



## CAPACIDAD DE BACTERIAS ENDÓFITAS DIAZOTRÓFICAS AISLADAS DE MAGUEY PARA SOLUBILIZAR P Y Fe

### CAPACITY OF ENDOPHYTIC DIAZOTROPHIC BACTERIA ISOLATED FROM MAGUEY TO SOLUBILIZE P AND Fe

Blanca Moreno-Gómez<sup>1</sup>, Erika Aldana-Hernández<sup>2</sup>, Edmundo García-Moya<sup>3</sup>  
y Gerardo A. Aguado-Santacruz<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Bajío, Celaya, Guanajuato, México. <sup>2</sup>BIOqualitum, Celaya, Guanajuato, México. <sup>3</sup>Colegio de Postgraduados, Postgrado en Botánica, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México.

\*Autor de correspondencia (gaguados@gmail.com)

#### RESUMEN

Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal son habitantes naturales del suelo y del interior de los tejidos de las plantas y son capaces de promover el crecimiento y la productividad de los cultivos. Cuando estas bacterias son susceptibles de ser aisladas y multiplicadas en laboratorio poseen un alto potencial para ser comercializadas y usadas para mejorar el rendimiento y sanidad de los cultivos. En este estudio se llevó a cabo el aislamiento, a partir de maguey, de bacterias endófitas diazotróficas con capacidad para solubilizar fosfato y hierro. Se colectaron pencas de maguey de las variedades Púa Larga, Ayoteco, Manso, Carricillo y Chalqueño en el Rancho Magueyero San Isidro, al suroeste de Nanacamilpa de Mariano Arista, Tlaxcala, México. El aislamiento de las bacterias endófitas se efectuó en el medio selectivo ELMARC y la identificación molecular posterior se llevó a cabo mediante la amplificación de un fragmento de la subunidad ribosomal 16S. Una vez realizada la identificación de las bacterias mediante la comparación de las secuencias amplificadas contra la base de datos del NCBI, se realizó una evaluación de las capacidades de las bacterias para fijar nitrógeno y solubilizar fosfato (P) y hierro (Fe) con base en las técnicas ARA (Ensayo de Reducción de Acetileno), Vanadato-Molibdato y Sulfonato de Cromo Azurol (CAS), respectivamente. Las pruebas ARA comprobaron la naturaleza diazotrófica de las bacterias seleccionadas en el medio ELMARC. La realización de pruebas cualitativas CAS mostró que, de 18 cepas aisladas, 12 presentaron alta capacidad para producir sideróforos. Posteriormente, la identificación de la naturaleza química de estas moléculas y las pruebas bioquímicas cuantitativas realizadas permitieron constatar que las cepas de *Bacillus mojavensis* (Bamo) y *Leclercia* sp. (Lesp2), con valores de 0.669 y 0.637 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente, fueron las mayores productoras de sideróforos tipo catecolato a las 24 h, mientras que *Erwinia tasmaniensis* (Erta) y *Enterobacter* sp. (Ensp1) destacaron por ser las mejores solubilizadoras de fosfato, mostrando actividades respectivas de 56.48 y 49.51 mg L<sup>-1</sup> a las 96 h.

**Palabras clave:** Bacterias diazotróficas, bacterias endófitas, maguey, sideróforos, solubilización de fosfatos.

#### SUMMARY

Plant growth promoting bacteria are natural inhabitants of the soil and the interior of plant tissues and are capable of promoting the growth and productivity of crops. When these bacteria can be isolated and multiplied in the laboratory, they have a high potential to be commercialized and used to

improve the yield and health of crops. In this study, the isolation from maguey of endophytic diazotrophic bacteria with the capacity to solubilize phosphate and iron was carried out. Maguey leaves of the Púa Larga, Ayoteco, Manso, Carricillo and Chalqueño varieties were collected at the San Isidro maguey producer ranch, in the southwest of Nanacamilpa de Mariano Arista, Tlaxcala, Mexico. Isolation of endophytic bacteria was carried out using the ELMARC selective medium, and subsequent molecular identification was carried out by amplifying a fragment of the 16S ribosomal subunit. Once the identification of the bacteria was carried out by comparing the amplified sequences against the NCBI database, an evaluation of the capabilities of the bacteria to fix nitrogen and solubilize phosphate (P) and iron (Fe) was carried out based on the ARA (Acetylene Reduction Assay), Vanadate-Molybdate and Chromium Azurol Sulfonate (CAS) techniques, respectively. The ARA tests verified the diazotrophic nature of the selected bacteria in the ELMARC medium. The qualitative CAS tests showed that, of 18 isolated strains, 12 showed high capacity to produce siderophores. Afterwards, the identification of the chemical nature of these molecules and the quantitative biochemical tests carried out, made it possible to verify that the strains of *Bacillus mojavensis* (Bamo) and *Leclercia* sp. (Lesp2), with values of 0.669 and 0.637 mg mL<sup>-1</sup>, respectively, were the highest producers of catecholate-type siderophores at 24 h, while *Erwinia tasmaniensis* (Erta) and *Enterobacter* sp. (Ensp1), stood out for being the best phosphate solubilizers, achieving respective activities of 56.48 and 49.51 mg L<sup>-1</sup> at 96 h.

**Index words:** Diazotrophic bacteria, endophytic bacteria, maguey, phosphate solubilization, siderophores.

#### INTRODUCCIÓN

Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) son habitantes naturales del suelo que pueden encontrarse en la rizósfera o en el interior de los tejidos de las plantas y son capaces de promover el crecimiento y la productividad de los cultivos (González y Fuentes, 2017). Cuando estas bacterias son susceptibles de ser aisladas y multiplicadas en laboratorio, poseen un alto potencial para ser comercializadas y usadas para mejorar el rendimiento y sanidad de los cultivos. La producción de los cultivos agrícolas utilizando BPCV es una tecnología que cada día gana mayor importancia en la agricultura de México

y el mundo. Los beneficios de las relaciones asociativas que se establecen entre las plantas y las BPCV incluyen el aumento de la productividad, la calidad de las cosechas y la reducción de la incidencia de enfermedades (Aguado-Santacruz, 2012).

