^+ , además de piruvato y ATP (Gunnarsson *et al.*, 2004).

El comportamiento de las cepas en el medio Pikovskaya resultó ser un poco diferente al obtenido en el medio SRSM-1. El ponderado de cepas que presentaron actividad solubilizadora no fue tan alto como el presentado en SRSM-1, ya que solo 21 cepas presentaron halos de solubilización en torno a las colonias (Tabla 13). Nautiyal (1999) ensayó diferentes concentraciones de los sustratos presentes con el fin de optimizar este medio de cultivo para bacterias aisladas de suelo alcalino; encontrando que algunos nutrientes presentan una alta relevancia para la solubilización (Glucosa y $Ca_3(PO_4)_2$) y otros no tanto (extracto de levadura, $(NH_4)_2SO_4$), lo que llevaría a pensar que posiblemente puedan variar las demandas de nutrientes para cada uno de los microorganismos que se estudiaron.

Tabla 13. Detección de actividad solubilizadora de fosfatos en medios SRSM-1 y Pikovskaya

<i>Cepa</i>	Solubilización	Acidificación	<i>Cepa</i>	Solubilización	Acidificación
	Pikovskaya	SRSM-1		Pikovskaya	SRSM-1
<u>MCR1</u>	+	+	<u>MCR18</u>	-	+
<u>MCR2</u>	+	+	<u>MCR19</u>	-	+
<u>MCR3</u>	+	+	<u>MCR20</u>	-	+
<u>MCR4</u>	+	+	<u>MCR21</u>	+	+
<u>MCR5</u>	+	+	<u>MCR22</u>	+	+
<u>MCR6</u>	-	-	<u>MCR23</u>	+	+
<u>MCR7</u>	+	+	<u>MCR24</u>	+	+
<u>MCR8</u>	+	+	<u>MCR25</u>	+	+
<u>MCR9</u>	-	+	<u>MCR26</u>	-	+
<u>MCR10</u>	+	+	<u>MCR27</u>	+	+
<u>MCR11</u>	+	+	<u>MCR28</u>	+	+
<u>MCR12</u>	+	+	<u>MCR29</u>	-	+
<u>MCR13</u>	-	+	<u>MCR30</u>	-	+
<u>MCR14</u>	-	+	<u>MCR31</u>	+	+
<u>MCR16</u>	-	+	<u>MCR32</u>	+	+
<u>MCR17</u>	+	+	<u>MCR33</u>	+	+
31 cepas produjeron acidificación en SRSM-1 (96,88%)					
21 cepas generaron halos de solubilización en Pikovskaya (65,63%)					
1 cepa no generó halos de solubilización ni acidificación en ninguno de los dos medios (3,12%)					

Existe un único aislado que no presentó ni solubilización ni acidificación: la cepa MCR6. Hipotéticamente puede tratarse de un microorganismo que posiblemente posee un sistema diferente de solubilización de fosfato o que simplemente se trata de un microorganismo que se centra en la liberación del fósforo necesario para su supervivencia. Esta misma cepa no generó hidrogeniones en el medio que ocasionaran un descenso de pH; su crecimiento se logra posiblemente por trazas de elementos que fueron arrastradas al momento de la siembra.

Por otra parte, las cepas MCR1, MCR2, MCR3, MCR4, MCR6, MCR7, MCR8, MCR10, MCR11, MCR12, MCR17, MCR21, MCR22, MCR23, MCR24, MCR25, MCR27, MCR28, MCR31, MCR32 y MCR33 (66% del total de actinomicetos aislados) tuvieron actividad en los dos medios (Figura 21), y demostraron que la formación de ácido puede ser el mecanismo utilizado para lograr la solubilización del fósforo, pues el ácido actúa como agente quelante para el calcio, aumentando la disponibilidad del fósforo; todo esto ocurre en rangos de pH que se encuentran dentro de la neutralidad (Nautiyal, 1999; Sylvia, 2005).

Por último, las cepas MCR9, MCR13, MCR14, MCR16, MCR18, MCR19, MCR20, MCR26, MCR29 y MCR30 (31% del total), fueron las que produjeron ácido, pero no lograron solubilización; esto puede deberse al tipo de fosfato que se está utilizando, pues no todos los microorganismos tienen la capacidad de solubilizar el fósforo desde fuentes inorgánicas (Nautiyal, 1999).

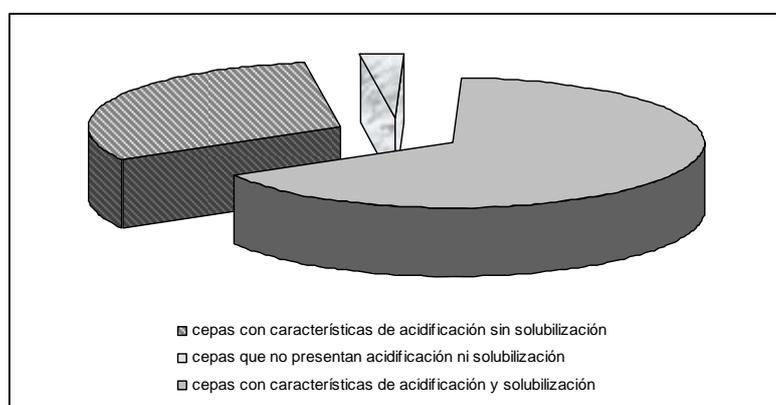


Figura 21. Cantidad de cepas que presentaron solubilización por presunta acción de ácidos orgánicos (63%), por acción enzimática (34%) o no presentan (3%).

Autores como Dick *et al.* (2000) y Ohtani *et al.* (2005), mencionan mecanismos adicionales de solubilización de fósforo y Chen *et al.* (2006) concluyen que aunque la producción de ácidos orgánicos quelantes es el factor más estudiado de solubilización de fósforo, no es el único responsable de esta labor, por esta razón se ensayaron los dos mecanismos: producción de ácidos y enzimáticos.

Cuantificación de la actividad de las fosfatasas. Entre las cepas evaluadas se encontraron diferencias significativas y solapamientos entre los grupos formados.

Los grupos formados según las diferencias estadísticas son:

G1: Cepa control

G2: MCR1 y MCR2

G3: MCR5, MCR7, MCR12, MCR16, MCR27 y MCR30

G4: MCR19

G5: MCR4, MCR8, MCR9, MCR22, MCR23, MCR25, MCR26

G6: MCR11, MCR24 y MCR31

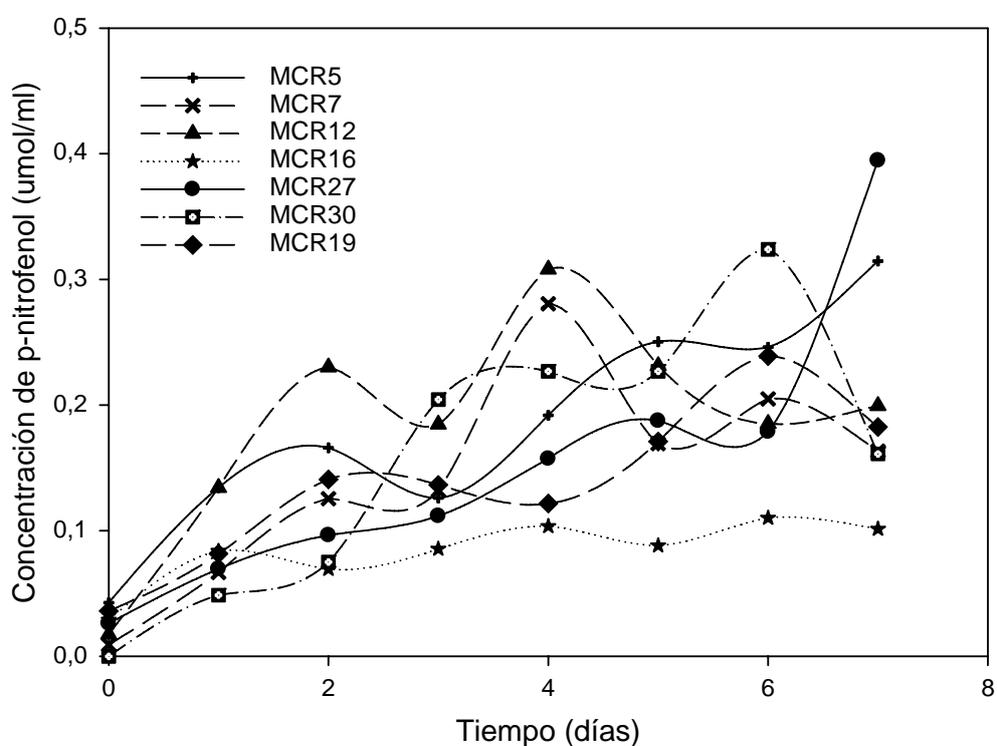


Figura 22. Cepas de actinomicetos que expresan fosfatasas en altas concentraciones (G3 y G4)

En cuanto a la producción se observa claramente que de los aislamientos que producen mayor concentración de enzima fosfatasa fue la cepa MCR27, seguida de MCR5 agrupados en el G2 y G3, y los actinomicetos que presentaban una producción más estable fueron los agrupados en el G5. Los que presentaron baja producción se encuentran agrupados en el G6.

Claramente se puede concluir (sin tener en cuenta los solapamientos) que existen diferencias significativas entre la cepa 0 (que es el control), las (MCR1 – MCR2), (MCR12 – MCR5 – MCR27 – MCR30 – MCR20 – MCR7), (MCR19), (MCR22 – MCR8 – MCR23 – MCR26 – MCR4 – MCR25 – MCR9), (MCR18 – MCR3 – MCR6 – MCR16) y finalmente (MCR31 – MCR11 – MCR24 – MCR21 – MCR10).

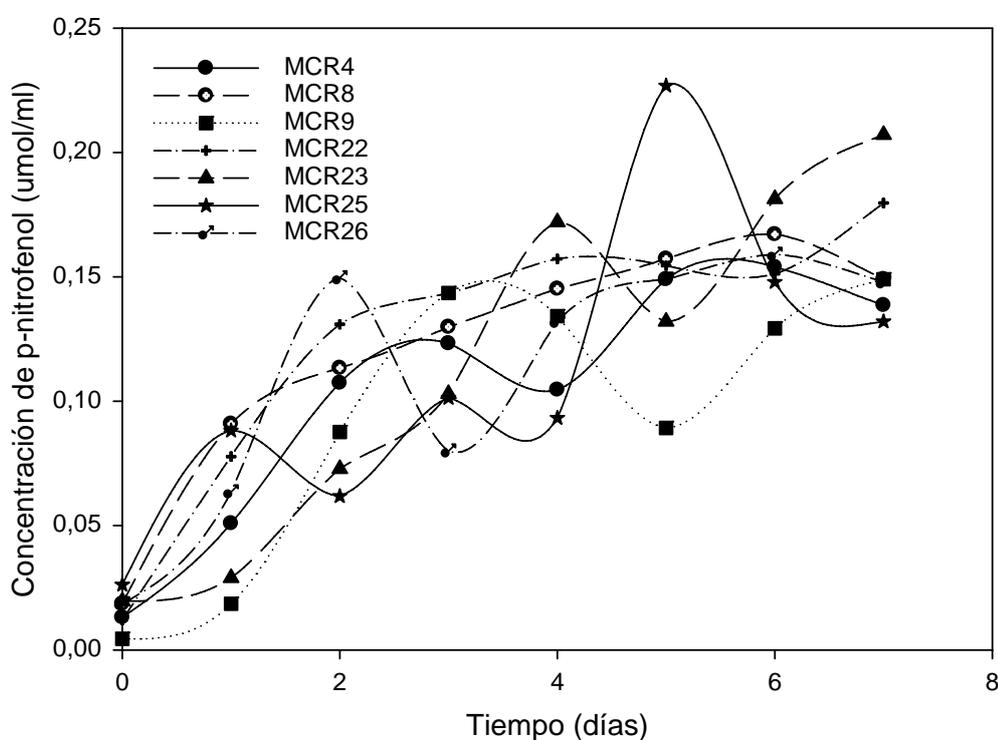


Figura 23. Cepas de actinomicetos que expresan fosfatasa en una concentración media.

Entre los grupos formados se encuentran las diferencias significativas, y dentro de cada uno de los grupos no existen diferencias significativas.

Los análisis estadísticos evidencian una actividad solubilizadora de fosfato inferior por las cepas de actinomicetos que por *Azotobacter* sp. (control) (Anexo 6). También se encontró que no existe diferencia significativa entre las actividades de las cepas MCR9 y MCR26 (cepas utilizadas posteriormente en ensayos en maceta), lo cual permite asumir que tienen una actividad solubilizadora de fosfato similar, mientras que la cepa MCR24 presenta una actividad significativamente inferior a la de éstas (Figura 24). Adicionalmente, se observa que existen diferencias significativas entre la actividad solubilizadora en los diferentes tiempos del muestreo, encontrando que el día 7 reflejó el mayor nivel de actividad fosfatasa para la cepa MCR9, mientras que las cepas MCR24 y MCR26 lo evidenciaron al sexto día, demostrando una actividad solubilizadora más rápida que la de la cepa MCR9. Lo anterior sucede porque los aislamientos presentan diferentes tasas de crecimiento y cuando están en la fase exponencial es cuando se requiere un mayor consumo de nutrientes esenciales.

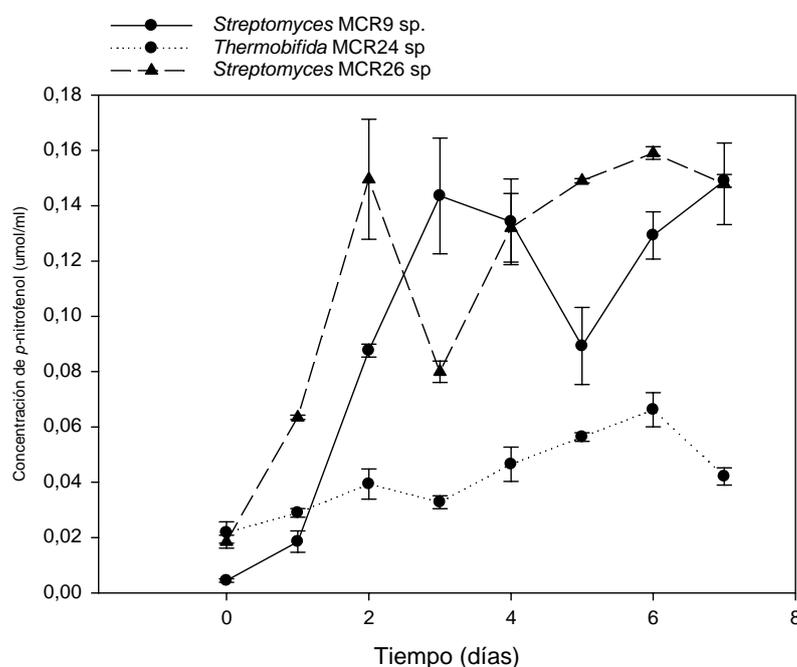


Figura 24. Solubilización de fosfato por parte de las 3 cepas de actinomicetos ensayados *in planta* a través de los tiempos de muestreo (cada día), expresado en cantidades de *p*-nitrofenolfosfato

Si se observa el comportamiento a lo largo del tiempo de la actividad de la enzima fosfatasa, se aprecian diferencias entre cada punto de muestreo. Se visualiza claramente el aumento del *p*-nitrofenolfosfato desde el día 0 hasta el día final 7 en forma creciente, para todos los ensayos realizados, demostrando una actividad constante y creciente, siendo más lenta que el control, por la diferencia de tasas de crecimiento que tienen estos dos grupos bacterianos: bacterias filamentosas y bacterias no filamentosas.

Las gráficas del comportamiento se pueden observar en el Anexo 7 al igual que el análisis estadístico realizado.

Un método alternativo, utilizado por diferentes microorganismos es la producción de fosfatasas con el fin de aumentar la disponibilidad del nutriente. Existe una afirmación planteada por Dick *et al.* (2000) y Ohtani *et al.* (2005), donde mencionan que la actividad de un grupo enzimático puede estar ligado al pH presente en el medio; es por esto que solamente las fosfatasas ácidas tienen acción en medios ácidos, con presencia de materia orgánica, y las fosfatasas alcalinas presentan actividad en medios neutros o alcalinos. Si se tiene en cuenta el comportamiento regular de las demás cepas y la acidificación del medio evidenciada en el viraje del indicador de pH (SRSM-1, pH inicial 7,2), se podría sugerir que esta afirmación confirma de alguna manera el hecho de que la cepa MCR6 podría poseer una fosfatasa ácida en su equipo enzimático que no pudo ser expresada a razón del medio donde se desarrolló y que las cepas evaluadas presentaron solubilización por ácidos y baja por fosfatasas. Esto también está relacionado con el origen del fosfato, donde el inorgánico es solubilizado comúnmente por la producción de ácidos orgánicos.

2.2. Caracterización de los actinomicetos como fijadores libres de nitrógeno

2.2.1. Introducción

Algunos actinomicetos rizosféricos han sido definidos por su habilidad para formar simbiosis con las raíces de ciertas plantas, generar nódulos y fijar N₂, como es el caso de *Frankia*. Ésta simbiosis ayuda a la planta a obtener su propio nitrógeno. Consecuentemente, las plantas y sus simbiosis se han difundido en una variedad notable de lugares, incluyendo suelos tropicales secos, lugares templados, bosques húmedos, las dunas, chaparrales, pantanos, la tundra, la zona subártica y hasta el glacial, observando

por medio del estudio del ARNr 16S la presencia del género *Frankia* (Clawson *et al.*, 1998).

Un estudio del año 2005 (Valdés *et al.*, 2005) mostró que cepas aisladas en suelo Mexicano (Irapuato y Veracruz) presentaron actividad como bacterias filamentosas fijadoras de nitrógeno. La morfología encontrada evidenció filamentos y de alguna manera similitud con ciertas especies de *Frankia* sp. Análisis posteriores de la secuencia del ARNr 16S, anularon dicha especulación. Las colonias presentaron una coloración amarillenta en agar DGM y pigmentación naranja en agar ISP2. La investigación concluyó que las cepas obtenidas en el “screening” presentan en su ADN la codificación de los genes *nifH*, precursores de la nitrogenasa (Valdés *et al.*, 2005). No se conoce ningún otro estudio de actinomicetos-no *Frankia*, diferente a *Streptomyces* o *Micromonospora* como fijadores libres de nitrógeno atmosférico.

2.2.2. Parte experimental

2.2.2.1. Metodología

Crecimiento en medios libres de nitrógeno. Las técnicas desarrolladas con esta finalidad buscan un aislamiento totalmente puro del microorganismo donde se tenga la certeza que el crecimiento presentado en los medios no sufriera interferencia alguna por trazas de nitrógeno presentes en los pases. Por este procedimiento, a medida que se practicaba un sub-cultivo permitía tomar determinaciones acerca de las cepas que debían seguir en evaluación. Los parámetros establecidos para tales lecturas fueron:

- Medio sólido (Ashby): Crecimiento de colonias definidas y puras
- Medio semisólido (Nfb y Nfb + agar purificado): Crecimiento, profundidad y extensión en el tubo.

Este tipo de evaluación permitió presumir sobre las posibles fuentes de nitrógeno alternativo que pueden ser tomadas por los microorganismos, ya que al no tenerlo presente en el medio deben buscar la manera de poder obtenerlo, posiblemente porque las bacterias en estudio, en este caso actinomicetos, posean actividad nitrogenasa que les permite captar el nitrógeno atmosférico (Gauthier *et al.*, 1981; Clawson *et al.*, 1998; Clawson *et al.*, 1999; Tjepkema *et al.*, 2002; Valdés *et al.*, 2005).

Ashby es un medio que en su composición no presenta fuente de nitrógeno, pero si está dotado de un elemento fundamental para la formación de las dos proteínas del complejo nitrogenasa: el hierro (Atlas, 2002; Gage, 2004; Valdés *et al.*, 2005). Posteriormente fue utilizado el medio Nfb (también libre de nitrógeno) que es de consistencia semisólida y permite ver el crecimiento en longitud y extensión sobre el tubo, hacia zonas de microaerofilia, ambiente necesario para la actividad de la nitrogenasa.

Al iniciar la técnica se realizó un pase directo desde el medio Avena al Ashby. De este mismo medio se realizó un nuevo pase a otro medio Ashby con lo que se pretendía evitar interferencia de nitrógeno proveniente del medio inicial.

Una vez seleccionadas las cepas, se procedió a evaluar el crecimiento en medio mineral líquido sin fuente de nitrógeno. Esta evaluación se realizó para determinar la fase de crecimiento exponencial en el microorganismo.

Análisis de la reducción del acetileno (ARA). Se realizó la preparación del inóculo a una concentración de 10^6 células·ml⁻¹.

a) Crecimiento en Medio libre de Nitrógeno (Nfb). Los actinomicetos se sembraron por triplicado en medio semisólido Nfb (pH 6.8). Los viales se incubaron durante 10 días a una temperatura de 22 °C.

b) Cromatografía de Gases. Se realizó según la metodología descrita en el numeral 5.2.3.1. del Capítulo General de Materiales y Métodos.

Las variables experimentales del ensayo fueron:

- Crecimiento en Ashby: 22°C por 7 días
- Concentración de inóculo: 10^6 conidios·ml⁻¹
- Crecimiento en medio semisólido Nfb: 22°C por 10 días
- Acetileno: 0.2%
- Hora de incubación en acetileno: 0, 2 y 5
- Condiciones de lectura en el cromatógrafo: Temperatura de horno: 150°C, velocidad de flujo: 25 ml·min⁻¹, temperatura del inyector: 100°C, temperatura del detector: 250°C, presión: 25 psi.

Detección de los genes *nifH*. Se realizó según la metodología descrita de forma detallada en el Capítulo General de Materiales y Métodos, numeral 5.2.4.

2.2.2.2. Resultados y discusión

Crecimiento en medios libres de nitrógeno. Las cepas MCR1, MCR5, MCR6, MCR13, MCR17, MCR18, MCR19 y MCR20 no superaron las pruebas de selección, pues su crecimiento fue nulo en el pase de Ashby a Ashby, luego de 15 días de incubación. Estas cepas no presentaron actividad alguna en ausencia de N mientras que mostraron crecimiento en el primer medio Ashby gracias a trazas de nutrientes provenientes del medio Avena (Tabla 14).



Figura 25. Cepas MCR9 y MCR14 evaluadas en medio NFB modificado

Las cepas restantes fueron evaluadas en medio Nfb tras un nuevo periodo de incubación de 15 días. Los parámetros de evaluación, mencionados anteriormente, mostraron que las cepas MCR2, MCR4, MCR7, MCR8, MCR11, MCR12, MCR22, MCR23, MCR25 y MCR33 no crecieron y fueron descartadas para el siguiente paso. Este consistía en hacer un pase desde el primer medio Nfb a un nuevo medio Nfb; aquí las 12 cepas restantes tuvieron el mismo comportamiento que en el medio anterior y fueron evaluadas en medio Nfb solidificado con agar purificado (Figura 25). Por tanto, las cepas MCR3, MCR9, MCR10, MCR14, MCR21, MCR24, MCR26, MCR27, MCR30 y MCR31 pueden considerarse como microorganismos capaces de crecer en medio libre de nitrógeno (Tabla 14).

Existen evidencias de que los organismos diazotrofos son capaces de realizar la fijación biológica de nitrógeno en un rango de pH más o menos amplio. Por esta razón,

aunque el pH del medio Nfb llegase a la neutralidad, el metabolismo de la fuente de carbono a partir de su hidrólisis generará productos que ocasionarán cambios en el pH, alterando su valor e interfiriendo en la fijación de nitrógeno, lo que no permitirá la alcalinización del medio y por ende su viraje a azul, comportamiento evidenciado por la mayoría de los aislamientos de actinomicetos (Figura 25).

Tabla 14. Secuencia de evaluación en el proceso de selección de cepas con capacidad de crecer en medios carentes de nitrógeno. Las filas que presentan un signo + hasta la última columna fueron las cepas que evidenciaron crecimiento en los medios hasta la evaluación final.

-	<i>Medios de Cultivo</i>				
	<i>Ashby</i>	<i>Ashby → Sabih</i>	<i>Ashby → NFB</i>	<i>NFB → NFB</i>	<i>NFB → NFB modificado</i>
<i>MCR1</i>	+	+			
<i>MCR2</i>	+	+	+		
<i>MCR3</i>	+	+	+	+	+
<i>MCR4</i>	+	+	+		
<i>MCR5</i>	+	+			
<i>MCR6</i>	+	+			
<i>MCR7</i>	+	+	+		
<i>MCR8</i>	+	+	+		
<i>MCR9</i>	+	+	+	+	+
<i>MCR10</i>	+	+	+	+	+
<i>MCR11</i>	+	+	+		
<i>MCR12</i>	+	+	+		
<i>MCR13</i>	+	+			
<i>MCR14</i>	+	+	+	+	+
<i>MCR16</i>	+	+	+	+	
<i>MCR17</i>	+	+			
<i>MCR18</i>	+	+			
<i>MCR19</i>	+	+			
<i>MCR20</i>	+	+			
<i>MCR21</i>	+	+	+	+	+
<i>MCR22</i>	+	+	+		
<i>MCR23</i>	+	+	+		
<i>MCR24</i>	+	+	+	+	+
<i>MCR25</i>	+	+	+		
<i>MCR26</i>	+	+	+	+	+
<i>MCR27</i>	+	+	+	+	+
<i>MCR30</i>	+	+	+	+	+

	<i>Medios de Cultivo</i>				
	<i>Ashby</i>	<i>Ashby</i> → <i>Sabih</i>	<i>Ashby</i> → <i>NFB</i>	<i>NFB</i> → <i>NFB</i>	<i>NFB</i> → <i>NFB</i> <i>modificado</i>
-					
<u>MCR31</u>	+	+	+	+	+
<u>MCR32</u>	+	+	+	+	
<u>MCR33</u>	+	+	+		

Microscópicamente, *Frankia* sp. es una bacteria filamentosas que presenta como rasgo sobresaliente vesículas especializadas en la fijación de nitrógeno que se encargan de la protección del complejo nitrogenasa. Este actinomiceto ha sido reportado ampliamente por diversos autores (Clawson, 1999; Tjepkema *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2007), al presentar características de fijación que ya han sido confirmadas por el método de reducción de acetileno (Grove, 1987; Gage, 2004; Valdés *et al.*, 2005). Las morfologías de los actinomicetos estudiados en este trabajo en medio Nfb (segundo pase) no mostraron similitud alguna con este actinomiceto, ya que las cepas investigadas mostraron diferentes descripciones microscópicas entre las que se encontraron filamentos largos, cortos, tortuosos o en espiral, lo que puede llegar a ser una evidencia sobre nuevas especies con capacidad de crecer en medio libre de nitrógeno.

Para la realización de las curvas de crecimiento de cada uno de los 10 morfotipos en medio mineral sin fuente de nitrógeno, se tomó como parámetro de referencia el aumento de biomasa visto en valores de biomasa seca (g) y número de conidios (conidios·ml⁻¹), con el fin de encontrar la fase exponencial de los actinomicetos y realizar el análisis de la reducción del acetileno.

De acuerdo con los resultados de las curvas de crecimiento en medio mineral para cada morfotipo (Figura 26), la fase exponencial de los 10 aislamientos se encontró alrededor de los días 9 y 12 escogiéndose el día 10 como el más apropiado para realizar el ARA, ya que para este tiempo el metabolismo microbiano de estas cepas, en medio mineral mínimo, está en su máxima actividad lo que indica tasas de fijación más certeras.

El valor del tiempo promedio de la fase exponencial es un indicador del crecimiento microbiano en relación con el metabolismo, ya que en esta fase la asimilación de nutrientes como carbono y nitrógeno se hace imprescindible, los cuales harán parte integral de la biomasa celular. Cuando alguno de estos macronutrientes se encuentra en bajas concentraciones, el microorganismo como respuesta a este estrés provoca cambios

enzimáticos y metabólicos, acelerándose su crecimiento, lo que le permite generar en algunas ocasiones mayor biomasa y obtener, mediante diferentes mecanismos, las fuentes nutricionales, como por ejemplo, mediante la fijación biológica de nitrógeno (Rodríguez *et al.*, 2005), cuando las condiciones medioambientales son las apropiadas para el correcto funcionamiento de la enzima nitrogenasa (Martínez-Romero, 2006).

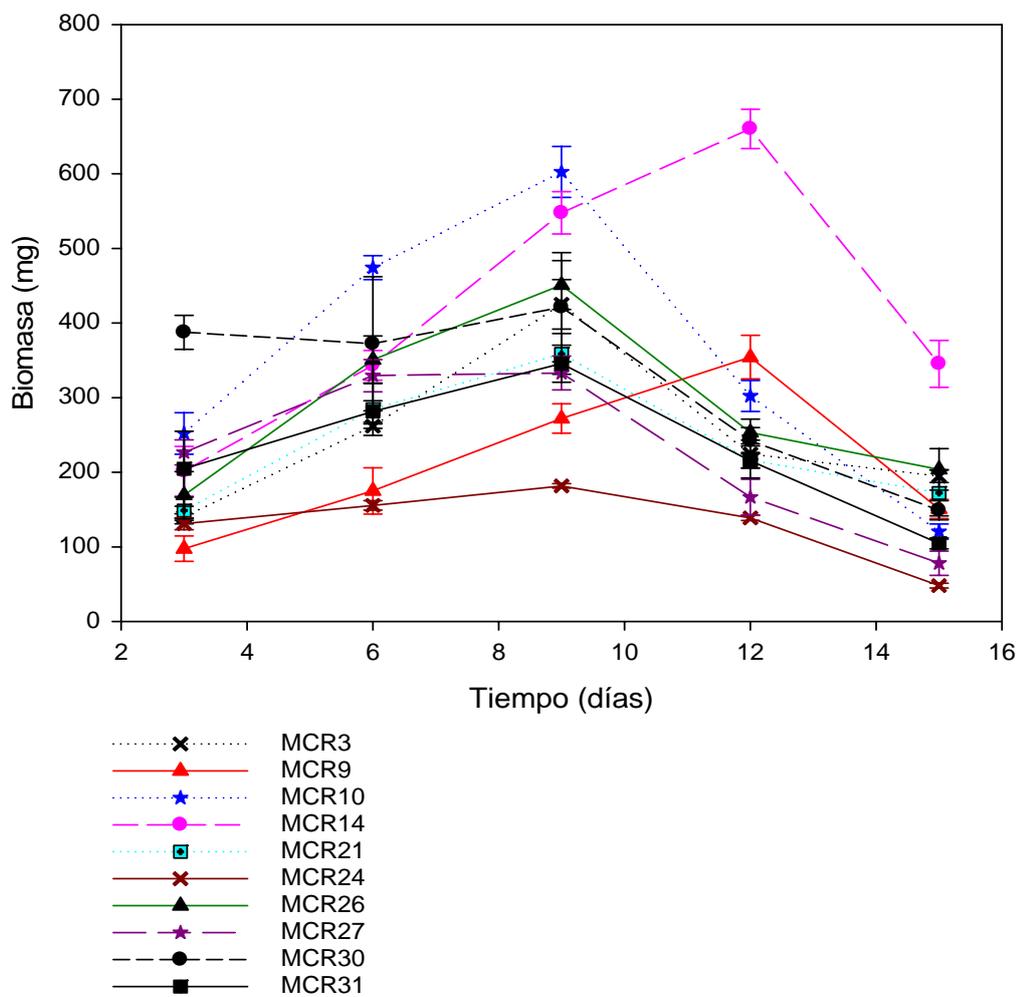


Figura 26. Curvas de crecimiento en medio mineral líquido sin fuente de nitrógeno

Por lo general, tanto para el aislamiento como para el crecimiento de microorganismos con características especiales, se recurre al empleo de medios de cultivo selectivos que favorecen el desarrollo microbiano e inhiben cualquier tipo de microbiota acompañante. Para el ARA, el medio semisólido Nfb es el más utilizado. Este medio tiene la característica de delimitar la microbiota acompañante y permitir el enriquecimiento selectivo de microorganismos diazótrofos, basándose en la capacidad de tomar el nitrógeno molecular como única fuente de nitrógeno bajo condiciones de microaerofilia (Hartman & Bardani, 2006), además de la presencia de algunos elementos menores como el molibdeno, hierro y azufre, participantes en el funcionamiento de la enzima nitrogenasa. El crecimiento microbiano se puede evidenciar por la formación de una película capaz de ocasionar el viraje de color del azul de bromotimol, desde verde a azul como signo de alcalinización por la utilización del ácido málico y su transformación en malato.

De las 10 cepas evaluadas, MCR14, MCR27 y MCR31 presentaron viraje en el indicador de pH del medio Nfb, hecho que no ocurrió en el resto de los aislamientos. En los viales donde se observó el viraje de color se esperaron altas tasas de fijación de nitrógeno, lo cual fue comprobado en el ARA. De los Santos *et al.* (2001) describen un comportamiento similar donde el medio semisólido inoculado con la bacteria *Burkholderia* no presentó cambio de pH en todos los viales, sin embargo en algunos el crecimiento del microorganismo ligeramente elevó el pH visualizándose un color azul verdoso en el medio, lo que confirma la necesidad de realizar el ARA para garantizar la característica diazotrófica de los microorganismos.

En el medio semisólido Nfb, el crecimiento de los actinomicetos se presentó en forma de una película blanca delgada ubicada a unos cuantos milímetros debajo de la superficie del agar. Gracias a su consistencia, el medio Nfb le permitió a los microorganismos desplazarse a través de él hasta encontrar el sitio óptimo donde la tasa de respiración se encuentra en equilibrio con la tasa de difusión del oxígeno (Gryndler & Hrselova, 1998).

La alcalinización observada en los viales con medio Nfb de los aislados MCR14, MCR27 y MCR31, donde se presentó el viraje de color del indicador de pH Azul de Bromotimol, desde verde a azul, es atribuida a la actividad metabólica de la película. La utilización del ácido málico y su transformación en malato (Mantilla, 2008) permite que este pueda ser oxidado en el ciclo de Krebs por vía aeróbica. Se asume que la

alcalinización se deba a la pérdida de hidrogeniones los cuales son captados por el oxígeno en el medio Nfb (Rodríguez *et al.*, 2005).

En relación al pH, la actividad del sistema nitrogenasa tiene una función importante en su regulación, ya que al exportar amonio, evita la acidificación letal del espacio peribacteroideo, contrarrestando la acción de la bomba de protones con actividad ATPasa (H^+ ATPasa) en la membrana peribacteroidea (Rodríguez *et al.*, 2005).

Análisis de la Reducción del acetileno (ARA). La fijación de nitrógeno se puede medir *in vitro* mediante el ARA, ya que partiendo de la fase exponencial en un medio sin fuente de nitrógeno el microorganismo a evaluar tiene la necesidad de asimilar cualquier compuesto que actúe como fuente inicial de nitrógeno, induciendo el crecimiento bacteriano y la fijación de nitrógeno en presencia de baja concentración de oxígeno (Roâzcycki *et al.*, 1999).

El ARA se basa en determinar la actividad de la enzima nitrogenasa que cataliza la reducción de acetileno a etileno y de forma indirecta, medir la presencia de esta enzima que tiene la función biológica de reducir el nitrógeno (N_2) a amonio (Aranibar *et al.*, 2003). En este ensayo, gracias a la inespecificidad de la enzima nitrogenasa, es posible catalizar la reducción de análogos estéricos del N_2 como el acetileno que será reducido a etileno, actuando como una medida indirecta de la capacidad fijadora de un microorganismo (Park *et al.*, 2005).

Partiendo de colonias aisladas de cada uno de las diez cepas sembradas en agar Ahsby, se determinó la concentración inicial de conidios a inocular mediante recuento en cámara de Neubauer, al igual que el tiempo óptimo de crecimiento de los actinomicetos, con base en los datos de la fase exponencial obtenida en el medio mineral. Respecto a la concentración de acetileno adecuada para reemplazar la atmósfera gaseosa y las condiciones de lectura apropiadas para establecer directamente la producción de etileno, se siguió la metodología mencionada por Mantilla (2008).

Con el fin de observar el comportamiento de las cepas de actinomicetos durante el ARA se presenta la Figura 27, donde se observa que la hora 0 resultó ser el tiempo de incubación que presentó una mayor concentración de μ moles de etileno. Se empleó como control positivo el aislamiento B28c correspondiente a la bacteria *Bacillus megaterium* citada por Mantilla (2008). Como control negativo se utilizaron viales con medio Nfb sin inocular y viales sin medio de cultivo.

Como se puede observar en la Figura 27 el tiempo 0 resultó ser la hora de incubación donde se mostró mayor concentración de etileno. El hecho de presentarse altos valores en el tiempo 0, es decir, inmediatamente después de haber inyectado el acetileno, contrarresta los resultados obtenidos por Aranibar *et al.* (2003) que al emplear el tiempo 0 se observó una disminución en la cantidad de etileno con respecto a los demás tiempos evaluados, donde la actividad nitrogenasa fue en aumento.

