



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XÓCHIMILCO, División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Formato SS-T

**SOLICITUD DE TÉRMINO
DE SERVICIO SOCIAL**

Mtra. Maria Elena Contreras Garfias
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
PRESENTE

Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año
--------------------	-----	-----	-----	---------------------	-----	-----	-----

Datos del Alumno

Nombre : Peláez Rojas José Luis	
Matrícula : 2132036092	Licenciatura : Química Farmacéutica Biológica
Domicilio : Calle Bilbao N. ext. 487, Dpto E-303, Colonia San Nicolas Tolentino, C.P 09850	
Teléfono : 54434271	Celular : 5559306202
Correo Electrónico : joseluis.pelaezrojas@gmail.com	CURP : PERL940707HDFLJS08

Datos del Proyecto

Nombre del Proyecto : Caracterización de bacterias rizosféricas y endófitas productoras de sideróforos, aisladas de Echinocactus platyacanthus (biznaga dulce)							
Lugar donde se realizó el Servicio Social : edificio N, Laboratorio de Ecología Molecular (N-105)							
Dependencia : Universidad Autónomas Metropolitana Unidad Xochimilco							
Entidad Federativa : Distrito Federal							
Municipio : Coyoacán	Localidad :						
Fecha de Inicio	Día	Mes	Año	Fecha de Término	Día	Mes	Año
	28	5	2018		28	1	2019

PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES

Sector: 1.- Educativo	Tipo: 2.- Interno
Orientación: 10.- Otros	

FIRMAS

Dr. Hugo César Ramírez Saad 8642

Asesor Interno
Nombre, firma y No. Económico

Dra. Ma. Eugenia de la Torre Hernández 9900031

Asesor Externo
Nombre, firma y No. Económico

José Luis Peláez Rojas

Alumno
Nombre, firma

M. en C. Alma E. Ibarra Cázares 32807

Vo. Bo. de la Comisión
Nombre y firma de la persona que autoriza



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Ciudad de México a 7 de Julio de 2020

DR, ESTEBAN BARRANCO FLORIDO
Jefe del Departamento de Sistemas Biológicos
Presente.

Por medio de la presente me permito comunicar a usted que el (la) alumno(a):
Peláez Rojas José Luis __, con matrícula __2132036092__ concluyó el proyecto de
Servicio Social:

Caracterización de bacterias rizosféricas y endófitas productoras de sideróforos,
aisladas de *Echinocactus platyacanthus* (biznaga dulce).

Que se realizó en: Laboratorio de Ecología Molecular _____

Ubicado en: edificio N- laboratorio 105 _____

Del 28 de mayo de 2018 al 28 de enero de 2019 bajo mi asesoría,
cubriendo un total de 480 horas.

ATENTAMENTE

Dr. Hugo César Ramírez Saad
Prof. Titular C

UNIDAD XOCHIMILCO, Departamento de Sistemas Biológicos
Calz. del Hueso 1100, Edificio N, Col. Villa Quietud, Delegación Coyoacán, 04960 México, D.F.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Ciudad de México a 7 de Julio de 2020

DR, ESTEBAN BARRANCO FLORIDO
Jefe del Departamento de Sistemas Biológicos
Presente.

Por medio de la presente me permito comunicar a usted que el (la) alumno(a):
Peláez Rojas José Luis, con matrícula 2132036092 concluyó el proyecto de
Servicio Social:

Caracterización de bacterias rizosféricas y endófitas productoras de sideróforos,
aisladas de *Echinocactus platyacanthus* (biznaga dulce).

Que se realizó en: Laboratorio de Ecología Molecular

Ubicado en: edificio N-105:

Del 28 de mayo de 2018 al 28 de enero de 2019 bajo mi asesoría,
cubriendo un total de 480 horas.

ATENTAMENTE

*Ma. Eugenia
de la Torre*

Dra. Ma. Eugenia de la Torre Hernández
Cédula de Doctorado No. 8273669

QUÍMICO FARMACEUTICO BIÓLOGICO

REPORTE FINAL DE INVESTIGACIÓN PARA LA LIBERACIÓN DEL SERVICIO SOCIAL

“Caracterización de bacterias rizosféricas y endófitas productoras de sideróforos, aisladas de *Echinocactus platyacanthus* (biznaga dulce)”

Como parte del proyecto CONACyT 221204-z : “Comunidades microbianas de la rizósfera de cactáceas del semidesierto de Querétaro; análisis mediante enfoques ecológicos, metagenómico y microbiológico”

Proyecto genérico “evaluación de productos relacionados con la salud”

Alumno: Peláez Rojas José Luis

Matricula: 2132036092

Asesores:

DR. HUGO CESAR RAMIREZ SAAD

DRA. MARIA EUGENIA DE LA TORRE HERNÁNDEZ

Lugar de Realización: LABORATORIO DE ECOLOGIA MOLECULAR, PLANTA PILOTO, UAM-X,
CALZADA DEL HUESO 1100, VILLA QUIETUD, DELEGACIÓN COYOACAN, MEXICO D. F.

Fecha de inicio: Mayo 2018

Fecha de terminación: Enero 2019

Índice

Índice de figuras	3
Índice de tablas	5
1 - Resumen.....	6
2 - Introducción	7
2.1-Zonas áridas y semiáridas (ZAS) de México	7
2.1.1 Composición del suelo de las ZAS	7
2.2-Cactáceas	8
2.3-El hierro y otros metales.....	9
2.4-Fitosideróforos y sideróforos.....	9
2.5-Ensayo para determinación de sideróforos con el cromo azulol sulfonato (CAS)	10
3 – Antecedentes experimentales inmediatos.....	11
4 - Justificación.....	11
5 - Objetivo general.....	11
5.1-Objetivos específicos	11
6 - Metodología.....	12
6.1. Preparación de inóculos.....	12
6.2 Prueba cualitativa de la producción de sideróforos para hierro	13
6.2.1 Preparación de medio selectivo de cultivo	13
6.2.2. Siembra de las cepas en estudio y de las cepas de referencia.....	14
6.3 Prueba cuantitativa de la producción de sideróforos para hierro	15
6.3.1 Preparación de los inóculos	15
6.3.2 Siembra de las cepas en estudio y de las cepas de referencia para la prueba cuantitativa.	15
6.3.3 Prueba cuantitativa	16
6.4 Determinación de la producción de sideróforos para diferentes iones (prueba cualitativa).	16
7 - Análisis y discusión de Resultados	17
7.1 Prueba cualitativa de sideróforos para hierro	17
7.2 Prueba cuantitativa de sideróforos para Fe en microplaca	19
7.3 Prueba cualitativa de sideróforos para otros iones	22
7.3.1 Actividad de sideróforos en medio CAS suplementado con Níquel.....	24
7.3.2 Actividad de sideróforos en medio CAS suplementado con Cobre.....	26
7.3.3 Muestras sembradas en medio CAS con Cromo.	28

7.3.4 Muestras sembradas en medio CAS con Zinc.	30
7.3.5 Muestras sembradas en medio CAS con Molibdeno.	32
7.3.6 Muestras sembradas en medio CAS con Vanadio.....	34
7.3.7 Muestras sembradas en medio CAS con Cadmio.....	36
7.3.8 Muestras sembradas en medio CAS con Cobalto.	38
7.3.8 Muestras sembradas en medio CAS con Plomo.....	40
8 - Conclusiones	42
9 - Bibliografía:	42
Vo. Bo. de asesores	45
10 - Anexos.....	46
10.1 - Calendario de actividades	46
10.2 – Índices de quelación de bacterias productoras de sideróforos con Mo, Ni, Zn, V, Cd, Cu, Cr, Pb y Co.	46

Índice de figuras

Figura 1. Halos de quelación de hierro a las 72 horas de incubación; A) <i>Bacillus</i> (P45), B) <i>Pseudomonas</i> (P44), C) <i>Bacillus</i> (P43), D) <i>Pseudomonas</i> (P42), E) <i>Pseudomonas</i> (P41), F) <i>Stenotrophomonas</i> (P31) y los controles positivos; G) <i>Azospirillum brasilense</i> (Ab) y H) <i>Bacillus licheniformis</i> (αF_1) en medio sólido suplementado con CAS y $FeCl_3$	17
Figura 2. Índices de quelación en medio LB-CAS suplementado con hierro.....	18
Figura 3. Prueba cuantitativa de sideróforos para Fe en placa de ELISA.	20
Figura 4. Porcentaje de quelación con respecto al testigo (reactivo CAS con medio inoculado con agua estéril).....	21
Figura 5. Halos de quelación en medio sólido suplementado con CAS y cromo. Panel A. 1) <i>Chitinophaga</i> (P12); 2) <i>Stenotrophomonas</i> (P31); 3) <i>Pseudomonas</i> (P32); 4) <i>Bacillus</i> (P38). Panel B. 1) <i>Pseudomonas</i> (P41); 2) <i>Pseudomonas</i> (P42); 3) <i>Bacillus</i> (P43); 4) <i>Pseudomonas</i> (P44), sembradas en medio CAS suplementado con $K_2Cr_2O_7$	23
Figura 6. Formación de halos de quelación en medio suplementado con CAS y níquel. A) <i>Pseudomonas</i> (P42); B) control <i>Bacillus</i> (αF_1); C) <i>Azospirillum brasilense</i> (Ab); D) <i>Bacillus</i> (P45); E) <i>Pseudomonas</i> (P41), sembradas por triplicado en medio suplementado con $NiSO_4$, a las 72 horas de incubación.	24
Figura 7. Índices de quelación en medio LB suplementado con CAS y Níquel.....	25
Figura 8. formación de halos de quelación en medio suplementado con CAS y Cobre; A) <i>Bacillus</i> (P45), B) <i>Pseudomonas</i> (P44), C) <i>Bacillus</i> (P43), D) <i>Pseudomonas</i> (P42), E) <i>Pseudomonas</i> (P41), F) <i>Stenotrophomonas</i> (P31) y los controles; G) <i>Azospirillum brasilense</i> (Ab) y H) <i>Bacillus</i> (αF_1), sembradas por triplicados en medio suplementado con $CuCl_2$, a las 72 horas de incubación.	26
Figura 9. Índices de quelación en medio LB suplementado con CAS y Cobre.....	27
Figura 10. Formación de halos de quelación en medio suplementado con CAS y Cromo; A) <i>Bacillus</i> (P45), B) <i>Pseudomonas</i> (P42), C) <i>Pseudomonas</i> (P41), D) <i>Stenotrophomonas</i> (P31), y los controles; E) <i>Azospirillum brasilense</i> (Ab) y F) <i>Bacillus</i> (αF_1) sembradas por triplicados en medio suplementado con $K_2Cr_2O_7$ a las 72 horas de incubación.	28
Figura 11. Índices de quelación en medio LB suplementado con CAS y cromo.....	29
Figura 12. Formación de halos de quelación en medio suplementado con CAS y Zinc; A) <i>Bacillus</i> (P45), B) <i>Bacillus</i> (P43), C) <i>Pseudomonas</i> (P42), D) <i>Pseudomonas</i> (P41), E) <i>Stenotrophomonas</i> (P31) y los controles positivos; F) <i>Azospirillum brasilense</i> (Ab) y G) <i>Bacillus</i> (αF_1), sembradas por triplicados en medio suplementado con $K_2Cr_2O_7$ a las 72 horas de incubación.....	30
Figura 13. Índices de quelación en medio LB suplementado con CAS y Zinc.....	31
Figura 14. Formación de halos de quelación en medio suplementado con CAS y Molibdeno; A) <i>Bacillus</i> (P45), B) <i>Pseudomonas</i> (P42), C) <i>Pseudomonas</i> (P41), D) <i>Stenotrophomonas</i> (P31), y los controles positivos; E) <i>Azospirillum brasilense</i> (Ab) y F) <i>Bacillus</i> (αF_1), sembradas por triplicados en medio suplementado con $MoCl_2$ a las 72 horas de incubación.	32
Figura 15. Índices de quelación de sideróforos en medio LB suplementado con CAS y Molibdeno ..	33
Figura 16. Formación de halos de quelación en medio suplementado con CAS y Vanadio; A) <i>Bacillus</i> (P45), B) <i>Pseudomonas</i> (P44), C) <i>Bacillus</i> (P43), D) <i>Pseudomonas</i> (P42), E) <i>Pseudomonas</i> (P41), F) <i>Stenotrophomonas</i> (P31), y los controles positivos; G) <i>Azospirillum brasilense</i> (Ab) y H) <i>Bacillus</i> (αF_1), sembradas por triplicados en medio suplementado con $NaVO_3$ a las 72 horas de incubación.	34
Figura 17. Índices de quelación de sideróforos en medio LB suplementado con CAS y Vanadio	35

Figura 18. formación de halos de quelación en medio suplementado con CAS y Cadmio; A) <i>Bacillus</i> (P45), B) <i>Pseudomonas</i> (P44), C) <i>Bacillus</i> (P43), D) <i>Pseudomonas</i> (P42), E) <i>Pseudomonas</i> (P41), F) <i>Stenotrophomonas</i> (P31), y los controles positivos; G) <i>Azospirillum brasilense</i> (Ab) y H) <i>Bacillus</i> (αF_1), sembradas por triplicados en medio suplementado con $CdCl_2$ a las 72 horas de incubación.	36
Figura 19. Índices de quelación de sideróforos en medio LB suplementado con CAS y Cadmio	37
Figura 20. Formación de halos de quelación en medio CAS y Cobalto; A) <i>Bacillus</i> (P45), B) <i>Pseudomonas</i> (P42), C) <i>Pseudomonas</i> (P41), D) <i>Stenotrophomonas</i> (P31), y los controles positivos; E) <i>Azospirillum brasilense</i> (Ab) y F) <i>Bacillus</i> (αF_1), sembradas por triplicados en medio suplementado con $CoCl_2$ a las 72 horas de incubación.	38
Figura 21. Índices de quelación de sideróforos en medio LB suplementado con CAS y Cobalto.	39
Figura 22. Formación de halos de quelación en medio CAS y Plomo; A) <i>Bacillus</i> (P45), B) <i>Pseudomonas</i> (P42), C) <i>Pseudomonas</i> (P41), D) <i>Stenotrophomonas</i> (P31), y los controles positivos; E) <i>Azospirillum brasilense</i> (Ab) y F) <i>Bacillus</i> (αF_1), sembradas por triplicados en medio suplementado con $PbCl_2$ a las 72 horas de incubación.	40
Figura 23. Índices de quelación de sideróforos en medio LB suplementado con CAS y Plomo.	41

Índice de tablas

Tabla 1. Composición del medio LB sin extracto de lavadura	12
Tabla 2. Cepas en estudio representativas de los 268 aislados originales de <i>E. platyacanthus</i> (Salinas-Virgen, 2015)	13
Tabla 3. Composición del medio solido LB sin extracto de levadura	13
Tabla 4. Preparación de suplementos para el medio LB: CAS, FeCl ₃ y CTAB	14
Tabla 5. Índices de quelación de las muestras productoras de sideróforos a las 48 y 72 h..	19
Tabla 6. Porcentaje de quelación de 24 a 72h.	22
Tabla 7. Índice de quelación de cepas en medio CAS suplementadas con Zinc a las 48 y 72 h.....	46
Tabla 8. Índice de quelación de cepas en medio CAS suplementadas con Molibdeno a las 48 y 72 h	47
Tabla 9. Índice de quelación de cepas en medio CAS suplementadas con Níquel a las 48 y 72 h....	47
Tabla 10. Índice de quelación de cepas en medio CAS suplementadas con Cobre a las 48 y 72 h... 47	
Tabla 11. Índice de quelación de cepas en medio CAS suplementadas con Cadmio a las 48 y 72 h.48	
Tabla 12. Índice de quelación de cepas en medio CAS suplementadas con Vanadio a las 48 y 72 h.	48
Tabla 13. Índice de quelación de cepas en medio CAS suplementadas con Cromo a las 48 y 72 h. 48	
Tabla 14. Índice de quelación de cepas en medio CAS suplementadas con Plomo a las 48 y 72 h.. 49	
Tabla 15. Índice de quelación de cepas en medio CAS suplementadas con Cobalto a las 48 y 72 h.49	

1 - Resumen

Actualmente, cerca del 60% del territorio nacional se considera como parte de las zonas áridas y semiáridas (ZAS). Las zonas áridas, están caracterizadas por la deficiencia de agua en el ambiente, presentan una muy baja humedad atmosférica, con precipitaciones de 200 mm anuales -en promedio- y zonas semiáridas, están caracterizadas por tener estaciones breves de humedad y, por consiguiente, mayor presencia de flora y fauna (CONAZA, 2019; Giménez, G. 2007).

Algunas especies vegetales crecen en áreas específicas de las ZAS, por lo que se les denomina especies microendémicas; dentro de estas especies se encuentran las cactáceas, plantas que aprovechan para construcción -como cercos vivos-, como fijadoras del suelo para evitar su erosión y como fuente de alimentación para ganado -forraje- (Alanís-Flores, G.J. 2008).

Estas plantas están consideradas en leyes y listas internacionales de protección de especies en peligro de extinción en vista de que algunas de sus poblaciones han disminuido considerablemente debido a la alteración de su ambiente, por el uso humano indiscriminado, así como a la extracción ilegal de su hábitat natural (Alanís-Flores, G.J. 2008). Frente a esta situación, se han desarrollado diversos intentos de preservación de las cactáceas como el cultivo *ex situ* (en un medio controlado y estéril) e *in situ* (sembrándolas directamente en su lugar origen) (Santos, Díaz. M.S, *et al*, 2011).

Otra forma de preservación que se ha intentado es a través de la utilización de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés: *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*), las cuales tienen diferentes mecanismos de acción a través de los cuales establecen interacciones mutualistas con las plantas; uno de estos mecanismos es la secreción de sideróforos, moléculas capaces de “secuestrar” iones de hierro (u otros iones), mismos que pueden ser utilizados directamente por la planta, o bien, su ausencia en el suelo circundante de la raíz, puede inhibir el crecimiento de otros microorganismos, incluidos patógenos (Aguado-Santacruz, G.A. 2012).

Este estudio forma parte de una investigación en la que previamente se aislaron 268 bacterias de la rizósfera de *Echinocactus platyacanthus* (biznaga dulce) del semidesierto queretano, las cuales fueron caracterizadas morfológicamente y fueron agrupadas en 42 diferentes patrones de restricción enzimática del gen 16S ribosomal; de cada grupo se tomó un representante para hacer el análisis filogenético correspondiente, así como la determinación de su actividad PGPR (Salinas-Virgen, 2015; 2019).

En este reporte se determinó la actividad productora de sideróforos de las 42 cepas representativas a través del método CAS de forma semi cualitativa y semi cuantitativa, reportado por Schwyn y Neilands (1987). Se identificaron 6 muestras con actividad de producción de sideróforos: 3 *Pseudomonas*, 2 *Bacillus* y 1 *Stenotrophomonas*. Se determinó que producen sideróforos para los iones Zn^{2+} , V^{5+} , Mo^{6+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Cr^{6+} , Ni^{2+} y Cd^{2+} , además de los característicos para hierro (Fe^{3+}).

2 - Introducción

2.1-Zonas áridas y semiáridas (ZAS) de México

Según la CONAZA (2019), cerca del 60% del territorio nacional es considerado como zonas áridas - con una precipitación anual promedio de hasta 200 milímetros-, o zonas semiáridas -cuya precipitación anual promedio es de entre 200 y 400 milímetros-.

En México se reconocen tres desiertos principales: el sonoreense, el Chihuahuense (dividido en 3 zonas: Meridional, Zonas Áridas de Querétaro, Hidalgo y Guanajuato) y el desierto de Tehuacán-Cuicatlán (Hernández H.M., 2006).

El clima desértico se caracteriza por condiciones climáticas extremas como son: baja humedad relativa durante el día y relativamente alta por la noche, fuertes cambios de temperatura, así como alta luminosidad y ausencia de precipitaciones; por lo tanto, la flora y fauna locales están adaptadas a estas condiciones (Giménez, G. 2007).

El desierto Chihuahuense es una región de gran importancia biológica. En esta extensa región de 507 mil kilómetros cuadrados se concentran 329 especies de cactáceas, lo que representa casi el 60% de las especies mexicanas y más de 20% del total continental (Hernández, J.G. 2007). En el 2007 se demostró que la riqueza cactológica en la región del desierto chihuahuense no se distribuye de manera uniforme, sino que existen núcleos de concentración de especies o sitios altamente diversos, que son áreas muy pequeñas en relación con la extensión total de esta unidad geográfica, estas son especies endémicas o microendémicas (Hernández, J.G. 2007).

En el extremo sur del desierto Chihuahuense existe un área que cumple con las características de los sitios de alta diversidad, la zona árida queretano-hidalguense, o semidesierto queretano, nombre con el que es conocido localmente, tradicionalmente ha llamado la atención de coleccionistas y cactólogos por albergar un importante número de especies endémicas, las cuales han sido objeto de saqueo o comercialización ilegal por décadas (Hernández, J.G. 2007).

