

---

## Potencial agrobiotecnológico de bacterias aisladas de suelos agrícolas asociados al cultivo de maíz en el Valle del Fuerte, Sinaloa

F. I. Parra-Cota<sup>1\*</sup>, S. de Los Santos-Villalobos<sup>2</sup>, M. A. Lugo-Valdez<sup>3</sup>, R. A. Cruz-Ibarra<sup>2</sup>, G. Fuentes-Dávila<sup>1</sup> y L. A. Peinado Fuentes<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Campo Experimental Norman E. Borlaug, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Norman Borlaug km 12, C. P. 85000, Ciudad Obregón, Sonora.

<sup>2</sup>CONACYT-Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de Febrero 818 Sur, Col. Centro, C. P. 85000, Ciudad Obregón, Sonora, México.

<sup>3</sup>Universidad de Occidente, Unidad Los Mochis, Blvd. Macario Gaxiola y Carretera internacional México 15, C. P. 81223, Los Mochis, Sin.

<sup>4</sup>Campo Experimental Valle del Fuerte, INIFAP, Carretera Internacional 15 km. 1069, Juan José Ríos, C. P. 81110, Guasave, Sin.

---

*Agrobiotechnological potential of bacteria isolated from agricultural soils associated to corn production in the El Fuerte Valley, Sinaloa.*

### Abstract

The plant growth promoting bacteria (PGPB) are agriculturally important microorganisms, when they grow in association with plants stimulate their growth. These bacteria are the basis for the development of biofertilizers, whose use contributes to sustainable agriculture. The aim of this research was to isolate and metabolically characterize edaphic bacteria to identify those that could have some biotechnological application. Soil was sampled from five agricultural sites, achieving isolation of 166 bacterial strains by microbiological methods. The isolates were metabolically characterized to identify strains capable of synthesizing auxins, siderophores and solubilize phosphates. For the determination of auxin synthesis, indoles were quantitated, finding that 100% of the bacterial strains have the ability to synthesize these phytohormones, although only 11 bacteria synthesized to 4ppm greater concentration. Moreover, it was determined that 42% of the bacteria showed the ability to produce siderophores, identifying 10 strains with a production efficiency higher than 50. Finally, 74 strains were able to solubilize phosphate, 54% of them showed a solubilization efficiency of 20 to 40, but 8 strains with values greater than 40 were identified. Bacteria identified with the best capacities in each of the characteristics evaluated are promising strains to be studied in future research to evaluate their potential to promote plant growth, increase yields and biocontrol diseases..

*Key words:* Auxins, siderophores, phosphate solubilisation.

### Resumen

Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) son microorganismos de importancia agrícola, que cuando crecen en asociación con las plantas estimulan su crecimiento. Dichas bacterias son la base para el desarrollo de biofertilizantes, cuyo uso contribuye a la agricultura sustentable. El objetivo del presente trabajo fue aislar y caracterizar metabólicamente bacterias edáficas para identificar aquellas que pudieran tener alguna aplicación biotecnológica. Se muestreó suelo de cinco sitios agrícolas, logrando por métodos microbiológicos el aislamiento de 166 cepas bacterianas. Posteriormente se caracterizaron metabólicamente los aislados para identificar cepas con capacidad de sintetizar auxinas, sideróforos y solubilizar fosfatos. En el caso de la síntesis de auxinas se cuantificaron los indoles, encontrando que 100% de las cepas bacterianas

---

\*Autores de correspondencia  
Email: parra.fannie@inifap.gob.mx

tiene la capacidad de sintetizar estas fitohormonas, aunque solamente 11 bacterias sintetizaron una concentración mayor a 4ppm. Por otra parte, se determinó que el 42% de las bacterias presentó la capacidad de producir sideróforos, identificando 10 cepas con una eficiencia de producción mayor a 50. Finalmente, 74 cepas resultaron con la capacidad de solubilizar fosfato, el 54% de éstas presentó una eficiencia de solubilización de 20 a 40, pero se identificaron 8 cepas con valores mayores a 40. Las bacterias identificadas con las mejores capacidades en cada una de las características evaluadas son cepas promisorias para ser estudiadas en futuras investigaciones para evaluar su potencial para promover el crecimiento vegetal, incrementar rendimientos y biocontrolar enfermedades.

