



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ÁREA TEMÁTICA: INTERACCIÓN PLANTA-MICROORGANISMO-INSECTO

FACULTAD DE BIOLOGÍA

**“ABUNDANCIA, DIVERSIDAD Y FUNCIONES DE ACTINOMICETOS
NATIVOS EN LA RIZOSFERA DE MAIZ”**

TESIS

Que para poder obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta:

Q.F.B.LUCERO CALDERÓN LÚA

Directores de Tesis:

DRA. YAZMÍN CARREÓN ABUD

DR. JOHN LARSEN

MORELIA MICHOACÁN, MARZO, 2016

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL
LABORATORIO DE AGROECOLOGÍA DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
CAMPUS MORELIA, BAJO LA DIRECCION DE:**

DR. JOHN LARSEN

**Y EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y
GENÉTICA DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA EN LA
UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO BAJO LA DIRECCIÓN DE:**

DRA. YAZMÍN CARREÓN ABÚD

AGRADECIMIENTOS

A la facultad de Biología y al programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento brindado para el desarrollo de esta investigación.

Al Laboratorio de Agroecología del Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad (IIES) de la Universidad Autónoma de México.

A mis compañeros del Laboratorio, por su amistad y apoyo.

A Dante, por su apoyo incondicional en todo momento, sus valiosas observaciones y sobre todo su amistad.

A Netza, por tu ayuda como técnico y amigo.

Al Dr. Antonio Roldán y Fuensanta Caravaca todo mi cariño y agradecimiento por su apoyo durante mi estancia en el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS), por su hospitalidad y muestras de afecto, así como su apoyo en el proyecto que ayudo a enriquecer mi trabajo.

A los Doctores Miguel Martínez y Javier Villegas por su aporte en mi trabajo, y sugerencias que siempre me hicieron mejorar.

A la Dra. Yazmin Carreón Abúd, por creer en mí y motivarme a ingresar a la maestría, por su apoyo y significativo aporte en este trabajo.

A John Larsen, agradezco infinitamente por dejarme aprender de el y darme la oportunidad de trabajar estos últimos años a su lado, por su apoyo siempre incondicional, su paciencia y dedicación. Por enseñarme a ser no solo una mejor profesionista sino una mejor persona, muchas gracias John por todo.

*A mis padres Angélica y Arturo,
por su incondicional apoyo y amor.*

INDICE

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
4. ANTECEDENTES	4
4.1. Rizósfera	4
4.2. Microorganismos de la rizósfera	5
4.3. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal	6
4.4. Actinomicetos	7
4.4.1. Características de los actinomicetos.....	9
4.4.2. Importancia de los actinomicetos.....	11
4.5. Influencia de la fertilización mineral sobre los microorganismos rizósfericos	12
4.6. Uso de microorganismos en la agricultura	13
5. HIPÓTESIS.....	14
6. OBJETIVO GENERAL	14
6.4. Objetivos particulares	14
7. MATERIALES Y MÉTODOS	15
7.4. FASE 1: Evaluación del efecto de la fertilización mineral sobre la diversidad y abundancia de actinomicetos	16
7.1.1. Materiales biológicos	16
7.1.2. Condiciones experimentales.....	16
7.1.3. Diseño experimental	17
7.1.4. Aislamiento de actinomicetos	17
7.1.5. Caracterización fenotípica	18
7.1.5.1. Morfología macroscópica	18
7.1.5.2. Morfología microscópica	19
7.1.6. Nomenclatura de actinomicetos nativos.....	19
7.1.7. Mantenimiento y conservación de cepas	19
7.1.8. Diversidad y abundancia de actinomicetos nativos	20
7.1.8.1. Evaluación de diversidad	20
7.1.8.2. Evaluación de abundancia	20
7.1.9. Estimación de la biomasa de actinomicetos	20

7.2. FASE 2. Capacidad de solubilización de fósforo y su efecto en la estimulación del crecimiento del maíz.	22
7.2.1. Materiales biológicos	22
7.2.2. Condiciones experimentales.....	22
7.2.3. Diseño experimental	23
7.2.4. Evaluación in vitro para la solubilización de fosforo	23
7.2.5. Desempeño vegetal.....	24
7.2.6. Medición de pH.....	24
8. RESULTADOS	25
FASE 1. Evaluación del efecto de la fertilización mineral sobre la diversidad y abundancia de actinomicetos.	25
8.1. Caracterización morfológica.....	25
8.1.1. Crecimiento en diferentes medios de cultivo.....	31
8.1.2. Diversidad	32
8.1.3. Abundancia	33
8.1.4. Estimación de la biomasa de actinomicetos mediante biomarcadores de ácidos grasos.	35
8.2. FASE 2. Capacidad de solubilización de fósforo y su efecto en la estimulación del crecimiento del maíz.	36
8.2.1. Solubilización de fosforo.....	36
8.2.2. Evaluación de promoción de crecimiento.....	38
8.2.3. Evaluación de pH	41
9. DISCUSIÓN.....	43
10. CONCLUSIONES.....	47
11. REFERENCIAS.....	48

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Clasificación de actinomicetos	7
TABLA 2. Diseño experimental fase 1	15
TABLA 3. Diseño experimental fase 2	22
TABLA 4. Descripción de características morfológicas microscópicas y macroscópicas de los actinomicetos nativos aislados	25
TABLA 5. Diversidad de colonias aisladas de actinomicetos nativos	31
TABLA 6. Abundancia de actinomicetos nativos	32
TABLA 7. Eficiencia relativa de solubilización por parte de los aislados de Actinomicetos	36
TABLA 8. Valores de probabilidad de P a partir del análisis de varianza del desempeño vegetal y pH, con diferentes inóculos de actinomicetos y distintos tipos de fertilización con fósforo.	37

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Proceso del aislamiento de actinomicetos	17
FIGURA 2. Metodología empleada evaluar la solubilización de fosforo in vitro	23
FIGURA 3. Microfotografía del aislado 101-52	24
FIGURA 4. Macroscopía de cepa 57-31	30
FIGURA 5. Morfotipos de actinomicetos aislados	31
FIGURA 6. Evaluación de abundancia en un tiempo de 6 semanas de crecimiento de la planta por tratamiento	32
FIGURA 7. Evaluación de abundancia en un tiempo de 3 semanas de crecimiento de la planta por comunidad nativa	33
FIGURA 8. Evaluación de abundancia en un tiempo de 6 semanas de crecimiento de la planta por comunidad nativa	33
FIGURA 9. Representación de ácidos grasos metilados en inóculos rizosfericos	34
FIGURA 10. Solubilización de fosfato en placa por parte de aislado de actinomiceto	35
FIGURA 11. Plantas de maíz inoculadas con cepas nativas de actinomicetos y testigo fertilizadas con diferentes fuentes de fosforo	38
FIGURA 12. Peso seco de la parte aérea de las plantas de maíz con y sin	38

la inoculación de actinomicetos

FIGURA 13. Peso seco de la parte radicular de las plantas de maíz con y sin la inoculación de actinomicetos **39**

FIGURA 14. Correlación entre peso seco parte radicular/peso seco parte aérea **40**

FIGURA 15. pH de suelo rizosferico de las plantas de maíz con y sin la inoculación de actinomicetos **40**

1. RESUMEN

El uso de fertilizantes químicos es uno de los principales métodos empleados en los sistemas de producción agrícola para beneficiar el crecimiento y rendimiento vegetal, sin embargo se conoce que la adición de fertilizantes químicos puede modificar la biodiversidad y alterar la estructura de las comunidades microbiológicas del suelo que desarrollan diversas actividades benéficas sobre el desarrollo y nutrición vegetal. En este estudio se evaluó el efecto que tiene la fertilización mineral sobre la abundancia y diversidad de actinomicetos nativos de la rizósfera de plantas de maíz, y se evaluaron algunas de las funciones como promotores de crecimiento vegetal por parte de los actinomicetos nativos aislados. La metodología empleada se dividió en 2 fases: 1) Aislamiento e identificación de actinomicetos bajo distintos tipos de fertilización; y 2) Evaluación de solubilización de fósforo por parte de los actinomicetos nativos aislados. Los resultados aislados obtenidos en la primer fase fueron utilizados en la segunda fase. En la fase 1 se aislaron actinomicetos nativos teniendo en cuenta sus características tanto micro como macroscópicas. La microscopía confirmó que el 100% de los actinomicetos aislados fueron Gram positivos, logrando 33 aislados de los diferentes tratamientos. Al finalizar el análisis de la comparación de la diversidad en los distintos tratamientos de fertilización podemos observar que esta disminuye al aumentar el tiempo de vida de la planta ocasionando modificación en la estructura de la comunidad bacteriana, en contraste con la abundancia la cual aumento. En la fase 2 se seleccionaron 4 actinomicetos principalmente por su capacidad de solubilizar fosforo de manera in vitro, para posteriormente desarrollar un sistema que pusiera a prueba su capacidad de solubilizar diferentes fuentes de fosforo y promover el desempeño vegetal en plantas de maíz, en donde se pudo observar un incremento del área foliar y una disminución del pH en el suelo rizósferico de las plantas que fueron inoculadas con actinomicetos nativos.

Palabras clave: Actinomicetos, fertilización mineral, rizósfera, biodiversidad, fósforo.

2. ABSTRACT

The use of chemical fertilizers is one of the main methods used in agricultural production systems for growing and performance benefit. However it is known that the addition of chemical fertilizers can modify and alter the biodiversity and alter the communities structure of the ground , which perform beneficial activities in vegetal nutrition and growing. In this study it has been evaluated the effect about mineral fertilization on the abundance and diversity of native actinomycetes in the corn plants rhizosphere and some functions as been evaluated as vegetal growing promoters by the isolated native actinomycetes. The used methodology was divided into 2 phases: 1) Isolation and identification of actinomycetes under different types of fertilization; and 2) Evaluation of solubilization of phosphorus by isolated native actinomycetes. The isolated results given in the first phase were utilized in the second phase. In the first phase the native actinomycetes were isolated considering micro and macroscopic features. Microscopy confirmed that 100% isolated actinomycetes were Gram positive, getting 33 isolates of different treatments. Finalizing the comparison analysis of the diversity in different fertilization treatments we can see a decrease due to the increase of the plant lifetime causing structure change modification on the bacterial community, in contrast which abundance has increased. In phase two, 4 actinomycetes has been selected mainly by its primarily for its phosphorus solubilize in vitro way, to further develop a system which could test it's solution capacity four different phosphorus sources and promote the vegetal performance in corn plants, where it was observed an increase of leaf area and a decrease in pH in the rhizosphere soil of the plants were inoculated with native actinomycetes.

Key words: actinomycetes, chemical fertilizers, rhizosphere, biodiversity, phosphorus.

3. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos de la rizósfera desarrollan en el suelo una amplia gama de actividades que inciden en el desarrollo y nutrición vegetal aumentando la disponibilidad de nutrientes limitantes (Thomson et al., 2010). Se sabe que el aumento de la microbiota edáfica incrementa la cantidad de nutrientes asimilables por la planta mejorando la fertilidad del suelo (Vargas Gil et al., 2009), y la determinación de dicha microbiota y el contenido de biomasa microbiana es, por lo tanto, una herramienta para el diagnóstico del estado de fertilidad (Canet et al. 2000). Numerosos estudios muestran que diferentes manejos agrícolas modifican la biodiversidad y alteran la estructura de las comunidades microbiológicas del suelo (Kennedy y Smith, 1995), las cuales juegan un papel fundamental en la fertilidad de los agroecosistemas. Entre los microorganismos rizosfericos benéficos se destacan los hongos formadores de micorriza arbuscular (HMA) y las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) (Azcón et al., 2000). Falta evidencia científica sobre el impacto que pueden tener los fertilizantes químicos sobre las poblaciones nativas de microorganismos y se desconocen muchos de los beneficios que se tienen al utilizar estos inoculantes en la nutrición de la planta, los cuales pueden llegar a ser un aspecto clave en la agricultura sostenible, principalmente ayudando a la reducción de dichos fertilizantes y estimular el crecimiento vegetal.

Por lo anterior es de suma importancia realizar estudios a aquellas comunidades bacterianas que desarrollan diversas actividades benéficas en los agroecosistemas como lo son los Actinomicetos, los cuales han mostrado tener características como la producción de antibióticos, compuestos con capacidad antagónica sobre patógenos, descomposición de la materia orgánica, fijación de nitrógeno, solubilización de fósforo, etc., que permiten catalogarlos como PGPR. Estudios realizados con actinomicetos se conocen escasamente, a pesar de ser bacterias conocidas por desarrollar diversas actividades benéficas en el ecosistema.

Teniendo en cuenta estos antecedentes el presente proyecto pretende estudiar el efecto que tiene la incorporación de fertilizantes sobre la abundancia y diversidad de actinomicetos nativos de plantas de maíz, y si la incorporación de actinomicetos nativos en la rizósfera facilita la solubilización de fosforo.

4. ANTECEDENTES

4.1. Rizósfera

La rizósfera es el volumen de suelo circundante bajo la influencia de las raíces de las plantas (Kennedy et al., 2005). A inicios del siglo XX, Hiltner introdujo el termino *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 de microorganismos estimuladas, tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo, en la rizósfera son de vital importancia para el desarrollo de las plantas (Azcón-Aguilar et al., 2002).

Las plantas, el suelo, los microorganismos y la microfauna tienen interacciones muy importantes en la rizósfera. (Pinton et al., 2001). Se sabe que en la rizosfera la interacción entre las bacterias y las raíces de las plantas puede ser beneficiosa, en este caso se puede considerar a la rizósfera como una zona de amortiguación microbiológica en donde la microbiota sirve de protección a la planta frente al ataque de patógenos (Krupa y Dommergues et al., 1981).

La rizósfera es el hábitat ecológico en el cual los microorganismos están en contacto directo con la raíz de las plantas (Arshad y Frankenberger et al., 1998) y es el sitio donde se dan diversas interacciones, como: competencia, mutualismo, comensalismo, amensalismo y parasitismo (Barea y Azcón-Aguilar et al., 1982). Dada su abundancia, el componente microbiano del suelo es importante para la salud de los ecosistemas. En este sentido, el mantenimiento de la viabilidad, diversidad de la población y el funcionamiento de las comunidades microbianas del suelo es esencial para la agricultura sustentable (Zuñiga et. Al 2008).

4.2. Microorganismos de la rizósfera

Las acciones que desarrollan los microorganismos en la rizósfera, y que resultan beneficiosos en los sistemas suelo-planta, pueden concretarse en las siguientes (Franco-Correa et al., 2008):

- 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.
- 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 o patógenos) o de eliminación de productos xenobioticos (biorremediadores) o incremento de la resistencia/tolerancia a la salinidad, sequia, degradación de sistemas, entre otros (mejoradores eco fisiológicos).

En general, los microorganismos desarrollan actividades relacionadas con los procesos de descomposición y mineralización de complejos orgánicos y la traslocación de bioproductos y elementos minerales que conllevan la movilización de los nutrientes en el ecosistema suelo-planta (Reyes et al., 2008).