2.1.1 Composición del suelo de las ZAS

Los suelos de zonas áridas se presentan en planicies y sus características químicas son propias de la roca madre de la cual se originaron, la cantidad de agua que tiene el suelo depende de la humedad derivada de la precipitación, de la pérdida por evaporación y de la profundidad de la percolación; por lo general sólo la parte superficial del suelo está humedecida y la profundidad de penetración de la humedad depende de la textura y capacidad de campo del suelo; por ejemplo, los suelos arcillosos tienen baja percolación, mientras que los suelos rocosos, alta, y los de textura arenosa, son intermedios (Medrano González, 2012).

En el desierto de Chihuahua y en el semidesierto queretano, la salinidad del suelo se ha incrementado por la erosión de las rocas sedimentarias que al ser sometidas al intemperismo; las sales que contienen son arrastradas por el agua de la lluvia a cuencas de captación de agua donde, al no tener un drenaje adecuado, la evaporación ocasiona la acumulación de sales, principalmente cloruro de sodio, aunque también se presentan sulfatos de sodio y de magnesio, así como cloruro de magnesio (Medrano González, 2012)

En las zonas áridas y semiáridas está documentado que el nitrógeno y el fósforo son los principales nutrientes que se encuentran deficientes o de forma no disponible para las plantas; el hierro

también está limitado, particularmente en suelos calcáreos o salinos, característicos de muchas zonas áridas y semiáridas (Estrada González, A, J. 2017)

2.2-Cactáceas

Son un grupo de plantas llamadas comúnmente “cactus” (nopales, biznagas, órganos, pitayas, garambullos) que son originarias y endémicas del continente americano y distribuidas principalmente en zonas áridas y semiáridas, siendo México, por sus características ecológicas, el país que alberga la mayor cantidad de especies de esta familia (Alanís-Flores, G.J. 2008).

El uso más común que se les da a las cactáceas es como fuente de alimento, utilizando los tallos y frutos; algunas especies tienen uso medicinal o como fuente de materia prima para la construcción. Las biznagas (de los géneros *Echinocactus* y *Ferrocactus*) son utilizadas principalmente para consumo humano, ya que sus tallos de forma globosa se usan para la elaboración del tradicional dulce de acitrón (Alanís-Flores, G.J. 2008). Además de su uso como fuente de alimento, las distintas especies de la familia de las cactáceas se han aprovechado para diversos fines: como cercos vivos, como fijadoras de suelo para evitar la erosión, como fuente de forraje y, en tiempos de sequía en las zonas áridas y semiáridas del país, son fuentes de mucílagos, gomas y pectinas (Alanís-Flores, G.J. 2008).

Sin embargo, la destrucción de sus hábitats naturales, provocada principalmente por el crecimiento de la actividad agrícola y ganadera, o por la demanda de las plantas silvestres para los fines mencionados anteriormente, ya sea en el país o en el extranjero, ha ocasionado daños no cuantificados a las poblaciones de cactáceas (Alanís-Flores, G.J. 2008).

Se han elaborado diversos catálogos que enlistan las especies que se encuentran en riesgo. Para el caso de México, la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001 señala 255 taxones (especies o subespecies) de cactáceas en alguna categoría de riesgo. El Libro Rojo de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, 2004), incluye 65 taxones de cactáceas en diversas categorías de riesgo. Además, existen acuerdos internacionales, como el de la Convención sobre Comercio de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestre (CITES), la cual enumera 41 taxones de cactáceas de nuestro país dentro del Apéndice I (en el que se encuentran las especies en mayor riesgo y con las cuales el comercio está prohibido). El resto de las cactáceas se encuentran en el Apéndice II, en el que figuran especies que, aunque no necesariamente se encuentren amenazadas, podrían llegar a estarlo si no se controla estrictamente su comercio (Jiménez Sierra, 2011).

Fue en 1997 cuando el gobierno mexicano, a través de las SEMARNAT, impulsó el “Programa de Conservación de la Vida Silvestre y Diversificación Productiva en el sector rural 1997-2000”, con el cual se intentaba normar y controlar el cultivo *in situ* y *ex situ* para la conservación de las cactáceas. La conservación *in situ* consiste en el crecimiento y protección de la planta en su ambiente natural, tiene como ventajas que es posible mantener el material genético y mantener los procesos naturales con los cuales la diversidad genética es originada y es posible preservar la variación genética (Santos, Díaz. M.S, *et al*, 2011). La conservación *ex situ* consiste en mantener y propagar las plantas fuera de su ambiente natural, en un ambiente con condiciones controladas, sin embargo, esto puede limitar la adaptación de las plantas a su ambiente natural (FAO, 2011; Santos, Díaz. M.S, *et al*, 2011). Este programa finalizó en el año 2000 y, dentro de las especies con mayor éxito en su conservación y manejo de forma *in situ* se encuentran *Astrophytum ornatum* (“biznaga burra”), *Echinocactus grusonii* (“biznaga dorada”), *Echinocereus schmollii* (“organito”), *Mammillaria*

herreriae (“bolita de hilo”) y *Thelocactus hastifer* (“biznaguita”); de forma *ex situ*, en jardines botánicos, viveros y en centros de investigación, se encuentran *Cephalocereus senilis* (“Cacto viejito”), *Pachycereus marginatus* (“Cardón órgano parado”), *Stenocereus eruca* (“Pitayo chirinola”), *Ferocactus histrix* (“Biznaga barril de acitrón”), *Echinocactus grusonii* (“biznaga dorada”), *Echinocactus platyacanthus* (“biznaga dulce”) y *Peniocereus serpentinae* (“Junco espinoso”) (Santos, Díaz. M.S, *et al*, 2011; Ruiz de Velasco, F.R. 2007).

Otra forma de conservación de plantas endémicas sería el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, bacterias que contribuyen a la nutrición y crecimiento de las plantas, encontrándose en la rizósfera de diversos vegetales, incluidas las cactáceas. Algunos microorganismos aislados de la rizósfera de cultivos de cereales y hortalizas ya han sido comercializados en productos para agricultura (Chávez-Ambriz, L.A. *et al* 2016), por ejemplo, BIOPRON PMC3, de la marca Probelte, cepas de *Azospirillum brasilense* con cepas de *Pantoea dispersa* que se encuentran en formas de gránulos que permiten su liberación cuando se encuentran en el suelo en contacto con el agua, estas cepas son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico, solubilizar el fósforo del suelo y producir sideróforos y fitohormonas naturales. Este producto se emplea en cultivos de acelga, espinaca, umbelíferas, hortalizas, lechuga, melón, patatas, etc. (De Liñán, 2008).

2.3-El hierro y otros metales

El hierro es un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo de la mayoría de organismos vivos, este elemento es utilizado por algunas enzimas que intervienen en diversas rutas metabólicas, en la síntesis de ADN y en la detoxificación de radicales libres, sin embargo, en condiciones fisiológicas (presencia de oxígeno y pH neutro) el hierro se oxida rápidamente de Fe^{2+} a Fe^{3+} (Aguado-Santacruz, G.A. 2012).

En el suelo, es uno de los elementos más abundantes y se encuentra formando complejos insolubles con hidroxilos, silicatos de ferromagnesio u óxidos de hierro, formas no asimilables para las plantas (Aguado-Santacruz, G.A. 2012).

En el ambiente, el pH, los contenidos de materia orgánica, la textura y aireación del suelo, afectan la disponibilidad del hierro; ésta decrece cuando el pH del suelo se incrementa a valores de entre 7.4 y 8.5, valores que se alcanzan en los suelos calcáreos o calizos, ya que la solubilidad del hierro desciende 1000 veces por cada unidad de pH que aumenta (Aguado-Santacruz, G.A. 2012).

Ante un suelo calizo, el hierro se mantiene en su forma Fe^{2+} a través de su interacción con agentes quelantes o ligandos, estos son productos solubles formados por átomos que ligan al catión por la donación de electrones de grupos carboxilo y átomos de nitrógeno con carga negativa (Aguado-Santacruz, G.A. 2012); los agentes quelantes también se pueden unir a iones divalentes como Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} y Zn^{2+} o iones trivalentes como Mn^{3+} , Co^{3+} y Al^{3+} que se encuentran esparcidos por minas, industrias, construcciones, etc. Los agentes quelantes pueden ser de dos tipos: los producidos por la misma planta (fitosideróforos) y los producidos por microorganismos, los sideróforos (Aguado-Santacruz, G.A. 2012; Ahmed, E. Holmström, J.M. 2014).

2.4-Fitosideróforos y sideróforos

Los **fitosideróforos** son aminoácidos no proteicos que produce la planta cuando hay deficiencia de hierro y zinc, estos hacen una función análoga a los sideróforos microbianos, facilitando la

solubilidad y el aprovechamiento del hierro por las plantas, además de poder captar otros iones, como el zinc (Aguado-Santacruz, G.A 2012). Son secretados hacia la rizósfera después de captar el ion férrico y formar con él un complejo 1:1; sin embargo, en comparación con los sideróforos microbianos, tienen una afinidad menor por el hierro, una menor diversidad de formas y, en algunos casos, estas moléculas no se unen de forma específica al hierro.

Los **sideróforos** microbianos son moléculas secretadas por microorganismos en condiciones de deficiencia de hierro en el suelo y se clasifican en tres tipos, según el donador de electrones:

- a) catecolatos y fenoles
- b) hidroximatos y α -hidroxi-carboxilatos
- c) una mezcla de ambos

Cuando no hay hierro disponible en el ambiente, los genes involucrados en la formación y captación de los complejos sideróforo-hierro son desreprimidos, liberando Fe^{2+} de las proteínas represoras, activando así la transcripción de los genes involucrados en la producción de los sideróforos; entonces, los sideróforos son secretados a la rizósfera para captar el hierro (Aguado-Santacruz, G.A. 2012).

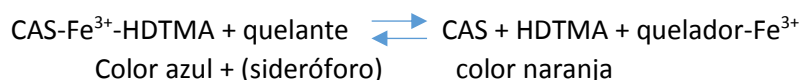
Algunas bacterias influyen de forma positiva en el crecimiento de las plantas a través de diversos mecanismos que incluyen la síntesis de sideróforos para la estimulación del crecimiento o como agentes mejoradores del suelo y de la sanidad vegetal; estas bacterias son llamadas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés) (Aguado-Santacruz, G.A. 2012).

Las PGPR se caracterizan por su capacidad de estimular el crecimiento de las plantas a través de mecanismos de tipo directo o indirecto. La estimulación directa puede incluir: fijación de nitrógeno, producción de hormonas, reducción de los niveles de etileno en el suelo, solubilización de fosfatos, secreción de sideróforos, entre otros. La estimulación indirecta del crecimiento de plantas incluye una variedad de mecanismos de biocontrol que usan las PGPR en la competencia por el nicho ecológico o por sustratos con otras bacterias, como la producción de antibióticos, inducción de resistencia sistémica (IRS) a un amplio espectro de patógenos y la producción de sideróforos como un mecanismo de secuestro del hierro disponible en el medio para limitar el crecimiento de microorganismos fitopatógenos (Aguado-Santacruz, G.A. 2012). Así, las plantas que pueden utilizar los complejos de los sideróforos microbianos como fuente de hierro aumentan su probabilidad de supervivencia y adaptación a diferentes condiciones del suelo (Aguado-Santacruz, G.A. 2012).

2.5-Ensayo para determinación de sideróforos con el cromo azurol sulfonato (CAS)

El ensayo del cromo azurol-S es un método creado por Schwyn y Neilands (1987) para la determinación de sideróforos, independientemente de su estructura.

Se emplea el cromo azurol sulfonato como colorante que, junto con algún ion divalente como Fe^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} y Zn^{2+} , o iones trivalentes como Mn^{3+} , Co^{3+} y Al^{3+} , y un detergente como HDTMA (*hexadecyl trimethyl ammonium bromide*) o CTAB (*cetyl trimethyl ammonium bromide*), forman un complejo que se rompe al ser retirado el ion por un quelante más afín a éste, liberando al colorante y cambiando la tonalidad del medio de azul a anaranjado (Louden, et al, 2011; Dimkpa, C, 2016).



La mayoría de los sideróforos reaccionan en proporción de 1:1 con el complejo CAS-Fe³⁺-CTAB.

3 – Antecedentes experimentales inmediatos

El proyecto aquí planteado forma parte de un trabajo que se realiza en el Laboratorio de Ecología Molecular de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, para la identificación y caracterización de bacterias aisladas de la rizósfera de *Echinocactus platyacanthus* (biznaga dulce) del semidesierto queretano. Originalmente se obtuvieron 268 aislados bacterianos que fueron caracterizados morfológicamente; se extrajo su DNA genómico y a partir de él se amplificó por PCR el gen 16S rRNA; los productos de amplificación fueron sometidos a un análisis de restricción enzimática (REA) que permitió agruparlos en 42 patrones de restricción diferentes, partiendo de la premisa de que las cepas que presentaran patrones de restricción similares, corresponderían a la misma cepa o a una filogenéticamente relacionada (Salinas-Virgen, 2015).

Se seleccionó una cepa representante de cada patrón de restricción para hacer un análisis filogenético que permitió conocer su identidad taxonómica; cada una de estas cepas ha sido analizada para determinar su posible actividad PGPR (Salinas-Virgen, 2019), siendo la producción de sideróforos una de estas actividades.

4 - Justificación

La deficiencia de hierro en el suelo representa un grave problema en México y en el mundo, particularmente en las zonas áridas y semiáridas, donde la elevada concentración de sales -como cloruro y sulfatos de sodio y magnesio- limitan fuertemente la disponibilidad de este elemento (Aguado-Santacruz, G.A. 2012; Kumar M. *et al* 2019). Debido a sus capacidades para secuestrar hierro, la producción de sideróforos microbianos constituye un área de estudio fundamental en cuanto se refiere a la preservación de las plantas que se desarrollan en suelos con baja disponibilidad de hierro (Aguado-Santacruz, G.A. 2012).

A partir de la colección de bacterias aisladas de la rizósfera de biznaga dulce, tanto de ejemplares silvestres como cultivados en vivero, provenientes del semidesierto queretano, se pretende determinar si las bacterias en estudio producen sideróforos como un mecanismo de acción para la promoción de crecimiento de dichas cactáceas.

5 - Objetivo general

Caracterizar las cepas productoras de sideróforos aisladas de la rizósfera de *Echinocactus platyacanthus* (biznaga dulce).

5.1-Objetivos específicos

1. Determinar cualitativamente la producción de sideróforos a través de la siembra de las 42 cepas en medio LB, suplementado con CAS y hierro.
2. Cuantificar la producción de sideróforos microbianos por espectrofotometría a 630nm, en cepas previamente seleccionadas por el método cualitativo.
3. Determinar cualitativamente la producción de sideróforos para distintos iones (Ni, Cu, K, Zn, Mo, V, Cd, Co, Cr y Pb) en aquellas cepas en las que se haya determinado su capacidad productora de sideróforos para Fe

6 - Metodología

El ensayo cualitativo para la detección de sideróforos puede ser preparado en cajas con agar, donde las bacterias productoras de sideróforos crecen en el medio generando un halo anaranjado producido por la remoción del ion férrico (Fe^{3+}) del complejo CAS; se puede obtener un índice de quelación de forma semi-cuantitativa, estableciendo la relación entre el diámetro del halo naranja que se forma alrededor la colonia y el diámetro de la colonia *per se* después de un tiempo determinado de incubación, en esta caso de 48 a 72 horas (Alexander, Zuberer 1991; Ahmadzadeh *et al*, 2006).

6.1. Preparación de inóculos

Se prepararon 45 mL de medio líquido LB sin extracto de levadura (Tabla 1); se hicieron alícuotas de 3 mL del medio en tubos de ensayo limpios.

Medio líquido Luria-Bertani (LB) modificado	
Reactivo	g/L
Peptona de caseína	10
NaCl	10

Tabla 1. Composición del medio LB sin extracto de levadura

El medio se esterilizó en autoclave a 121°C, 15 lb de presión, durante 15 minutos; terminado el proceso de esterilización, los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

En una campana de flujo laminar, se tomaron 30 μ L de los cultivos criopreservados de cada una de las 42 cepas previamente aisladas en el Laboratorio de Ecología Molecular (Salinas-Virgen, 2015) para inocular los correspondientes tubos que contenían 3 mL de medio LB modificado, estéril. Se utilizaron como cepas de referencia positiva *Azospirillum brasilense* (Ab) y *Bacillus licheniformis* (aF1); *Klebsiella varicola* se utilizó como referencia negativa puesto que no se ha reportado su capacidad productora de sideróforos.

Los tubos se incubaron con agitación orbital constante de 180 rpm, a 30°C, durante 24 h.

En la Tabla 2 se muestran las cepas bacterianas en estudio, con su correspondiente clave de identificación, misma a la que se hará referencia en el resto del trabajo.

Clave identificación	Identificación taxonómica	Clave identificación	Identificación taxonómica
P1	<i>Pseudomonas</i>	P23	<i>Leifsonia</i>
P2	<i>Bacillus</i>	P24	<i>Pseudomona</i>
P3	<i>Paenibacillus</i>	P25	<i>Bacillus</i>
P4	<i>Bacillus</i>	P26	<i>Bacillus</i>
P5	<i>Paenibacillus</i>	P28	<i>Bacillus</i>
P6	<i>Staphylococcus</i>	P29	<i>Bacillus</i>
P7	<i>Bacillus</i>	P30	<i>Bacillus</i>
P8	<i>Brevibacterium</i>	P31	<i>Stenotrophomonas</i>
P9	<i>Bacillus</i>	P32	<i>Pseudomonas</i>

P10	<i>Taibaiella</i>	P34	<i>Bacillus</i>
P11	<i>Staphylococcus</i>	P35	<i>Bacillus</i>
P12	<i>Chitinophaga</i>	P36	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
P13	<i>Flavobacterium</i>	P37	<i>Pseudomonas</i>
P14	<i>Bacillus</i>	P38	<i>Bacillus</i>
P15	<i>Bacillus</i>	P39	<i>Bacillus</i>
P16	<i>Pseudomonas</i>	P40	<i>Rhodococcus</i>
P17	<i>Arthrobacter ramosus</i>	P41	<i>Pseudomonas geniculata</i>
P18	<i>Pseudomonas simiae</i>	P42	<i>Pseudomonas koreensis</i>
P19	<i>Klebsiella</i>	P43	<i>Bacillus</i>
P20	<i>Staphylococcus</i>	P44	<i>Pseudomonas</i>
P22	<i>Cutibacterium</i>	P45	<i>Bacillus</i>

Tabla 2. Cepas en estudio representativas de los 268 aislados originales de *E. platyacanthus* (Salinas-Virgen, 2015)

6.2 Prueba cualitativa de la producción de sideróforos para hierro

6.2.1 Preparación de medio selectivo de cultivo

Se prepararon 300mL de medio LB modificado (Tabla 3) aforándolo a 270mL; los 30mL restantes correspondieron al reactivo CAS y al suplemento de hierro.

Medio Solido Luria-Bertani (LB)		
Reactivo	de	g/L
Peptona	de caseína	10
NaCl		10
Agar		4.5

Tabla 3. Composición del medio solido LB sin extracto de levadura

La preparación del reactivo CAS, se muestra en la Tabla 4; el colorante CAS y el CTAB se prepararon en una concentración 10 veces mayor a la concentración final debido a que, para un volumen de 300 mL, se necesitaban cantidades extremadamente pequeñas de CAS y CTAB que no podían ser pesadas por las básculas del laboratorio.

El colorante CAS se preparó pesando 181 mg y disolviéndose en 15 mL de agua; del CTAB se pesaron 219 mg y se disolvieron en 12 mL de agua.

El suplemento de hierro se preparó pesando 0.003 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ y disolviéndose en 45 mL de agua con HCl al 10 mM (41.56 μL de HCl al 37% p/p con $D=1.19 \text{ g/mL}$), la solución se aforó a 50 mL.

Suplementos para el medio LB	
Medio	900 mL
Cromo azurol S	60.5 mg en 50 mL
FeCl₃·6H₂O 56 mg/L en HCl 10 mM	10 mL
CTAB	72.9 mg en 40 mL

Tabla 4. Preparación de suplementos para el medio LB: CAS, FeCl₃ y CTAB

Se tomaron 1.5 mL del reactivo CAS 10x y se vertieron en un tubo cónico (Falcon) de 50 mL que contenía 13.5 mL de agua. Se tomaron 1.2 mL del CTAB 10x y se vertieron en un tubo cónico (Falcon) de 50 mL que contenía 10.8 mL de agua.

Todos los componentes del medio LB/CAS se esterilizaron en autoclave por separado y se dejaron enfriar hasta una temperatura aproximada de 40°C.

En la campana de flujo laminar, se mezclaron el reactivo CAS y el CTAB con el medio LB/agar, enseguida se agregaron 3mL de la solución de FeCl₃·6H₂O (53 ppm en HCl 10 mM), se mezcló hasta homogeneizarse y, con ayuda de una probeta estéril, se vertieron 20 mL del medio en cada caja de Petri; se dejaron abiertas dentro de la campana hasta que se solidificaron.