Los mecanismos de acción de las BPCV se dividen en directos e indirectos. Los efectos directos incluyen la producción de fitohormonas (ácido indolacético, ácido giberélico, citocininas y ácido abscísico), la capacidad de producir la enzima 1-aminociclopropano 1-carboxilato (ACC) desaminasa, que mejora el crecimiento de las plantas al reducir los niveles internos de etileno, el aumento en la asimilación de nutrientes del suelo mediante su solubilización a partir de formas complejas de elementos como fósforo, hierro y potasio, entre otros, y la fijación biológica de nitrógeno, mientras que los mecanismos indirectos se relacionan con la modificación del ambiente rizosférico y con sus actividades de biocontrol contra agentes fitopatógenos, mediante la liberación de sideróforos,  $\beta$ -1,3-glucanasas, quitinasas o antibióticos (González y Fuentes, 2017).

La incorporación de nitrógeno al suelo y a las plantas a partir del aporte atmosférico constituye uno de los mecanismos más importantes para el crecimiento y rendimiento de cultivos (Ariza *et al.*, 2020), aunque la existencia de capacidades adicionales en los microorganismos para mejorar el crecimiento de las plantas, tales como la solubilización de fosfato y hierro, les confiere un valor agregado (Aguado-Santacruz, 2012). La deficiencia de hierro y fósforo representa un problema en México, en particular en el norte del país, donde la elevada concentración de sales limita fuertemente la disponibilidad de estos elementos (Romero *et al.*, 2019). El fósforo es un nutriente limitante para las plantas ubicadas en zonas áridas, ya que aunque los suelos pueden presentar una alta concentración de este nutriente; es decir, 557-729 kg ha<sup>-1</sup>, sólo del 2.4 al 3.9 % se encuentra en formas asimilables para las plantas, el resto se encuentra en formas insolubles, tales como fosfatos de aluminio en suelos ácidos y fosfatos de calcio en suelos derivados de material parental sedimentario alcalino.

Las estrategias para corregir la baja disponibilidad de fósforo incluyen el uso de fuentes orgánicas de este elemento y la utilización de bacterias solubilizadoras de fosfatos, las cuales utilizan diferentes mecanismos, como la producción de ácidos orgánicos y enzimas fosfatasas, para convertirlo en formas iónicas solubles como la monobásica ( $H_2PO_4^-$ ) y la dibásica ( $HPO_4^{2-}$ ) (Aguado-Santacruz, 2012).

Por otra parte, el hierro es el cuarto metal más abundante

en los suelos; A pesar de ésto, en presencia de oxígeno y pH neutro, este elemento es escaso y no disponible debido a la rápida oxidación de  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$  y la subsecuente formación de silicatos de ferromagnesio, hidróxidos u óxidos de hierro, formas que no son fácilmente asimilables por las plantas; además, el pH, los contenidos de materia orgánica, la textura y aireación del suelo afectan su disponibilidad; por ejemplo, en suelos calcáreos la concentración de hierro disponible decrece rápidamente a medida que el pH incrementa; a partir de un pH de 7.4, como límite inferior, la solubilidad empieza a decrecer hasta un valor de 8.5.

De acuerdo con el grupo funcional quelador del hierro, los sideróforos pueden clasificarse en catecolatos (fenolatos), hidroximatos e hidroxicarboxilatos, formas moleculares que conforman complejos octaédricos hexadentados con el metal (Miethke y Marahiel, 2007). Considerando las premisas anteriores, la búsqueda de microorganismos que sean capaces de aportar nitrógeno a las plantas en suelos con baja disponibilidad de hierro y fósforo posee una gran importancia para la agricultura nacional y mundial, pues es necesario consolidar una producción de alimentos agrícolas menos dependiente de agroquímicos, generar alimentos inocuos y desarrollar una agricultura con un impacto mínimo al ambiente. En esta investigación se planteó el objetivo de identificar a nivel molecular una colección de cepas diazotróficas, aisladas a partir de maguey y analizar su potencial para solubilizar P y Fe.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolección de muestras

La presente investigación inició con un muestreo en el Rancho Magueyero San Isidro, ubicado a 5 kilómetros al suroeste de la localidad de Nanacamilpa de Mariano Arista, Tlaxcala en el año 2018. Los materiales de maguey utilizados para el aislamiento de bacterias incluyeron a Manso, Chalqueño, Ayoteco, Púa Larga y Carricillo. Se recolectó una penca de la sección media del maguey. Una vez realizado el trabajo de campo, se procedió al traslado de las muestras a los laboratorios de la empresa BIOqualitum S.A. de C.V. ubicados en la ciudad de Celaya, Guanajuato, para su procesamiento.

### Aislamiento de bacterias

Las muestras vegetales fueron procesadas dentro de los 5 d posteriores a su colecta, considerando tres secciones de las pencas (basal, media y distal); la sección basal fue aquella más próxima a la roseta de las plantas, mientras que la sección distal incluía la púa de la penca. Se retiraron las espigas laterales y distales del maguey para facilitar su procesamiento; posteriormente, los trozos de pencas de

magüey se lavaron con agua y se cortaron en cubos de 5 × 5 cm. Estos trozos se desinfectaron con etanol 70 % por 30 s y posteriormente con hipoclorito de sodio 1 % por 10 min; a continuación, los trozos de magüey se lavaron tres veces con agua destilada estéril para eliminar los restos de los desinfectantes. A los fragmentos de magüey se les retiró la epidermis, se fraccionaron en trozos más pequeños de 1 × 1 cm, se colocaron sobre sanitas estériles para eliminar el exceso de humedad y, al final, se sembraron en el medio selectivo ELMARC a 30 °C hasta observar el desarrollo de crecimiento bacteriano.