Las μ moles de etileno para la hora 2 disminuyeron notablemente en todos los aislados excepto en MCR24. Para la hora 5 también se evidenció una disminución del etileno, probablemente debido a estrés por abundancia de acetileno lo que conllevaría a la inhibición por sustrato de la enzima nitrogenasa. Welsh *et al.* (2000) atribuye este comportamiento al hecho de que probablemente el etileno pudo ser consumido por los mismos actinomicetos evidenciándose su reducción en μ moles de etileno producidos.

Otra posible razón para justificar esa disminución de μ moles de etileno a la hora 5 en comparación con las horas 0 y 2 de incubación, podría ser el agotamiento de la fuente de carbono presente en el medio Nfb indispensable para que se pueda llevar a cabo indirectamente la fijación de nitrógeno (Marin *et al.*, 1998). Rodríguez *et al.* (2005) mencionan que el proceso de fijación biológica del nitrógeno depende del aporte de sustrato energético, donde la fuente carbonada presente en el medio de cultivo influye en la capacidad fijadora de los aislamientos, inferida a través de la reducción del acetileno.

Si bien el ácido málico resultó ser la fuente de carbono del medio Nfb utilizada por los actinomicetos, su asimilación fue diferente entre los aislados evaluados. Esto puede explicarse por el rendimiento de ATP obtenido por cada molécula de carbohidrato utilizada, por lo que un mayor rendimiento favorece tanto el crecimiento como la actividad nitrogenasa de los diazótrofos estudiados (Saito & Minamisawa., 2006).

En la Figura 27 se puede apreciar que los aislados MCR24, MCR26 y MCR31, destacan por sus elevadas tasas de producción de etileno en los 3 tiempos de incubación, sin presentar una diferencia estadísticamente significativa. Como se había mencionado anteriormente, durante el crecimiento en medio semisólido Nfb, MCR31 fue uno de los aislados que evidenció viraje en el indicador de pH, azul de bromotimol, presumiendo que la alcalinización del medio arrojaría altos valores de μ moles de etileno, siendo efectivamente la que más actividad nitrogenasa manifestó.

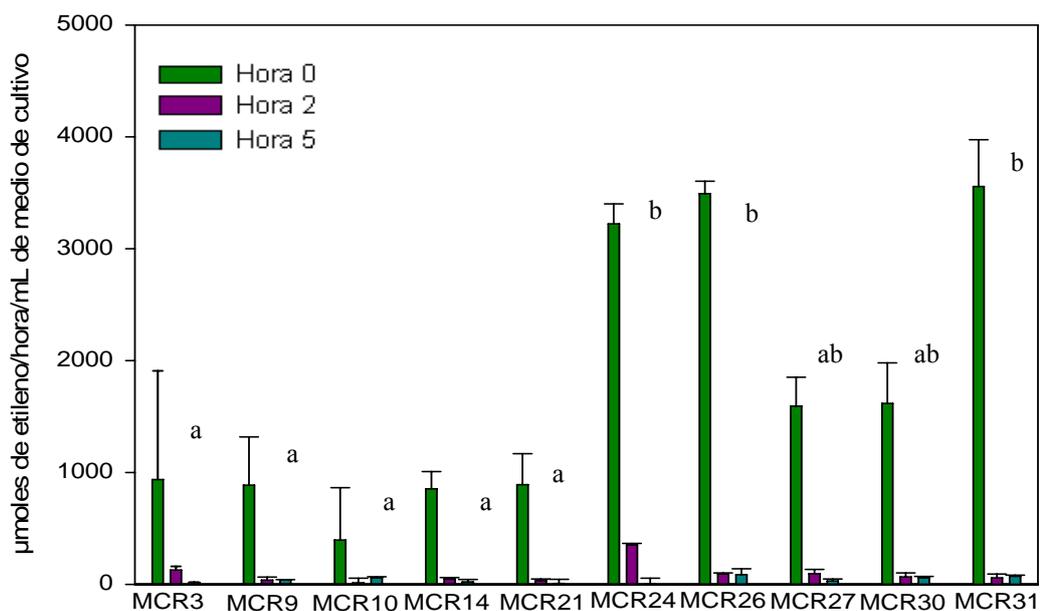


Figura 27. Tasas de fijación de nitrógeno de los actinomicetos diazótrofos

En relación con el control positivo, *Bacillus megaterium*, se encontró que la producción de etileno fue muy baja en las horas de incubación evaluadas con los aislamientos de actinomicetos (por lo cual no se colocó en la figura: 3.20 µmoles de etileno/hora/ml de medio de cultivo), presentando diferencias significativas con respecto a todos los actinomicetos evaluados. Son de destacar las altas tasas de fijación *in vitro* de los actinomicetos en comparación con el control positivo.

Los actinomicetos son microorganismos heterótrofos, requieren de fuentes de carbono para obtener la energía necesaria que demanda la fijación del nitrógeno. Por esta razón cada una de las bacterias difieren en el metabolismo del carbono y en su capacidad intrínseca en cuanto a la fijación del nitrógeno, mostrando diferentes tasas de reducción del acetileno. Así se observa una elevada actividad nitrogenasa en los aislamientos MCR24, MCR26 y MCR31, sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre ellos, pero si las presentan con el resto de los aislados diazótrofos. Es de destacar la

importancia del hallazgo de actividad nitrogenasa en actinomicetos diazótrofos de vida libre, evidenciada por medio del ARA, siendo una de las primeras referencias para cepas como *Thermobifida* sp. La alta diversidad que se presenta en los suelos del bosque alto andino de la zona cundiboyacense colombiana, se ve reflejada en la capacidad de fijación de nitrógeno reportada por los aislados.

Como se observa en la Figura 27, las tasas de fijación de nitrógeno de las bacterias diazótropas aerobias son altas con respecto al control positivo (*Bacillus megaterium*) referido por Mantilla (2008) como una de las cepas colombianas que tenían alta fijación de nitrógeno atmosférico. Es importante resaltar que aunque no se tienen referencias de literatura para la zona cundiboyacense colombiana, en los cuales se haya evaluado la actividad nitrogenasa de actinomicetos diazótrofos, sí es válido comparar la capacidad para fijar nitrógeno de estos aislamientos *per se* con lo descrito por otros autores como Mantilla (2008), quien evaluó la capacidad fijadora de nitrógeno de diferentes aislamientos de bacterias diazótropas del Amazonas colombiano, encontrando tasas de fijación entre 200–8000 nmoles de etileno/h/ml de medio de cultivo. Así mismo, Aranibar *et al.* (2003) evaluaron la capacidad fijadora de nitrógeno entre aislamientos de cianobacterias provenientes de suelos áridos y semiáridos encontrando tasas de fijación entre 88–535 nmoles de etileno/h. Igualmente, Park *et al.* (2005) encontraron fijación de nitrógeno en bacterias aisladas de la rizosfera de plantas de sésamo, maíz, avena, soya, lechuga, pimienta y arroz, con tasas de fijación entre 19–280.94 nmoles de etileno/h/mg de proteína.

Detección de los genes *nifH*. El gen *nifH*, el cual codifica para la enzima nitrogenasa, se ha convertido en el marcador molecular más empleado para la detección de microorganismos fijadores de nitrógeno evolucionando a la par con los genes ARNr 16S, empleándose también como marcador molecular a nivel de estudios de filogenia (Hamelin *et al.*, 2002).

La técnica de la PCR anidada ha sido descrita como una herramienta muy útil para verificar la presencia del gen *nifH* en microorganismos fijadores de nitrógeno. Consiste en dos pasos: en el primero se produce tanto el amplificado del gen de interés como amplificados inespecíficos; el segundo paso se lleva a cabo usando uno de los primers previos y otro interno lo que resulta en productos de PCR más específicos (Diallo *et al.*, 2004).

Como resultado del protocolo descrito por Bürgmann *et al.* (2004) se esperaba obtener un fragmento de aproximadamente 371 pb, sin embargo no se logró la amplificación del gen *nifH* en ninguno de los aislamientos. De acuerdo a Marusina *et al.* (2001), la razón por la cual resulta problemática la amplificación del gen *nifH* se debe principalmente a los primers ya que debido a la amplia diversidad filogenética, genes tan conservados como el *nifH* pueden variar considerablemente. El diseño de primers universales para el gen *nifH* requiere de secuencias de ADN altamente degeneradas lo que conlleva a una reducción en la especificidad durante la amplificación de la PCR. Por esto la mayoría de los primers han sido diseñados para amplificar el gen *nifH* de grupos taxonómicos individuales de procariotas o para un microorganismo en particular.

Como consecuencia de este resultado se decidió ensayar los primers propuestos por Diallo *et al.* (2004), “primers” muy similares a los que utilizó Valdés *et al.* (2005) para cepas de actinomicetos-no *Frankia* sp. en la amplificación del gen *nifH*. Mediante este protocolo fue posible la amplificación del gen en todos los aislamientos.

En la Figura 28 se puede visualizar una banda correspondiente al fragmento del gen con un tamaño esperado de 320 pb. Estos amplificados fueron purificados por medio del Minielute PCR Purification Kit de QiaGEN para luego ser enviados a secuenciación. Las bandas observadas presentan un tamaño muy similar a lo descrito por Valdés *et al.*, (2005) para el gen *nifH*. También se puede visualizar “background”. Soares *et al.* (2006) en su estudio le atribuye la presencia de “background” o “smearing” al empleo de primers degenerados como PolR y PolF durante la PCR anidada.

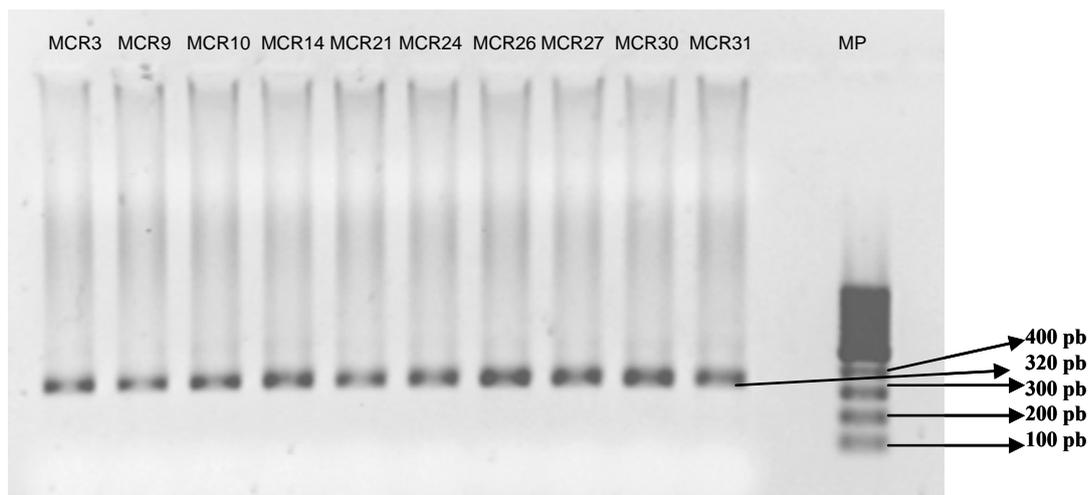


Figura 28. Amplificación por PCR de un fragmento interno del gen *nifH* de 320pb, en los 10 aislamientos de actinomicetos diazótrofos. MP (100 pb Invitrogen).

Es de destacar que los resultados de Valdés *et al.* (2005) son uno de los primeros estudios en el cual se detecta mediante el uso de primers degenerados la presencia del gen *nifH* en actinomicetos de vida libre, diferentes a *Frankia*, aislados en la raíz de *Casuarina equisetifolia*.

Al igual que el gen *nifH* puede actuar como marcador molecular, existen otros genes del complejo nitrogenasa capaces de indicar tal actividad en microorganismos fijadores. Como señala Fedorov *et al.* (2008) en un estudio sobre un nuevo sistema de primers para detectar y amplificar la porción del gen *nifDK*, se está considerando la posibilidad de emplear el gen estructural *nifD* como marcador molecular.

Cabe mencionar que aunque en la actualidad se conocen muy pocos primers diseñados para su amplificación, el gen *nifD* es menos conservado que el gen *nifH* lo que conlleva a la selección de oligonucleótidos degenerados para su detección y amplificación acarreado ciertas dificultades durante el proceso (Fedorov *et al.*, 2008).

Los avances en el desarrollo de nuevos sistemas de “primers” dirigidos a diferentes sitios del operón *nif* pueden ser usados eficientemente en la búsqueda de actinobacterias fijadoras de nitrógeno, a las cuales la actividad nitrogenasa no ha sido detectada. Sin embargo la presencia del gen *nifH* por si mismo no indica una fijación de nitrógeno activa ya que la enzima nitrogenasa se encuentra regulada a nivel pre y postranscripcional (Ueda *et al.*, 1995), además su funcionamiento es dependiente de las condiciones

medioambientales siendo la presencia del ARNm del *nifH* un indicador más adecuado de la actividad del complejo nitrogenasa (Burgmann *et al.*, 2004).

El alto grado de degeneración de las secuencias de nucleótidos del gen *nifH* proporciona la existencia de sitios invariantes (Marusina *et al.*, 2001). Esto explica la repetida presencia del nucleótido N en las secuencias del gen *nifH* disminuyendo su especificidad

Se realizó la búsqueda BLAST por medio de GenBank para encontrar las secuencias del gen *nifH* más cercanamente relacionadas con las obtenidas en este estudio. Se encontró que eran muy similares a las descritas para *Frankia* sp., con un porcentaje de similitud entre el 96% y 98%, según los números de acceso arrojados por el GenBank, para algunas de las cepas (MCR 3 y MCR24). Las otras cepas presentaron los alineamientos del gen *nifH* con similitudes en los genes encontrados en bacterias fijadoras como *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, entre otras, indicando que posiblemente los fragmentos de PCR efectivamente corresponden al gen *nifH*. Es comprensible que dentro de las secuencias anotadas, en la gran mayoría de las cepas, no exista, quienes compartan similitudes con algún actinomiceto diazótrofo, ya que prácticamente la única representante fijadora de nitrógeno es *Frankia* pero vía simbiosis actinorrízica.

Streptomyces thermoautotrophicus UBT1 fija nitrógeno atmosférico y crece en medios libres de nitrógeno, pero no reduce el acetileno; este tipo de reducción del nitrógeno es inusual y parece estar acoplada a la reducción de monóxido de carbono y es dependiente del oxígeno (Ribbe *et al.*, 1997), este tipo de microorganismos no se encuentran asociados a plantas ni presentan otras características en suelos de importancia agronómica. En contraste, la fijación de nitrógeno atmosférico por parte de los actinomicetos investigados en el presente estudio puede influir en el crecimiento vegetal, pues se confirmó la actividad nitrogenasa al analizar la capacidad de reducir acetileno a etileno y la presencia de genes *nifH* por amplificación con PCR (Gauthier *et al.*, 1981; Valdés *et al.*, 2005).

2.3. Producción de ácido indol acético

2.3.1. Introducción

Entre los mecanismos por los cuales las rizobacterias pueden manifestar su acción promotora del crecimiento de las plantas, destaca la producción de reguladores de crecimiento vegetal (Ahmad *et al.*, 2005).

Las auxinas son uno de tales reguladores (fitohormonas). El nombre auxina significa en griego "crecer" y es dado a un grupo de compuestos que estimulan la elongación de tallos y raíces. Es un grupo de hormonas muy importantes pues tienen la capacidad de inducir la diferenciación de filamentos vasculares de las plantas, en las cuales el flujo de auxinas es esencial para dar inicio a la formación de tejidos finos vasculares. Por otra parte, estudios realizados en coníferas y angiospermas, han demostrado que la síntesis de este tipo de hormonas puede afectar la mayoría de aspectos en el crecimiento secundario de las mismas, incluyendo la división celular, el grosor de la pared celular y el tamaño final de las células del xilema (Uggla *et al.*, 1996). La microbiota rizosférica también juega un papel importante mediante la producción endógena de un conjunto de hormonas vegetales, entre los que se encuentra la auxina: ácido indol acético (AIA) (Patten & Glick, 2002).

2.3.2. Parte experimental

2.3.2.1. Metodología

La producción del AIA se detectó por reacciones colorimétricas utilizando el reactivo de Van Urk Salkowsky, específico para la detección de compuestos derivados del indol, como se describe en el Capítulo General de Materiales y Métodos (Numeral 5.3)

2.3.2.2. Resultados y Discusión

La producción de auxinas como el AIA por parte de las cepas seleccionadas, fue cuantificada con el reactivo de Salkowsky, basándose en una curva de calibración (Anexo 9) que se elaboró a partir de patrones de AIA (Sigma) diluidos en agua destilada en concentraciones conocidas. Con los datos de absorbancia en función de la concentración se hizo una regresión lineal para determinar la ecuación de la recta: $y=0.0212x+0.0333$,

con un valor de $r^2=0.9929$. Se consideró una dispersión adecuada de los valores sobre la recta, por lo tanto se empleó dicha ecuación como el patrón de referencia para el cálculo de las concentraciones de AIA producidas por las cepas evaluadas.

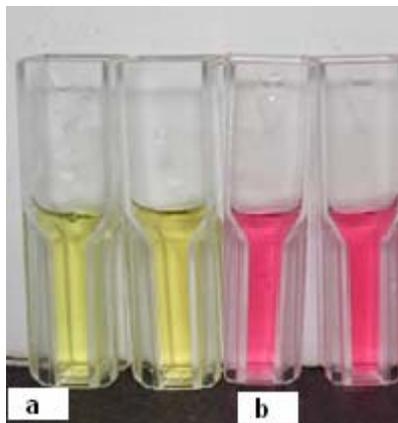


Figura 29. Reacción colorimétrica de Salkowski, (a) negativo, (b) positivo

Dado que el AIA es sintetizado a partir de diversas vías metabólicas que dependen o no del triptófano (Salkowski, 1889; Bric *et al.*, 1991) es lógico que la presencia de indol en el medio es directamente proporcional a la intensidad del color rojo que se produce (Figura 29). Los resultados de la producción de AIA por las cepas de actinomicetos seleccionadas, en comparación y de la cepa control positivo (*Azotobacter vinelandii* ATCC 12518) se muestran en la Figura 30. En el ensayo colorimétrico utilizado se evidenció, en algunos casos, un cambio en la coloración, esto es consecuencia de una reacción oxidativa a partir del ácido sulfúrico donde por medio de una transaminación se sustituye un grupo amino por el cloro que proviene del cloruro férrico (Bric *et al.*, 1991; Ahmad *et al.*, 2005).

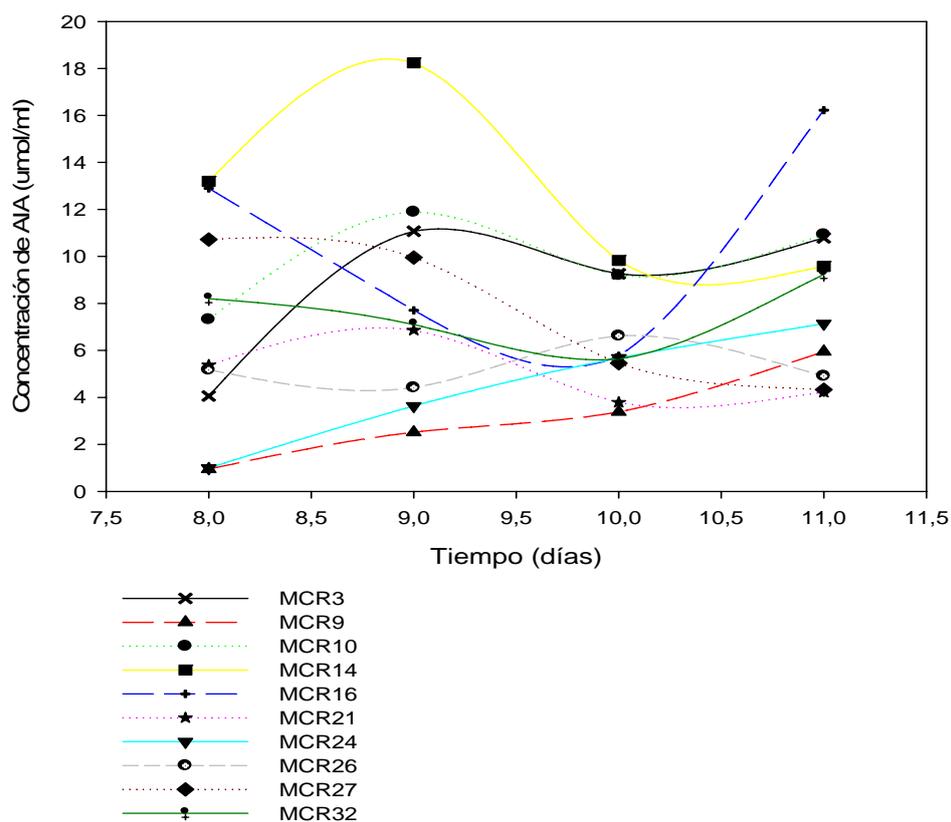


Figura 30. Producción de AIA (Reacción de Salkowsky) por las cepas de actinomicetos seleccionadas

Con base en lo anterior, se observó que las cepas, durante el periodo estudiado, tuvieron una producción mínima de AIA respecto al control (Anexo 9), cuyo comportamiento concuerda con los estudios de Celis y Gallardo (2007). Para efectuar el análisis estadístico, no se tuvo en cuenta el dato del control positivo (*Azotobacter vinelandii*) para hacer las agrupaciones por comparación de medias (Figura 30). Los datos corroboran la capacidad de actinomicetos del género *Streptomyces* como posibles productores de AIA (Müller & Raymond, 1984; Müller *et al.*, 1984).

Se realizó un análisis de varianza, cuya variable fue "AIA". A continuación se presenta la hipótesis planteada para las pruebas realizadas:

$H_0 : \beta = 0$ Donde β corresponde a la variable de interés.

$H_1 : \beta \neq 0$

Teniendo en cuenta la variable AIA, el análisis de varianza permitió ver si las variables Cepa y Día influían representativamente en los resultados (Anexo 9).

De acuerdo a los resultados, fue evidente que ambas variables eran representativas en el estudio, sobre todo la referente a Cepa, es decir que ésta explicó el comportamiento y las diferencias en las mediciones de AIA. Lo anterior se dedujo teniendo en cuenta el p-valor (<0.0001) el cual sirvió para verificar la hipótesis alterna al compararlo con un valor límite de 0.05.

La hipótesis consistió en probar si la variable Cepa y la variable Día eran representativas en el modelo, para que de esta manera se explicara el comportamiento de los datos. Para la variable Cepa el p-valor fue menor a 0.0001, es decir que en este caso se rechazó la hipótesis nula (H_0), la cual hacía referencia a que no había diferencias representativas entre las cepas, lo que se interpretó como que no es significativa en el modelo. Por tanto, como se rechazó, era significativa. Para la variable DIA el p-valor fue de 0.0344 (menor a 0.05), por lo tanto la variable fue significativa por lo mencionado anteriormente.

Para determinar las diferencias entre las variables, se compararon las medias utilizando dos pruebas para tener mayor exactitud en los resultados, la prueba de Duncan y la prueba LDS de Fisher, ambas agrupaban los promedios de AIA medidos respecto a las Cepas o los Días. Las dos pruebas arrojaron los mismos datos, por tal motivo se reportaron los correspondientes a Duncan (Anexo 9).

Se evidenció tras la prueba que la cepa MCR14 fue significativamente diferente a las otras cepas evaluadas en cuanto a la producción de AIA. Con relación a los promedios evaluados de la variable Día, se observó que tras el paso del tiempo hubo producción de AIA. Se hizo una comparación de los resultados que se obtuvieron frente a las cepas evaluadas en cada uno de los cuatro días de interés (Anexo 9).

La variable réplica (Rep) no es importante dentro del estudio ya que frente a las hipótesis planteadas, la hipótesis nula se acepta, puesto que el p-valor de la variable auxinas fue mayor de 0.05. Sin embargo éste análisis permitió eliminar la variable del modelo y confirmar que a nivel de réplica el estudio funcionó.

Se realizó la consolidación de los resultados arrojados del análisis por días para la variable AIA (Tabla 15) con el fin de identificar día a día cuáles cepas tenían comportamientos similares y cuales cepas tenían comportamientos diferentes. Así mismo se pudo evidenciar la producción de los metabolitos secundarios.

Tabla 15. Análisis de producción de AIA por días de las cepas evaluadas (resultados a partir de las pruebas de Duncan y LSD)

ACIDO INDOL ACETICO													
DIA 8				DIA 9			DIA 10			DIA 11			
Agrupamiento	Media	Cepa		Agrupamiento	Media	Cepa	Agrupamiento	Media	Cepa	Agrupamiento	Media	Cepa	
A	13.193	14		A	18.241	14	A	9.828	14	A	16.228	16	
A	12.895	16		B	11.888	10	A	9.262	3	B	10.929	10	
A	10.725	27		B	11.071	3	A	9.199	10	B	10.788	3	
B	7.313	10		B	9.954	27	B	6.621	26	C	B	9.577	14
C	B	5.379	21	C	7.706	16	B	5.772	16	C	D	7.140	24
C	B	5.175	26	C	6.857	21	B	5.677	24	D	D	5.945	9
C	D	4.058	3	D	4.420	26	B	5.457	27	E	D	4.907	26
C	D	E	2.517	30	E	D	3.634	24	C	E	D	4.325	27
	D	E	2.281	32	E	D	2.517	9	C	E	D	4.215	21
	E		0.992	24	E	D	2.486	32	D	C		2.536	32
	E		0.945	9	E		1.841	30	D		E	2.360	30

De acuerdo a las determinaciones realizadas, los mayores niveles en la producción de AIA se obtuvieron con la cepa MCR14 (*Streptomyces* sp) excepto en el día 11, los niveles más bajos se presentaron en la cepa MCR30 (*Streptomyces* sp) excepto el día 8, cuya producción fue superior a los demás días. Se presume que las concentraciones obtenidas en algunas cepas pueden ser suficientes para tener una influencia directa en fitoestimulación, si se tiene en cuenta que los reguladores de crecimiento vegetal actúan en pequeñas concentraciones para esta función.

La habilidad de producir hormonas de crecimiento por parte de microorganismos está ampliamente citada por varios autores. Así, hongos micorrícicos, *Pseudomonas* sp., *Azospirillum brasilense*, *Azotobacter paspali* y *Xanthomonas* sp. producen esta hormona (Fett *et al.*, 1987; Torres-Rubio 2000; Patten & Glick 2002). En cuanto a la producción de AIA por parte de los actinomicetos cabe mencionar que la literatura es muy poca y no se observa continuidad en estos estudios al hacer revisiones de los mismos autores (Müller & Raymond, 1984; Müller *et al.*, 1984) por lo que no existen patrones válidos de comparación para los resultados que se obtuvieron.

Las cepas MCR3, MCR10, MCR21, MCR27 y MCR32 produjeron como valores máximos de AIA: 11.1, 11.9, 6.86, 10.72 y 3.05 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, los cuales son

valores bajos comparados con los estudios de Matsukawa *et al.* (2007) quienes encuentran que *Streptomyces purpurascens* NBRC 13077, *S. coelicolor* A3, *S. olivaceus* NBRC 12805 y *S. kasugaensis* NBRC 13851 producen AIA en concentraciones de 28.4, 21.8, 14.2 y 51.5 µg/ml respectivamente.

2.4. Producción de sideróforos

2.4.1. Introducción

La producción de sideróforos por rizobacterias y su papel en el biocontrol de enfermedades de las plantas ha sido informada por varios autores (Barona-Gomez *et al.*, 2006). Los sideróforos son pigmentos extracelulares fluorescentes con alta afinidad por el hierro III, solubles en agua y de bajo peso molecular (500-1000 Da); producidos por una gran variedad de microorganismos que han crecido en condiciones limitantes de hierro (Sánchez & Cantero, 2001; Neilands, 1995).

Todos los microorganismos requieren de hierro para satisfacer sus necesidades vitales, pues este compuesto participa en procesos biológicos tan importantes como el transporte de oxígeno, síntesis del ADN, fijación del nitrógeno, fotosíntesis y respiración (Sánchez & Cantero, 2001). Por otra parte, han sido asociados como sustancias antagonistas de ciertos microorganismos (Müller & Raymond, 1984) y como mecanismo de virulencia de microorganismos patógenos (Neilands, 1995). *Mycobacterium tuberculosis* es un actinomiceto que presenta sideróforos con finalidad patógena; los utiliza como factor de virulencia, pues de estos depende su vida y acoplamiento dentro de los macrófagos alveolares humanos (De Voss *et al.*, 1999).

2.4.2. Parte experimental

2.4.2.1. Metodología

Para la detección y determinación de los sideróforos producidos por los actinomicetos se adoptó la metodología descrita por Atkin (1970), como se describe en el Capítulo General de Materiales y Métodos (Numeral 5.4).

2.4.2.2. Resultados y discusión

La presencia de sideróforos en el sobrenadante de los cultivos de las cepas evaluadas se determinó tras la adición del reactivo de perclorato férrico. Se evidenció presencia de sideróforos en la mayoría de las cepas a excepción de la cepa MCR30 (*Streptomyces* sp.). La detección de sideróforos, se evidencia experimentalmente por un cambio de color; el color amarillo claro, del caldo de cultivo, cambia a café rojizo (Figura 31), dicho cambio revela la quelación del catión férrico por el sideróforo y la tonalidad puede indicar que probablemente se trata de sideróforos de tipo desferrioxaminas (Leong & Wikelmann, 1998).



Figura 31. Reacción colorimétrica de producción de sideróforos de tipo hidroxamato, (a) negativo, (b) positivo

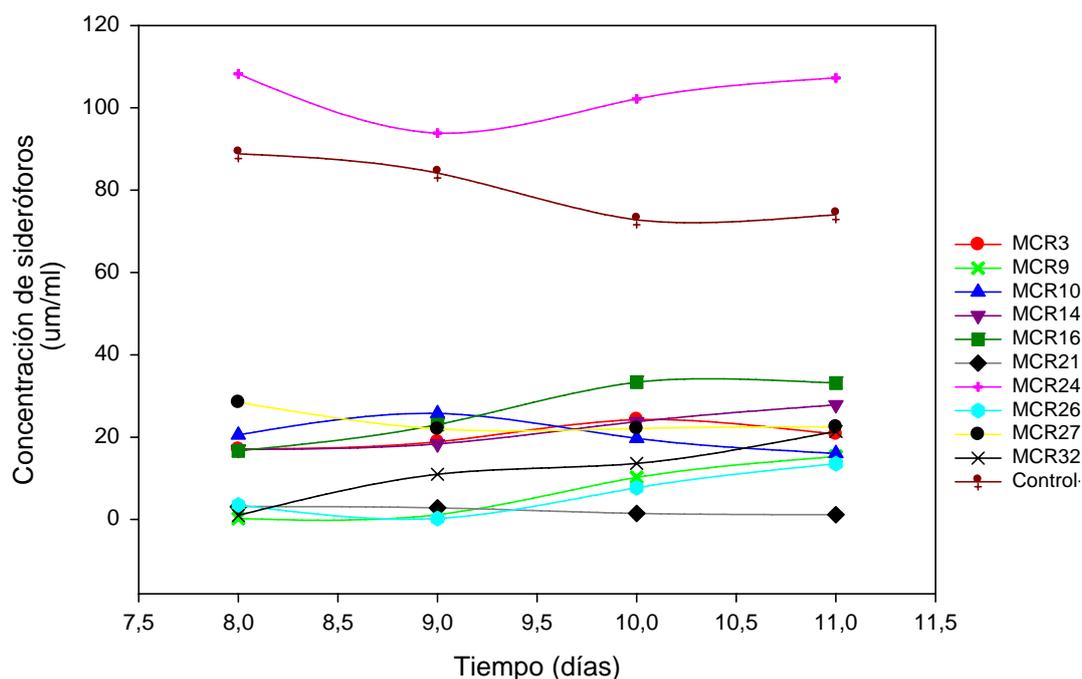


Figura 32. Producción de Sideróforos de hidroxamato por las cepas de actinomicetos seleccionadas

Con base en lo anterior, se observó (Figura 32) que durante el periodo evaluado las cepas tuvieron una producción mínima de sideróforos respecto al control (Anexo 10), excepto *Thermobifida* MCR24.

Se realizó un análisis de varianza, cuya variable fue “sideróforos”. A continuación se presenta la hipótesis planteada para las pruebas realizadas:

$$H_0 : \beta = 0 \quad \text{Donde } \beta \text{ corresponde a la variable de interés.}$$

$$H_1 : \beta \neq 0$$

Teniendo en cuenta la variable sideróforos, el análisis de varianza permitió ver si las variables Cepa y Día influían representativamente en los resultados (Anexo 10).

De acuerdo a los resultados, fue evidente que ambas variables influían representativamente en el estudio, sobre todo la referente a Cepa, es decir que ésta explicó el comportamiento y las diferencias en las mediciones de sideróforos. Lo anterior se dedujo teniendo en cuenta el p-valor ($<.0001$) el cual sirvió para verificar la hipótesis al compararlo con un valor límite de 0.05.

La hipótesis consistió en probar si la variable Cepa y la variable Día eran representativas en el modelo, para que de esta manera se explicara el comportamiento de los datos. Para la variable Cepa el p-valor fue menor a 0.0001, es decir que en este caso se rechazó la hipótesis nula (H_0), la cual hacía referencia a que no había diferencias entre cepas o días en la producción de sideróforos, lo que se interpretó como que no es significativa en el modelo. Por tanto, como se rechazó, era significativa. Para la variable DIA el p-valor fue de 0.0254 (menor a 0.05), por lo tanto la variable fue significativa por lo mencionado anteriormente.

Para determinar las diferencias entre las variables, se compararon las medias utilizando dos pruebas para tener mayor exactitud en los resultados, la prueba de Duncan y la prueba LDS de Fisher, ambas agruparon los promedios de sideróforos medidos respecto a las Cepas o los Días. Las dos pruebas arrojaron los mismos datos, por tal motivo se reportaron los correspondientes a Duncan (Anexo 10). La cepa 0 corresponde al control.

Se evidenció que algunos de los resultados obtenidos para las cepas MCR16, MCR27 y MCR14 fueron similares en los 4 días evaluados, por tal razón se agruparon en un mismo conjunto. Cabe resaltar la alta producción de la cepa MCR24, donde se demostró que fue la única cepa diferente significativamente a nivel estadístico con respecto a las otras, incluso al control.

En relación con los promedios evaluados de la variable Día, se observó que tras el paso del tiempo hubo aumento en la producción de sideróforos. Se hizo una comparación de los resultados que se obtuvieron frente a las cepas evaluadas en cada uno de los cuatro días de interés (Anexo 10).

La variable réplica (Rep) no es importante dentro del estudio ya que frente a las hipótesis planteadas, la hipótesis nula se acepta, puesto que el p-valor de la variable sideróforos fue de 0.8637, por lo tanto no hay diferencias significativas. Sin embargo éste análisis permitió a parte de eliminar la variable del modelo, confirmar que a nivel de réplica el estudio funcionó.

Se realizó la consolidación de los resultados arrojados del análisis por días para la variable Sideróforos (Tabla 17) con el fin de identificar día a día cuáles cepas tenían comportamientos similares y cuáles cepas tenían comportamientos diferentes, así mismo evidenciar la producción de los metabolitos secundarios.

Tabla 16. Análisis de producción de sideróforos por días de las cepas evaluadas (resultados a partir de las pruebas de Duncan y LSD)

SIDEROFOROS											
DIA 8			DIA 9			DIA 10			DIA 11		
Agrupamiento	Media	Cepa									
A	144.194	24	A	125.028	24	A	136.139	24	A	142.944	24
B	118.361	0	B	112.111	0	B	96.972	0	B	98.639	0
C	37.944	27	C	34.333	10	C	44.472	16	C	44.194	16
D	27.389	10	D	30.722	16	D	32.389	3	D	37.111	14
D	22.806	3	D	29.333	27	D	31.694	14	D	30.028	27
D	22.667	14	D	25.167	3	D	29.472	27	D	27.667	3
D	22.250	16	D	24.472	14	D	26.278	10	D	21.417	10
E	4.750	26	E	11.000	32	E	13.639	9	E	21.417	32
E	4.194	21	F	3.778	21	E	13.639	32	E	20.444	9
E	1.000	32	F	1.556	9	F	10.306	26	E	18.083	26
E	0.306	9	F	0.306	26	F	1.972	21	F	1.556	21
E	-2.333	30	F	-3.583	30	G	-2.333	30	F	-1.500	30

De acuerdo a las determinaciones realizadas, los mayores niveles en la producción de sideróforos se obtuvieron con *Thermobifida* MCR24 manteniéndose en el tiempo, los niveles más bajos se presentaron en *Streptomyces* MCR30.