Las cajas se dejaron a temperatura ambiente si iban a ser usadas al día siguiente de que fueron hechas o, en refrigerador, para su uso posterior.

6.2.2. Siembra de las cepas en estudio y de las cepas de referencia

Los inóculos (Sección 6.1) de cada una de las cepas en estudio se cuantificaron a través de la determinación de la densidad óptica de los cultivos bacterianos a 540 nm.

A partir de la absorbancia obtenida, se utilizó la siguiente fórmula para calcular la cantidad de UFC/mL presentes en cada cultivo:

$$UFC/mL = \frac{(abs - 0.094)}{1.218 \times 10^{-9}}$$

Posteriormente, los inóculos se ajustaron la concentración celular conocida (1.6×10^7 UFC/mL) utilizando la siguiente fórmula:

$$Inóculo (1000 \mu L) = \frac{(1.6 \times 10^7 \text{ UFC/mL})(1000 \mu L \text{ agua estéril})}{(UFC/mL \text{ calculadas})}$$

Las cajas de LB suplementadas con CAS y hierro se rotularon con la clave de la muestra, nombre del medio y la fecha; se dividieron en tres secciones para el sembrado por triplicado de cada muestra.

Se sembraron 30 μ L de cada uno de los inóculos ajustados en cada una de las tres secciones marcadas de las cajas; se dejó que se absorbieran los inóculos en el agar y las cajas se sellaron con Parafilm antes de ser depositadas en la incubadora a 28 °C, durante 72 h, aunque se registró el crecimiento y formación de halos (si los hubiera) también a las 48 h de incubación.

En las cajas donde hubo crecimiento colonial y formación de halos a las 48 y/o 72 horas, se tomaron las medidas del diámetro tanto de las colonias como de los halos.

El índice de quelación se obtuvo utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de quelación} = \frac{\text{diámetro halo (cm)}}{\text{diámetro colonia (cm)}}$$

En el caso de las colonias cuyo crecimiento y formación de halos fueron ovalados, se promediaron los valores del largo y ancho tanto del halo como de la colonia, posteriormente se aplicó la fórmula antes mencionada. Los índices de cada triplicado se promediaron para tener un índice general de la muestra, con su respectiva desviación.

Los índices de quelación de las muestras (por triplicado) fueron analizados con el software JMP 11 para determinar si se ajustaban a una distribución normal; a aquellas en las que este fue el caso, se les aplicó ANOVA y prueba de Tukey para analizar la diferencia de medias; en caso de que no tuvieran un ajuste de distribución normal, se les aplicó la prueba de Wilcoxon, con análisis de medias de Dunn.

El mismo procedimiento se llevó a cabo para las 42 muestras, así como para las cepas de referencia (positiva y negativa).

6.3 Prueba cuantitativa de la producción de sideróforos para hierro

De forma cuantitativa se realizó una estimación de la producción de sideróforos llevando a cabo una reacción entre el reactivo CAS y los sideróforos del sobrenadante de las muestras, lo cual genera un cambio de color que es medido en comparación con un testigo (CAS + sobrenadante testigo), en un lector de microplacas (Naveen Kumar, A. 2017).

6.3.1 Preparación de los inóculos

Se prepararon los inóculos como se detalla en la sección 6.1.

Paralelamente, se prepararon tubos que contenían 5 mL de medio LB sin extracto de levadura, mismos que fueron rotulados con la clave de la muestra, número de triplicado (ej. 1, 2 o 3) y tiempo de incubación (0, 24, 48 y 72h).

6.3.2 Siembra de las cepas en estudio y de las cepas de referencia para la prueba cuantitativa.

Se siguió el protocolo detallado en la sección 6.2.2.

Se utilizaron 50 µL de cada inóculo ajustado para sembrarlos en los tubos con 5 mL de medio LB, anteriormente rotulados según el tiempo de incubación y clave de muestra.

Tres tubos de 5 mL con medio LB fueron inoculados con 30 µL de agua estéril; estos tubos sirvieron como testigos negativos para la prueba cuantitativa.

Los tubos inoculados fueron incubados a 28°C con agitación orbital constante (260 rpm), excepto los triplicados de las muestras de tiempo 0, puesto que con ellos se empezó la prueba cuantitativa enseguida, a las 0 horas de incubación.

6.3.3 Prueba cuantitativa

Los triplicados de las muestras se mezclaron en vortex.

En la campana de flujo laminar se tomaron 1000 μL de cada cultivo (incluidos los tubos a tiempo 0) y se vertieron en tubos eppendorf, mismos que se centrifugaron a 13 000 rpm, durante 5 minutos; se recuperaron los sobrenadantes.

Se prepararon 2 mL del reactivo CAS vertiendo 400 μL de CAS 10X, 400 μL de CTAB 10X, 400 μL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (en HCl 10 mM) y 800 μL de agua estéril, en un tubo Eppendorf de 2 mL; después se agitó en el vortex.

Se vertieron 50 μL del reactivo CAS en cada pozo a utilizar de una placa de ELISA de 96 pozos con fondo plano; se agregaron 50 μL de cada sobrenadante a los pozos correspondientes y se homogenizaron con ayuda de la micropipeta. Además de las muestras (incluidas aquéllas a tiempo 0), como controles negativos se utilizaron: por una parte, reactivo CAS (50 μL) adicionado con 50 μL de medio estéril sin inocular, y, por otra parte, reactivo CAS (50 μL) con agua estéril (50 μL), ambos por triplicado.

La placa se incubó a 28°C por 30 minutos en oscuridad. Después del tiempo de incubación, la placa se leyó en un lector de microplacas a 630 nm.

A partir de las absorbancias obtenidas, primero se realizó un promedio de la absorbancia basal de la placa (pozos vacíos); después, ese valor se restó a las absorbancias de todas las muestras y los controles. Se promedió el triplicado de las absorbancias del control negativo que usamos como referencia (reactivo CAS con medio sin inocular) y, a partir del valor obtenido, se calculó individualmente el porcentaje de quelación de cada uno de los triplicados de las muestras con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de quelación} = \frac{(A_r - A_s) \times 100}{A_r}$$

A_r = absorbancia de referencia (solución CAS con medio sin inocular)

A_s = absorbancias de las muestras (solución CAS con el sobrenadante)

Una vez obtenidos los valores individuales, se hicieron promedios de los triplicados de las muestras para obtener los porcentajes de quelación, así como la desviación estándar de cada triplicado. Estos valores fueron analizados con el software JMP 11 para determinar si se ajustaban a una distribución normal, en caso de ser así, se les aplicó ANOVA y prueba de Tukey para analizar las diferencias entre las medias; en caso de que no se ajustaran a una distribución normal, se les aplicó la prueba de Wilcoxon con el análisis de medias de Dunn.

Este procedimiento se realizó para todos los triplicados de las muestras en los diferentes tiempos de incubación probados (0, 24, 48 y 72 horas).

6.4 Determinación de la producción de sideróforos para diferentes iones (prueba cualitativa)

Se determinó la producción de sideróforos para los siguientes iones a una concentración de 56 ppm en HCl 10 mM: Ni, Cu, Zn, Mo, V, Cd, Co, Cr y Pb.

Se prepararon los inóculos de las muestras y los cultivos de referencia como se detalla en la sección 6.1. La siembra de los inóculos ajustados se llevó a cabo como se detalla en la sección 6.2.2, con la salvedad de que se utilizaron los iones antes mencionados para la suplementación de las cajas de medio LB, en vez de FeCl_3 .

7 - Análisis y discusión de Resultados

7.1 Prueba cualitativa de sideróforos para hierro

Con las pruebas cualitativas se determinó que, de las 42 muestras representativas de los 268 aislados de la rizósfera de *Echinocactus platyacanthus* (Salinas-Virgen, 2019), 6 mostraron crecimiento y formación de halos en medio LB sólido modificado, suplementado con CAS y hierro (Figura 1):

- *Bacillus licheniformis* (P45)
- *Pseudomonas koreensis* (P44)
- *Bacillus subtilis subsp. inaquosorum* (P43)
- *Pseudomonas* (P42)
- *Pseudomonas geniculata* (P41)
- *Stenotrophomonas maltophilia* (P31)

Estas son las únicas cepas de la colección de bacterias rizosféricas de *E. platyacanthus* del Laboratorio de Ecología Molecular que pueden metabolizar el hierro y usarlo para desarrollarse. El crecimiento colonial y de halo que mostraron cada una de ellas fueron diferentes, por lo que fue necesario el cálculo de los índices de quelación correspondientes para saber cuáles de estas cepas tienen una mayor producción de sideróforos.

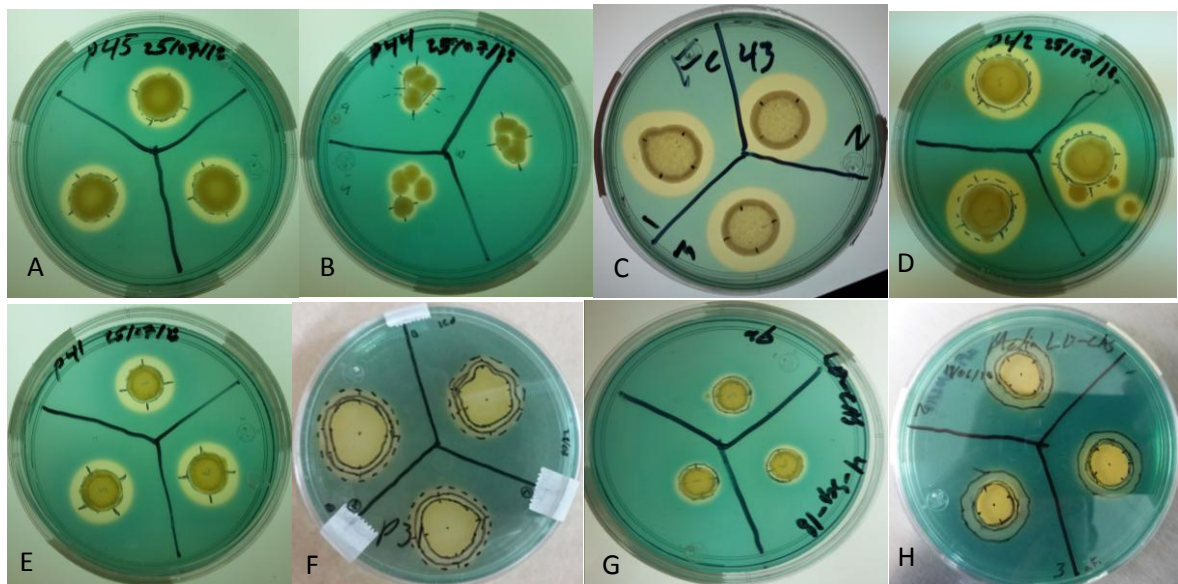


Figura 1. Halos de quelación de hierro a las 72 horas de incubación. A) *Bacillus* (P45), B) *Pseudomonas* (P44), C) *Bacillus* (P43), D) *Pseudomonas* (P42), E) *Pseudomonas* (P41), F) *Stenotrophomonas* (P31) y los controles positivos; G) *Azospirillum brasilense* (Ab) y H) *Bacillus licheniformis* (aF1), en medio sólido suplementado con CAS y FeCl_3 .

Se calcularon los índices de quelación de las cepas correspondientes a las 48 y 72 horas (Figura 2).

A las 48 h, *Stenotrophomonas* (P31) presentó el índice más alto y significativamente diferente (1.47) de las demás muestras y los controles. *Pseudomonas* (P42) se distinguió por mostrar el índice de quelación más bajo (0.92), significativamente diferente respecto a todas las demás muestras. *Pseudomonas* (P41), a este mismo tiempo, presentó crecimiento colonial pero no formación de halo.

A las 72 h, *Stenotrophomonas* (P31) mantuvo el índice más alto (1.64), seguido de *Bacillus* (P43), con un índice de 1.44, y *Pseudomonas* (P42), con un índice de 1.39; *Pseudomonas* (P41) es la cepa que mostró el índice de quelación más bajo, de 1.07.

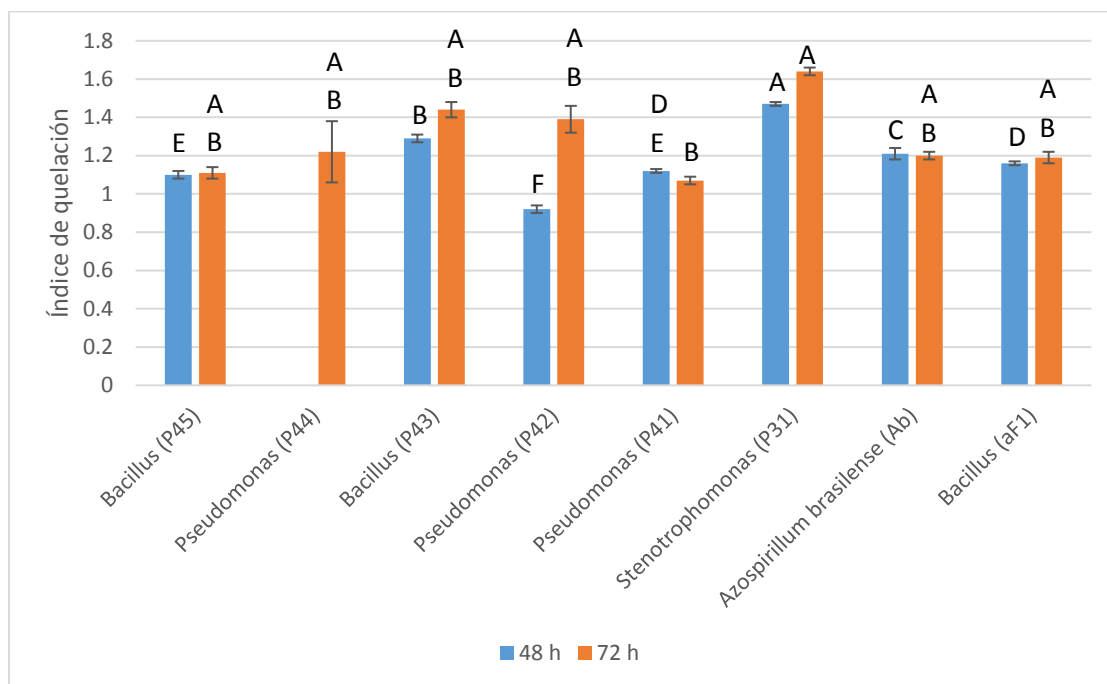


Figura 2. Índices de quelación en medio LB-CAS suplementado con hierro. Las mediciones se hicieron a las 48 y a las 72 horas de cultivo. Los índices de las 48 h se ajustaron a una distribución normal y se compararon sus medias con Tukey ($\alpha = 0.05$); los índices de las 72 h no se ajustaron a una distribución normal, sus medias fueron comparadas con la medida de medias no paramétricas de Dunn ($\alpha = 0.05$).

En la Figura 2 se observa que, a las 48 y 72 horas, *Bacillus* (P45), *Pseudomonas* (P44 y P41), así como los controles *Azospirillum brasilense* (Ab) y *Bacillus licheniformis* (aF1), son las muestras que tienen un índice de quelación menor de 1.2, esto se debe a que generaron un halo ligeramente mayor alrededor de sus colonias bacterianas, por lo cual son las muestras que tienen menos producción de sideróforos. *Pseudomonas* (P42) obtuvo un índice de 0.92 a las 48 horas, pero a las 72 horas su índice se incrementó a 1.39, esto se debió a un aumento en el tamaño del halo de las 48 a las 72h. *Stenotrophomonas* (P31) fue la cepa que presentó el mayor índice, tanto a las 48 como a las 72 horas (1.47 y 1.64), seguida de *Bacillus* (P43) con 1.44; estas muestras formaron un halo más grande que el resto de las colonias desde las 48 horas.

En un estudio realizado por Soltani *et al.* (2012), donde evaluaron 25 aislados de *Pseudomonas fluorescens* como controles biológicos sobre el hongo *Rhizoctonia solani*, emplearon el método cualitativo CAS para determinar la producción de sideróforos según la metodología de Alexander y Zuberer (1991) -una metodología distinta a la usada en este trabajo-; los índices de quelación que reportaron para *Pseudomonas* fueron de 0.33 a 1.26, a las 48h, y de 0.32 a 1.23, a las 72 horas de

incubación con 27°C. A pesar de las diferencias en la metodología de evaluación utilizada, estos índices son comparables con los que obtuvimos para las muestras de *Pseudomonas* a las 48 h (Tabla 5); incluso a las 72 h, *Pseudomonas* (P42) presentó un índice de 1.39, un valor más alto que el máximo reportado por Soltani *et al.*, (2012), que fue de 1.23.

En el estudio hecho por El-Moaty *et al.* (2018) en aislados de *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus spp.* provenientes de rizósfera de papa, sembrados en medio nutritivo suplementado con reactivo CAS y hierro al 1 mM e incubados a 37°C por 72 h, se reportó la producción de sideróforos a partir de la medición del diámetro del halo (mm). *Bacillus sp.* presentó diámetros de 4 a 22 mm y *Pseudomonas* de 5 a 18 mm. En nuestro estudio, a las 72h de incubación, los *Bacillus* analizados desarrollaron halos de 14.2 a 25.3 mm, mientras que en *Pseudomonas* fueron de 0.92 a 18.9 mm (Tabla 5).

Kumar (2013) desarrolló un biofertilizante a partir de bacterias aisladas de rizósfera de trigo, maíz, papa, *Aloe vera* y *Bacopa monnieri*. Como parte de la batería de pruebas que se les practicó a los aislados bacterianos para conocer sus capacidades PGPR, se hizo la determinación de la producción de sideróforos a través del método cualitativo de cromo azurol (CAS); reportó una cepa de *Stenotrophomonas maltophilia* que produjo un halo de quelación de entre 11 y 20 mm de diámetro, valor comparable con el obtenido por nosotros para *Stenotrophomonas maltophilia* (P31), que produjo un halo de quelación con diámetro de 21.8 mm (Tabla 5) .

Muestras productoras de sideróforos en medio LB-CAS-Fe	Índice de quelación		SD		Diámetro halo naranja (mm)	
	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h
<i>Bacillus</i> (P45)	1.1 ^E	1.11 ^{AB}	±0.02	±0.03	12.8	14.2
<i>Pseudomonas</i> (P44)		1.22 ^{AB}		±0.16		0.92
<i>Pseudomonas</i> (P42)	0.92 ^F	1.39 ^{AB}	±0.02	±0.07	13.7	18.9
<i>Bacillus</i> (P43)	1.30 ^B	1.44 ^{AB}	±0.02	±0.04	22.6	25.3
<i>Pseudomonas</i> (P41)	1.12 ^{DE}	1.07 ^B	±0.01	±0.02	11.9	12.1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (P31)	1.47 ^A	1.64 ^A	±0.01	±0.02	16.8	21.8
<i>Azospirillum brasilense</i> (ab, control, positivo)	1.21 ^C	1.2 ^{AB}	±0.03	±0.02	11.2	12.7
<i>Bacillus</i> (aF1, control positivo)	1.16 ^D	1.19 ^{AB}	±0.01	±0.03	11.8	13.1

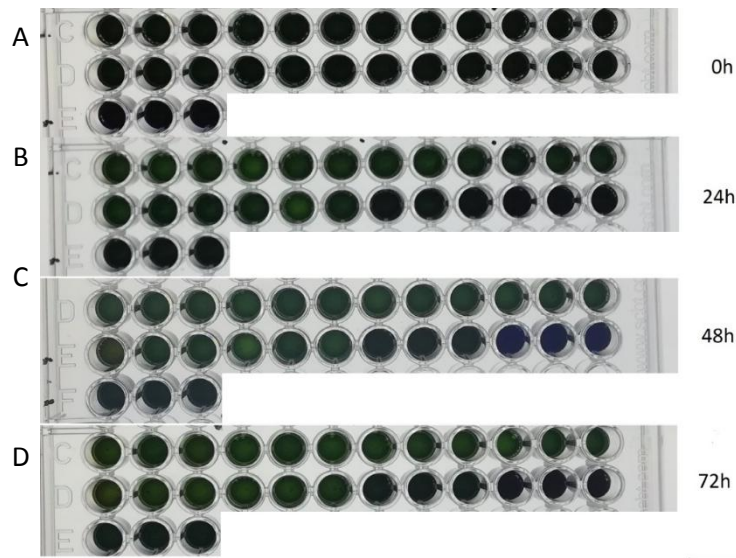
Tabla 5. Índices de quelación de las muestras productoras de sideróforos a las 48 y 72 h. Los índices obtenidos a las 48 horas, se ajustaron a una distribución normal y se compararon sus medias con Tukey ($\alpha = 0.05$); los índices obtenidos a las 72 h no se ajustaron a una distribución normal, por lo que sus medias fueron comparadas con la medida de medias no paramétricas de Dunn ($\alpha = 0.05$). Las letras diferentes reflejan diferencias significativas entre las muestras correspondientes.

