



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO VICTOR ALZAMORA CASTRO

**DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD
BIOFERTILIZANTE DE
ACTINOMICETOS EN PRESENCIA DE
METALES PESADOS**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN MICROBIOLOGÍA**

SARA LIZ PACHECO HUERTA

LIMA – PERÚ

2016

ASESOR DE TESIS

Dr. Jasmin Hurtado Custodio de Berastain

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mis maravillosos padres por su apoyo y tolerancia desde el inicio hasta el final de la elaboración del presente. Estas maravillosas personas son las que me incentivan, con sus consejos y actos, a seguir adelante y superar cualquier obstáculo, siendo así ejemplos a seguir. Mi admiración y agradecimientos para con ellos serán eternos y poco es esta dedicatoria para estas personas tan nobles, ejemplares y maravillosas.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a Dios y a San Judas Tadeo, por su bendición, iluminación y fortaleza en los momentos difíciles, permitiéndome salir adelante frente a cualquier adversidad.

A mis padres, personas increíblemente maravillosas, por estar a mi lado durante todo momento y ayudarme a salir adelante cuando las cosas se volvían difíciles. Mi padre, el hombre más admirable, ejemplar e inteligente que puede haber, por compartir sus conocimientos y ayudarme con estos en la elaboración de este trabajo, enseñándome a no rendirme mediante sus palabras: todo esfuerzo vale la pena. Mi madre, la mujer más noble, tolerante y comprensible del mundo, por sus consejos, apoyo y cuidados durante este proceso, no dejándome caer y brindándome su mano en cualquier momento para lograr mis objetivos a pesar de las dificultades. Nunca me cansare de agradecerles por todo lo brindado hacia mi persona a nivel profesional y personal, ya que estoy donde estoy por el esfuerzo de ellos. Padres míos, los amo con todo mi corazón y no me alcanzara la vida para regresarles todo lo que me han dado. Espero haberlos enorgullecido con todo esto.

A una persona muy especial en mi vida, considerado mi ángel, mi amigo, mi guía, mi consejero, mi todo, quien me ha motivado a cumplir este objetivo y me ha enseñado a que todo puede volverse realidad si lo haces de corazón e invirtiendo todas las ganas. Su apoyo y tolerancia ha sido ejemplo de admiración, ya que en todo

momento, inclusive sin pedírselo, estuvo acompañándome en este arduo camino. Así mismo, por sus palabras dichas día a día que me permitieron tener seguridad y no dejarme dudar de nada: todo va a estar bien, ten confianza, tú puedes lograrlo. Siempre estarás en mi corazón y doy gracias por haberte conocido y ser parte de todo esto.

A mi asesora, por permitirme ser parte de su grupo de trabajo y aprender cada vez más de ella, personal y profesionalmente. Su orientación y conocimientos ha sido la base de concluir muchos propósitos profesionales. Además de su paciencia y comprensión en situaciones complicadas en varios aspectos de mi vida. Por todo esto, la considero una gran mentora y le agradezco por todas las oportunidades ofrecidas.

FUENTE DE FINANCIAMIENTO

Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y la Productividad
(Innovate Perú) Bajo el Contrato 235- FincyT-IA-2013.

ÍNDICE DE CONTENIDO

I.	INTRODUCCION	1
II.	PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	5
	2.1. Planteamiento del Problema	5
	2.2. Marco Teórico	7
	2.2.1. Actinomicetos	7
	2.2.1.1. Características generales	7
	2.2.1.2. Condiciones de crecimiento	8
	2.2.1.3. Distribución Ecológica	10
	2.2.1.4. Actividades Biológicas	11
	2.2.1.5. Clasificación Taxonómica	12
	2.2.1.6. Aplicaciones Biotecnológicas	19
	2.2.2. Metales Pesados y Ecosistemas	20
	2.2.3. Metales Pesados en Suelos Agrícolas	26
	2.2.4. Metales Pesados en Cultivos de Plantas	29
	2.2.5. Biofertilización Bacteriana	35

2.2.5.1. Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (PGPR)	37
2.2.5.2. Mecanismos de Acción de las PGPR	39
2.2.5.3. Controladores de Estrés (Metales Pesados)	43
2.2.5.4. Actinomicetos como Biofertilizantes	48
2.3. Justificación	50
III. OBJETIVOS GENERALES	52
IV. OBJETIVOS ESPECIFICOS	52
V. MATERIALES Y METODOS	54
5.1. Flujograma del Procesos	54
5.2. Material Biológico	55
5.3. Caracterización Morfológica	55
5.3.1. Caracterización Macroscópica	55
5.3.2. Caracterización Microscópica	56
5.3.2.1. Coloración Gram	56
5.3.2.2. Laminilla en Plano Inclinado	57
5.4. Caracterización Bioquímica	57

5.4.1. Prueba de Rojo de Metilo y Voges Proskauer	58
5.4.2. Prueba de Citrato	58
5.4.3. Prueba de Lisina Hierro	59
5.4.4. Prueba de Hierro Triple Azúcar	59
5.4.5. Prueba de Licuefacción de la Gelatina	60
5.4.6. Prueba de Catalasa	60
5.4.7. Prueba de Hidrolisis de Almidón	61
5.4.8. Crecimiento a Diferentes pH	61
5.4.9. Crecimiento a Diferentes Niveles de Salinidad	62
5.5. Caracterización Molecular	62
5.5.1. Extracción de ADN	62
5.5.2. Evaluación de la Integridad del ADN Extraído	64
5.5.3. Selección y Validación de Primers para la Amplificación del Gen 16S	65
5.5.4. Amplificación del Gen Ribosomal 16S por PCR	66
5.5.5. Secuenciamiento de los Productos de PCR	66
5.5.6. Análisis Filogenético	67
5.6. Resistencia a Metales Pesados	68
5.7. Estandarización del Método de Germinación y Crecimiento Vegetal de Semillas de <i>Lactuca sativa</i>	

(lechuga) y <i>Medicago sativa</i> (alfalfa) con agua (d)	69
5.8. Determinación de la Capacidad de Germinación y Crecimiento Vegetal de Semillas de <i>Lactuca sativa</i> (lechuga) y <i>Medicago sativa</i> (alfalfa) Expuestas a los Géneros de Actinomicetos	70
5.9. Determinación de la Capacidad de Germinación y Crecimiento Vegetal de Semillas de <i>Lactuca sativa</i> (lechuga) y <i>Medicago sativa</i> (alfalfa) Expuestas a Metales Pesados	71
5.10. Determinación de la Capacidad Biofertilizante de los Géneros de Actinomicetos en Semillas de <i>Lactuca sativa</i> (lechuga) y <i>Medicago sativa</i> (alfalfa) Expuestas a Metales Pesados	72
5.11. Conservación de Cepas de Actinomicetos	73
5.12. Análisis Estadístico	73
VI. RESULTADOS	75
6.1. Caracterización Morfológica	75
6.1.1. Caracterización Macroscópica	75
6.1.2. Caracterización Microscópica	82

6.2. Caracterización Bioquímica	83
6.3. Caracterización Molecular	88
6.3.1. Evaluación de la Integridad del ADN Extraído	88
6.3.2. Validación de Primers 8F Y 1492R para la Amplificación el Gen 16S	90
6.3.3. Amplificación del Gen 16S por PCR	91
6.3.4. Secuenciamiento de los Productos de PCR	95
6.3.5. Caracterización Molecular de las Cepas de Actinomicetos	95
6.3.6. Análisis Filogenético	96
6.4. Resistencia a Metales Pesados	98
6.5. Estandarización del Método de Germinación y Crecimiento Vegetal de Semillas de <i>Lactuca sativa</i> (lechuga) y <i>Medicago sativa</i> (alfalfa) con agua (d).	99
6.6. Determinación de la Capacidad de Germinación y Crecimiento Vegetal de Semillas de <i>Lactuca sativa</i> (lechuga) y <i>Medicago sativa</i> (alfalfa) Expuestas a los Géneros de Actinomicetos	100
6.7. Determinación de la Capacidad de Germinación y Crecimiento Vegetal de Semillas de <i>Lactuca sativa</i>	

(lechuga) y <i>Medicago sativa</i> (alfalfa) Expuestas a Metales Pesados	105
6.8. Determinación de la Capacidad Biofertilizante de los Géneros de Actinomicetos en Semillas de <i>Lactuca sativa</i> (lechuga) y <i>Medicago sativa</i> (alfalfa) Expuestas a Metales Pesados	110
VII. DISCUSIÓN	126
VIII. CONCLUSIONES	148
IX. RECOMENDACIONES	151
X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	152

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Morfología de *Streptomyces* usando microscopio electrónico.
- Figura 2.** Morfología macroscópica de *Nocardia sp.*
- Figura 3.** Morfología macroscópica de *Streptomyces sp.*
- Figura 4.** Árbol filogenético de organismos.
- Figura 5.** Árbol filogenético de la Clase Actinobacteria basado en el estudio de ADNr/ARNr 16S.
- Figura 6.** Estructura química de sideróforos.
- Figura 7.** Porcentaje de las cepas de actinomicetos basadas en el aspecto macroscópico en AN, XGAL y AAI.
- Figura 8.** Porcentaje de las cepas de actinomicetos basadas en la coloración del micelio aéreo, del micelio del sustrato y la pigmentación en AN.
- Figura 9.** Porcentaje de las cepas de actinomicetos basadas en la coloración del micelio aéreo, del micelio del sustrato y la pigmentación en XGAL.
- Figura 10.** Porcentaje de las cepas de actinomicetos basadas en la coloración del micelio aéreo, del micelio del sustrato y la pigmentación en AAI.
- Figura 11.** Morfología a nivel macroscópico de la cepa 6c de actinomicetos a los 14 días en medio AN, XGAL y AAI.
- Figura 12.** Porcentaje de las cepas de actinomicetos basadas en el tipo de borde en AN, XGAL y AAI.
- Figura 13.** Morfología macroscópica de las diversas formas de los bordes de las cepas de actinomicetos en el medio de cultivo AN a los 14 días.