*Palabras claves:* Auxinas, sideróforos, solubilización de fosfatos.

---

## Introducción

Una de las principales zonas agrícolas en México es el Valle del Fuerte, el cual se encuentra ubicado en la parte norte del estado de Sinaloa, integrado por los municipios de Ahome, El Fuerte, Guasave y Sinaloa de Leyva. El valle cuenta con los Ríos Fuerte y Sinaloa, los cuales forman las 2 cuencas más grandes de la entidad con el 50% del total del Área Hidrológica. Los cultivos con mayor producción son papa, trigo, tomate, chile verde, frijol, sorgo, tomatillo, garbanzo y maíz, siendo este último el principal con una superficie sembrada de 277,642 ha y una producción total de aproximadamente 2.9 millones de toneladas (SIAP-SAGARPA, 2015). Para lograr buenos rendimientos se usan grandes cantidades de agroquímicos lo cual a su vez ocasiona daños al medio ambiente y salud humana, así como incrementos en costos de producción, el uso de biofertilizantes es una alternativa para contribuir a la sustentabilidad de los sistemas agrícolas.

Dentro de los biofertilizantes se encuentran los que están formulados a base de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV). Las BPCV representan una amplia variedad de bacterias no patógenas, las cuales cuando crecen en asociación con las plantas tienen efectos benéficos sobre el crecimiento y salud de las plantas, eliminando microorganismos causantes de enfermedades e incrementando la disponibilidad y asimilación de nutrientes estimulan su crecimiento (Nihorimbere *et al.*, 2011). Por lo tanto, para mejorar la fertilidad del suelo, aumentar el rendimiento de los cultivos y reducir los impactos negativos de los fertilizantes químicos en el medio ambiente, es muy recomendable explotar el uso de estas bacterias (Babalola, 2010). A diferencia de los efectos

adversos del continuo uso de fertilizantes químicos, cuando las BPCV son aplicadas al suelo mejoran su estructura sin dejar residuos tóxicos (Shankar Singh *et al.*, 2011).

Las BPCV pueden facilitar el crecimiento y desarrollo de las plantas por medio de mecanismos directos e indirectos. La estimulación directa puede involucrar el suministro de sustancias sintetizadas por la propia bacteria y la ayuda para la toma de nutrientes del ambiente, los cuales pueden ser nitrógeno, fitohormonas, hierro y fósforo (Verma *et al.*, 2010), mientras que la estimulación indirecta incluye la prevención o eliminación de fitopatógenos por la producción de sustancias inhibitorias o por el incremento de la resistencia de la planta (Saleem *et al.*, 2007).

Entre las principales fitohormonas que sintetizan las BPCV se encuentran las auxinas, que tienen un efecto estimulador del crecimiento, especialmente marcado cuando las plantas están en estado de plántula y los niveles endógenos de fitohormonas son insuficientes para su óptimo crecimiento (Vejan *et al.*, 2016). Por otra parte, algunos mecanismos que tiene las BPCV para mejorar la nutrición de las plantas son la solubilización de fosfatos y la síntesis de sideróforos, que incrementan la toma y asimilación de fósforo y hierro, respectivamente (Pii *et al.*, 2015). Además, los sideróforos, moléculas que presentan alta afinidad por el hierro, son compuestos que pueden controlar patógenos al convertir a dicho nutriente en factor limitante para el crecimiento de los patógenos (Saha *et al.*, 2016). Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue aislar y caracterizar metabólicamente bacterias edáficas para identificar cepas con características de interés agronómico para potenciar el crecimiento vegetal y biocontrolar enfermedades.

## Materiales y métodos

### *Sitio de muestreo y aislamiento de microorganismos*

Se colectó suelo en cinco lotes agrícolas (sitio 1: 25°45'48.6"N-108°48'35.5"O, sitio 2: 25°46'14.8"N-108°48'22.9"O, sitio 3: 25°46'22.7"N-108°48'17.1"O, sitio 4: 25°52'43.9"N-109°0'36.7"O, sitio 5: 25°41'9.2"N-109°2'11.7"O) donde se cultiva maíz en los municipios de Ahome y Guasave, Sinaloa. En cada sitio se tomó una muestra compuesta de 10 kg de suelo para el análisis microbiológico. El aislamiento de los microorganismos se realizó mediante la técnica de diluciones seriales en agar Nutritivo suplementado con 80 µg ml<sup>-1</sup> de cicloheximida. Los cultivos fueron incubados a 28 ± 2° C durante 7 días, determinando a las 72 horas las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por gramo de peso seco de suelo (g. s. s.). Los aislamientos se realizaron por triplicado (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2013).