En la rizosfera, las bacterias son los microorganismos más abundantes. Las rizobacterias en la rizosfera son bacterias competentes que agresivamente colonizan las raíces de las plantas; ellos son capaces de multiplicarse y colonizar todos los nichos ecológicos que se encuentran en las raíces en todas las etapas de crecimiento de la planta, en la presencia de una microflora que compiten (Antoun y Kloepper et al., 2001).

4.3. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

A las bacterias que ejercen un efecto benéfico sobre el crecimiento de las plantas se les denomina rizobacterias promotoras el crecimiento vegetal (PGPR) (Kloepper y Schroth et al., 1978).

Las PGPR son bacterias benéficas que se presentan como una alternativa a los fertilizantes químicos y plaguicidas (Kloepper & Beauchamp et al., 1992). En años recientes, se ha retomado el interés de utilizar bacterias promotoras de crecimiento en la producción de cultivos. Estas bacterias se han aplicado a semillas, tubérculos o raíz, y son capaces de colonizar las raíces de las plantas y estimular el crecimiento y rendimiento de cultivos (Chanway et al., 1989).

Se conoce un amplio rango de mecanismos benéficos para las plantas realizados por las bacterias promotoras de crecimiento que incluyen efectos directos o indirectos. El efecto directo consiste en un aumento en la movilización de nutrimentos solubles, seguido por el mejoramiento de absorción de las plantas (Lifshitz et al., 1987), la producción de antibióticos para hongos, bacterias y virus (Hoffland et al., 1997) y de fitohormonas (auxinas, giberelinas, citocininas y etileno) (Schroth y Weinhold, et al., 1986; Chanway et al., 1997). Efectos indirectos incluyen el aumento de fijación de N₂, cuando actúan como agentes de control biológico reduciendo enfermedades, cuando se estimulan otras simbiosis beneficiosas, o cuando protegen la planta mediante la degradación xenobióticos en suelos contaminados inhibitorias (Jacobsen, 1997).

El crecimiento microbiano está limitado por la disponibilidad de carbono orgánico, su aporte por los exudados radicales y las bajas concentraciones de O₂ favorecen la actividad y el crecimiento de las bacterias. Las raíces en crecimiento son una fuente vital de carbono para la biomasa microbiana (Buée, 2009).

Los actinomicetos y muchas bacterias son capaces de producir enzimas extracelulares que hidrolizan dichos polímeros (Paul y Clark et al., 1989). Es sabido que el funcionamiento de un ecosistema terrestre depende en gran medida de la actividad microbiana del suelo (Barea et al., 2004).

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, se asocian en el nicho rizosférico con plantas de interés agronómico y en ciertos casos producen efectos benéficos directos

sobre su crecimiento y nutrición tanto nitrogenada como fosforada. Así se constituyen en una alternativa económica y ecológica para aumentar la producción de alimentos (Bashan et al., 2004; Caballero et al., 2004; Díaz y Fernández et al., 2008; Ferraris y Courerot et al., 2004; Naiman et al., 2009; Reed y Glick et al., 2004).

4.4. Actinomicetos

El término actinomiceto es una designación informal para las bacterias que pertenecen al orden de los actinomicetales. En un principio estos microorganismos fueron considerados como hongos, debido a que poseen hifas aerobias verdaderas. Sin embargo estudios realizados en su composición de su pared celular, específicamente en su envoltura lipídica celular y a la composición de peptidoglicano, demostraron que los actinomicetos son bacterias aerobias verdaderas (Mcneil et al., 1994).

Entre los microorganismos del suelo, los actinomicetos son uno de los grupos de bacterias más abundantes, comprende 63 géneros constituyendo aproximadamente del 20-60% de la población microbiana del suelo (Franco-Correa et al., 2008). Los actinomicetos también cuentan con diversas e importantes capacidades fisiológicas y metabólicas, como la producción de enzimas extracelulares y la formación de metabolitos secundarios (Berdy et al., 2004). Al formar parte del sistema de descomposición de la materia orgánica, los actinomicetos pueden ser indicadores de fertilidad y servir como elemento de aproximación a la dinámica de un ecosistema (Kennedy y Smith et al., 1995).

Los géneros dentro de este grupo son muy diversos e incluyen algunos que pueden ser patógenos tanto para el hombre y animales. Los más importantes de estos son los llamados corineformes y nocardioformes y que incluyen los siguientes géneros: *Corynebacterium* (*C.diphtheriae*), *Mycobacterium* (*M.tuberculosis*), *Nocardia* (*N.asteroides*, *N.otitidiscaviarum*, *N.brasiliensis*), *Rhodococcus* (*R.equi*), *Gordonia*, *Tsukamurella* y *Actinomadura* (*A. madurae*). Otros géneros importantes son: *Streptomyces* y *Dermatophilus*, así como los actinomicetos anaerobios: *Actinomyces*, *Arachnia* y *Rothia* (Serrano et al., 2005) (tabla 1).

Constituyen el orden *Actinomycetales*, de la clase *Actinobacteria*. Dicho orden está compuesto por más de 220 géneros y cientos de especies que constantemente son descritas (www.bacterio.citc.fr).

TABLA 1. CLASIFICACIÓN DE ACTINOMICETOS		
FAMILIA	CARACTERÍSTICAS	GÉNERO
<i>Actinomycetaceae</i>	Filamento ramificado con fragmentos. Sin micelio aéreo. Paredes celulares variables que incluyen tipo V y VI.	<i>Actinomyces</i> <i>Agromyces</i> <i>Arachnia</i> <i>Bacterionema</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Rothia</i>
<i>Actinoplanaceae</i>	GRUPO A Sin micelio aéreo. Pared celular tipo II. Zoosporas en vesícula (esporangio). GRUPO B Micelio Aéreo Pared celular tipo III Esporas con motilidad o sin ella, formadas dentro de vesículas (esporangio).	<i>Actinoplana</i> <i>Ampullariella</i> <i>Dactilosporangium</i> <i>Planobispora</i> <i>Planomonospora</i> <i>Spirillospora</i> <i>Streptosporangium</i>
<i>Dermatophilaceae</i>	Micelio dividido en todos los planos, sin micelio aéreo. Pared celular tipo III. Forma elementos móviles (zoosporas).	<i>Dermatophilus</i> <i>Geodermatophilus</i>
<i>Frankiaceae</i>	Simbióticas obligadas, formando nódulos en raíces de plantas no leguminosas que pueden fijar nitrógeno.	<i>Frankia</i>
<i>Micromonosporaceae</i>	Únicamente micelio vegetativo. Pared celular tipo II. Forma esporas individuales, sensibles al calor.	<i>Micromonospora</i>
<i>Mycobacteriaceae</i>	Crecen como bacilos, filamentos ramificados, ocasionalmente con micelio rudimentario. Fuertemente ácido resistente. Pared celular Tipo IV. Alto contenido en lípidos que incluye ácidos micólicos.	<i>Mycobacterium</i> <i>Micrococcus</i>
<i>Nocardiaceae</i>	Micelio vegetativo que fragmenta, forma ácidos nocardiomicólicos (lípidos LCN-A). Pared celular tipo IV. Se pueden formar cadenas de esporas en el micelio vegetativo y aéreo. Micelios vegetativos no fragmentados. Micelio aéreo. Aeróbios. Pared celular tipo I. Esporas presentes en micelio aéreo, pero también pueden ser observadas en micelios vegetativos. Cadenas de artrosporas formadas dentro de una vaina. Esporas principalmente no móviles.	<i>Rhodococcus</i> <i>Micropolyspora</i> <i>Nocardia</i> <i>Chainia</i> <i>Elytrosporangium</i> <i>Intrasporangium</i> <i>Kitasatoa</i> <i>Microellobisporia</i> <i>Streptovercillium</i> <i>Streptomyces</i>

FAMILIA	CARACTERISTICAS	GENERO
<i>Thermomonosporaceae</i>	Micelio aéreo y vegetativo. Micelio vegetativo puede fragmentar. Pared celular tipo III (algunos IV) Esporas individuales, en paredes o en cadenas cortas, encerradas en vaina.	<i>Actinomadura</i> <i>Microbispora</i> <i>Microtetrastora</i> <i>Saccharomonospora</i> <i>Thermomonospora</i>
No designados	Micelio rudimentario, se rompe en elementos móviles. Gram negativos. No forma micelio aéreo. Micelio vegetativo rompe en elementos móviles (fragmentación de esporas). Pared celular tipo IV. Sin micelio aéreo. Fragmentos de micelio vegetativo, producen esporas individuales. La pared celular contiene lisina pero no ácido aspártico. Micelios aéreos y vegetativos no fragmentados. Pared celular tipo IV. Esporas formadas en micelios vegetativo y aéreo. Sin micelio vegetativo. Pared celular tipo I. Pedúnculos que soportan cadenas cortas de oosporas.	<i>Mycoplana</i> <i>Oerskovia</i> <i>Promicromonospora</i> <i>Pseudonocardia</i> <i>Sporichthya</i>
Modificado de: Serrano, José A., Sandoval Trujillo, A.H. 1992. "Manual de Laboratorio para el Estudio de los Actinomicetales Patógenos". 1ª ed. Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.		

4.4.1. Características de los actinomicetos

Los Actinomicetos son bacterias Gram positivas que generalmente en algún momento de su ciclo de crecimiento desarrollan células filamentosas, ramificadas que fragmentan en elementos cocoides y/o bacilares (Serrano et al., 2005). En la actualidad, los actinomicetos se encuentran incluidos en el dominio Bacteria debido a varias razones: la pared celular está compuesta por peptidoglicano, el diámetro de sus hifas es inferior al de los hongos, son sensibles a los antimicrobianos pero presentan resistencia a los antifúngicos y la disposición de su material genético es típicamente procariótica, aunque se caracterizan por presentar un alto contenido de guanina y citosina en su DNA, encontrándose entre el rango de 51 a 78% G+C (Franco-Correa, et al., 2008).

Desde un punto de vista práctico, estos microorganismos pueden ser reconocidos en el laboratorio por que forman colonias lisas, firmes, adherentes, cerosas o calcáreas que crecen después de 3 días a 2 semanas de incubación. Pueden tener una pigmentación ocre, rosada, anaranjada o gris (Bergey et al., 2000). El olor a sótano húmedo o a suelo recién removido es un indicio importante por el cual se los puede reconocer. La temperatura óptima de crecimiento es de 30°C a 36 °C, tanto en la incubadora de CO₂ (como para el cultivo de micobacterias) como en el medio ambiente (como en las incubadoras utilizadas para el cultivo de hongos) (Koneman et al., 2001).

Casi todos sus miembros desarrollan un micelio filamentososo que puede permanecer unido a la superficie del sustrato, al cual se le denomina micelio vegetativo, o bien puede desarrollarse hacia la parte externa, en cuyo caso se denomina micelio aereo. Los filamentos individuales o hifas del micelio se subdividen en unidades, como producto del crecimiento de la pared celular hacia el interior de la hifa en intervalos regulares a lo largo de la estructura. A este proceso se le denomina septación y cada una de las septas resultantes contiene una molécula de ADN (Holt et al., 1994). 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 orgánicos, azúcares, polisacáridos, lípidos, proteínas e hidrocarburos alifáticos. Utilizan como fuentes de nitrógeno amonio, nitratos, aminoácidos, peptonas y un gran número de proteínas (Franco-Correa, 2008).

Estos organismos son los causantes del olor característico a moho o a tierra húmeda de los campos recién arados. Este olor característico se origina de la producción de metabolitos denominados “*geosminos*” (Berdy et al., 2004). 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. 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. Los géneros *Streptomyces*, *Nocardia* y *Micromonospora* se encuentran frecuentemente como habitantes del suelo (Titus y Pereira et al., 1999).

La mayoría de los actinomicetos crecen en medios como agar nutritivo, agar tripticasa 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, malta, almidón con sales inorgánicas, agar agua con determinados polisacáridos como fuente de carbono, extracto de levadura o peptona.

4.4.2.Importancia de los actinomicetos

Los actinomicetos pueden degradar una enorme cantidad y variedad de compuestos orgánicos y son muy importantes en la mineralización de la materia orgánica. Los Actinomicetos producen la mayor parte de los antibióticos naturales de importancia médica. Aunque la mayoría de los Actinomicetos son organismos de vida libre, algunos son patógenos para los seres humanos, ciertos animales y algunas plantas (Prescott et al., 2004).

Entre las actividades funcionales que catalogan a los actinomicetos como PGPR cabe destacar la solubilización de fósforo, la fijación de nitrógeno atmosférico, la producción de sideróforos y la producción de metabolitos secundarios (Williams et al.,1984). 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).

Una de las características que distinguen a los actinomicetos del resto de las bacterias es la capacidad de producir un amplio espectro de metabolitos secundarios que son utilizados con fines terapéuticos por su actividad como antineoplásicos, antibióticos, inmunomoduladores, inhibidores enzimáticos, etc. (Prescott et al., 2004). Las especies pertenecientes al género *Streptomyces* constituyen el 75% del total de la población con capacidad para producir moléculas con actividad antibiótica como la estreptomicina (Heuer et al., 1997). También exhiben diferentes estrategias, desde ciclos de rápida proliferación y esporulación, hasta el mantenimiento de poblaciones por prolongados periodos de tiempo. Esta versatilidad metabólica y morfológica les confiere un gran potencial para desempeñarse en procesos de biorremediación, incluyendo la remoción de metales (Albarracín et al. 2005).

De igual manera, desempeñan un rol crucial en la sostenibilidad a largo plazo de los sistemas naturales y agrícolas, debido al papel que cumplen en la descomposición de la materia orgánica, fijación de nitrógeno (*Frankia sp.*), degradación de agroquímicos y el control biológico de plagas en plantas y animales (Williams et al. 1984).

4.5. Influencia de la fertilización mineral sobre los microorganismos rizósfericos

La cantidad de microorganismos que se van a encontrar los suelos agrícolas depende de factores como: la estación de año, el tipo de suelo, la vegetación, el contenido de humedad, el tipo de labranza y fertilización (Killian et al., 2001). Las prácticas agrícolas afectan tanto a su biodiversidad como a la densidad de las poblaciones microbianas implicadas; los resultados a mediano y largo plazo pueden ser la pérdida de fertilidad de los suelos y su progresiva depauperación (Olalde y Aguilera et al., 1998). Numerosos estudios muestran que diferentes manejos agrícolas modifican la biodiversidad y alteran la estructura de las comunidades microbiológicas del suelo (Kennedy y Smith., 1995).