Figura 14. Morfología microscópica de las cepas de actinomicetos por coloración Gram.

Figura 15. Morfología microscópica de las cepas de actinomicetos en laminillas.

Figura 16. Porcentaje de las cepas de actinomicetos basadas en pruebas de actividad metabólica.

Figura 17. Prueba de TSI de las cepas de actinomicetos.

Figura 18. Porcentaje de las cepas de actinomicetos que crecieron a diferentes pH.

Figura 19. Porcentaje de las cepas de actinomicetos que crecieron a diferentes concentraciones de NaCl.

Figura 20. Evaluación de la extracción de ADN.

Figura 21. Evaluación de la extracción de ADN.

Figura 22. Resultado del PCR in silico para la región 16S con los primers 8F y 1492R.

Figura 23. Electroforesis de los productos de PCR de las muestras K4, K2, E1 y 6E1.

Figura 24. Electroforesis de los productos de PCR de las muestras Frep15, Fe5, YA4, 11.1, 6E3 y X.

Figura 25. Electroforesis de los productos de PCR de las muestras 6c, F1, Y16, Frep14, 6b, 6d, Frep13, AB7 y K1B.

Figura 26. Electroforesis de los productos de PCR de las muestras K1A, C2, AB5, F y 21.

Figura 27. Árbol filogenético generado mediante el algoritmo neighbour-joining a partir de las secuencias correspondientes a la región 16S.

Figura 28. Porcentaje de las cepas de actinomicetos que crecieron a diferentes concentraciones de metales.

Figura 29. Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Medicago sativa* (alfalfa) expuestas a cepas del género *Streptomyces*.

Figura 30. Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) expuestas a cepas del género *Streptomyces*.

Figura 31. Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Medicago sativa* (alfalfa) expuestas a metales pesados a diferentes concentraciones.

Figura 32. Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) expuestas a metales pesados a diferentes concentraciones.

Figura 33. Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Medicago sativa* (alfalfa) expuestas a cepas del género *Streptomyces* y a diferentes concentraciones de cobre.

Figura 34. Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Medicago sativa* (alfalfa) expuestas a cepas del género *Streptomyces* y a diferentes concentraciones de hierro.

Figura 35. Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Medicago sativa* (alfalfa) expuestas a cepas del género *Streptomyces* y a diferentes concentraciones de zinc.

Figura 36. Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Medicago sativa* (alfalfa) expuestas a cepas del género *Streptomyces* y a diferentes concentraciones de cadmio.

Figura 37. Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) expuestas a cepas del género *Streptomyces* y a diferentes concentraciones de cobre.

Figura 38. Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) expuestas a cepas del género *Streptomyces* y a diferentes concentraciones de hierro.

Figura 39. Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) expuestas a cepas del género *Streptomyces* y a diferentes concentraciones de zinc.

Figura 40. Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) expuestas a cepas del género *Streptomyces* y a diferentes concentraciones de cadmio.

Figura 41. Resumen general de la longitud (cm) de la raíz de *Medicago sativa* (alfalfa) en presencia de agua, de actinomicetos, de metales pesados y de metales pesados con actinomicetos.

Figura 42. Resumen general de la longitud (cm) de la raíz de *Lactuca sativa* (lechuga) en presencia de agua, de actinomicetos, de metales pesados y de metales pesados con actinomicetos.

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Clasificación taxonómica de los subórdenes y principales familias y géneros de los actinomicetos.
- Tabla 2.** Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Medicago sativa* (alfalfa) expuestas a cepas del género *Streptomyces*.
- Tabla 3.** Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) expuestas a cepas del género *Streptomyces*.
- Tabla 4.** Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Medicago sativa* (alfalfa) expuestas a metales pesados a diferentes concentraciones.
- Tabla 5.** Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) expuestas a metales pesados a diferentes concentraciones.
- Tabla 6.** Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Medicago sativa* (alfalfa) expuestas a cepas del género *Streptomyces* y a diferentes concentraciones de cobre.
- Tabla 7.** Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Medicago sativa* (alfalfa) expuestas a cepas del género *Streptomyces* y a diferentes concentraciones de hierro.
- Tabla 8.** Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Medicago sativa* (alfalfa) expuestas a cepas del género *Streptomyces* y a diferentes concentraciones de zinc.

Tabla 9. Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Medicago sativa* (alfalfa) expuestas a cepas del género *Streptomyces* y a diferentes concentraciones de cadmio.

Tabla 10. Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) expuestas a cepas del género *Streptomyces* y a diferentes concentraciones de cobre.

Tabla 11. Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) expuestas a cepas del género *Streptomyces* y a diferentes concentraciones de hierro.

Tabla 12. Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) expuestas a cepas del género *Streptomyces* y a diferentes concentraciones de zinc.

Tabla 13. Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) expuestas a cepas del género *Streptomyces* y a diferentes concentraciones de cadmio.

Tabla 14. Resumen general de la longitud (cm) de la raíz de *Medicago sativa* (alfalfa) en presencia de agua, de actinomicetos, de metales pesados y de metales pesados con actinomicetos.

Tabla 15. Resumen general de la longitud (cm) de la raíz de *Lactuca sativa* (lechuga) en presencia de agua, de actinomicetos, de metales pesados y de metales pesados con actinomicetos.

RESUMEN

Los actinomicetos constituyen un grupo de microorganismos reportados como bacterias promisorias en la biofertilización. El objetivo del estudio fue determinar la capacidad biofertilizante de los actinomicetos en plantas frente a metales pesados. Se trabajó con 24 cepas de actinomicetos, las cuales fueron identificadas morfológica y molecularmente y caracterizadas por crecimiento a diferentes condiciones de pH, NaCl, pruebas bioquímicas y resistencia a metales pesados. 5 cepas (AB5, X, C2, K2 y E1) fueron seleccionadas por su buen rendimiento. Las 5 cepas correspondieron al género *Streptomyces* y sometidas a pruebas con semillas de *Medicago sativa* (alfalfa) y *Lactuca sativa* (lechuga). *Medicago sativa* sometida a Cu, Fe, Zn y Cd a 10, 50, 100 y 200 ppm, rindieron un 66.2%, 20%, 16.6% y 6.8% y *Lactuca sativa* un 56.5%, 16.2%, 5.1% y 2.8%, respectivamente; en cambio estas semillas sometidas a los mismos metales en iguales concentraciones pero con las 5 cepas de *Streptomyces sp.* rindieron para *Medicago sativa* un 77%, 64%, 55.5% y 46% y para *Lactuca sativa* un 71.5%, 54.6%, 47.1% y 39.5%, respectivamente. Estos resultados permitieron inferir que los metales son nocivos para las plantas, en cambio la presencia de estas bacterias ha contrarrestado este efecto, pudiendo permitir la restauración de suelos contaminados y promoviendo el crecimiento vegetal.

Palabras Claves: Actinomicetos, metales pesados, biofertilización.

ABSTRACT

Actinomycetes are a group of microorganisms reported as promising biofertilization bacteria. This study was aimed to determine the biofertilizer capacity of actinomycetes in plants against heavy metals. 24 strains of actinomycetes were used and identified morphologically and molecularly and categorized by growth at different conditions as pH, NaCl, biochemical test and heavy metal resistance. 5 strains (AB5, X, C2, K2 and E1) were selected for their good performance. The 5 strains corresponded to the genus *Streptomyces* and were used on tests with seeds of *Medicago sativa* and *Lactuca sativa*. *Medicago sativa* seeds were exposed to Cu, Fe, Zn and Cd at of 10, 50, 100 and 200 ppm, and performed 66.2%, 20%, 16.6% and 6.8% and *Lactuca sativa* 56.5%, 16.2%, 5.1% y 2.8%, respectively; instead the same seeds exposed to same heavy metals at the same concentrations but with the presence of the 5 strains of *Streptomyces sp.* showed a performance to *Medicago sativa* of 77%, 64%, 55.5% and 46% and *Lactuca sativa* of 71.5%, 54.6%, 47.1% y 39.5% respectively. These results allowed to infer that metals are harmful for plants, however the presence of bacteria have offset this effect and therefore may allow restoration of contaminated soils and promoting plant growth.

Keywords: Actinomycetes, heavy metals, biofertilization.

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente existen problemas que causan efectos considerables en el medio ambiente, perjudicando el equilibrio de los ecosistemas y por tal a los factores bióticos y abióticos. Uno de los problemas más importantes es la contaminación ambiental generada por metales pesados, proveniente de fuentes naturales (actividad volcánica, erosión de las rocas, etc.) y antropogénicas (industrias mineras, vertidos industriales, actividades agrícolas, etc.).

Los metales pesados afectan el área agrícola, limitando la germinación, el crecimiento y el desarrollo de las plantas, debido a que ocasionan la infertilidad del suelo y la contaminación del agua utilizada para el riego.