Aunque los actinomicetos estudiados no producían concentraciones altas de sideróforos de hidroxamato se puede asumir que algunas cepas manifiestan una posible ventaja como mecanismo PGPR.

Carson *et al.* (2000) mencionan la relación existente entre la producción de sideróforos y el incremento de la capacidad de fijar nitrógeno. Microorganismos como *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium leguminosarum*, *Sinorhizobium meliloti* han sido mencionados como productores de sideróforos. En este estudio las cepas evaluadas para producción de sideróforos de hidroxamato pueden crecer en medios de cultivo sin adición de nitrógeno, lo que corroboraría en parte los hallazgos de Carson *et al.* (2000). Así mismo se confirmaría que las cepas que se seleccionaron poseían dicha capacidad, y todas de una u otra forma (alta o baja) produjeron sideróforos.

La literatura menciona estudios (Carson *et al.*, 2000) sobre distintos tipos de sideróforos (Rhizobactina, Vicibactina, Catecol). Sin embargo en estos no involucran

sideróforos de tipo hidroxamato en actinomicetos, el cual fue objeto de esta investigación; como consecuencia de esto no fue posible establecer patrones de comparación con los resultados obtenidos en el presente estudio y le confieren originalidad a estos hallazgos.

2.5. Producción de quitinasas

2.5.1. Introducción

Di Pietro *et al.* (1993) describieron la producción de enzimas quitinolíticas del tipo endoquitinasas, glucosaminidasas y quitobiosidasas, indicando la existencia de un complejo patrón funcional y regulatorio para éstas enzimas, involucradas en funciones como la liberación de nutrientes a partir de sustratos de quitina, micoparasitismo, competencia y funciones reguladoras en el desarrollo fúngico.

Las enzimas de tipo quitinasas han recibido especial interés por el control que ejercen sobre los hongos patógenos del suelo. Concretamente, se ha descrito la purificación y caracterización de enzimas hidrolíticas quitinasas y β -1,3-glucanasas producida por *Trichoderma* sp. y *Talaromyces flavus*, microorganismos que ejercen efecto antagónico por micoparasitismo sobre *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* sp. Singh *et al.* (1999), describieron una fuerte acción antagónica de *Streptomyces* sp. 385 sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, por secreción de enzimas quitinasas y otras sustancias antifúngicas, demostrando así la represión que ejerce *Streptomyces* sp. 385 sobre el fitopatógeno causante del marchitamiento de plantas de pepino.

2.5.2. Parte experimental

2.5.2.1. Metodología

La quitina coloidal se preparó siguiendo el protocolo de Skujins *et al.* (1965) modificado por Rodríguez *et al.* (2000). Con la quitina preparada se procedió a realizar la detección cualitativa de la producción de quitinasas y las cepas que dieron positivo se les realizó la cuantificación de la actividad, según la metodología descrita en el Capítulo General de Materiales y Métodos, Numeral 5.5.1., 5.5.2 y 5.5.3.

Para investigar la producción por parte de los actinomicetos en estudio de metabolitos que pueden generar antagonismo en hongos no micorrícicos comunes del suelo, se realizaron unas pruebas de enfrentamiento en cultivos duales *in vitro*. Las pruebas se realizaron en agar avena y PDA en donde se trazó una división del borde de la caja al centro de 3 cm de diámetro, donde se sembró masivamente el actinomiceto. Este se incubó hasta evidenciar la producción de propágulos en donde se esperaba la generación de metabolitos con actividad antimicrobiana en el medio (amensalismo). El hongo a investigar se sembró a los lados de la división y también en una caja que sirvió como control de crecimiento para el mismo (Figura 33). Los hongos a evaluar fueron: *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora infestans* y *Verticillium dahliae*.

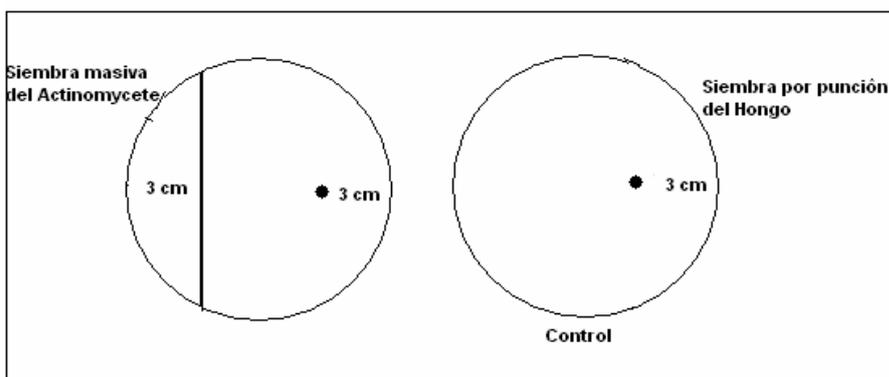


Figura 33. Técnica de enfrentamiento de cultivo dual

Las cajas se incubaron a 25°C por 5 días y los resultados de crecimiento radial se compararon con los controles del hongo sembrado por punción central en medio avena incubado bajo las mismas condiciones (Cafaro & Currie, 2005).

Se determinó el porcentaje de inhibición micelial, tomando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ IM} = \frac{Mb - Ma}{Mb} \times 100$$

Donde:

- a. Mb = Media basal (Crecimiento libre del hongo)
- b. Ma = Media Antagónica (Crecimiento influenciado del fitopatógeno).

2.5.2.2. Resultados y Discusión

Evaluación cualitativa de la producción de quitinasas. Una vez sembradas las cepas de los actinomicetos en el medio mineral suplementado con quitina coloidal al 0.2%, se procedió a evaluar la formación de halos de hidrólisis (Figura 34). Cada halo de hidrólisis se midió y se realizó un análisis semicuantitativo a partir de los halos formados (Tabla 17).



Figura 34. Halos de hidrólisis formados por la producción de quitinasas en cepas de actinomicetos

De los 30 aislados de actinomicetos, 20 fueron capaces de hidrolizar la quitina después de 3 días de crecimiento sobre el agar mineral suplementado con quitina como única fuente de carbono. Las zonas de aclaramiento fueron observadas alrededor de la colonia de la bacteria hasta 9 días de crecimiento (Figura 34), sugiriendo la presencia de actividad quitinolítica dentro de las proteínas secretadas al medio de cultivo.

Los diámetros de los halos iban incrementando a través del tiempo de incubación encontrándose el tamaño más grande y medible luego de 9 días de incubación. Se observan claramente las diferencias estadísticamente significativas al ser comparadas con la cepa control (*Streptomyces* sp.) donada por el laboratorio de Biotecnología de la Pontificia Universidad Javeriana. Por encima del rango de la cepa control, 4 cepas presentaron una mayor hidrólisis de la quitina coloidal en el medio mineral y 15 de las cepas presentaron diferencias significativas al ser comparadas con el control (Tabla 17).

Tabla 17. Tamaño de los halos de hidrólisis producidos por las cepas de actinomicetos. Se presentan los promedios de 3 réplicas realizadas, luego de 9 días de evaluación. Las mismas letras acompañando a un valor dado significan que no hay una diferencia significativa entre los valores

CEPA	HALO DE HIDRÓLISIS (cm)	CEPA	HALO DE HIDRÓLISIS (cm)
MCR1	0	MCR17	0
MCR2	6.00 ^c	MCR18	2.53 ^{ab}
MCR3	0	MCR19	0
MCR4	3.33 ^b	MCR20	1.50 ^a
MCR5	3.92 ^b	MCR21	3.58 ^b
MCR6	0	MCR22	11.42 ^d
MCR7	3.70 ^b	MCR23	0
MCR8	2.08 ^a	MCR24	11.17 ^d
MCR9	0	MCR25	5.00 ^c
MCR10	2.53 ^{ab}	MCR26	8.50 ^d
MCR11	0.5 ^a	MCR27	4.08 ^b
MCR12	2.67 ^b	MCR30	0
MCR14	8.42 ^d	MCR31	3.85 ^b
MCR16	2.13 ^a	MCR32	1.75 ^a
		CONTROL	2.25

Cuantificación de la actividad quitinolítica por los actinomicetos. Las cepas que dieron positivo en la evaluación semicuantitativa, fueron investigados posteriormente para determinar la actividad quitinolítica de forma cuantitativa. La actividad exoquitinasa fue detectada utilizando *p*-NP-N-acetil-glucosamina.

Tabla 18. Determinación de la actividad quitinasa en el extracto crudo enzimático de los actinomicetos seleccionados en la prueba cualitativa. Valores del promedio \pm SD (Desviación estándar). Las mismas letras acompañando a un valor dado significan que no hay una diferencia significativa entre los valores.

CEPA	ACTIVIDAD ESPECIFICA (U/mg de proteína)	CEPA	ACTIVIDAD ESPECIFICA (U/mg de proteína)
MCR2	0.20 \pm 1.1 a	MCR20	0
MCR4	0	MCR21	0
MCR5	1.83 \pm 1 b	MCR22	2.05 \pm 2.2 b
MCR7	0	MCR24	4.6 \pm 1.4 d
MCR8	0	MCR25	7.37 \pm 1.80 e
MCR10	0	MCR26	5.25 \pm 1.4 d
MCR11	0	MCR27	1.01 \pm 2.3 ab
MCR12	0	MCR31	0
MCR14	2.85 \pm 2.3 c	MCR32	0
MCR16	0	CONTROL	1.77 \pm 1.4 b
MCR18	0		

La quitinólisis es un proceso muy común en los actinomicetos del suelo (Gupta *et al.*, 1995), aunque estudios en suelos tropicales los han encontrado escasos (Gomes *et al.*, 1999). Los datos obtenidos demuestran que la concentración de actinomicetos quitinolíticos es alta en suelos tropicales de alta montaña andina.

Evaluación de actividad antagonista *in vitro* contra hongos no micorrícicos comunes en suelo. El antagonismo es definido como un mecanismo que se basa principalmente en la actividad inhibitoria directa entre dos microorganismos (Ochoa, 1998) los cuales presentan acciones opuestas en un mismo sistema. Las pruebas que se realizaron lo fueron con el fin de evaluar la interacción o inhibición de 7 cepas de actinomicetos, que presentaron o no actividad quitinolítica y tienen un comportamiento como regulador de crecimiento vegetal, contra los hongos *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani* y *Verticillium dahliae*.

En las pruebas de antagonismo contra los hongos fitopatógenos se observó que las cepas presentaban una inhibición generalizada, alta, media o baja, pero que la cepa fúngica más resistente fue *F. oxysporum*. Diversos actinomicetos pueden ejercer su acción antagonista sobre *F. oxysporum* mediante la producción de antibióticos (antibiosis). Estos difunden por el medio inhibiendo el crecimiento del hongo fitopatógeno. Molano *et al.* (2000) determinaron la inhibición *in vitro* del crecimiento de *Fusarium oxysporum* a partir de la actinomicina, un antibiótico producido por *Nocardia* sp., cepa aislada de una muestra de suelo rizosférico de liquen (Mosquera-Colombia). La producción de dicho metabolito secundario resultó tóxico para el hongo fitopatógeno. Los resultados presentados a continuación (Tabla 19) son los correspondientes a aquellas cepas que crecieron en el medio Nfb y presentaron actividad quitinolítica, esto como forma de ir seleccionando aquellas cepas a las que se les iba a realizar la prueba de antagonismo:

Tabla 19. Porcentaje de inhibición micelial de hongos patógenos por parte de los actinomicetos en estudio (Media y Desviación Estándar con tres repeticiones). Las mismas letras acompañando a un valor dado significan que no hay una diferencia significativa entre los valores.

CEPA	Porcentaje de Inhibición Micelial (%)			
	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Verticillium dahliae</i>

Resultados

CEPA	Porcentaje de Inhibición Micelial (%)			
	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Verticillium dahliae</i>
MCR10	0	37.7 ± 6.89 b	77.3 ± 2.8 d	24.25 ± 3.7 b
MCR14	0	62.2 ± 1.1 c	0	30 ± 2.7 b
MCR21	0	55.5 ± 4.4 c	0	0
MCR24	0	66.6 ± 0.56 c	40.12 ± 2.3 b	0
MCR26	0	55.5 ± 0.25 c	17.7 ± 4.35 a	48.8 ± 1.7 c
MCR27	0	0	0	11.1 ± 0.45 a
MCR31	65.32 ± 2.1 c	48.8 ± 1.3 c	0	0

Resulta evidente que la cepa MCR31, presentó una clara inhibición contra *Fusarium oxysporum* a los 8 días de incubación (Figura 35).

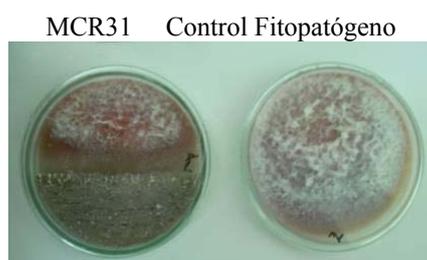


Figura 35. Técnica de enfrentamiento en cultivo dual con 68% de inhibición micelial sobre *Fusarium oxysporum*.

No se observó efecto antagónico de otros actinomicetos capaz de inhibir parcial o totalmente a *Fusarium oxysporum*.

MCR26

MCR10

MCR24



Figura 36. Técnica de enfrentamiento en cultivo dual. MCR26 vs *Verticillium dahliae*. MCR10 vs *Phytophthora infestans*. MCR14 vs *Rhizoctonia solani*

Las cepas MCR26, MCR10 y MCR24 resultaron las mejores antagonistas de los hongos evaluados (Figura 36). Se puede inferir con estos resultados que la inhibición del crecimiento micelial se da por productos antifúngicos y no por la producción de la enzima quitinasa, ya que cepas con actividad quitinolítica no produjeron una inhibición del crecimiento micelial. Con este resultado se continuó la fase de interacción frente al hongo formador de micorriza, al observar que la producción de la enzima quitinasa no afecta directamente a los hongos.

Una evaluación frente a *Phytophthora infestans* permitió determinar que los actinomicetos no presentaban una inhibición del crecimiento micelial por la enzima quitinasa sino por otros metabolitos. Esto podría explicarse por las características de su pared celulósica. Este hecho se confirma porque algunos de los hongos evaluados no se inhibieron frente a las cepas quitinolíticas.

Es importante mencionar que el tiempo de crecimiento del antagonista (el actinomiceto) fue mayor que el del fitopatógeno. Este hecho concuerda con la realidad de que lo que se busca es que se prevenga la enfermedad causada por el hongo a las plantas, antes que atacar la enfermedad cuando ya está establecida y exista una penetración de tejido por parte del patógeno, ya que la acción del actinomiceto está ceñida a la producción de sustancias en la rizosfera (Thomas *et al.*, 1991; Sánchez & Cantero, 2001). Adicionalmente decir que estos resultados pueden de alguna forma correlacionarse con los obtenidos en la interacción frente a hongos formadores de micorriza que se exponen en el capítulo de la interacción de actinomicetos y los hongos MA y sus efectos sobre las plantas de trébol.

Es importante tener en cuenta que no todos los antibióticos que posiblemente producen los actinomicetos que se aislaron pueden inhibir o afectar el desarrollo de los

hongos evaluados. Es válido tener presente que algunos hongos poseen pequeñas células que contienen genes de resistencia a cierto tipo de antibióticos producidos por los actinomicetos (Davies, 1994).

La curva de crecimiento de los actinomicetos, presenta las mismas fases que los microorganismos fúngicos, es decir, la fase que corresponde a la fase logarítmica perteneciente a la tropofase y la fase de muerte, que se caracteriza por la lisis celular que corresponde a la idiofase (Watson, 1984). Es claro que la producción de antibióticos está directamente relacionada con la idiofase. Según Demain & Piret (1983), los antibióticos forman parte en la transición de las células vegetativas a propágulos en actinomicetos como *Streptomyces*, donde existe la posibilidad que el antibiótico se encuentre en el interior de las esporas y la función se enfoca en autoinhibir la germinación hasta que se presenten condiciones favorables. Pasado el tiempo de germinación de las conidias, se presenta un rápido desarrollo seguido de la segunda fase de crecimiento la cual se relaciona con la síntesis de antibióticos.

Por otro lado, se debe hacer mención al hecho de que algunos actinomicetos no esporularon en su totalidad, y aún así se realizó el ensayo de antagonismo. Se conoce que la esporulación se relaciona directamente con la producción de los antibióticos (metabolito secundario) como se mencionó anteriormente (Silver *et al.*, 1993).

Cabe resaltar que otro posible motivo por el que no todas las cepas evaluadas hayan presentado inhibición frente al hongo, puede justificarse teniendo en cuenta la influencia que ejerce el cambio de las condiciones naturales en las cuales normalmente los dos microorganismos se desarrollan, generalmente en condiciones de laboratorio el crecimiento de los actinomicetos se hace más lento al igual que su esporulación.

Actualmente es distribuido en Europa un bioplaguicida denominado Mycostop® que contiene micelio y esporas de *Streptomyces griseoviride* para proteger cultivos frente a *Fusarium* sp y *Alternaria* sp. La acción de este plaguicida se basa en una compleja interacción biológica, después que el producto ha sido introducido dentro del sustrato de crecimiento, el organismo coloniza la rizosfera y empieza a secretar metabolitos secundarios (Sánchez & Cantero, 2001).

Posiblemente el antagonismo no se dé exclusivamente por la presencia de las enzimas quitinasas sino la presencia de otros compuestos genera un sinergismo operativo en el antagonismo (Schirmbock *et al.*, 1994), afirmación que se confirma con los resultados de antagonismo obtenidos. Cuando la actividad antifúngica analizada con los

actinomicetos ya crecidos, todos los géneros fueron activos en su mayoría contra los hongos evaluados excepto contra *F. oxysporum*, dato similar encontrado por Gomes *et al.* (2000), y que prueba que posiblemente son otros compuestos los que presentan actividad antifúngica y no la producción de quitinasas.

En el siguiente capítulo se evalúa si se presenta o no antagonismo de los actinomicetos frente a hongos benéficos como son los hongos formadores de MA, hecho importante en ecología de la rizosfera.

Capítulo 3: INTERACCIONES DE ACTINOMICETOS Y HONGOS MA, Y SUS EFECTOS SOBRE EL DESARROLLO DE PLANTAS DE TREBOL

3.1. Introducción

Como se indicó con anterioridad, los microorganismos rizosféricos pueden influenciar la formación y el funcionamiento de las simbiosis MA mediante actividades de distinta índole como son la activación de propágulos infectivos del hongo en estadios presimbóticos (Azcón-Aguilar & Barea, 1996; Giovannetti *et al.*, 2002), facilitando la formación de puntos de entrada en la raíz (Azcón-Aguilar *et al.*, 1986; Linderman, 1988; Vivas *et al.*, 2003) o incrementando el desarrollo del hongo en la raíz (Mayo *et al.*, 1986; Carpenter-Boggs *et al.*, 1995).

Así mismo, los cambios fisiológicos inducidos por la colonización MA en la planta o las alteraciones que induce el micelio externo en el medio físico de la rizosfera, afectan a las poblaciones de otros organismos que habitan en la rizosfera y/o rizoplana, lo que da lugar a la llamada micorizosfera (Linderman, 1988; Azcón-Aguilar & Barea, 1992; Barea, 1997; Gryndler, 2000; Barea *et al.*, 2005).

En virtud de las repercusiones en ecología de la rizosfera es muy importante conocer las interacciones de rizobacterias y hongos MA, debido a que pueden beneficiar el crecimiento de las plantas inoculadas (Filippi *et al.*, 1998; Budi *et al.*, 1999). En este sentido, se han realizado diversos estudios que han permitido evidenciar la capacidad colonizadora y las interacciones a nivel rizosférico de diferentes tipos de hongos y bacterias que benefician el crecimiento y la salud vegetal, así como la calidad del suelo. Se sabe que el manejo adecuado de las actividades cooperativas microbianas puede reducir el uso de químicos y energía, incrementando el interés de la aplicación de consorcios microbianos seleccionados como inoculantes vegetales (Barea *et al.*, 2005).

La simbiosis MA ocupa una posición central en el desarrollo de la rizosfera y posterior micorizosfera habiéndose descrito diversos tipos de interacciones asociadas a esta simbiosis microbiana (Jeffries *et al.*, 2003). Sin embargo las informaciones en relación con la interacción de los actinomicetos con la simbiosis MA son muy escasas. Tampoco hay mucha información sobre estudios que describan a estas bacterias filamentosas con características de PGPR asociadas al micelio de las MA, como sucede

con otro tipo de bacterias en las cuales se ha corroborado los efectos positivos de las interacciones con las MA (Barea *et al.*, 2005).

Durante el establecimiento de las MA se reconoce como efecto primario el incremento en la capacidad de absorción de P, N y otros nutrientes por parte de las plantas siendo el micelio externo de los hongos MA el que actúa como puente entre las raíces y los microhabitantes del suelo que rodean la raíz (Barea *et al.*, 2005). De esta forma, los hongos pueden contribuir a la captura y aporte de P, ya que pueden acceder a porciones bióticas o geoquímicas del ecosistema del suelo-planta, lo que afecta el ciclado de P en los ecosistemas naturales y agrícolas (Jeffries & Barea, 2001).

Como se indicó en el Capítulo de Introducción General, las MA pueden reducir el daño causado por fitopatógenos radicales mediante diferentes mecanismos (Azcón-Aguilar & Barea, 1992 y 1996; Linderman, 1994, 2000; Elmer, 2002; Azcón-Aguilar *et al.*, 2002; Whipps, 2004). Uno de tales mecanismos se basa en los cambios que suceden en la micorizosfera (Azcón-Aguilar & Barea, 1992 y 1996; Linderman, 1994 y 2000). Se ha evidenciado que muchos actinomicetos pueden actuar como controladores de hongos fitopatógenos por lo que, al igual que ocurre con PGPR, es de interés verificar si las actividades antifúngicas pueden afectar negativamente a hongos beneficiosos, como los formadores de las MA. Esto es crítico para poder explotar las posibilidades de utilizar cultivos mixtos (hongos MA y PGPR) como inoculantes de las plantas, y servir de defensa contra los hongos fitopatógenos (Calvet *et al.*, 1993; Barea *et al.*, 1998; Edwards *et al.*, 1998; Vásquez *et al.*, 2000).

3.2. Parte Experimental

3.2.1. Metodología

3.2.1.1. Elaboración del semillero y diseño experimental

Se utilizaron semillas de trébol blanco (*Trifolium repens* L.) de la variedad carretón blanco gigante- Agropaz. Estas fueron desinfectadas en una solución de hipoclorito de sodio al 10%, durante 15 min, en agitación constante a 50 rpm, empleando un agitador orbital (Barnstead/Lab – line, MAXQ 3000). A continuación se lavaron 3 veces con abundante agua destilada estéril para finalmente ser sometidas a hidratación en agua destilada estéril durante 1h, en agitación a 50 rpm. Una vez desinfectadas e hidratadas, las

semillas de trébol fueron sembradas en un semillero elaborado con suelo abono “plantitierra”, previamente pasado por tamiz con un tamaño de poro de 4750 μm , 2000 μm y 1700 μm (Jardineros Ltda.) y arena.

Las plántulas crecieron en semilleros bajo condiciones de invernadero a una temperatura promedio de 18°C durante 2 meses, al cabo de los cuales se transplantaron a macetas, ubicando cuatro plántulas de manera equidistante por maceta.

Con objeto de proceder a la inoculación con MA de dichas plántulas, se evaluaron previamente los cuatro aislados de MA encontrados en el muestreo primario para seleccionar el más adecuado para hacerlo interaccionar con los actinomicetos, así como por sus efectos sobre las plantas de trébol.

Luego de la evaluación y selección del aislado de MA, se aplicaron a las plantas de trébol 9 tratamientos, que consistieron en: *Streptomyces* MCR9, *Thermobifida* MCR24, *Streptomyces* MCR26, *Glomus* FC8 sp, *Streptomyces* MCR9 + *Glomus* FC8 sp, *Thermobifida* MCR24 + *Glomus* FC8 sp., *Streptomyces* MCR26 + *Glomus* FC8 sp, Control no inoculado, y *Glomus mosseae* (inoculante comercial). Estos 9 tratamientos fueron replicados 8 veces para un total de 72 macetas que fueron distribuidas aleatoriamente en el invernadero. El riego siempre fue establecido y controlado con el propósito de mantener la humedad cercana a la capacidad de campo.

3.2.1.2. Preparación de inóculos e inoculación de plántulas con cepas de Actinomicetos y Micorrizas

Streptomyces MCR9, *Thermobifida* MCR24 y *Streptomyces* MCR26, fueron cultivados en erlenmeyer (250ml) que contenían 120 ml de caldo ISP2 (Merzaeva & Shirokikh, 2006). Los actinomicetos se inocularon directamente al suelo aplicándose 5 ml de células lavadas, obtenidas a partir del cultivo en caldo ISP2, a una concentración de 10^6 células·ml⁻¹. El inóculo de micorriza empleado para los tratamientos fue *Glomus* FC8 sp, correspondiente al género que se encontró con una frecuencia mayor durante la toma de muestra primaria y que mostró más eficacia en ensayos previos. Se utilizó también como control un hongo MA comercial de referencia perteneciente al género *Glomus mosseae*, inóculo donado por la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA-Tibaitatá, Bogotá-Colombia). El inóculo de micorriza consistió en una mezcla de suelo, raíces colonizadas, hifas y esporas. Diez gramos de este inóculo se mezclaron con el suelo inoculado con los actinomicetos correspondientes en aquellos

tratamientos que incluían la variable micorriza. Esta mezcla inoculada constituyó el sustrato de crecimiento en macetas a las que se transplantaron las plántulas cuando tenían dos meses de crecimiento en semillero.

3.2.1.3. Evaluación de los efectos de la inoculación.

Se evaluó el establecimiento de las poblaciones de actinomicetos a nivel de rizosfera y rizoplana, así como se evaluó la colonización de las MA en las plantas. Las determinaciones en suelo y planta se efectuaron tal como se describe en Materiales y Métodos Generales (Numeral 7.3.3)

3.2.2. Resultados y Discusión

3.2.2.1. Efectos de los actinomicetos sobre la germinación de las esporas y el crecimiento del micelio de *Glomus FC8 sp.*

En los resultados expuestos en la Tabla 20 se puede observar que las dos cepas de *Streptomyces* (MCR9 y MCR26) provocan una estimulación de la germinación de las esporas del hongo MA, mientras *Thermobifida* MCR24 disminuye notablemente la germinación de las esporas.

Se observa también que los aislados de *Streptomyces* y *Thermobifida* mejoran el desarrollo del micelio de *Glomus FC8 sp.*

Tabla 20 Efecto de los actinomicetos sobre la germinación de las esporas de *Glomus FC8 sp in vitro* y en suelo y sobre el crecimiento micelial *in vitro*. Los valores corresponden a la media de los valores de 20 réplicas realizadas para evaluar la germinación de las esporas *in vitro*, 50 réplicas para la germinación de las esporas en suelo y 15 réplicas para el desarrollo micelial *in vitro*. Los valores por columna que no presentan la misma letra corresponden a las diferencias significativas a nivel de $P=0.05$

Cepa de actinomiceto	% germinación de esporas		Desarrollo micelial (mm/espora germinada)
	In vitro	In soil	
Control	71 ^b	62 ^b	13 ^a
<i>Streptomyces</i> MCR9 sp	81 ^a	76 ^a	48 ^b
<i>Streptomyces</i> MCR26 sp	85 ^a	80 ^a	32 ^c
<i>Thermobifida</i> MCR24 sp	25 ^c	18 ^c	28 ^c

Carpenter-Boggs *et al.* (1995) demostraron el efecto estimulador de actinomicetos como *Streptomyces orientalis* sobre esporas de *Gigaspora margarita* y encontraron que

las cantidades de compuestos volátiles producidos por los aislamientos correlacionan bien con la germinación de las esporas MA. Dicha investigación puede explicar la estimulación de la germinación de las esporas de *Glomus* FC8 sp. por algunas cepas de actinomicetos en el presente trabajo. También Mosse (1959) y Azcón-Aguilar & Barea (1985) describieron como algunas bacterias micorrizósferas fueron capaces de promover el establecimiento de MA, mejorando la germinación de las esporas.

3.2.2.2. Interacción de los actinomicetos con plantas de trébol

Germinación de las semillas de trébol blanco. De acuerdo con los resultados que se presentan en la Tabla 21 se aprecia que en las tres réplicas analizadas se obtuvo un 100% de germinación de las semillas, lo que asegura que la desinfección con etanol e hipoclorito no influye en la germinación de las semillas utilizadas en este estudio, lo cual concuerda con las descripciones de Varma *et al.* (2004).

Tabla 21. Resultados de las pruebas de germinación de semilla de trébol blanco a los 10 días de desarrollo

Repetición	Semillas germinadas	Semillas no germinadas
1	10	0
2	10	0
3	10	0

Pruebas de establecimiento rizosférico de los actinomicetos seleccionados. Las cepas evaluadas fueron las seleccionadas por su actividad como promotoras de crecimiento vegetal *in vitro*.

Los datos de UFC·g⁻¹ resultado del análisis del establecimiento de los actinomicetos a nivel del suelo, rizosfera y rizoplana, se convirtieron en función de sus logaritmos en base diez para la elaboración de gráficas que permitieron describir su comportamiento durante el presente estudio. Se realizó el análisis estadístico por medio de la prueba de agrupamiento de medias de Tukey a los intervalos de tiempo para cada una de las cepas en los diferentes análisis (Anexo 12).

Para verificar la esterilización del suelo tamizado se realizaron diluciones seriadas que se sembraron sobre agar avena y no se observó el crecimiento de ningún tipo de colonia en este medio, comprobando que el suelo quedó sin microorganismos.

La cantidad de actinomicetos inoculados, durante los 30 días del experimento, muestra un aumento pequeño durante los 10 primeros días, aunque las cifras se estabilizan durante el resto del ensayo (Figura 37).

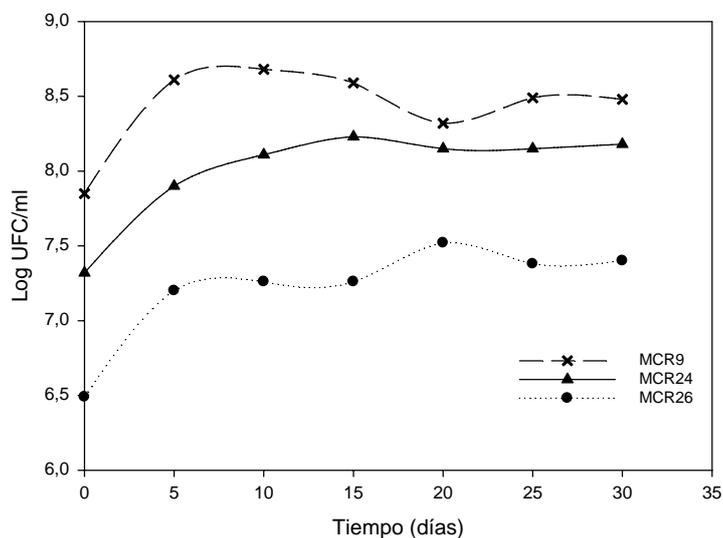


Figura 37. Establecimiento en el suelo de las cepas inoculadas durante el crecimiento de trébol blanco

En el caso de *Streptomyces* MCR9 la concentración inicial en el suelo fue 70×10^6 UFC·g⁻¹ de suelo o su equivalente en unidades logarítmicas 7.85. Al día 5 de iniciado el ensayo la concentración incrementó casi un orden de magnitud y se mantuvo estable durante los 30 días del estudio. El análisis estadístico muestra que el mayor aumento de concentración se da durante el intervalo del día 0 al día 5 (Anexo 12).

Thermobifida MCR24 con una concentración inicial en el suelo de 21×10^6 UFC·g⁻¹ de suelo (es decir, 7.32 equivalente en unidades logarítmicas) incrementó dicha concentración en casi un orden de magnitud durante los 30 días del estudio. El análisis estadístico muestra que el mayor aumento de concentración se presenta durante el intervalo del día 0 al día 5 (Anexo 12).

Streptomyces MCR26 presentó una concentración inicial en el suelo de 31×10^5 UFC·g⁻¹ de suelo (6.49 en su equivalente en unidades logarítmicas) concentración que

incrementó casi un orden de magnitud durante los 30 días del estudio. El análisis estadístico muestra que el mayor aumento de concentración se observa durante el intervalo del día 0 al día 5 (Anexo 12).

1. *Establecimiento de los actinomicetos en rizoplana.* Se realizó el análisis de la población de actinomicetos a nivel de rizoplana a partir del día 10 debido a que antes de este tiempo no había un desarrollo radicular para poder realizar el ensayo.

La concentración de *Streptomyces* MCR9 y *Thermobifida* MCR24 incrementó en dos órdenes de magnitud durante el transcurso del día 10 al día 30 (Figura 38). De acuerdo con el análisis estadístico, el mayor aumento de concentración ocurre en el intervalo de los días 15 al 20. La concentración de *Streptomyces* MCR26 aumenta en un orden de magnitud en el transcurso del día 10 al día 30 y según el análisis estadístico muestra que los intervalos en donde se presenta un mayor incremento de la concentración son del día 10 al 15 y 15 al 20. Concretamente, la concentración de las cepas *Streptomyces* MCR9 y *Thermobifida* MCR24 incrementan desde una concentración inicial de 10^7 UFC·ml⁻¹ para el día 10 que se mantiene estable a la concentración de 10^8 UFC·ml⁻¹ hasta el final del estudio. En el caso de *Streptomyces* MCR26 parte de una concentración de 10^5 UFC·ml⁻¹ para el día 10 que aumenta y se mantiene estable hasta 10^6 UFC·ml⁻¹ (Figura 38).

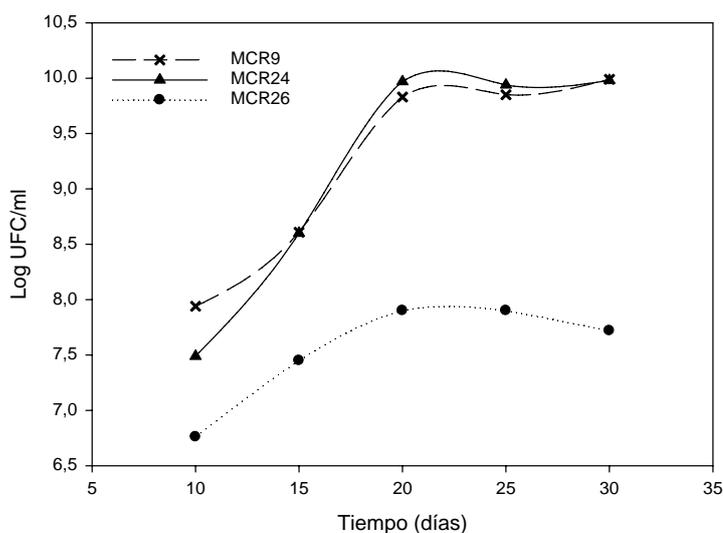


Figura 38. Establecimiento de los actinomicetos en la rizoplana durante el crecimiento de *T. repens*

El comportamiento de los actinomicetos evaluados en este estudio corroboran los resultados obtenidos con *Streptomyces globisporus* 1-K-4 (Merzaeva & Shirokikh, 2006) que muestran que la concentración de esta bacteria aumenta en la rizoplana de las plántulas de arroz casi inmediato después de la inoculación.

En resumen se puede decir que la tendencia de todas las cepas es establecerse rápidamente en rizoplana, ya que los mayores aumentos de las concentraciones se dan entre los intervalos de 10 a 15 días ó 15 a 20 días.

2. *Análisis de la concentración de los actinomicetos en rizosfera.* El establecimiento de los actinomicetos a nivel de la rizosfera experimenta un aumento significativo durante los 30 días evaluados, aunque, en el caso de *Streptomyces* MCR9 se evidenció un aumento leve de concentración, menor de un orden de magnitud, entre los días 10 al 25 y una caída posterior de un orden de magnitud entre los días 25 al 30 hecho difícil de explicar teniendo en cuenta el comportamiento de las demás cepas. Las mayores cifras de $\text{UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$ se registraron en el intervalo del día 15 al 20 (Anexo 12).

La concentración de *Thermobifida* MCR24 aumentó levemente entre el día 10 y 30 de 7.93 a 7.99 unidades logarítmicas respectivamente. El intervalo de tiempo en el cual se produjo el mayor aumento ocurrió entre los días 20 al 25.