7.2 Prueba cuantitativa de sideróforos para Fe en microplaca

Consiste en hacer reaccionar el CAS con los sideróforos presentes en el sobrenadante de las muestras a diferentes tiempos de cultivo, desarrollando una coloración que va de azul a amarillo, pasando por tonalidades intermedias (verdes), en función de la cantidad de sideróforos presentes.

En la Figura 3 se muestran las microplacas en las que llevó a cabo la reacción y, como se puede ver, la coloración de los pozos pasa de ser oscura a las 0h (panel A, en ausencia total de producción de

sideróforos) a irse aclarando entre las 48 y las 72h (punto máximo de producción; paneles C y D, respectivamente).



posición de las muestras en la placa											
P41	P41	P41	P43	P43	P43	P44	P44	P44	P45	P45	P45
AB	AB	AB	aF1	aF1	aF1	test	test	test	Agua	Agua	Agua
med	med	med									

Figura 3. Prueba cuantitativa de sideróforos para Fe en placa de ELISA con reactivo CAS y sobrenadantes de *Pseudomonas* (P41), *Bacillus* (P43), *Pseudomonas* (P44), *Bacillus* (P45), *Azospirillum brasilense* (Ab), *Bacillus licheniformis* (aF1), medio inoculado con agua (Test), alícuotas de agua estéril (agua) y medio estéril sin inocular (med).

Con las absorbancias obtenidas se calculó el porcentaje de quelación con respecto al testigo (CAS con medio inoculado con agua estéril), en donde hay ausencia total de sideróforos (Figura 4). A las 24 horas, *Bacillus* (P43) fue la muestra que mostró un mayor porcentaje de producción de sideróforos (30.99%); a las 48 horas, *Stenotrophomonas* (P31) tuvo el mayor porcentaje (30.24%), junto con el control *Azospirillum brasilense* (30.03%), seguidos de *Pseudomonas* (P42), con 28.98%, y el control *Bacillus licheniformis* (aF1), con 28.92%. A las 72 horas, el control *Azospirillum brasilense* (Ab) mostró el mayor porcentaje de producción de sideróforos, 37.63%, seguido de *Pseudomonas* (P44), con 29.31%, el control *Bacillus licheniformis* (aF1), con 28.56 %, y *Pseudomonas* (P42) con 28.25%, *Stenotrophomonas* (P31) fue la muestra que mostró el menor porcentaje de quelación de sideróforos (24.17%).

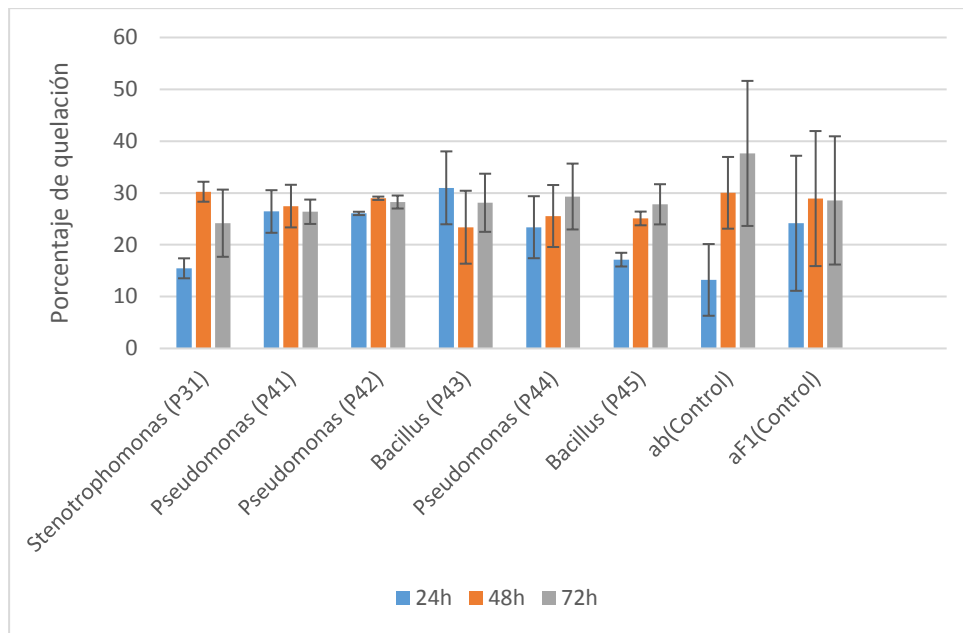


Figura 4. Porcentaje de quelación con respecto al testigo (reactivo CAS con medio inoculado con agua estéril). Los datos mostraron un ajuste de distribución normal y con la prueba de ANOVA ($P > 0.05$) no se determinaron diferencias significativas de los datos a cada tiempo (24, 48 y 72 h).

En el trabajo de Kushwah y colaboradores (2015), analizaron las actividades promotoras del crecimiento vegetal en aislados de *Pseudomonas fluorescens* provenientes de suelos en diferentes localizaciones de Chhattisgarh, India. Estimaron el porcentaje de quelación incubando las cepas de *Pseudomonas* en medio líquido King a $28 \pm 2^\circ \text{C}$ por 3 días, después se retiraron las células bacterianas centrifugándolas a 3000 rpm (5 minutos) y tomando 0.5 mL de los sobrenadantes para hacerlos reaccionar con 0.5 mL de reactivo CAS y 10 μL de ácido sulfosalicílico (éste último utilizado como solución acelerante de la reacción entre el CAS y los sideróforos presentes en el sobrenadante); después de 20 min de incubación en oscuridad a $28 \pm 2^\circ \text{C}$, midieron la absorbancia de la reacción a 630 nm, tomando como referencia la misma mezcla de reactivos adicionada con 0.5 mL de medio sin inocular; reportaron porcentajes de producción de entre 22.37 y 80.15.

En la Tabla 6 se muestran los porcentajes relativos de producción de sideróforos, obtenidos de las 0 a las 72 h de incubación. A las 72 horas se obtuvieron valores entre 26.38 y 29.31 para las *Pseudomonas* que pertenecen a la colección de aislados bacterianos del Laboratorio de Ecología Molecular; a pesar de no ser valores particularmente elevados, son comparables con los obtenidos previamente por Kushwah *et al.*, (2015).

Dar GH, *et al.*, (2018) realizaron la caracterización molecular y evaluación de actividades PGPR de *Bacillus* aislados de la rizósfera de nogal inglés (*Juglans regia*); entre las pruebas realizadas, determinaron la producción de sideróforos con la metodología de Schwyn y Neilands (1987) en la cual crecieron sus aislados bacterianos en medio deficiente de hierro y midieron la densidad celular a 600 nm hasta que las muestras alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento, entonces mezclaron

0.1 mL de sobrenadante de cada muestra con 0.5 mL de reactivo CAS adicionado con 10 μ L de solución acelerante de reacción (0.2 M ácido 5-sulfosalicílico); posteriormente, midieron la absorbancia de las muestras a 630 nm y reportaron porcentajes de quelación de 16.6 a 25.

En el presente trabajo, se consideraron 72 horas como tiempo máximo de incubación de las muestras y los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 6; los *Bacillus* pertenecientes a la colección de aislados bacterianos del Laboratorio de Ecología Molecular presentaron sus más altos porcentajes de producción de sideróforos a las 72 horas de incubación, con valores entre 27.81 y 28.11, ligeramente por encima de los previamente reportados en la literatura consultada.

S.H. Youseif (2018) aisló muestras de *Stenotrophomonas maltophilia* provenientes de la rizósfera de cultivos de maíz, cacahuete, arroz y trigo, en provincias de Egipto, para realizar pruebas *in vitro* de sus actividades PGPR. Para calcular el porcentaje de quelación, tomó 0.5 mL de sobrenadante de cada muestra y lo mezcló con 0.5 mL de reactivo CAS; midió la absorbancia de las muestras a 630 nm, tomando como referencia 0.5 mL de medio no inoculado mezclado con 0.5 mL de reactivo CAS. Los porcentajes de producción de sideróforos que reportó iban de 15.2 a 34.2; en la Tabla 6 reportamos la producción de sideróforos de *Stenotrophomonas* (P31) de las 24 a las 72 horas de incubación, mostrando un porcentaje mínimo de 15.46 (a las 24h) y uno máximo de 30.24 (a las 72 h).

Muestras	%			SD		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
<i>Stenotrophomonas</i> (P31)	15.46	30.24	24.17	±1.93	±6.49	±6.08
<i>Pseudomonas</i> (P41)	26.43	27.47	26.38	±4.11	±2.35	±9.73
<i>Pseudomonas</i> (P42)	26.05	28.98	28.25	±0.32	±1.26	±6.96
<i>Bacillus</i> (P43)	30.99	23.39	28.11	±7.04	±5.61	±3.29
<i>Pseudomonas</i> (P44)	23.39	25.55	29.31	±5.98	±6.36	±2.33
<i>Bacillus</i> (P45)	17.14	25.09	27.81	±1.32	±3.88	±7.23
<i>A. brasilense</i> (Ab; control positivo)	13.23	30.03	37.63	±6.92	±13.99	±8.42
<i>B. licheniformis</i> (aF1; control positivo)	24.15	28.92	28.56	±13.03	±12.37	±3.76

Tabla 6. Porcentaje de quelación de 24 a 72h. Las mediciones se obtuvieron del promedio de la densidad óptica de los ensayos cuantitativos; son el resultado de ensayos independientes por triplicado. Los datos con la fórmula aplicada para obtener el porcentaje de producción de sideróforos mostraron un ajuste de distribución normal y con la prueba de ANOVA ($P > 0.05$) no se determinaron diferencias significativas entre los datos de los tres tiempos evaluados.

7.3 Prueba cualitativa de sideróforos para otros iones

Con la intención de saber si las cepas productoras de sideróforos para hierro eran capaces de producir sideróforos para captar otros iones, se probaron Zn, V, Mo, Cu, Co, Cr, Pb, Ni y Cd (56 ppm); de forma preliminar, fueron preparadas cajas de LB suplementadas con CAS y con un determinado ion, en lugar del FeCl_3 ; se dividieron en cuatro secciones con marcador permanente y se sembraron 30 μ L de muestra por sección, se incubaron en oscuridad a 28°C entre 48 y 72 h; posteriormente, se revisó si había crecimiento de colonia y formación de halos, como se muestra en la Figura 5, donde se sembraron *Chitinophaga* (P12), *Stenotrophomonas* (P31), *Bacillus* (P38), *Pseudomonas* (P32), *Pseudomonas* (P41), *Pseudomonas* (P42), *Pseudomonas* (P44) y *Bacillus* (P43), en presencia del ion

Cr ($K_2Cr_2O_7$). A las 72 mostraron crecimiento y formación de halos, a excepción de *Chitinophaga* (P12), *Bacillus* (P38) y *Pseudomonas* (P32).

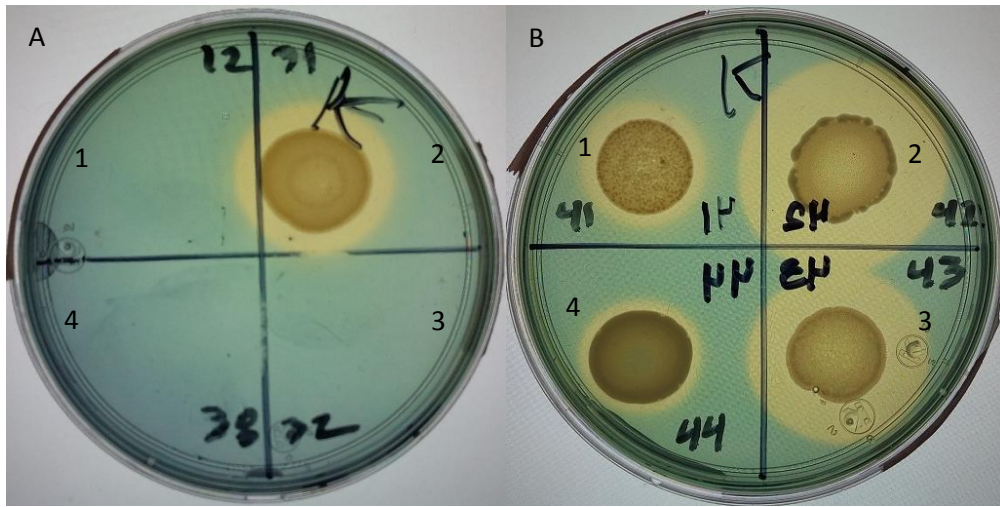


Figura 5. Halos de quelación en medio sólido suplementado con CAS y cromo. Panel A. 1) *Chitinophaga* (P12); 2) *Stenotrophomonas* (P31); 3) *Pseudomonas* (P32); 4) *Bacillus* (P38). Panel B. 1) *Pseudomonas* (P41); 2) *Pseudomonas* (P42); 3) *Bacillus* (P43); 4) *Pseudomonas* (P44), sembradas en medio CAS suplementado con $K_2Cr_2O_7$.

Las muestras que presentaron crecimiento y formación de halo con diferentes iones en la prueba preliminar, se sembraron por triplicado en cajas con medio LB suplementado con CAS y los iones correspondientes.

7.3.1 Actividad de sideróforos en medio CAS suplementado con Níquel.

A las 72 horas, en presencia del ion Ni (NiSO_4), mostraron crecimiento y formación de halos *Pseudomonas* (P42), *Bacillus* (P45) y *Pseudomonas* (P41), además de los controles *Bacillus* (aF1) y *Azospirillum brasilense* (Ab), como se muestra en la Figura 6.

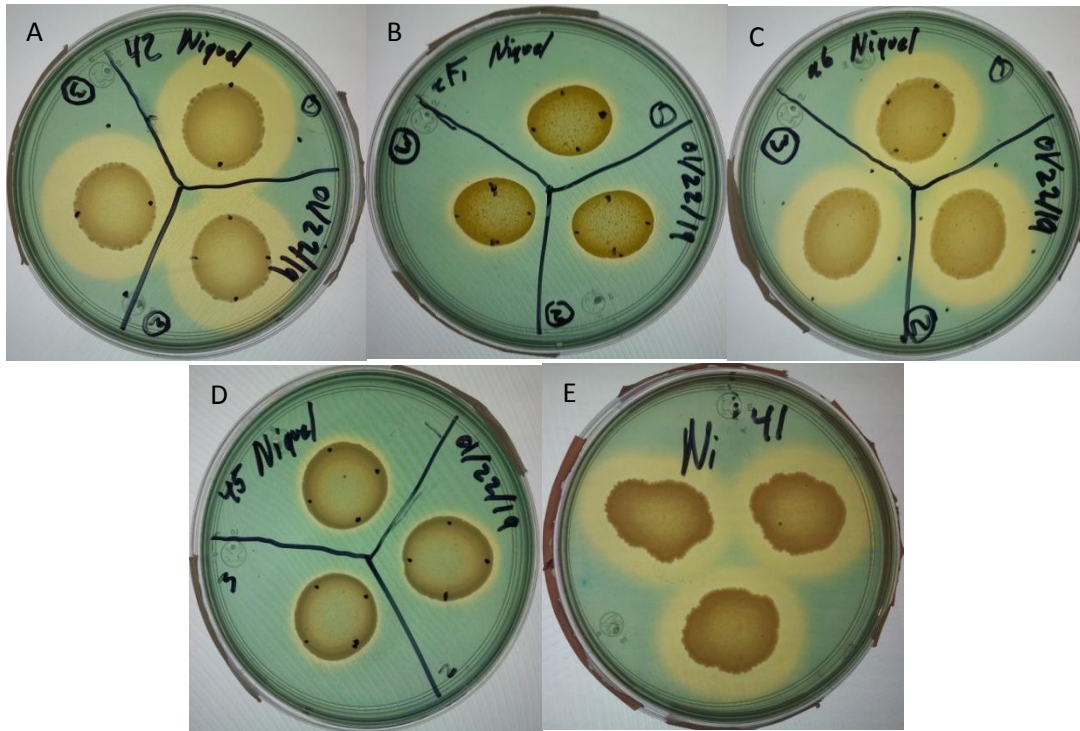


Figura 6. Formación de halos de quelación en medio suplementado con CAS y Níquel. A) *Pseudomonas* (P42); B) control *Bacillus* (aF1); C) *Azospirillum brasilense* (Ab); D) *Bacillus* (P45); E) *Pseudomonas* (P41), sembradas por triplicado en medio suplementado con NiSO_4 . Los resultados presentados corresponden a las 72 horas de incubación.

En la Figura 7 se muestran los índices de quelación de sideróforos obtenidos en las cajas de LB-CAS-Ni de las cepas que crecieron con este ion; se observa a *Pseudomonas* (P42) como una muestra significativamente diferente de las demás por su alto índice (1.50), seguida de *Stenotrophomonas* (P31), con 1.34, y el control *A. brasilense* (Ab), con 1.24; tanto *Bacillus* (P45), como el control *Bacillus* (aF1), son muestras significativamente diferentes de las demás por su bajo índice, de 1.05 y 1.07, respectivamente. A las 72 horas, *Pseudomonas* (P42) continuó mostrando el más alto índice de quelación (1.63), seguido del control *A. brasilense*, con 1.50, y *Stenotrophomonas* (P31), con 1.35; *Bacillus* (P45) fue significativamente diferente a las demás muestras por su bajo índice de quelación (1.07) incluso a las 72 horas de incubación.

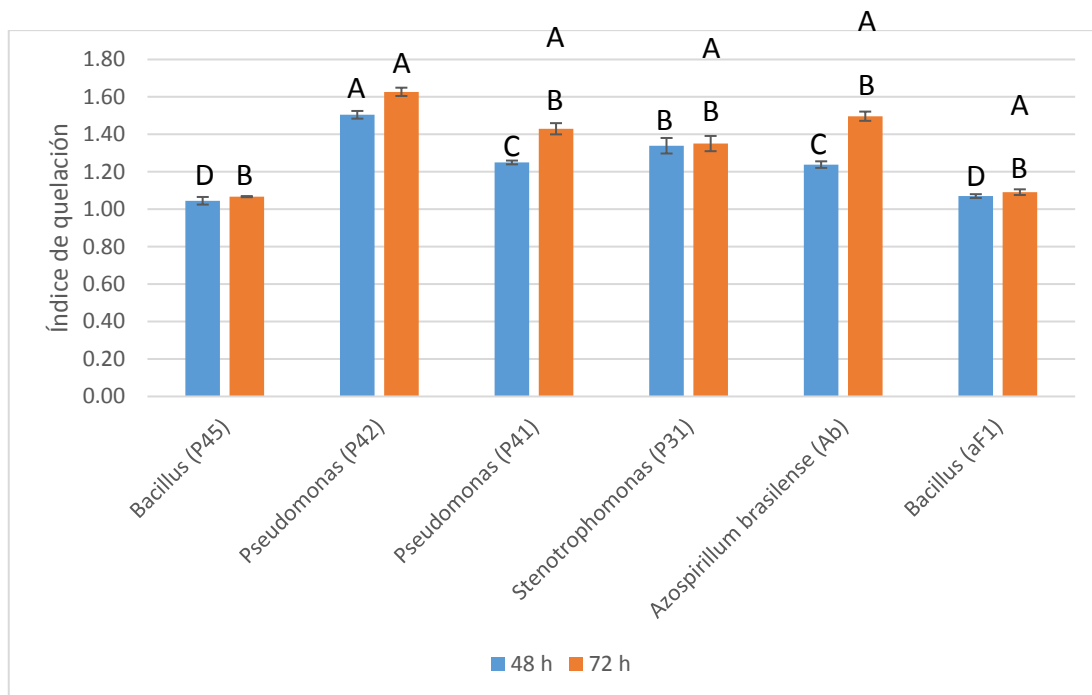


Figura 7. Índices de quelación en medio LB suplementado con CAS y Níquel. Los datos de las 48 horas mostraron un ajuste de distribución normal y se pudieron comparar con Tukey ($\alpha = 0.05$); los datos de las 72 horas no mostraron un ajuste de distribución normal y se compararon con la medida no paramétrica de Dunn ($\alpha = 0.05$).

Patel y colaboradores (2018), publicaron una modificación al medio cromo azul S para determinar la producción de sideróforos con diferentes iones aparte del Fe^{3+} , cambiando el FeCl_3 por $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , CuCl_2 , CoCl_2 , HgCl_2 o AgNO_3 y poniéndolo a prueba con *Alcaligenes* sp y *Pseudomonas aeruginosa* aisladas del jardín del Departamento de Microbiología de la Universidad PSGVP Mandal, Shahada. Las cepas bacterianas fueron inoculadas en medio MS a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, con agitación de 120 rpm por 48h; posteriormente, *Pseudomonas* fue sembrada en cajas de con medio CAS sólido modificado con un ion determinado, a 28°C por 24 horas, y mostraron crecimiento colonial y formación de halo. En presencia de níquel, reportaron a *Pseudomonas* como un “positivo fuerte”, sin embargo, no realizaron mediciones del diámetro del halo ni de la colonia. Dentro del artículo Patel (2018) se menciona que son escasos los reportes de métodos modificados del medio CAS para determinar sideróforos para otros iones. Larios-Bayona (2014) menciona que el níquel es necesario para el crecimiento y el metabolismo de las plantas, por lo que deben ser necesarios sideróforos específicos para este ion.