Entre los metales pesados, se encuentran los oligoelementos esenciales para el crecimiento de la planta como cobre (Cu), zinc (Zn) y hierro (Fe), entre otros, pero que estos, en concentraciones más altas se convierten en tóxicos y pueden interferir con numerosos procesos biológicos (1,2). Del mismo modo, los metales pesados no esenciales como el cadmio (Cd), plomo (Pb) y el mercurio (Hg) causan efectos perjudiciales en las plantas (3,4). La toxicidad en las plantas es generada por la capacidad que presentan los metales pesados de adherirse a las moléculas orgánicas ejerciendo: alteraciones en las proteínas, la sustitución de otros elementos que son esenciales para su metabolismo y la producción del estrés oxidativo (5). Las plantas absorben y acumulan altas concentraciones de metales pesados en su sistema,

principalmente en sus raíces, de donde se movilizan hacia otras partes de la planta (6), permitiendo su disponibilidad directa para los animales y seres humanos o mediante la cadena alimenticia (7).

Las patologías tóxicas causadas por los metales pesados son la inhibición de la germinación, la disminución del crecimiento de las plantas (raíces y hojas), la necrosis (ocasionada en las puntas de las hojas) y la clorosis (amarillamiento de las hojas por la insuficiente clorofila) (6).

Para poder remediar este problema es necesario aplicar estrategias que garanticen la fertilidad del suelo, el crecimiento y el desarrollo saludable de las plantas, contribuyendo, así, a la mejora de la producción agrícola. Para estos propósitos se ha encontrado que el uso de microorganismos ofrece un significativo potencial de acción que promueve el crecimiento y desarrollo de las plantas (8), siendo esta una alternativa para el óptimo rendimiento de diversos cultivos. Todas aquellas bacterias que ejercen un efecto positivo en el crecimiento de las plantas, directa o indirectamente a través de diferentes mecanismos, son designadas como rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR: Plant Growth Promoting *Rhizobacteria*) (9,10,11,12). Estas PGPR son bacterias beneficiosas para las plantas con diferentes efectos como en el poder de germinación, en la promoción del crecimiento vegetal, en la colonización de las raíces, en la síntesis de fitohormonas, en el control biológico y en la captación de nutrientes y agua (13).

Aparte de los mecanismos directos e indirectos, los cuales son importantes para las plantas, la literatura menciona otros posibles mecanismos en respuesta a las condiciones de estrés generadas por metales pesados: producción de compuestos quelantes de metales como los sideróforos (14,15), adsorción de los iones metálicos en la pared celular (16,17,18), almacenamiento intracelular de los iones metálicos que ingresan por el sistema de transporte (16,17,18) y mediante la acción de la ACC desaminasa, enzima que disminuye la biosíntesis del etileno (19). Todos estos mecanismos juntos, debido a su complementación unos con otros, mejoran la fertilidad del suelo y promueven el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Existe una gran variedad de bacterias que han sido empleadas para tratar este problema como *Herbaspirillum* sp., *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasiliense*, *Azotobacter beijerinckii*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter* sp entre otras (20,21,22). Pero entre ellas destaca un tipo de bacteria de suma importancia para la agricultura, los actinomicetos, catalogadas como PGPR, los cuales son aplicados para producir mejoras en los cultivos y así conseguir una Agricultura Sostenible (15).

Dentro del área de investigación en Biotecnología Industrial y Ambiental se han realizado una variedad de estudios con el fin de enriquecer los conocimientos sobre los actinomicetos, que son bacterias presentes en el suelo y que contribuyen a la conservación del equilibrio ecológico en sectores que presentan una alta actividad agrícola. Por tal, estas bacterias han sido objeto de estudios para determinar su posible

potencial biofertilizante y de ahí la importancia de catalogarlas como PGPR, determinando sus acciones positivas para las plantas (23,24).

Por todo lo expuesto anteriormente, en este trabajo se busca determinar el efecto biofertilizante de cepas de actinomicetos, aisladas de minerales, a través de su inoculación sobre diferentes tipos de semillas, las cuales, a la vez, son expuestas también a diferentes concentraciones de metales pesados. Las variables a evaluar son las semillas germinadas y el desarrollo de raíz y de hojas. En esta investigación se emplea semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) y *Medicago sativa* (alfalfa), que han sido reportadas como cultivos con un alto importe económico para su aplicación en distintos pisos ecológicos (25).

II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. PLATEAMIENTO DEL PROBLEMA

La contaminación ambiental es un problema considerado de índole mayor y principal de las actividades antropogénicas, que se va acrecentando en la medida que sucede la evolución de la humanidad. Un factor agravante de esta situación es el desinterés y la falta de aplicación de políticas mundiales para la conservación del ambiente por parte de los estados. Una actividad que tiene mayor impacto en la contaminación ambiental es la industria minero metalúrgica productora de metales para beneficio del hombre y también productora de residuos que al no ser adecuadamente tratados terminan contaminando el ambiente en perjuicio de la biodiversidad. Una situación especial de la problemática ambiental es la incorporación de metales pesados nocivos en los ecosistemas, particularmente en el área agrícola, que ocasionan la infertilidad del suelo y la inhibición de la germinación, crecimiento y desarrollo de los cultivos.

La actividad agrícola es la principal productora de alimentos y por ende la base de la alimentación humana y ganadera, que se ve afectada por la presencia de los metales pesados en los suelos agrícolas. Cuando los metales pesados están en los suelos en concentraciones que rebasan los límites permisibles afectan los procesos biológicos de las plantas debido a que estos poseen gran capacidad de unirse a las moléculas orgánicas alterando proteínas, sustituyendo a otros elementos esenciales en su

metabolismo estándar y finalmente produciendo estrés oxidativo. En suma, actualmente en la humanidad existe una realidad de contaminación de los suelos agrícolas por metales pesados nocivos que perturban el rendimiento de los cultivos, para cuya solución es necesario aplicar estrategias científico técnicas de descontaminación.

2.2. MARCO TEÓRICO

2.2.1. Actinomicetos

2.2.1.1. Características Generales

Los actinomicetos son microorganismos heterogéneos, que se caracterizan por ser gram-positivas, no-alcohol-ácido resistentes y no presentar motilidad, en quienes prevalece la morfología filamentosa con verdaderas ramificaciones evidenciados entre las 14 y 48 horas de cultivo (26,27).

Inicialmente los actinomicetos se clasificaron entre los hongos debido a que su morfología y desarrollo eran similares, ya que ambos poseen un micelio verdadero; por lo cual fueron denominados “hongos radiados”. No obstante, en la actualidad, y debido a su naturaleza procariota, se justifica su clasificación como bacterias (28,29). Asimismo, estas bacterias presentan otras características como una pared celular compuesta de peptidoglicano, hifas entre 0.5 y 2.0 μm de diámetro, resistencia a los antifúngicos, presencia en su material genético de un contenido alto de Guanina y Citosina (58 a 78% G+C); y producción de esporas externas por algunas especies de actinomicetos, las cuales también respaldan que este grupo sea considerado dentro del dominio bacteria (30). Adicionalmente, muchas de estas bacterias producen un metabolito denominado geosmina, el cual le confiere un olor característico a suelo húmedo (29), además presentan una alta actividad metabólica, lo que permite que estas

bacterias cumplan una función importante en la descomposición del suelo, la degradación de la materia orgánica de origen animal y vegetal, y esto lo realizan por la producción de enzimas extracelulares (ligninolíticas e hidrolíticas), pigmentos y terpenoides (31).

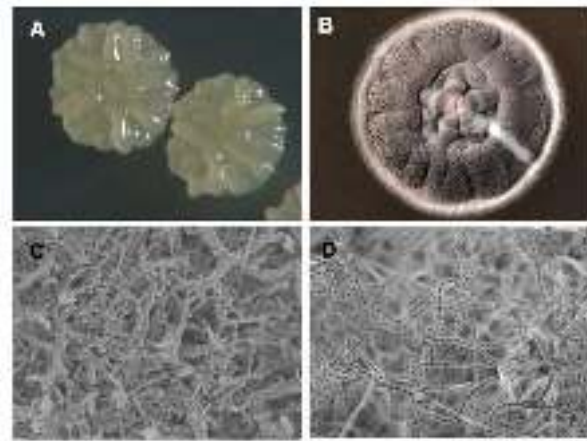


Figura 1: Morfología de *Streptomyces* usando microscopio electrónico. A. Colonias de *Streptomyces* en estado vegetativo; B. Colonias de *Streptomyces* esporuladas; C. Micelios vegetativos; D. Cadenas de esporas. Figura tomada de Rigali et al., 2008 (32).

2.2.1.2. Condiciones de Crecimiento

Los actinomicetos están presentes en suelos alcalinos y neutros, lo cual permite un favorable crecimiento y desarrollo, el pH óptimo de estas bacterias se encuentra entre 6.0 y 8.0 y a un pH por debajo de 5.0 estas bacterias están ausentes, no obstante, en investigaciones recientes se ha reportado especies de actinomicetos capaces de tolerar ambientes ácidos (pH 2) (33,34). Son bacterias mesófilas, es decir, registran un

óptimo crecimiento entre 25°C y 30°C, mientras que su ausencia es evidente a temperaturas menores a 5°C, sin embargo a temperaturas por encima de 55°C solo son capaces de crecer: *Thermoactinomyces sp.*, *Streptomyces sp.* y *Thermomonospora sp.* (29). Además, la mayoría de estas bacterias son aerobias, es decir, su crecimiento es óptimo en suelos aireados; pero también pueden ser microaerófilas y esto último depende de la especie de actinomiceto (28); por otra parte algunas, tales como *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii* y *Actinomyces odontolyticus*, pueden crecer bajo condiciones anaerobias (26).