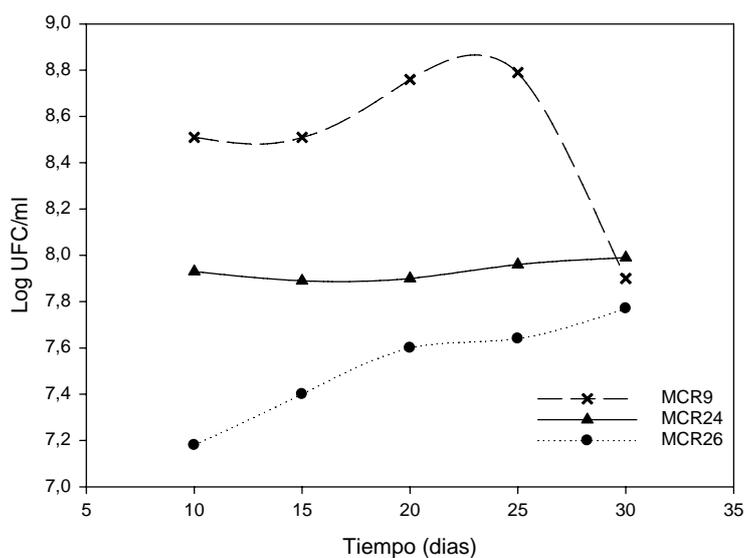


Figura 39. Establecimiento de los actinomicetos seleccionados en rizosfera de trébol blanco

La concentración de *Streptomyces* MCR26 aumentó de 7.18 a 7.77 unidades logarítmicas entre el día 10 y 30, particularmente entre los días del 10 al 15 y del 15 al 20.

Los resultados obtenidos difieren de los encontrados por Merzaeva & Shirokikh (2006) en cuanto al establecimiento de *Streptomyces globisporus* 1-K-4 en la rizosfera de plántulas de arroz crecidas en arena estéril, donde las cifras de establecimiento de la bacteria incrementan en dos órdenes de magnitud durante los 30 días de la experimentación de 10^6 a 10^8 UFC·ml⁻¹. Esta discrepancia puede ser debida a que los actinomicetos posiblemente se encontraban en un punto fisiológico de equilibrio dinámico diferente en su curva de crecimiento.

Efecto de los actinomicetos seleccionados como promotores de crecimiento vegetal en *Trifolium repens* L. Los datos se presentan en las Figuras 40 y 41. Las variables que se analizaron fueron la longitud y peso de parte aérea y raíz.

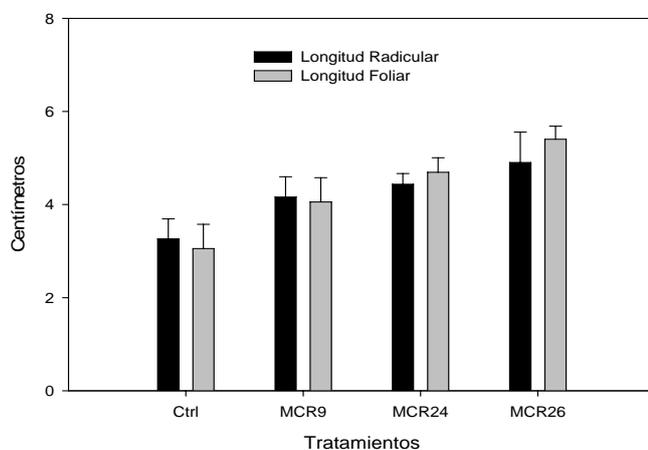


Figura 40. Efecto de la inoculación de actinomicetos en el desarrollo (longitud) del sistema radicular y aéreo de trébol blanco

La inoculación de los actinomicetos seleccionados incrementó la longitud (Figura 40) y el peso (Figura 41) de parte aérea y raíz, siendo *Streptomyces* MCR26 el que mostró una mejor actividad promotora del crecimiento vegetal.

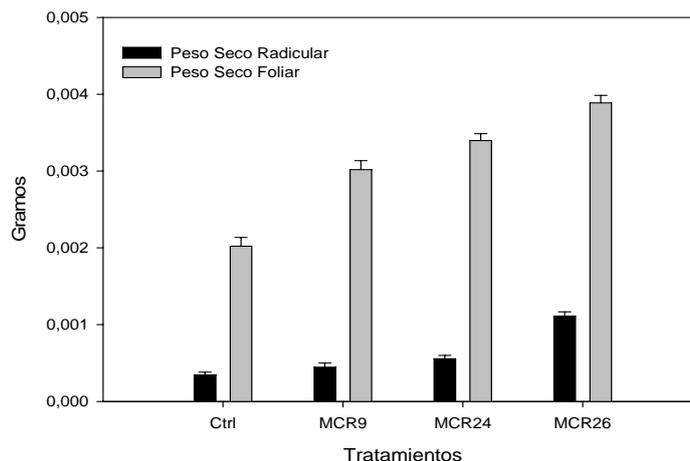


Figura 41. Peso seco del sistema radicular y aéreo de trébol blanco con los diferentes actinomicetos evaluados

Los datos obtenidos se transformaron por el procedimiento Box Cox para su posterior análisis por medio de análisis de varianza.

El análisis de varianza permiten validar la hipótesis alterna “Al menos uno de los tratamientos es distinto de otro” para todas las variables analizadas (Anexo 12). Las probabilidades que se generaron para las variables de longitud de raíz y del sistema aéreo fueron $p < 0.0001$. La probabilidad para el caso de las variables de peso seco del sistema radicular y aéreo son $p < 0.0069$ y $p < 0.0001$ respectivamente. Los tratamientos se compararon por medio de la prueba de comparación de medias de Tukey para cada una de las variables.

El agrupamiento para la variable longitud del sistema radicular muestra que los tratamientos Control y *Streptomyces* MCR9 sp. son similares pues se reúnen en un solo grupo. *Thermobifida* MCR24 sp. y *Streptomyces* MCR26 sp. se agrupan en un mismo grupo

El agrupamiento para la variable longitud del sistema aéreo muestra que el tratamiento más efectivo fue *Streptomyces* MCR26 sp. mientras que *Thermobifida* MCR24 sp. es similar estadísticamente al Control, siendo *Streptomyces* MCR9 sp. el menos efectivo.

El agrupamiento para la variable peso seco del sistema radicular confirma que *Streptomyces* MCR26 sp. fue el más efectivo mientras que *Streptomyces* MCR9 sp. fue el menos efectivo, y *Thermobifida* MCR24 muestra una influencia positiva sobre la acumulación de biomasa en la raíz.

El agrupamiento para la variable peso seco del sistema aéreo muestra que *Streptomyces* MCR26 sp. es el tratamiento más efectivo aunque *Thermobifida* MCR24 sp. evidencia una influencia positiva para la acumulación de biomasa en el sistema aéreo. Se puede concluir que *Streptomyces* MCR26 sp fue el más efectivo en cuanto a las variables peso seco del sistema radicular y peso seco del sistema aéreo y para la variable longitud del sistema radicular.

3.2.2.3. Interacción de los actinomicetos con los hongos MA y sus efectos sobre el crecimiento y nutrición de las plantas de trébol

Selección de hongos MA de acuerdo con su capacidad de colonización y esporulación, y efectos sobre las plantas. Se diseñaron ensayos en microcosmos, tal como se describe en Materiales y Métodos Generales (Numeral 7.3.3).

En la evaluación realizada a los noventa días después del transplante (90 ddt), no hubo diferencias significativas en cuanto a efectos sobre la longitud de raíz, producción de esporas y colonización (Tabla 22).

Tabla 22. Evaluación de los efectos de la inoculación de los hongos en la planta 90 ddt ** p ≤ 0.01: Diferencias altamente significativas; * p ≤ 0.05: Diferencias significativas; ns: No diferencias significativas, de acuerdo a ANOVA, procedimiento GLM (Programa SAS) (n) 20 (gl) 12. Letras diferentes: Diferencias significativas (p ≤ 0.05); Letras iguales: No diferencias significativas, según la prueba de Tukey.

Fuente de Variación/ Tratamiento	Peso Seco raíz (g)	Peso Seco foliar (g)	Longitud foliar (cm)	Longitud de la raíz (cm)	Esporas totales (esp/g)	Colonización (%)
<i>Glomus</i> FC8 sp	0.10 ^a	0.11 ^a	2.1 ^a	1.34 ^a	18.25 ^a	5.75 ^b
<i>Acaulospora mellea</i>	0.013 ^a	0.14 ^a	2.0 ^a	1.59 ^a	15.50 ^a	2.00 ^a
<i>Entrophospora colombiana</i>	0.013 ^a	0.13 ^a	1.45 ^a	1.43 ^a	11.0 ^a	2.75 ^a
Testigo bajo P	0.15 ^a	0.17 ^a	2.0 ^a	1.56 ^a	8.00 ^a	--
Testigo alto P	0.69 ^b	1.52 ^b	2.5 ^a	1.35 ^a	8.50 ^a	--
Coefficiente de variación	27.53	25.94	10.93	24.32	25.53	71.16

El testigo fertilizado con concentración alta de P mostró valores significativamente mayores ($p \leq 0.05$) para las variables peso fresco y seco de parte aérea y de raíz, longitud de parte aérea, aérea, área foliar, número de folíolos, volumen foliar y de raíz, según la prueba de Tukey (Tabla 22).

En la evaluación realizada a los 180 ddt, para longitud de raíz, el tratamiento fertilizado con concentración alta de P mostró diferencias significativas con los tratamientos inoculados con *Glomus* FC8 sp. y *Entrophospora colombiana*, presentando mayor longitud de raíz el tratamiento con baja concentración de P (Tabla 23).

Tabla 23. Evaluación de los efectos de la inoculación de los hongos en la planta 180 ddt ** $p \leq 0.01$: Diferencias altamente significativas; * $p \leq 0.05$: Diferencias significativas; ns: No diferencias significativas, de acuerdo a ANOVA, procedimiento GLM (Programa SAS) (n) 20 (gl) 12. Letras diferentes: Diferencias significativas ($p \leq 0.05$); Letras iguales: No diferencias significativas, según la prueba de Tukey

Fuente de Variación/ Tratamiento	Peso Seco raíz (g)	Peso Seco foliar (g)	Long. foliar (cm)	Long. de la raíz (cm)	Area Foliar (cm)	Vol. Foliar (ml)	Vol. Raíz (ml)	Esporas totales (esp/g)	Colonización (%)
<i>Glomus</i> FC8 sp	0.69 ^a	1.75 ^b	5.68 ^a	1.50 ^a	43.82 ^a	2.69 ^a	1.82 ^{ab}	18.25 ^a	27.75 ^a
<i>A. mellea</i>	0.51 ^b	1.80 ^b	4.73 ^a	1.65 ^a	35.66 ^a	2.29 ^a	1.62 ^b	15.50 ^a	23.00 ^a
<i>E. colombiana</i>	0.48 ^b	1.64 ^a	3.91 ^b	1.66 ^a	32.07 ^a	2.15 ^a	1.68 ^b	12.75 ^a	26.50 ^a
Testigo bajo P	0.67 ^a	2.32 ^b	4.05 ^b	2.18 ^a	39.52 ^a	2.17 ^a	1.64 ^b	-	-
Testigo alto P	0.62 ^a	1.46 ^a	5.22 ^a	1.12 ^b	35.23 ^a	2.08 ^a	1.34 ^a	-	-
Coefficiente de variación	33.75	31.87	13.65	22.26	41.77	43.76	34.10	37.77	52.76

Según la prueba de Tukey, para la variable número de esporas totales no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, sin embargo, *Glomus* FC8 (18.25 esporas·g⁻¹ suelo) produce mas esporas, seguidos por *A. mellea* (15.50 esporas·g⁻¹ suelo) (Tabla 22).

Con el transcurso del tiempo del ensayo, entre los 90 y 180 ddt, se pudo observar el desarrollo de la fase mutualista, la cual se traduce en un desarrollo muy rápido de la plántula, como consecuencia del aumento del volumen radical y a un incremento en la eficiencia para la absorción de nutrientes y agua (Tabla 23, Figura 42). Estos datos

demuestran una respuesta favorable de la planta a cualquiera de los inóculos micorrícicos, en comparación con los fertilizantes químicos (P).

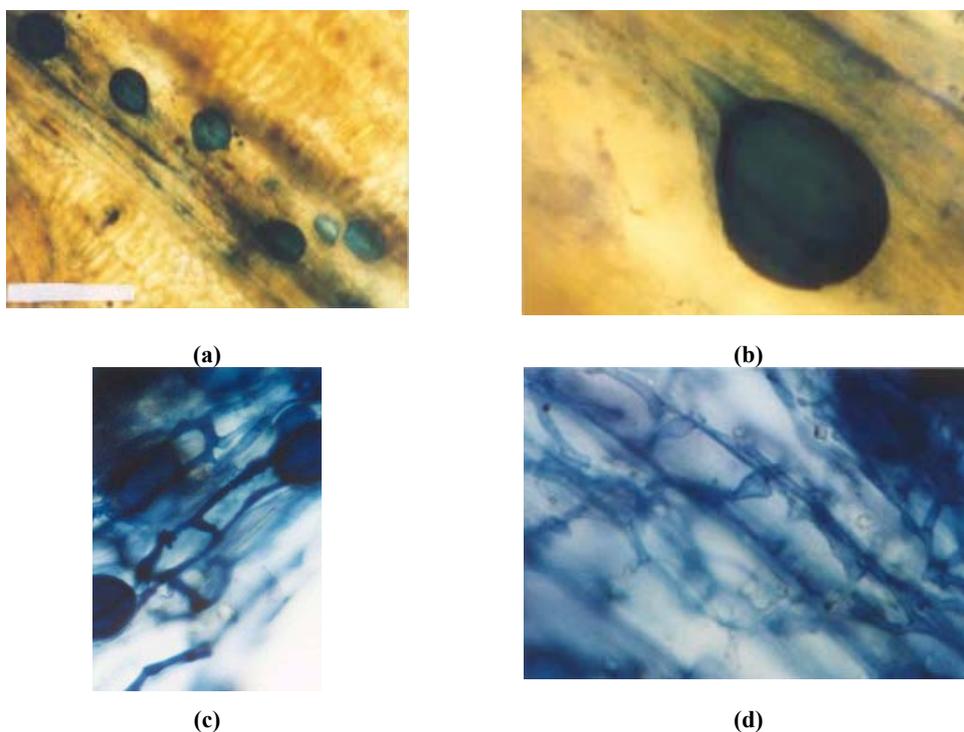


Figura. 42. Colonización por hongos MA. a) vesículas; b) vesícula en mayor detalle, c) vesículas y micelio intraradicular, d) micelio intraradicular

Es evidente que *E. colombiana* producía un efecto menor en todas las variables de respuesta estudiadas que el resto de los inóculos, aunque todos ellos superaron al testigo fertilizado con alta concentración de P en cuanto al desarrollo de la planta a los 180 ddt (Tabla 23).

De acuerdo con estos resultados se determinó seleccionar a *Glomus* sp FC8 como inoculante micorrícico por sus efectos sobre el desarrollo vegetal, por su nivel de colonización y mayor frecuencia asociado a las raíces de las plantas y zonas de estudio seleccionadas.

Dinámica de la población de los actinomicetos en co-inoculación con *Glomus* FC8 sp. Las poblaciones rizosféricas de actinomicetos fueron afectadas de forma significativa

por la micorrización. Particularmente, el establecimiento de *Streptomyces* MCR9 sp. experimentó un aumento significativo en co-inoculación con *Glomus* FC8 sp. mientras que la bacteria no afectó negativamente la colonización MA (Figura 43).

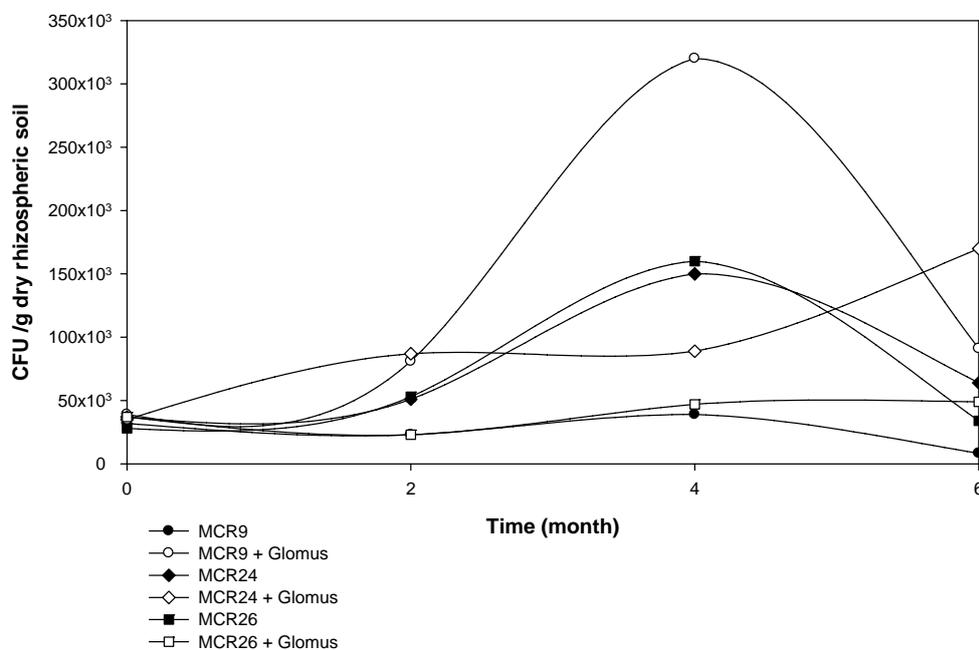


Figure 43. Dinámica de la población de los actinomicetos inoculados solos o en conjunto con *Glomus*.

Como muestra la Figura 43, *Glomus* FC8 sp. mejora el establecimiento de *Streptomyces* MCR9 sp., mientras que la micorrización con este inóculo disminuye significativamente la concentración de las poblaciones de *Streptomyces* MCR26 sp. y *Thermobifida* MCR24 sp.

El análisis de varianza entre tratamientos y según la prueba de Tukey, muestra diferencias significativas del porcentaje de colonización de plantas de trébol entre *Glomus* FC8 sp inoculado solo (34.25%) o en co-inoculación con MCR24 (47.25%), con MCR9 (44.75%) o con MCR26 (15.75%).

En la Figura 44, se observan las raíces colonizadas correspondientes a unos de los tratamientos inoculados y evaluados 180 ddt, destacándose la presencia de áreas de colonización.

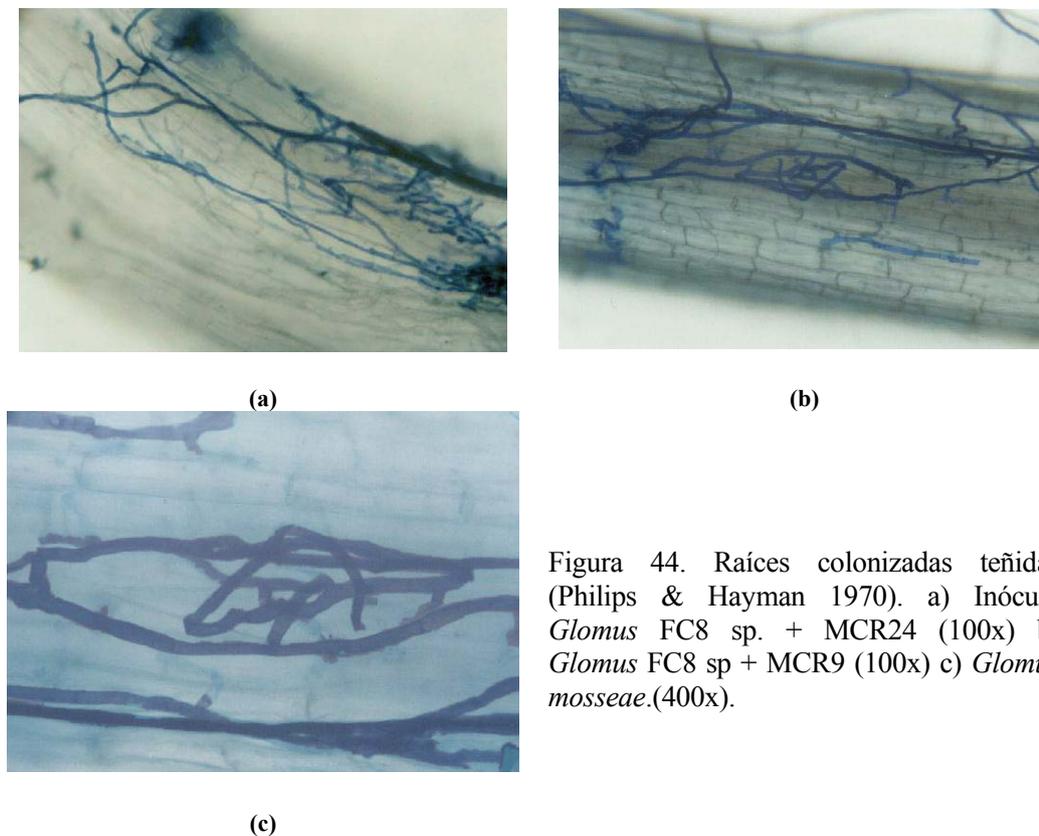


Figura 44. Raíces colonizadas teñidas (Philips & Hayman 1970). a) Inóculo *Glomus* FC8 sp. + MCR24 (100x) b) *Glomus* FC8 sp + MCR9 (100x) c) *Glomus mosseae*.(400x).

Es conocido que diferentes factores agro-ecológicos pueden afectar el establecimiento, desarrollo y extensión de la colonización micorrícica, entre los que se encuentran los factores abióticos, la fisiología de la planta y/o microorganismos rizosféricos. Lingua *et al.* (2008) afirman que bacterias como *Pseudomonas* promueven la micorrización manteniendo una alta densidad en su población, y que esta bacteria se le conoce que presenta una actividad antagonista contra hongos saprofitos, pero que en inoculación con las MA no les producen un efecto antimicrobiano. Este efecto es muy similar al comportamiento que presentan los actinomicetos aquí investigados.

Efectos de la co-inoculación de actinomicetos con *Glomus* FC8 sp. sobre el crecimiento y nutrición de las plantas. En la Tabla 24 se observa que la inoculación de actinomicetos en plantas no-MA o de *Glomus* como único bioinoculante, benefician el

crecimiento de la planta. La co-inoculación de actinomicetos interactuando con el hongo MA produce un efecto sinérgico, aunque este se manifiesta más patente a través del tiempo.

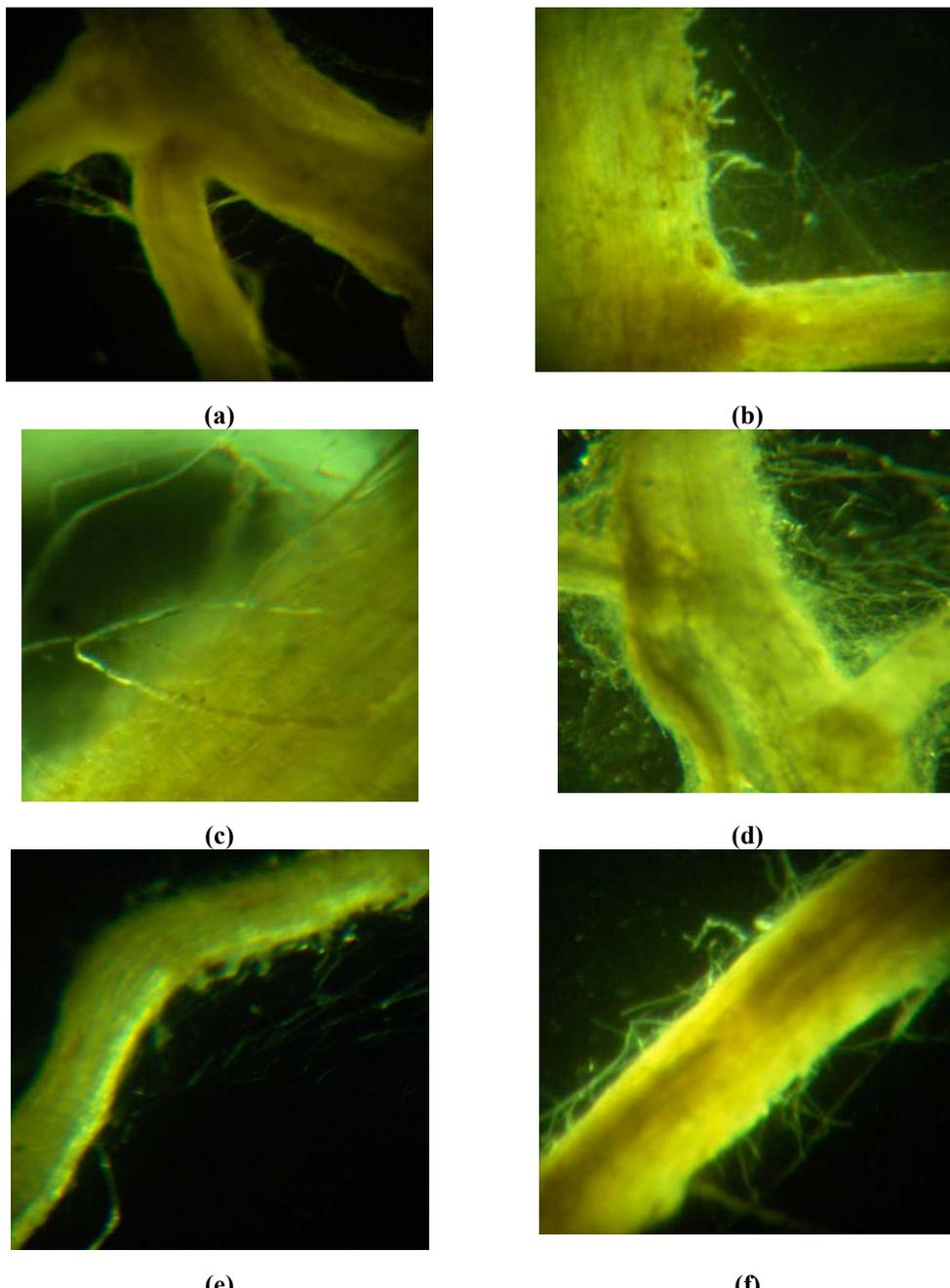
Tabla 24. Efecto de los actinomicetos sobre la formación de las micorrizas y la producción de biomasa de plantas de *Trifolium repens* L.. Evaluación realizada durante 6 meses bajo condiciones de invernadero. Test de Duncan para cada variable. Medias con igual letra no presentan diferencias significativas. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$

	Producción de Biomasa foliar (mg [peso seco] ⁻¹)*			Producción de Biomasa radicular (mg [peso seco] ⁻¹)*			Longitud de la raíz micorrizada (%) (mes)**		
	(mes)			(mes)					
	2	4	6	2	4	6	2	4	6
Control (none)	22 ^a	45 ^a	96 ^a	5 ^a	10 ^a	22 ^a	5 ^a	8 ^a	15 ^b
<i>Glomus</i> sp	98 ^c	146 ^c	185 ^b	8 ^a	24 ^b	36 ^b	35 ^b	46 ^b	58 ^c
<i>Glomus mosseae</i> (testigo comercial)	74 ^b	133 ^c	168 ^b	7 ^a	25 ^b	32 ^b	42 ^b	47 ^b	61 ^c
MCR9	45 ^b	90 ^b	189 ^b	7 ^a	21 ^b	46 ^b	3 ^a	5 ^a	0 ^a
MCR9+ <i>Glomus</i> sp	123 ^c	257 ^d	605 ^d	7 ^a	26 ^b	47 ^b	47 ^b	68 ^b	65 ^c
MCR24	65 ^b	132 ^c	252 ^c	6 ^a	17 ^b	35 ^b	0 ^a	7 ^a	4 ^a
MCR24+ <i>Glomus</i> sp	135 ^c	283 ^d	584 ^d	10 ^a	27 ^b	54 ^c	37 ^b	52 ^b	73 ^c
MCR26	32 ^a	85 ^b	210 ^b	8 ^a	22 ^b	41 ^b	3 ^a	5 ^a	3 ^a
MCR26+ <i>Glomus</i> sp	106 ^c	238 ^d	506 ^d	12 ^a	35 ^c	68 ^c	40 ^b	74 ^c	68 ^c

Tabla 25. Concentraciones de N y P (%) en planta (tallos y raíces) de *T. repens* inoculado con cepas de actinomicetos y *Glomus* sp. después de 6 meses de crecimiento vegetal. $P < 0.001$

	Control	<i>Glomus</i>	<i>G. mosseae</i> (testigo comercial)	MCR 9	MCR 24	MCR 26	<i>Glomus</i> FC8+ MCR 9	<i>Glomus</i> FC8+ MCR 24	<i>Glomus</i> FC8+ MCR 26
N (ppm)	1,7 ^a	2,8 ^b	2,6 ^b	2,5 ^b	2,7 ^b	2,3 ^{ab}	2,6 ^b	2,8 ^b	2,5 ^b
P (ppm)	0,19 ^a	0,31 ^b	0,22 ^a	0,18 ^a	0,33 ^b	0,15 ^a	0,44 ^c	0,48 ^c	0,27 ^b

Los resultados que se recogen en la Tabla 25 muestran el efecto beneficioso de todos los tratamientos sobre la nutrición vegetal. En cuanto al N no hay variación entre tratamientos, pero con respecto al P, la co-inoculación de hongos MA con *Thermobifida* MCR24 sp o *Streptomyces* MCR9 sp produce resultados estadísticamente superiores.



(a) (b)
(c) (d)
(e) (f)
Figura 45. Fotografías de microscopia de campo oscuro y contraste de fase de las raíces de trébol con los diferentes tratamientos evaluados en maceta. a) Control, b) MCR9 + *Glomus* FC8, c) *Glomus* FC8, d) MCR9, e) MCR24, f) *Glomus mosseae*.

Magnificación: 1. Longitud focal 69mm, abertura F/13, tiempo de exposición 4 seg, velocidad ISO ISO-400, modo de medición foco, origen de luz: tungsteno. 2. Longitud focal 69mm, abertura F/10, tiempo de exposición 30 seg, velocidad ISO ISO-400, modo de medición foco, origen de luz: tungsteno. 3.

La Figura 45 permite observar como la MA se estableció al igual que el actinomiceto. *Streptomyces* MCR9 sp. exhibe una mejor colonización de la raíz no-MA.

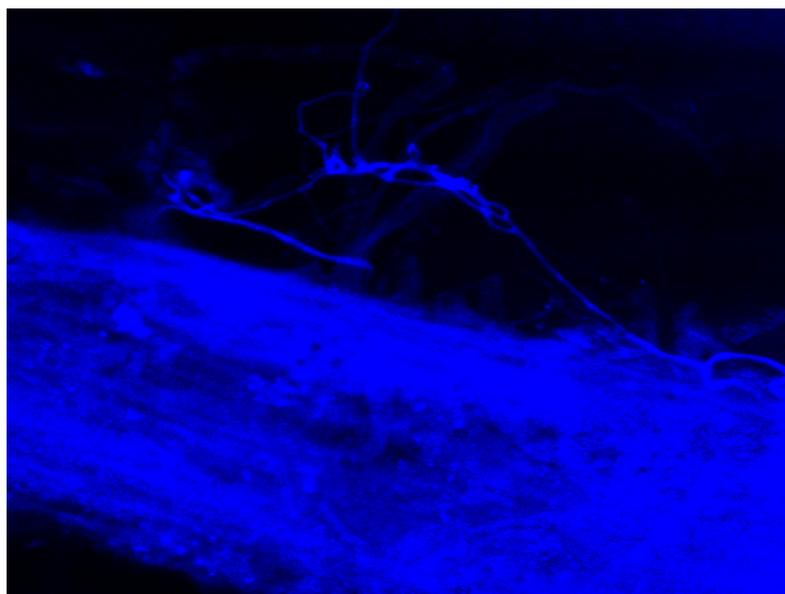
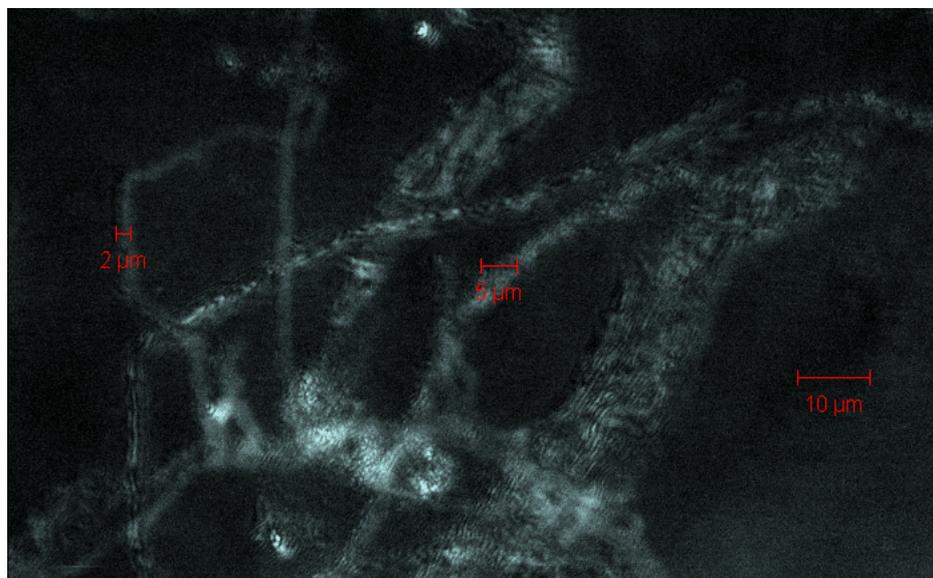


Figura 46. Fotografía de microscopía confocal de la interacción MCR24 + *Glomus* FC8 en raíces de trébol. Longitud de los filamentos de MCR24: 2 μm. Longitud de las hifas de *Glomus* sp: 5 μm

Mediante microscopía confocal se observó que cepas quitinolíticas y que presentaban antagonismo contra hongos no micorriza con pared de quitina, no provocaban una degradación de la pared del micelio de *Glomus* FC8 sp. ni del testigo comercial. Estos resultados concuerdan con otros trabajos donde han visualizado bacterias dentro de las MA y como colonias colonizando sobre las hifas fúngicas (Foster & Marks, 1966; Nurmiaho-Lassila *et al.*, 1997; Bonfante 2001). Diferentes estudios han indicado que los antagonistas microbianos de los patógenos fúngicos no presentan un efecto inhibitorio contra las AM (Barea *et al.*, 1998; Edwards *et al.*, 1998; Vazqu ez *et al.*, 2000; Barea *et al.*, 2002).

IV. DISCUSIÓN GENERAL

***“No tenía miedo a las dificultades:
lo que la asustaba era la obligación
de tener que escoger un camino.
Escoger un camino significaba
abandonar otro”***

Paulo Coelho

El trabajo de investigación que se resume en la presente Memoria de Tesis Doctoral, ha tenido como objetivo principal contribuir al conocimiento de los actinomicetos y sus interacciones con las raíces de las plantas en interacción con hongos formadores de micorrizas arbusculares (MA). La idea era analizar diferentes actividades metabólicas de aislados de actinomicetos autóctonos de suelos colombianos, que permitan fundamentar la catalogación de estos microorganismos como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. Para esta investigación, se ha utilizado el trébol blanco como planta modelo, ya que se ha usado en estudios básicos de interacciones microbianas. Además presenta numerosas ventajas al tener un ciclo de vida corto, ser fácil de crecer y micorrizar. Por otra parte es una planta cosmopolita que sirve de modelo para ensayos similares o complementarios.

Las bacterias filamentosas como los actinomicetos son microorganismos que han sido poco explorados en los procesos de interacciones a nivel rizosférico, aunque en los últimos años se ha generado interés en caracterizarlos como PGPR (El Tarabily & Sivasithamparam, 2006). Son muy pocas las investigaciones realizadas en este contexto y no hay estudios recientes que presenten resultados sobre los efectos que se pueden presentar en las interacciones de estos microorganismos con los hongos y/o la simbiosis MA. Los actinomicetos tienen la característica de sobrevivir a ambientes extremos, hecho que no es común para la mayoría de las bacterias. Por ello, es importante entender las relaciones rizosféricas que puedan ocurrir, máxime cuando a los actinomicetos se les reconoce un potencial metabólico alto. Además, muchos microorganismos utilizados como biofertilizantes presentan una inestabilidad en cuanto a viabilidad e infectividad generados por estreses medioambientales, mientras que los actinomicetos se propagan mejor bajo condiciones de estrés.

En el presente estudio se encontraron 30 aislados diferentes de actinomicetos en suelos de la zona central de alta montaña en Colombia. Estos fueron identificados por técnicas morfológicas y moleculares, e investigados para conocer su fisiología y morfología. Algunos de los géneros que se pudieron identificar en las claves dicótomas utilizadas no existen en los Manuales para identificación de género, incluidos los más usados como el Manual de Sistemática Bacteriológica de Bergey (Bergey & Hendricks, 1984), el Manual de Determinativa Bacteriológica de Bergey (Bergey *et al.*, 2000), ni tampoco en Prokaryotes (Kroppenstedt & Goodfellow, 1992). Esto se debe básicamente a que algunos géneros de actinomicetos han sido clasificados, reclasificados o agrupados en “clusters” o grupos diferentes basándose en los estudios genotípicos. Estos Manuales de

clasificación están basados en características morfológicas, quimiotaxonómicas, relaciones de hábitat e historia natural, que en algunos casos son parcialmente congruentes con los estudios filogenéticos (Penny & Haldeman, 1997).