7.3.2 Actividad de sideróforos en medio CAS suplementado con Cobre.

En presencia del ion Cu (CuCl_2), mostraron crecimiento y formación de halos *Bacillus* (P45), *Pseudomonas* (P44), *Bacillus* (P43), *Pseudomonas* (P42), *Pseudomonas* (P41), *Stenotrophomonas* (P31), además de los controles *Azospirillum brasilense* (Ab) y *Bacillus* (aF₁), como se muestra en la Figura 8.

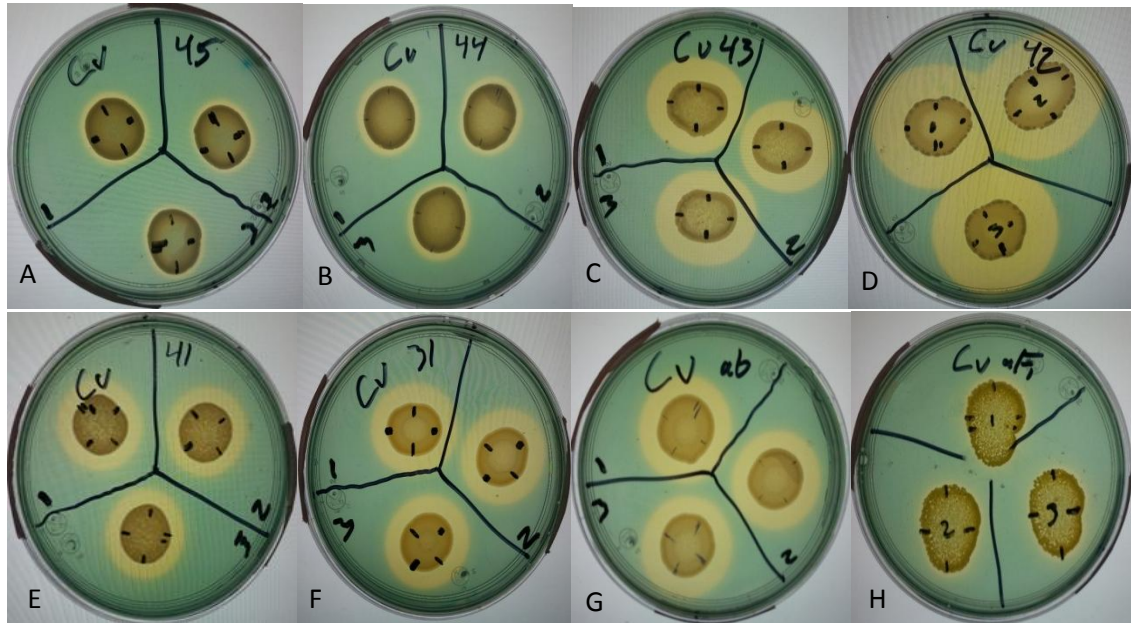


Figura 8. formación de halos de quelación en medio suplementado con CAS y Cobre. A) *Bacillus* (P45), B) *Pseudomonas* (P44), C) *Bacillus* (P43), D) *Pseudomonas* (P42), E) *Pseudomonas* (P41), F) *Stenotrophomonas* (P31) y los controles G) *Azospirillum brasilense* (Ab) y H) *Bacillus* (aF₁), sembradas por triplicado en medio suplementado con CuCl_2 . Los resultados presentados corresponden a las 72 horas de incubación.

En la Figura 9 se muestran los índices de quelación de sideróforos obtenidos en las cajas de LB-CAS-Cu de las cepas que crecieron con este ion. A las 48 horas, *Pseudomonas* (P42) mostró diferencias significativas respecto a las demás cepas por su alto índice de quelación (1.75), seguida de *Bacillus* (P43) con 1.43. Tanto *Bacillus* (P45) como el control *Bacillus* (aF₁) fueron muestras significativamente diferentes a las demás por su bajo índice de quelación (1.11 y 1.02). A las 72 horas, *Pseudomonas* (P42) siguió siendo una muestra diferente a las demás por su alto índice (2.02), seguida de *Bacillus* (P43) con 1.64; el control *Bacillus* (aF₁) siguió siendo otra muestra diferente a las demás por su bajo índice (1.02).

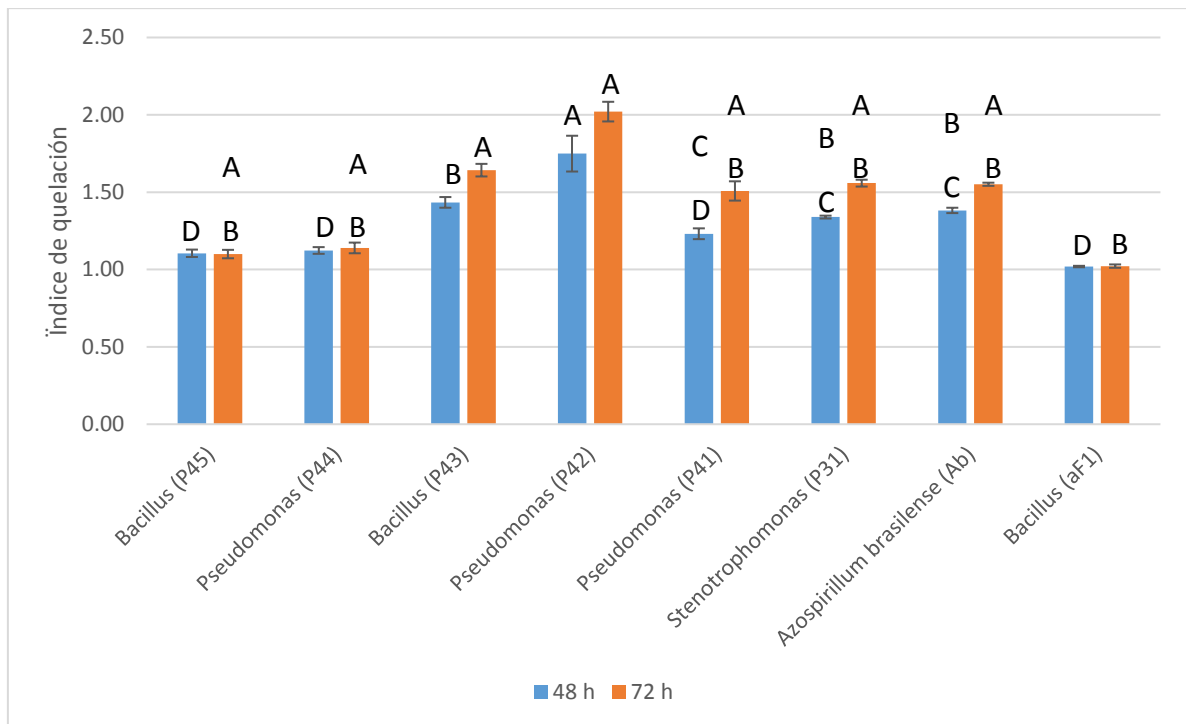


Figura 9. Índices de quelación en medio LB suplementado con CAS y Cobre. Los datos de las 48 horas mostraron un ajuste de distribución normal y se pudieron comparar con Tukey ($\alpha = 0.05$), los datos de las 72 horas no mostraron un ajuste de distribución normal y se compararon por la medida no paramétrica de Dunn ($\alpha = 0.05$).

Patel *et al.* (2018) mencionan que son escasos los reportes de métodos modificados del medio CAS para determinar sideróforos con otros iones, sin embargo, reportan que, en presencia de Cobre, *Pseudomonas* es un “positivo muy fuerte”, sin embargo, no realizaron mediciones de diámetro de halo y colonia. Por su parte, Larios-Bayona (2014) dice que el cobre actúa como estabilizador de la clorofila, impidiendo su degradación precoz.

7.3.3 Actividad de sideróforos en medio CAS suplementado con Cromo.

En presencia del ion Cr ($K_2Cr_2O_7$), las cepas en estudio que mostraron crecimiento y formación de halos fueron *Bacillus* (P45), *Pseudomonas* (P42), *Pseudomonas* (P41), *Stenotrophomonas* (P31), además de los controles *Azospirillum brasilense* (Ab) y *Bacillus* (aF₁), como se muestra en la Figura 10.

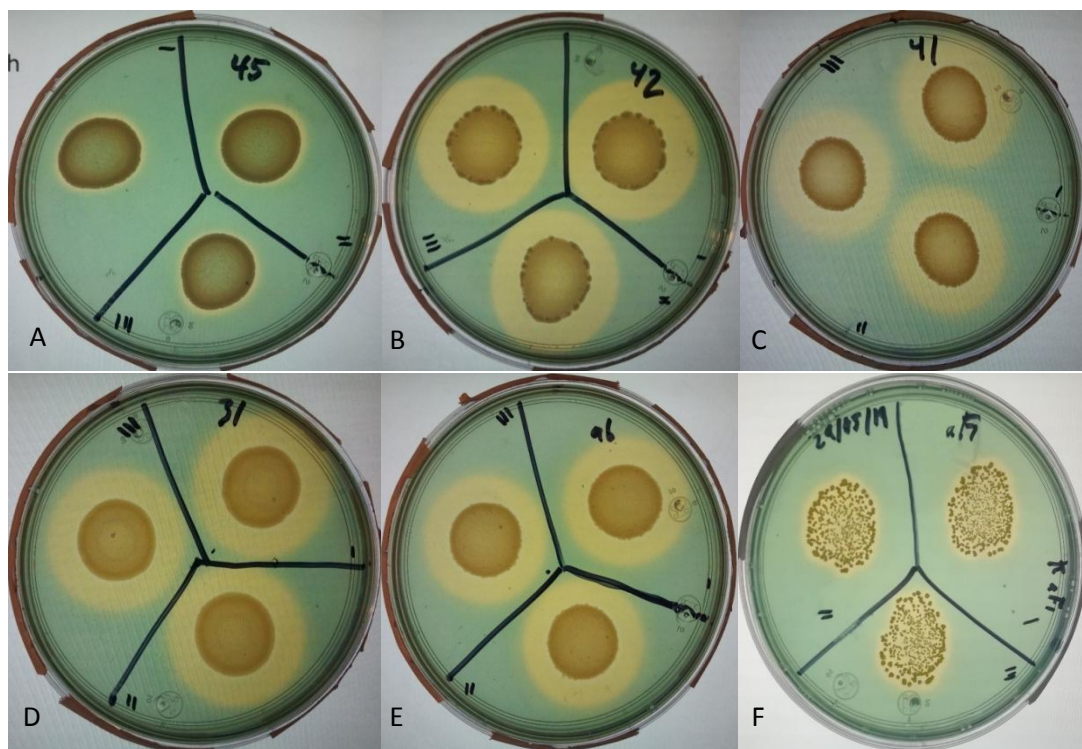


Figura 10. Formación de halos de quelación en medio suplementado con CAS y Cromo. A) *Bacillus* (P45), B) *Pseudomonas* (P42), C) *Pseudomonas* (P41), D) *Stenotrophomonas* (P31), y los controles E) *Azospirillum brasilense* (Ab) y F) *Bacillus* (aF₁), sembradas por triplicado en medio suplementado con $K_2Cr_2O_7$. Los resultados corresponden a las 72 horas de incubación.

En la Figura 11 se muestran los índices de quelación de sideróforos obtenidos en las cajas de LB-CAS-Cr de las cepas que crecieron con este ion, se observa a las 48 horas que, a pesar de no haber diferencias significativas entre las muestras, *Pseudomonas* (P42) y el control *A. brasilense* son las que tienen el mayor índice de quelación (1.58), seguidas de *Stenotrophomonas* (P31), con 1.42, y *Bacillus* (P45) es la muestra con el menor índice (1.14). A las 72 horas, *Pseudomonas* (P24) es significativamente diferente a las demás muestras por su alto índice (1.74), seguida de *Stenotrophomonas* (P31), con 1.67. *Bacillus* (P45) fue significativamente diferente de las demás muestras por su bajo índice (1.06).

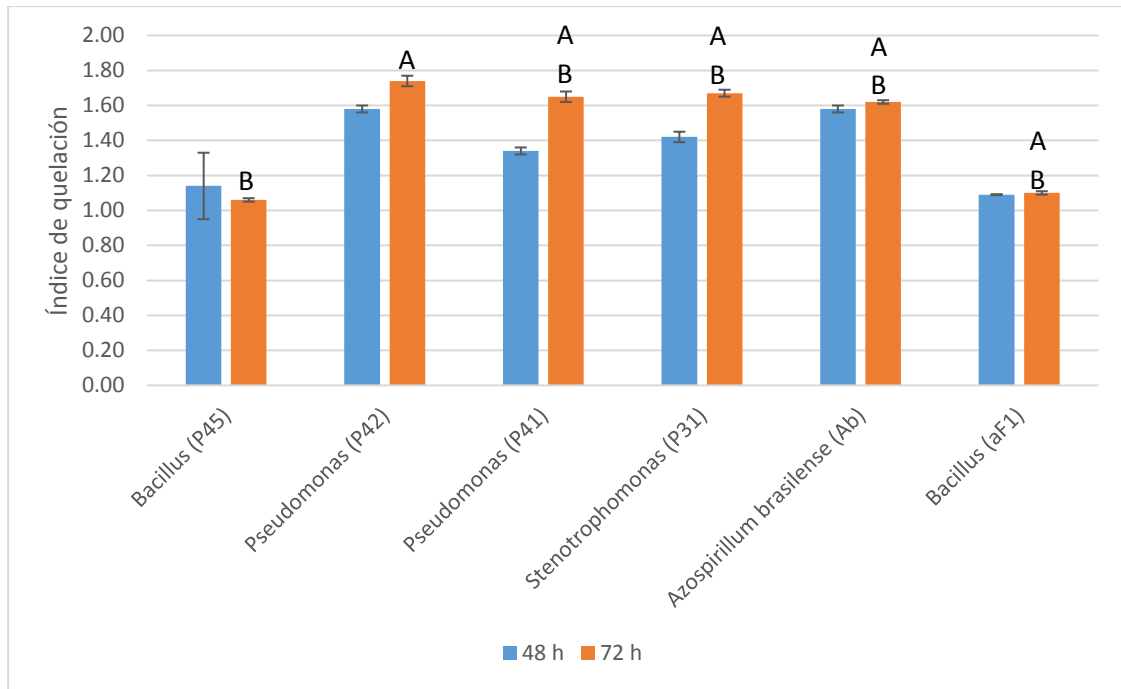


Figura 11. Índices de quelación en medio LB suplementado con CAS y cromo. Los datos de las 48 y 72 h no mostraron un ajuste de distribución normal, se les aplicó la prueba de Wilcoxon y la comparación de medias de Dunn ($\alpha = 0.05$), excepto los datos de las 48 h ya que no mostraron diferencias significativas entre ellos

En el caso de este ion no se han reportado trabajos donde se use como suplemento del reactivo CAS. La determinación de sideróforos para Cromo, al igual que su índice de quelación, puede ser de interés ya que, Benjumeda-Muñoz (2017), reporta al ion Cr como un contaminante del suelo que puede ser quelado por los sideróforos microbianos para llevar a cabo procesos de bioremediación.

7.3.4 Actividad de sideróforos en medio CAS suplementado con Zinc.

En presencia del ion Zn ($ZnSO_4$), mostraron crecimiento y formación de halos *Bacillus* (P45), *Bacillus* (P43), *Pseudomonas* (P42), *Pseudomonas* (P41), *Stenotrophomonas* (P31), además de los controles *Azospirillum brasilense* (Ab) y *Bacillus* (αF_1), como se muestra en la Figura 12.

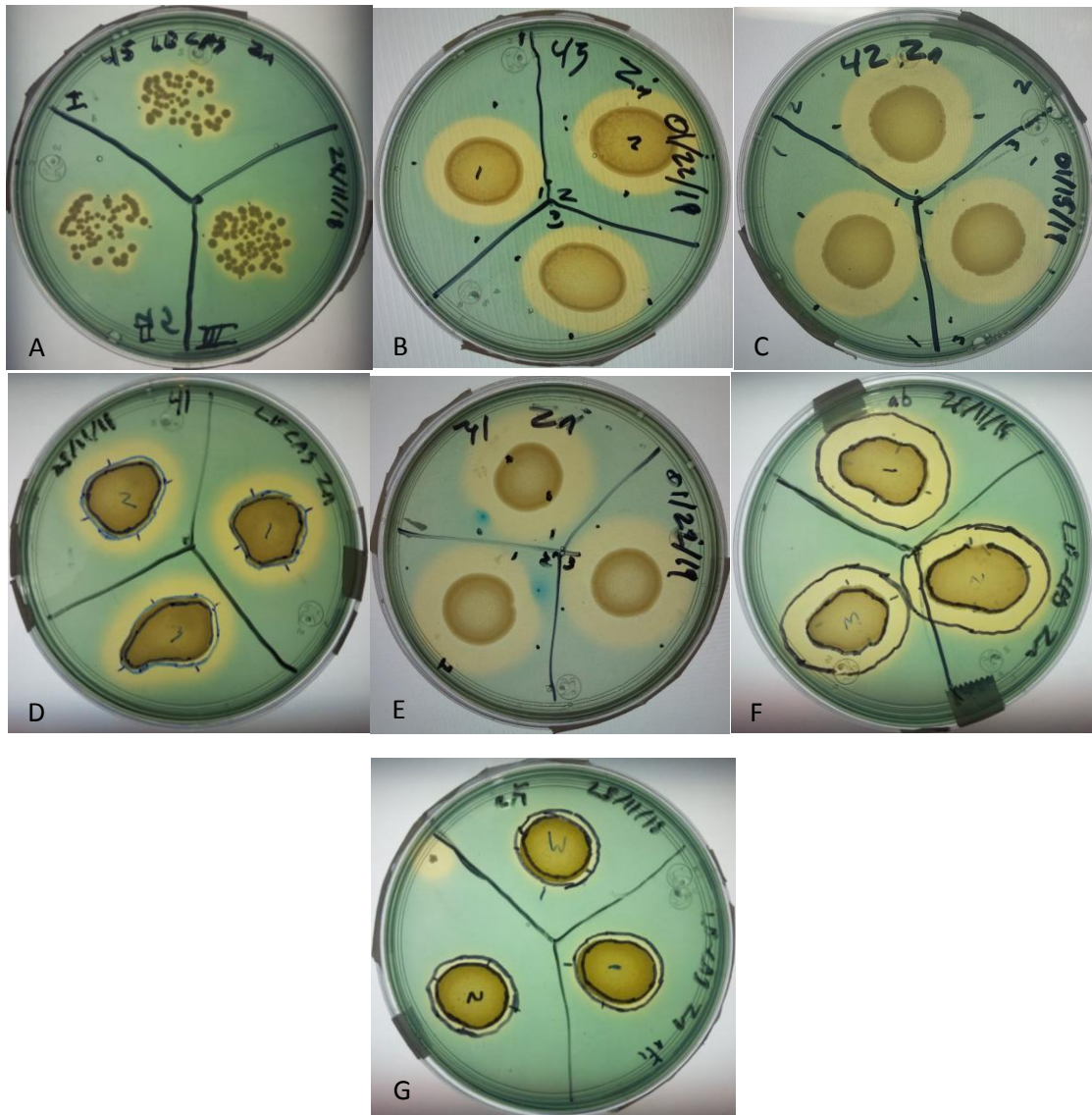


Figura 12. Formación de halos de quelación en medio suplementado con CAS y Zinc. A) *Bacillus* (P45), B) *Bacillus* (P43), C) *Pseudomonas* (P42), D) *Pseudomonas* (P41), E) *Stenotrophomonas* (P31) y los controles positivos F) *Azospirillum brasilense* (Ab) y G) *Bacillus* (αF_1), sembradas por triplicado en medio suplementado con $K_2Cr_2O_7$. Los resultados corresponden a las 72 horas de incubación.

En la Figura 13 se muestran los índices de quelación de sideróforos obtenidos en las cajas de LB-CAS-Zn de las cepas que crecieron con este ion. A las 48 horas, *Pseudomonas* (P42) es la muestra con el mayor índice de quelación (1.69) y es significativamente diferente a las demás muestras, seguida de *Pseudomonas* (P41), con 1.48, y *Stenotrophomonas* con 1.42. *Bacillus* (P45) mostró un comportamiento significativamente diferente de las demás por su bajo índice de quelación (1.04). A las 72 horas, *Pseudomonas* (P42) siguió siendo diferente a las demás muestras por su índice (1.82), seguida de *Stenotrophomonas* (P31), con 1.74, y el control *A. brasilense*, con 1.64. *Bacillus* (P45) mostró diferencia respecto a las demás cepas por su bajo índice (1.02).