### *Determinación de características de promoción de crecimiento*

Producción de Ácido Indol Acético (AIA). Cada aislado (1 x 10<sup>5</sup> UFC) fue inoculado en Caldo Nutritivo suplementado con 100 ppm de triptófano. Estos cultivos fueron incubados a 28°C durante 3 días a 100 rpm. Posteriormente, 1 ml de cada cultivo se centrifugó a 13000 rpm durante 3 min, se colocaron 100 µl del sobrenadante y 200 µl de reactivo de Salkowski (cloruro férrico, 0.4058 g; agua, 33 ml y ácido sulfúrico, 20 ml) en una placa de Elisa. Dicha reacción fue incubada en oscuridad durante 30 min a temperatura ambiente (Glickmann y Dessaux, 1995). La cuantificación de AIA se determinó a 540 nm en un espectrofotómetro. Este ensayo se llevó a cabo con tres réplicas independientes

Producción de sideróforos. Cada aislado bacteriano fue inoculado en el centro de una caja Petri conteniendo el medio de cultivo CAS (Cromo Azuro S), el cual fue preparado de acuerdo a lo reportado por Alexander y Zuberer (1991). Las cajas fueron incubadas durante 15 días a 28°C. La capacidad para producir sideróforos es representada por un halo transparente alrededor del microorganismo (Schwyn y Neilands, 1987), con los datos de los tamaños del diámetro del halo (DH) y de la colonia (DC) se determinó la eficiencia de producción (EP), EP= (DH-DC/ DC) \*100. Los

experimentos de producción de sideróforos se llevaron a cabo por duplicado.

Solubilización de fosfatos. Se determinó la capacidad de los aislados para solubilizar fosfato utilizando el medio PVK (Pikovskaya, 1948) el cual contiene fosfato tricálcico insoluble. Dicho medio fue suplementado con azul de bromofenol para facilitar la observación de los halos de solubilización. Cada aislado se inoculó en el centro de una caja Petri con medio PVK y se incubaron a 28 ± 2° C durante 7 días (Nautiyal, 1999). Se determinó la eficiencia de solubilización (ES), relacionado las medidas de los diámetros de el halo (DH) y la colonia (DC), ES= (DH-DC/ DC) \*100. Estos ensayos se realizaron por duplicado.

### *Actividad hemolítica*

Para determinar la capacidad de hemólisis, las bacterias se sembraron en Agar Nutritivo y se incubaron a 28°C por 24 horas, posteriormente se transfirieron a cajas con Agar Sangre, donde se sembraron por picadura. Se incubaron a 28°C por 24 h para monitorear la apariencia de la actividad hemolítica, clasificándose como alfa hemolíticas (hemólisis parcial), beta hemolíticas (hemólisis completa) y gamma hemolíticas (sin actividad hemolítica). Las evaluaciones se hicieron por duplicado (Forbes *et al.*, 2007).

## Resultados y discusión

Se determinó la población total cultivable en cada una de las muestras de suelo colectadas, en el sitio 4 se encontró la mayor población con 5x10<sup>6</sup> UFC/ g. s. s., mientras que el resto de los sitios presentaron una población menor a 2x10<sup>6</sup> UFC/g. s. s. (Figura 1), lo cual puede ser resultado de las características del suelo, ya que se encontró que posee un mayor contenido de materia orgánica y el suelo se clasificó como tipo Franco, a diferencia de los otros sitios que presentaron contenidos de materia orgánica menor al 1.3% y su tipo de suelo fue arcilloso (datos no mostrados). Posteriormente de acuerdo a sus características macroscópicas los aislados bacterianos se clasificaron en proteobacterias, firmicutes y actinobacterias. Se aislaron un total de 166 microorganismos (Tabla 1), siendo el sitio 4 el que presentó mayor diversidad al obtenerse 60 aislados bacterianos, mientras que en el sitio 2 solo se aislaron 10 microorganismos.