Los resultados del ARDRA clasifican a algunos de los actinomicetos como pertenecientes al género *Thermobifida* el cual no se encuentra en los Manuales de clasificación mencionados, este género es propuesto por Zhenshui *et al.* (1998). Se propone la formación del género *Thermobifida* basándose en estudios filogenéticos, quimiotaxonómicos y evidencia fenotípica con las bacterias no filamentosas *Thermomonospora fusca* y *Thermomonospora alba* las cuales se reclasifican como *Thermobifida fusca* y *Thermobifida alba* respectivamente. Igualmente *Thermomonospora mesophila* se reclasifica como *Microbispora mesophila*. El género *Actinoalloteichus* tampoco se encuentra en los libros de clasificación dado que se propone la formación de éste en el año 2000 basándose en análisis filogenéticos (Tomohiko *et al.*, 2000). Lo mismo ocurre con el género *Thermocrispum*, el cual fue propuesto en 1995 y está compuesto por dos especies *Thermocrispum municipale* y *Thermocrispum agreste* (Korn *et al.*, 1995). Otras cepas son clasificadas como pertenecientes a alguno de los géneros *Actinoalloteichus*, *Actinopolyspora*, *Saccharopolyspora* o *Thermocrispum*. Sin embargo, observando las características de estos géneros se puede llegar a inferir que pertenecen al género *Saccharopolyspora*, los demás géneros se descartan pues el género *Actinopolyspora* solo contiene una especie halófila que no corresponde al hábitat de crecimiento de los aislamientos de este estudio. El género *Thermocrispum* exhibe producción de micelio aéreo blanco y micelio vegetativo amarillo, características que no se presentan en estas cepas y el género *Actinoalloteichus*, constituido por una sola especie, presenta fragmentación en el micelio aéreo y de sustrato, lo cual no se presenta en los aislamientos (Cook & Meyers, 2003).

Es un hecho comprobado que los metabolitos microbianos son fundamentales en las relaciones ecológicas entre microorganismos, y que ello es importante en el caso de los actinomicetos (Lehr *et al.*, 2008). En este trabajo se encontraron cepas de actinomicetos fijadores libres de nitrógeno, actividad solo reportada por Valdés *et al.* (2005) para una cepa de *Streptomyces thermoautotrophicus*, que no estaba asociada a las plantas. Esta cepa crecía en medio libre de nitrógeno pero no reducía acetileno aunque poseía la secuencia del gen *nifH*. Los 10 aislados de actinomicetos que se evidenciaron en el presente estudio con capacidad para crecer en medios libres de nitrógeno, procedían de la rizosfera y mostraron actividad nitrogenasa. Adicionalmente, Valdés *et al.* (2005)

detectaron que los aislados que se encontraban asociados a las plantas como endófitos si que mostraban actividad nitrogenasa. El potencial de los aislados nativos de actinomicetos para la fijación no simbiótica de nitrógeno, se contrasta con los datos de Mantilla (2008) que encuentra tasas de fijación en bacterias nativas del amazonas colombiano inferiores a las encontradas para los actinomicetos estudiados.

Adicionalmente, es de destacar la obtención de secuencias de ADN_r que alinean con las de clones de bacterias no cultivables, a los cuales se les ha secuenciado parcialmente los genes *nifH* que codifican para la dinitrogenasa y la proteína H ligada al hierro. La homología de muchos de los aislamientos con estas secuencias permite suponer que las cepas estudiadas en el presente trabajo, no corresponden con especies actualmente encontradas en las bases de datos; de modo que podría sugerirse que las bacterias diazótroficas encontradas en los suelos de bosque alto andino de la zona central colombiana constituyen una fuente de nuevas especies, mas cuando no existen siquiera datos de actinomicetos fijadores no simbióticos de nitrógeno en las bases de datos como el Gen Bank. Martínez-Romero (2006) menciona que la capacidad fijadora de nitrógeno está desigualmente distribuida dentro de los taxos procarióticos y las bacterias que fijan nitrógeno se encuentran restringidas a “clusters” cercanos a especies de bacterias no fijadoras, por ejemplo, la autora menciona a Firmicutes formadores de endosporas aerobios (bacterias gram positivas), en donde los fijadores se encuentran principalmente en un grupo discreto que corresponde a *Paenibacillus*, esto puede explicar porque se encuentran registros de bacterias diferentes a *Frankia* en las secuencias del gen *nifH* para los actinomicetos evaluados.

Como se conoce, la mayoría del nitrógeno fijado por rizobacterias no simbióticas suele ser retenido dentro de sus células en forma orgánica lo cual evita, al menos en parte, que sea directamente transferido a la planta, aunque finalmente pueda ser mineralizado por la microbiota del suelo (Mukerji *et al.*, 2006). Sin embargo, los efectos positivos de la inoculación de los actinomicetos seleccionados, incrementando la concentración de N en planta, permiten vislumbrar los beneficios basados en la capacidad de fijar N₂ de estas bacterias.

Los resultados beneficiosos de la inoculación de cepas de actinomicetos seleccionados sobre la promoción del crecimiento de las plantas (generando un sinergismo con *Glomus* FC8 sp) hacen pensar en la intervención de procesos tales como la fijación de N, solubilización de P, producción de sideróforos y de AIA, siendo los

mecanismos determinantes para evaluar la actividad PGPR. Concretamente el efecto PGPR de la producción bacteriana de AIA había sido reconocido previamente (Igarashi *et al.*, 2002; Schrey *et al.*, 2005). Es evidente que el AIA producido por los actinomicetos puede cooperar a dicha actividad beneficiosa para la planta. Como se indicó anteriormente, el AIA regula una gran variedad de procesos fisiológicos entre los cuales se encuentra la extensión celular, la división celular, la diferenciación vascular, la formación de raíces laterales, la dominancia apical y el fototropismo (Matsukawa *et al.*, 2007). Sin embargo se ha considerado que el AIA producido por la planta también puede influenciar el crecimiento de los actinomicetos asociados a su rizosfera. En los estudios de Matsukawa *et al.* (2007) se evaluó el efecto exógeno del AIA en la morfogénesis y la producción de metabolitos secundarios en *Streptomyces purpurascens* NBRC 13077. Concretamente, en dicho estudio se encuentra que el AIA en concentraciones entre 1 y 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ estimula la formación de micelio aéreo y la producción de metabolitos secundarios en esta bacteria con respecto a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger*. De ahí, que los actinomicetos durante la estimulación para la producción de AIA, produjeran una alta concentración de biomasa, aunque los valores de producción de la hormona no fueran altos, si hubo producción. Estos resultados sugieren que el AIA puede actuar como un regulador común en la morfogénesis y la producción de metabolitos secundarios de la bacteria, dos factores que participan en las interacciones microbiológicas.

Los mecanismos que se han descrito para la solubilización de fosfatos por microorganismos, es decir, la producción de ácidos orgánicos y la de fosfatasas dependen de la naturaleza del P en el suelo (Whitelaw, 2000; Gyaneshwar *et al.*, 2002; Tiesen 2008) y han quedado patentes para los actinomicetos evaluados en el presente estudio. Los actinomicetos pueden actuar por cualquiera de estas vías. Por ejemplo, *Thermobifida* sp. MCR24 que no evidenció actividad fosfatasa, beneficia la captación de P por la planta, lo que puede sugerir que *Thermobifida* sp. MCR24 expresa mecanismos diferentes para la solubilización de este elemento, como lo pueden ser los ácidos orgánicos quelantes, mientras que las cepas de *Streptomyces* (MCR9 y MCR26) actúan mediante la producción de fosfatasas para la solubilización de fosfatos orgánicos.

La correlación de la reducción de acetileno y solubilización de fósforo para las 30 cepas indicó un índice de coeficiente de correlación de Pearson de -0.198, un valor muy bajo que indicó que no existe una relación entre las variables. Teniendo en cuenta que la determinación de AIA y sideróforos de hidroxamato se llevó a cabo solamente en las

cepas que presentaron reducción de acetileno, esta variable no se tuvo en cuenta para el análisis de correlación, pues su valor es positivo para todas las cepas. En general las correlaciones determinadas son muy bajas, aunque una excepción fue la de AIA y Sideróforos con un valor de 0.833.

Para correlacionar los datos obtenidos de la producción de AIA y sideróforos por los actinomicetos utilizados sobre las variables longitud del sistema radicular y aéreo y peso seco del sistema radicular y aéreo se utilizó el método de correlación de Pearson. Para ninguna de las variables se encuentra una correlación significativa, sin embargo para poder verificar esto, se necesitaría realizar pruebas determinando la presencia de estas moléculas producidas por estas bacterias filamentosas en las raíces de las plantas. Los estudios de Crowley *et al.* (1987) muestran la capacidad de promoción de crecimiento de plantas de avena con la adición de Ferrioxamina B, sideróforo tipo hidroxamato, en concentraciones de 5 μmol y confirman el sistema de transporte de hierro que funciona entre las plantas y los microorganismos. La producción *in vitro* de sideróforos de tipo hidroxamato de las cepas evaluadas determinó que se produjeron cantidades elevadas, por lo cual se infiere que pudo ser un factor que influyó en el crecimiento vegetal.

Más de 10 especies distintas de *Streptomyces* han sido investigadas como productoras de sideróforos de tipo desferrioxamina y solo en los últimos años se ha estudiado la producción de sideróforos de otro tipo de estructura como hidroxamatos, catecolatos, hidroxicarboxilatos y tiazolinas por parte de especies de este género. Los análisis *in silico* del genoma de *S. coelicolor* sugiere que la biosíntesis de sideróforos de diversos tipos es posible a partir de este microorganismo (El Tarabily & Sivasithamparam, 2006).

Según Whipps (2001), Nawani *et al.* (2002) y El-Tarabily (2003) la resistencia a sustancias antagónicas, tales como las quitinasas, puede ser una característica importante para microorganismos que colonizan la rizosfera. Este hecho puede explicar algunos de los resultados obtenidos en cuanto a establecimiento de ciertas cepas en la rizosfera, como es el caso de *Streptomyces* MCR9 sp. Esta bacteria antagoniza hongos patógenos pero produce una interacción beneficiosa con *Glomus* FC8 sp. tanto *in vitro* como en co-inoculación, con lo cual se mejora el crecimiento de las plantas y su estado nutricional.

El hecho de que algunos actinomicetos antagonistas de patógenos sean también productores de sustancias promotoras del crecimiento vegetal y MHB, es importante para ayudar a las plantas a sobrellevar las condiciones adversas y el ataque de los patógenos

con beneficios para la planta y para la micorrización (Igarashi *et al.*, 2002). Concretamente, se ha descrito que *Streptomyces* spp. actúan mejorando el estado fisiológico de la planta, su micorrización y controlando el desarrollo de las enfermedades de las plantas (Yuan *et al.*, 1995; Tokala *et al.*, 2002; Schrey *et al.*, 2005; Riedlinger *et al.*, 2006; Lehr *et al.*, 2007). La influencia positiva de *Streptomyces* sp GB 4-2 sobre el crecimiento de hongos MA y la colonización temprana de las raíces de las plantas justifica que se pudieran catalogar estas bacterias como MHB (Garbaye, 1994, Frey-Klett *et al.* 2007), aunque esta actividad se ha estudiado muy poco. De hecho se ha visto que uno de los factores que afectan la germinación y establecimiento de las MA es la interacción con otros microorganismos del suelo como bacterias y hongos (Walley & Germida, 1996; Azcón-Aguilar & Barea, 1992).

Se ha descrito que la habilidad de las bacterias para estimular el crecimiento del micelio de los hongos MA está correlacionado con el efecto MHB (Schrey *et al.*, 2005), como sucede en ectomicorrizas (Richter *et al.*, 1989). Tal característica de MHB podría adjudicarse a *Thermobifida* MCR24 sp, que aunque mostró *in vitro* un efecto negativo en cuanto a la germinación de las esporas de *Glomus* FC8 sp., benefició de forma significativa el desarrollo hifal por espora germinada, y evidenció un efecto positivo sobre la formación de la MA y el desarrollo vegetal, reflejado en la producción de biomasa y en la nutrición. Por el contrario *Streptomyces* MCR26 que mostró efectos positivos en relación a la germinación de las esporas de *Glomus* sp, en los ensayos *in planta* no mostró efecto sinérgico con el hongo MA.

Las fotografías de microscopía presentadas demuestran que los actinomicetos se adhieren más a las estructuras fúngicas que a las plantas. Lehr *et al.* (2008) observaron la colonización de raíces de *Picea abis* (*Picea* Noruega) y la adherencia de *Streptomyces* sp GB 4-2 caracterizando esta bacteria como un microorganismo endofítico. Adicionalmente, estudios previos (Lehr *et al.*, 2007) habían demostrado que la misma cepa de *Streptomyces* promueve la extensión del micelio de ectomicorrizas.

Los resultados encontrados en la presente investigación apoyan, por tanto, interacciones tanto entre planta-microorganismo, ya sean actinomicetos o hongos MA, (rizosfera), como MA-actinomicetos (micosfera), para desarrollar una auténtica micorrizosfera (Barea *et al.*, 2005) que promueve el crecimiento y nutrición de las plantas.

V. CONCLUSIONES

1. Se han aislado (en suelos de Colombia) e identificado 30 cepas de actinomicetos, el 68% de las cuales corresponden al género *Streptomyces*.

2. El 36.6% de los actinomicetos aislados son fijadores de nitrógeno, ya que son capaces de utilizar el N₂ atmosférico como única fuente de N para su crecimiento.

3. El 65.63% de los actinomicetos aislados solubilizan fosfatos por medio de la generación de ácidos característicos de su metabolismo; el 31.25% de ellos también solubiliza P por medio de actividades enzimáticas.

4. La mayor parte de las cepas evaluadas producen AIA y sideróforos siendo las más representativas *Streptomyces* MCR14 sp, máxima productora de AIA, y *Thermobifida* MCR24 sp, máxima productora de sideróforos de tipo hidroxamato.

5. Se evidenció la capacidad de los actinomicetos de inhibir *in vitro* el crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos por mecanismos diferentes a la producción de quitinasas.

6. Como consecuencia de las actividades reseñadas en Conclusiones anteriores, las cepas de actinomicetos seleccionadas promueven el crecimiento vegetal por lo que pueden ser consideradas PGPR.

7. La inoculación de *Glomus* FC8 sp. tiene un efecto variable sobre el establecimiento de los actinomicetos, dependiendo de la cepa de estas bacterias aunque no del hongo.

8. Las cepas de actinomicetos seleccionados mejoran la germinación de esporas de hongos MA y/o el desarrollo del micelio emergente de esas esporas, así como la colonización MA en plantas de trébol.

9. La co-inoculación de los actinomicetos y *Glomus* sp. seleccionados produjo un efecto beneficioso sinérgico sobre el crecimiento y nutrición de las plantas de trébol.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott LK.** (1982). Comparative anatomy of vesicular-arbuscular mycorrhizas formed on subterranean clover. *Australian Journal of Botany*. **30**:485-499.
- Abdel-Fatah GM, Mohamedin AH.** (2000). Interactions between a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) and *Streptomyces coelicolor* and their effects on sorghum plants grown in soil amended with chitin of brawn scales. *Biol Fertility Soils* **32**:401-409
- Ahmad F, Ahmad I, Saghir M.** (2005). Indole Acetic Production by the Indigenous Isolates of *Azotobacter* and Fluorescent *Pseudomonas* in the Presence and Absence of Tryptophan. *Turkish Journal of Biology*. **29**:29-34.
- Alexander M.** (1980). Introducción a la Microbiología del Suelo. *AGT Editores*, México pp. 234-362
- Alguacil MM, Caravaca F, Roldán A.** (2005) Changes in rhizosphere microbial activity mediated by native or allochthonous AM fungi in the reforestation of a Mediterranean degraded site. *Biology and Fertility of Soils*, **41**: 59–68.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang Z, Miller W. Lipman DJ.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, **25**:3389–3402.
- Ames RN.** (1989). Mycorrhiza development in onion in response to inoculation with chitin-decomposing Actinomycetes. *New Phytologist*, New York, **112**:423-427
- Anderson AS, Wellington EMH.** (2001). The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**:797–814.
- Andrade G, Mihara KL, Linderman RG, Bethlenfalvay GJ.** (1997). Bacteria from rhizosphere and hyphosphere soils of different arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, **192**:71–79.
- Aranibar JN, Anderson IC, Ringrose S, Macko SA.** (2003). Importance of nitrogen fixation in soil crusts of southern African arid ecosystems: acetylene reduction and stable isotope Studies. *Journal of Arid Environments* **54**:345–358
- Arines J, Porto A, Vilariño A.** (1992). Effect of manganese on vesicular-arbuscular mycorrhizal development in red clover plants and on soil MN-oxidizing bacteria. *Mycorrhiza*, 127-131
- Artursson V, Finlay RD, Jansson JK.** (2005) Combined bromodeoxyuridine immunocapture and terminal restriction fragment length polymorphism analysis highlights differences in the active soil bacterial metagenome due to *Glomus mosseae* inoculation or plant species. *Environ Microbiol* **7**: 1952–1966.
- Artursson V, Finlay RD, Jansson JK.** (2006). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology* **8**: 1–10.
- Aspray TJ, Frey-Klett P, Jones JE, Whipps JM, Garbaye J, Bending GD.** (2006). Mycorrhization helper bacteria: a case of specificity for altering ectomycorrhiza architecture but not ectomycorrhiza formation. *Mycorrhiza* **16**: 533-541
- Atalan E.** (2001). Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis (RFLP) of some *Streptomyces* strains from soil. *Turky Journal of Biology*. **25**:397-404.

- Atkin CL, Neilands JB, Phaff HJ.** (1970). Rhodotorulic Acid from Species of *Leucosporidium*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus* and *Sporobolomyces*, and a New Alanine-Containing Ferrichrome from *Cryptococcus melibiosum*. *Journal of Bacteriology*. **103**; **3**: 722 – 733
- Atlas RM.** (1995). Handbook of media for Environmental Microbiology. *CRC Press*. Florida, págs. 353
- Atlas RM.** (2002). Ecología microbiana y microbiología ambiental. 4a ed. *Pearson Educación SA*. Madrid, España pp. 429-430
- Azcón R, Barea JM.** (1997). Mycorrhizal dependency of a representative plant species in a Mediterranean shrublands (*Lavanduca spica* L.) as key factor to its use for revegetation strategies in a desertification-threatened areas. *Applied Soil Ecology* **7**: 83-92
- Azcón R, Borie F, Barea JM.** (1982). Exocellular phosphatase activity of lavender and wheat roots as affected by phytate and mycorrhizal inoculation. En: *Les Mycorrhizes: Biologie et Utilization* (S. Gianinazzi, V. Gianinazzi-Pearson and A. Trouvelot, Eds). INRA, Dijon pp. 83-85
- Azcón R, El-Atrash F.** (1997). Influence of arbuscular mycorrhizal and phosphorus fertilization on growth, nodulation and N₂ fixation (15N) in *Medicago sativa* at four salinity levels. *Biol. Fert. Soil*. **24**:81-86
- Azcón-Aguilar C, Bago B.** (1994) Physiological characteristics of the host plant promoting an undisturbed functioning of the mycorrhizal symbiosis. En: *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems*. S Gianinazzi, H Schüepp (eds), Birkhäuser-Verlag, Basel, pp 47-60
- Azcón-Aguilar C, Barea JM.** (1985). Effect of soil microorganisms on formation of VA mycorrhizas. *Trans. British Mycol. Soc.*, **84**:536-539.
- Azcón-Aguilar C, Barea JM.** (1992). Interaction between Mycorrhizal fungi and other rhizosphere microorganisms. En: *Mycorrhizal functioning: An interpretative plant-fungal process*. *MF Allen (Ed.) Chapman & Hall*, New York. pp. 163-198
- Azcón-Aguilar C, Barea JM.** (1996) Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens - An overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* **6**: 457-464
- Azcón-Aguilar C, Diaz-Rodríguez RM, Barea JM.** (1986a) Effect of free-living fungi on the germination of *G. mosseae* on soil extract. En: *Physiological and genetical aspects of mycorrhizal*. *Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S (eds)*, INRA, Paris, pp 515-519
- Azcón-Aguilar C, Díaz-Rodríguez RM, Barea JM.** (1986b) Effect of soil microorganisms on spore germination and growth of the VA mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **91**:337-340
- Azcón-Aguilar C, Palenzuela J, Roldan A, Bautista S., Vallejo R., Barea JM.** (2002). Analysis of the mycorrhizal potential in the rizosphere of representative plant species from desertification-threatened Mediterranean shrublands. *Applied Soil Ecology*. **21**: 1-9.
- Barea JM, Andrade G, Bianciotto V, Dowling D, Lohrke S, Bonfante P, O’Gara F, Azcón-Aguilar C.** (1998) Impact on arbuscular mycorrhiza formation of *Pseudomonas* strains used as inoculants for the biocontrol of soil-borne plant fungal pathogens. *Appl. Environm. Microbiol.*, **64**:2304-2307

- Barea JM, Azcón R, Azcón-Aguilar C.** (2004). Mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria. En: *Plant Surface Microbiology (A. Varma, L. Abbott, D. Werner, R. Hampp Eds)* Springer-Verlag, Heidelberg, Alemania. pp. 351-371.
- Barea JM, Azcón-Aguilar C.** (1982) La rizosfera: Interacciones microbio-planta. *Anal. Edafol. Agrobiol.* **41**:1517-1532
- Barea JM, Azcón-Aguilar C.** (1983). Interactions between phosphate solubilizing bacteria and VA mycorrhiza to improve plant utilization of rock phosphate in non-acidic soils. *3rd international congress on phosphorous compounds*, Brussels, 4-6 Oct. pp. 127-144
- Barea JM, Ferrol N, Azcón-Aguilar C, Azcón R.** (2008). Mycorrhizal symbioses. En: *The Ecophysiology of Plant-Phosphorus interactions. P.J. White, JP.Hammond (Eds).* Springer Science. pp. 143-166
- Barea JM, Gryndler M, Lemanceau Ph, Schüepp H, Azcon R.** (2002). The rizosphere of mycorrhizal plants. En: *Mycorrhiza Technology in Agriculture: from Genes to Bioproducts. Gianinazzi S, Schüepp H, Barea JM, Haselwandter K, eds.* Basel, Switzerland: Birkhäuser Verlag, 1-18.
- Barea JM, Honrubia M.** (2004). La micorrización dirigida de la planta forestal. En: *Avances en el Estudio de la Gestión del Monte Mediterráneo (R. Vallejo, J.A Alloza Eds.)* Fundación Centro de Estudios Ambientales del Mediterráneo – CEAM, Valencia, España. pp. 215-260.
- Barea JM, Jeffries P.** (1995). Arbuscular mycorrhizas in sustainable soil plant systems. En: *Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology. Varma A, Hock B, eds.* Heidelberg: Springer-Verlag, 521-559.
- Barea JM, Olivares J.** (1998). Manejo de las propiedades biológicas del suelo. En: *Agricultura sostenible. RM. Jiménez-Díaz, J. Lamo de Espinosa (Eds.)* Mundi prensa. Madrid. pp. 173-193.
- Barea JM, Pozo MJ, Azcon-Aguilar C.** (2005). Microbial cooperation in the rizosphere. *J. Expe: Bot.* **56**: 1778-1784
- Barea JM, Requena N, Jimenez I.** (1995). A revegetation strategy based on the management of arbuscular mycorrhizae, *Rhizobium* and rhizobacterias for the reclamation of desertified Mediterranean shrubland ecosystems. En: *La mycorrhization des plantes forestieres en Milieu Aride et semi-aride et la lutte contre la desertification dans le Bassin Mediterranéen. Volumen 20.*
- Barea JM, Toro M, Azcón R.** (2007). The use of ³²P isotopic dilution techniques to evaluate the interactive effects of phosphate-solubilizing bacteria and mycorrhizal fungi at increasing plant P availability. En: *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Series: Developments in Plant and Soil Sciences. (E. Velázquez, C. Rodríguez-Barrueco Eds.)* ISBN: 978-1-4020-4019-1. Springer. Dordrecht, The Netherlands, 287: 223-227.
- Barea JM.** (1997) Mycorrhiza/bacteria interactions on plant growth promotion. En: *Plant Growth.Promoting Rhizobacteria, Present Status and Future Prospects. Ogoshi A, Kobayashi L, Homma Y, Kodama F, Kondon N, Akino S (eds), OCDE, Paris, pp 150-158*
- Barea JM.** (2000). Rhizosphere and mycorrhiza of field crops. En: *Biological Resource Management: Connecting Science and Policy. (Balázs E, Galante E, Lynch JM, Schepers JS, Toutant JP, Werner D, Werry PA Th J, eds)* Berlin, Heidelberg, New York: INRA Editions, Springer-Verlag, 110-125.

- Barea JM.** (2001). Rhizosphere and mycorrhizal of field crops, En: Biological Resource Managements, Connecting Science and Policy. *Toutant P, Balazs E, Galante E, Lynch JM, Shepers JS, Werner D, Werry PA* (eds), (OECD) INRA Edition and Springer. Heidelberg, pp 110-125
- Barona-Gómez F, Lautru S, Francou FX, Leblond P, Pernodet JL, Challis GL.** (2006). Multiple Biosynthetic and Uptake Systems Mediate Siderophore-dependent Iron Acquisition in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) and *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877. *Microbiology*. **152**:3355–3366
- Bashan Y, Holguin G.** (1998). Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry*, **30**:1225–1228.
- Bashan Y, Levanony H.** (1990). Current status of *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.* **36**: 591 -608
- Bayona A.** (2003). Conservación y Mantenimiento de Cepas Microbianas con Fines Docentes e Investigativos. *Laboratorio Actual*. **20**; **36**:35-39
- Bécard G, Pfeffer PE.** (1993). Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi durin *in vitro* development. *Protoplasma*, **174**:62-68
- Bécard G., Fortín JA.** (1998). Early events of vesicular arbuscular mycorrhiza formation on ri T DNA transformed roots. *New Phytologist*. **108**:211-218
- Beilby JP, Kidby DK.** (1982). The early synthesis of RNA, protein and some associate metabolic events in germinating vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spores of *Glomus caledonius*. *Can J. Microbiol.* **28**:623-628
- Bending GD, Poole EJ, Whipps JM, Read DJ.** (2002). Characterisation of bacteria from *Pinus sylvestris-Suillus luteus* mycorrhizas and their effects on root-fungus interactions and plant growth. *FEMS Microbiology and Ecology*. **39**:219-227
- Ben-Omar N, Merroun ML, Arias Peñalver JM, Gonzalez Muñoz MT.** (1997). Comparative heavy metal biosorption study of Brewery yeast and *Myxococcus xanthus* biomass. *Chemosphere*. Vol. **35**, **10**:2217-2283
- Bergey J, Hendricks D, Holt J.** (2000). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. novena edición. Editorial Lippincott. Williams & Wilkins. Philadelphia
- Bergey J, Hendricks D.** (1984). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 2. *Editorial William & Wilkins*. Baltimor Filadelfia, USA
- Bertrand H, Plassard C, Pinochet X, Touraine B, Normand P, Cleyet-Marel JC.** (2000). Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp.). *Can J Microbiol* **46**:229–236
- Bethlenfalvay GJ, Schüepp H.** (1994). Arbuscular mycorrhizas and agrosystem stability impact os Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Nastural Ecosystems (*S. Gianinazzi, H. Schüepp eds.*) Birkh, user Verlag, Basel, Switzerland 117-131
- Bolán NS.** (1991). A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plan Soil*. **134**:189-207

- Bonfante Fasolo P.** (2001). At the interface between Mycorrhizal fungi and plants: the structural organization of the cell wall, plasma membrane and cytoskeleton. *The Mycota IX, Fungal Associations Hock* (Ed.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 45-61.
- Bradford MM.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**:248–254.
- Bric J, Bostock R, Silverstone S.** (1991). Rapid in situ assay for Indoleacetic acid Production by Bacteria Immobilized Nitrocellulose Membrane. *Applied and Environmental Microbiology*. **57**; 2:535-538
- Brulé C, Frey-Klett P, Pierrat JC, Courrier S, Gérard F, Lemoine MC, Rousselet JL, Sommer J, Garbaye J.** (2001). Survival in the soil of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* and effect of a mycorrhiza helper *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biology and Biochemistry* **33**:1683-1694
- Brundett MC, Ashwath N, Jasper DA.** (1996). Mycorrhizas in the Kakadu region of tropical Australia. I. Propagules of mycorrhizal fungi and soil properties in natural habitats. *Plant and soil* **184**:159-171
- Bryla DR, Koide RT.** (1998). Mycorrhizal response of two tomato genotypes relates to their ability to acquire and utilize phosphorus. *Annals of Botany* **82**:849–857.
- Budi SW, van Tuinen D, Martinotti MG, Gianinazzi S.** (1999). Isolation from the *Sorghum bicolor* mycorrhizosphere of a bacterium compatible with arbuscular mycorrhiza development and antagonistic towards soil-borne fungal pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:148–150
- Bürgmann H, Widmer F, Von Sigler W, Zeyer J.** (2004). New Molecular Screening Tools for Analysis of Free – Living Diazotrophs in soil. *Applied and Environmental Microbiology*. **70**, **1**: 240–247
- Burke DJ, Kretzer AM, Rygielwicz PT, Topa MA.** (2006). Soil bacterial diversity in a loblolly pine plantation: Influence of ectomycorrhizas and fertilization. *FEMS Microbiology Ecology* **57**:409-419
- Bürkett B, Robson A.** (1994). Zn uptake in subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) by three vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in a root-free sandy soil. *Soil Biol. Biochem.* **26**:1117-1124
- Cafaro MJ, Currie CR.** (2005). Phylogenetic Analysis of Mutualistic Filamentous Bacteria Associated with Fungus-Growing Ants. *Canadian Journal of Microbiology*; **51**; 6:441-446
- Calvet C, Barea JM, Pera J.** (1992). *In vitro* interactions between the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and some saprophytic fungi isolated from organic substrates. *Soil Biol. Biochem.* **24**:775-780
- Calvet C, Pera J, Barea JM.** (1993). Growth response of marigold (*Tagetes erecta* L.) to inoculation with *Glomus mosseae*, *Trichoderma aureoviride* and *Pythium ultimum* in a peat-perlite mixture. *Plant and Soil* **148**:1–6.
- Carpenter-Boggs L, Loynachan TE, Stahl PD.** (1995). Spore germination of *Gigaspora margarita* stimulated by volatiles of soil-isolated actinomycetes. *Soil Biology and Biochemistry* **27**:1445-1451
- Carson KC, Meyerb JM, Dilwortha MJ.** (2000). Hydroxamate Siderophores of Root Nodule Bacteria. *Soil Biology and Biochemistry* **32**:11-21
- Cattelan A.J, Hartel PG, Fuhrmann JJ.** (1999). Screening for Plant Growth Promoting Rhizobacteria to Promote Early Soybean Growth. *Soil Science Society*. **63**:1670–1680

- Cavaletti L, Monciardini P, Bamonte R, Schumann P, Rohde M, Sosio M, Donadio S.** (2006). New Lineage of Filamentous, Spore-Forming, Gram-Positive Bacteria from Soil. *Applied and Environmental Microbiology*. **72**:4360-4369.
- Celis L, Gallardo I.** (2007). Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (Ácido indol acético y Giberelinas) en cultivos microbianos. *Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana*. Bogotá D.C.
- Celis L, Gallardo I.** (2007). Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (Ácido indol acético y Giberelinas) en cultivos microbianos. *Trabajo de Grado de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana*. Bogotá D.C.
- Clawson ML, Benson DR.** (1999). Natural Diversity of Frankia Strains in Actinorhizal Root Nodules from Promiscuous Hosts in the Family Myricaceae. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**; **10**:4521-4527
- Clawson ML, Caru M, Benson DR.** (1998). Diversity of Frankia Strains in Root Nodules of Plants from the Families Elaeagnaceae and Rhamnaceae. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**; **9**:3539 – 3543
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Clement C, Ait Barka E.** (2005). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**; **9**:4951–4959.
- Cook A, Meyers P.** (2003). Rapid identification of filamentous Actinomycetes to the genus level using genus-specific 16S rRNA gene restriction fragment patterns. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **53**:1907–1915
- Cooke JC, Gemma JN, Koske RE.** (1987). Observations of nuclei in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia* **79**:331-333
- Cramer RG, Hinterman G, Hutter R.** (1983). Deoxyribonucleic acid restriction endonuclease fingerprint characterization of Actinomycete strains. *FEMS Microbiology Letters* **23**:652-655
- Crowley D, Reid P, Szanislo P.** (1987) Utilization of Microbial Siderophores in Iron Acquisition by Oat. *Plant Physiology*. **87**:680-685
- Cuevas F, Medina N, Díaz G, Mojerón R.** (2000). Efecto de la biofertilización con hongos micorrizógenos (MA) en el cultivo del tomate. *Avances CIGET*. Pinar del Río. 2 (4). La Habana, Cuba
- Charter K, Hopwood D.** (1993). *Bacillus subtilis* and other Gram positive bacteria. Chapter 6. *Streptomyces* Washington
- Chen YP, Rekha PD, Arun AB, Shen FT, Lai WA, Young CC.** (2006). Phosphate Solubilizing Bacteria from Subtropical Soil and their Tricalcium Phosphate Solubilizing Abilities. *Applied Soil Ecology* **34**:33–41.
- Christensen H, Jakobsen I.** (1993). Reduction of bacterial growth by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in the rhizosphere of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Biol. Fertil. Soils* **15**: 253-258
- Davies J.** (1994). Inactivation of Antibiotics and the Dissemination of Resistance Genes. *Science*. **264**; **5157**:375–382.