### Identificación molecular

La identificación de los géneros bacterianos seleccionados requirió del cultivo de los aislados en medio Luria Bertani (LB) (extracto de levadura 10 g L<sup>-1</sup>, NaCl 10 g L<sup>-1</sup>, peptona de caseína 5 g L<sup>-1</sup>, agar 15 g L<sup>-1</sup>) (Sambrook *et al.*, 1989) por 24 h. Después del periodo de cultivo, se tomó una alícuota de 2 mL que fue centrifugada a 12,000 rpm por 5 min; después, se extrajo el ADN genómico siguiendo el método de Sarcosina (Lopes *et al.*, 1995). Para verificar la calidad del ADN se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa 1 %; a continuación, con el uso del ADN extraído, se amplificó un fragmento de la subunidad ribosomal 16S con la técnica de PCR utilizando los iniciadores 46F (5'-GCCTAACACATGCAAGTC-3') y 1540R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') (Santiago-Urbina y Ruíz-Terán, 2014). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 25 µL considerando la siguiente mezcla: dNTPs 1 µL, 0.5 µL de cada primer (46F y 1540R), 1 µL ADN *Taq* polimerasa Platinum, 1 µL MgCl<sub>2</sub>, 2.5 µL Buffer, 3 µL de ADN purificado y 15.5 µL de agua Mili-Q. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf (Mastercycler Gradient, Eppendorf International, Hamburgo, Alemania). Las condiciones para la PCR fueron las siguientes: 94 °C (5 min), 35 ciclos a 94 °C (50 s), 58 °C (50 s), 72 °C (60 s) y finalmente 72 °C durante 5 min. Los productos amplificados se corrieron en un gel de agarosa 1 % con una carga de 3 µL del producto de la PCR y 0.5 µL del amortiguador de carga 6x (Invitrogen) con un marcador de peso molecular de 1 kb (DNA Ladder) para determinar el tamaño de los amplicones. El gel se corrió a 85 V durante 45 min y luego se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta (UV). Los productos amplificados de los diferentes aislados se extrajeron del gel y se purificaron con el uso del kit QIAEX II (Quiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El producto purificado se envió al laboratorio de secuenciación del LANGEBIO (CINVESTAV-Irapuato) para luego analizar las secuencias obtenidas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank a través del programa BLAST.

### Estimación de la actividad de la enzima nitrogenasa

La actividad de la enzima nitrogenasa de las bacterias diazotróficas fue estimada a través de la prueba de reducción de acetileno ARA (Chauhan *et al.*, 2017). Las bacterias se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 100 mL de medio de malato semisólido libre de nitrógeno (Nfb) a 30 °C por 48 h en un agitador rotatorio a 100 rpm hasta que llegaron a la mitad de su fase exponencial. Viales de ensayo conteniendo medio Nfb libre de nitrógeno se inocularon con alícuotas de las bacterias (0.1 DO a 600 nm) y se incubaron hasta alcanzar la fase exponencial. En los tubos inoculados, la fase superior gaseosa de los viales fue reemplazada con acetileno (10 % v/v) y nuevamente se incubaron por 18 h. La producción de etileno se analizó usando un cromatógrafo de gases (Hewlett Packard, modelo HP 5890, Palo Alto, California, EUA) equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar.

La tasa de fijación de nitrógeno se expresó como la cantidad de etileno acumulado (mmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> ufc<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) con base en la curva estándar y el porcentaje del área pico; posteriormente, se tomó una alícuota de los cultivos para determinar las ufc de los crecimientos bacterianos por el método de dilución seriada.

### Evaluación cuantitativa de solubilización de fosfatos

Las cepas de bacterias se cultivaron en caldo de sacarosa-sales basales (SB) complementado con Ca-P, con un tiempo de incubación de 40 h a 28 °C y 120 rpm (Chuang *et al.*, 2007); después, el crecimiento de las bacterias se uniformizó a una concentración de 10<sup>9</sup> ufc mL<sup>-1</sup> mediante el método de diluciones seriadas. Para la determinación de la actividad de solubilización de fosfato de cada cepa bacteriana se utilizó el método colorimétrico descrito por Alamgir y Marschner (2013). La técnica se estandarizó de acuerdo con las condiciones propias del equipo del laboratorio con un espectrofotómetro (Jenway™ Espectrofotómetro UV/visible 6305, Staffordshire, UK) a una absorbancia de 420 nm y el uso de una curva patrón donde se utilizó fosfato de potasio y se consideró un intervalo de concentraciones de 10 hasta 465 mg L<sup>-1</sup> y un índice de correlación ≥ 0.95. Se mezclaron 2 mL de caldo SB con 40 µL de los cultivos bacterianos, se reservó un tubo control (sin inocular) y se mantuvieron en agitación durante 24 y 96 h a 120 rpm; luego, se centrifugaron en una microcentrífuga (Fisher Scientific™ accuSpin Micro 17, Tampa, Florida, EUA) a 5000 rpm y el sobrenadante se mezcló con el reactivo de vanadato-molibdato (Sigma-Aldrich) en una relación 1:1 con un tiempo de reposo de 10 min. Por último, se registraron las absorbancias y se establecieron las concentraciones de

fosfato con la curva patrón.

### Evaluación cualitativa de la producción de sideróforos

Para la prueba, se inoculó cada bacteria en caldo LB, se mantuvieron en agitación por 48 h a 120 rpm y 30 °C. La evaluación cualitativa de la producción de sideróforos se llevó a cabo en medio cromo azurol sulfonato (CAS) (Schwyn y Neilands, 1987), el cual se dividió en cuadrantes para obtener 4 repeticiones; por último, se tomó un círculo de un diámetro de 6 mm para cada cuadrante, el cual se sumergió por medio de pinzas estériles en el caldo inoculado respectivo de cada bacteria y se colocaron en cajas Petri con medio CAS. Las placas se incubaron a 28 °C y después de 5-7 días se observó la formación de un halo naranja alrededor de la colonia analizada (producción de sideróforos).

### Identificación de la naturaleza química de los sideróforos

La identificación de la naturaleza química de los sideróforos de cada cepa bacteriana seleccionada requirió de la inoculación en tubos de ensayo con 15 mL de medio succinato ( $\text{g L}^{-1}$ ): 6.0  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 3.0  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.0  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.2  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 4.0  $\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , a pH 7.0 y se incubaron en agitación (120 rpm) a 28 °C por 3 d (Nair *et al.*, 2007); posteriormente, los tubos se centrifugaron a 7000 rpm por 5 min y se recuperó el sobrenadante para su lectura en el espectrofotómetro (Jenway UV/visible), que indicó los picos de mayor absorbancia: 420 a 450 nm para sideróforos tipo hidroxamato y 495 nm para los de tipo catecolato (Baakza *et al.*, 2004).