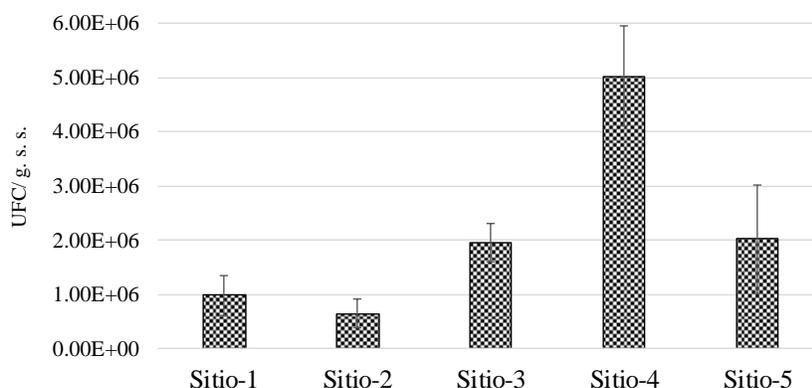


Figura 1. Población bacteriana cultivable aislada de suelo agrícola asociado a maíz en el Valle del Fuerte.

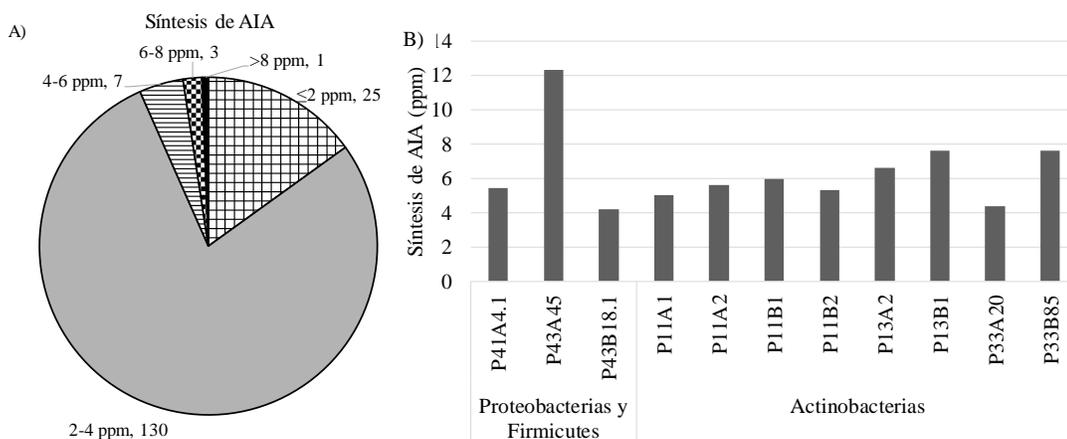
Tabla 1. Bacterias aisladas en cada sitio muestreado en el Valle del Fuerte.

Sitio	Proteobacterias y Firmicutes	Actinobacterias	Total
1	15	21	36
2	5	5	10
3	39	6	45
4	44	16	60
5	9	6	15
<b>Total</b>	<b>112</b>	<b>54</b>	<b>166</b>