- De Boer W, Verheggen P, Klein Gunnewiek PJA, Kowalchuk GA, van Veen JA.** (2003) Microbial community composition affects soil fungistasis. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:835–844.
- De La Cruz J, Hidalgo-Gallego A., Lora JM, Benitez T, Pintor-Toro JA, Liobell A.** (1992). Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. *European Journal of Biochemistry*, **206**:859-867.
- De Los Santos P, Bustillos, 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
- De Voss J, Rutter K, Schroeder BG, Su H, Zhu Y, Barry CE.** (1999). The salicylate-derived mycobactin siderophores of *Mycobacterium tuberculosis* are essential for growth in macrophages. *PNAS*. **97**; **3**:1252-1257
- Demain A., Piret J.** (1983). Why secondary metabolism Genetics of industrial microorganisms. *Journal of Food Safety*. **5**:361-362
- Di Pietro A, Lorito M, Hayes CK, Broadway RM, Harman GE.** (1993). Endochitinase from *Gliocladium virens*: Isolation, Characterization, and Synergistic Antifungal Activity in Combination with Gliotoxin. *Phytopathology*. **83**: 308-313.
- Diallo MD, Willems A, Vloemans N, Cousin S, Vandekerckhove TT, de Lajudie P, Neyra M, Vyverman W, Gillis M, Van der Gucht K.** (2004). Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the N₂-fixing bacterial diversity in soil under *Acacia tortilis* ssp. *raddiana* and *Balanites aegyptiaca* in the dryland part of Senegal. *Environ Microbiol* **6**:400–415
- Dick WA, Cheng L, Wang P.** (2000). Soil Acid and Alkaline Phosphatase Activity as pH Adjustment Indicators. *Soil Biology and Biochemistry*. **32**:1915–1919
- Dobbelaere S, Vanderleyden J, Okon Y.** (2003) Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit Rev Plant Sci* **22**:107–149.
- dos Santos K, Marin VA, Baldani JI.** (1998). Nitrogenase: Bioquímica do processo de FBN. (Embrapa – CNPAB. Documentos, 84 - ISSN 0104-6187). *Seropédica: Embrapa Agrobiologia*, 25p.
- Duponnois R, Garbaye J.** (1990). Some mechanisms involved in growth stimulation of ectomycorrhizal fungi bacteria. *Canadian Journal of Botany* **68**:2148-2152
- Edwards SG, Young JPW, Fitter AH.** (1998). Interactions between *Pseudomonas fluorescens* biocontrol agents and *Glomus mosseae*, an arbuscular mycorrhizal fungus, within the rhizosphere. *FEMS Microbiology Letters* **116**:297–303.
- Elmer WH.** (2002). Influence of formononetin and NaCl on mycorrhizal colonization and *Fusarium* crown and root rot of asparagus. *Plant Disease* **86**:1318–1324.
- El-Tarabily KA, Nassar AH, Hardy GESTJ, Sivasithamparam K.** (2003) Fish emulsion as a food base for rhizobacteria promoting growth of radish (*Raphanus sativus* L. var. *sativus*) in a sandy soil. *Plant Soil* **252**:397–411
- El-Tarabily KA, Nassar AH, Sivasithamparam K.** (2008) Promotion of growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a calcareous soil by a phosphate-solubilizing, rhizospherecompetent isolate of *Micromonospora endolithica*. *Appl Soil Ecol* **39**:161–171

- El-Tarabily KA, Nassar AH. (2006). Promotion of Growth of Bean in A Calcareous Soil by A Phosphate-Solubilizing, Rhizosphere-Competent Isolate of *Micromonospora endolithica*. *The seventh Annual U.A.E. University Research Conference*
- El-Tarabily KA, Sivasithamparam K. (2006). Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biol Biochem* **38**:1505–1520
- El-Tarabily KA. (2003). An endophytic chitinase-producing isolate of *Actinoplanes missouriensis*, with potential for biological control of root rot of lupine caused by *Plectosporium tabacinum*. *Australian Journal of Botany*, 257–266.
- El-Tarabily KA. (2006). Rhizosphere-competent isolates of streptomycete and non-streptomycete actinomycetes capable of producing cell-wall-degrading enzymes to control *Pythium aphanidermatum* damping-off disease of cucumber. *Can. J. Bot.* **84**:211- 222
- El-Tarabily KA. (2008). Promotion of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plant growth by rhizosphere competent 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-producing streptomycete actinomycetes. *Plant Soil* **308**:161–174
- Ezziyyani M, Pérez C, Requena M, Ahmed A, Candela M. (2004). Evaluación del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annum* L.) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*. *Anales de Biología* **26**:61-68.
- Fedorov D, Ivanova E, Doronina N, Trotsenko Y. (2008). A New System of Degenerate Oligonucleotide Primers for Detection and Amplification of *nifHD* Genes. *Microbiology* **77**:247–249
- Fernandez C. (1988). Vida microbiana en el suelo. *Editorial Pueblo y Educación*. Habana, Cuba, pp. 306 – 331
- Fett WA, Osman SF, Dunn MF. (1987). Auxin Production by Plant-Pathogenic *Pseudomonads* and *Xanthomonads*. *Applied and Environmental Microbiology*. **53**; **8**:1839–1845
- Filippi C, Bagnoli G, Citerinesi AS, Giovannetti M. (1998). Ultrastructural spatial distribution of bacteria associated with sporocarps of *Glomus mosseae*. *Symbiosis* **24**: 1-12
- Foster RC, Marks GC. (1966). The fine structure of the mycorrhizas of *Pinus radiata*. *Australian Journal of Biology Sciences* **19**:1027–1038.
- Franco-Correa M. (1999). Aislamiento, Caracterización y Evaluación de Actinomycetes inhibidores de algunos hongos fitopatógenos. Tesis de Maestría en Microbiología, *Departamento de química, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia*. págs. 86
- Frey P, Frey-Klett P, Garbaye J, Berge O, Heulin T. (1997). Metabolic and genotypic fingerprinting of fluorescent pseudomonads associated with the Douglas Fir - *Laccaria bicolor* mycorrhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology* **63**:1852-1860
- Frey-Klett P, Chavatte M, Clause ML, Courrier S, Le Roux C, Raaijmakers J, Martinotti MG, Pierrat JC, Garbaye J. (2005). Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytologist* **165**:317–328.
- Frey-Klett P, Garbaye J, Tarkka M. (2007). The Mycorrhiza helper bacteria revisited. *Tansley Review. New Phytol.* **176**:22-36

- Gage D.J.** (2004). Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **68**; 2:280-300
- Gamalero E, Trotta A, Massa N, Copetta A, Martinotti MG, Berta G.** (2004). Impact of two fluorescent pseudomonads and an arbuscular mycorrhizal fungus on tomato plant growth, root architecture and P acquisition. *Mycorrhiza* **14**:185–192.
- Garbaye J, Duponnois R.** (1992). Specificity and function of mycorrhization helper bacteria (MHB) associated with the *Pseudotsuga menziesii* - *Laccaria laccata* symbiosis. *Symbiosis* **14**:335-344
- Garbaye J.** (1994). Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* **128**; **2**: 197-210
- García Breijo F.J.** (2003). Biología y Botánica, Parte III: El Funcionamiento de las Plantas. *Universidad Politécnica de Valencia*. [on line] <http://www.euita.upv.es/varios/biologia/programa.htm> (consultada: 12 de noviembre de 2007)
- Gauthier D, Diem HG, Dommergues Y.** (1981). *In Vitro* Nitrogen Fixation by Two Actinomycete Strains Isolated from *Casuarina* Nodules. *Applied and Environmental Microbiology*. **41**; **1**:306–308
- Gendermann JW, Nicolson TH.** (1963). Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **46**:235-244
- Ghanem NB, Sabry SA, El-sherif ZM, Abu El-Ela GA.** (2000). Isolation and Enumeration of marine Actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. *Applied and Environmental Microbiology*. **46**:105-111.
- Gianinazzi S, Schüepp H.** (1994). Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems. *Birkhäuser Verlag*, Basel. Pág.226
- Giovannetti M, Avio L, Sbrana C, Citerinesi AS.** (1993). Factors affecting appressorium development in the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol and Gerd.) Gerd. and Trappe. *New Phytologist*, **123**:115-122
- Giovannetti M, Mosse B.** (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, **84**:489-499
- Giovannetti M, Sbrana C, Avio L** (2002) Arbuscular mycorrhizal fungal mycelium: from germlings to hyphal networks. En: *Gianinazzi S, Schüepp H, Barea JM, Haselwandter K* (eds) *Mycorrhizal Technology in Agriculture*. Birkhauser, pp 49-58
- Giovannetti M, Sbrana C, Avio L.** (2002). Arbuscular mycorrhizal fungal mycelium: from germlings to hyphal networks. *Mycorrhizal Technology in Agriculture*. *Gianinazzi S, Schüepp H, Barea JM, Haselwandter K*. *Birkhauser* (Eds) pp. 49-58
- Glick BR.** (1995) The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol* **41**:109–117.
- Gomes RC, Semeão LTAS, Soares RMA, Alviano CS, Linhares LF, Coelho RRR.** (2000) Chitinolytic actinomycetes from a Brazilian tropical soil active against phytopathogenic fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **16**:109-110
- Gomes RC, Semeão LTAS, Soares RMA, Linhares LF, Ulhoa CJ, Alviano CS, Coelho RRR.** (2001). Purification of a thermostable endochitinase from *Streptomyces* RC1071 isolated from a cerrado soil and its antagonism against phytopathogenic fungi.

- González A.** (1996). Las micorrizas como biofertilizantes en la agricultura. Curso Cultivo e Investigación del Chontaduro. *CORPOICA*, El Mirá, Regional 5. Tumaco, Nariño. Págs. 57-62
- Goodfellow M, Cross T.** (1984). The Biology of the Actinomycetes Classification. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. *M. Goodfellow, M. Mordarski, S. T. Williams* (ed.). Academic Press Inc., London, p. 7-164.
- Govindarajulu M, Pfeffer PE, Jin H, Abubaker J, Douds DD, Allen JW, Bücking H, Lammers PJ, Shachar-Hill Y.** (2005). Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature* **435**:819-823
- Grove TS, Malajczuk N.** (1987). Nitrogen Fixation (Acetylene Reduction) by Forest Legumes: Sensitivity to Pre-harvest and Assay Conditions. *New Phytologist*. **106**:115-127.
- Gryndler M.** (2000) Interactions of arbuscular mycorrhizal fungi with other soil organisms. En: Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Functions. *Kapulnick Y, Douds DD* (eds) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht pp 239-362
- Gryndler, M., Hrselova, H.** 1998. Effect of diazotrophic bacteria isolated from a mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi on colonization of maize root by *Glomus fistulosum*. *Biologia Plantarum* **41**; 4:617-621
- Gunnarsson N., Mortensen U.H., Sosio M., Nielsen J.** (2004). Identification of the Entner–Doudoroff Pathway in an Antibiotic-Producing Actinomycete Species. *Molecular Microbiology*. **52**; 3:895 – 902
- Gupta R, Saxena RK, Chatuverdi P, Viridi JS.** (1995) Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: its potential in fungal cell wall lysis. *Journal of Applied Bacteriology* **78**:378–383.
- Gurtler V, Wilson VA, Mayall BC.** (1991). Classification of medically important clostridia using restriction endonuclease site differences of PCR-amplified 16S rDNA. *Journal of Genetic Microbiology*. **137**:2673–2679
- Gutierrez Mañero FJ, Ramos B, Lucas Garcia JA, Probanza A, Barrientos ML.** (2002) Systemic induction of terpenic compounds in *D. lanata*. *J Plant Physiol* **160**:105–113
- Gutiérrez-Mañero F, Ramos-Solano B, Probanza A, Mehouchi J, Tadeo FR, Talon M.** (2001) The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol Plant* **111**:206–211
- Gyaneshwar P, Kumar GN, Parekh LJ, Poole PS.** (2002) Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil* **245**:83–93.
- Hamdali H, Hafidi M, Virole MJ, Ouhdouch Y.** (2008). Rock phosphate-solubilizing actinomycetes: screening for plant growth-promoting activities. *World J. Microbiol. Biotechnol.* Springer Science Business Media.
- Hamelin J, Fromin N, Tarnawski S, Teyssier-Cuvelle S, Arango M.** (2002). *NifH* gene diversity in the bacterial community associated with the rhizosphere of *Molinia coerulea*, an oligonitrophilic perennial grass. *Environmental Microbiology*, **48**; 8:477-481
- Hartmann A, Baldani J.** (2006). The genus *Azospirillum*. *Prokaryotes* **5**:115-140.

- Hass D, Keel C, Laville J, Maurhofer M, Oberhänsli T, Schnider U, Voisard C, Wüthrich B, Défago G.** (1991). Secondary metabolites of *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 involved in the suppression of root diseases. En: *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, Vol. I H. Henneke and D.P.S. Verma (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp.450-456.
- Hause B, Mrosk C, Isayenkov S, Strack D.** (2007). Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions. *Phytochem* **68**:101-110
- Hecht ST, Causey WA.** (1976). Rapid Method for the Detection and Identification of Mycolic Acids in Aerobic Actinomycetes and Related Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. **4**; **3**:284 – 287
- Hildebrandt U, Ouziad F, Marner FJ, Bothe H.** (2006). The bacterium *Paenibacillus validus* stimulates growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* up to the formation of fertile spores. *FEMS Microbiology Letters* **254**:258-267
- Hopwood D.** (2003). *Streptomyces* genes: from Waksman to Sanger. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **30**:468–471
- Hosny M, Gianinazzi-Pearson V, Dulieu H.** (1998). Nuclear DNA content of 11 fungal species in Glomales. *Genome* **41**:422-428
- Hoster F, Schmitz JE, Daniel R.** (2005). Enrichment of chitinolytic microorganisms: Isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**:434–442.
- Igarashi Y, Iida T, Yoshida R, Furumai T.** (2002). Pteridic acids A and B novel plant growth promoters with auxin-like activity from *Streptomyces hygrosopicus* TP-A0451. *Journal of Antibiotics*. **55**:764-767
- Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.** (2004). [on line] <http://www.humboldt.org.co> [consulta Junio-Julio 2008].
- Instituto Geográfico Agustín Codazzi. IGAC.** (1992). Diccionario geográfico de Colombia. Santa Fé de Bogotá
- INVAM** (2008). [on line] <http://invam.caf.wvu.edu> [consulta 01 agosto 2008]
- Izumi H, Anderson IC, Alexander IJ, Killham K, Moore ER.** (2006). Endobacteria in some ectomycorrhiza of Scots pine (*Pinus sylvestris*). *FEMS Microbiology and Ecology* **56**:34-43
- James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox C, Celio G, Gueidan C, Fraker E, Miadlikowska J.** (2006). Reconstructing the early evolution of the fungi using a six gene phylogeny. *Nature* **443**:818–822.
- Jeffries P, Barea JM.** (2001). Arbuscular mycorrhiza: a key component of sustainable plant–soil ecosystems. En: *Hock B, ed. The Mycota: fungal associations*, Vol. IX. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 95–113.
- Jeffries P, Gianinazzi S, Perotto S, Turnau K, Barea JM.** (2003). The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility of Soil* **37**:1-16

- Jiménez R, Virgen G, Tabares S, Olalde V.** (2001). Bacterias Promotoras del Crecimiento de Plantas: Agro-Biotecnología. *Avance y Perspectiva*. **20**:395-400
- Johansson JF, Paul, LR, Finlay RD.** (2004). Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiology Ecology*, **48**:1-13
- Jurkevitch E, Hadar Y, Chen Y.** (1992). Differential Siderophore Utilization and Iron Uptake by Soil and Rhizosphere Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**, **1**:119-124
- Kamara A.** (2001). Nutrición, Regulación del Crecimiento y Desarrollo Vegetal. *Integración de Tecnológicos y Recomendaciones Agropecuarias de Kamara*. [online] http://www.uaaan.mx/academic/Horticultura/Memhort01/Ponencia_04.pdf (consultada: 29 de Enero de 2007)
- Kang G, Mills KL.** (2004). Soil aggregation status. *Plant Soil* **202**:89-96
- Keller S, Sneider K, Sussmuth RD.** (2006). Structure elucidation of auxofuran, a metabolite involved in stimulating growth of fly agaric, produced by the mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* AchH 505. *Journal of Antibiotics* (Tokyo) **59**:801-803
- Khalil S, Loynachan TE, Tabatabai MA.** (1999). Plant Determinants of Mycorrhizal Dependency in Soybean. *Agronomy Journal* **91**:135-141
- Khan A, Myrold DD, Misraa AK.** (2007). Distribution of *Frankia* Genotypes Occupying *Alnus nepalensis* Nodules with Respect to Altitude and Soil Characteristics in the Sikkim Himalayas. *Physiologia Plantarum* **130**:364-371
- Kitasano University.** (2007). Discover Life - Bacteria: Actinobacteria – Actinomycetes [on line] <http://www.discoverlife.org/mp/20o?search=Actinobacteria> (consultada: 17 de Enero de 2007)
- Kloepper JW, Lifshitz R, Zablutowicz RM.** (1989) Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol* **7**:39-43
- Kloepper JW, Zablutowicz RM, Tipping EM, Lifshitz R.** (1991) Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. En: The rhizosphere and plant growth, *Keister DL, Cregan PB (eds)*. Kluwer academic Publishers, Netherlands, pp 315-326
- Kloepper JW.** (1994). Plant growth promoting rhizobacteria (other system). En: *Azospirillum/Plant Association (Y. Okon, Ed.)*, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. pp. 135-166.
- Kloepper JW.** (1996). Biological control agents vary in specificity for host, pathogen control, ecological habitat and environmental conditions. *Bio. Sci.* **46**:406-409.
- Kohler G, Ludwig W, Schleifer KH.** (1991). Differentiation of lactococci by rRNA gene restriction analysis. *FEMS Microbiology Letters*. **84**:307-312
- Koneman EW.** (2001). Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas a Color. Quinta Edición. *Médica Panamericana*. Buenos Aires, Argentina. Págs. 10-16, 75-82
- Korn-Wendisch F, Rainey F, Kroppenstedt M, Kempf A, Majazza A, Kutzner H, Stackenbrandt E.** (1995). *Thermocrispum* gen. nov., a New Genus of the Order Actinomycetales, and Description of *Thermocrispum municipale* sp. nov. and *Thermocrispum agreste* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **45**, **1**:67-77

- Kortemaa H, Rita H, Haahtela K, Smolander A.** (1994). Rootcolonization ability of antagonistic *Streptomyces griseoviridis*. *Plant and Soil* **163**:77-83.
- Koske RE, Tessier B.** (1983) A convenient, permanent slide mounting medium. *Mycological Society of America Newsletter*, **34**:59.
- Kottke I.** (2002). Mycorrhizae-Rhizosphere determinants of plant communities. En: Plant Roots. *The Hidden Half. 3rd Ed.* New York, Marcel Deccker, Inc. pp. 919-931
- Krishna KR, Balakrishna AN, Bagyaraj DJ.** (1982) Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and *Streptomyces cinnamomeus* and their effects on finger millet. *New Phytol.* **93**:401-405
- Kroppenstedt RM, Goodfellow M.** (1992). The family Thermomonosporaceae. En: The prokaryotes, a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications, 2nd ed., vol. II. *Springer-Verlag KG*, Berlin, Germany
- Kurklinsky-Sobra J, Araujo WL, Mendes R, Geraldi IO, Pizzirani-Kleiner AA, Azevedo JL.** (2004). Isolation and characterization of soy-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environm Microbiol* **6**:1244-1251
- Laaser G, Moller E, Jahnke KD, Bahnweg G, Prillinger H, Prell HH.** (1989). Ribosomal DNA restriction fragment analysis as a taxonomic tool in separating physiologically similar Basidiomycetous yeasts. *Syst Appl Microbiol* **11**:170-175
- Lacey J.** (1973). Actinomycetes in soils, composts and fodders in Actinomycetales: Characteristics and Practical Importance, *G Sykes, FA Skinner (Eds)* Academic Press, London, pp. 231-251.
- Lehr NA, Schrey SD, Bauer R, Hampp R, Tarkka MT.** (2007). Suppression of plant defence response by a mycorrhiza helper bacterium. *New Phytologist* **174**:892-903.
- Lehr NA, Schrey SD, Hampp R, Tarkka MT.** (2008). Root inoculation with a forest soil streptomycete leads to locally and systemically increased resistance against phytopathogens in Norway spruce. *New Phytologist*, 177
- Leiva S, Yáñez M, Zaror L, Rodríguez H, García H.** (2004). Actividad Antimicrobiana de actinomycetes aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile. *Revista médica de Chile*. **132**:151-159.
- Leong SA, Winkelmann G.** (1998) Molecular biology of iron transport in fungi. In Iron Transport and Storage in Microorganisms, Plants, and Animals. *Sigel A., and Sigel H.* (eds). New York, NY: Marcel Dekker, pp. 147-186
- Lerat S, Lapointe L, Piché Y, Vierheilig H.** (2003). Variable carbon sink strength of different *Glomus mosseae* strains colonizing barley roots. *Can J. Bot.* **81**:886-889
- Leveau JY, Bouix M.** (2000). Microbiología industrial: los microorganismos de interés industrial. *Acribia*. Zaragoza, España.
- Linderman RG.** (1988). Mycorrhizal Interactions with the Rhizosphere Microflora - The rhizosphere effect. *Phytopathology.* **78**:366-371
- Linderman RG.** (1994). Role of VAM fungi in biocontrol. En: Mycorrhizae and plant health. *Pfleger FL, Linderman RG, eds.* St Paul: APS Press, 1-25.

- Linderman RG.** (2000). Effects of mycorrhizas on plant tolerance to diseases. En: Arbuscular mycorrhizas: physiology and function. Kapulnik Y, Douds Jr DD, eds. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 345–365.
- Lingua G, Gamalero E, Fusconi A, Lemanceau P, Berta G.** (2008). Colonization of plant roots by *Pseudomonas* and AM Fungi: A dynamic phenomenon, affecting plant growth and health. En: Mycorrhiza, A. Varma (ed.) Springer Verlag Berlin Heidelberg, pp. 601-626
- Lum MR, Hirsch AM.** (2003). Roots and their symbiotic microbes: Strategies to obtain nitrogen and phosphorus in a nutrient-limiting environment. *Journal of Plant Growth Regulation*. **21**:368-382
- Madigan M, Martinko J, Parker J.** (1998). Brock. Biología de los microorganismos. 8a edición *Prentice May*. Barcelona
- Mantelin S, Touraine B.** (2004) Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *J Exp Bot* **55**:27–34
- Mantilla M.** (2008) Distribución de bacterias diazotrofas y su capacidad fijadora de nitrógeno asociadas con tres coberturas vegetales en paisajes de terraza y varzea en suelos del sur del trapezoido amazónico colombiano. *Tesis de Maestría. Pontificia Universidad Javeriana*. pp. 153
- Marin V, Baldani V, dos Santos-Teixeira K, Baldani JI.** (1998). Fijación biológica de nitrógeno: Bacterias fijadoras de nitrógeno de importancia para la agricultura tropical. *EMBRAPA-AGROBIOLOGIA*, Seropedica, RJ. Documentos internos
- Martin A.** (1981). Introducción a la microbiología del suelo. *AGT editores*. Ciudad de México
- Martinez E, Martinez JC.** (2008) La Bacteria Filamentos *Frankia*. Microbios en línea. Cap 17. [on line] http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_17/Capitulo17.pdf. [consultada el 14 de agosto de 2008]
- Martinez-Romero E.** (2006). Dinitrogen-Fixing Prokaryotes. En: The Prokaryotes, 3rd ed., Chapter 1.24. *Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. Eds.*, New York: Springer, **2**; 1:793-817
- Marusina M, Boulygina E, Kuznetsov B, Tourova T, Kravchenko I, Gal'chenko V.** (2001). A System of Oligonucleotide Primers for the Amplification of *nifH* Genes of Different Taxonomic Groups of Prokaryotes. *Microbiology* **70**:73–78.
- Matsukawa E, Nakagawa Y, Iimura Y, Hayakawa M.** (2007). Stimulatory effect of indole-3-acetic acid on aerial mycelium formation and antibiotic production in *Streptomyces* spp. *Actinomycetologica*. **6**:1-8.
- Matteucci SD, Colma A.** (1982). Metodología para el estudio de la vegetación. *Monografía 22*, OEA, Washington 168 pp.
- Matthijs S, Tehrani KA, Laus G, Jackson RW, Cooper RM, Cornelis P.** (2007). Thioquinolobactin, a *Pseudomonas* siderophore with antifungal and anti-*Pythium* activity. *Environ Microbiol* **9**:425-434
- Mayo K, Davis RW, Motta J.** (1986). Stimulation of germination of spores of *Glomus versiforme* by spore associated bacteria. *Mycologia* **78**:426-431

- Mcneil M, Brown J.** (1994). The Medically Important Aerobic Actinomycetes: Epidemiology and Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*. **7**; 3:357-417
- Merzaeva O, Shirokikh I.** (2006). Colonization of Plant Rhizosphere by Actinomycetes of Different Genera. *Microbiology*. **75**, 2:226–230
- Meyers P, Goodwin C, Bennett B, Price C, van Rooyen J.** (2004). *Streptomyces africanus* sp. nov., a novel streptomycete with blue aerial mycelium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **54**:1531-1535.
- Molano A, Algecira N, Bernal J, Franco-Correa M.** (2000). Evaluación y Selección de un Medio de Cultivo a partir de Actinomycetes. En: Memorias del II Congreso Internacional de Microbiología Industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Mayo 10– 12
- Monroy A.F.** (2002). Evaluación de la estabilidad del método de criopreservación en glicerol para el establecimiento de un banco de cepas. Pontificia Universidad Javeriana. *Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Bogotá DC. [Recurso electrónico]*. pp 59-73
- Morton JB, Benny GL.** (1990). Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zigomycetes): a new order, Glomales, Two new suborders, Glominae and Gigasporinae, and two new families, Acaulosporaceae, with an emendation of glomaceae. *Mycotaxon* **37**:471-491
- Morton JB.** (1990). Species and clones of Arbuscular Mycorrhizal Fungi, (Glomales, Zygomycetes) Their role in macro and microevolutionary processes. West Virginia University, Morgant own. *Mycotaxon* **37**:493-515
- Mosse B.** (1959). The regular germination of resting spores and some observations on the growth requirements of an *Endogone* sp. causing vesicular–arbuscular mycorrhiza. *Transactions of the British Mycological Society* **42**:273–286.
- Mosse B.** (1962). The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. *J. Gen Microbiol.* **27**:509-520
- Moura R, Martín J, Martín A, Liras P.** (2001). Substrate analysis and molecular cloning of the extracellular alkaline phosphatase of *Streptomyces griseus*. *Microbiology*. 147:1525–1533
- Mukerji K, Manoharachary C, Singh J.** (2006). Microbial Activity in the Rhizosphere Springer Verlag Berlin Heidelberg Germany Chapter 6. Significance of bacteria in the Rhizosphere. *DB Nehl, OGG Knox (Eds)*.
- Müller G, Matzanke BF, Raymond KN.** (1984). Iron Transport in *Streptomyces pilosus* mediated by Ferrichrome Siderophores, Rhodotorulic Acid, and Enantio-Rhodotorulic Acid. *Journal of bacteriology*. **160**; 1:313-318
- Müller G, Raymond K.** (1984). Specificity and Mechanism of Ferrioxamine-Mediated Iron Transport in *Streptomyces pilosus*. *Journal of bacteriology*. **160**; 1:304-312
- Nassar AH, El-Tarabily KA, Sivasithamparam K.** (2003). Growth promotion of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a poliamine-producing isolate of *Streptomyces griseoluteus*. *Plant growth Regul* **40**:97-106
- Nautiyal SC, Bhadauria S, Kumar P, Lal H, Mondal R, Verma D.** (2000). Stress Induced Phosphate Solubilization in Bacteria Isolated from Alkaline Soils. *Microbiology Letters*. **182**:291-296

- Nautiyal SC.** (1999). An Efficient Microbiological Growth Medium for Screening Phosphate Solubilizing Microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*. **170**:265-270
- Nawani NN, Kapadnis BP, Das AD, Rao AS, Mahajan SK.** (2002). Purification and characterization of a thermophilic and acidophilic chitinase from *Microbispora* sp.V2. *Journal of Applied Microbiology*. **93**:965–975.
- Neilands JB.** (1995). Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *The Journal of Biological Chemistry* **270**; **45**:26723–26726
- Nguyễn Lâm Dung- Nguyen Kim Un Thao.** (2006). Các nhóm vi khuẩn chủ yếu. Actinomycetes, Morphology. www.free.fr/khaocuu/nguyenlandung/phanloixakhuan01.ht. (consultada 17 de Enero 2007)
- Nicolson TH, Gerdemann JW.** (1968). Mycorrhizal Endogone species. *Mycologia* **60**:3313-325
- Nogales B.** (2005). La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. *Ecosistemas*. pp 1-10.
- Nurmiaho-Lassila EL, Timonen S, Haahtela K, Sen R.** (1997). Bacterial colonization patterns of intact *Pinus sylvestris* mycorrhizospheres in dry pine forest soil: an electron microscopy study. *Canadian Journal of Microbiology* **43**:1017–1035.
- O’Gara F, Dowling DN, Boesten B.** (1994) Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms. Weinheim, Germany: *VCH*, 173
- Ochoa JM.** (1998). Control Biológico del Marchitamiento Vascular del Clavel Ocasionado por *Fusarium oxysporum* f sp *dianthi* Mediante el uso de los Microorganismos Potencialmente Antagonistas *Pseudomonas fluorescens*, *Streptomyces coelicolor* y *Trichoderma hamatum*. *Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana*. Bogotá D.C.
- Ohtani N, Saito N, Tomita M, Itaya M, Itoh A.** (2005). The SCO2299 gene from *Streptomyces coelicolor* A3(2) encodes a bifunctional enzyme consisting of an RNase H domain and an acid phosphatase domain. *The FEBS Journal*. **272**:2828–2837
- Okon Y, Lavandera-Gonzalez C.** (1994). Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* **26**; **12**:1591-1601
- Otálora J, Patiño L.** (2003). Estandarización de una técnica cuantitativa de producción de fosfatasa producidas a partir de microorganismos solubilizadores de fosfatos. *Trabajo de grado de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana- Colombia*
- Ozanne PG.** (1980). Phosphate nutrition of plant - A general treatise. En: The role of phosphorus in agriculture. *FE Khasawneh, EC Sample, EJ Kamprath, Eds.* ASA-CSSA-SSSA, Madison, W.I. pp 559-589.
- Park M, Kim C, Yang J, Lee H, Shin w, Kim S, Sa T.** (2005). Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiological Research*. **160**:127-133
- Patel JB, Wallace RJ, Brown-Elliott BA, Taylor T, Imperatrice C, Leonard DGB, Wilson RW, Mann L, Jost KC, Nackamkin I.** (2004). Sequenced-Based Identification of Aerobic Actinomycetes. *Journal of Clinical Microbiology*. **42**; **6**:2530 – 2540

- Patten CL, Glick BR.** (2002). Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**; **8**:3795-3801
- Pearson V, Read DJ.** (1975). The physiology of the mycorrhizal endophyte of *Canulla vulgaris*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **64**: 1-7
- Penny S, Haldeman D.** (1997). The Microbiology of the terrestrial deep subsurface. Capitulo 10 Phylogenetic Analysis and Implications for subsurface microbiology. *CRC. Press*
- Persello-Cartieaux F, Nussaume L, Robaglia C.** (2003) Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant Cell and Environment* **26**:189-199.
- Phillips JM, Hayman DS** (1970) Improve procedure of clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **55**:159-161
- Prescott, L.M.** (2002). Microbiology. 5th ed. *Editorial McGraw-Hill*. Boston, Massachusetts, USA. pp. 524-528.
- Probanza A, Lucas GJA, Ruiz PM, Ramos B, Gutierrez MFJ.** (2002). *Pinus pinea* L. seedling growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR Bacillus (*B. licheniforme* CECT 5106 and *B. pumilus*CECT 5105). *Applied Soil Ecology*, **20**:75-84
- Puppi G, Azcón R, Höflich G.** (1994). Management of positive interactions of arbuscular mycorrhizal fungi with essential groups of soil microorganisms. En: Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems (*Gianinazzi, s. and Schüepp, H. Eds.*), Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland. pp 201-215.
- Rauland U, Glocker I, Redenbach M, Cullum J.** (1995). DNA amplifications and deletions in *Streptomyces lividans* 66 and the loss of one end of the linear chromosome. *Molecular Gene and Genetics*. **246**:37-44
- Rheims H, Spróer C, Rainey FA, Stackebrandt E.** (1999). Molecular biological evidence for the occurrence of uncultured members of the Actinomycete line of descent in different environments and geographical locations. *Microbiology*. **142**:2863-2870.
- Ribbe M, Gadkari D, Meyer O.** (1997). N₂ fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* involves a molybdenum-dinitrogenase and a manganese-superoxide oxidoreductase that couple N₂ reduction to the oxidation of superoxide produced from O₂ by a molybdenum-CO dehydrogenase. *J. Biol.Chem.* **272**:26627–26633.
- Richter DL, Zuellig TR, Bagley ST, Bruhn JN.** (1989). Effects of red pine (*Pinus resinosa* Ait.) mycorrhizoplane-associated actinomycetes on *in vitro* growth of ectomycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **115**:109–116.
- Riedlinger J, Schrey SD, Tarkka MT, Hampp R, Kapur M, Fiedler HP.** (2006). Auxofuran, a novel substance stimulating growth of fly agaric, produced by the mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* Ach 505. *Applied and Environmental Microbiology* **72**:3550-3557
- Rillig M, Treseder KK, Allen MF.** (2002) Global change and mycorrhizal fungi. En: Mycorrhizal Ecology (*eds van der Heijden MGA, Sanders IR*), Springer, Berlin, Heidelberg, New York
- Rillig MC.** (2004). Arbuscular mycorrhizae and terrestrial ecosystem processes. *Ecol Lett* **7**:740-754

- Roączycski, H., Dahm, H., Strzelczyk, E. y Li, C.Y., 1999. Diazotrophic bacteria in root-free soil and in the root zone of pine (*Pinus sylvestris* L.) and oak (*Quercus robur* L.). *Applied Soil Ecology* **12**:239-250
- Rodríguez A, Trujillo I, Bringas Y, Rojas M, Manzano J, Heydrich M. (2005). Caracterización fisiológica de la comunidad microbiana endófito de la caña de azúcar. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 7:66-75
- Rodríguez H, Fraga R. (1999). Phosphate solubilising bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv* **17**:319–339.
- Rodríguez MX, Buschmann H, Iglesias C, Beeching JR. (2000). Production of antimicrobial compounds in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots during post-harvest physiological deterioration. En: Cassava Biotechnology: Proceedings of the IV International scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network, Nov 3-7, 1998. *Carvalho LJCB, Thro AM, Vilarinhos AD (Eds)*. EMBRAPA, CENARGEN, CBN (Publishers). Brasilia.
- Rodríguez MX. (2001). Towards identifying markers for post-harvest physiological deterioration in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Tesis de Doctorado. University of Bath*
- Rosado A. (1997). Molecular Microbial Ecology: a Minireview. *Revista de Microbiología* **28**:135-147.
- Rosendahl S. (2008). Communities, populations and individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **178**:253–266
- Ruíz-Lozano JM, Azcon R., Gomez M. (1995) Effects of arbuscular mycorrhizal *Glomus* species on drought tolerance: physiological and nutritional plant responses. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:456-460
- Ruíz-Lozano JM, Collados C, Barea JM, Azcón R. (2001) Arbuscular mycorrhizal symbiosis can alleviate drought-induced nodule senescence in soybean plants. *New Phytologist* **151**; **2**:493-502
- Ruiz-Lozano JM. (2003). Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza*. **13**:309-317
- Russell EW. (1980). Soil conitins & plant growth. *10 th ed.* Longman, London
- Saito A, Minamisawa K. (2006). Evaluation of the Nitrogen-fixing Ability of Endophytic Clostridia based on Acetylene Reduction and Reverse Transcription-PCR Targeting the nifH Transcript and Ribosomal RNA. *Microbes and Enviroments* **21**:25-35.
- Salem B. (2003). Application of GIS to biodiversity monitoring. *Journal of Arid Environments* **54**:91–114
- Salkowski E. 1889. Ueber die Bildung von Fluchtigen Fettsauren bei der Ammoniakalischen Harnghahrung. *Zeitschrift fur Physiologische Chemie* **13**:264-273
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) Molecular cloning: a laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York, USA.
- Sánchez de Prager M. (1995). Endomicorrizas en Agroecosistemas Colombianos. Generalidades de la Micorriza. Primera parte. *Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira*. Págs.33-92

- Sánchez L.** (2006). Metabolito bacteriano a partir de *Burkholderia cepacia* como agente biocontrolador en cultivos de interés agrícola. [On line]: <http://www.monografias.com/trabajos36/metabolitobacteriano/metabolito-bacteriano.shtml> (Consulta: 12 de Julio de 2007)
- Sánchez O, Cantero A.** (2001). Evaluación de Cepas Antagónicas de Actinomycetes y de *Trichoderma* sp Aisladas a Partir de Suelos de Cultivos de Arroz (*Oryza sativa*) Para el Control de *Rhizoctonia solani*. *Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana*. Bogotá DC. Págs.48–51
- Schenck N, Pérez Y.** (1990). Manual for the identification of VA Mycorrhizal Fungi. Third Edition. Florida, United States. Págs. 285
- Schirmbock M, Lorito M, Yong-Li W.** (1994) Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotic, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Applied and Environmental Microbiology* **60**:4364–4370.
- Schrey SD, Schellhammer M, Ecke M, Hampp R, Tarkka MT.** (2005). Mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* AcH 505 induces differential gene expression in the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. *New Phytologist*, **168**:205-216
- Schüßler A., Schwarzott D, Gerig H, Walker C.** (2001a). Analysis of partial Glomales SSU rRNA gene sequences: implications for primer design and phylogeny. *Mycological Research* **105**:5-15
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C.** (2001b). A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research*. **105**:1413-1421
- Sieverding E, Toro S.** (1988). Los Géneros de la familia Endogonaceae y su Ecología. Investigaciones sobre Micorrizas en Colombia N° 2. *Sociedad Colombiana en la Ciencia del Suelo*. Págs. 25-53
- Sieverding E.** (1991). Vesicular-Arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems GTZ, Eschborn, Germany pp. 371
- SIG WWF Colombia.** (2005). [on line] <http://sig.wwf.org.co>. [consulta Octubre 2007]
- Silver L, Hostian KA.** (1993). Discovery and development of New Antibiotics: The Problem of Antibiotic Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **37**; 3:377-383
- Simon EH, Tessman I.** (1963). Thymidine-requiring mutants of phage T4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **50**:526-532.
- Singh PP, Shin YC, Park CS, Chung YR.** (1999) Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. *Phytopathology*, **89**:92-99
- Skujins JJ, Potgeiter HJ, Alexander M.** (1965). Dissolution of fungal cell walls by *Streptomyces* chitinase and β -1,3-glucanase. *Arch. Biochem. Biophys.* **111**:358–364.
- Smith SE, Gianninazzi-Pearson V.** (1990). Phosphate uptake and arbuscular activity in mycorrhizal *Allium cepa* L. Effects of photon irradiance and phosphate nutrition. *Aus J. Plant Physiol.* **17**:177-188
- Smith SE, Read DJ.** (1997). Mycorrhizal Dymbiosis. San Diego: *Academic Press*. pp. 26-160

- Smith SE, Read DJ.** (2008). Mycorrhizal Symbiosis. *Elsevier Academic Press*. Third edition. pp. 11-188
- Smith SE.** (1966). Physiology and ecology of orchid mycorrhizal fungi with reference to seedling. *New Phytologist*. **65**:488-499
- Soares R, Roesch LF, Zanatta G, Oliveira-Camargo F, Passaglia LM.** (2006). Occurrence and distribution of nitrogen fixing bacterial community associated with oat (*Avena sativa*) assessed by molecular and microbiological techniques. *Applied Soil Ecology* **33**:221-234.
- Stanier R.** (1996). Microbiología. *Editorial Reverte*. Barcelona, España. Págs 181-197
- Stanley Y.** (1994). The Family Streptomycetaceae. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore USA: USA: *Ed. Williams & Wilkins*. Vol. 4. 605-669, 2344-2347
- Stewart JWB, Sharpley AN.** (1987). Controls on dynamics of soil and fertilizer phosphorus and sulfur. IN: Soil Fertility and Organic matter as critical components on production systems. *Soil Science Society of America*, St. Paul, MN
- St-John BJ, Smith SE, Nicholas DJD, Smith FA.** (1985). Enzymes of ammonium assimilation in *Pezizella ericae* Read. *New Phytologist*. **100**:579-584
- Sylvia DM, Williams SE** (1992). Vesicular-arbuscular mycorrhizae and environmental stresses. En: Mycorrhizae in Sustainable Agriculture. *GJ Bethlenfalvay, RG Linderman* (eds):101-124. American Society of Agronomy, Madison, WI.
- Sylvia DM.** (1998). Principles and application of soil microbiology. *Prentice Hall*. Seattle river, NJ
- Sylvia DM.** (2005). Principles and applications of soil microbiology. Segunda Edición. *Pearson/Prentice Hall*. New Jersey, USA Págs. 259-306.
- Tabatai MA, Brenner JM.** (1969). Use of p-nitrofenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry* **1**:301-307
- Takizawa M, Colwell RR, Hill RT.** (1993). Isolation and Diversity of Actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**; **4**:997-1002
- Tang WH** (1994). Yield-increasing bacteria (YIB) and biocontrol of sheath blight of rice. En: Improving Plan Productivity with Rhizosphere Bacteria. *MH Ryder, PM Stephens, GD Bowen* (eds): 267-273. Division of Soils CSIRO, Adalaide, Australia.
- Tarka MT, Frey-Klett P.** (2008). Mycorrhiza Helper Bacteria. En: Mycorrhiza. *A. Varma* (Ed.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp.113-132
- Tate RL.** (2000) Soil Microbiology (second ed.), *Wiley*, New York, pp.47-56
- Tejeda-Sartorius M, Martinez dela Vega O, Delano-Frier JP.** (2008). Jasmonic acid influences mycorrhizal colonization in tomato plants by modifying the expression of genes involved in carbohydrate partitioning. *Physiologia Plantarum* **133**:339-353
- Thomas DI, Cove JH, Baumberg S, Jones C, Rudd B.** (1991). Plasmid Effects on Secondary Metabolite Production by a *Streptomyces* Synthesizing and Anthelmintic Macrolide. *Journal of General Microbiology*. **137**:2331-2337.