### Evaluación cuantitativa de sideróforos

Se prepararon diluciones con las cepas de bacterias que presentaron naturaleza de tipo catecolato a una concentración de  $10^9$  ufc  $\text{mL}^{-1}$ ; después, se colocó 1 mL de caldo LB en tubos Eppendorf, se inoculó con 40  $\mu\text{L}$  de los cultivos bacterianos. Se reservó un tubo con medio LB sin inocular como testigo negativo. Estos tubos se mantuvieron en una incubadora (Lumistell<sup>MR</sup> IEC-36, Celaya, México) a 28 °C por 24 y 96 h; posteriormente, se centrifugaron (Fisher Scientific<sup>TM</sup> accuSpin Micro 17, Tampa, Florida, EUA) a 10,000 rpm por 10 min. El sobrenadante se mezcló con el medio CAS en una relación 1:1, se mantuvo en reposo por 20 min y entonces se tomaron lecturas de absorbancia de las muestras a 630 nm empleando el medio CAS como blanco. Para construir la curva patrón se utilizó el reactivo catecol (Sigma-Aldrich), se consideró una amplitud de concentraciones de 0.15 a 0.65  $\text{mg mL}^{-1}$ ; después, se tomó 1 mL de cada una de las mezclas anteriores, se combinó con 1 mL del medio CAS, se agitó cada tubo para

homogenizar la solución y se dejó en reposo por 20 min. El blanco utilizado en este caso fue la mezcla de 1 mL de agua destilada con 1 mL de CAS. Al final, los valores de absorbancia obtenidas se graficaron en Excel para obtener la tendencia central de la recta y, de esta forma, generar una curva patrón con un índice de correlación  $\geq 0.95$ .

### Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante análisis de varianza, estableciendo las diferencias entre medias a través de pruebas de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) utilizando el software Minitab 15<sup>®</sup>.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Identificación molecular de las bacterias y estimación de su capacidad de fijación de $\text{N}_2$

Después de colocar los fragmentos de cada uno de los tipos de maguey muestreados en el medio de selección, fue posible observar colonias bacterianas entre 5 y 8 d después de la incubación a 30 °C. A partir de las pencas de los cinco tipos de maguey muestreados, se logró aislar un total de 18 microorganismos en el medio selectivo ELMARC. Previamente, Martínez-Rodríguez *et al.* (2014) aislaron 300 cepas endófitas de hojas de *Agave tequilana* del estado de Nayarit, México, y confirmaron que los aislados correspondían a bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (BPCV) por su capacidad de fijación de nitrógeno; asimismo, Bautista-Cruz y Martínez-Gallegos (2020) lograron el aislamiento de tres cepas de bacterias fijadoras de nitrógeno a partir de la rizósfera de *Agave angustifolia* cultivado en el distrito de Tlacolula, Oaxaca, México. En el presente estudio, el análisis de las secuencias de estas bacterias en la base del NCBI indicó que 12 de estas 18 especies se ubicaron en el orden Enterobacterales (*Enterobacter* sp., *Erwinia tasmaniensis*, *Leclercia* sp. y un miembro no identificado de la familia *Enterobacteriaceae*), uno en el orden Bacillales (*Bacillus mojavensis*), tres en el orden Actinomycetales (*Brevibacterium halotolerans*, *Brevibacterium brevis* y *Curtobacterium flaccumfaciens*), uno en el orden Pseudomonadales (*Acinetobacter* sp.) y uno más en el orden Aeromonadales (*Aeromonas caviae*). Las coincidencias en cuanto a los resultados de los géneros bacterianos con los encontrados por Martínez-Rodríguez *et al.* (2014) incluyeron a *Enterobacter* sp. y *Bacillus* sp.

Debido a que la enzima responsable de la fijación biológica de nitrógeno nitrogenasa es capaz de reducir el acetileno a etileno, la prueba ARA (Acetylene Reduction Assay) se ha usado como un índice de la tasa de fijación de nitrógeno (Das y Kumar, 2018). Aunque las

determinaciones cuantitativas de la fijación biológica de  $N_2$  requieren del empleo de las técnicas de  $^{15}N_2$ , la técnica de ARA es ampliamente usada debido a que provee una manera altamente sensitiva y económica para cuantificar la actividad enzimática relativa de la nitrogenasa (Yin *et al.*, 2015). En el presente estudio la naturaleza diazotrófica de las bacterias endófitas aisladas, establecida inicialmente por su crecimiento en el medio ELMARC, pudo ser comprobada a través de las pruebas ARA realizadas (Cuadro 1). Del grupo de bacterias que alcanzaron un crecimiento de  $10^{-9}$  ufc destacaron por su capacidad de reducción de acetileno *Brevibacterium halotolerans* y *Enterobacter cloacae* (Encl1), en el de  $10^{-8}$  *Bacillus mojavensis* y *Erwinia tasmaniensis*, y finalmente, en el de  $10^{-7}$  *Acinetobacter* sp. y la cepa Ensp2 de *Enterobacter* sp.

### Capacidad de solubilización de fosfatos

De las 18 cepas evaluadas, dos de ellas, *Erwinia tasmaniensis* y la cepa Ensp1 de *Enterobacter* sp. destacaron por ser las mejores solubilizadoras de fosfatos, al mostrar valores de solubilización a las 96 h de 56.48 y 49.51 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 1). Estos datos concuerdan con los referidos por Clavijo *et al.* (2012), quienes encontraron que de entre 104 cepas de bacterias diazotróficas nativas de la rizosfera de olivo en Perú, *Erwinia tasmaniensis* fue la especie con mejor capacidad solubilizadora de fosfato tricálcico; además, se ha demostrado que esta especie de *Erwinia* es la única considerada como no fitopatógena, ya que no produce uno de los dos exopolisacáridos importantes para la formación de biopelículas, capacidad que es necesaria para patogenicidad (Polsinelli *et al.*, 2019). Es importante mencionar que los valores de solubilización de fosfatos encontrados en maguey para estas dos cepas bacterianas son casi la mitad de aquellos detectados para la cepa de *Pseudomonas fluorescens* (Psfl), 109.468 mg L<sup>-1</sup>, que fue usada como referencia en la presente investigación. *Pseudomonas fluorescens* es muy conocida, además de su capacidad para producir sideróforos, por su potencial para solubilizar fosfatos (Ingle y Padole, 2017). El valor de solubilización de fosfatos obtenido en el presente estudio supera en más de cuatro veces el valor de 26.57 mg L<sup>-1</sup>, consignado por Sánchez *et al.* (2014) para esta misma especie bacteriana.