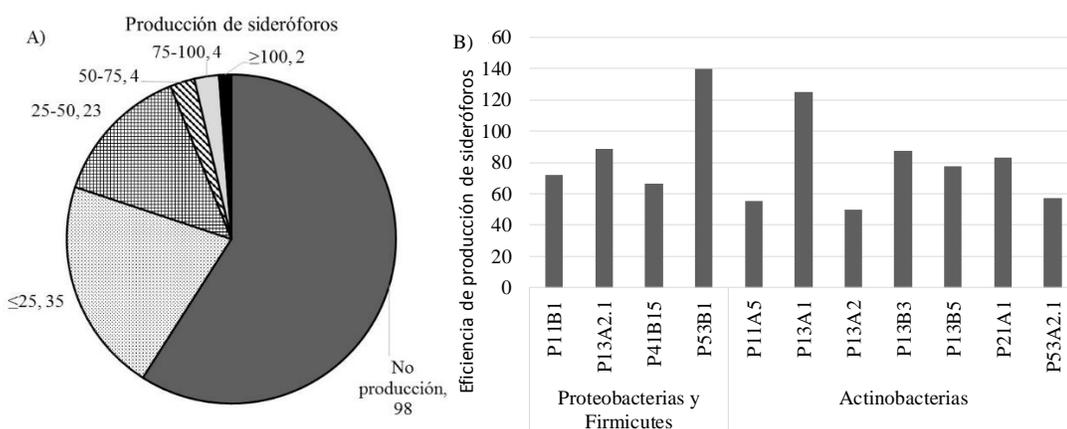
Posteriormente se llevó a cabo la caracterización metabólica de las bacterias para identificar tres características de interés agronómico, producción de auxinas (AIA), solubilización de fosfatos y producción de sideróforos. Los resultados obtenidos en la determinación de síntesis de AIA indicaron que el 100% de las cepas bacterianas tiene la capacidad de sintetizar la fitohormona, pero en distintas concentraciones. El 78% de las cepas produjo cantidades bajas en un rango de 2 a 4 ppm, mientras 11 cepas tienen la capacidad de sintetizar más de 4 ppm (Figura 2A), siendo la cepa bacteriana P43A45 la que presentó la mayor producción con una concentración de 12.33 ppm (Figura 2B). Se han encontrado resultados similares en otros estudios donde se han caracterizado aislados bacterianos edáficos asociados al cultivo de maíz, donde más del 96% de los microorganismos tiene la capacidad de sintetizar indoles (Arruda *et al.*, 2013; Coronel-Acosta, 2016). Se ha reportado que las auxinas, además de ser inductores del crecimiento podrían participar en la regulación positiva de la resistencia al estrés por sequía, a

través de la regulación de la arquitectura de la raíz, la expresión de genes sensibles a ABA, el metabolismo de ROS y la homeostasis metabólica, al menos parcialmente (Shi *et al.*, 2014).

Los ensayos para determinar la producción de sideróforos indicaron que solamente 68 de los 166 aislados bacterianos tienen la capacidad de producir este compuesto, 10 aislados tuvieron una eficiencia de producción mayor a 50 (Figura 3A), destacando dos bacterias, P13A12 y P53B1, con una eficiencia de producción de 124 y 140, respectivamente (Figura 3B). Una de las principales finalidades de los sideróforos en los microorganismos es la competencia por nutrientes como hierro, por lo cual se han utilizado para el biocontrol de enfermedades principalmente de etiología fúngica (Compant *et al.*, 2005). Pero los microorganismos productores de sideróforos también pueden ser utilizados para incrementar la calidad nutricional de los alimentos, Sah y colaboradores (2017) demostraron que la inoculación de plantas de maíz con distintas cepas de *Pseudomonas* incrementó el contenido de zinc en grano hoja y tallo.



**Figura 2. Producción de AIA por bacterias aisladas del Valle del Fuerte. A) Número de bacterias por rango de producción de AIA (concentración, número de cepas). B) Principales cepas bacterianas productoras de AIA.**