- Tiesen H.** (2008). Phosphorus in the global environment. En: The ecophysiology of plant-phosphorus interactions. *PH White, JP Hammond (Eds)*. pp. 1-7
- Titus A, Pereira GN.** (1999-2007). The role of Actinomycetes in coffee plantation ecology. [Online] <http://www.ineedcoffee.com/05/actinomycetes/print.asp>. Acceso 21 de Enero de 2008.
- Tjepkema JD, Cashon RE, Beckwith J, Schwintzer CR.** (2002). Hemoglobin in *Frankia*, a Nitrogen-Fixing Actinomycete. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**; 5:2629–2631
- Tokala K, Strap C, Jung D, Crawford L, Salove L, Deobald F, Bailey J, Morra J.** (2002). Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Applied and Environmental Microbiology*. **68**:2161–2171
- Tomohiko T, Zhiheng L, Zhang Y, Hatano K.** (2000). *Actinoalloteichus cyanogriseus* gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **50**:1435–1440
- Torres-Rubio MG, Valencia SA, Bernal J, Martínez P.** (2000). Isolation of Enterobacteria, *Azotobacter* sp. and *Pseudomonas* sp., Producers of Indole-3-Acetic Acid and Siderophores, from Colombian Rice Rhizosphere. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. **42**:171-176
- Ueda T, Suga Y, Yahiro N, Matsuguchi T.** (1995). Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. *Journal of bacteriology*, p.1414 – 1417.
- Uggla C, Moritz T, Sandberg G, Sundberg B.** (1996). Auxin as a Positional Signal in Pattern Formation in Plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **93**:9282-9286
- Uroz S, Calvaruso C, Turpault MP, Pierrat JC, Mustin C, Frey-Klett P.** (2007). Effect of the mycorrhizosphere on the genotypic and metabolic diversity of the soil bacteria communities involved in mineral weathering in a forest soil. *Applied and Environmental Microbiology* **73**:3019-3027
- Valdes M, Perez N, Estrada P, Caballero J, Peña J, Normand P, Hirsch A.** (2005). Non-*Frankia* Actinomycetes Isolated from Surface-Sterilized Roots of *Casuarina equisetifolia* Fix Nitrogen. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**, 1:460 466.
- Valdés M, Perez N, Estrada P, Caballero J, Peña J, Normand P, Hirsch A.** (2005). Non-*Frankia* Actinomycetes Isolated from Surface-Sterilized Roots of *Casuarina equisetifolia* Fix Nitrogen. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**, 1:460 466.
- van de Broek A, Vanderleyden J.** (1995) Review: genetics of the *Azospirillum*-plant root association. *Crit. Rev. Plant Sci*. **14**:445-466
- van der Heijden MGA.** (2004). Arbuscular mycorrhizal fungi as support systems for seedling establishment in grassland. *Ecology Letters* **7**:293-303
- van Loon LC, Bakker P, Pieterse CMJ** (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* **36**:453-483.
- van Tichelen KK, Colpaert JV, Vangronsveld J.** (2001). Ectomycorrhizal protection of *Pinus sylvestris* against copper toxicity. *New Phytologist* **150**; 1:203-213

- Varma A, Abbott L, Werner D, Hampp R.** (2004). Plant Surface Microbiology. *Springer Verlag, Berlin Heidelberg New Cork*
- Vásquez P, Holguín G, Puente M.** (2000). Phosphate-solubilizing microorganisms associated with rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biol. Fertl. Soils.* **30**:460-468
- Vierheilig H, Piché Y.** (2002). Phosphorus solubilization and pH changes as a result of the interactions between soil bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on a medium containing NO₃ as nitrogen resource. *Can J. Bot.* **80**:571-576
- Vivas A, Azcon R, Biro B, Barea JM, Ruiz-Lozano JM.** (2003). Influence of bacterial strain isolated from lead-polluted soil and their interactions with arbuscular mycorrhizae on the growth of *Trifolium pratense* L. Under lead toxicity. *Canadian Journal of Microbiology* **49**:577-588
- Walker C.** (1982). Species in the Endogonaceae: a new species (*Glomus occultum*) and a new combination (*Glomus geosporum*). *Mycotaxon* **15**:49-61
- Walley FJ, Germida JJ.** (1996). Failure to decontaminate *Glomus clarum* NT4 spores is due to spore wall-associated bacteria. *Mycorrhiza* **6**:43-49
- Wang SY, Moyne AL, Thottappilly G, Wu SJ, Locy RD, Singh NK.** (2001). Purification and characterization of *Bacillus cereus* exochitinase. *Enz. Microbiol Technol.* **28**:492-498.
- Watson E.** (1984). Studies on the Ecology of Actinomycetes in Soil. *Soil Biology and Biochemical.* p. 6343-6352
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ.** (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* **173**:697-703
- Welsh DT.** (2000). Nitrogen fixation in seagrass meadows: Regulation, plant-bacteria interactions and significance to primary productivity. *Ecology Letters* **3**, 1:58-71.
- Wellington E, Anderson A.** (2001). The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* **51**:797-814.
- Wellington E, Williams S.** (1981). Host ranges of phages isolated to *Streptomyces* and other genera. *Zentbl Bakteriologic Hygiene I Abt Supplement.* **11**:93-98.
- Weller DM, Thomashow LS.** (1994) Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the rhizosphere. Molecular ecology of rhizosphere microorganisms biotechnology and the release of GMOs. *O'Gara F, Dowling DN, Boesten B, Winheim VCH (eds), Germany,* 1-18.
- Whipps JM.** (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* **52**:487-511
- Whipps JM.** (2004). Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Canadian Journal of Botany* **82**:1198-1227.
- Whitelaw M.** (2000). Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. Academic press. *Advances in Agronomy* **69**:99-151
- Wilson JM.** (1984). Comparative development of infection by three vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist.* **97**:413-426

- Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV.** (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. **18**:6531-6535
- Woese CR.** (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*. **51**:221–271
- Xie ZP, Staehelin C, Vierheilig H, Wiemken A, Jabbouri S, Broughton WJ, Vogeli-Lange R, Boller T.** (1995). Rhizobial nodulation factors stimulate mycorrhizal colonization of nodulating and nonnodulating soybeans. *Plant Physiology* **108**:1519-1525
- Yu T, Egger KN, Peterson RI.** (2001). Ectendomycorrhizal associations-characteristics and functions. *Mycorrhiza* **11**:167-177
- Yuan WM, Crawford DL.** (1995). Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal rot and seed rots. *Applied and Environmental Microbiology* **61**:3119–3128.
- Zahir AZ, Arshad M, Frankenberger WT.** (2004). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Applications and Perspectives in Agriculture. *Advances in Agronomy*. **81**:97-108
- Zaitlin BK, Turkington D, Parkinson G, Clayton G.** (2004). Effects of Tillage and Inorganic Fertilizers on Culturable Soil Actinomycetes Communities and Inhibition of Fungi by Specific Actinomycetes. *Applied Soil Ecology*. **26**:53-62.
- Zhenshui Z, Wang Y, Ruan J.** (1998). Reclassification of *Thermomonospora* and *Microtetraspora*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **48**:411–422

ANEXOS

ANEXO 1. MEDIOS DE CULTIVO

1. Agar Avena

COMPONENTES	g/l
Avena	60.0
Agar-Agar	15

Agregar los componentes al agua destilada, calentar al fuego durante 5 minutos. Autoclavar (15lb y 121°C). Servir en cajas de petri estériles. *Nota:* Cuando se utilice la nistatina (1%) se debe agregar antes de la esterilización del medio de cultivo.

2. Medio Pikovskaya

COMPONENTES	g/l
Glucosa	10
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5
NaCl	0.2
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5
MgSO ₄	0.1
Extracto de Levadura	0.5
MnSO ₄	0.1
Agar-Agar	20
Agua destilada	1 L

Agregar los componentes al agua destilada (excepto el fosfato tricalcico, éste se autoclava en seco y se adiciona al finalizar la esterilización.). Autoclavar (15 lb y 121°C). Servir en cajas de petri estériles. *Nota:* Cuando se utilice la nistatina (1%) se debe agregar antes de la esterilización del medio de cultivo.

3. Medio Ashby

COMPONENTES	g/l
Manitol	20
CaCl ₂	0.2
KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄	0.2
Extracto de suelo	100ml
FeSO ₄	0.005
NaCl	0.2
Agar-Agar	15
Agua destilada	900ml

Agregar los componentes al agua destilada. Autoclavar (15lb y 121°C). Servir en cajas de petri estériles. *Nota:* Cuando se utilice la nistatina (1%) se debe agregar antes de la esterilización del medio de cultivo.

4. Medio SRSM -1

COMPONENTES	g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5
KCl	0.2
MgSO ₄	0.3
FeSO ₄	0.004
NaCl	0.2
Glucosa	10
Extracto de levadura	0.5
Púrpura de Bromocresol	0.1
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5
Agar-Agar	15

Agregar los componentes al agua destilada (excepto el fosfato tricalcico, éste se autoclava en seco y se adiciona al finalizar la esterilización.). Autoclavar (15lb y 121°C). Servir en cajas de petri estériles. *Nota:* Cuando se utilice la nistatina (1%) se debe agregar antes de la esterilización del medio de cultivo.

5. Medio Ashby -Nfb y Medio Nfb + Agar purificado

COMPONENTES	g/l
Ácido D-málico	5
Solución 10% K ₂ HPO ₄	5
Solución 10% MgSO ₄	2
Solución 10% NaCl	1
Solución 1% CaCl ₂ * H ₂ O	2
Solución 5% Azul de bromotimol en 0.2 N KOH	2
Solución de Micronutrientes (semisólido)	2
Solución 1.64% de EDTA	4
KOH	4.5

SOLUCIÓN DE MICRONUTRIENTES	g/200ml
Molibdato de Sodio Dihidratado	0,2
Sulfato de manganeso	0,235
Ácido bórico	0,280

Sulfato de cobre pentahidratado	0,008
Sulfato de zinc heptahidratado	0,024

Mezclar los componentes, ajustar el pH a 6.8 con ácido málico y KOH. Calentar hasta ebullición con agitación constante. Autoclavar (15lb y 121°C). Servir en tunos Kant. *Nota:* la preparación del medio NFB + Agar purificado, es el mismo procedimiento y componentes mencionados anteriormente, con la diferencia que el agar-agar es reemplazado con el agar purificado.

6. Caldo Simon y Tessman

COMPONENTES	g/l
Succinato de sodio	10
Cloruro de Sodio	5.8
Cloruro de Potasio	3.7
Cloruro de Calcio dihidratado	0.15
Tris	12.1
Cloruro de Magnesio hexahidratado	0.10
Cloruro de Amonio	1.1
Sulfato de Sodio bibásico	0.142
Fosfato de Potasio	0.272

Mezclar los componentes, ajustar el pH a 6.8 con HCL. Agitar y autoclavar (15lb y 121°C). Servir asépticamente.

7. Caldo B suplementado con triptona

COMPONENTES	g/l
Glucosa	5
K ₂ HPO ₄	4ml
MgSO ₄	2ml
NH ₄ NO ₃	2ml
NaCl	2ml
Triptona	20g
FeCl ₃	0,1ml

Mezclar los componentes, en el siguiente orden: K₂HPO₄, MgSO₄, NH₄NO₃, NaCl, Glucosa, Triptona y por último FeCl₃. Ajustar el pH a 7.0 con NaOH. Agitar y autoclavar (15lb y 121°C). Servir asépticamente

8. Medio ISP1 o Middlebrook 7H9

Componentes	g/l
Triptona	5
Extracto de levadura	3

Mezclar los componentes, ajustar el pH a 6.8 con HCL. Agitar y autoclavar (15lb y 121°C). Servir asépticamente.

9. Caldo ISP2

Componentes	g/l
extracto de levadura	4
Glucosa	8
extracto de malta	10

Mezclar los componentes, ajustar el pH a 6.8 con HCL. Agitar y autoclavar (15 lb y 121°C). Servir asépticamente.

10. Medio Czapeck-Dox

Solución 1

Componentes	g/l
K ₂ HPO ₄	20
NaCl	10

Solución 2

Componentes	g/l
Na ₂ EDTA	0.1339
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.1
MgSO ₂ · 7H ₂ O	5

Solución 3

Componentes	g/l
NH ₄ NO ₃	40

Se mezclan las tres soluciones donde se agrega de la solución 1: 50 ml/l, de la solución 2: 100 ml/l y de la solución 3: 50 ml/L. Se adicionan 20g/l de glucosa. Se mezclan muy bien, ajustar el pH a 6.8 con HCL. Agitar y autoclavar (15 lb y 121°C). Servir asépticamente.

11. Agar agua

Componentes	g/l
Agar	8

Mezclar el agua con el agar y tamponar con 10 mM Mes (2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid) pH final 7.0, después de esterilizar a 120°C por 20 min.

ANEXO 2. REACTIVOS Y SOLUCIONES

1. Polivinil-ácido láctico-glicerol (PLVG)

Componentes	en 10 ml de agua
alcohol de polivinilo	1.66g
ácido láctico	10 ml
glicerina	1 ml

Mezclar todos los componentes y envasar.

2. Tampón TE pH 7.7

Componentes	Concentración
Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM

Mezclar todos los componentes y envasar. Ajustar el pH en 7.7 y completar el volumen con agua destilada.

3. Tampón TAE 50 X

Componentes	Para un litro
Tris Base	242g
Ácido acético glacial	57.1ml
EDTA (0.5M) pH 8.0	100ml

Disolver el Tris Base y el EDTA en 400ml de agua destilada, ajustar el pH y completar con agua destilada a 1000ml. Para preparar 1 litro de Buffer TAE 1X se debe tomar 20ml de Buffer TAE 50X y llevar hasta 1000ml con agua destilada.

4. Tampón de carga BLUE/ORANGE 6X Loading Dye (G190A) (Promega)

Componentes	Concentración
Ficol	15%
Azul de bromofenol	0,03%
Xileno de cianol	0,03%
Colorante naranja G	0,4%
Tris-HCL (pH 7,5)	10mM

Mezclar todos los componentes, envasar y reservar en el congelador de -20°C.

5. Reactivo de Salkowsky

Componentes	Concentración
FeCl ₃	12g/l
H ₂ SO ₄	7.9M

Mezclar todos los componentes, envasar y reservar en el refrigerador a 4°C.

6. Marcador de Peso Molecular de ADN de 100bp - 100µg (Promega)



Consiste de 40 bandas de DNA mostrando rangos de 100 a 4000 pb. No debe ser usado para análisis de cuantificación.

7. Tampón Fosfato pH 7

Componentes	Concentración en 100 ml de agua destilada estéril
Na ₂ HPO ₄	1 M
NaHPO ₄	1M

Mezclar todos los componentes, envasar y reservar en el refrigerador a 4°C

ANEXO 3. CLAVES DICÓTOMAS UTILIZADAS POR COOK & MEYERS (2003)

IDENTIFICACIÓN DEL GÉNERO CON *Sau3AI*

Grupo 1.

Digested with	Relevant feature(s)	Go to:
(1a) <i>Sau3AI</i>	Largest DNA fragment <750 bp <i>Sau3AI</i> (Group 1)	2
(1b) <i>Sau3AI</i>	Largest DNA fragment >950 bp <i>Sau3AI</i> (Groups 2 and 3)	Table 2
(2a) <i>AsnI</i>	Not cut	3
(2b) <i>AsnI</i>	Cut (470–590 bp and 900–960 bp)	6
(3a) <i>KpnI</i>	Cut (410–470 bp and 1000–1100 bp)	4
(3b) <i>KpnI</i>	Not cut	8
(4a) <i>SphI</i>	Cut	5
(4b) <i>SphI</i>	Not cut: <i>Streptomyces</i> (56/103); <i>Sporichthya</i> (2/2)	
(5a) <i>SphI</i>	Cut (170–260 bp and 1010–1350 bp): <i>Kitasatospora</i> (12/12)	
(5b) <i>SphI</i>	Cut (390–450 bp and 1050–1110 bp): <i>Streptomyces</i> (47/103)	
(6a) <i>Scal</i>	Not cut	7
(6b) <i>Scal</i>	Cut (570–630 bp and 850–900 bp): <i>Gordonia</i> (3/15); <i>Nocardia</i> (20/25); <i>Skermania</i> (1/1)	
(7a) <i>SphI</i>	Cut (280–310 bp and 890–920 bp): <i>Glycomyces</i> (3/3); <i>Nocardioides</i> (1/5)	
(7b) <i>SphI</i>	Not cut: <i>Pseudonocardia</i> (4/17)	
(8a) <i>PstI</i>	Cut (400–430 bp and 1000–1050 bp): <i>Nonomuraea</i> (10/15)	
(8b) <i>PstI</i>	Not cut: <i>Microbispora</i> (1/3)	

Grupo 2.

Digested with	Relevant feature(s)	Go to:
(1a) <i>Sau3AI</i>	Cut (300–350 bp and 760–980 bp): Group 2	2
(1b) <i>Sau3AI</i>	Cut (990–1300 bp): Group 3	Table 3
(2a) <i>AsnI</i>	Cut (470–590 bp and 900–960 bp)	3
(2b) <i>AsnI</i>	Not cut	6
(3a) <i>KpnI</i>	Cut (410–470 bp and 1000–1100 bp)	4
(3b) <i>KpnI</i>	Not cut	5
(4a) <i>HindIII</i>	Cut (440 bp and 1070 bp): <i>Pseudonocardia</i> (1/17)	
(4b) <i>HindIII</i>	Not cut: <i>Nocardioides</i> (1/5); <i>Prauserella</i> (1/1); <i>Saccharomonospora</i> (4/6)	
(5a) <i>SphI</i>	Cut (270–280 bp and 900 bp): <i>Nocardioides</i> (2/5)	
(5b) <i>SphI</i>	Not cut: <i>Actinoalloteichus</i> (1/1); <i>Actinopolyspora</i> (1/1); <i>Saccharopolyspora</i> (3/7); <i>Thermocrispum</i> (1/1)	
(6a) <i>HindIII</i>	Cut (400–550 bp and 900–920 bp): <i>Streptosporangium</i> (3/12)	
(6b) <i>HindIII</i>	Not cut	7
(7a) <i>SphI</i>	Cut (595–615 bp and 860–900 bp): <i>Nocardioipsis</i> (2/13)	
(7b) <i>SphI</i>	Not cut	8
(8a) <i>PstI</i>	Not cut: <i>Thermobifida</i> (3/3)	
(8b) <i>PstI</i>	Cut (415–460 bp and 995–1100 bp): <i>Thermomonospora</i> (1/2)	

Grupo 3. El ADNr 16S de estos géneros es cortado con *AsnI* y *SphI*.

Digested with	Relevant feature(s)	Go to:
(1a) <i>AsnI</i>	Cut (470–590 bp and 900–960 bp)	2
(1b) <i>AsnI</i>	Not cut	Table 5
(2a) <i>SphI</i>	Cut (280–310 bp and 890–920 bp)	3
(2b) <i>SphI</i>	Not cut	Table 4
(3a) <i>SnaBI</i>	Not cut	4
(3b) <i>SnaBI</i>	Cut (470–510 bp and 970–1000 bp)	6
(4a) <i>SalI</i>	Not cut	5
(4b) <i>SalI</i>	Cut (540–560 bp and 900–1040 bp): <i>Actinoplanes</i> (7/21); <i>Micromonospora</i> (12/12); <i>Couchioplanes</i> (1/1); <i>Pilimelia</i> (2/2); <i>Spirilliplanes</i> (1/1); <i>Verrucosipora</i> (1/1); <i>Virgisporangium</i> (2/2)	
(5a) <i>PvuII</i>	Cut (560 bp and 970–980 bp): <i>Dactylosporangium</i> (6/6)	
(5b) <i>PvuII</i>	Not cut: <i>Actinoplanes</i> (14/21); <i>Asanoa</i> (1/1); <i>Catellatospora</i> (3/3); <i>Catenuloplanes</i> (2/2)	
(6a) <i>SalI</i>	Cut (235–265 bp and 1215–1245 bp)	7
(6b) <i>SalI</i>	Not cut	9
(7a) <i>AgeI</i>	Cut (660–680 bp and 910–930 bp)	8
(7b) <i>AgeI</i>	Not cut: <i>Promicromonospora</i> (2/2)	
(8a) <i>SstI</i>	Cut (585 bp and 930 bp): <i>Hongia</i> (1/1)	
(8b) <i>SstI</i>	Not cut: <i>Kribbella</i> (1/1); <i>Nocardioides</i> (1/5)	
(9a) <i>AgeI</i>	Cut	10
(9b) <i>AgeI</i>	Not cut: <i>Oerskovia</i> (3/3); <i>Saccharopolyspora</i> (1/7)	
(10a) <i>AgeI</i>	Produces two bands between 660 bp and 910 bp	11
(10b) <i>AgeI</i>	Cut (230 bp and 1240 bp): <i>Intrasporangium</i> (1/1)	
(11a) <i>AgeI</i>	670–680 bp and 750–830 bp: <i>Kineosporia</i> (4/4)	
(11b) <i>AgeI</i>	660 bp and 910 bp: <i>Nocardioides</i> (1/5)	

Digested with	Relevant feature(s)	Go to:
(1a) <i>KpnI</i>	Cut (410–470 bp and 990–1100 bp)	5
(1b) <i>KpnI</i>	Not cut	2
(2a) <i>HindIII</i>	Cut	3
(2b) <i>HindIII</i>	Not cut: <i>Actinosynnema</i> (2/2); <i>Pseudonocardia</i> (3/17); <i>Saccharopolyspora</i> (2/7)	
(3a) <i>HindIII</i>	170–200 bp and 1270–1290 bp: <i>Gordonia</i> (1/15)	
(3b) <i>HindIII</i>	Two bands (460–570 bp, doublet) OR (460–570 bp and 890–990 bp)	4
(4a) <i>HindIII</i>	460 bp and 990 bp: <i>Kibdelosporangium</i> (1/1)	
(4b) <i>HindIII</i>	550–570 bp and 890–990 bp: <i>Nocardia</i> (5/25)	
(5a) <i>HindIII</i>	Cut	6
(5b) <i>HindIII</i>	Not cut	8
(6a) <i>HindIII</i>	Produces at least one band < 250 bp	7
(6b) <i>HindIII</i>	470–600 bp and 910–970 bp: <i>Lentzea</i> (3/4)	
(7a) <i>ScaI</i>	Cut (570–630 bp and 850–900 bp): <i>Gordonia</i> (8/15)	
(7b) <i>ScaI</i>	Not cut: <i>Pseudonocardia</i> (1/17); <i>Saccharomonospora</i> (1/6)	
(8a) <i>SalI</i>	Cut (540–560 bp and 950–990 bp)	9
(8b) <i>SalI</i>	Not cut	10
(9a) <i>PspI</i> 406I	Cut (440 bp and 1030 bp): <i>Streptoalloteichus</i> (1/1)	
(9b) <i>PspI</i> 406I	Not cut: <i>Kutzneria</i> (2/2)	
(10a) <i>PspI</i> 406I	Cut	11
(10b) <i>PspI</i> 406I	Not cut: <i>Actinokineospora</i> (5/5); <i>Lechevalieria</i> (2/2); <i>Lentzea</i> (1/4); <i>Pseudonocardia</i> (4/17); <i>Saccharothrix</i> (7/7)	
(11a) <i>PspI</i> 406I	Produces one band of 780 bp: <i>Saccharomonospora</i> (1/6)	
(11b) <i>PspI</i> 406I	600 bp and 800 bp: <i>Amycolatopsis</i> (11/12); <i>Pseudonocardia</i> (4/17); <i>Saccharopolyspora</i> (1/7)	

ANEXO 4. ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN UTILIZADAS EN EL ESTUDIO

Enzima	Sitio de restricción
<i>Sau3AI</i>	5' ↓GATC 3' 3' CTAG↓ 5'
<i>AsnI</i> o <i>VspI</i>	5' AT↓TA AT 3' 3' TA AT↓TA 5'
<i>KpnI</i>	5' G GTAC↓ C 3' 3' C ↓CATG G 5'
<i>SphI</i>	5' G CATG↓ C 3' 3' C ↓GTAC C 5'
<i>HindIII</i>	5' A↓ AGCTT 3' 3' T TCGA↓A 5'
<i>PstI</i>	5' CTGCA↓G 3' 3' G↓ACGTC 5'

**ANEXO 5. MAPAS DE RESTRICCIÓN DE LAS SECUENCIAS DE ADNr
16S UTILIZADAS PARA LAS RESTRICCIONES VIRTUALES**

Restriction Map with kitasatospora sp.

Sequence	Name	Number of cut sites
kitasatospora sp.	AsnI	0
kitasatospora sp.	KpnI	1
kitasatospora sp.	Sau3AI	5
kitasatospora sp.	SphI	2

Restriction Map with Micromonospora sp

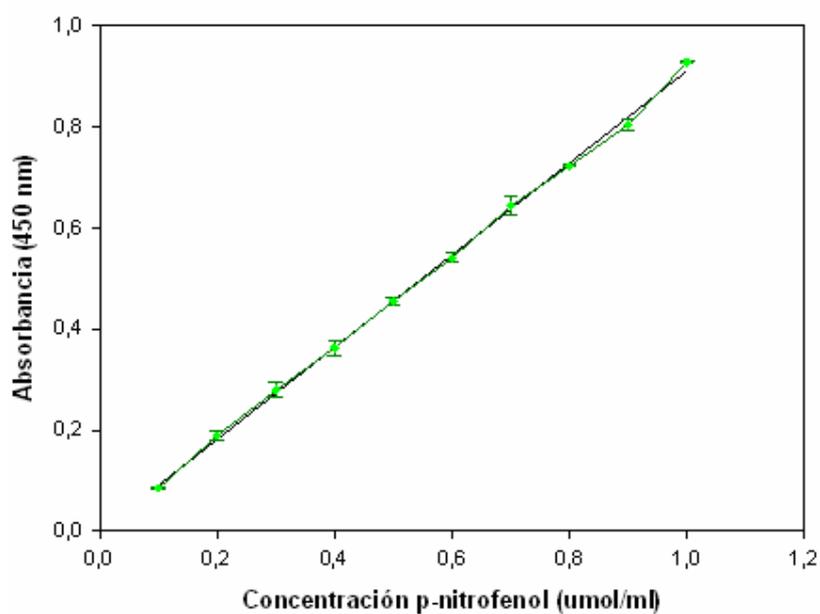
Sequence	Name	Number of cut sites
Micromonospora sp	AsnI	1
Micromonospora sp	Sall	1
Micromonospora sp	Sau3AI	3
Micromonospora sp	SnaBI	0
Micromonospora sp	SphI	2

Restriction Map with Thermobifida fusca

Sequence	Name	Number of cut sites
Thermobifida fusca	AsnI	0
Thermobifida fusca	HindIII	0
Thermobifida fusca	KpnI	0
Thermobifida fusca	PstI	0
Thermobifida fusca	Sau3AI	2
Thermobifida fusca	SphI	0

ANEXO 6. CURVA PATRON de *p*-nitrofenil-fosfato

Concentración (μmol/ml)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación
0,1	0,082	0,084	0,089	0,085	0,00360555	4,24182503
0,2	0,181	0,198	0,188	0,189	0,008544	4,5206369
0,3	0,262	0,284	0,290	0,279	0,01474223	5,29027378
0,4	0,353	0,356	0,381	0,363	0,01537314	4,23113855
0,5	0,451	0,463	0,453	0,456	0,0064291	1,41092184
0,6	0,532	0,551	0,540	0,541	0,00953939	1,76328873
0,7	0,631	0,665	0,635	0,644	0,01858315	2,8870761
0,8	0,723	0,721	0,725	0,723	0,002	0,27662517
0,9	0,794	0,814	0,806	0,805	0,01006645	1,25100819
1	0,928	0,929	0,928	0,928	0,00057735	0,06219213

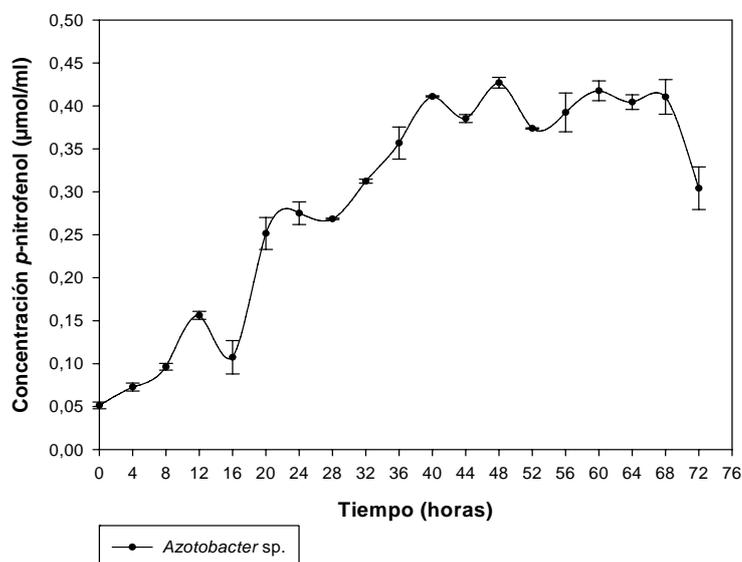


$$y = 0.912x - 0.0004$$

$$r^2 = 0,9989$$

ANEXO 7. DATOS ANEXOS DE LA SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATO

1. Solubilización de fosfato por parte de la cepa control a través de los tiempos de muestreo (cada 4 horas), expresado en cantidades de p-nitrofenil liberado



2. Análisis estadístico de la solubilización de fósforo por fosfatasa.

Inicialmente se ajusta el modelo que explicará la información recolectada.

Variable dependiente: FOSF

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	32	3.55376009	0.11105500	26.33	<.0001
Error	590	2.48871380	0.00421816		
Total correcto	622	6.04247389			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	FOSF Media
0.588130	52.43912	0.064947	0.123853

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
CEPA	25	1.90010993	0.07600440	18.02	<.0001
TIME	7	1.65365016	0.23623574	56.00	<.0001

El R cuadrado aunque no es muy alto, es bueno ya que como se consideran 25 tratamientos y el control, tener un modelo que ajuste perfecto a tantos datos y explique la variabilidad de los mismos es un poco complicado. Si se incluye en el modelo la variable réplica, el R cuadrado aumenta pero esta variable no aporta al modelo, entonces no es bueno incluirla.