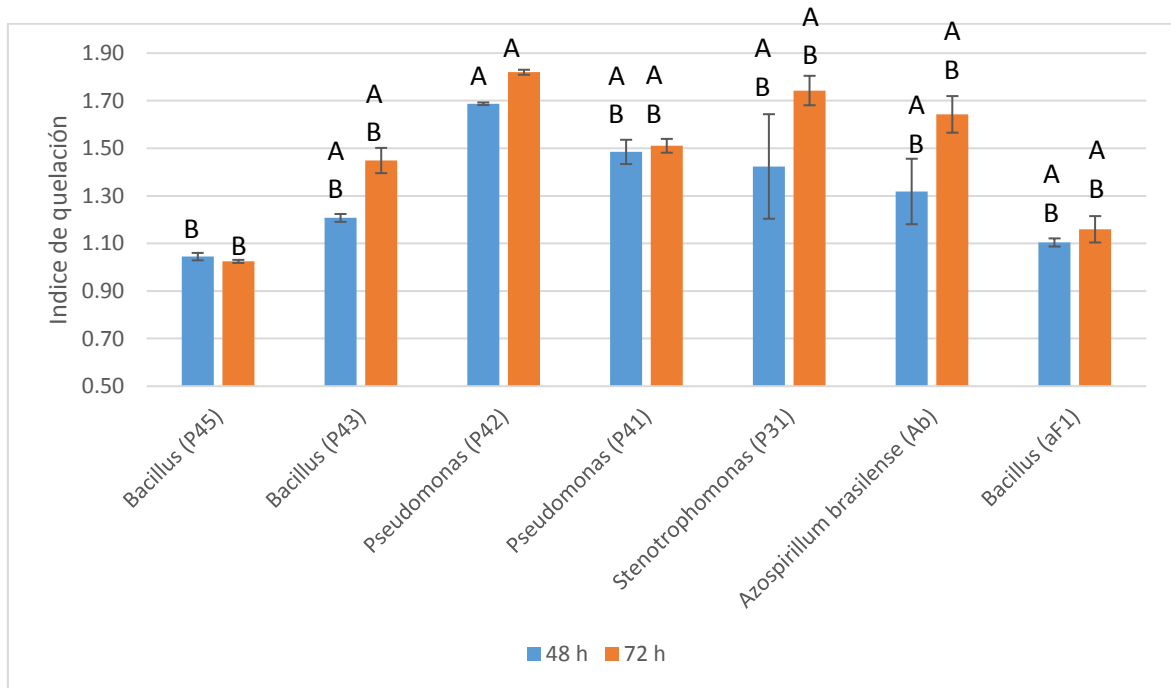


Figura 13. Índices de quelación en medio LB suplementado con CAS y Zinc. Los datos de las 48 y 72 h no se ajustaron a una distribución normal, por lo que se les aplicó la prueba de Wilcoxon y la comparación de medias de Dunn ($\alpha = 0.05$).

Patel *et al.* (2018) reportaron que *Pseudomonas*, en presencia de zinc, tuvo un comportamiento “positivo”, sin embargo, no realizaron mediciones de diámetro de halo y colonia. Larios-Bayona (2014) reportó que, en la planta, el zinc interviene en la formación de auxinas y está relacionado con la asimilación de calcio, fósforo y magnesio.

7.3.5 Actividad de sideróforos en medio CAS suplementado con Molibdeno.

En presencia del ion Mo (NaMoO_4), mostraron crecimiento y formación de halos *Bacillus* (P45), *Pseudomonas* (P42), *Pseudomonas* (P41), *Stenotrophomonas* (P31), además de los controles *Azospirillum brasilense* (Ab) y *Bacillus* (aF₁), como se muestra en la Figura 14.

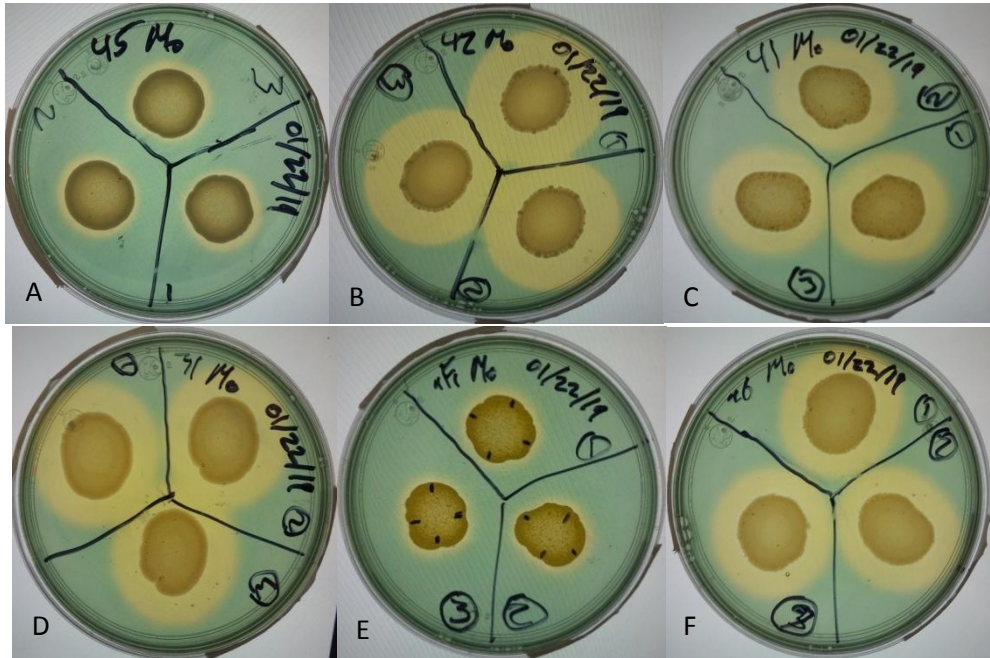


Figura 14. Formación de halos de quelación en medio suplementado con CAS y Molibdeno. A) *Bacillus* (P45), B) *Pseudomonas* (P42), C) *Pseudomonas* (P41), D) *Stenotrophomonas* (P31) y los controles positivos E) *Azospirillum brasilense* (Ab) y F) *Bacillus* (aF₁), sembradas por triplicado en medio suplementado con MoCl_2 . Los resultados corresponden a las 72 horas de incubación.

En la Figura 15 se muestra los índices de quelación de sideróforos obtenidos en las cajas de LB-CAS-Mo de las cepas que crecieron con este ion. A las 48 horas, *Pseudomonas* (P42) mostró un comportamiento significativamente diferente de las demás muestras por un índice de quelación alto (1.70), seguido de *Stenotrophomonas* (P31) con un índice de 1.44 y el control *A. brasilense* (Ab) con un índice de 1.29, *Bacillus* (P45) es una muestra significativamente diferente por su bajo índice de quelación (1.10). A las 72 horas, *Pseudomonas* (P42) siguió siendo diferente a las demás muestras, con un índice de 1.86, seguido de *Stenotrophomonas* (P31), con 1.64, y el control *A. brasilense* (Ab), con 1.61. *Bacillus* (P45) fue diferente a las demás muestras por su bajo índice (1.11).

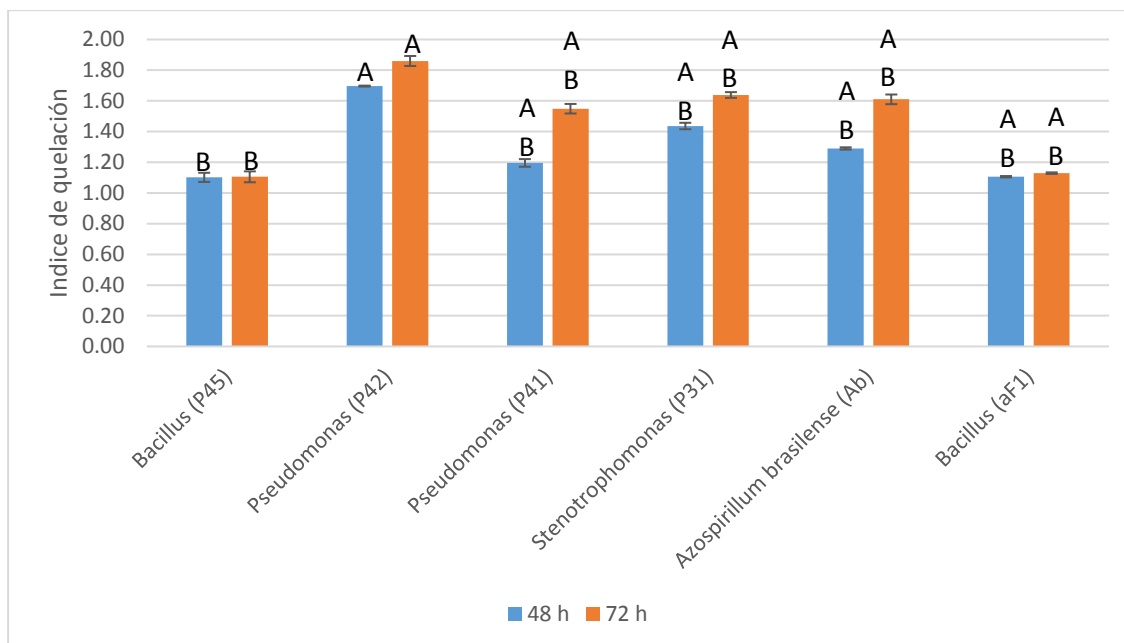


Figura 15. Índices de quelación de sideróforos en medio LB suplementado con CAS y Molibdeno. Los datos de las 48 y 72 h no se ajustaron a una distribución normal, por lo que se les aplicó la prueba de Wilcoxon y la comparación de medias de Dunn ($\alpha = 0.05$).

En el caso de este ion no se han reportado trabajos donde se use como suplemento del reactivo CAS. La determinación de sideróforos para Molibdeno, al igual que su índice de quelación, puede ser de interés ya que, Bellenger y colaboradores (2008), mencionan que el Molibdeno en conjunto con el Fe, son cofactores para la enzima nitrogenasa, enzima que interviene en la fijación del nitrógeno.

7.3.6 Actividad de sideróforos en medio CAS suplementado con Vanadio.

En presencia del ion V (NaVO_3), mostraron crecimiento y formación de halos *Bacillus* (P45), *Pseudomonas* (P42), *Pseudomonas* (P41), *Stenotrophomonas* (P31), además de los controles *Azospirillum brasilense* (Ab) y *Bacillus* (aF₁), como se muestra Figura 16.

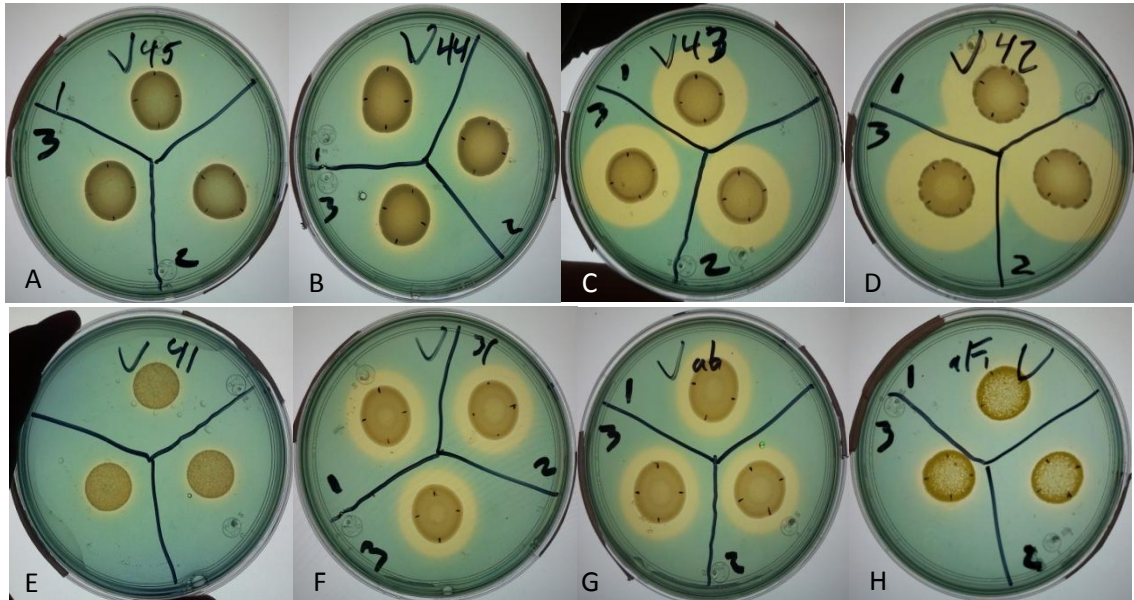


Figura 16. Formación de halos de quelación en medio suplementado con CAS y Vanadio. A) *Bacillus* (P45), B) *Pseudomonas* (P44), C) *Bacillus* (P43), D) *Pseudomonas* (P42), E) *Pseudomonas* (P41), F) *Stenotrophomonas* (P31) y los controles positivos G) *Azospirillum brasilense* (Ab) y H) *Bacillus* (aF₁), sembradas por triplicado en medio suplementado con NaVO_3 . Los resultados corresponden a las 72 horas de incubación.

En la Figura 17 se muestran los índices de quelación de sideróforos observados en las cajas de LB-CAS-V de las cepas que crecieron con este ion. A las 48 horas, *Pseudomonas* (P42) muestra diferencias significativas respecto a las demás por su alto índice de quelación (1.72), le siguen *Bacillus* (P43), con 1.55; tanto *Stenotrophomonas* (P31) como *A. brasilense*, mostraron un índice de quelación de 1.22. *Bacillus* (P45) mostró un comportamiento significativamente diferente de las demás por su bajo índice (1.03). A las 72 horas, *Pseudomonas* (P42) siguió siendo diferente de las demás muestras, con un índice de 2.03, seguida de *Bacillus* (P43), con 1.82, *Stenotrophomonas* (P31), con 1.47, y el control *Azospirillum brasilense* (Ab), con 1.46. *Bacillus* (P45) siguió mostrando un índice bajo (1.04), significativamente diferente a las demás muestras.

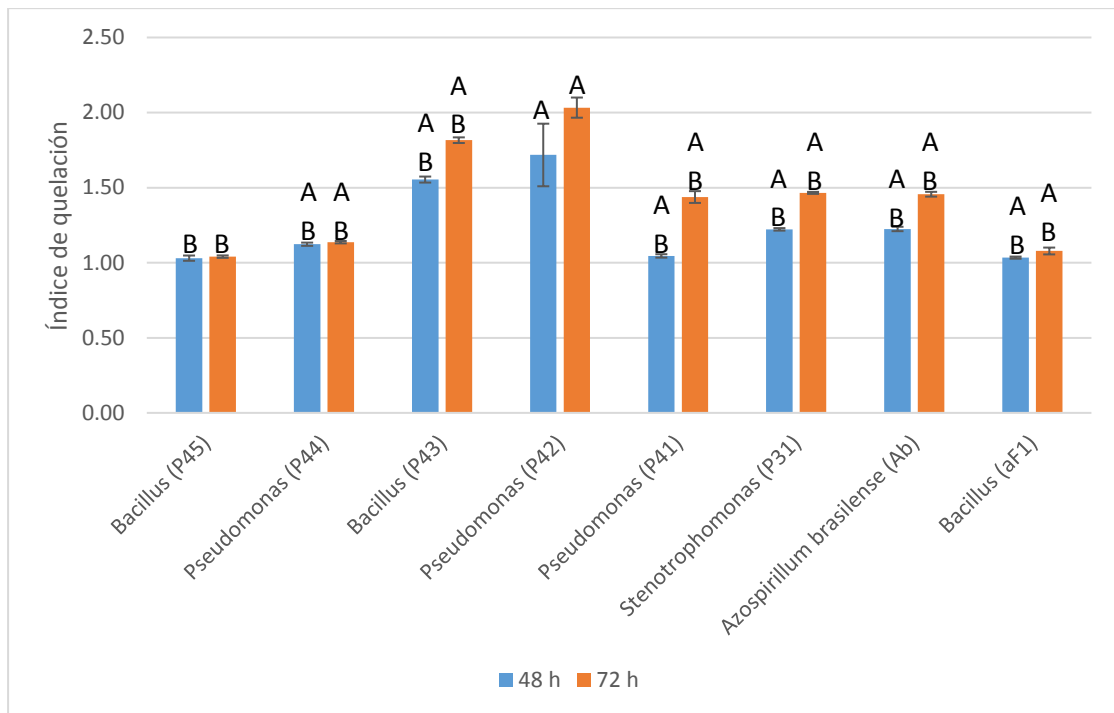


Figura 17. Índices de quelación de sideróforos en medio LB suplementado con CAS y Vanadio. Los datos de las 48 y 72 h no se ajustaron a una distribución normal, por lo que se les aplicó la prueba de Wilcoxon y la comparación de medias de Dunn ($\alpha = 0.05$).

En el caso de este ion no se han reportado trabajos donde se usó como suplemento del reactivo CAS. La determinación de sideróforos para Vanadio, al igual que su índice de quelación, puede ser de interés ya que, Bellenger y colaboradores (2008), reportaron que el Vanadio puede sustituir al Molibdeno como cofactor para la enzima nitrogenasa, enzima que interviene en la fijación del nitrógeno.

7.3.7 Actividad de sideróforos en medio CAS suplementado con Cadmio.

En presencia del ion Cd (CdCl_2), mostraron crecimiento y formación de halos *Bacillus* (P45), *Pseudomonas* (P42), *Pseudomonas* (P41), *Stenotrophomonas* (P31), así como los controles *Azospirillum brasilense* (Ab) y *Bacillus* (aF₁), como se muestra en la Figura 18.

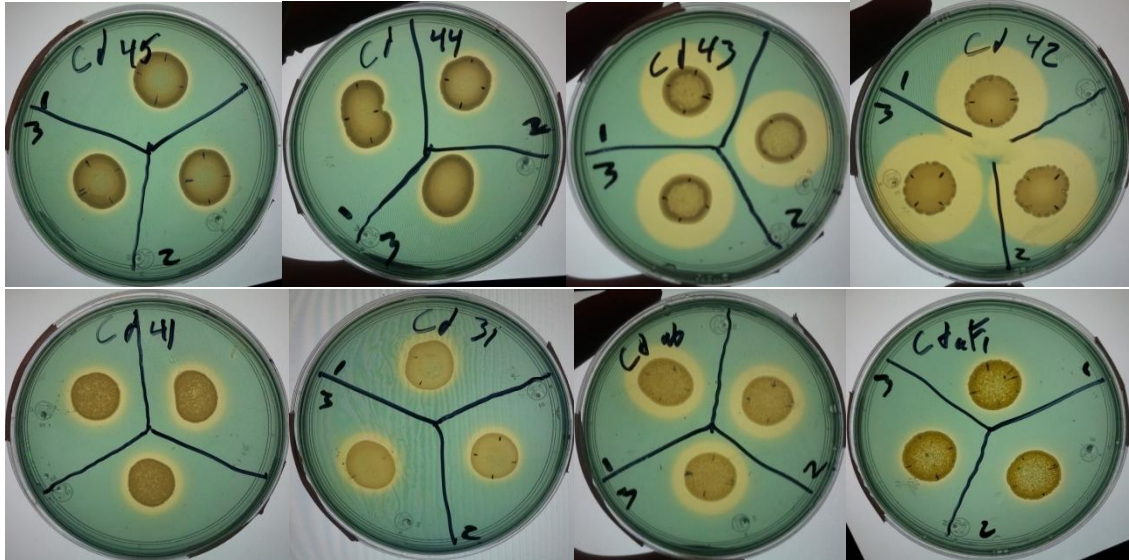


Figura 18. Formación de halos de quelación en medio suplementado con CAS y Cadmio. A) *Bacillus* (P45), B) *Pseudomonas* (P44), C) *Bacillus* (P43), D) *Pseudomonas* (P42), E) *Pseudomonas* (P41), F) *Stenotrophomonas* (P31) y los controles positivos G) *Azospirillum brasilense* (Ab) y H) *Bacillus* (aF₁), sembradas por triplicado en medio suplementado con CdCl_2 . Los resultados corresponden a las 72 horas de incubación.

En la Figura 19 se muestran los índices de quelación de sideróforos obtenidos en las cajas de LB-CAS-Cd de las cepas que crecieron con este ion. A las 48 horas, *Pseudomonas* (P42) mostró diferencia significativa respecto a las demás cepas por su alto índice (1.73), seguida de *Bacillus* (P43), con 1.48, y el control *A. brasilense* (Ab), con 1.13; tanto *Pseudomonas* (P41) como *Stenotrophomonas* (P31), no mostraron formación de halo. El control *Bacillus* (aF₁) mostró diferencia significativa respecto a las demás por su bajo índice (1.04). A las 72 horas, *Pseudomonas* (P42) se mantuvo significativamente diferente de las demás por su alto índice (2.02), seguida por *Bacillus* (P43), con 1.87, y *A. brasilense* (Ab), con 1.49; el control *Bacillus* (aF₁) fue diferente de las demás muestras por su bajo índice (1.04).