Una de las prácticas agrícolas más comúnmente empleadas es la fertilización mineral (química), que produce marcados beneficios en las plantas debido al aumento en la disponibilidad de nutrientes (Wu et al., 2011). Sin embargo, poco se conoce acerca del efecto que provocan los fertilizantes en la dinámica de las poblaciones microbianas nativas. Los fertilizantes provocan modificaciones en las poblaciones de hongos y bacterias en el suelo (Ge et al., 2008), sin embargo, algunos investigadores no han encontrado diferencias en la respuesta de los microorganismos ante la fertilización (Clegg et al., 2006), mientras que otros autores mencionan que el uso indiscriminado de insumos inorgánicos ha alterado significativamente los constituyentes organismos y vivos del suelo, y con ello su equilibrio ecológico, modificando principalmente las actividades metabólicas de las diferentes poblaciones microbianas del agroecosistema (Reyes et al., 2008).

4.6. Uso de microorganismos en la agricultura

Se plantea que el uso constante de agroquímicos en la agricultura ha motivado a mejorar la comprensión de las actividades cooperativas que se establecen en el suelo entre la microbiota y las plantas.

La utilización de microorganismos benéficos ha tenido una amplia difusión en los últimos años debido a su efecto positivo sobre el rendimiento de muchos cultivos y a la factibilidad de permitir desarrollar una agricultura orgánica (Caballero-Mellado et al., 2004, Cassán y García de Salamone et al., 2008). Así se constituyen en una alternativa económica y ecológica para aumentar la producción de alimentos (Bashan et al., 2004; Caballero-Mellado et al., 2004; Díaz y Fernández et al., 2008; Ferraris y Courerot et al., 2004; Naiman et al., 2009; Reed y Glick et al., 2004).

Hoy en día, los biofertilizantes son considerados como un componente del manejo integrado de la nutrición vegetal y han sido definidos como sustancias que contienen microorganismos vivos que al aplicarse a las semillas, superficie de las plantas o al suelo, colonizan la rizósfera o el interior de la planta y promueven su crecimiento aumentando la disponibilidad de los nutrientes y la sanidad vegetal en la planta hospedera (Vessey, 2003).

La utilización de biofertilizantes basados en estos microorganismos se presenta como una biotecnología “limpia” de gran interés, tanto desde el punto de vista económico como ecológico para la agricultura moderna (Rodríguez et al., 2002).

5. HIPÓTESIS

La abundancia y diversidad de actinomicetos nativos en la rizósfera de plantas de maíz varía de acuerdo al tipo de fertilización mineral empleada, y la incorporación de estas comunidades nativas promueve el crecimiento vegetal.

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar la abundancia y diversidad de actinomicetos nativos de la rizósfera del maíz y evaluar su capacidad de promover el crecimiento vegetal.

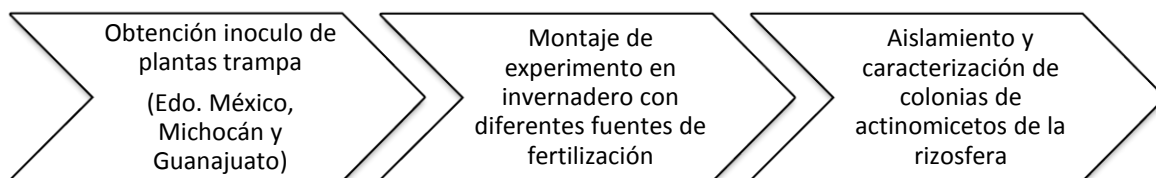
6.4. Objetivos particulares

- Determinar la diversidad y densidad poblacional de actinomicetos nativos en la rizósfera de plantas de maíz con distintos tipos de fertilización.
- Caracterizar morfológicamente actinomicetos nativos de la rizósfera de plantas de maíz.
- Evaluar la capacidad de solubilización de fosforo de los aislados de actinomicetos nativos obtenidos de la rizósfera de plantas de maíz.
- Determinar el impacto de los actinomicetos nativos sobre el desempeño vegetal del maíz.

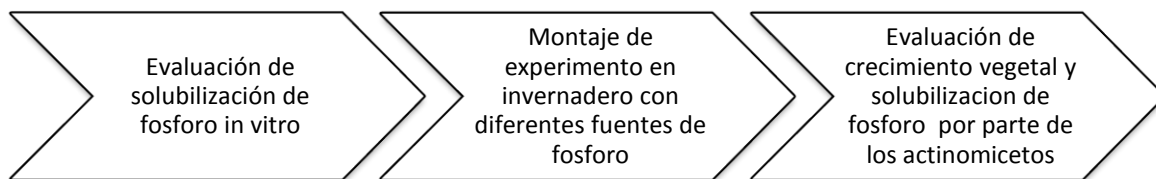
7. MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento consistió en 2 fases, las cuales fueron realizadas en el laboratorio de agroecología del Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad.

FASE I



FASE II



7.4. FASE 1: Evaluación del efecto de la fertilización mineral sobre la diversidad y abundancia de actinomicetos

7.1.1. Materiales biológicos

- Se usó como inóculo de microorganismos rizosféricos el suelo de un cultivo trampa de HMA nativos provenientes de parcelas de 3 estados de México (Edo. De México, Guanajuato y Michoacán) las cuales han sido manejadas con distintos tipos de fertilización, el inóculo del estado de Guanajuato tenía un manejo intensivo, el del estado de Michoacán tenía un sistema medio ya que no era 100% orgánico y en el del estado de México no hacían uso de agroquímicos y tenían prácticas de conservación del suelo; los cultivos trampa fueron propagados por 3 meses con una mezcla de arena de río y suelo agrícola (proporción 1:1) estéril con la semilla de maíz DK2042, fertilizando el suelo con la adición de una fuente de potasio y micronutrientes, adicionando NH_4NO_3 a los 22 días, al 2° mes y al 3° mes. No se adicionó ninguna fuente de fósforo en ninguna fase del experimento (Alvarado, 2015).
- Maíz DK4046 características agronómicas

7.1.2. Condiciones experimentales

Se realizó un experimento en invernadero con una mezcla 1:1 de suelo arcilloso extraído del Centro Regional Universitario de Centro Occidente (CRUCO) con arena de Zinapécuaro la cual se esterilizó en autoclave a 120 °C y 15 lb de presión por 1 hora.

Se utilizaron macetas de 3 kilos en las cuales se agregaron 2700 g del sustrato estéril más 300 g de inóculo de microorganismos rizosféricos. Se fertilizó el suelo con la adición de una fuente de macronutrientes y micronutrientes. El sistema se mantuvo por 6 semanas regándose cada tercer día a 80% de capacidad de campo, adicionándole NH_4NO_3 cada 15 días.

7.1.3. Diseño experimental

El diseño experimental consistió en cuatro repeticiones por cada inoculo de los diferentes manejos de los agroecosistemas del campo, tres distintos tipos de fertilización mineral y dos tiempos de cosecha (Tabla 2).

Factor	Nivel	Total
Inoculo	Testigo, Guanajuato,	4
Comunidades	Michoacán, Estado de México.	
Fertilización mineral	Testigo, Completo sin N, Completo sin P, Completo	4
Tiempo	3 y 6 semanas	2
Repeticiones	4	4
Unidades Experimentales		128

7.1.4. Aislamiento de actinomicetos

Después de 6 semanas de haber sembrado las plantas de maíz se cosecho cada una de ellas, se obtuvo una muestra de suelo rizosferico de cada maceta para aislar los actinomicetos presentes en el, la cual fue puesta en refrigeración durante 24 horas, posteriormente se tomó 1 gr de suelo rizosferico y se agregó 9 ml de agua destilada en tubos de ensaye, realizando posteriormente diluciones seriadas desde 10^{-3} a 10^{-8} . Después se colocó 0.1 ml de cada dilución sobre placas de agar extracto de malta (Anexo I, tabla 1) realizando una siembra masiva con asa estéril en forma de L.

Las placas se incubaron a 28°C por 14 días, en los cuales se realizó cada 24 horas una revisión del crecimiento colonial. Después se observaron las colonias obtenidas y considerando sus características morfológicas macroscópicas se hizo una selección de

aquellas que presentaban características típicas de los Actinomicetos. Posteriormente cada una de las colonias seleccionadas fue resembrada en agar extracto de malta y avena suplementada con nistatina para obtener cultivos puros (Anexo I, tabla 1.2).

Se realizó un recuento de las poblaciones en cada tratamiento.

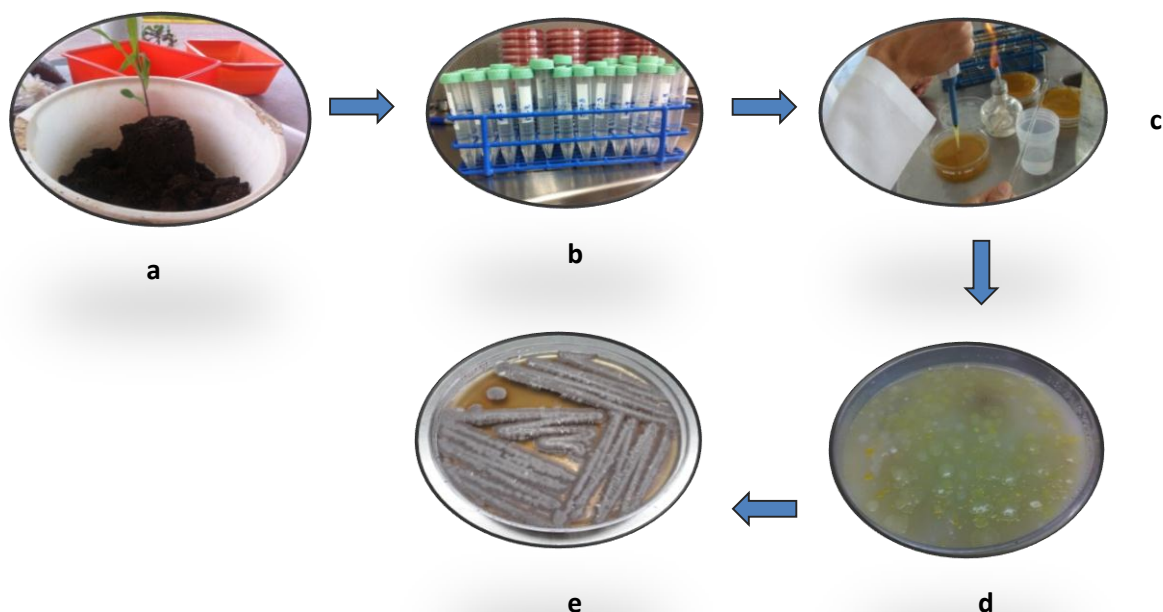


Figura 1. Proceso del aislamiento de actinomicetos: a) recolección de suelo rizosférico; b) diluciones seriadas de las muestras de suelo rizosférico; c) inoculación en placas con agar extracto de malta de cada dilución; d) crecimiento colonial de microorganismos rizosféricos en medio sólido; e) colonia representativa de actinomicetos re-aislada en medio sólido con crecimiento de 2 semanas en incubadora.

7.1.5. Caracterización fenotípica

7.1.5.1. Morfología macroscópica

Cada una de los aislados fue identificado en base a sus características macroscópicas, como la presencia o ausencia de micelio aéreo, colonias no cremosas, algunas con textura dura y en algunos casos fijas en el agar, considerando al mismo tiempo características

como, tamaño, color, forma, textura y presencia de pigmento difusible en el agar que pudieran ser características de las colonias de actinomiceto (Salazar et. al., 2013).

7.1.5.2. Morfología microscópica

Para determinar el tipo de pared de cada célula se realizó una tinción de Gram (Anexo II tabla 1.1). Para ello se tomó una muestra de un cultivo joven, entre una y dos semanas de crecimiento. La preparación se observó con un microscopio óptico con el objetivo de inmersión 100X. Se seleccionaron las cepas que presentaron células filamentosas, bacilares y en algunos casos cocoidales con presencia de ramificaciones, así como la presencia de esporas, la forma y tipo de agrupación de las mismas (Serrano et. al., 2005).

7.1.6. Nomenclatura de actinomicetos nativos

Los códigos empleados provienen de una numeración dada de acuerdo al tratamiento y dilución en donde se aisló cada cepa, por ejemplo en tratamiento #1 con una dilución a la -3 la cepa encontrada se llamaba C1-3, y de ser el caso que encontráramos más de una cepa, a las demás se les nombraba con los números continuos, es decir, C1-31, C1-32, C1-33, etc. Los aislamientos se realizaron siguiendo el diseño experimental presentado (tabla 2), el cual se efectuó a las 3 y 6 semanas posteriores a la siembra.

7.1.7. Mantenimiento y conservación de cepas

Las cepas obtenidas se resembraron en agar extracto de malta, las cuales, una vez crecidas se mantuvieron en refrigeración a 4°C. A su vez se realizó una resiembra periódica cada mes en nuevas placas y resiembras masivas en tubos con agar extracto de malta en pico de flauta permitiéndonos aumentar la supervivencia de los cultivos para su conservación.

7.1.8. Diversidad y abundancia de actinomicetos nativos

7.1.8.1. Evaluación de diversidad

Se realizó una comparación entre morfotipos encontrados evaluando las características morfológicas macroscópicas que presento cada aislado.

7.1.8.2. Evaluación de abundancia

La abundancia se midió en base a las unidades formadoras de colonias encontradas por tratamiento, realizando diluciones seriadas de 10^{-3} hasta 10^{-8} realizando un conteo colonial en 10^{-8} en agar extracto de malta y estimando resultados en base al número de colonias encontradas en dicha dilución sobre gr de suelo húmedo.

tripticasea puestas en agitación por 1 semana; (d) Bomba de vacío con filtros de membrana para la colecta de las células

7.1.9. Estimación de la biomasa de actinomicetos

La cuantificación de la densidad de actinomicetos se realizó siguiendo el método de Sasser (1990) mediante biomarcadores de ácidos grasos totales. Para esto, se tomó 1 gramo del suelo rizosferico previamente liofilizado y pulverizado el cual se colocó en un tubo de ensaye, la muestra se saponifico con 2 ml del reagente 1 (NaOH + Metanol + Agua), se cerró y vortexeo durante un lapso de 5 a 10 segundos, se colocó en baño María a 100 °C por 5 minutos, se sacó (esto con la finalidad de evitar fugas), y se agito nuevamente en vortex. Posteriormente se volvió a colocar en baño María a 100 °C por 25 minutos y al finalizar el tiempo los tubos se sacaron y se colocaron en agua para su enfriamiento. Se destaparon los tubos y se agregaron 4 ml del reagente #2 (HCl + Metanol) para su metilación, se vortexeó el tubo y se calentó en baño María a 80 °C durante 10 minutos, al

finalizar el tiempo los tubos se enfriaron en agua con hielo rápidamente para detener la reacción.

Posteriormente se realizó una extracción de los esteres metílicos en donde pasan de estar de la fase acuosa acídica a la fase orgánica, para esto se agregaron 2.5 ml del reagente #3 (Hexano + MTBE) y 100 µl de una solución estándar del ácido graso 19:0. Los tubos se cerraron y se rotaron durante 10 minutos, se centrifugaron durante 3 minutos a 2000 rpm y se procedió a remover el sobrenadante el cual fue colocado en un nuevo tubo de ensaye.