Procedimiento GLM

Prueba del rango múltiple de Duncan para FOSF

Alfa 0.05

Media armónica de tamaño de celdas 23.95993

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Duncan Agrupamiento					Media	N	CEPA
				A	0.27177	24	0
				B	0.20964	24	2
	C			B	0.18872	24	1
	C			B D	0.18600	24	12
	C	E		B D	0.18122	24	5
	C	E		B D	0.17199	24	27
	C	E		F D	0.15765	24	30
	C	E		F D	0.15500	24	20
	G	E		F D	0.14582	24	7
	G	E		F	0.13969	24	19
	G			F H	0.12663	24	22
	G	I		F H	0.12177	23	8
J	G	I		F H	0.11744	24	23
J	G	I		F H	0.11566	24	26
J	G	I		K H	0.11073	24	4
J	G	I		K H	0.10680	24	25
J	G			K H	0.10410	24	9
J				K H	0.09620	24	18
J				K H	0.08546	24	6
J				K H	0.08514	24	3
J	L	I		K	0.08044	24	16
J	L			K M	0.07509	24	31
	L			K M	0.06911	24	11
	L			M	0.04197	24	24
				M	0.03927	24	21
				M	0.03679	24	10

Procedimiento GLM

Prueba del rango múltiple de Duncan para FOSF

Alfa 0.05

Media armónica de tamaño de celdas 77.87358

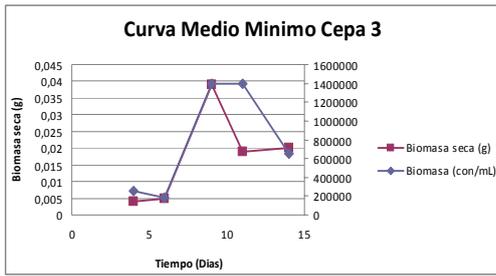
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Duncan Agrupamiento					Media	N	TIME
				A	0.18220	77	7
				B A	0.17201	78	6
				B	0.15704	78	4
				B	0.15192	78	5
				C	0.12563	78	3
				C	0.11123	78	2
				D	0.07104	78	1
				E	0.02050	78	0

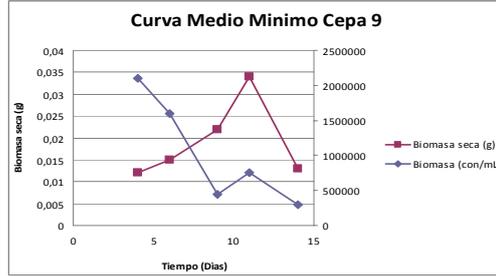
ANEXO 8. DATOS ANEXOS DE LA FIJACION DE NITROGENO

1. Curvas medio mineral sin N

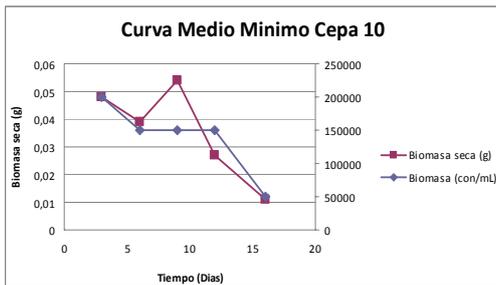
MCR3



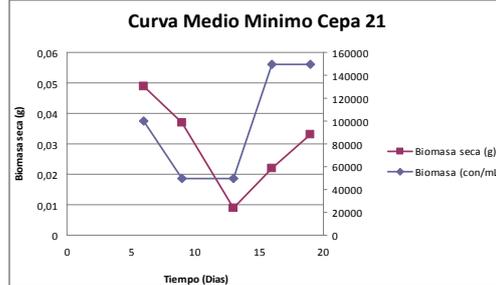
MCR9



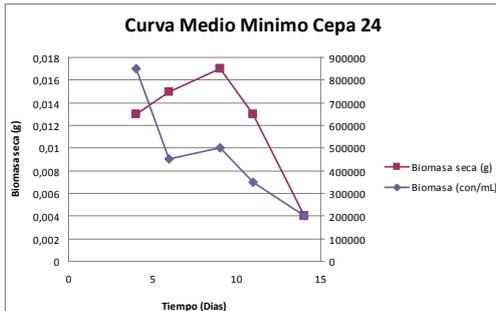
MCR10



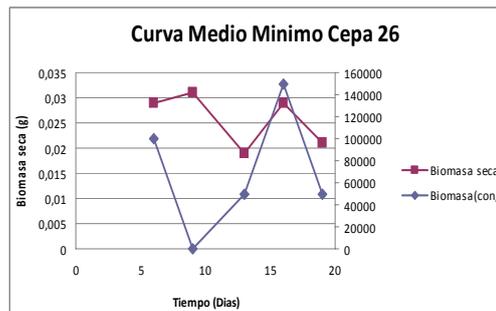
MCR21



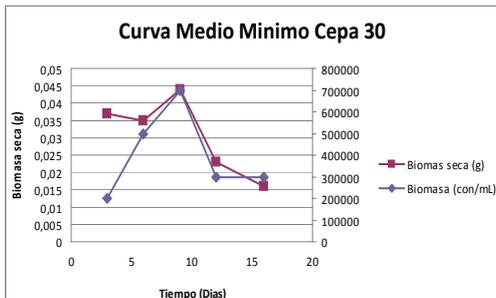
MCR24



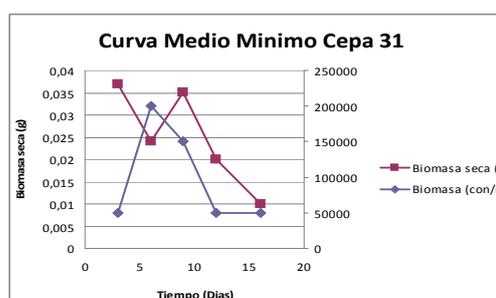
MCR26



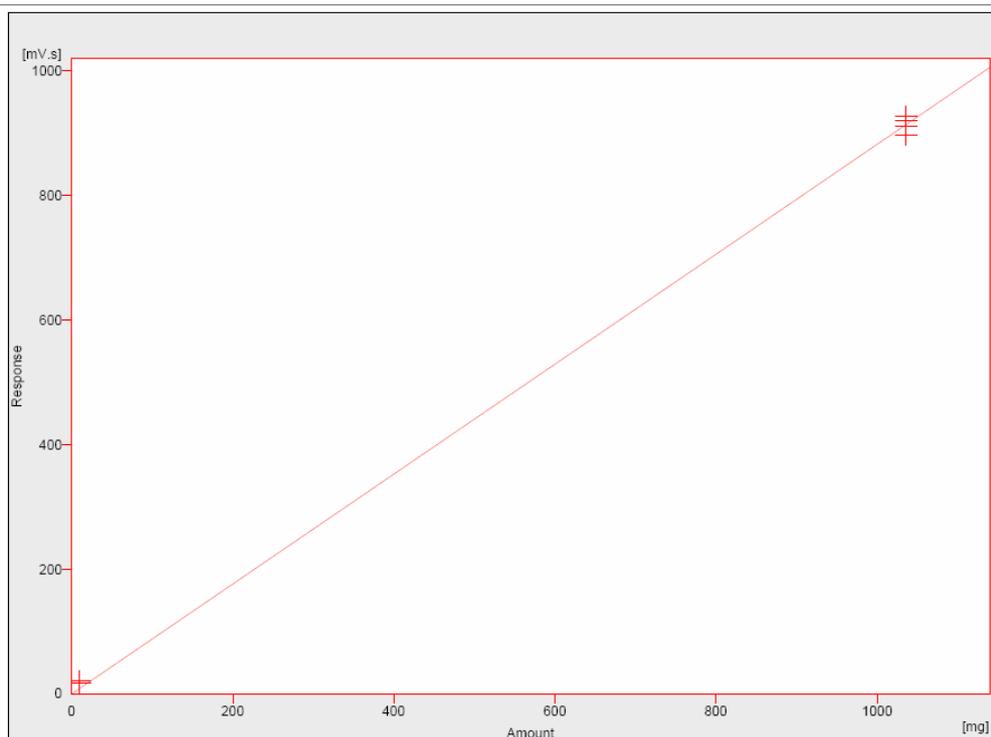
MCR30



MCR31



2. Curva calibración del etileno



Etileno - Signal 1 - 11.517 min.

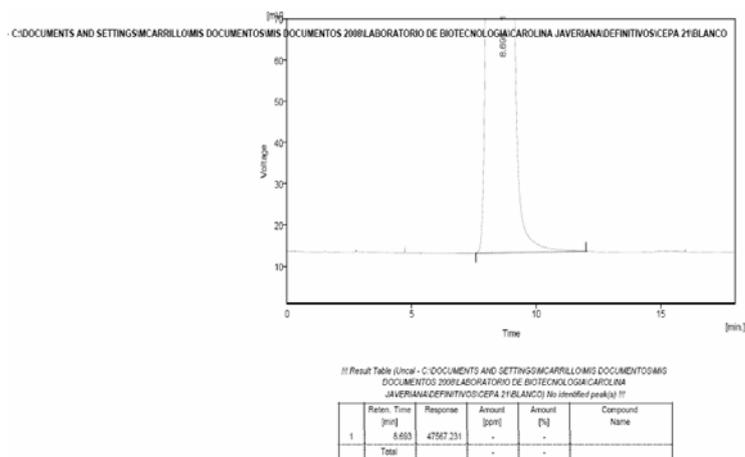
Peak Type : Ordnr
 Left Window : 0.5 min
 Right Window : 0.5 min
 Response Base : Area
 Curve Fit Type : Linear
 Zero Type : Curve from Zero
 Weighting Method : None
 Subst. Equation : $Y = 0.88175 \cdot X$
 Correlation Coef. : 0.9997806
 Residuum : 10.07007 [mV.s]

	Response	Amount	Resp. Factor	Rec No.	Used	Deviation [%]
1	911.0670	1036.0000	1.1371	1	<input checked="" type="checkbox"/>	0.2661
2	897.2303	1036.0000	1.1547	1	<input checked="" type="checkbox"/>	1.8124
3	928.3947	1036.0000	1.1183	1	<input checked="" type="checkbox"/>	-1.3928
4	919.0650	1036.0000	1.1272	1	<input checked="" type="checkbox"/>	-0.6064
5	21.4089	10.0000	0.4671	1	<input checked="" type="checkbox"/>	-58.8139
6	17.9521	10.0000	0.5570	1	<input checked="" type="checkbox"/>	-50.8831
7	0.0000	0.0000	0.0000	0	<input checked="" type="checkbox"/>	-
8	0.0000	0.0000	0.0000	0	<input checked="" type="checkbox"/>	-
9	0.0000	0.0000	0.0000	0	<input checked="" type="checkbox"/>	-
10	0.0000	0.0000	0.0000	0	<input checked="" type="checkbox"/>	-
11	0.0000	0.0000	0.0000	0	<input checked="" type="checkbox"/>	-
12	0.0000	0.0000	0.0000	0	<input checked="" type="checkbox"/>	-
13	0.0000	0.0000	0.0000	0	<input checked="" type="checkbox"/>	-
14	0.0000	0.0000	0.0000	0	<input checked="" type="checkbox"/>	-
15	0.0000	0.0000	0.0000	0	<input checked="" type="checkbox"/>	-
16	0.0000	0.0000	0.0000	0	<input checked="" type="checkbox"/>	-
17	0.0000	0.0000	0.0000	0	<input checked="" type="checkbox"/>	-
18	0.0000	0.0000	0.0000	0	<input checked="" type="checkbox"/>	-
19	0.0000	0.0000	0.0000	0	<input checked="" type="checkbox"/>	-
20	0.0000	0.0000	0.0000	0	<input checked="" type="checkbox"/>	-

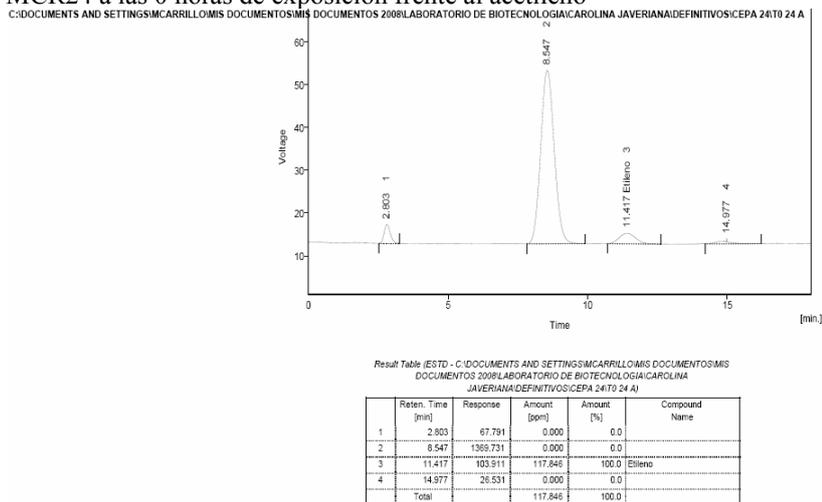
3. Cromatogramas del ARA

Se exponen algunos de los cromatogramas que se usaron para el análisis de la reducción del acetileno.

Control negativo:

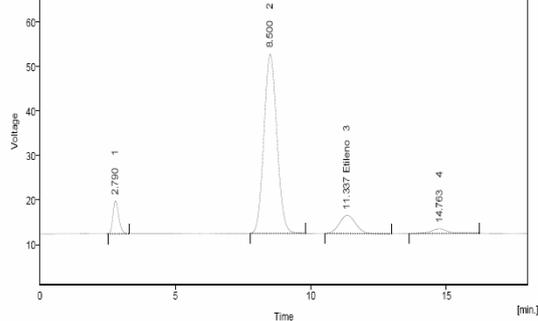


MCR24 a las 0 horas de exposición frente al acetileno



MCR26 a las 0 horas de exposición frente al acetileno

C:\DOCUMENTS AND SETTINGS\MCARILLOMIS\DOCUMENTOS\MIS DOCUMENTOS 2008\LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA\CAROLINA JAVERIANA\DEFINITIVOS\CEPA 26\T0 26 B

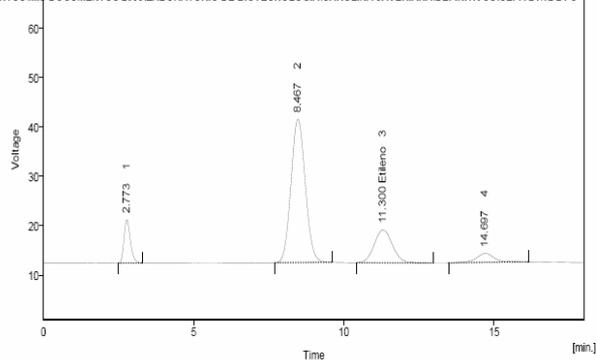


Result Table (ESTD - C:\DOCUMENTS AND SETTINGS\MCARILLOMIS\DOCUMENTOS\MIS DOCUMENTOS 2008\LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA\CAROLINA JAVERIANA\DEFINITIVOS\CEPA 26\T0 26 B)

Reten. Time [min]	Response	Amount [ppm]	Amount [%]	Compound Name
1	2.790	110.696	0.000	0.0
2	8.500	1343.509	0.000	0.0
3	11.337	172.135	195.220	100.0 Etileno
4	14.763	47.014	0.000	0.0
Total			195.220	100.0

MCR24 a las 2 horas de exposición frente al acetileno.

C:\DOCUMENTS AND SETTINGS\MCARILLOMIS\DOCUMENTOS\MIS DOCUMENTOS 2008\LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA\CAROLINA JAVERIANA\DEFINITIVOS\CEPA 24\T2 24 C

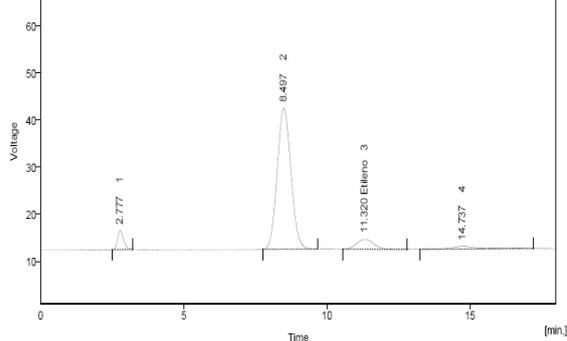


Result Table (ESTD - C:\DOCUMENTS AND SETTINGS\MCARILLOMIS\DOCUMENTOS\MIS DOCUMENTOS 2008\LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA\CAROLINA JAVERIANA\DEFINITIVOS\CEPA 24\T2 24 C)

Reten. Time [min]	Response	Amount [ppm]	Amount [%]	Compound Name
1	2.773	129.528	0.000	0.0
2	8.467	961.450	0.000	0.0
3	11.300	279.947	317.491	100.0 Etileno
4	14.697	76.684	0.000	0.0
Total			317.491	100.0

MCR26 a las 2 horas de exposición frente al acetileno

C:\DOCUMENTS AND SETTINGS\MCARILLO\MIS DOCUMENTOS\MIS DOCUMENTOS 2008\LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA\CAROLINA JAVERIANA\DEFINITIVOS\CEPA 26\T 2 26 B

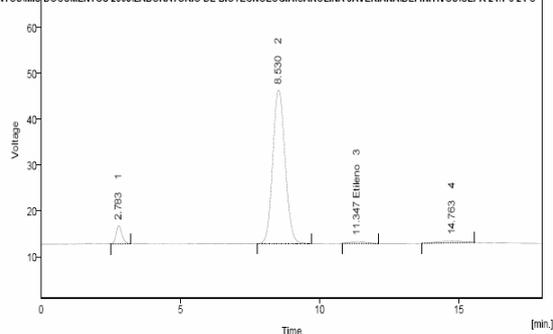


Result Table (ESTD - C:\DOCUMENTS AND SETTINGS\MCARILLO\MIS DOCUMENTOS\MIS DOCUMENTOS 2008\LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA\CAROLINA JAVERIANA\DEFINITIVOS\CEPA 26\T 2 26 B)

Reten. Time [min]	Response	Amount [ppm]	Amount [%]	Compound Name
1	2.777	59.708	0.000	0.0
2	8.497	998.389	0.000	0.0
3	11.320	97.977	99.775	100.0 Etileno
4	14.737	44.935	0.000	0.0
Total			99.775	100.0

MCR24 a las 5 horas de exposición frente al acetileno

C:\DOCUMENTS AND SETTINGS\MCARILLO\MIS DOCUMENTOS\MIS DOCUMENTOS 2008\LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA\CAROLINA JAVERIANA\DEFINITIVOS\CEPA 24\T 5 24 C

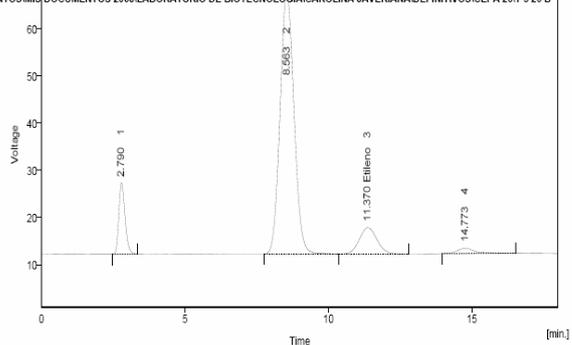


Result Table (ESTD - C:\DOCUMENTS AND SETTINGS\MCARILLO\MIS DOCUMENTOS\MIS DOCUMENTOS 2008\LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA\CAROLINA JAVERIANA\DEFINITIVOS\CEPA 24\T 5 24 C)

Reten. Time [min]	Response	Amount [ppm]	Amount [%]	Compound Name
1	2.783	58.426	0.000	0.0
2	8.530	1031.944	0.000	0.0
3	11.347	18.577	18.801	100.0 Etileno
4	14.763	24.995	0.000	0.0
Total			18.801	100.0

MCR26 a las 5 horas de exposición frente al acetileno

C:\DOCUMENTS AND SETTINGS\MCARRILLO\MIS DOCUMENTOS\MIS DOCUMENTOS 2008\LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA\CAROLINA JAVERIANA\DEFINITIVO\CEPA 26IT 5 26 B



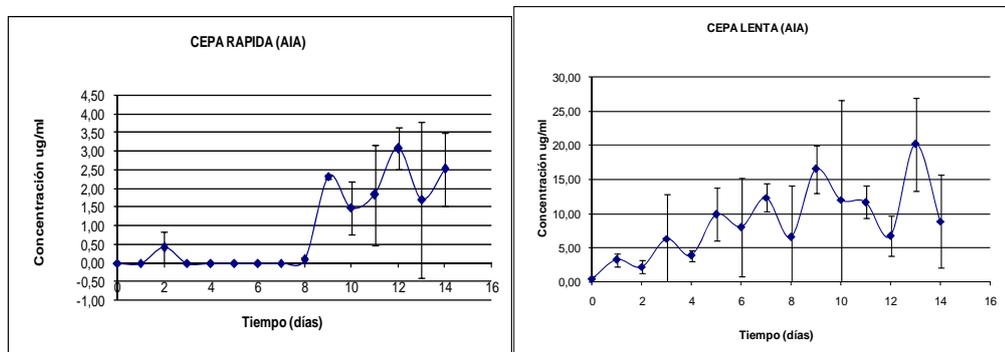
Result Table (ESTD - C:\DOCUMENTS AND SETTINGS\MCARRILLO\MIS DOCUMENTOS\MIS DOCUMENTOS 2008\LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA\CAROLINA JAVERIANA\DEFINITIVO\CEPA 26IT 5 26 B)

	Reten. Time [min]	Response	Amount [ppm]	Amount [%]	Compound Name
1	2.790	228.010	0.000	0.0	
2	8.563	1873.348	0.000	0.0	
3	11.370	240.529	272.786	100.0	Etieno
4	14.773	49.457	0.000	0.0	
	Total		272.786	100.0	

ANEXO 9. DATOS DE ANEXOS DE AIA.

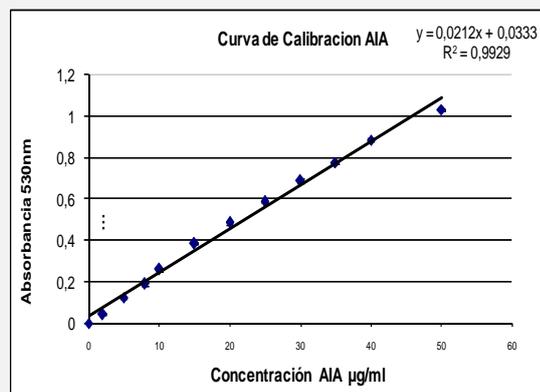
1. Curva de producción de AIA para la estandarización de los días de muestreo

Valores correspondientes al promedio de tres réplicas.

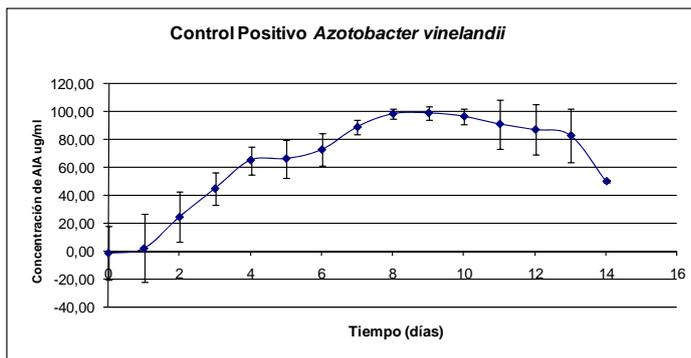


2. Curva calibración AIA

[] µg/ml	Abs _{530nm}	Desvest
0	0,0013	0,0015
2	0,0470	0,0026
5	0,1257	0,0055
8	0,1920	0,0098
10	0,2617	0,0085
15	0,3857	0,0040
20	0,4857	0,0067
25	0,5907	0,0049
30	0,6920	0,0106
35	0,7787	0,0081
40	0,8883	0,0061
50	1,0347	0,0055



3. Curva de producción de AIA por la cepa control (*Azotobacter vinelandii*)



4. Análisis de la variable AIA por ANOVA

Procedimiento ANOVA		Variable dependiente: AIA			
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	13	1577.551969	121.350151	17.45	<.0001
Error	118	820.485411	6.953266		
Total correcto	131	2398.037380			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	AIA Media	
	0.657851	40.13093	2.636905	6.570755	
Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
CEPA	10	1515.466729	151.546673	21.80	<.0001
DIA	3	62.085240	20.695080	2.98	0.0344
Procedimiento ANOVA		Nivel de -AIA			
DIA	N	Media	Dev std		
8	33	5.95211549	4.60035845		
9	33	7.32861635	5.04512592		
10	33	5.82489994	2.66761750		
11	33	7.17738708	4.38927418		

Prueba de Duncan para la variable AIA

Prueba del rango múltiple de Duncan para AIA

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Duncan Agrupamiento	Media	N	CEPA
A	12.710	12	14
B A	10.650	12	16
B C	9.833	12	10
B C	8.795	12	3
C	7.616	12	27
D	5.281	12	26
D	5.061	12	21
E D	4.361	12	24
E D	3.197	12	9
E	2.589	12	32
E	2.187	12	30

Prueba del rango múltiple de Duncan para AIA

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	118
Error de cuadrado medio	6.953266

Número de medias	2	3	4
Rango crítico	1.286	1.353	1.398

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Duncan Agrupamiento	Media	N	DIA
A	7.3286	33	9
B A	7.1774	33	11
B	5.9521	33	8
B	5.8249	33	10

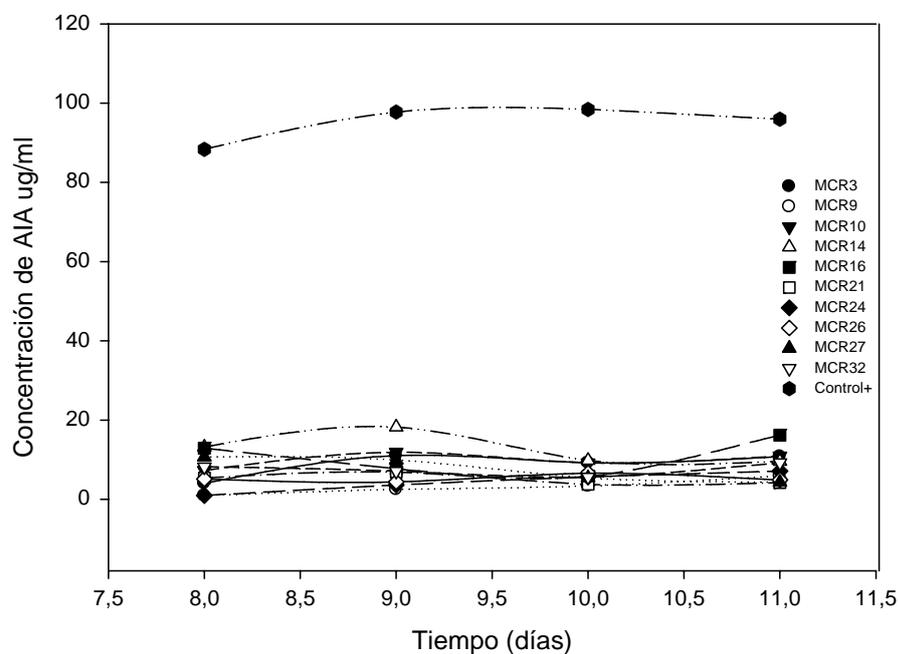
Análisis general de AIA Variable dependiente: AIA

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	10	614.1915327	61.4191533	21.44	<.0001
Error	22	63.0339979	2.8651817		
Total correcto	32	677.2255307			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	AIA Media
0.906923	28.43837	1.692685	5.952115

Fuente	DF	Tipo I SS	la media	F-Valor	Pr > F
CEPA	10	614.1915327	61.4191533	21.44	<.0001

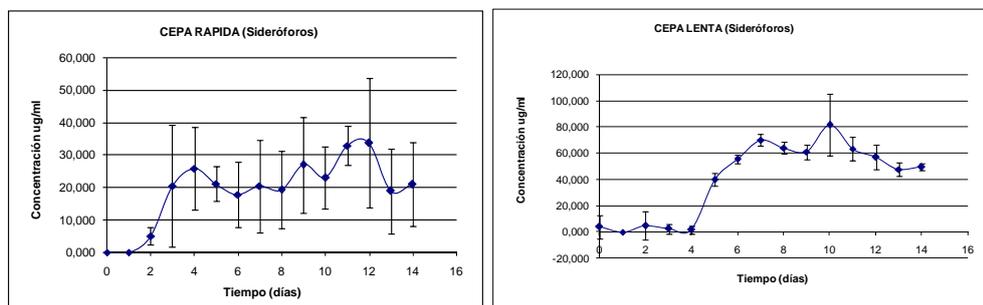
5. Curva de producción de AIA de todas las cepas incluyendo el control



ANEXO 10. DATOS ANEXOS DE SIDEROFOROS

1. Curva de producción de sideróforos para la estandarización de los días de muestreo

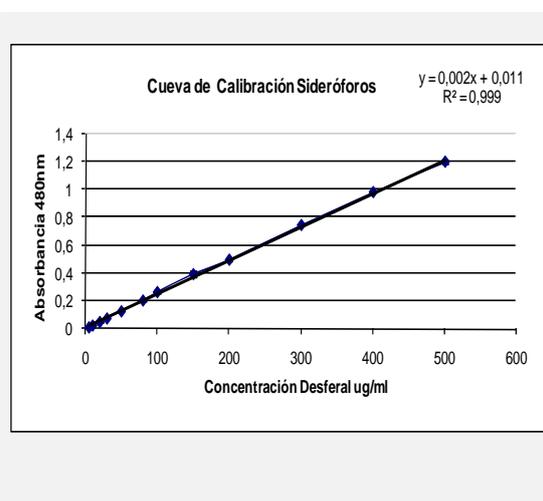
Valores correspondientes al promedio de tres réplicas.



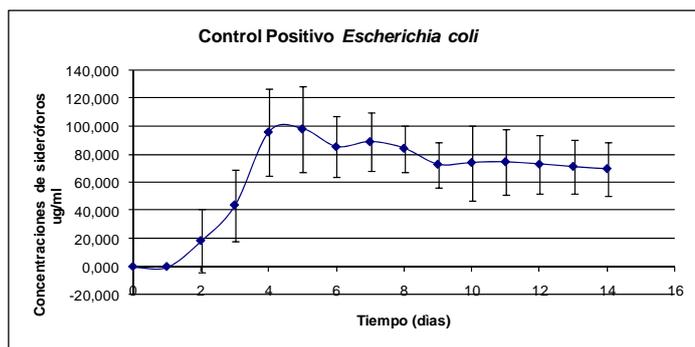
2. Curva calibración Sideróforos de hidroxamato

Valores correspondientes al promedio de tres réplicas

[] µg/ml	Abs _{480nm}	Desvest
500	1,199	0,0130
400	0,9817	0,0023
300	0,7463	0,0006
200	0,4980	0,0036
150	0,3947	0,0195
100	0,2663	0,0106
80	0,2063	0,0038
50	0,1287	0,0006
30	0,0777	0,0006
20	0,0523	0,0012
10	0,0270	0,0000
5	0,0140	0,0000



3. Curva de producción de Sideróforos de hidroxamato por la cepa control (*Escherichia coli*)



4. Análisis de la variable Sideróforos por ANOVA

Procedimiento ANOVA		Variable dependiente: SIDEROFOROS			
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	14	241474.0066	17248.1433	231.92	<.0001
Error	129	9593.9284	74.3715		
Total correcto	143	251067.9350			
	R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	SIDE Media	
	0.961788	24.43045	8.623893	35.29977	
Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
CEPA	11	240758.4153	21887.1287	294.29	<.0001
DIA	3	715.5912	238.5304	3.21	0.0254
Procedimiento ANOVA		Nivel de -SIDE-			
DIA	N	Media	Dev std		
8	36	33.6273148	46.6760003		
9	36	32.8518519	41.2336361		
10	36	36.2199074	39.8634184		
11	36	38.5000000	41.0483890		

Prueba de Duncan para la variable Sideróforos Prueba del rango múltiple de Duncan para SIDE Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Duncan Agrupamiento	Media	N	CEPA
A	137.076	12	24
B	106.521	12	0
C	35.410	12	16
D C	31.694	12	27
D C	28.986	12	14
D	27.354	12	10
D	27.007	12	3
E	11.764	12	32
F E	8.986	12	9
F E	8.361	12	26
G F	2.875	12	21
G	-2.437	12	30

Prueba del rango múltiple de Duncan para SIDE

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	129
Error de cuadrado medio	74.37154

Número de medias	2	3	4
Rango crítico	4.022	4.233	4.373

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Duncan Agrupamiento	Media	N	DIA
A	38.500	36	11
B A	36.220	36	10
B	33.627	36	8
B	32.852	36	9

Análisis general de Sideróforos Variable dependiente: SIDE

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	13	75008.85900	5769.91223	102.05	<.0001
Error	22	1243.85610	56.53891		
Total correcto	35	76252.71510			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	SIDE Media
0.983688	22.36050	7.519236	33.62731

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
CEPA	11	74992.18269	6817.47115	120.58	<.0001
REP	2	16.67631	8.33816	0.15	0.8637

**ANEXO 11. CORRELACION DE DATOS DE LAS ACTIVIDADES PGPR
in vitro**

1. Tabla resumen de resultados de fijación de nitrógeno, solubilización de fósforo, AIA y sideróforos en términos cualitativos

CEPA	Crecimiento en medio libre de Nitrógeno	Solubilización de Fósforo	DIA	Sideróforos	AIA
MCR3	+	+	8	+	-
			9	+	+
			10	+	+
			11	+	+
MCR9	+	-	8	-	-
			9	-	-
			10	-	-
			11	-	-
MCR10	+	-	8	+	+
			9	+	+
			10	+	+
			11	+	+
MCR14	+	-	8	+	+
			9	+	+
			10	+	+
			11	+	+
MCR21	+	+	8	-	-
			9	-	-
			10	-	-
			11	-	-
MCR24	+	-	8	+	-
			9	+	-
			10	+	-
			11	+	+
MCR26	+	-	8	-	-
			9	-	-
			10	-	+

			11	-	-
MCR27	+	+	8	+	+
			9	+	+
			10	+	-
			11	+	-
MCR30	+	-	8	-	-
			9	-	-
			10	-	-
			11	-	-
MCR31	+	-	8	-	-
			9	-	-
			10	-	-
			11	+	-

2. Matriz con todas las correlaciones entre las variables

	Nitrógeno	Fósforo	Sideróforos	AIA
Nitrógeno	1			
Fósforo	NA	1		
Sideróforos	NA	0,149	1	
AIA	NA	0,261	0,833	1

3. Cuadro de correlación de Pearson para las variables longitud del sistema radicular, longitud del aéreo, peso seco del sistema radicular, peso seco del sistema aéreo, producción de sideróforos, producción de AIA con todas las cepas.

	LR	LT	MSR	MST	Side	AIA
LR	1,00000	-0,81317	-0,02009	-0,48520	-0,08073	-0,21463
LT	-0,81317	1,00000	0,14266	0,64170	-0,11859	0,13672
MSR	-0,02009	0,14266	1,00000	0,67464	-0,64229	-0,43858
MST	-0,48520	0,64170	0,67464	1,00000	-0,23858	-0,04577
Side	-0,08073	-0,11859	-0,64229	-0,23858	1,00000	0,57975
AIA	-0,21463	0,13672	-0,43858	-0,04577	0,57975	1,00000

LR: Longitud del sistema radicular, LT: Longitud del sistema aéreo, MSR: Peso seco del sistema radicular, MST: Peso seco del sistema aéreo, Side: Sideróforos, AIA: Ácido Indol Acético. Los datos son del día 10 al ser el día en el que se registró una mayor variabilidad de los datos

ANEXO 12. ESTADISTICA PARA LOS DATOS DE SUELO, RIZOSFERA Y RIZOPLANO

1. Análisis estadístico del establecimiento de los actinomicetos.

Cepa MCR9

Rizoplana

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento	Media	N	Tiempo
A	1.21776	2	15 a 20
B	0.66435	2	10 a 15
C	0.14023	2	25 a 30
C	0.02382	2	20 a 25

Rizosfera

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento	Media	N	Tiempo
A	0.2587	2	20 a 25
A	0.0367	2	25 a 30
A	-0.0013	2	15 a 20
A	-0.7277	2	10 a 15

Suelo

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento	Media	N	Tiempo
A	0.8334	2	0a5
B	0.1961	2	20a25
B	-0.0074	2	25a30
B	-0.0220	2	10a15
B	-0.0622	2	5a10
B	-0.2973	2	15a20

Cepa MCR24

Rizoplana

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento	Media	N	Tiempo
A	1.36838	2	15 a 20
B	1.12036	2	10 a 15
C	0.04357	2	25 a 30
C	-	2	20 a 25
	0.03183		

Rizosfera

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento	Media	N	Tiempo
A	1.06882	2	25 a 30
B	0.00870	2	20 a 25
B	-0.04595	2	15 a 20
C	-2.04789	2	10 a 15

Suelo

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento	Media	N	Tiempo
A	0.78597	2	0 a 5
B	0.31314	2	10 a 15
C	0.01946	2	25 a 30
C	0.00000	2	20 a 25
C	-0.07403	2	15 a 20
C	-0.19402	2	5 a 10

Cepa MCR26

Rizoplana

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento	Media	N	Tiempo
A	1.40585	2	10 a 15
B	1.00911	2	20 a 25
C	0.53929	2	15 a 20
D	0.01392	2	25 a 30

Rizosfera

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento	Media	N	Tiempo
A	0.15024	2	15 a 20
A	0.07079	2	25 a 30
A	0.01637	2	20 a 25
B	-2.24178	2	10 a 15

Suelo

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento	Media	N	Tiempo
A	0.7970	2	0 a 5
B	0.3477	2	10 a 15
B	0.1288	2	25 a 30
B	0.0161	2	20 a 25
B	-0.0161	2	15 a 20
C	-0.2284	2	5 a 10

2. Análisis de varianzas de los tratamientos

Análisis de varianzas para la variable longitud de raíz transformada

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	5	0,29936881	0,05987376	20,76	<,0001
Error	414	1,19421181	0,00288457		
Total correcto	419	1,49358062			

Análisis de varianzas para la variable longitud de tallo transformada

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	5	0,38887291	0,07777458	31,27	<,0001
Error	414	1,02969474	0,00248719		
Total correcto	419	1,41856764			

Análisis de varianzas para la variable peso seco de raíz transformada

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	5	41,608165	8,321633	3,24	0,0069
Error	414	1062,052100	2,565343		
Total correcto	419	1103,660266			

Análisis de varianzas para la variable peso seco de tallo transformada

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	5	5,13793193	1,02758639	6,88	<,0001
Error	414	61,79616989	0,14926611		
Total correcto	419	66,93410183			

Coefficientes de correlación Pearson

Coefficientes de correlación Pearson						
Prob > r suponiendo H0: Rho=0						
Número de observaciones						
	LR	LT	MSR	MSF	Side	AIA
LR	1,00000 <,0001 72	-0,81317 <,0001 72	-0,02009 0,8670 72	-0,48520 <,0001 72	-0,08073 0,5398 60	-0,21463 0,0996 60
LT	-0,81317 <,0001 72	1,00000 <,0001 72	0,14266 0,2319 72	0,64170 <,0001 72	-0,11859 0,3668 60	0,13672 0,2976 60
MSR	-0,02009 0,8670 72	0,14266 0,2319 72	1,00000 <,0001 72	0,67464 <,0001 72	-0,64229 <,0001 60	-0,43858 0,0005 60
MSF	-0,48520 <,0001 72	0,64170 <,0001 72	0,67464 <,0001 72	1,00000 <,0001 72	-0,23858 0,0664 60	-0,04577 0,7284 60
Side	-0,08073 0,5398 60	-0,11859 0,3668 60	-0,64229 <,0001 60	-0,23858 0,0664 60	1,00000 60	0,57975 <,0001 60
AIA	-0,21463 0,0996 60	0,13672 0,2976 60	-0,43858 0,0005 60	-0,04577 0,7284 60	0,57975 <,0001 60	1,00000 60

LR: longitud de raíz, LT: longitud de tallo, MSR: masa seca radicular, MSF: masa seca foliar, Side: Sideróforos, AIA: ácido indol acético.