Con respecto a su crecimiento y desarrollo de los actinomicetos, se emplean medios de cultivo sólidos y líquidos como agar nutritivo, agar sangre, agar tripticasa de soja, entre otros, pero para el desarrollo de esporas o pigmentos, y así puedan diferenciarse, se requiere de suplementos presentes en los medios de cultivos como extracto de levadura, almidón, avena, peptona, sales inorgánicas y quitina coloidal (23,35).

El tiempo de incubación en medio sólido es de 3 a 4 días, pero puede tardar entre 7 a 14 días para desarrollar micelos aéreos maduros con esporas e, incluso, para algunos actinomicetos, puede tomar un mes de incubación (35); además, estas bacterias no producen mucopolisacáridos por eso su crecimiento en este tipo de medios son colonias secas y no cremosas (36). Por el contrario, en medios líquidos su crecimiento se evidencia mediante la formación de agrupaciones filamentosas o “pellets”, o, también, por la formación tanto de un sedimento algodonoso como una película en la

superficie, dejando transparente el medio (29). Para garantizar un óptimo crecimiento en medio líquido es recomendable realizar una agitación que sea entre 200 y 250 rpm, esto permite mejorar el suministro de aireación (23,29).



Figura 2: Morfología macroscópica de *Nocardia sp.* Figura tomada de Mikami et al., 1989 (37).

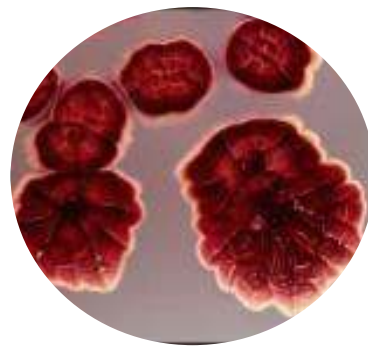


Figura 3: Morfología macroscópica de *Streptomyces sp.* Figura tomada de Microbe Beta World, 2012 (38).

2.2.1.3. Distribución Ecológica

Los actinomicetos son microorganismos unicelulares, que al igual que las mixobacterias, se encuentran abundantemente en el suelo (36), no obstante, también están presentes en aguas estancadas, aguas marinas y aguas dulces (39), así como en el aire, estiércol, fangos de ríos, y, generalmente, en zonas donde se produce la descomposición aeróbica de restos vegetales (40). Los principales géneros de actinomicetos que son aislados son *Streptomyces*, *Micromonospora* y *Nocardia* (41).

Estos microorganismos se encuentran ampliamente distribuidos en el suelo y bajo condiciones extremas se genera una ligera reducción de la población. El tamaño de la población depende de la naturaleza del suelo, así como de algunas características físicas como el pH del ambiente y contenido de materia orgánica, pero es frecuente hallarlos en suelos que son fértiles a una concentración de 10^6 UFC g^{-1} de suelo seco. Generalmente se logran aislar actinomicetos de las superficies de los suelos y a profundidades, aproximadamente, de 2 a 15 cm, más allá de estos parámetros decrece considerablemente la cantidad de estas bacterias. (42).

Por otra parte, los actinomicetos pueden estar presentes en los seres humanos como colonizadores normales de la vagina, colon y boca, o también como patógenos oportunistas, principalmente en la cavidad bucal (43,44).

2.2.1.4. Actividades Biológicas

La degradación de la materia orgánica en el suelo se lleva a cabo, en gran parte, por los actinomicetos, gracias a la diversa variedad de enzimas extracelulares que producen (ligninolíticas e hidrolíticas) y por la capacidad, de estas bacterias, de descomponer compuestos recalcitrantes derivados de la mineralización de la materia orgánica en el suelo. Además, estos microorganismos cumplen un rol esencial en la mineralización del nitrógeno y carbono (30), dentro del cual, géneros como *Frankia* y algunas cepas de las familias Micromonosporaceae y Thermomonosporaceae han demostrado ser fijadoras de nitrógeno atmosférico (23,45). Así mismo, los

actinomicetos también son capaces de secretar sustancias antibióticas como la estreptomicina y tetraciclina (30).

2.2.1.5. Clasificación Taxonómica

Los actinomicetos pertenecen al phylum Actinobacteria, clase I Actinobacteria, subclase V Actinobacteridae y orden Actinomycetales que se divide en subórdenes, familias y géneros. (23, 35,46).

Tabla 1: Clasificación taxonómica de los subórdenes y principales familias y géneros de los actinomicetos.

Suborden	Familia	Géneros
Micromonosporineae	Micromonosporaceae	<i>Micromonospora</i>
	Actinoplanaceae	<i>Ampullariella</i> <i>Planobispora</i> <i>Actinoplana</i> <i>Planomonospora</i> <i>Streptosporangium</i> <i>Dactilosporangium</i> <i>Spirillospora</i>
Frankineae	Frankiaceae	<i>Frankia</i>
	Geodermatophilaceae	<i>Geodermatophilus</i>

	Sporichthyaceae	<i>Sporichthya</i>
Pseudonocardineae	Pseudonocardiaceae	<i>Actinosynnema</i> <i>Saccharopolyspora</i>
Streptomycineae	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces</i> <i>Streptoverticillium</i>
Corynebacterineae	Nocardiaceae	<i>Nocardia</i> <i>Rhodococcus</i> <i>Micropolyspora</i> <i>Chainia</i> <i>Elytrosporangium</i> <i>Intrasporangium</i> <i>Kitasatoa</i> <i>Microellobisporia</i>
	Mycobacteriaceae	<i>Mycobacterium</i>
	Corynebacteriaceae	<i>Corynebacterium</i>
Micrococcineae	Micrococcaceae	<i>Micrococcus</i> <i>Arthobacter</i>
	Microbacteriaceae	<i>Microbacterium</i>
	Dermatophilaceae	<i>Dermatophilus</i>
Actinomycineae	Actinomycetaceae	<i>Actinomyces</i> <i>Agromyces</i> <i>Arachnia</i>

		<i>Bacterionema</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Rothia</i>
Propionibacterineae	Propionibacteriaceae Nocardoidaceae	<i>Propiobacterium</i>
Streptosporangineaea	Thermomonosporaceae	<i>Thermomonospora</i> <i>Actinomadura</i> <i>Microbispora</i> <i>Microtetraspora</i> <i>Saccharomonospora</i>
	Thermoactinomycetaceae	<i>Thermoactinomyces</i>
Glycomycineae	Glycomycetaceae	<i>Glycomyces</i>

Existen diversos criterios de clasificación que también se han utilizados para los actinomicetos como:

- a) Quimiotaxonomía: Consiste en el estudio de la composición de la pared celular, tales como el tipo de peptidoglicano que presenta, el tipo de isómeros de ácido diaminopimélico, el tipo de azúcares, el patrón de los fosfolípidos y ácidos grasos de la membrana, el contenido y tipo de ácidos micólicos, el contenido en el material genético de Guanina y Citocina (mol%: porcentaje molar de G+C). (23,47,48).

- b) Fagotipificación: Se basa en aprovechar la especificidad de los actinofagos por el hospedero, consiguiéndose identificar el género, e incluso la especie. Este criterio es principalmente para *Streptomyces sp.* (49).

- c) Otros criterios: La serología, las pruebas bioquímicas (empleadas para una rápida identificación) y las pruebas de detección de enzimas bacterianas mediante el desarrollo de sustratos cromogénicos y fluorogénicos (48).

- d) Métodos moleculares: Es un criterio utilizado para una mejor clasificación, debido a que existen aislamientos bacterianos que no concuerdan con los patrones de identificación. Por tal, el empleo de estas herramientas para analizar los genomas de las bacterias ha sido un gran aporte para la taxonomía bacteriana (50). Las técnicas moleculares han resultado siendo a la fecha un método exacto y confiable, por cuya razón se describe sus fundamentos a continuación.

Los ribosomas son estructuras macromoleculares complejas y especializadas que se encuentran ubicados en el citoplasma, empleados por los organismos para la síntesis de proteínas. Esta estructura, de acuerdo al coeficiente de sedimentación, se divide en 2 tipos: ribosoma 80S y 70S, siendo este último típico de procariotas, mientras que el 80S corresponde a eucariotas. El ribosoma 70S puede desintegrarse en 2 subunidades disímiles de tamaño: 50S y 30S (51). La subunidad mayor 50S presenta 31 proteínas diferentes y dos moléculas, una de ARNr 23S y otra de ARNr 5S; en

cambio la subunidad menor 30S contiene 21 proteínas diferentes y una molécula de ARNr 16S (52).

Los ribosomas son muy importantes para una correcta función celular e interaccionan con varias moléculas, entre las cuales se encuentran el ARN de transferencia (ARNt) y el ARN mensajero (ARNm). El ARNr es considerado la base de los estudios filogenéticos debido a que presenta secuencias elevadamente conservadas. Estas estructuras primarias contienen sitios alternados con una baja y alta variabilidad, es decir, los sitios con secuencias conservadas poseen información sobre los sucesos evolutivos más recientes, mientras que los sitios con secuencias variables presentan información filogenética de bajo nivel (53).