En la última fase se eliminan los ácidos grasos libres y residuos con un lavado básico, el cual se realizó agregando con 6 ml del reagente #4 (NaOH + H₂O destilada) a cada tubo, estos se pusieron en rotación por 5 minutos y posteriormente se centrifugaron por 3 minutos a 2000 rpm, al terminar se removi6 el sobrenadante y se colocaron en viales para ser evaporados con nitr6geno. Después se prepararon viales nuevos con 200µ de hexano y un baby vial adentro, y la muestra que previamente fue evaporada con nitr6geno se disolvi6 con 80 µl de hexano, se agiti6 en vortex y se agregaron 60 µl de esta muestra adentro del baby vial, este vial se cerr6 y el sobrante se almacen6 como muestra de respaldo (Sasser, 1990). Estos extractos se llevaron a leer al cromatografo de gases marca Agilent, modelo 7890B con el software de MIDI (Microbial Identification System).

7.2. FASE 2. Capacidad de solubilización de fósforo y su efecto en la estimulación del crecimiento del maíz.

Esta fase se basó en desarrollar un sistema utilizando 4 cepas nativas de actinomicetos obtenidas a partir de la fase 1 que evaluara su capacidad de solubilizar diferentes fuentes de fosforo y la capacidad de promover el crecimiento en plantas de maíz.

7.2.1. Materiales biológicos

- Selección de cepas de actinomicetos. La selección de aislados de actinomicetos se realizó principalmente en su capacidad de solubilizar fosforo de manera in vitro calculada en base a la eficiencia relativa de solubilización (ERS) que presento cada cepa, la cual fue calculada en base al Diámetro de la solubilización/Diámetro de la colonia X 100 (Vera et al., 2002), de esta manera, se seleccionaron 2 cepas que presentaron la mayor capacidad de solubilizar fosforo insoluble así como 2 actinomicetos que no solubilizaron in vitro. Otra de las características por la cual se realizó esta selección fue basándonos en sus características morfológicas macroscópicas de los aislados, tratando de tener 4 cepas totalmente distintas. La densidad inoculada fue de 1×10^6 UFC/gr de sustrato de las 4 cepas de Actinomicetos previamente seleccionadas.
- **Maíz DK4046**

7.2.2. Condiciones experimentales

Se realizó un experimento en invernadero, en donde se utilizó como sustrato una mezcla 1:1 de suelo arcilloso del (CRUCO) con arena de Zinapecauro estéril el cual se esterilizó dos veces en autoclave a 120 °C y 15 lb de presión por 1 hora.. Se utilizaron macetas de 2 kilos en las cuales se agregaron 1800 g del sustrato estéril más una densidad de inculo de 1×10^6 UFC/gr de sustrato de las 4 cepas de Actinomicetos seleccionadas. Se fertilizó el suelo con la adición de una fuente de potasio y micronutrientes: solución 1(K₂SO₄),

solución 2 ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) y solución 3 ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$), adicionándosele diferentes fuentes de fósforo como KH_2PO_4 o CaPO_4 . El sistema se mantuvo por 6 semanas regándose cada tercer día a 80% de capacidad de campo, adicionándole NH_4NO_3 cada 15 días.

7.2.3. Diseño experimental

En esta segunda fase se evaluó la promoción de crecimiento vegetal y la capacidad de solubilizar fósforo por parte de las cepas nativas de Actinomicetos y el diseño experimental consistió en cinco repeticiones por cada uno de los 4 diferentes actinomicetos seleccionados y un testigo, y cuatro distintos tipos de fertilización mineral con fósforo (Tabla 3).

Factor	Nivel	Total
Actinomiceto	Testigo, 2 solubilizadores y 2 no solubilizadores	5
Fertilización mineral	Testigo, Completo KH_2PO_4 , Completo CaPO_4 , Sin fósforo	4
Repeticiones	5	5
	Unidades Experimentales	100

7.2.4. Evaluación in vitro para la solubilización de fósforo

La capacidad de solubilizar fósforo de los actinomicetos se evaluó utilizando Medio NBRIP-BPB suplementado con fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) y el indicador azul bromefenol (Kumar, 1999).

Los aislados se sembraron en el medio cortando un cuadro de cada colonia en medio de cultivo extracto de malta, colocando 4 repeticiones por caja, separándolas de forma equidistante (figura 1) y se incubó a 28°C , revisando el halo de hidrólisis por 2 semanas. Se tomaron los datos de medida de la colonia y halo de hidrólisis para establecer la eficiencia de solubilización de fósforo por medio de la siguiente fórmula (Kumar and Narula.1999):

$$\text{Eficiencia de solubilización} = \frac{\text{diámetro del halo de hidrólisis}}{\text{diámetro de colonia}} \times 100$$



Figura 2. Metodología empleada evaluar la solubilización de fosforo por parte de los actinomicetos en Medio NBRIP-BPB: a) medio NBRIP-BPB sin inocular; b) corte realizado a cepa pura de actinomiceto; c) cortes del mismo tamaño en 4 secciones del medio.

7.2.5. Desempeño vegetal

Durante las seis semanas de crecimiento de la planta se realizó una medición en la altura de las plantas de maíz bajo los diferentes tratamientos, esta medición se realizó cada dos semanas, desde el inicio del tallo hasta la hoja más larga. Las plantas cosechadas se colocaron en un horno de secado a 80°C durante 48 hrs. Pasado este tiempo se registró el peso seco de la parte aérea y radicular de cada planta y se tomó como una variable a evaluar.

7.2.6. Medición de pH

Después de las 6 semanas de haber sembrado las plantas de maíz estas se cosecharon y se obtuvieron una muestra de suelo rizosferico de cada maceta para medir el pH de la rizosfera, con la finalidad de evaluar si los actinomicetos utilizados influenciaron en algún cambio en el pH aumentando la disponibilidad de fosforo. La medición del pH de suelo se realizó en una proporción 1:10 con una agitación de media hora en cada una de las 100 unidades experimentales obtenidas.

Análisis estadístico

Todos los datos fueron analizados usando un Análisis de Varianza Multifactorial. Cuando las diferencias son significativas se realizaran comparaciones mediante la prueba de DMS.

8. RESULTADOS

FASE 1. Evaluación del efecto de la fertilización mineral sobre la diversidad y abundancia de actinomicetos.

En esta primer fase se muestra como cada una de las colonias de actinomicetos nativos aisladas fue caracterizada, permitiéndonos registrar la diversidad de morfotipos encontrados, así como el conteo realizado para determinar su abundancia bajo diferentes tratamientos de fertilización y procedencia del inóculo después de que las plantas fueron cosechadas.

8.1. Caracterización morfológica

Se obtuvieron 33 aislados de los diferentes tratamientos (Tabla 1). Las colonias aisladas presentaron un micelio de color anaranjado, rosa, gris, café, blanco y negro, cambiando a tonos más oscuros debido a la producción de esporas. Las colonias presentaron un olor a suelo húmedo característica representativa de este grupo microbiano por su capacidad de producir geosmina.

La microscopía confirmó que el 100% de los aislados fueron Gram positivos, presentaban un micelio ramificado, algunos largos otros cortos que se fragmentaban en estructuras cocoidales o bacilares (Figura 4).

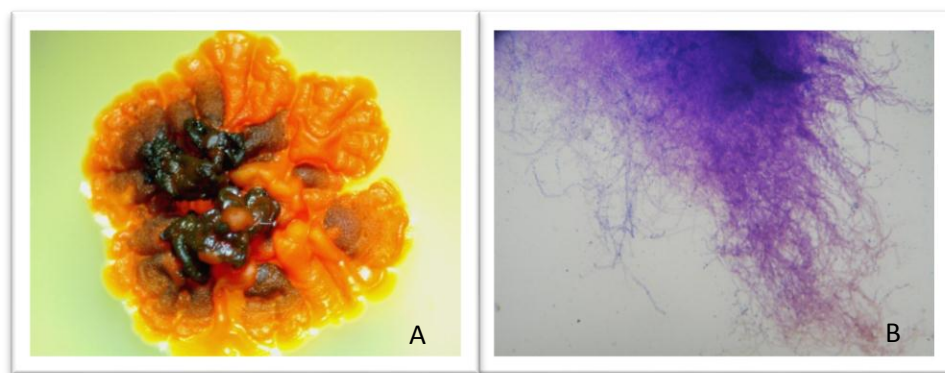
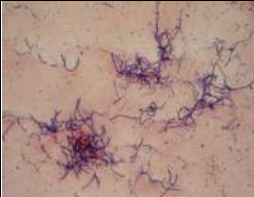
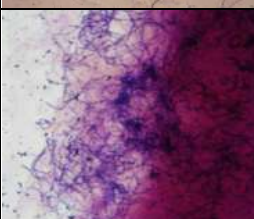
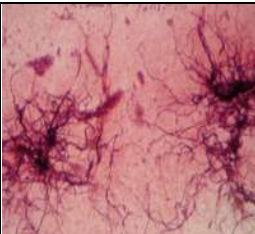
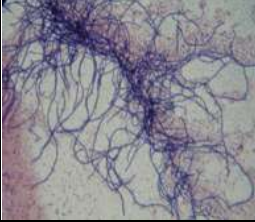
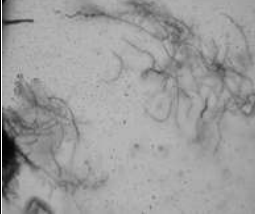
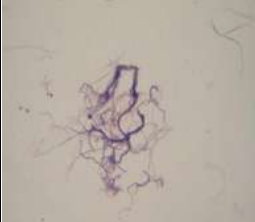
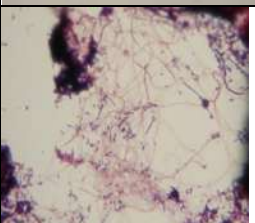
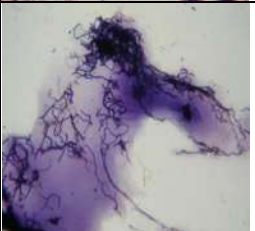


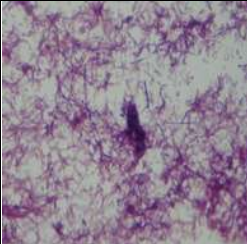
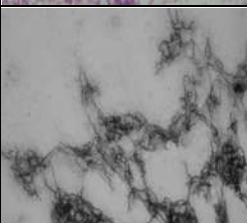
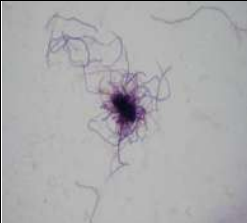
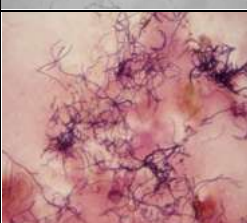
Figura 3. Microfotografía del aislado 101-52. Colonia vista en estereoscopio (A). Tinción Gram (B).

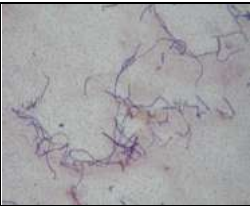
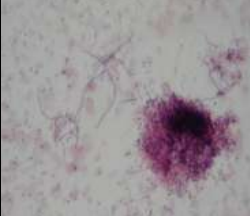
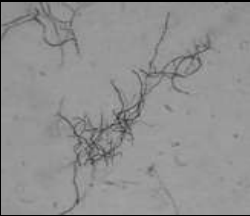
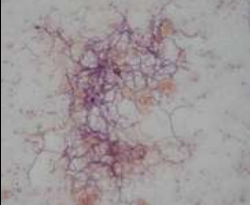
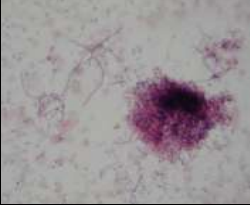
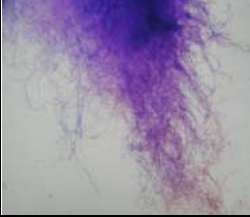
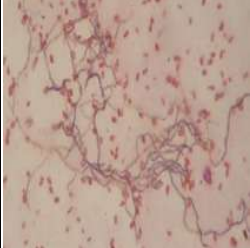
A continuación se presenta una tabla resumen de las características macroscópicas y microscópicas de los aislados que se obtuvieron.

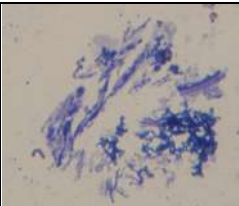
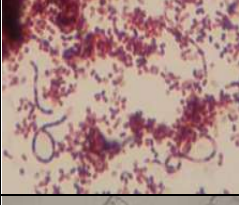
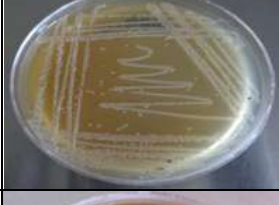
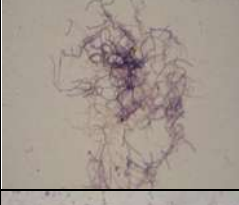
Tabla 4. Descripción de características morfológicas microscópicas y macroscópicas (Crecimiento en Agares extracto de malta y avena; tinción Gram 100X).