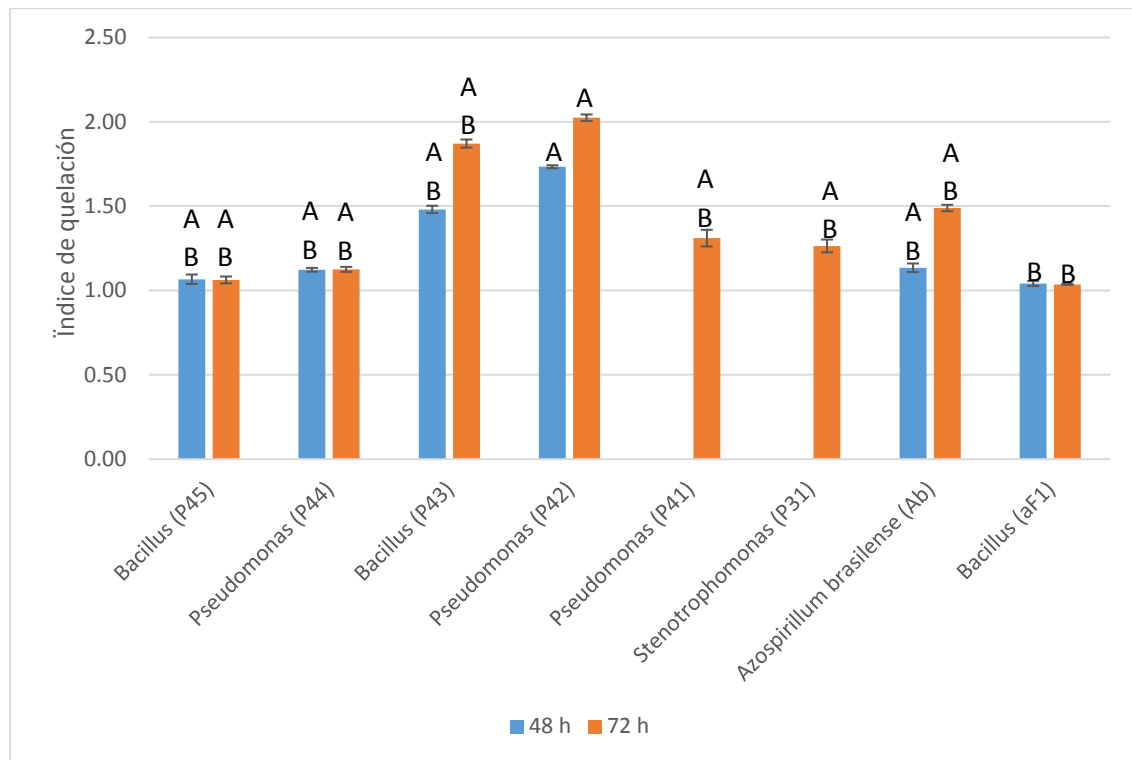


Figura 19. Índices de quelación de sideróforos en medio LB suplementado con CAS y Cadmio. Los datos de las 48 y 72 h no se ajustaron a una distribución normal, por lo que se les aplicó la prueba de Wilcoxon y la comparación de medias de Dunn ($\alpha = 0.05$).

Sayed y colaboradores (2013) investigaron el rol que pueden tener los sideróforos de bacterias PGPR en la bioremediación de metales pesados, modificando el medio cromo azulol cambiando el FeCl_3 por $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , CuCl_2 y CoCl_2 , a pesar de no usar Cd dentro de los iones a prueba, citaron a Aiken *et al.* (2003), quienes reportan que los sideróforos se pueden unir a iones divalentes, entre ellos el Cadmio el cual, según González-Chávez (2005), es un metal tóxico que puede ser enlazado por los sideróforos para removerlo del ambiente.

7.3.8 Actividad de sideróforos en medio CAS suplementado con Cobalto.

En presencia del ion Co (CoCl_2), mostraron crecimiento y formación de halos *Bacillus* (P45), *Pseudomonas* (P42), *Pseudomonas* (P41), *Stenotrophomonas* (P31), además de los controles *Azospirillum brasilense* (Ab) y *Bacillus* (aF₁), como se muestra en la Figura 20.

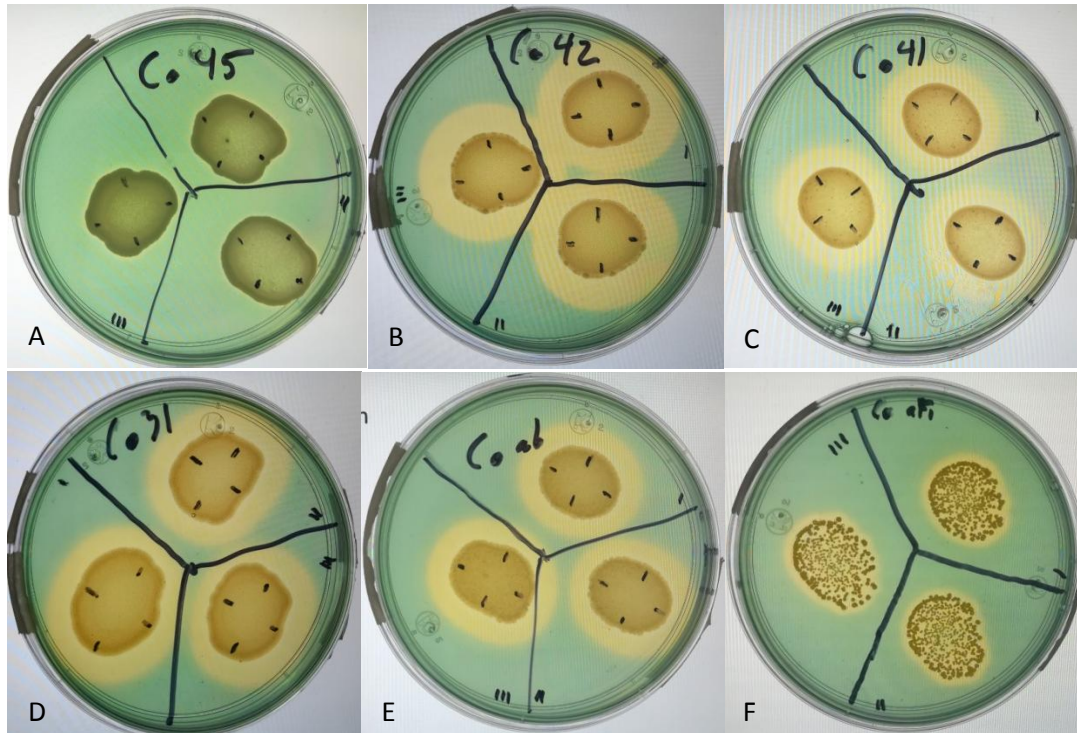


Figura 20. Formación de halos de quelación en medio CAS y Cobalto. A) *Bacillus* (P45), B) *Pseudomonas* (P42), C) *Pseudomonas* (P41), D) *Stenotrophomonas* (P31) y los controles positivos E) *Azospirillum brasilense* (Ab) y F) *Bacillus* (aF₁), sembradas por triplicado en medio suplementado con CoCl_2 . Los resultados presentados corresponden a las 72 horas de incubación.

En la Figura 21 se muestran los índices de quelación de sideróforos obtenidos en las cajas de LB-CAS-Co de las cepas que crecieron con este ion. A las 48 horas, *Pseudomonas* (P42) mostró diferencia significativa respecto a las demás cepas por su alto índice (1.54), seguida de *Stenotrophomonas* (P31), con 1.32, así como *Pseudomonas* (P41) y el control *A. brasilense* (Ab), ambas con 1.26; *Bacillus* (P45) mostró diferencia significativa respecto a las demás por su bajo índice (1.01). A las 72 horas, *Pseudomonas* (P42) se mantuvo significativamente diferentes a las demás cepas por su alto índice (1.66), seguida del control *A. brasilense* (Ab), con 1.50, y *Pseudomonas* (P41), con 1.48; *Bacillus* (P45) fue diferente a las demás muestras por su bajo índice (1.02).

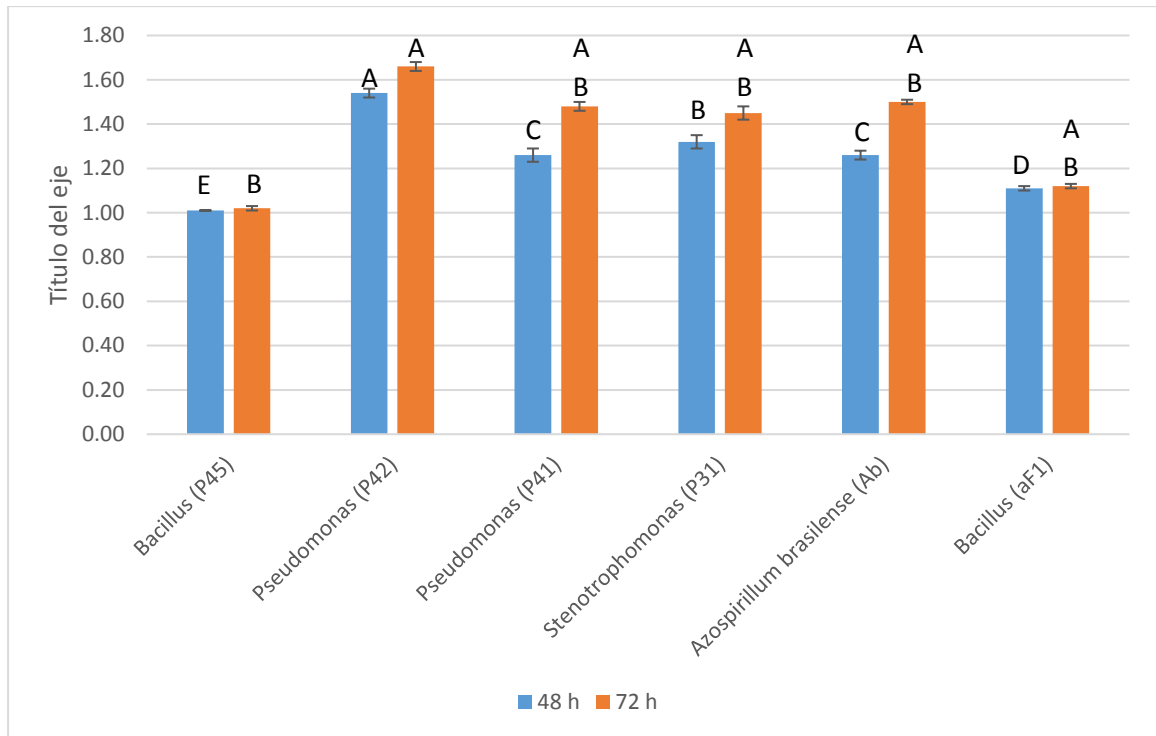


Figura 21. Índices de quelación de sideróforos en medio LB suplementado con CAS y Cobalto. Los datos de las 48 y 72 horas no se ajustaron a una distribución normal, por lo que se les aplicó la prueba de Wilcoxon y comparación de medias con la prueba de Dunn ($\alpha = 0.05$).

Patel *et al.* (2018) reportaron que *Pseudomonas*, en presencia de Cobalto, tuvo un comportamiento como un “positivo fuerte”, sin embargo, no realizaron mediciones de diámetro de halo y colonia. Larios Bayona (2014) reportó que el Cobalto es esencial para fijación de nitrógeno.

7.3.9 Actividad de sideróforos en medio CAS suplementado con Plomo.

En presencia del ion Pb ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$), mostraron crecimiento y formación de halos *Bacillus* (P45), *Pseudomonas* (P42), *Pseudomonas* (P41), *Stenotrophomonas* (P31), así como los controles positivos *Azospirillum brasilense* (Ab) y *Bacillus* (aF₁), como se muestra en la Figura 22 .

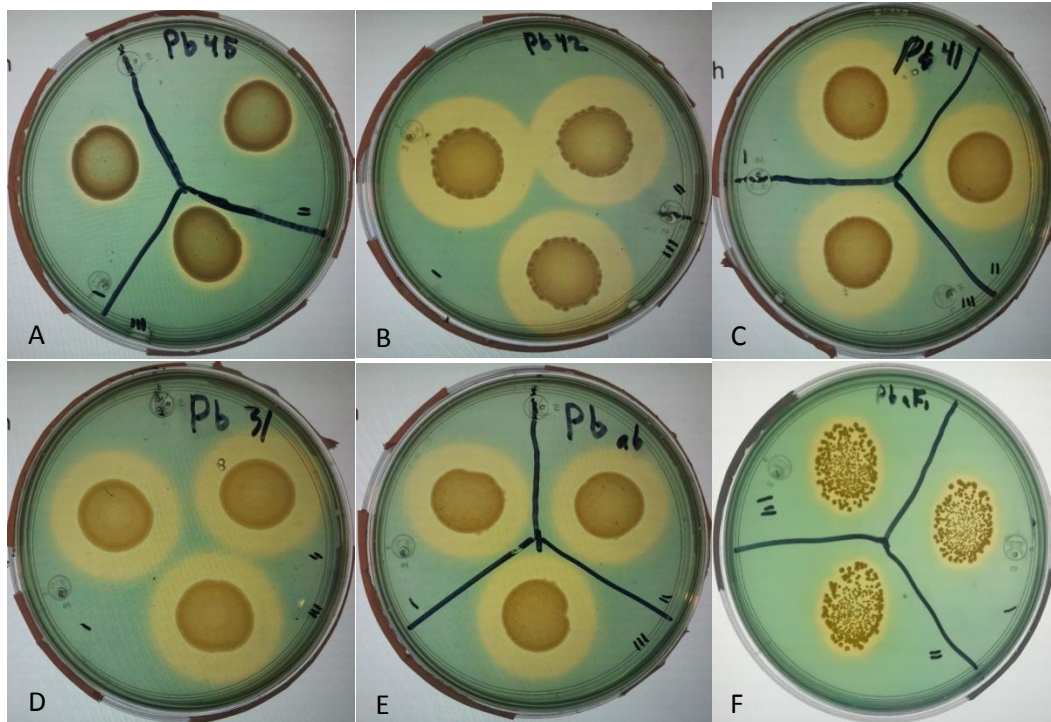


Figura 22. Formación de halos de quelación en medio CAS y Plomo; A) *Bacillus* (P45), B) *Pseudomonas* (P42), C) *Pseudomonas* (P41), D) *Stenotrophomonas* (P31), y los controles positivos E) *Azospirillum brasilense* (Ab) y F) *Bacillus* (aF₁), sembradas por triplicado en medio suplementado con PbCl_2 . Los resultados corresponden a las 72 horas de incubación.

En la Figura 23 se muestran los índices de quelación de sideróforos obtenidos en las cajas de LB-CAS-Pb de las cepas que crecieron con este ion. A las 48 horas, *Pseudomonas* (P42) mostró diferencia significativa respecto a las demás cepas por su alto índice (1.63), seguida de *Stenotrophomonas* (P31), con 1.42, y *Pseudomonas* (P41), con 1.36; tanto *Bacillus* (P45) como el control *Bacillus* (aF₁) mostraron diferencias significativas respecto a las demás muestras por sus bajos índices, de 1.05 y 1.09, respectivamente. A las 72 horas, *Pseudomonas* (P42) se mantuvo significativamente diferente a las demás por su alto índice (1.79), seguida tanto de *Stenotrophomonas* (P31) como de *Pseudomonas* (P41), ambas con 1.69; *Bacillus* (P45) fue diferente de las demás muestras por su bajo índice (1.09).

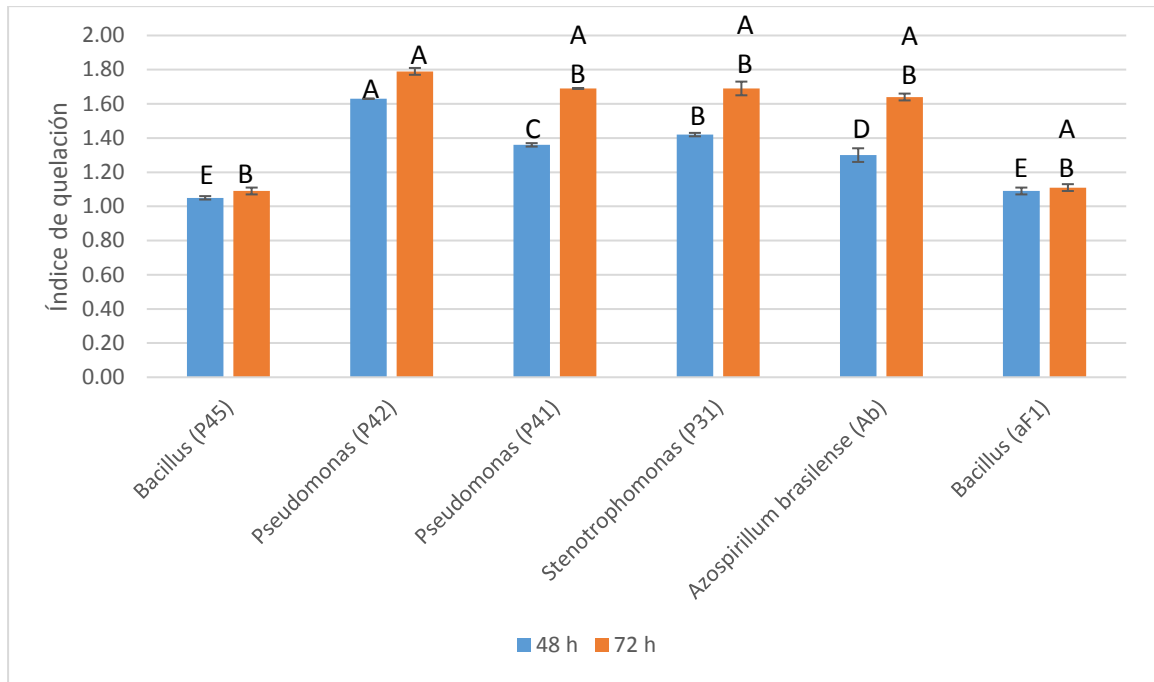


Figura 23. Índices de quelación de sideróforos en medio LB suplementado con CAS y Plomo. Los datos de las 48 y 72 horas no se ajustaron a una distribución normal, por lo que se les aplicó la prueba de Wilcoxon y comparación de medias con la prueba de Dunn ($\alpha = 0.05$).

Sayed, Patel y Reddy (2013), investigaron el rol que pueden tener los sideróforos producidos por bacterias con actividad PGPR en la bioremediación de metales pesados, a través de la modificación del ion presente en el medio de cultivo suplementado con cromo azulol; cambiaron el FeCl_3 por $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , CuCl_2 o CoCl_2 . A pesar de no usar Pb dentro de los iones a prueba, citaron a Aiken *et al.* (2003), quienes reportaron la presencia de sideróforos que se pueden unir a iones divalentes como el Pb. Por su parte, González-Chávez (2005) reporta que el plomo es un metal tóxico que puede ser enlazado por los sideróforos para removerlo del ambiente.

8 - Conclusiones

Se determinó, de forma cualitativa en un medio suplementado con hierro, que 6 de las 45 cepas bacterianas aisladas de *E. platyacanthus*, pertenecientes a la colección del Laboratorio de Ecología Molecular, son las productoras de sideróforos.

De forma cualitativa se determinó que, de las 6 muestras productoras de sideróforos con hierro, *Stenotrophomonas* (P31) mostró el mayor índice de quelación a las 48 y 72 horas (1.47 y 1.64, respectivamente); *Pseudomonas* (P42) mostró el menor índice a las 48 horas (0.92) y *Pseudomonas* (P41) mostró el menor índice de quelación (1.07) a las 72 horas.

De forma cuantitativa se determinó el porcentaje de quelación de las 6 muestras productoras y se determinó que las muestras con mayor porcentaje fueron: a las 24 horas, *Bacillus* (P43) con 27.57%, a las 48 horas, *Stenotrophomonas* (P31) con 30.24%, y a las 72 horas, el control positivo *A. brasilense* con 37.63%, seguido de *Pseudomonas* (P44), con 29.31 %.

Se determinó la producción cualitativa de sideróforos en presencia de diferentes iones (Zn, V, Mo, Cu, Co, Cr, Pb, Ni y Cd) a 56 ppm; *Pseudomonas* (P42) mostró el mayor índice de quelación a las 48 y 72 horas con todos los iones; por su parte, *Bacillus* (P45) y el control positivo *Bacillus* (aF1) mostraron el menor índice de quelación a las 48 y 72 horas con todos los iones.