La subunidad 23S y 16S son considerablemente grandes y en consecuencia poseen información que permite realizar comparaciones de suma importancia. Para estudios filogenéticos y taxonomía bacteriana, la macromolécula más utilizada es el ARNr 16S, debido a su fácil manejo en la experimentación en comparación con el 23S (54), además presenta en su secuencia, sitios elevadamente conservados y otros variables, y posee una baja tasa de mutaciones. Muchas secuencias se encuentran registradas en bases de datos, los cuales permiten una identificación de los sitios con secuencias conservadas a través de alineamientos (55). Debido a los sitios conservados y variables se puede determinar las relaciones filogenéticas que hay entre taxas distantes o cercanas, incluso se puede definir las categorías taxonómicas a las que pertenecen los microorganismos estudiados como el dominio, división, familia, clase,

orden, género y especie (23,56). Los actinomicetos, a diferencia de los cocos gram positivos y los formadores de endosporas, constituyen filogenéticamente una subdivisión del dominio bacteria (Figura 4 y 5).

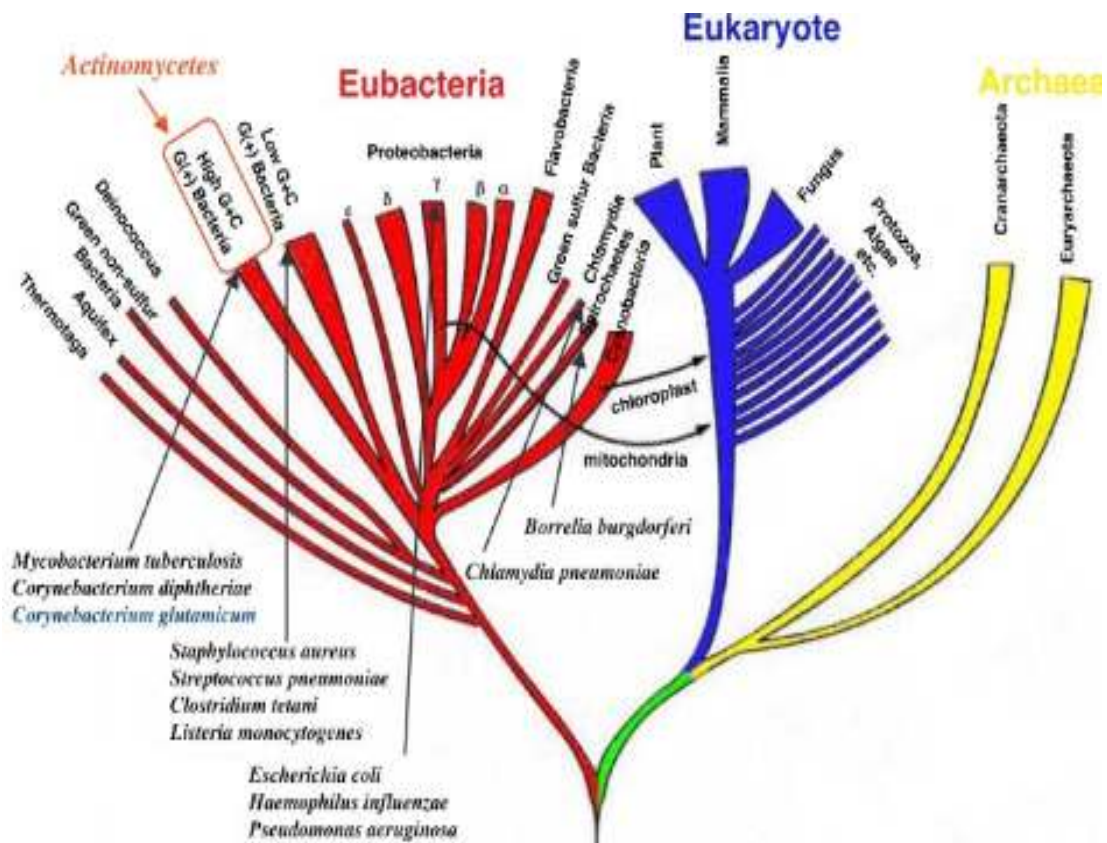


Figura 4: Árbol filogenético de organismos. Figura tomada de Kitasano University, 2007 (57).

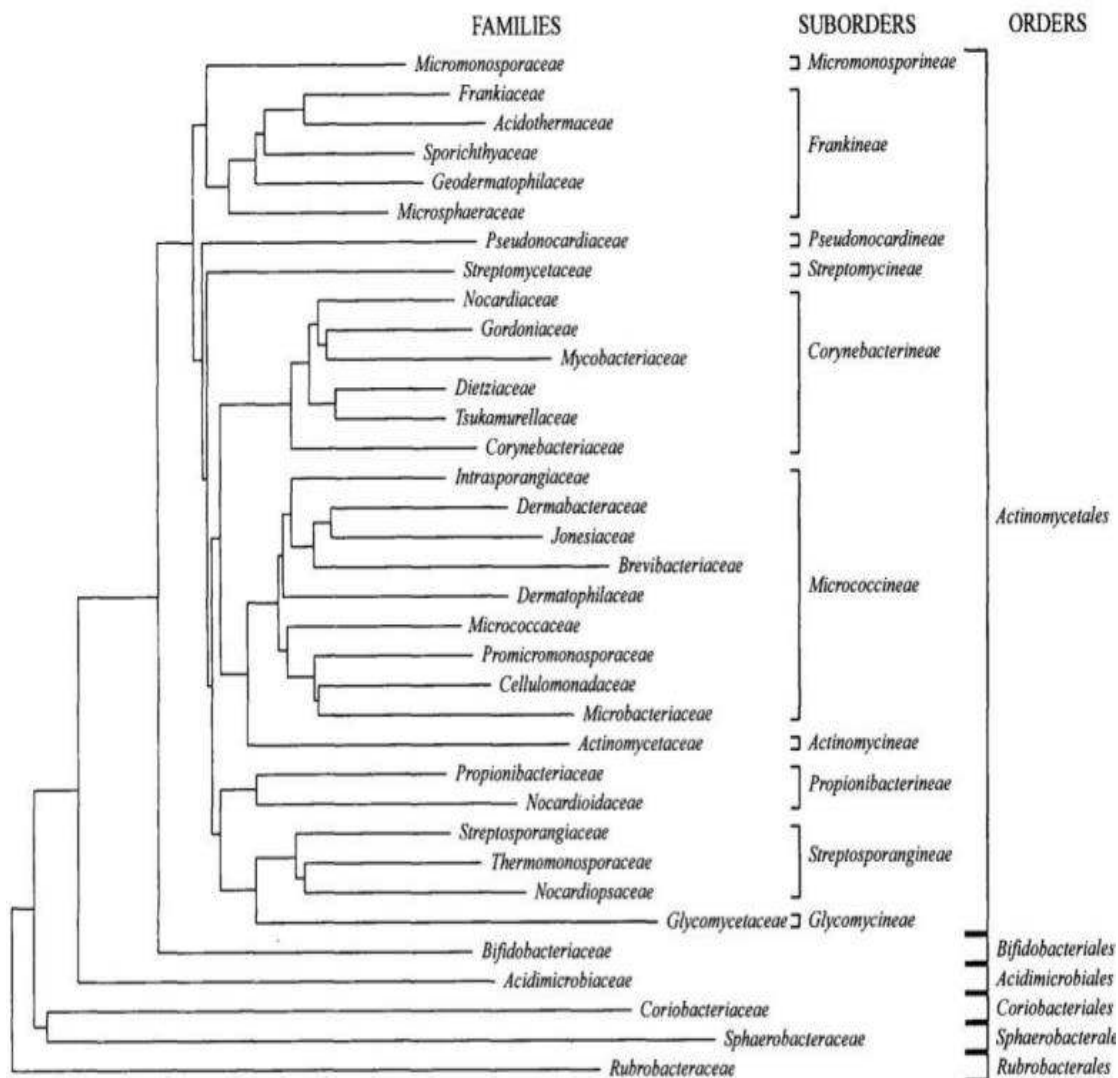


Figura 5: Árbol filogenético de la Clase Actinobacteria basado en el estudio de ADNr/ARNr 16S. Figura tomada de Stackebrandt et al., 1997 (58).

Cabe mencionar que la clasificación de los actinomicetos ira desarrollándose con la generación de técnicas nuevas que permitan una clasificación más rápida y exacta.

2.2.1.6. Aplicaciones Biotecnológicas

Los actinomicetos son un grupo microbiano que desde tiempos remotos hasta la actualidad han sido y siguen siendo estudiados para definir sus posibles impactos positivos en distintas áreas biotecnológicas como la industria alimentaria, la industria farmacéutica, la medicina, la agricultura, la biorremediación, entre otros, y esto a causa de su capacidad de producir sustancias con actividad biológica de suma importancia e utilidad para el hombre (59).

Uno de los retos de la tecnología y la ciencia ha sido y es producir alimentos cada vez con menos empleo de compuestos químicos potencialmente contaminantes como los pesticidas. Una alternativa es el empleo de la biotecnología, y particularmente de los actinomicetos. En el caso de la medicina y veterinaria se demanda nuevos antibióticos activos contra microorganismos patógenos resistentes, y han sido los actinomicetos una buena opción para este tema.

Los grupos microbianos más prolíficos, en cuanto a la producción de antibióticos, han sido los actinomicetos y hongos filamentosos; sin embargo, históricamente, los actinomicetos han producido la mayoría de los antibióticos existentes (59). Este es el caso del género *Streptomyces*, este género produce 60 antibióticos entre los cuales están la estreptomicina, espectinomicina, neomicina, tetraciclina, eritromicina, entre otros. Estos antibióticos inhiben a una gran diversidad de microorganismos patógenos de diversas categorías taxonómicas. En el presente,

debido a su importancia económica, los actinomicetos siguen siendo objeto de estudio para la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas pero en otros géneros (27,46). Con respecto a la biorremediación y al campo de la agricultura, los actinomicetos son capaces de degradar herbicidas, pesticidas y moléculas orgánicas de excesiva complejidad, además, son importantes en la mineralización de diversos materiales orgánicos e incluso pueden degradar sustancias resistentes como la pectina, lignina, queratina, látex y compuestos aromáticos (45,60). Adicionalmente permiten el control biológico, la síntesis de fitohormonas, la resistencia a microorganismos patógenos y la mejor captación de nutrientes y agua (13).