CEPA	CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS		CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS	
C5-4(1)		Colonia café clara, seca, pulverulenta con esporulación blanca		Filamentos delgados, largos, ramificados, algunos segmentados, Gram +
C5-4(2)		Colonia beige, suave, irregular, convexa y con pliegues		Filamentos delgados, largos, ramificados, Gram +
C5-4(3)		Colonia beige, irregular, elevada y con pliegues		Filamentos delgados, largos, ramificados, Gram +
C5-4(4)		Colonia beige, dura, seca, con esporulación blanca		Filamentos delgados, largos, ramificados, Gram +
C9-3(1)		Colonia beige, suave, irregular con pliegues		Filamentos delgados, cortos, ramificados, algunos segmentados, Gram +
C9-3(3)		Colonia rosa pálido, suave, con esporulación blanquecina		Filamentos delgados, cortos, ramificados, algunos segmentados, Gram +

C9-3(4)		Colonia blanca, dura, elevada, circular, convexa.		Filamentos delgados, largos, ramificados, Gram +
C9-3(5)		Colonia beige con esporulación blanquecina, dura, circular, convexa.		Filamentos delgados, largos, ramificados Gram +
C13-4(1)		Colonia café rojiza, dura, circular, elevada		Filamentos delgados, largos, ramificados Gram +
C13-4(2)		Colonia beige, suave, elevada e irregular.		Filamentos delgados, largos, ramificados Gram +
C13-5(1)		Colonia blanca, dura, circular, esporulación blanca.		Filamentos delgados, largos, ramificados Gram +
C17-3(1)		Colonia rosa pálido, suave, esporulación blanca		Filamentos delgados, largos, ramificados Gram +
C21-3(1)		Colonia café rojiza, dura, elevada y convexa		Filamentos delgados, largos, ramificados, algunos segmentados Gram +

C21-3(2)		Colonia blanca, algodonosa, suave		Filamentos delgados, largos, ramificados, algunos segmentados Gram +
C21-3(4)		Colonia beige, puntiforme, dura, elevada		Filamentos delgados, largos, ramificados, Gram +
C25-3(1)		Colonia rosa pálido, suave, esporulación blanca		Filamentos delgados, cortos, ramificados, algunos segmentados Gram +
C29-3(2)		Colonia beige, suave e irregular		Filamentos delgados, largos, ramificados, algunos segmentados Gram +
C29-3(5)		Colonia beige, suave, irregular		Filamentos delgados, largos, ramificados, Gram +
C44-3(1)		Colonia beige, dura, irregular, esporulación blanca		Filamentos delgados, largos, ramificados, Gram +
C49-3(1)		Colonia blanca, dura, firme, circular		Filamentos delgados, largos, ramificados, algunos segmentados Gram +

C57-3(1)		Colonia blanca, suave, circular, elevada		Filamentos delgados, largos, ramificados, algunos segmentados Gram +
C57-3(2)		Colonia beige, dura, elevada		Filamentos delgados, largos, algunos segmentados Gram +
C57-4(2)		Colonia blanca, dura, plana		Filamentos delgados, largos, ramificados, Gram +
C61-6(1)		Colonia café claro, con esporulación verdosa, dura, puntiforme		Filamentos delgados, largos, ramificados, Gram +
C61-6(2)		Colonia beige, suave, elevada		Filamentos delgados, largos, ramificados, Gram +
C101-4(1)		Colonia amarilla claro, irregular, suave		Filamentos delgados, largos, ramificados, Gram +
C101-4(2)		Colonia roja, dura, irregular		Filamentos delgados, largos, ramificados, Gram +
C105-3(1)		Colonia blanca, suave, algodonosa		Filamentos delgados, largos, ramificados, Gram +

C105-3(2)		Colonia beige con esporulación blanquecina, dura, irregular		Filamentos delgados, cortos, ramificados, Gram +
C105-3(3)		Colonia beige, suave, circular, elevada		Filamentos delgados, cortos, segmentados, Gram +
C109-5(1)		Colonia beige, suave, circular, elevada		Filamentos delgados, largos, ramificados, Gram +
C109-5(2)		Colonia blanca grisácea, dura		Filamentos delgados, largos, ramificados, algunos segmentados Gram +
C121-3(1)		Colonia beige, dura, elevada, irregular		Filamentos delgados, largos, ramificados, algunos segmentados Gram +

En general, se clasificaron los morfotipos encontrados en base al color que presentaron, en donde, los aislados de color beige fueron los más dominantes con un 49%, siguiendo los de color blanco con un 24%, después los cafés con un 12%, los rosas con un 9%, los rojos con un 3% y los amarillos con un 3%.

8.1.1. Crecimiento en diferentes medios de cultivo

Los aislados obtenidos fueron sembrados en Agar extracto de malta y avena suplementado con nistatina, en donde el agar extracto de malta fue el medio óptimo para un buen crecimiento de todas las cepas aisladas, mientras que en avena fue un poco más lento y moderado, sin embargo, hubo una mayor producción de metabolitos secundarios y color (Figura 5). En las diferentes cepas la textura variaba, sin embargo, todas ellas parecían estar adheridas al medio de cultivo de forma fuerte o moderada. Al inicio del crecimiento todas las cepas presentaban diversas variaciones en su color y a medida de que pasaba el tiempo de incubación se volvían de color oscuro y algunas se volvían más suaves. Se observó que el color variaba de acuerdo al medio donde se encontraban, siendo en el medio de avena donde encontrábamos mayor intensidad en los colores e intensidad en aquellas colonias negras. La inoculación en estos dos medios tan distintos permitió observar una amplia diversidad morfológica en las cepas recuperadas de la rizosfera de plantas de maíz.

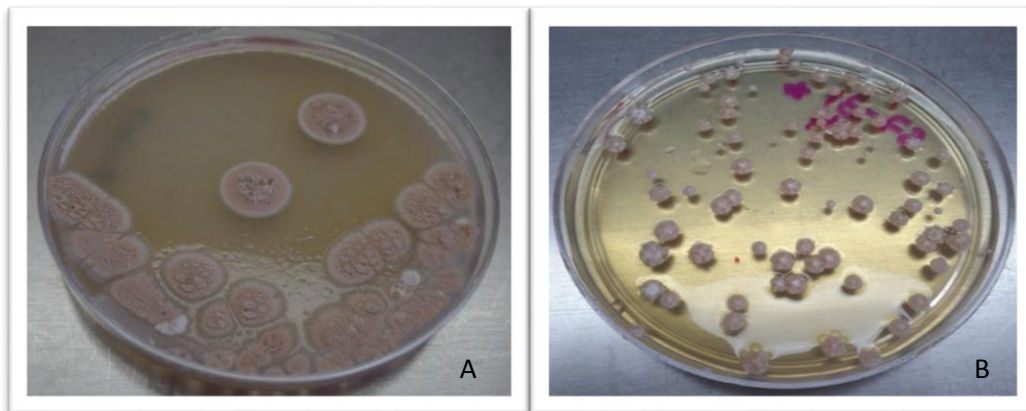


Figura 4. Macroscopía de cepa 57-31, en donde se observa su crecimiento en agar avena (A), y agar extractos de malta (B).

8.1.2.Diversidad

Después de haber obtenido todos los aislados de las muestras de suelo rizosferico, la diversidad fue evaluada en dos periodos de tiempo (3 y 6 semanas) (tabla 5). En esta etapa pudimos apreciar la diferencia en la morfología de las cepas aisladas en ambos periodos, en donde a las 3 semanas encontramos colonias duras, adheridas al medio, con coloración y mayor diversidad, sin embargo, a las 6 semanas observamos una homogeneidad en las colonias encontradas, ya que la mayoría eran de color blanquecino, suaves y con una evidente producción de metabolitos secundarios.



Tabla 5. Diversidad de las colonias aisladas de actinomicetos separándolas por tratamiento, procedencia del inóculo y tiempo de cosecha.

Después de haber analizado y comparado la diversidad en los distintos tratamientos pudimos observar que esta disminuyo al aumentar el tiempo de vida de la planta (Figura 5).

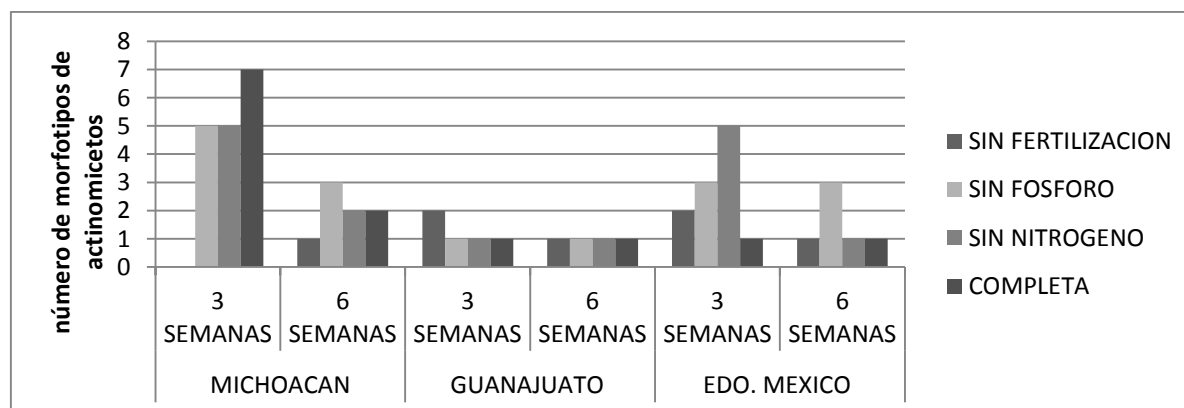


FIGURA 5. Numero de morfotipos encontrados en cada tratamiento.

8.1.3. Abundancia

Después de evaluar los diferentes tratamientos en los dos diversos tiempos de cosecha se observó que las UFC's encontradas aumentaron al incrementar el tiempo de vida de la planta en la mayoría de los casos (Tabla 6), y no existieron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de fertilización (Figura 6).

Tabla 6. UFC's encontrados por inoculo, tiempo de siembra y tratamiento de fertilización, los resultados se contabilizaron a partir de una dilución 10^{-3} .

TRATAMIENTOS	MICHOCAN				GUANAJUATO				EDO. MEXICO			
	3 SEMANAS		6 SEMANAS		3 SEMANAS		6 SEMANAS		3 SEMANAS		6 SEMANAS	
	Ufc's/gr hum	suelo	Ufc's/gr hum	suelo	Ufc's/gr hum	suelo	Ufc's/gr hum	suelo	Ufc's/gr hum	suelo	Ufc's/gr hum	suelo
SIN FERTILIZACION	0		40000		20000		10000		20000		30000	
SIN FOSFORO	70000		6200000		30000		40000		60000		2500000	
SIN NITROGENO	60000		2900000		20000		10000		50000		20000	
COMPLETA	80000		2800000		20000		20000		20000		10000	

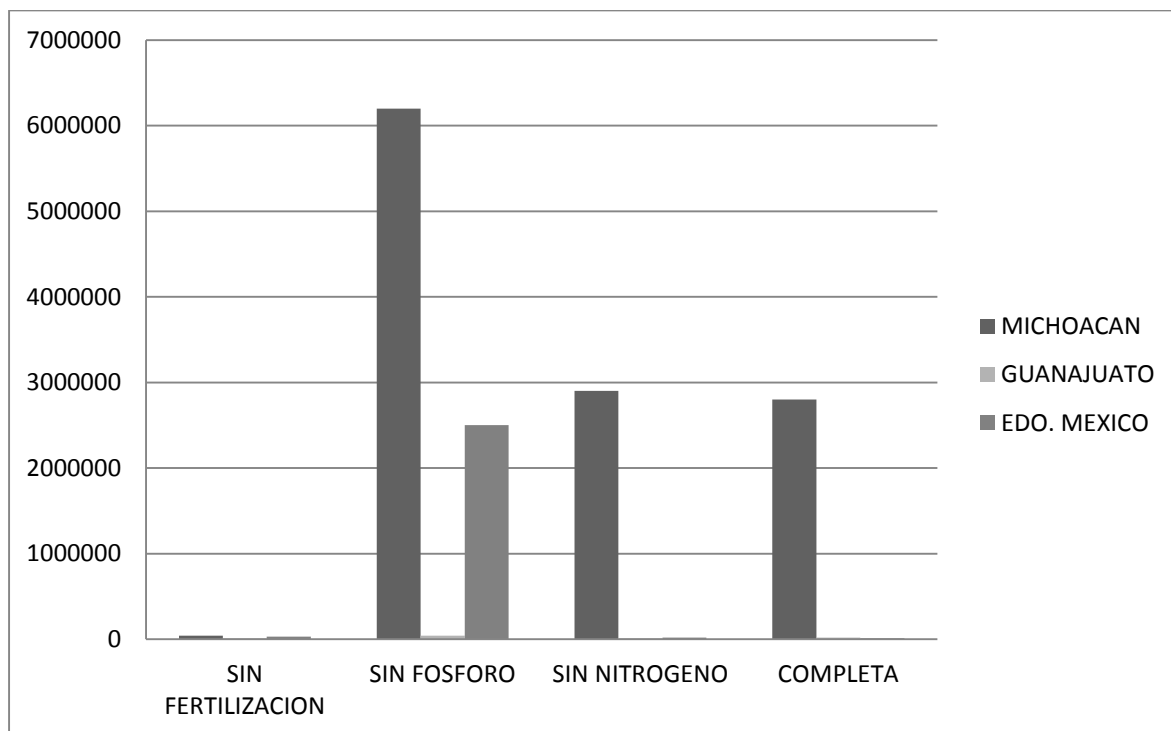


Figura 6. Tiempo 6 semanas. Representación de unidades formadoras de colonias sobre gramo de suelo húmedo en cada tratamiento.

Al realizar el análisis de varianza de las variables evaluadas se tomó cada tratamiento de fertilización como una repetición (Figuras 7 y 8). Podemos ver diferencias significativas en la abundancia de ufc's encontradas en el estado de Michoacán la cual fue mayor comparada con el Edo. de México y el estado de Guanajuato en el cual la cantidad de ufc's era muy baja.

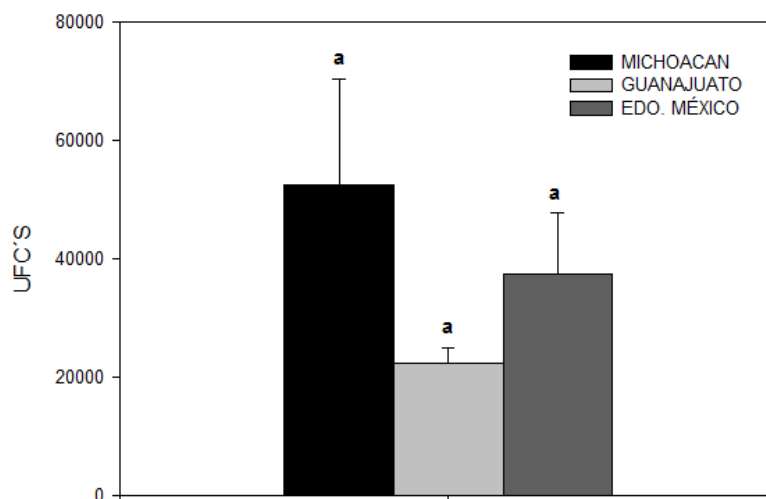


Figura 7. Tiempo 3 semanas. Representación de unidades formadoras de colonias por gr de suelo húmedo en comunidades estudiadas.

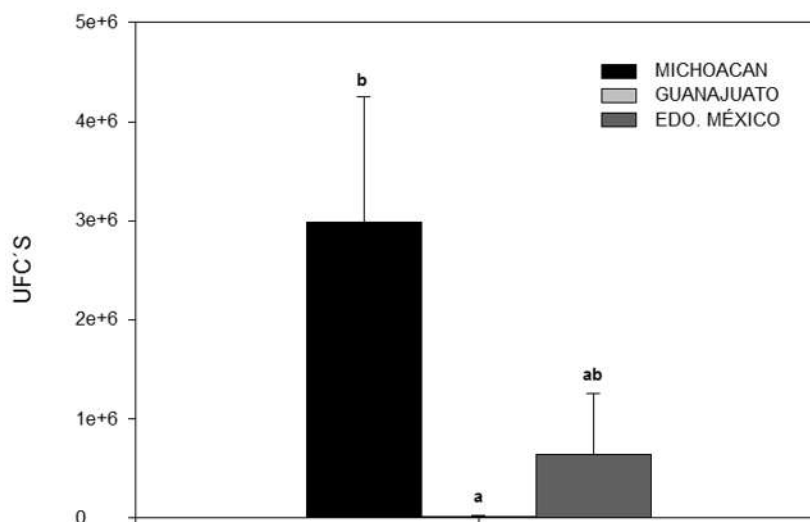


Figura 8. Tiempo 6 semanas. Representación de unidades formadoras de colonias sobre gramo de suelo húmedo en comunidades.