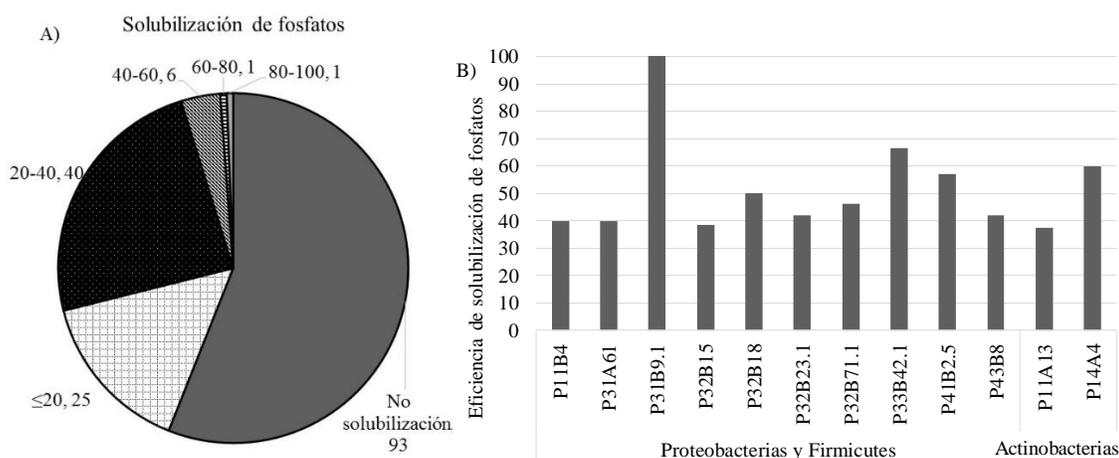


**Figura 3. Producción de sideróforos por bacterias aislados del Valle del Fuerte. A) Número de bacterias por rango de índice de producción (índice, número de cepas). B) Principales cepas bacterianas productoras de sideróforos.**

Posteriormente se determinó la capacidad de las cepas bacterianas para solubilizar fosfatos. De manera similar a la producción de sideróforos, menos del 50% de las cepas aisladas solubilizó fosfato (Figura 4A). De las 74 bacterias que presentaron solubilización, el 54% presentó un índice de solubilización de 20 a 40, mientras que 8 bacterias tuvieron un índice de solubilización mayor a 40. Las cepas P31B9.1 y P33b42.1 con índices de 100 y 66.6 respectivamente (Figura 4B), presentaron las más altas capacidades para solubilizar el nutriente, por lo cual pueden ser

seleccionadas para futuras evaluaciones de promoción de crecimiento vegetal. Hussain *et al.* (2013) realizaron un escrutinio de 72 aislados edáficos para identificar solubilizadores de fosfato, encontraron 30 cepas, las cuales fueron capaces de estimular el crecimiento de plantas de maíz en ensayos *in vitro*.

Se identificaron 30 cepas que presentaban las tres características evaluadas, pero estas no fueron las que mostraron mejores resultados en cada una de las determinaciones. Se ha reportado que es común que una sola BPCV muestre más de un modo de acción,



**Figura 4. Solubilización de fosfatos por bacterias aislados del Valle del Fuerte. A) Número de bacterias por rango de índice de solubilización (índice, número de cepas). B) Principales cepas bacterias solubilizadoras de fosfatos.**

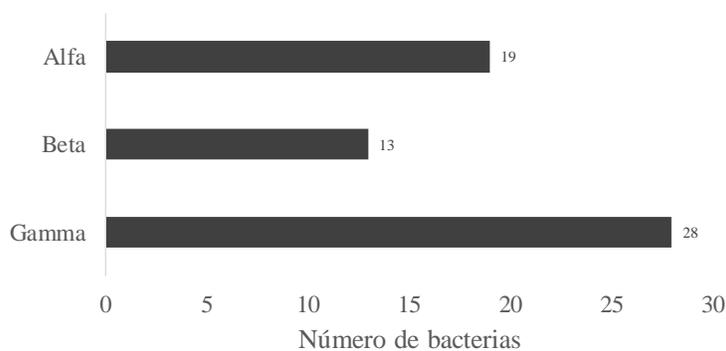
así como también es común que en la rizósfera, las BPCV que tienen un solo modo de acción actúen sinérgicamente para estimular el crecimiento de la planta hospedera (Vessey, 2003).

Por último, se seleccionaron 60 aislados bacterianos promisorios para determinar su capacidad hemolítica, parámetro que es necesario conocer para el uso comercial de microorganismos vivos, debido a que nos permite identificar bacterias potencialmente patógenas (Forbes *et al.*, 2007). El 47% de las cepas seleccionadas resultaron no hemolíticas (gamma hemólisis), mientras que 13 cepas (22%) presentaron hemólisis completa (beta hemolíticas) (Figura 5). Un número reducido de aislados resultó potencialmente patógeno, sin

embargo, se pueden seguir estudiando y alguno de sus metabolitos podrían tener una aplicación biotecnológica.