2.2.2. Metales Pesados y Ecosistemas

Existen varias maneras de definir el término “metal pesado”, una de ellas es referida al número atómico, es decir, los metales pesados son los que presentan un número atómico mayor a 20 (excluidos alcalinos y alcalinotérreos), mientras que otra se refiere a los metales de densidad mayor a 5 g/cm³ (61). De manera estricta, y a partir del enfoque químico, se menciona que los metales pesados están compuestos, principalmente, por los metales de transición, algunos metaloides, lantánidos e actínidos (62).

Los metales pesados se dividen en 2 grupos: los micronutrientes u oligoelementos y los metales pesados sin función biológica conocida. Los micronutrientes u oligoelementos son utilizados por los organismos en pequeñas

cantidades para poder desarrollar algunas actividades metabólicas, por ejemplo: arsénico, boro, cobalto, cromo, etc.; mientras que los metales pesados sin función biológica conocida, como su mismo nombre lo dice, son aquellos que no ejercen función biológica alguna. Sin embargo, a partir de ciertas concentraciones los metales pesados pueden ser peligrosos, produciendo disfunciones en los organismos por la toxicidad causada, por ejemplo: cadmio, mercurio, plomo, etc. (63,64,65,66).

Los metales pesados están presentes en la corteza terrestres como elementos naturales y se encuentran en estado libre y de forma natural en algunos ecosistemas; no obstante, pueden variar su concentración y asimismo convertirse en metales tóxicos, representando un serio problema medio ambiental y alterando el equilibrio de los ecosistemas (67). Entre los metales más tóxicos destacan el mercurio (Hg), el plomo (Pb), el cadmio (Cd), el cromo (Cr), el cobre (Cu), el manganeso (Mn), el níquel (Ni), el estaño (Sn), el zinc (Zn), el vanadio (V), entre otros (68,69).

La emisión de los metales pesados al medio ambiente ocurre de manera natural y/o antropogénica, perjudicando considerablemente los ecosistemas, lo cual es evidenciado por el deterioro del entorno y la disminución de la calidad de vida de los factores bióticos e incluso llevándolos eventualmente hasta la muerte. La causa principal de esta emisión es atribuida a las actividades antropogénicas como la industria minera, los vertidos industriales, la actividad agrícola, etc. (63,64,65,66,70,71). La más importante entre ellas, son las operaciones mineras (72,73,74), que a pesar de la suspensión de sus actividades, la emisión de dichos metales persiste aun en el ambiente

y esto puede perdurar durante cientos de años. En el presente, nuestro entorno se ve sumamente comprometido debido a que los agentes contaminantes han empezado a incrementarse ampliamente por la disposición y el empleo inadecuado de una gran variedad de productos químicos, utilizados para la explotación de numerosos recursos (plata, oro, cobre, etc.), perjudicando altamente la coexistencia entre el entorno y los actores que lo habitan, siendo manifestado por las intensas alteraciones en la calidad del suelo, aire, y agua de diversas regiones (75).

Debido a los diversos procesos mencionados anteriormente, los metales pesados son abandonados como material de desecho y algunos de ellos se movilizan por medio de masas de agua y/o de viento, generando problemas en el ambiente como la contaminación del agua, suelo y aire, y así, acumulándose en las plantas y en los tejidos orgánicos (76). Por ejemplo, los ríos se ven afectados por el continuo desemboque de las aguas residuales no tratadas, procedentes de diversos procesos antropogénicos; mientras que las aguas subterráneas se encuentran contaminadas por residuos industriales. Además, el mar también es contaminado ya que los desagües que terminan en este, contienen aguas ácidas provenientes de la lixiviación de metales pesados. Adicionalmente, estos metales se encuentran formando parte de los sedimentos en suspensión en las aguas de los arroyos y ríos, los cuales terminan como sedimentos en los lechos de este último, pudiendo llegar, incluso, hasta las aguas subterráneas (77,78).

Todos los metales pesados una vez liberados al medio ambiente, actúan y generan efectos considerables, cada uno de diferente manera, permitiendo su distinción entre ellos. Por ejemplo, en el caso del mercurio (Hg), su forma más tóxica es el metilmercurio, es un complejo mercurial orgánico, que se forma mediante los procesos de metilación y así, generando su carácter de potente neurotóxico. Se ha encontrado que en los peces, un 40% de Hg tienden a bioacumularse en metilmercurio, haciéndolo disponible para los animales y humanos (79).

Otro ejemplo es el cobre (Cu), el cual ingresa al medio ambiente por residuos de los procesos industriales como electrodeposición, producción de sulfato de cobre, procesos metalúrgicos, procesos textiles, etc. Estos residuos contaminan las aguas causando en los organismos daños hepáticos e incidencia de enfermedades coronarias (80). Además, por medio de la liberación de este metal mediante la quema del combustible, Cu se encuentra en el aire durante largos periodos, luego es depositado por la lluvia, teniendo como destino final el suelo y agua, las cuales llegan a presentar grandes cantidades de cobre (81).

Adicionalmente, el hierro (Fe) cuando se presenta a concentraciones mayores de 0.3 mg/L presenta un color amarillo y a partir de 1mg/L presenta un sabor amargo y astringente, siendo evidencias de contaminación y cuando ocurre la inhalación de polvos que contengan óxido de hierro se puede originar neumoconiosis (siderosis) (82). Este metal cuando se asocia con el oxígeno en un medio acuoso produce su carencia y por lo tanto el ahogo de peces, plantas y organismos marinos que tanto la requieren.

La fabricación de hierro y acero originan cantidades enormes de aguas servidas y emisiones atmosféricas, por lo que si todo esto no es tratado de una forma correcta puede ocasionar la degradación del suelo, agua y aire. (83).

Asimismo, el zinc (Zn) es otro metal contaminante del ambiente que es adicionado durante las operaciones mineras, el proceso del acero y la combustión del carbón. Cuando las aguas residuales no son depuradas satisfactoriamente se genera la deposición de fango contaminado con zinc en las orillas de los ríos, incrementando la acidez de las aguas, además, esta contaminación afecta a los peces, ya que el zinc entra en sus cuerpos produciendo la biomagnificación en la cadena alimentaria. Por otro lado, los suelos contaminados con zinc afectan significativamente la salud de los animales puesto que absorben las elevadas concentraciones de dicho metal, a través de las plantas empleadas para su alimentación. Además, el zinc es capaz de impedir diversas actividades en los suelos, ejerciendo efectos negativos, principalmente, en las actividades realizadas por los microorganismos y lombrices (84).

Por otra parte, el cadmio (Cd) es liberado al ambiente por la refinación del zinc (y ocasionalmente plomo), por la bioindustria del estiércol y por fuentes naturales como la actividad volcánica y erosión de las rocas. El cadmio presente en ambientes acuáticos se bioacumula en una variedad de especies como las langostas, peces, ostras, gambas y mejillones. En el aire, el cadmio está presente a causa de las frecuentes combustiones de residuos urbanos y combustibles fósiles que se realizan, además, también puede encontrarse en el suelo debido a que las aguas residuales que desembocan en este,

contienen grandes cantidades de dicho metal. Una vez en el suelo, el cadmio representa un peligro potencial para las plantas, ya que la materia orgánica presente lo absorbe rápidamente. Esto repercute en los animales y humanos ya que son dependientes de las plantas para su alimentación, provocando que este metal sea acumulado en sus sistemas biológicos, generando poderosos daños. Los seres vivos que ingieren alimentos contaminados con cadmio, manifiestan lesiones en el cerebro, hígado y nervios, además de una alta presión sanguínea (84).

Con respecto al plomo (Pb), existen muchos causantes de su emisión al ambiente, pero entre ellos destacan, principalmente, los procesos mineros y de fundición, las pinturas antiguas que presentan plomo y el escape de gases de automóviles que son generados por la intensa quema de combustibles de petróleo que contienen tetraetilo de plomo $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_4\text{Pb}$. La contaminación con plomo en los seres vivos es llamada saturnismo, el cual es manifestado por calambres en el abdomen asociados con vómitos y náuseas, por daños cerebrales, hepáticos y renales, y por dolencias en la cabeza, estómago y músculos. La detección del plomo en el sistema corporal es realizada a través de un examen sanguíneo y si el hallazgo de dicho metal es elevado indica que no puede ser eliminado naturalmente por el organismo (84).

Todos estos metales han sido mencionados puesto que son considerados como los más tóxicos para el medio ambiente, pero de la misma manera se podría citar otros como el níquel, cromo, manganeso, vanadio, estaño, etc. Además, cabe mencionar que,

generalmente, los metales pesados son liberados al ambiente por los procesos de extracción de los mismos (84).

2.2.3. Metales Pesados en Suelos Agrícolas

La agricultura es una actividad humana que ha convertido al hombre de su estado nómada buscador y recolector de comida a sedentario dominador de la tierra y productor de alimentos en niveles cuantitativos y cualitativos diferentes, con lo que se ha convertido, con el tiempo, en un gran propulsor del desarrollo económico y sustentable para la humanidad. Sin embargo, esta transición al sedentarismo ha repercutido negativamente sobre el ambiente, generando peligros que afectan considerablemente a los factores bióticos y abióticos (85).