8.1.4. Estimación de la biomasa de actinomicetos mediante biomarcadores de ácidos grasos.

En el análisis de varianza para la estimación de la biomasa de actinomicetos mediante biomarcadores de ácidos grasos se encontraron resultados similares a los mostrados en la evaluación de ufc's, en donde en las variables evaluadas se puede observar que no existieron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de fertilización, sin embargo, si las hubo en las tres diferentes comunidades evaluadas, mostrando un incremento en el biomarcador C17:0_methyl (Figura 9) en el estado de Michoacán comparado con los estados de Guanajuato y México.

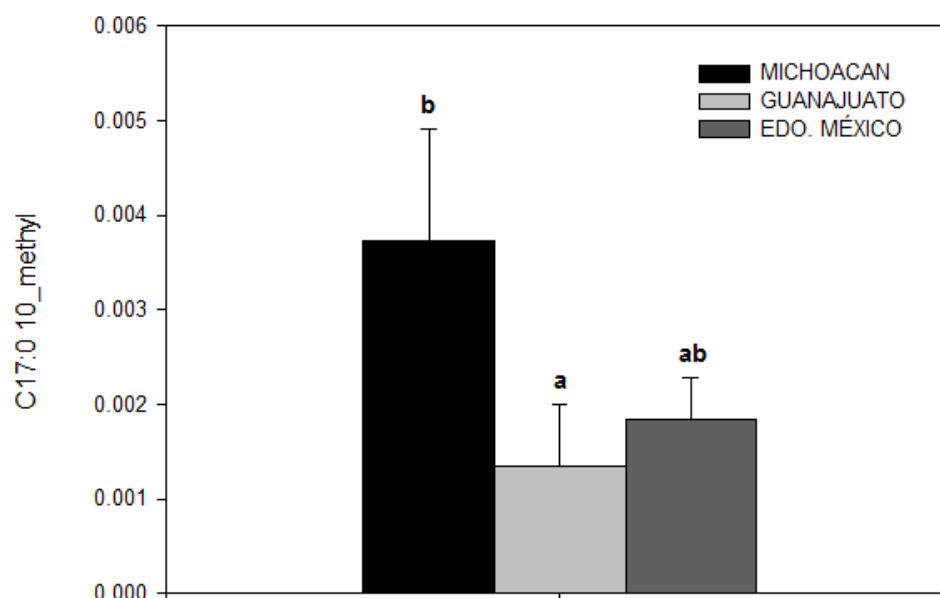


Figura 9. Representación de ácidos grasos metilados C17:0 en inóculos rizosfericos .

8.2. FASE 2. Capacidad de solubilización de fósforo y su efecto en la estimulación del crecimiento del maíz.

En esta segunda fase se evaluaron cada uno de los aislados obtenidos en la fase anterior, poniendo a prueba su capacidad de solubilizar fosforo in vitro, a partir de esta prueba se decidió utilizar la cepa 109-52 y 21-34 (solubilizadoras in vitro), así como las cepas 13-51 y 57-32 (no solubilizadoras in vitro) en un experimento en invernadero con plantas de maíz y se observó cómo las 4 cepas de actinomicetos nativos tuvieron un efecto benéfico en la planta incrementando la altura y peso seco de la parte aérea.

8.2.1. Solubilización de fosforo

La actividad solubilizadora se observó con la formación de halos alrededor de la colonia en las placas de agar (figura 10).

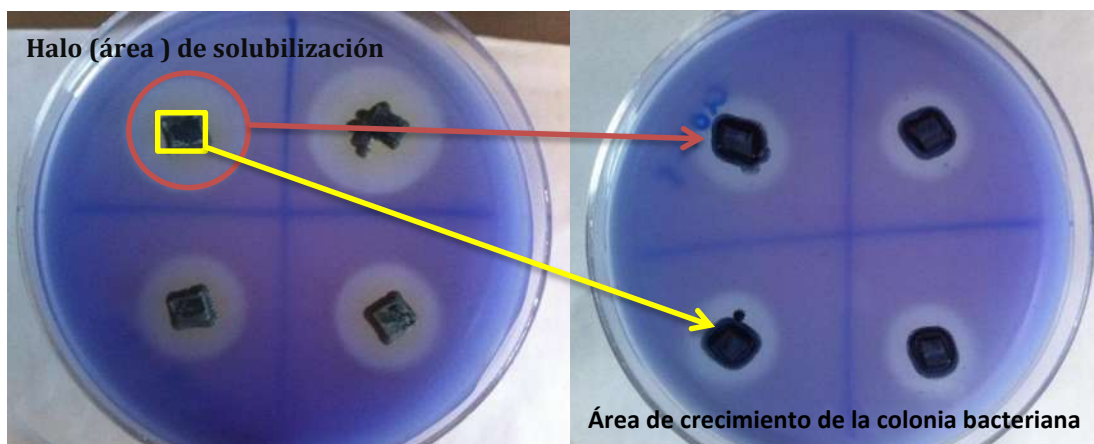


Figura 10. Medio de cultivo Medio NBRIP-BPB que muestra la solubilización de fosfato por un actinomiceto.

Los 35 aislados obtenidos se evaluaron y solo el 57.5% mostraron actividad solubilizadora (tabla 3). Cabe señalar que la tabla 3 solo refleja resultados de aquellos actinomicetos que presentaron esta capacidad de solubilización in vitro y se descartaron a aquellos que no mostraron tenerla.

Tabla 7. Eficiencia relativa de solubilización por parte de los aislados de Actinomicetos

CEPA	Promedio diámetro de cepa (mm)	Promedio diámetro de halo (mm)	% Eficiencia Relativa de Solubilización (ERS)
5-4(2)	0.61	0.66	108.16
57-3(2)	0.80	0.90	112.50
101-4(2)	0.88	1.50	171.43
17-3(1)	0.88	0.98	111.43
61-6(1)	0.65	0.75	115.38
29-3(2)	0.83	0.93	112.12
21-3(4)	0.63	1.63	260.00
101-4(1)	0.60	0.88	145.83
9-3(3)	0.53	0.73	138.10
109-5(2)	0.55	1.15	209.09
9-3(1)	0.55	0.75	136.36
29-3(5)	0.43	0.56	132.35
21-3(2)	1.00	2.20	220.00
109-5(1)	0.98	1.83	187.18
9-3(5)	0.68	0.78	114.81
25-3(1)	0.83	1.28	154.55
57-3(1)	0.53	0.63	119.05
21-3(1)	0.75	1.95	260.00

A partir de estos resultados se decidió utilizar las cepas 109-52 y 21-34, que mostraron tener una ERS alta y morfológicamente son distintas.

8.2.2. Evaluación de promoción de crecimiento

Las plantas fueron cosechadas 6 semanas posteriores a su siembra. Se observaron diferencias significativas en donde aquellas plantas que estaban inoculadas con actinomicetos eran más grandes y gruesas, comparándolas con el control. El análisis de varianza para el peso seco de la parte aérea y radicular, así como el pH de suelo rizosferico se resume como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Valores de probabilidad de (*P*) a partir del análisis de varianza del desempeño vegetal, bajo distintos tipos de fertilización con fosforo y cepas de actinomicetos empleadas como factor principal. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

	Peso seco parte aérea	Peso seco parte radicular	Raíz/Tallo	Total
Fosforo	***	***	***	***
Actinomiceto	***	**	**	***
P X Ac	***	*	**	*

P=Fosforo; Ac=Actinomiceto

En los resultados mostrados podemos ver que en el peso seco de la parte aérea hubo diferencias significativas entre aquellos tratamientos que fueron inoculados con actinomicetos, no hubo diferencias entre ellos, es decir, entre los dos actinomicetos que solubilizaron in vitro y los dos que no lo hicieron, sin embargo, comparados con el control tuvieron un mayor peso y altura (figura 11). En el peso seco de la parte radicular no hubo diferencias significativas. Respecto al pH se observó que este disminuyó con los tratamientos inoculados con actinomicetos comparados con aquellos que no fueron inoculados.

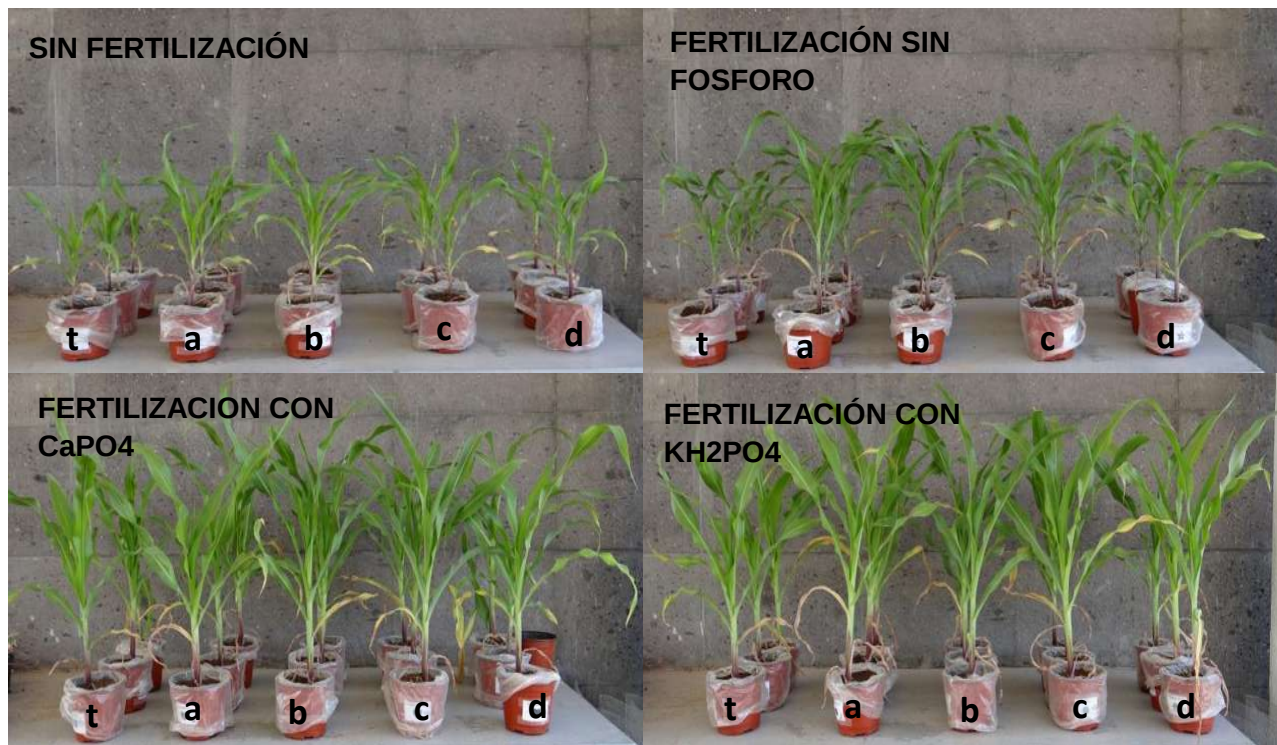


Figura 11. Plantas de maíz inoculadas con cepas nativas de actinomicetos y testigo fertilizadas con diferentes fuentes de fósforo. (t) Testigo sin inocular; (a) cepa 109-52; (b) cepa 21-34; (c) cepa 13-51; (d) cepa 57-32.

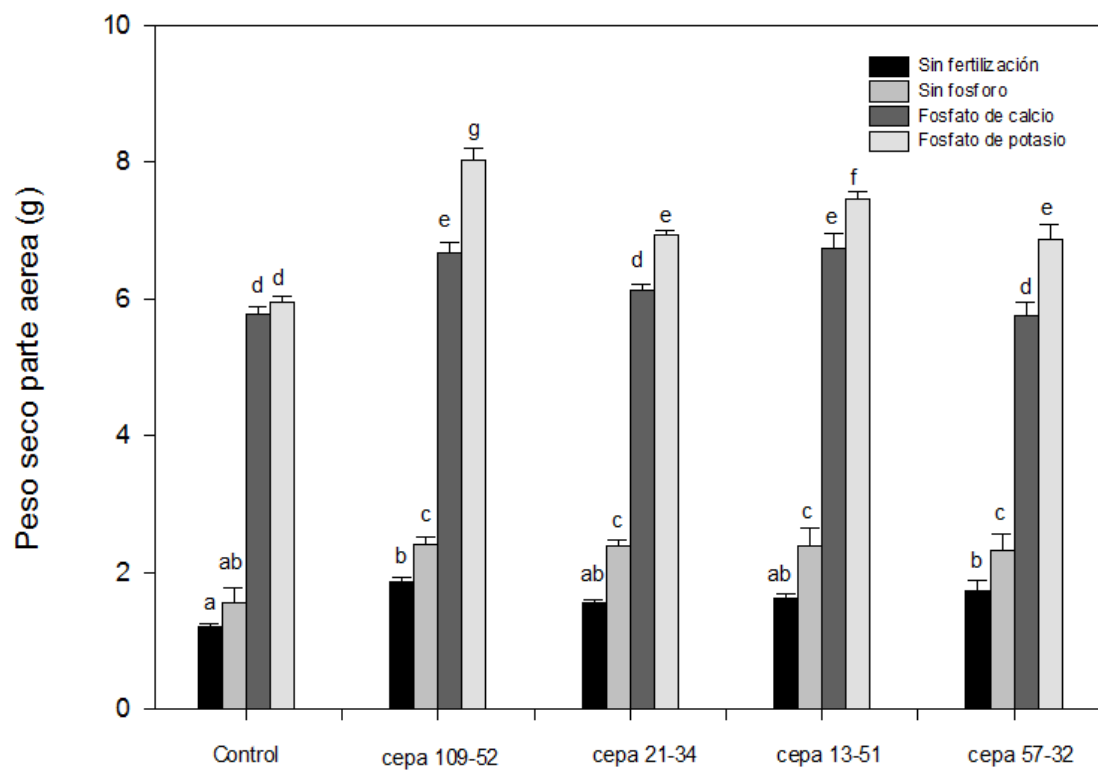


Figura 12. Peso seco parte aérea de plantas de maíz de 6 semanas representado en gramos, en base a cada tratamiento usado, el análisis estadístico utilizado fue LSD con valor-P 0.000, n=5 y un nivel del 95.0% de confianza.

Se observó que las 4 cepas de actinomicetos empleadas incrementaron mayormente el peso seco de la parte aérea en los tratamientos con KH_2PO_4 , sin fósforo y sin fertilización respecto al tratamiento en donde se fertilizó con CaPO_4 (Figura 12).

Respecto a la evaluación del peso seco de la parte radicular no se observaron diferencias significativas entre tratamientos (figura 13).