### Conclusiones

Por medio de técnicas de microbiología clásica se logró el aislamiento de 166 cepas bacterianas edáficas, identificando al menos 60 con el potencial para promover el crecimiento vegetal debido a que tienen la capacidad de sintetizar AIA, producir sideróforos y/o solubilizar fósforo. Dichas bacterias son candidatas para ser evaluadas en ensayos de interacción planta-microorganismo para confirmar su efecto positivo sobre el desarrollo de los cultivos



**Figura 5. Actividad hemolítica de las cepas bacterianas seleccionadas**

y servir de base para la generación de productos agrobiotecnológicos.

### Agradecimiento

Los autores(as) agradecen al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por el financiamiento al presente estudio a través del Proyecto de Investigación Recursos Fiscales Núm. 2315932912 “Aislamiento y caracterización de microorganismos promisorios para fortalecer el cultivo de maíz en el sur de Sonora y norte de Sinaloa”.

### Referencias

- Alexander, D. B.; Zuberer, D.A. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils*. 12:39-45.
- Arruda, L., Beneduzi, A., Martins, A., Lisboa, B., Lopes, C., Bertolo, F., Passaglia, L. M. P. and Vargas, L. K. 2013. Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. *Applied Soil Ecology*. 63:15-22.
- Babalola O. O. 2010. Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology Letters*. 32:1559-1570.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. 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.
- Coronel-Acosta C. B. 2016. Caracterización metabólica de la población bacteriana edáfica asociada al cultivo de maíz en el valle del Yaqui, Sonora (Tesis Licenciatura). Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias. Instituto Tecnológico de Sonora.
- de los Santos-Villalobos, S., de Folter, S., Délano-Frier, J. P., Gómez-Lim, M. A., Guzmán-Ortiz, D. A., & Pena-Cabriales, J. J. 2013. Growth promotion and flowering induction in mango (*Mangifera indica* L. cv “Ataulfo”) trees by *Burkholderia* and *Rhizobium* Inoculation: morphometric, biochemical, and molecular events. *Journal of plant growth regulation*. 32(3): 615-627.
- Forbes, B. A.; Sahm, D. F. and Weissfeld, A. S. 2007. *Bailey & Scott's. Diagnostic microbiology*. 12th edition, Mosby Elsevier.
- Glickmann, E.; Dessaux, Y. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowsky reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 61:793-796.
- Hussain, M. I., Asghar, H. N., Arshad, M., & Shahbaz, M. 2013. Screening of multi-traits rhizobacteria to improve maize growth under axenic conditions. *Journal of Animal and Plant Sciences*. 23(2): 514-20.
- Nautiyal, C. S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS microbiology Letters*. 170(1): 265-270.
- Nihorimbere V., Ongena M., Smargiassi M., Thonart P. 2011. Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*. 15: 327-337
- Pii, Y., Mimmo, T., Tomasi, N., Terzano, R., Cesco, S., & Creccchio, C. 2015. Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. *Biology and fertility of soils*. 51(4): 403-415.
- Pikovskaya R.I. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. 1948. *Microbiologiya*. 17:362-370.
- Sah, S., Singh, N., & Singh, R. 2017. Iron acquisition in maize (*Zea mays* L.) using *Pseudomonas* siderophore. *3 Biotech*. 7(2): 121.
- Saha, M., Sarkar, S., Sarkar, B., Sharma, B. K., Bhattacharjee, S., & Tribedi, P. 2016. Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environmental Science and Pollution Research*. 23(5): 3984-3999.
- Saleem M., Arshad M., Hussain S., Bhatti A. S. 2007. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 34: 635-648.
- Schwyn, B. & Neilands, J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*. 160:47-56.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2016. Consultado 17-11-2017 en <http://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119?idiom=es>
- Shankar Singh J., Pandey V. C., Singh D. P. 2011. Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 140: 339-353.
- Shi, H., Chen, L., Ye, T., Liu, X., Ding, K., & Chan, Z. 2014. Modulation of auxin content in *Arabidopsis* confers improved drought stress resistance. *Plant Physiology and Biochemistry*. 82, 209-217.
- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., & Nasrulhaq Boyce, A. 2016. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability: a review. *Molecules*. 21(5): 573.
- Verma J. P., Yadav J., Tiwari K. N., Lavakush V. Singh. 2010. Impact of plant growth promoting rhizobacteria on crop production. *International Journal of Agricultural Research*. 5: 954-983.
- Vessey, J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*. 255: 571-586.