### Capacidad de producción de sideróforos

Los resultados de la prueba cualitativa de CAS mostraron diferencias en las capacidades de las cepas endófitas diazotróficas aisladas para solubilizar hierro, lo cual se evidenció por la formación de los halos de color naranja alrededor de las colonias sembradas en el medio CAS; un halo de color naranja indica una fuerte actividad

para solubilizar hierro, mientras que uno de color amarillo se relaciona con una menor capacidad de producción de sideróforos (Arora y Verma, 2017). Para llevar a cabo la determinación de la naturaleza química de los sideróforos producidos por las bacterias se descartaron seis de las 18 cepas analizadas en virtud de que, de acuerdo con la prueba cualitativa de CAS, éstas mostraron poca capacidad para solubilizar hierro [las cepas Encl1 y Encl2 de *Enterobacter cloacae*, *Erwinia tasmaniensis* (Erta), *Enterobacter ludwigii* (Enlu), la cepa Ensp2 de *Enterobacter* sp. y un miembro de la familia *Enterobacteriaceae* (Enba)].

De las 12 cepas evaluadas, se identificaron seis que produjeron sideróforos de tipo catecolato: *Bacillus mojavensis* (Bamo), *Leclercia* sp. (Lesp2), *Aeromonas caviae* (Aeca), *Leclercia* sp. (Lesp3), *Enterobacter kobei* (Enko) y *Leclercia* sp. (Lesp4); por otro lado, se identificaron seis cepas productoras de sideróforos de tipo hidroxamato: *Enterobacter* sp. (Ensp1), *Leclercia* sp. (Lesp1), *Brevibacterium halotolerans* (Brha), *Brevibacterium brevis* (Brbr), *Acinetobacter* sp. (Acsp) y *Curtobacterium flaccumfaciens* (Cuf1); la cepa de referencia, *Pseudomonas fluorescens* Ag\_001 (Psfl) también resultó ser un microorganismo productor de sideróforos tipo hidroxamato. Al final, sólo tres cepas bacterianas (Lesp2, Lesp3 y Lesp4) resultaron ser productoras de ambos tipos de sideróforos (catecolato/hidroxamato). Los resultados del presente estudio concuerdan con los de Nair *et al.* (2007), quienes mostraron que el género *Pseudomonas* produce sideróforos de tipo hidroxamato; así mismo, diversas investigaciones muestran que los géneros *Aeromonas*, *Bacillus* y *Acinetobacter* son bacterias productoras de sideróforos de tipo catecolato (Bharucha *et al.*, 2013; Reitz y Butler, 2020).

Una vez identificada la naturaleza química de los sideróforos producidos por los microorganismos, se llevó a cabo un estudio cuantitativo de la capacidad productora de sideróforos tipo catecolato de las bacterias, debido a que los estudios sobre antagonismo de rizobacterias contra hongos fitopatógenos se han realizado principalmente en bacterias productoras de este tipo de sideróforos (Fernández-Herrera *et al.*, 2018), además de que estos sideróforos presentan una de las constantes de formación de complejos férricos más elevada ( $K_f$ ,  $10^{52}$ ), lo que le permite disociar con mayor facilidad este metal de la proteína acarreadora de hierro transferrina (Aguado-Santacruz *et al.*, 2012).

Las mayores concentraciones de sideróforos tipo catecolato se observaron a las 24 h de crecimiento bacteriano en medio LB. La bacteria que destacó como mejor productora de sideróforos tipo catecolato fue *Bacillus mojavensis* (Bamo,  $P \leq 0.05$ ), la cual mostró una producción

de estos compuestos de  $0.669 \text{ mg mL}^{-1}$ , mientras que la segunda mejor productora fue la cepa Lesp2 de *Leclercia* sp. ( $0.443 \text{ mg mL}^{-1}$ ), aunque no mostró diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) con la cepa Lesp4 de este mismo género ni con *Aeromonas caviae* (Figura 2). Estos valores superan por mucho los referidos por Grobelak y Hiller (2017) para diversas cepas endófitas aisladas a partir de *Festuca rubra*; el valor máximo de producción de sideróforos tipo catecolato entre diversas bacterias analizadas en ese estudio fue de  $0.0029 \text{ mg mL}^{-1}$ . Por su parte, Gupta y Gopal (2008) analizaron 10 cepas de rizobacterias productoras de sideróforos, destacando las bacterias *Pseudomonas fluorescens* y *Enterobacter* sp., pero contrariamente a los resultados del presente estudio, tres cepas de *Bacillus* spp. no fueron capaces de producir sideróforos.

Aunque las cepas Lesp2 y Lesp4 de *Leclercia* sp. no destacaron por ser las mejores solubilizadoras de fósforo y hierro, éstas presentaron valores por arriba del promedio, lo cual las convierte en candidatas idóneas para ser evaluadas en invernadero y campo, ya que al poder evitar algunas de las limitaciones nutricionales relacionadas con la disponibilidad de fósforo y hierro en el suelo, se

esperaría que pudieran realizar una fijación biológica de nitrógeno más eficiente. Los resultados de este estudio, y los microorganismos aislados, son considerados como alternativas viables para mejorar la productividad de diversos cultivos de México.