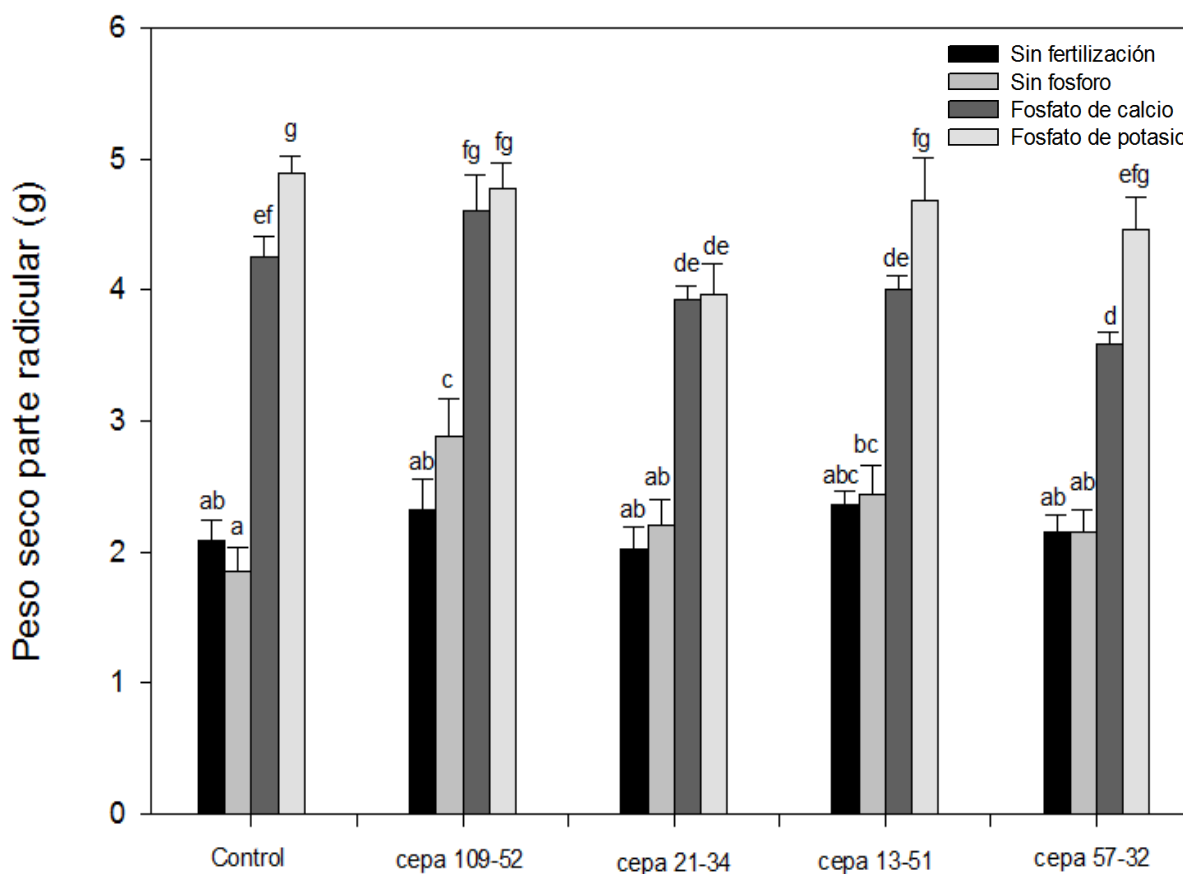


Figura 13. Peso seco parte radicular de plantas de maíz de 6 semanas representado en gramos, en base a cada tratamiento usado, el análisis estadístico utilizado fue LSD con valor-P 0.000, n=5 y un nivel del 95.0% de confianza.

Se realizó un análisis de varianza en donde se evaluó la relación raíz/tallo de la planta (Figura 14), en donde se puede observar la disminución en la translocación de energía hacia la parte radicular en aquellos tratamientos que fueron fertilizados con fósforo, a diferencia de aquellos tratamientos sin la administración de este elemento en donde, el aporte fue mayor hacia la parte radicular.

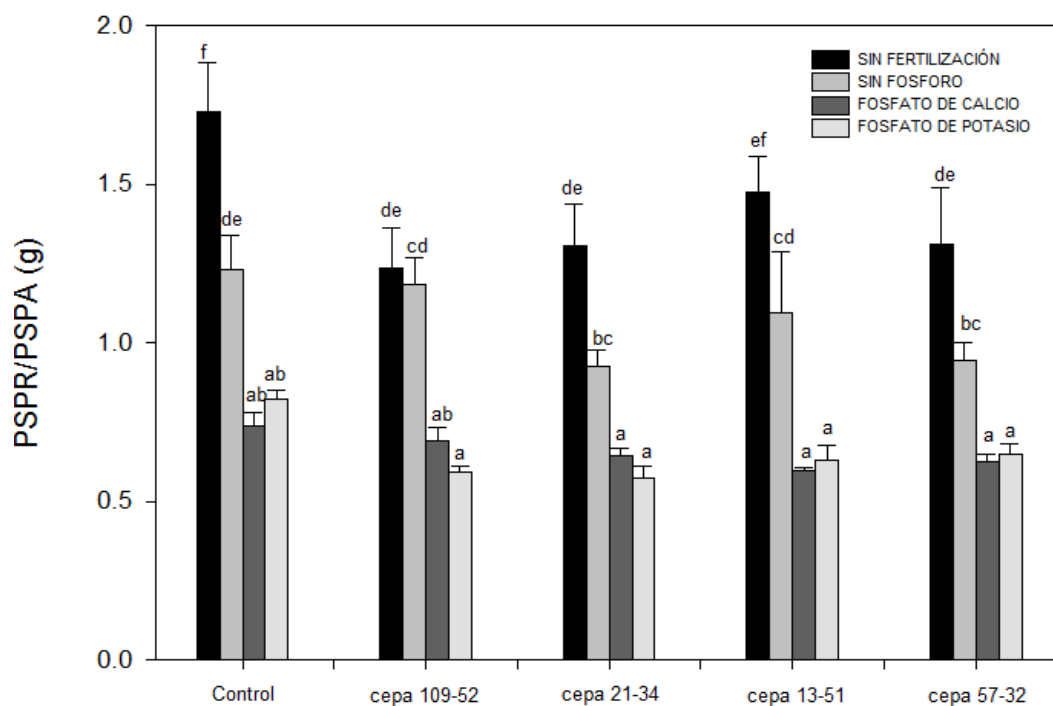


Figura 14. Peso seco parte radicular/ peso seco de parte aérea de plantas de maíz de 6 semanas representado en gramos, en base a cada tratamiento usado, el análisis estadístico utilizado fue LSD con valor-P 0.000, n=5 y un nivel del 95.0% de confianza.

8.2.3. Evaluación de pH

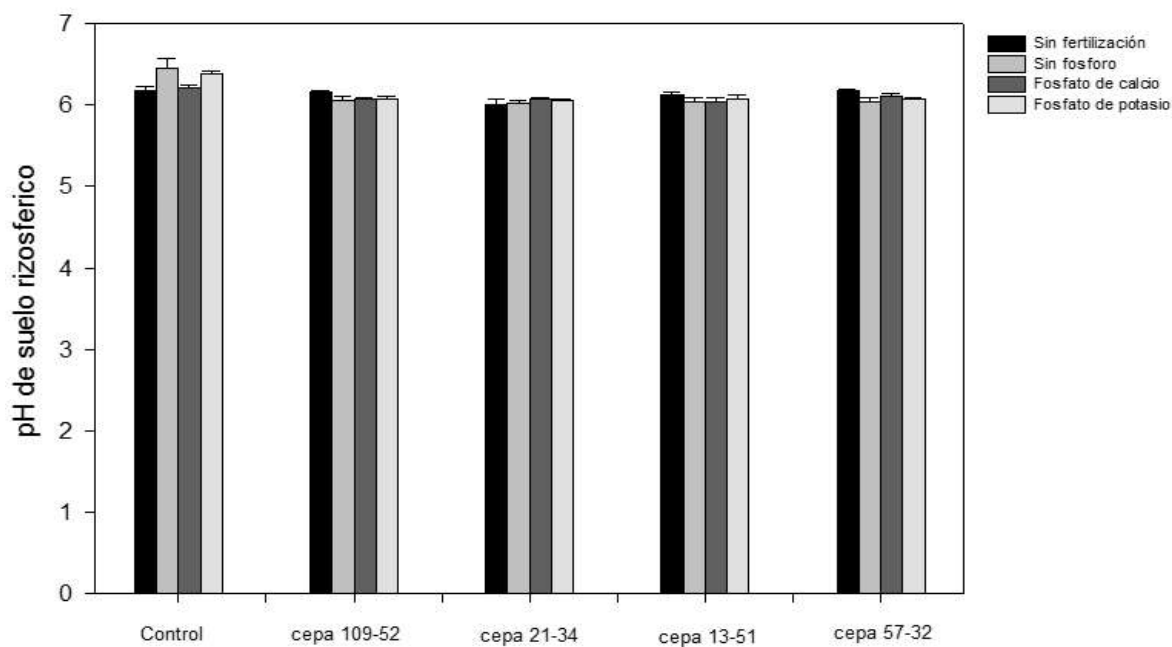


Figura 15. pH de suelo de plantas de maíz de 6 semanas, en base a cada tratamiento, usado el análisis estadístico utilizado fue LSD con valor-P 0.000, n=5 y un nivel del 95.0% de confianza.

Se mostró una disminución del pH en suelo rizosferico en aquellos tratamientos que habían sido inoculados con las cepas de actinomicetos nativos respecto al control, todos los tratamientos se mantuvieron en un rango de pH de 5.9 a 6.9. (Figura 15).

9. DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó la abundancia y diversidad de actinomicetos nativos en la rizósfera de maíz bajo diferentes tratamientos de fertilización, así como la capacidad que tienen estas poblaciones nativas de promover el crecimiento vegetal.

Abundancia

Los actinomicetos son bacterias filamentosas Gram positivas que se encuentran ampliamente distribuidas en el medio ambiente. La mayoría de los suelos contienen entre 10^9 y 10^{10} microorganismos por gramo (Madigan et al, 2004), las bacterias del tipo Actinomicetos llegan a representar entre 10^4 y 10^6 individuos por gramo, (Sylvia et al, 1999). En este estudio existieron varias respuestas en la densidad de actinomicetos aislados, encontrando hasta 6.2×10^5 ufc's/g en suelo rizósferico, en donde la abundancia fue mayor en el inoculo de Michoacán comparado con el estado de Guanajuato y México. En la evaluación de biomarcadores de ácidos grasos metilados para representar la biomasa de actinomicetos presentes se reafirmó el resultado ya mostrado en el conteo microbiano. Estos efectos pueden deberse al tipo de fertilización empleada en cada inoculo, como ha sido observado por Ge Y. y colaboradores (2008) en donde observaron que los regímenes de fertilización a largo plazo pueden afectar la estructura de las comunidad bacteriana y su abundancia. En su estudio los tratamientos de materia orgánica y PK revelaron una riqueza distinta entre las comunidades de cada tratamiento. Sin embargo, al incorporar diferentes tipos de fertilizantes a cada inoculo evaluado en nuestro estudio no existió ninguna diferencia en la densidad de actinomicetos nativos encontrados en la rizósfera. Diversos estudios afirman que factores importantes como la humedad relativa, pH, disponibilidad de nutrientes en el suelo, abundancia de materia orgánica y temperatura, son aspectos que controlan la densidad de estos microorganismos (Ventura et al., 2007).

Otra respuesta en este estudio se observó al existir un incremento en la abundancia de actinomicetos nativos al ir aumentando el tiempo de vida de la planta, lo cual, puede deberse a que los microorganismos utilizan primeramente aquellos compuestos aptos como recursos energéticos y nutrientes esenciales aumentando rápidamente su población. De acuerdo con Bastardo (1989) las bacterias inician el ataque al sustrato aumentando notablemente en número, lo que a su vez refleja una mayor expresión de su capacidad

para utilizar los diferentes sustratos que componen el esqueleto vegetal, después las bacterias disminuyen en número, producto de la competencia por el sustrato por otras poblaciones más competentes.

Diversidad

Los actinomicetos son bacterias cosmopolitas que presentan una amplia variabilidad morfológica. En este estudio se observó una diversa cantidad de morfotipos entre los tres inóculos evaluados, lo cual concuerda con lo mencionado por Zornoza y col. (2009) quienes discuten que las características medio ambientales y del suelo influyen directamente sobre la diversidad de las comunidades bacterianas. Al realizar una comparación entre los morfotipos encontrados en cada inóculo pudimos observar que la composición de las especies eran en su mayoría diferente entre sí, aunque se encontró un morfotipo compartido en los tres inóculos estudiados el cual fue abundante comparado con los demás morfotipos, Xu *et al.* (1996) estudiaron la diversidad y las características biológicas de actinomicetos acuáticos en 12 lagos del "Middle Plateau" de Yunnan en China, aislando 60 géneros diferentes, siendo *Micromonospora* el más dominante, seguido por *Streptomyces*. Correlacionado con esto, Hua-Li *et al.* (1996), también, estimaron la diversidad de actinomicetos en suelos de la misma región china por medio del aislamiento y enumeración en medios de cultivo de enriquecimiento. Reportaron una mayor diversidad en suelos bajo bosque primario, seguida por suelos bajo bosque secundario y, finalmente, por granjas cultivadas con vegetales. El género *Streptomyces* fue el más importante, representando el 90% de la diversidad total, lo que puede explicar la presencia y dominancia de este morfotipo encontrado en nuestros inóculos. Por otro lado, se observó una sucesión microbiana al aumentar el tiempo de vida de la planta, en donde, se observó una disminución en el número de morfotipos de actinomicetos nativos encontrados Moreno () plantea que esto puede deberse a que el tipo de nutrientes disponibles se va haciendo más escaso con el paso del tiempo, promoviendo el desarrollo de solo aquellas especies capaces de utilizar polímeros de difícil degradación, lo que favorecería la actividad y diversificación en términos de riqueza de géneros de actinomicetos altamente competitivos.

Actinomicetos solubilizadores de fósforo

Es conocido que el fósforo es uno de los nutrientes más requeridos por las plantas y microorganismos, y en el suelo es uno de los factores limitantes del desarrollo vegetal. La disponibilidad del fósforo depende de muchos factores como los minerales presentes en el suelo, el pH, la actividad microbiológica, la producción de enzimas y ácidos orgánicos y la

intensidad de la demanda de nutriente. Por lo tanto los microorganismos son esenciales para asegurar un mejor y mayor uso del fósforo en el suelo. El propósito principal del uso de actinomicetos solubilizadores de fosfato en este estudio es optimizar la disponibilidad para la planta de dicho elemento en el suelo, lo que por consecuencia da un incremento en el rendimiento vegetal cambiando las formas insolubles en solubles. Se han descrito mecanismos para la solubilización de fósforo como la producción de ácidos orgánicos y fosfatasas, y los actinomicetos pueden actuar por estas dos vías. En esta fase fue posible observar la capacidad de los actinomicetos de solubilizar fósforo inorgánico *in vitro* en donde casi el 60% de los aislados fue capaz de hacerlo. Se conoce que algunos microorganismos pueden solubilizar fósforo en condiciones de laboratorio pero no son capaces de hacerlo en el suelo, lo cual se observó al inocular dos cepas solubilizadoras *in vitro* y dos no solubilizadoras en plantas de maíz, en donde no se observó ningún efecto en el favorecimiento del crecimiento vegetal en la planta entre los cuatro inóculos evaluados, sin embargo comparados con el control los cuatro aislados demostraron tener un efecto evidente en la promoción de crecimiento vegetal. Lo cual es de considerar ya que solo los ensayos de campo establecen si la capacidad solubilizadora de fósforo inorgánico de los organismos seleccionados *in vitro* tiene efecto sobre las plantas Nautiyal (1999).