El principal peligro que perjudica el ambiente y a sus actores es la constante exposición a una gran variedad de contaminantes, particularmente, a los metales pesados. Esta exposición, a parte de las causas naturales, se debe fundamentalmente a la eliminación descuidada e imprudente de los metales pesados al medio ambiente, los cuales provienen de muchos procesos antropogénicos (86,87). A partir de esto, la contaminación ambiental por metales pesados ha sido considerada como un problema de índole mayor, generando preocupación en todas partes (88,89).

La contaminación por metales pesados en áreas agrícolas se está incrementando (90) a causa de la deposición de materiales de desechos procesados y sin procesar, que

ha llevado a la lixiviación persistente de metales pesados disueltos en los sistemas de suelo y agua, por tal dichos metales han sido priorizados como principales contaminantes debido a su eliminación descuidada al medio ambiente (91). Esta eliminación ocasiona que los metales pesados sean emitidos al ambiente produciendo la infertilidad del suelo (desmejoramiento de las propiedades químicas, físicas y biológicas) y la contaminación del agua, la cual es emplea para riego, afectando así al área agrícola a través de la limitación de la germinación, crecimiento y desarrollo de las plantas.

Los metales pesados para causar efectos negativos en los suelos agrícolas deben encontrarse a concentraciones mayores que los límites permisibles, pero estas elevadas concentraciones no solo perjudican la germinación, desarrollo y crecimiento de las plantas sino que también ejercen un poderoso efecto sobre las poblaciones microbianas, mediante la alteración de su tamaño poblacional, esto es definida como “polución de suelos” (92).

En los suelos, estos metales pueden encontrarse de varias formas, como iones libres o disponibles, como compuestos de sales metálicas solubles, o bien, como compuestos insolubles o parcialmente solubilizables tales como hidróxidos, óxidos y carbonatos (93). Cuando los metales pesados están presentes en forma de iones libres, afectan directamente a los organismo, bloqueando sus funciones biológicas como la inactivación de varias enzimas esenciales y esto es causado por la capacidad de los metales pesados de unirse al grupo sulfhidriilo ($-SH$) de las proteínas (94).

Otra causa a la que se le atribuye la contaminación en los suelos agrícolas por metales pesados es el empleo de fertilizantes químicos, ya que al aumentar el contenido de estos compuesto en el suelo, alteran las propiedades del mismo. Generalmente, los fertilizantes contribuyen con el suelo mediante el enriquecimiento de nutrientes esenciales que son requeridos para el óptimo rendimiento de las plantas, por ejemplo los fertilizantes nitrogenados que contienen fosfato de amonio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), nitratos de amonio (NH_4NO_3), urea ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$), nitratos de sodio (NaNO_3), etc. (95); sin embargo, estos productos presentan impurezas que son residuos de metales pesados, los cuales permanecen en los suelos volviéndolos infértiles y por tal perjudicando al desarrollo y crecimiento de las plantas.

Existen 4 rutas diferentes que pueden seguir los metales pesados, una vez incorporados en los suelos (96):

- a) Permanecer en los suelos, mediante su fijación por procesos de complejación, adsorción y precipitación o disueltos en las soluciones de los suelos.
- b) Integrar la cadena alimenticia a través de su absorción por las plantas.
- c) Ser volatilizados y así formar parte de la atmósfera.
- d) Moverse hacia las aguas subterráneas o superficiales.

Los metales pesados presentan una importante característica, no ser biodegradables, por tal, esto les confiere su permanencia en el suelo por largos periodos de tiempo; como consecuencia, estos se acumulan y se dispersan sin ningún

inconveniente por una gran diversidad de ecosistemas (97). Los metales pesados presentes en el suelo tienden a diseminarse ampliamente entre los compuestos de la fase sólida del suelo, ejerciendo una alta toxicidad sobre un sinnúmero de cultivos. Esta diseminación es caracterizada inicialmente por una retención fugaz, seguida por reacciones tardías, siendo todo esto dependiente de las características del suelo, la especie del metal y grado de tiempo e introducción (98).

2.2.4. Metales Pesados en Cultivos de Plantas

Algunos de los metales pesados son oligoelementos esenciales para el crecimiento y nutrición de las plantas, por ejemplo el zinc (Zn), manganeso (Mn), hierro (Fe), cobre (Cu), entre otros, los cuales son indispensables en el proceso fotosintético y la activación enzimática para el adecuado metabolismo de las plantas (99), pero en concentraciones más altas se convierten en tóxicos y pueden interferir con numerosas procesos biológicos (1). Del mismo modo, se consideran entre los metales pesados los elementos no esenciales que se encuentran comúnmente en los suelos agrícolas, como el cadmio (Cd), plomo (Pb) y el mercurio (Hg), y se sabe que causan efectos nocivos en las plantas, afectando su germinación, crecimiento y desarrollo (3,4).

Las plantas absorben y acumulan una variedad de nutrientes mediante el empleo de mecanismos específicos, sin embargo, durante estos procesos ciertos metales no

esenciales pueden ser incorporados en las plantas a causa de la presencia de un comportamiento electroquímico muy semejante con los elementos esenciales requeridos por los vegetales para su óptimo desarrollo (100).

Generalmente, para que los metales pesados puedan integrar la cadena alimentaria, primero deben ser absorbidos por las plantas, seguido por su acumulación en los mismos (101). Estos metales pesados presentes en suelos y aguas negras son muy perjudiciales ya que suelen ser bioacumulados por las plantas. La bioacumulación se define como el incremento de la concentración de un compuesto químico presente en un ser vivo por un periodo determinado, contrastada con la concentración del mismo compuesto presente en el entorno (102). Los procesos de absorción y acumulación de metales pesados tienden a depender, primeramente, de su desplazamiento para ir del suelo hacia la raíz; segundo, de su movimiento a través de las membranas de las células corticales presentes en la raíz; tercero, de su paso a partir de estas células hacia el xilema, de donde estos metales se movilizan al tallo; por último, el transporte de estos metales desde las hojas a los tejidos de almacenamiento, los cuales son empleados por el floema como alimento (tubérculos, semillas y frutos). Inmediatamente de la absorción y acumulación, los metales pesados presentes en las plantas, se encuentran al alcance de los animales (ganado) y/o humanos, ya que son consumidos por ellos como alimento (103).

Los metales, junto con el agua y otros nutrientes, son incorporados a las plantas a través de las raíces; ingresan a las células vegetales y son distribuidas en sus

diferentes compartimentos a través de proteínas transportadoras presentes en las membranas de cada compartimento subcelular. Sin embargo, estos transportadores no suelen ser específicos para cada metal en particular, lo cual genera dos tipos de inconvenientes: por un lado, que se incorporen metales nocivos para la planta y, por otro, que la acumulación en exceso de un metal limite el ingreso a la célula de otros. Una vez dentro de la raíz, la capacidad para moverse de un metal y su sitio de depósito en la planta va a depender de las propiedades del metal, de la especie vegetal y de la edad de la planta en el momento de la exposición. En general, la raíz es considerada como el principal acceso que emplean los metales para incorporarse a las plantas, además es ahí donde se acumula la mayor cantidad de metal y la alta movilidad de muchos metales les permite moverse rápidamente hacia la parte aérea de la planta (6).

Las células rizodérmicas de la raíz poseen cargas negativas, las cuales son conferidas por la presencia de polímeros tales como el grupo carboxilo del ácido péctico y las diferentes proteínas enzimáticas y estructurales. Las cargas negativas generan una interfase en equilibrio cuando se unen con las cargas positivas en la zona rizosférica, como sucede con los cationes que son metálicos, por ejemplo el plomo (Pb^{+2}). Estos cationes, a través de la pared celular (la cual es hidrofílica y permite el paso e intercambio iónico), ingresan y se unen a las cargas negativas presentes en la pared celular, y posteriormente son conducidos de manera radial, a través de la vía simplástica y la vía apoplástica (7). La vía apoplástica es la ruta de movimiento de iones y otros por las paredes celulares y espacios intercelulares de las células de la raíz, en cambio, la vía simplástica es la ruta de movimiento a través del citoplasma

atravesando las células por medio de los plasmodesmos. Los plasmodesmos son conexiones plasmáticas entre células contiguas a través de las paredes que las separan, permitiendo el movimiento de célula a célula (104,105).

En las zonas apicales jóvenes no se encuentra desarrolla la Banda de Caspary, por lo que el metal se transporta por la vía apoplástica hacia el espacio vascular. Caso contrario a lo que sucede con raíces adultas, donde esta Banda se encuentra presente debido a la diferenciación de tejidos y el desarrollo de la exodermis y endodermis, haciendo innecesaria la vía apoplástica y promoviendo el uso de la vía la simplástica (106). La banda de Caspary se define como una capa impermeable compuesta por un polímero llamado suberina, el cual tiende a extenderse ilimitadamente de manera transversal y radial a todo lo largo de las paredes celulares de la endodermis (capa más interna de la corteza), formando un cilindro continuo sin espacios intercelulares entre sus células debido a la unión entre sí de estas por las bandas, imposibilitando el paso de sustancias entre ellas; además, es considerada una defensa frente al transporte pasivo de metales pesados (107,108,109).

La absorción foliar es otro mecanismo de ingreso de metales pesados a las plantas. Algunos elementos traza pueden provenir de fuentes aéreas y tener un gran impacto sobre las plantas, por lo cual también es importante controlar el uso de fertilizantes foliares. Esta absorción es dependiente de la penetración cuticular y de un mecanismo de carácter metabólico, el cual permite acumular grandes cantidades de metales (110).