El presente estudio está en línea con las tendencias actuales en la agricultura de México, que busca implementar un nuevo modelo para la producción agrícola que reduzca el uso de agroquímicos y el impacto negativo al ambiente, y al mismo tiempo sea capaz de producir alimentos inocuos. El presente, constituye el primer estudio en el que se consignan bacterias endófitas diazotróficas aisladas de tejidos vegetales sanos de maguey y que, además, poseen capacidad para la solubilización de fosfatos y hierro. Aunque Li *et al.* (2020) ya han explorado con buenos resultados la posibilidad de mejorar la eficiencia de la fijación biológica de nitrógeno mediante la co-inoculación de una bacteria diazotrófica (*Paenibacillus beijingensis* BJ-18) y una solubilizadora de fosfatos (*Paenibacillus* sp. B1), en esta investigación se buscó identificar bacterias endófitas de maguey con capacidad de fijación biológica de nitrógeno, que además pudieran solventar deficiencias nutricionales

**Cuadro 1. Identidad de bacterias endófitas diazotróficas aisladas a partir de maguey y estimación de su capacidad de fijación biológica de nitrógeno.**

Bacteria	Código	Identidad NCBI (%)	ARA ( $\text{mmol C}_2\text{H}_4 \text{ ufc}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )
<i>Acinetobacter</i> sp.	Aesp	96.85	$4.1 \times 10^{-7}$
<i>Aeromonas caviae</i>	Aeca	95.94	$1.3 \times 10^{-9}$
<i>Bacillus mojavenensis</i>	Bamo	94.22	$5.4 \times 10^{-8}$
<i>Brevibacterium brevis</i>	Brbr	93.06	$4.1 \times 10^{-8}$
<i>Brevibacterium halotolerans</i>	Brha	96.67	$3.8 \times 10^{-9}$
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	Cufl	92.69	$2.9 \times 10^{-8}$
<i>Enterobacter cloacae</i>	Encl1	96.84	$4.1 \times 10^{-9}$
<i>Enterobacter cloacae</i>	Encl2	96.89	$3.3 \times 10^{-8}$
<i>Enterobacter kobei</i>	Enko	96.67	$3.9 \times 10^{-8}$
<i>Enterobacter ludwigii</i>	Enlu	95.21	$3.2 \times 10^{-9}$
<i>Enterobacter</i> sp.	Ensp1	96.17	$2.7 \times 10^{-8}$
<i>Enterobacter</i> sp.	Ensp2	96.44	$2.9 \times 10^{-7}$
<i>Enterobacteriaceae</i>	Enba	77.21	$2.8 \times 10^{-7}$
<i>Erwinia tasmaniensis</i>	Erta	90.88	$4.7 \times 10^{-8}$
<i>Leclercia</i> sp.	Lesp1	95.20	$2.8 \times 10^{-7}$
<i>Leclercia</i> sp.	Lesp2	96.20	$1.9 \times 10^{-9}$
<i>Leclercia</i> sp.	Lesp3	95.91	$3.3 \times 10^{-8}$
<i>Leclercia</i> sp.	Lesp4	94.30	$2.7 \times 10^{-7}$

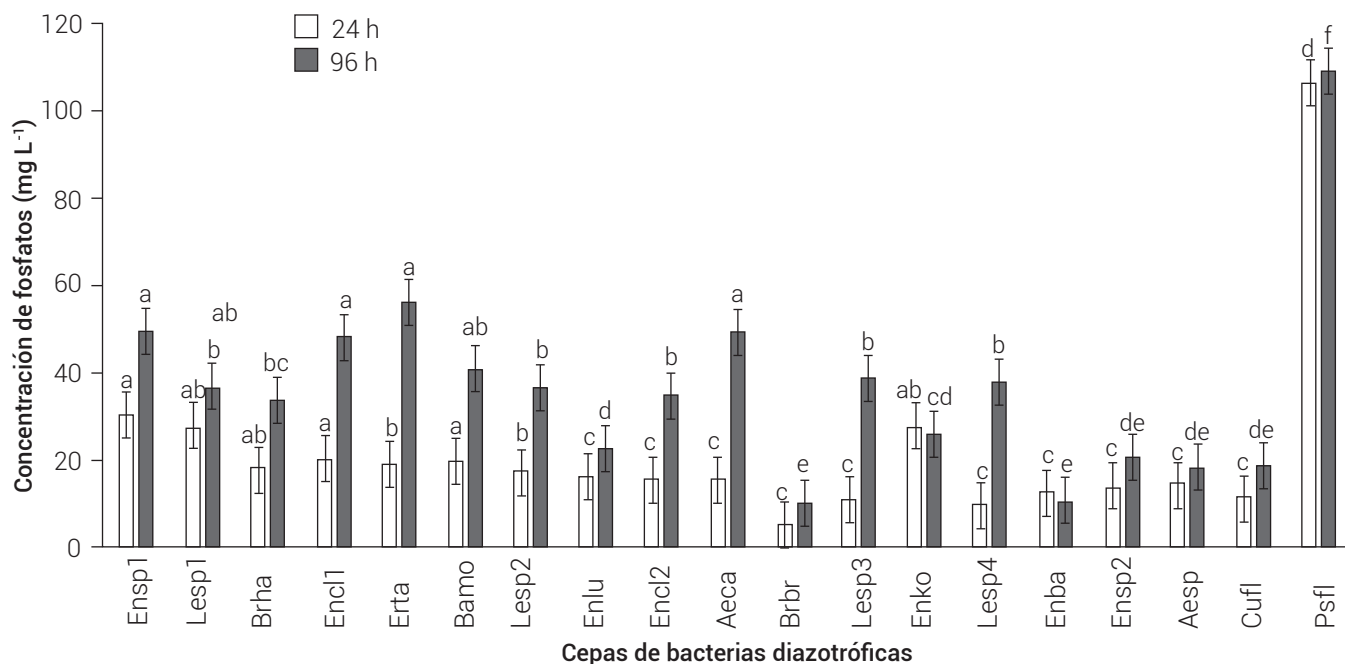


Figura 1. Capacidad de solubilización de fosfatos de las cepas de bacterias endófitas aisladas de maguey: *Aeromonas caviae* (Aeca), *Acinetobacter* sp. (Acsp), *Bacillus mojavensis* (Bamo), *Brevibacterium brevis* (Brbr), *Brevibacterium halotolerans* (Brha), *Curtobacterium flaccumfaciens* (Cufl), *Enterobacter cloacae* (Encl1), *Enterobacter cloacae* (Encl2), *Enterobacteriaceae* (Enba), *Enterobacter kobei* (Enko), *Enterobacter ludwigii* (Enlu), *Enterobacter* sp. (Ensp1), *Enterobacter* sp. (Ensp2), *Erwinia tasmaniensis* (Erta), *Leclercia* sp. (Lesp1), *Leclercia* sp. (Lesp2), *Leclercia* sp. (Lesp3) y *Leclercia* sp. (Lesp4). Las barras muestran los errores estándar de las bacterias para cada tiempo de evaluación. Distintas literales indican diferencias significativas (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) entre las bacterias para cada tiempo de evaluación.