Efecto de actinomicetos en el desempeño vegetal

En este estudio se han demostrado los beneficios de la inoculación de cepas de actinomicetos sobre la promoción de crecimiento vegetal, las cuales demostraron incrementar la longitud y peso de la parte aérea, por lo que se puede pensar que la intervención de procesos como la solubilización de fósforo, fijación de nitrógeno atmosférico, la producción de sideróforos o de fitohormonas pueden ser los mecanismos determinantes para evaluar la actividad de estas rizobacterias, como menciona Franco Correa (2009), quien dice que los actinomicetos han demostrado ser microorganismos promisorios en la biofertilización promoviendo el crecimiento y nutrición de las plantas sin afectar a otros microorganismos rizosféricos manteniendo un equilibrio ecológico. En esta fase fue posible observar que las cepas que habían solubilizado fósforo *in vitro* no mostraron tener mayor promoción en el crecimiento vegetal comparadas con aquellas que no lo habían hecho, lo que sugiere que los actinomicetos desarrollaron otras funciones para mejorar la disponibilidad de nutrientes a la planta como puede ser la producción de sustancias reguladoras de crecimiento. Por otro lado se observaron diferencias entre aquellos tratamientos fertilizados con fósforo y aquellos en los que no se adicionó ninguna fuente de este elemento, en donde se vio un mayor incremento en el crecimiento vegetal

en aquellos tratamientos que fueron fertilizados con una fuente de fósforo soluble y en la ausencia de este comparados con el control. Oliviera *et al.* (2008) aislaron, seleccionaron y evaluaron la actividad solubilizadora de microorganismos en rizósfera de maíz en suelos brasileños, con el fin de encontrar potenciales bioinoculantes, ello identificaron los géneros *Bacillus* y *Burkholderia* sp., como mejores bacterias; *Kitasatospora*, como nuevo género de actinomicetos solubilizadores de fosfato, y *Aspergillus terreus* como mejor hongo solubilizador. Se observó que la translocación de energía fue mayor hacia la parte aérea que en las raíces en aquellos tratamientos con fósforo y en los tratamientos inoculados con actinomicetos sin fertilización fosforada paso lo mismo, al contrario de lo que se vio en aquellos tratamientos sin este elemento, en donde la planta destino mayor energía a la parte radicular, lo cual puede explicarse debido a una deficiencia del P en la planta por lo que se reduce el crecimiento, y en la medida en que una especie tenga mayor capacidad de acceder al fósforo, la deficiencia interna de P será menor y el crecimiento mayor. aérea Además se observó que el suelo inoculado con las cuatro cepas de actinomicetos presento un pH más ácido comparado con el control, este efecto puede deberse a la actividad microbiana en el suelo pues el testigo no registro ninguna disminución, lo que también sugiere que un pH más ácido puede ser más óptimo para el desarrollo de los actinomicetos utilizados, la disponibilidad de nutrientes o puede indicar que el mecanismo de las cepas de actinomicetos evaluadas para solubilizar fósforo es el de la formación ácidos, pues el ácido actúa como agente quelante para el calcio, aumentando la disponibilidad del fósforo (Nautiyal, 1999; Sylvia, 2005).

10. CONCLUSIONES

Los morfotipos de los actinomicetos nativos encontrados son distintos en los tres inóculos evaluados, sin embargo, se encontró un morfotipo compartido entre ellos y abundante. En general se demuestra que la fertilización mineral tiene un efecto sobre la diversidad y abundancia de actinomicetos nativos, debido a que encontramos especies únicas en cada tratamiento.

El tiempo fue un factor que influyó en la cantidad de morfotipos encontrados, ya que al aumentar el tiempo de vida de la planta disminuyó su diversidad.

La abundancia de actinomicetos incremento con el paso del tiempo y fue distinta en los inóculos estudiados.

Se estableció la capacidad de los actinomicetos nativos de solubilizar fosforo de manera in vitro, y de incrementar la longitud y el peso seco de la parte aérea, demostrando que esta población nativa puede ser utilizada para promover el crecimiento vegetal favoreciendo la productividad en los agroecosistemas.

11. REFERENCIAS

- **Alvarado M.** 2015. Caracterización de comunidades de hongos micorrízicos arbusculares en diferentes agroecosistemas de maíz (*Zea mays* L.)
- **Antoun, H. and J. W. Kloepper.** 2001. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). pp. 1477-1480. In: S. Brenner and J. H. Miller (eds.). Encyclopedia of genetics. Academic Press. New York, NY, USA.
- **Arshad, M. y W.T. Frankenberger Jr.** 1998. Plant growthregulating substances in the rhizosphere: Microbial production and functions. Adv. Agron. 62: 45-151.
- **Azcón R.** 2000. "Papel de la simbiosis micorrízica y su interacción con otros microorganismos rizosféricos en el crecimiento vegetal y sostenibilidad agrícola". En: Alarcón A., Ferrera Cerrato R.; (eds). Ecología, Fisiología y Biotecnología de la Micorriza arbuscular. Colegio de Posgraduados, Ediciones Mundi Prensa, Montecillo, México, pp. 1-15
- **Azcon-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, J.M. y C. Azcón-Aguilar.** 1982. La Rizosfera: Interacciones microbio-planta. Anales de Edafología y Agrobiología XII (7-8): 1517-1532.
- **Barea, JM.** 2004. Impacto de las micorrizas en la calidad del suelo y la productividad vegetal en sistemas agrícolas y espacios naturales. En: Monzón de Asconegui MA, García de Salamone, IE, Miyazaki SS (eds.). Biología del suelo. Transformaciones de la materia orgánica, usos y biodiversidad de los organismos edáficos. Editorial FAUBA, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. pp. 7-11.
- **Bashan Y, Holguin G, de-Bashan LE.** 2004. Azospirillum plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). Canadian Journal of Microbiology 50:521-577.
- **Berdy J.** 2004. Bioactive microbial metabolites. J. Antibiot; 58; 1-26
- **Bergey J, Hendricks D, Holt J.** 2000. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Novena edición.
- **Caballero Mellado, J.** 2004. Uso de Azospirillum como alternativa tecnológica viable para cultivos de cereales. En: Monzón de Asconegui MA, García de Salamone, IE, Miyazaki SS (eds.). Biología del suelo. Transformaciones de la

materia orgánica, usos y biodiversidad de los organismos edáficos. Editorial FAUBA, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. pp. 45-49

- **Canet, R.** 2000. Los índices de actividad biológica como herramienta de diagnóstico de la fertilidad del suelo en agricultura ecológica. En: Investigaciones y perspectivas de la enzimología de suelos en España. España: Centro de Edafología y Biología Aplicada Segura, 352 p.
- **Cassán FD, García de Salamone IE.** 2008. *Azospirillum* sp.: Cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Asociación Argentina de Microbiología. Buenos Aires.
- **Chanway, C.P.** 1997. Inoculation of tree roots with plant growthpromoting soil bacteria: An emerging technology for reforestation. *For. Sci.* 43: 99-112.
- **Chanway, C.P., R.K. Hynes y L.M. Nelson.** 1989. Plant growthpromoting rhizobacteria: Effects on growth and nitrogen fixation of lentil (*Lens esculenta* Moench.) and pea (*Pisum sativum* L.). *Soil Biol. Biochem.* 21: 511-517.
- **Clegg, C.** 2006. Impact of cattle grazing and inorganic fertilizer additions to managed grasslands on the microbial community composition of soils. *App. Soil Ecol.* 31:73-82.
- **Ferraris G, Courerot L.** 2004. Evaluación de la utilización de bacterias solubilizadoras de fósforo (*Pseudomonas* spp) en trigo. *Revista de Tecnología Agropecuaria* 9:37-39.
- **Franco-Correa, M.** 2008. Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Tesis Doctoral, Director: Dr. José Miguel Barea N. Departamento de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. pp. 266
- **Ge, Y., J.B. Zhang, L.M. Zhang, M. Yang, y J.Z. He.** 2008. Longterm fertilization regimes affect bacterial community structure and diversity of an agricultural soil in northern China. *J Soils Sed.* 8:43–50
- **Heuer, H., M. Krsek., P. Baker., K. Smalla & E. Wellington.** 1997. Analysis of Actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3233-3241.
- **Hoffland, E., P.A.H.M. Bakker y V.L.C. Loon.** 1997. Multiple disease protection by rhizobacteria that induce systemic resistance-reply. *Phytopathol.* 87: 2, 138.

- **Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Stanley, J. T. y Williams, ST.** 1994. Bergey's Manual of determinative bacteriology. 9th Edition. The Williams y Wilkins Co. Baltimore, Maryland. USA. 532p.
- **Hua-Li, X., L. Qi-Ren & J. Cheng-Lin.** 1996. Diversity of soil Actinomycetes in Yunnan China. Appl. Environ. Microbiol. 6: 244-248.
- **Kennedy, A. & K. Smith.** 1995. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. Plant Soil 170: 75-86.
- **Kennedy, A. C.,** 2005, Rhizosphere, in: *Principles and Applications of Soil Microbiology*, D.M., Sylvia, J.J., Fuhrmann, P.G., Hartel, and D.A., Zuberer, eds., 2nd ed. Pearson, Prentice Hall, New Jersey, pp.242-262.
- **Kloepper, J. y Ch. Beauchamp.** 1992. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. Canadian Journal of Microbiology 38: 1219-1232.
- **Kloepper, j.w & schroth,** 1978. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. In: Proc. Internat. Conf. Plant Pathog. Bact. 4th, vol 2, Angers, France
- **Koneman, E., Allen, S., & Schreckenberger, P.** 2001. Diagnóstico Microbiológico (Quinta edición ed.). Washington: Médica Panamericana.
- **Krupa S.W. & Dommergues Y.K.** 1981. Ecology of root pathogens; 2da.ed. Elsevier scientific publishing company. EEUU.
- **Kumar, V. y Narula.** 1999. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergente of wheat as affected by Azotobacter chroococum mutans. Biol. Fertil. Soils. 28: 301-305
- **Lifshitz, R, J.W. Kloepper y M. Kozlowski.** 1987. Growth promotion of canola (repeseed) seedlings by a strain of Pseudomonas putida under gnotobiotics conditions. Can. J. Microbiol. 3: 390-395.
- **McNeil MJ, Brown J.** 1994. The medically important aerobic actinomycetes: Epidemiology and Microbiology. Clin. Microbiol. Reviews; 7(3): 357-417
- **Naiman AD, Latronico AE, García de Salamone IE.** 2009. Inoculation of wheat with Azospirillum brasilense and Pseudomonas fluorescens: impact on the production and rhizospheric microflora. European Journal of Soil Biology 45:44-51.
- **Nautiyal, C. S.** 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate-solubilizing microorganisms. FEMS Microbiology Letters 170: 265 – 270.
- **Olalde P.V. & Aguilera L.L.** 1998. Microorganismos y Biodiversidad. Terra. 16: 289-292.

- **Pinton, R., Varanini, Z., and Nannipieri, P.** 2001, The rhizosphere as a site of biochemical interactions among soil components, plants and microorganisms, in: *The Rhizosphere. Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface*, Pinton, R., Varanini, Z. and Nannipieri, P., eds., Marcel Dekker, N.Y., pp. 1-17.
- **Prescott.** 2004. Microbiología. McGraw-Hill Interamericana, Madrid. 5ª edición. pp 1-17
- **Reed MLE, Glick BR.** 2004. Applications of free living plant growthpromoting rhizobacteria. *Antonie van Leewenhoek* 86:1-25.
- **Reyes I, Alvarez L.** 2008. Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. *Bioagro.* 1316-3361
- **Rodríguez, C.** 2002. Las micorrizas. En: First International meeting on microbial phosphate solubilization. Abstracts. España. p. 36.
- **Serrano, José A ,Sandoval Trujillo, A.H.** 1992. “Manual de Laboratorio para el Estudio de los Actinomicetales Patógenos”. 1ª ed. Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela; p. 18-19.
- **Sylvia D.M.** 1999. Principles and aplications of soil microbiology.UnitedStates of America. Hall Inc. 480p
- **Thomson B, Ostle N, McNmara N, Bailey M, Whiteley A, Griffiths R.** 2010. Vegetation affects the relative abundances of dominant soil bacterial taxa and soil respiration rates in an upland grassland soil. *Microbial Ecology* 59:335-343.
- **Titus A, Pereira GN.** 1999. The role of Actinomycetes in coffe plantation ecology. [Online] <http://www.ineedcoffe.com/05/actinomycetes/print.asp>. Acceso 21 de Enero de 2008.
- **Tokala K, Stramp C, Jung D, Cradford L, Salove L, Deobald F, Bailey J, Morra J.** 2002. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum satuvum*). *Applied and Enviromantal Microbiology.* 50:1435-1440.
- **Vargas Gil S., S. Pastor y G.J. March.** 2009. Quantitative isolation of biocontrol agents *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. and Actinomycetes from soil with culture media. *Micr. Res.* 164: 196-205
- **Ventura, M., Canchaya, A., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G., Chater, K. & Sinderen, D.** 2007. Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* Alemania. (71): 495–548.

- **Vera D., F., H. Pérez, y H. Valencia.** 2002. Aislamiento de hongos solubilizadores de fosfatos de la rizósfera de arazá (*Eugenia stipitata*, Myrtaceae). Acta Biol. Colomb. 7: 33–40.
- **Williams, S.T., Lanning, S. y Wellinton, E.M.H.** 1984. Ecology of Actinomycetes, p. 481-528. In M. Goodfellow, M. Mordarky and ST Williams (ed), The biology of the actinomycetes. Academic Press Ltd., London, United Kingdom.
- **Wu, F., M. Dong, Y. Liu, X. Ma, L. An, J.P.W. Young, y H. Feng.** 2011. Effects of long-term fertilization on AM fungal community structure and Glomalin-related soil protein in the Loess Plateau of China. Plant Soil 342:233–247.
- **Xu, L-H., Q-R. Li & C-L. Jiang.** 1996. Diversity of aquatic Actinomycetes in lakes of the Middle Plateau, Yunnan, China. Appl. Environ. Microbiol. 62: 249-253.
- **Zornoza, r., Guerrero, C., Mataix-solera, J., Scow, K. W., Arcenegui, V. & Mataixbeneyto, J.** 2009. Changes in soil microbial community structure following the abandonment of agricultural terraces in mountainous areas of Eastern Spain. Applied Soil Ecology 42: 315–323