9 - Bibliografía:

- Aguado-Santacruz, G, A. IMPACTO DE LOS SIDERÓFOROS MICROBIANOS Y FITOSIDERÓFOROS EN LA ASIMILACIÓN DE HIERRO POR LAS PLANTAS: UNA SÍNTESIS. Rev. Fitotec. Mex. Vol. 35 (1): 9 - 21, 2012
- Ahmadzadeh, M. *et al.* Identification of some molecular traits in fluorescent pseudomonads with antifungal activity. IRANIAN JOURNAL of BIOTECHNOLOGY, October 2006; 4; 4; 247
- Ahmed, E. Holmström, J.M. Siderophores in environmental research: roles and applications. Microbial Biotechnology 2014; 7; 196–208.
- Alanís Flores, G.J. Velazco Macías, C.G. Importancia de las cactáceas como recurso natural en el noroeste de México. CIENCIA UANL, 2008; 11; 1; 6-10
- Bellenger, J.P. *et al.* Uptake of molybdenum and vanadium by a nitrogen-fixing soil bacterium using siderophores. Nature Geoscience 2008; 1; 4; 243.
- Benjumeda-Muñoz, D. Bacterias Promotoras Del Crecimiento Vegetal: Mecanismos y Aplicaciones (Revisión Bibliográfica). Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, 2017. Trabajo de fin de grado. [12 enero 2020], disponible en: <http://hdl.handle.net/11441/65140>.
- Chávez-Ambriz, L.A. *et al.* Aislados de *Bacillus* provenientes de la rizósfera de cactus incrementan la germinación y la floración de *Mammillaria* spp. (Cactaceae) Revista Argentina de Microbiología, 2016 [12 enero 2020], disponible en <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2016.09.001>

- CONAZA. Priorizarán atención a comunidades de extrema marginación de las zonas áridas y en proceso de desertificación, [27 septiembre 2019], disponible en: <https://www.gob.mx/conaza/prensa/priorizaran-atencion-a-comunidades-de-extrema-marginacion-de-las-zonas-aridas-y-en-proceso-de-desertificacion-198461>
- D.B Alexander, D.A Zuberer. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Department of Soil and Crop Sciences, Texas A&M University, Texas Agricultural Experiment Station, College Station, TX 77843, USA. *Biol Fertil Soils* (1991) 12:39-45
- Dar H.G. *et al.* Molecular characterization of rhizobacteria isolated from walnut (*Juglans regia*) rhizosphere in Western Himalayas and assessment of their plant growth promoting activities. *BIODIVERSITAS*, 2018; 19; 2; 712-719.
- De Liñán, C. Vademecum de productos fitosanitarios y nutricionales 2008. EDICIONES AGROTECNICAS, Madrid, España [22 abril 2020] disponible en: http://agroquimicosdemexico.com/ejm_aminoacidos.php
- Dimkpa, C. Microbial siderophores: Production, detection and application in agriculture and environment. *Endocytobiosis and Cell Research* 2016; 27; 2; 7-16
- El-Moaty, N.M.A *et al.* Isolation, characterization, and evaluation of multi-trait plant growth promoting rhizobacteria for their growth promoting. *Middle East Journal of Applied Science* 2018; 08; 02; 554-566.
- Estrada-González, A. J. (2017) Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias asociadas a *Opuntia* spp. y su efecto en la germinación y crecimiento de *Arabidopsis thaliana* L. INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A. C. Tesis de Maestría, [13 enero 2020], disponible en: <http://ipicyt.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1010/1674>.
- FAO, 2011. La FAO se moviliza para detener la pérdida de recursos genéticos. Nuevo impulso a la diversidad vegetal mundial. [27 septiembre 2019], disponible en: <http://www.fao.org/news/story/es/item/116092/icode/>.
- Fruns Luis, E.E. La vida en los desiertos mexicanos. *CACTÁCEAS y suculentas mexicanas*. 2010; 55; 1; 26-28.
- Giménez, G. Héau Lambert, C. El desierto como territorio, paisaje y referente de identidad. *CULTURALES*, Universidad Autónoma de Baja California, 2007; 3; 5; 7-10
- González-Chávez, M.C. (2005) RECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON METALES PESADOS UTILIZANDO PLANTAS Y MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS. *TIERRA Latinoamericana*, 2005; 23; 1; 29-33..
- Hernández MH. La vida en los desiertos mexicanos. Colección La Ciencia para Todos. Fondo de Cultura Económica, 2006; 213; 188.
- Hernández, J.G. Chavéz R.J. Sánchez E.M. Diversidad y estrategias para la conservación de cactáceas en el semidesierto queretano. *CONABIO. Biodiversitas*, 2007; 70; 6-9

- Jiménez Sierra, C.L. 2011. Las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan. Revista digital Universitaria, UNAM, [27 septiembre 2019], disponible en: www.revista.unam.mx › vol.12 › num1 › art04 › art04
- Kumar, A. (2013). DEVELOPMENT OF A LIQUID BIOFERTILIZER WITH INDIGENOUS MICROBIAL STRAINS OF HIMACHAL PRADESH. Csk Himachal Pradesh Agriculture University Palampur [1 octubre 2019], disponible en: <https://shodhganga.inflibnet.ac.in/handle/10603/10663>.
- Kushwah, R. Agrawal, T. Kotasthane, A.S. Biochemical and functional characterisation of acetaminase producing fluorescent Pseudomonas inhabiting chhattisgarh soils. Journal of Bio Innovation, Issue 6 06 2015. [30 marzo 2020] Disponible en: <https://jbino.com/ar.htm>
- Larios Bayona, M. (2014) NIVELES DE Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb Y Zn EN LOS SUELOS DE RIBERA DE LA CUENCA DEL RIO TURIA. Universidad Autónoma de Barcelona [1 octubre 2019], disponible en:
<http://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=2ahUKEwioj42bwv7kAhVKd6wKHTYWCwAQFjABegQIAhAC&url=http%3A%2F%2Fdigital.csic.es%2Fbitstream%2F10261%2F141280%2F1%2FTesis-Larios.pdf&usg=AOvVaw3j7HbzHdlBnXO93WBign49>
- Louden, B.C. Haarmann, D. Lynne M.A. Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection. JOURNAL OF MICROBIOLOGY & BIOLOGY EDUCATION, 2011; 12; 1; 51-53.
- Manoj, K. et al. Saline Soil-based Agriculture by Halotolerant Microorganism. Springer editorial. 2019;130.
- Medrano González, F. Las zonas áridas y semiáridas de México y su vegetación. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), 2012; 1; 40-48
- Naveen Kumar, A. Verma, M. Modified microplate method for rapid and efficient estimation of siderophores produced by bacteria. Biotech 2017; 7; 381-383.
- Patel, P.R. Shalkh, S. S. Sayyed, R. Z. (2018) Modified Chrome azurol S method for detection and estimation of siderophores having affinity for metal ions other than iron. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/325327907>.
- Ruiz de Velasco, F.R. Conservación, manejo y aprovechamiento sustentable de la vida silvestre. Instituto Nacional de Ecología y Cambio climático. SEMARNAT. [14 enero 2020], disponible en: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/286/ramirez.html>
- Salinas-Virgen L.I. (2019). Identificación y caracterización de la actividad PGPR de bacterias rizosféricas y endófitas aisladas de Echinocactus platyacanthus (biznaga dulce) creciendo en condiciones silvestres y de invernadero en el semidesierto queretano. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Departamento del hombre y su ambiente, Maestría en Ciencias Agropecuarias. Tesis de Maestría.
- Salinas-Virgen, L. I. (2015). Aislamiento y caracterización mediante técnicas microbiológicas y de biología molecular de bacterias promotoras del crecimiento obtenidas de la rizósfera de la

cactácea *Echinocactus platyacanthus* (biznaga dulce) del semidesierto de Querétaro. Departamento de Sistemas Biológicos, UAM-Xochimilco, México. Reporte de servicio social.

Santos, Diaz. M.S, Pérez, Molphe, E. Ramírez, Malagón, R. Núñez, Palenius H.G. Ochoa, Alejo, N. Mexican threatened Cacti: Current Status and Strategies for Their Conservation, Chapter 1. Species Diversity and Extinction, Nova Science Publisher, Inc. 2010; 14, 19-30, 34-35.

Sayed, R.Z. Patel, P. R. Reddy, M. S. (2013) ROLE OF PGPR IN THE BIOREMEDIATION OF HEAVY METAL IONS AND PLANTS GROWTH-PROMOTION OF WHEAT AND PEANUT GROWN IN HEAVY METAL CONTAMINATED SOIL. Capitulo siete del libro Recent advances in Biofertilizers and Biofungicides (PGPR) for sustainable Agriculture, Cambridge scholars publishing. [5 abril 2020] disponible en: https://www.researchgate.net/publication/274068216_Role_of_PGPR_in_Bioremediation_of_heavy_Metal_ions_and_plant_growth_Promotion_of_wheat_and_peanut_grown_in_heavy_metal_contaminated_soil

Schwyn, B. Neilands, J.B. Universal Assay for the detection and Determination of Siderophores. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 1987; 160; 47-56

Soltani, A.A. *et al.* Evaluation of Biological Control Traits in Some Isolates of Fluorescent Pseudomonads and flavobacterium. Journal of Agricultural Science 2012; 4; 1; 165-170

Youseif S.H. Genetic diversity of plant growth promoting rhizobacteria and their effects on the growth of maize plants under greenhouse conditions. Annals of Agricultural Sciences 63 (2018) 25–35.

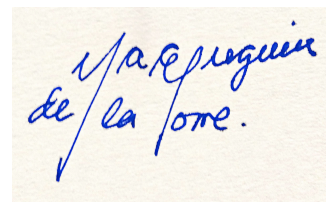
Vo. Bo. de asesores

Al reporte de Servicio social titulado:

Caracterización de bacterias rizosféricas y endófitas productoras de sideróforos, aisladas de *Echinocactus platyacanthus* (biznaga dulce)



Dr. Hugo César Ramírez Saad
Asesor Interno



Dra. María Eugenia de la Torre Hernández
Asesor Externo

10 - Anexos

10.1 - Calendario de actividades

Actividad	Junio	Julio	sept	oct	Nov	dic	enero
Preparación de los medios con CAS	+						
Preparación de inóculos	+						
ensayo cualitativo	+	+	+				
Selección de cepas productoras de sideróforos	+	+	+				
Ensayo cuantitativo			+	+	+		
Prueba de cepas seleccionadas con diferentes metales					+	+	+
Lectura de material bibliográfico	+	+	+	+	+	+	+
Escritura de reporte		+	+	+	+	+	+

10.2 – Índices de quelación de bacterias productoras de sideróforos con Mo, Ni, Zn, V, Cd, Cu, Cr, Pb y Co.

Índice de quelación de cepas en LB-CAS-Zn						
muestras	Índice de quelación		sd		diámetro halo naranja(cm)	
	48 h	72 h	48 h	72h	48 h	72h
<i>Bacillus</i> (P45)	1.04 ^B	1.02 ^B	±0.016	±0.006	2.12	2.17
<i>Bacillus</i> (P43)	1.21 ^{AB}	1.45 ^{AB}	±0.017	±0.053	2.19	2.76
<i>Pseudomonas</i> (P42)	1.69 ^A	1.82 ^A	±0.005	±0.011	3.08	3.49
<i>Pseudomonas</i> (P41)	1.48 ^{AB}	1.51 ^{AB}	±0.051	±0.029	2.77	2.88
<i>Stenotrophomonas</i> (P31)	1.42 ^{AB}	1.74 ^{AB}	±0.220	±0.062	2.56	3.08
<i>Azospirillum brasilense</i> (control)	1.32 ^{AB}	1.64 ^{AB}	±0.138	±0.077	2.81	3.48
<i>Bacillus control</i> (aF ₁)	1.10 ^{AB}	1.16 ^{AB}	±0.017	±0.055	2.25	2.3

Tabla 7. Índice de quelación de cepas en medio CAS suplementadas con Zinc a las 48 y 72 h

Índice de quelación de cepas en LB-CAS-Mo						
Muestras	Índice de quelación		sd		diámetro halo naranja(cm)	
	48 h	72 h	48 h	72h	48 h	72h
<i>Bacillus (P45)</i>	1.10 ^B	1.11 ^B	±0.030	±0.036	1.92	2.07
<i>Pseudomonas (P42)</i>	1.70 ^A	1.86 ^A	±0.003	±0.033	3.04	3.52
<i>Pseudomonas (P41)</i>	1.20 ^{AB}	1.55 ^{AB}	±0.025	±0.031	2.15	2.88
<i>Stenotrophomonas (P31)</i>	1.44 ^{AB}	1.64 ^{AB}	±0.021	±0.019	2.85	3.41
<i>Azospirillum brasilense (control)</i>	1.29 ^{AB}	1.61 ^{AB}	±0.007	±0.032	2.45	3.22
<i>Bacillus control (aF₁)</i>	1.11 ^{AB}	1.13 ^{AB}	±0.004	±0.005	1.88	1.95

Tabla 8. Índice de quelación de cepas en medio CAS suplementadas con Molibdeno a las 48 y 72 h

Relación diámetro halo/diámetro colonia de cepas en LB-CAS-Ni						
Muestras	Índice de quelación		sd		diámetro halo naranja(cm)	
	48 h	72 h	48 h	72h	48 h	72h
<i>Bacillus (P45)</i>	1.05 ^D	1.07 ^B	±0.020	±0.003	2.12	2.22
<i>Pseudomonas (P42)</i>	1.50 ^A	1.63 ^A	±0.021	±0.022	3.03	3.4
<i>Pseudomonas (P41)</i>	1.25 ^C	1.43 ^{AB}	±0.01	±0.03	2.73	3.33
<i>Stenotrophomonas (P31)</i>	1.34 ^B	1.35 ^{AB}	±0.041	±0.041	2.52	2.62
<i>Azospirillum brasilense (Ab)</i>	1.24 ^C	1.50 ^{AB}	±0.018	±0.025	2.39	3.03
<i>Bacillus (aF₁)</i>	1.07 ^D	1.09 ^{AB}	±0.010	±0.015	1.93	1.99

Tabla 9. Índice de quelación de cepas en medio CAS suplementadas con Níquel a las 48 y 72 h

Relación diámetro halo/diámetro colonia de cepas en LB-CAS-Cu						
Muestras	Índice de quelación		sd		diámetro halo naranja(cm)	
	48 h	72 h	48 h	72h	48 h	72h
<i>Bacillus (P45)</i>	1.11 ^D	1.10 ^{AB}	±0.02	±0.03	1.81	1.89
<i>Pseudomonas (P44)</i>	1.12 ^D	1.14 ^{AB}	±0.02	±0.03	1.89	2.01
<i>Bacillus (P43)</i>	1.43 ^B	1.64 ^{AB}	±0.03	±0.04	2.40	2.87
<i>Pseudomonas (P42)</i>	1.75 ^A	2.02 ^A	±0.12	±0.06	3.11	3.73
<i>Pseudomonas (P41)</i>	1.23 ^{CD}	1.51 ^{AB}	±0.03	±0.06	1.88	2.45
<i>Stenotrophomonas (P31)</i>	1.34 ^{BC}	1.56 ^{AB}	±0.01	±0.02	2.11	2.68
<i>Azospirillum brasilense(control)</i>	1.38 ^{BC}	1.55 ^{AB}	±0.02	±0.01	2.32	2.81
<i>Bacillus control (aF₁)</i>	1.02 ^D	1.02 ^B	±0.005	±0.01	2.11	2.18

Tabla 10. Índice de quelación de cepas en medio CAS suplementadas con Cobre a las 48 y 72 h

Relación diámetro halo/diámetro colonia de cepas en LB-CAS-Cd						
Muestras	Índice de quelación		SD		diámetro halo naranja(cm)	
	48 h	72 h	48 h	72h	48 h	72h
<i>Bacillus (P45)</i>	1.07 ^{AB}	1.06 ^{AB}	±0.03	±0.02	1.71	1.79
<i>Pseudomonas (P44)</i>	1.12 ^{AB}	1.13 ^{AB}	±0.01	±0.01	1.85	1.95
<i>Bacillus (P43)</i>	1.48 ^{AB}	1.87 ^{AB}	±0.02	±0.02	2.22	2.90
<i>Pseudomonas (P42)</i>	1.73 ^A	2.02 ^A	±0.01	±0.02	2.65	3.37
<i>Pseudomonas (P41)</i>	-	1.31 ^{AB}	-	±0.05	-	1.96
<i>Stenotrophomonas (P31)</i>	-	1.26 ^{AB}	-	±0.04	-	1.92
<i>Azospirillum brasilense (control)</i>	1.13 ^{AB}	1.49 ^{AB}	±0.03	±0.02	1.74	2.48
<i>Bacillus control (aF₁)</i>	1.04 ^B	1.04 ^B	±0.01	±0.003	1.64	1.71

Tabla 11. Índice de quelación de cepas en medio CAS suplementadas con Cadmio a las 48 y 72 h.

Relación diámetro halo/diámetro colonia de cepas en LB-CAS-V						
Muestras	Índice de quelación		sd		diámetro halo naranja(cm)	
	48 h	72 h	48 h	72h	48 h	72h
<i>Bacillus (P45)</i>	1.03 ^B	1.04 ^B	±0.02	±0.01	1.64	1.71
<i>Pseudomonas (P44)</i>	1.12 ^{AB}	1.14 ^{AB}	±0.01	±0.01	1.84	1.96
<i>Bacillus (P43)</i>	1.55 ^{AB}	1.82 ^{AB}	±0.02	±0.02	2.32	2.91
<i>Pseudomonas (P42)</i>	1.72 ^A	2.03 ^A	±0.21	±0.07	2.78	3.49
<i>Pseudomonas (P41)</i>	1.05 ^{AB}	1.44 ^{AB}	±0.01	±0.04	1.47	2.18
<i>Stenotrophomonas (P31)</i>	1.22 ^{AB}	1.47 ^{AB}	±0.01	±0.01	1.90	2.46
<i>Azospirillum brasilense (control)</i>	1.22 ^{AB}	1.46 ^{AB}	±0.01	±0.02	2.02	2.55
<i>Bacillus control (aF₁)</i>	1.03 ^{AB}	1.08 ^{AB}	±0.01	±0.02	1.59	1.73

Tabla 12. Índice de quelación de cepas en medio CAS suplementadas con Vanadio a las 48 y 72 h.

Relación diámetro halo/ colonia de cepas en LB-CAS-Cr						
Muestras	Índice de quelación		sd		diámetro halo naranja (cm)	
	48 h	72 h	48 h	72h	48h	72h
<i>Bacillus (P45)</i>	1.14	1.06 ^B	±0.19	±0.01	2.01	1.96
<i>Pseudomonas (P42)</i>	1.58	1.74 ^A	±0.02	±0.03	2.85	3.26
<i>Pseudomonas (P41)</i>	1.34	1.65 ^{AB}	±0.02	±0.03	2.24	2.86
<i>Stenotrophomonas (P31)</i>	1.42	1.67 ^{AB}	±0.03	±0.02	2.53	3.18
<i>Azospirillum brasilense (control)</i>	1.58	1.62 ^{AB}	±0.02	±0.01	2.85	2.90
<i>Bacillus control (aF₁)</i>	1.09	1.10 ^{AB}	±0.00	±0.01	2.06	2.13

Tabla 13. Índice de quelación de cepas en medio CAS suplementadas con Cromo a las 48 y 72 h.

Relación diámetro halo/ colonia de cepas en LB-CAS-Pb						
Muestras	Índice de quelación		sd		diámetro halo naranja (cm)	
	48 h	72 h	48 h	72h	48h	72h
Bacillus (P45)	1.05 ^E	1.09 ^B	±0.01	±0.02	1.81	1.97
Pseudomonas (P42)	1.63 ^A	1.79 ^A	±0.00	±0.02	2.83	3.29
Pseudomonas (P41)	1.36 ^C	1.69 ^{AB}	±0.01	±0.00	2.23	2.94
Stenotrophomonas (P31)	1.42 ^B	1.69 ^{AB}	±0.01	±0.04	2.52	3.15
Azospirillum brasilense (control)	1.30 ^D	1.64 ^{AB}	±0.04	±0.02	2.12	2.85
Bacillus control (aF1)	1.09 ^E	1.11 ^{AB}	±0.02	±0.020	1.97	2.05

Tabla 14. Índice de quelación de cepas en medio CAS suplementadas con Plomo a las 48 y 72 h.

Relación diámetro halo/ colonia de cepas en LB-CAS-Co						
Muestras	Índice de quelación		sd		diámetro halo naranja (cm)	
	48 h	72 h	48 h	72h	48h	72h
Bacillus (P45)	1.01 ^E	1.02 ^B	±0.00	±0.01	2.12	2.19
Pseudomonas (P42)	1.54 ^A	1.66 ^A	±0.02	±0.02	3.06	3.41
Pseudomonas (P41)	1.26 ^C	1.48 ^{AB}	±0.03	±0.02	2.30	2.82
Stenotrophomonas (P31)	1.32 ^B	1.45 ^{AB}	±0.03	±0.03	2.86	3.30
Azospirillum brasilense (control)	1.26 ^B	1.50 ^{AB}	±0.02	±0.01	2.35	2.93
Bacillus control (aF1)	1.11 ^D	1.12 ^{AB}	±0.01	±0.01	2.19	2.24

Tabla 15. Índice de quelación de cepas en medio CAS suplementadas con Cobalto a las 48 y 72 h.