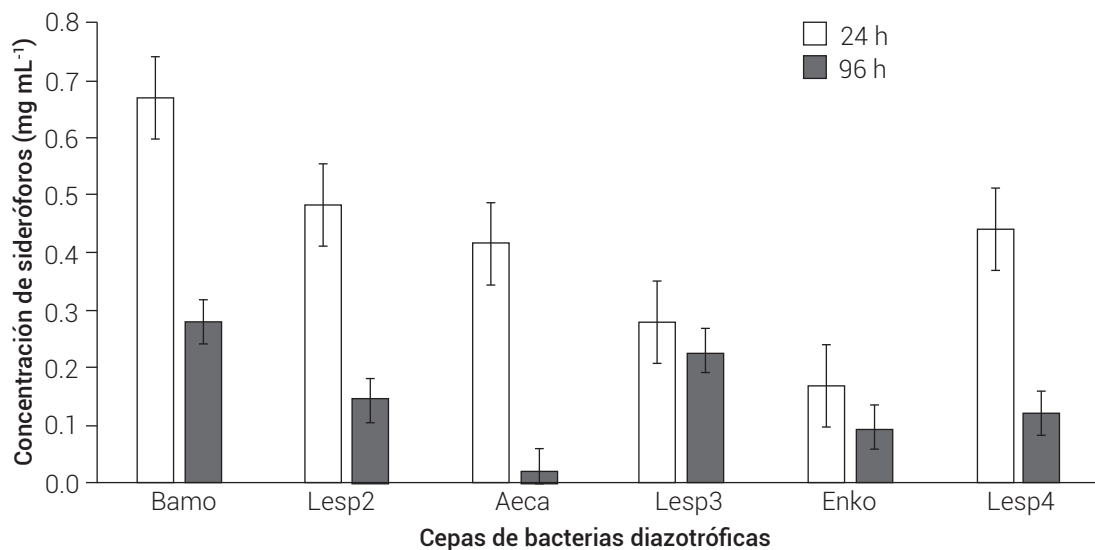


Figura 2. Capacidad de producción de sideróforos tipo catecolato a las 24 y 96 h en seis bacterias endófitas diazotróficas aisladas de maguey: *Aeromonas caviae* (Aeca), *Bacillus mojavensis* (Bamo), *Enterobacter kobei* (Enko), *Leclercia* sp. (Lesp2), *Leclercia* sp. (Lesp3) y *Leclercia* sp. (Lesp4). Las barras muestran los errores estándar de las bacterias para cada tiempo de evaluación.

relacionadas con la presencia de formas insolubles de fósforo y hierro en el suelo; aunque destacaron *Erwinia tasmaniensis* por su capacidad para solubilizar fosfatos y *Bacillus mojavensis* por su producción de sideróforos, se identificaron algunas otras cepas con capacidades intermedias en estas variables (e.g., las cepas Lsp2 y Lsp4 de *Leclercia* sp.), lo cual las convierte en modelos de estudio interesantes para evaluar su impacto sobre el crecimiento de cultivos desarrollados en suelos con limitaciones de hierro y fósforo. Actualmente se están realizando ya pruebas de campo que permitan analizar la factibilidad de su empleo para aumentar la rentabilidad de los cultivos hortícolas en virtud del actual encarecimiento sin precedente de los agroquímicos en México.

### CONCLUSIONES

Los resultados indican que el acervo bacteriano del maguey no permite seleccionar cepas que puedan fijar nitrógeno y que además puedan solventar deficiencias nutricionales relacionadas con la disponibilidad de hierro y fósforo. Dado que esta situación es muy común en muchos de los suelos de México, es muy importante validar este enfoque dual bajo condiciones de campo. Evaluaciones preliminares en campo e invernadero permiten visualizar la posibilidad de utilizar estas cepas para mejorar la productividad de los cultivos de México en condiciones limitativas de Fe y P.

### AGRADECIMIENTOS

El Dr. Aguado Santacruz agradece al CONACyT la beca otorgada (no. 710315) para la realización de una estancia posdoctoral en el Colegio de Posgraduados. Los autores agradecen al Corporativo Magueyero San Isidro S.A. de C.V. por habernos permitido acceder a su predio y coleccionar el material vegetal empleado en esta investigación.

### BIBLIOGRAFÍA

- Aguado-Santacruz G. A. (2012) Uso de microorganismos como biofertilizantes. In: Introducción al Uso y Manejo de los Biofertilizantes en la Agricultura. G. A. Aguado S. (ed.). INIFAP/SAGARPA. Celaya, Guanajuato, México. pp:35-78.
- Aguado-Santacruz G. A., B. Moreno-Gómez, B. Jiménez-Francisco, E. García-Moya y R. E. Preciado-Ortiz (2012) Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Revista Fitotecnia Mexicana* 35:9-21, <https://doi.org/10.35196/rfm.2012.1.9>
- Alamgir M. and P. Marschner (2013) Changes in phosphorus pools in three soils upon addition of legume residues differing in carbon/phosphorus ratio. *Soil Research* 51:484-493, <https://doi.org/10.1071/SR12378>
- Ariza R. S., O. González M. y J. López S. (2020) Evaluación de fijadores biológicos de nitrógeno libres sobre el crecimiento de gramíneas en suelo degradado. *Revista Colombiana de Biotecnología* 22:87-97, <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v22n1.78019>
- Arora N. K. and M. Verma (2017) Modified microplate method for rapid and efficient estimation of siderophore produced by bacteria. *3 Biotech* 7:381, <https://doi.org/10.1007/s13205-017-1008-y>
- Baakza A., A. K. Vala, B. P. Dave and H. C. Dube (2004) A comparative study of siderophore production by fungi from marine and terrestrial habitats. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 311:1-9, <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2003.12.028>
- Bautista-Cruz M. A. y V. Martínez-Gallegos (2020) Promoción del crecimiento de *Agave potatorum* Zucc. por bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre. *Terra Latinoamericana* 38:555-567, <https://doi.org/10.28940/terra.v38i3.647>
- Bharucha U. D., K. C. Patel and U. B. Trivedi (2013) Antifungal activity of catecholate type siderophore produced by *Bacillus* sp. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences* 4:528-531.
- Chauhan, A., S. Guleria, P. P. Balgir, A. Walia, R. Mahajan, P. Mehta and C. K. Shirkot (2017) Tricalcium phosphate solubilization and nitrogen fixation by newly isolated *Aneurinibacillus aneurinilyticus* CKMV1 from rhizosphere of *Valeriana jatamansi* and its growth promotional effect. *Brazilian Journal of Microbiology* 48:294-304, <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.12.001>
- Chuang C. C., Y. L. Kuo, C. C. Chao and W. L. Chao (2007) Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. *Biology and Fertility of Soils* 43:575-584, <https://doi.org/10.1007/s00374-006-0140-3>
- Clavijo C., V. Chipana, J. Centeno, D. Zúñiga y C. Guillén (2012) Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias diazotróficas de la rizósfera del cultivo de *Olea europea* "olivo" en Tacna Perú. *Ecología Aplicada* 11:89-102, <https://doi.org/10.21704/rea.v11i1-2.429>
- Das S. and T. Kumar (2018) Microbial assay of N<sub>2</sub> fixation rate, a simple alternate for acetylene reduction assay. *MethodsX* 5:909-914, <https://doi.org/10.1016/j.mex.2017.11.010>
- Fernández-Herrera E., M. E. Martínez-Rentería, S. F. Moreno-Salazar, N. Jiménez-Peña and I. I. Ramírez-Bustos (2018) Bacterias de la rizósfera de garbanzo con capacidad antagónica a hongos fitopatógenos y de promoción de crecimiento de la planta. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 21:557-568.
- González F. H. y N. Fuentes M. (2017) Mecanismo de acción de cinco microorganismos promotores de crecimiento vegetal. *Revista de Ciencias Agrícolas* 34:17-31, <https://doi.org/10.22267/rcia.173401.60>
- Grobelak A. and J. Hiller (2017) Bacterial siderophores promote plant growth: screening of catechol and hydroxamate siderophores. *International Journal of Phytoremediation* 19:825-833, <https://doi.org/10.1080/15226514.2017.1290581>
- Gupta A. and M. Gopal (2008) Siderophore production by plant growth promoting rhizobacteria. *Indian Journal of Agricultural Research* 42:153-156.
- Ingle K. P. and D. A. Padole (2017) Phosphate solubilizing microbes: an overview. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6:844-852, <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.601.099>
- Li Y., Q. Li, G. Guan and S. Chen (2020) Phosphate solubilizing bacteria stimulate wheat rhizosphere and endosphere biological nitrogen fixation by improving phosphorus content. *Peer J* 8:e9062, <https://doi.org/10.7717/peerj.9062>
- Lopes M. A., K. Takasaki, D. E. Bostwick, T. Helentjaris and B. A. Larkins (1995) Identification of two *opaque2* modifier loci in quality protein maize. *Molecular and General Genetics* 247:603-613, <https://doi.org/10.1007/BF00290352>
- Martínez-Rodríguez J. C., M. De la Mora-Amutio, L. A. Plascencia-Correa, E. Audelo-Regalado, F. R. Guardado, E. Hernández-Sánchez, ... and T. Ogura (2014) Cultivable endophytic bacteria from leaf bases of *Agave tequilana* and their role as plant growth promoters. *Brazilian Journal of Microbiology* 45:1333-1339, <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000400025>
- Miethke M. and M. A. Marahiel (2007) Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71:413-451, <https://doi.org/10.1128/MMBR.00012-07>
- Nair A., A. A. Juwarkar and S. K. Singh (2007) Production and characterization of siderophores and its application in arsenic removal from contaminated soil. *Water, Air, and Soil Pollution*



- 180:199-212, <https://doi.org/10.1007/s11270-006-9263-2>
- Polsinelli I., R. Caliandro, M. Salomone-Stagni, N. Demitri, M. Rejzek, R. A. Field and S. Benini (2019)** Comparison of the levansucrase from the epiphyte *Erwinia tasmaniensis* vs its homologue from the phytopathogen *Erwinia amylovora*. *International Journal of Biological Macromolecules* 127:496-501, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.074>
- Reitz Z. L. and A. Butler (2020)** Precursor-directed biosynthesis of catechol compounds in *Acinetobacter bouvetii* DSM 14964. *Chemical Communications* 56:12222-12225, <https://doi.org/10.1039/D0CC04171H>
- Romero F. A. J., R. M. Arias M. y R. Mendoza-Villarreal (2019)** Aislamiento y selección de hongos de suelo solubilizadores de fósforo nativos del estado de Coahuila, México. *Acta Botánica Mexicana* 126:e1390, <https://doi.org/10.21829/abm126.2019.1390>
- Sambrook J., E. R. Fritsch and T. Maniatis (1989)** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Vol. 1. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York. pp. 1.74-1.84.
- Sánchez L. D. B., A. M. García H., F. A. Romero P. y R. R. Bonilla B. (2014)** Efecto de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal solubilizadoras de fosfato en *Lactuca sativa* cultivar White Boston. *Revista Colombiana de Biotecnología* 16:122-128, <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v16n2.41077>
- Santiago-Urbina J. A. and F. Ruíz-Terán (2014)** Microbiology and biochemistry of traditional palm wine produced around the world. *International Food Research Journal* 21:1261-1269.
- Schwyn B. and J. B. Neilands (1987)** Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160:47-56, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)
- Yin T. T., U. L. Pin and A. H. A Ghazali (2015)** Influence of external nitrogen on nitrogenase enzyme activity and auxin production in *Herbaspirillum seropedicae* (Z78). *Tropical Life Sciences Research* 26:101-110.