La alta toxicidad que causan los metales pesados desde el punto de vista químico se debe a que estos presentan gran capacidad de adherirse a las moléculas orgánicas. Esta toxicidad en los organismos vivos depende de las reacciones de los metales con los ligandos, los cuales son fundamentales para que sean asimilados, y a la vez, estos se encuentran en grandes cantidades en las células, ya sea como moléculas individuales o integrando moléculas complejas. Así mismo, es importante resaltar la alta afinidad que poseen los metales pesados por los grupos carboxilos, sulfidrilos, hidroxilos, fosfatos e radicales amino. Las reacciones ligando-metal pueden ser muy dañinas para las células, ya que ejercen acción sobre las proteínas, inhabilitando su actividad o alterando su estructura proteica; además reemplazan elementos que son requeridos por su metabolismo, ocasionando la sustitución de las funciones (debido a la semejanza con los elementos esenciales) y la interferencia de numerosas moléculas (mediante la alteración de su conformación y el bloqueo de sus grupos funcionales); y por último inducen el estrés oxidativo por la producción de radicales libres o especies reactivas del oxígeno (ROS) (5,6,7).

El estrés oxidativo genera daños por la producción de ROS tales como los radicales hidroxilos (OH^\cdot), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el anion superóxido (O_2^\cdot), los cuales afectan crónicamente diversas moléculas como los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, además de las membranas y el proceso fotosintético, siendo todo esto atribuido al elevado poder oxidante que presentan estas especies. Los metales pesados por medio de una gran variedad de mecanismos son capaces de inducir el estrés oxidativo, por ejemplo, los metales pesados, como el cobre (Cu) y hierro (Fe), producen

radicales hidroxilo mediante su participación en las reacciones de Fenton y Haber-Weiss, debido a la capacidad que presentan dichos metales de variar su estado de oxidación. En caso contrario, los metales pesados, como el plomo (Pb) y el cadmio (Cd), que no son capaces de modificar su estado de oxidación, de forma directa no intervienen en la producción de ROS pero sí causan alteraciones en los mecanismos de defensas antioxidantes que presentan las células (6,111).

Otro inconveniente de estos metales es que perjudican el paso de electrones del Ciclo de Calvin o de la cadena transportadora, dando como resultado que, a la presencia de una elevada intensidad luminosa, el sistema fotosintético absorba grandes cantidades de energía luminosa que la que normalmente se emplea en los procesos metabólicos. Esto origina que el sistema fotosintético traslade esta energía absorbida hacia los radicales de oxígeno, que son los únicos aceptores en el cloroplasto que se encuentran disponibles. De esta manera se lleva a cabo la reacción de Mehler y se produce el anión superóxido, y éste a su vez genera peróxido de hidrógeno. Este último en grandes cantidades induce la producción de radicales hidroxilo, los cuales son potentes oxidantes de los ácidos orgánicos que pueden fomentar la generación en cadena de nuevos radicales de oxígeno, siendo para la célula elevadamente tóxicos. (7,111).

Sin embargo, las células vegetales emplean un mecanismo de defensa que, por medio de la reacción de óxido-reducción glutatión-ascorbato, producen enzimas

antioxidantes: el superóxido dismutasa y la peroxidasa, las cuales se ven disminuidas por la toxicidad de los metales pesados (112).

Las sintomatologías tóxicas por los metales pesados en las plantas incluyen la inhibición de la germinación y disminución del desarrollo y crecimiento de estas; conjuntamente, se ve afectado el crecimiento de las raíces y hojas, en este último también puede producirse la necrosis (muerte en la punta de las hojas) y la clorosis (amarillamiento de las hojas por la insuficiente clorofila) (6,111). Existen varios estudios que reportan la toxicidad en las plantas por metales pesados (113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128, 129).

2.2.5. Biofertilización Bacteriana

Actualmente, para lograr una agricultura rentable es necesario el empleo de estrategias que ofrezcan una buena fertilidad del suelo y un óptimo crecimiento y desarrollo de las plantas. Por tal una de estas estrategias involucra la aplicación de microorganismos capaces de ejercer efectos benéficos sobre el suelo y las plantas, es decir, promoviendo el crecimiento y desarrollo de una gran variedad de cultivos (8). Los beneficios que proveen los microorganismos que viven asociados a las plantas resaltan el interés de su uso en cultivos y mejoramiento de técnicas agrícolas. Así mismo, estos microorganismos que crecen asociados a la raíz de la planta, en la denominada rizósfera, se encuentran relacionados con el incentivo del crecimiento vegetal a través de una gran variedad de actividades. Entre éstas están la mejora de la

salud de las plantas, la estimulación de los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes y la mejora de la calidad estructural del suelo, aspectos importantes de la fertilidad del mismo (24). La calidad estructural del suelo implica propiedades físicas (espacio poroso, retención hídrica, densidad aparente, resistencia a la penetración), propiedades químicas (provisión de nutrientes esenciales) y propiedades biológicas (relación del suelo con los organismos).

Por lo mencionado anteriormente, es indispensable conocer los distintos factores que participan en la regulación de las actividades de los microorganismos, vinculadas con el mejoramiento de la fertilidad del suelo y crecimiento de la planta. Por tal motivo, las investigaciones se enfocan en buscar microorganismos capaces de producir sideróforos, promover el enraizamiento, fijar nitrógeno atmosférico, solubilizar el fósforo mineral no biodisponible, sinergismo con otros microorganismos, entre otras (24).

Cuando una gran diversidad de plantas interactúan con microorganismos promotores de la germinación y crecimiento vegetal, se habla de una relación planta-bacteria e incluso, de “helper bacteria”; por tal, esto conlleva a utilizar las bacterias como buenos biofertilizantes. Los biofertilizantes son insumos que han sido desarrollados con uno o varios microorganismos, que, de una forma u otra, benefician a las plantas en diferentes aspectos mediante su aplicación a semillas y/o parte superficial de la planta o suelos, colonizando la rizósfera o la zona interna de la planta,

y así, promoviendo el crecimiento vegetal por el aumento de los nutrientes esenciales y por el óptimo ambiente del suelo brindado.

Las plantas son influenciadas en su crecimiento por la participación de algunas bacterias, que son reconocidas como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) (9,10,11,12). Estas PGPR usan diversos mecanismos para beneficiar a las plantas, los cuales son evidenciados por el incremento de la germinación y el crecimiento vegetal, colonización de raíces, síntesis de fitohormonas, solubilización de fosfatos, fijación de nitrógeno, control biológico, estimulación de la resistencia a patógenos y mejoramiento de la calidad estructural del suelo y captación de nutrientes y agua (13).

2.2.5.1. Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (PGPR)

Las rizobacterias beneficiosas, conocidas como PGPR, cumplen importantes funciones que contribuyen con el crecimiento vegetal, como (130,131,132,133,134,135):

- a) Ejercer un control biológico contra los microorganismos patógenos a través de una estimulación de resistencia a estos o un efecto antagonista.
- b) Incrementar el contenido de nutrientes mediante la fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato, etc.

- c) Sintetizar hormonas de crecimiento vegetal (citoquinas, giberelinas, auxinas) para contribuir a la colonización de raíces mediante el aumento de la longitud y densidad de los pelos radiculares, permitiendo así una mejor captación de nutrientes y agua.

Las PGPR son capaces de interactuar con una variedad de especies vegetales e encontrarse, usualmente, dentro de una gran diversidad de ambientes. Algunas de estas PGPR son colonizadoras de la parte superficial de las raíces y la interfase del suelo adyacente, mientras que otras suelen ser bacterias endófitas, invadiendo el interior de la planta (hojas, vástagos, frutos, raíces, semillas, tubérculos, etc) (136).

Para que una bacteria sea reconocida como PGPR debe presentar 3 principales características (137):

- a) Ser colonizadora de la raíz o/y del espacio adyacente
- b) Subsistir y reproducirse dentro de los hábitats localizados en la zona superficial de la raíz.
- c) Promover el desarrollo y crecimiento de las plantas

Las actividades de las PGPR se inician colonizando la raíz o la rizósfera y esto ocurre gracias al fenómeno de la quimiotaxis, es decir, las bacterias son atraídas por compuestos químicos de los exudados que son secretados por las raíces, permitiendo la interacción entre estas bacterias y la raíz de la planta. Entre estos compuestos

podemos encontrar azúcares (glucosa, arabinosa, fructuosa, maltosa, etc), aminoácidos (asparagina, glutamina, arginina, etc), ácidos orgánicos (ácido málico, ácido ascórbico, ácido acético, ácido succínico, etc), flavonoides, fenoles, carbohidratos, ácidos grasos, alcaloides, entre otros (138, 139,140,141,142). Existe una gran variedad de bacterias que son catalogadas como PGPR: *Streptomyces sp.*, *Azospirillum sp.*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Azotobacter sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Micrococcus sp.*, *Microbacterium sp.*, *Agrobacterium sp.*, *Xanthomonas sp.*, entre muchas más (9,135,143,144,145,146,147,148).

2.2.5.2. Mecanismos de Acción de las PGPR

El efecto positivo que otorga las PGPR a las plantas está regulada por el empleo de dos mecanismos: directo e indirecto, o también por la combinación de ambos. El mecanismo directo consiste en suministrar nutrientes necesarios para el desarrollo de la planta o contribuyendo con la asimilación de nutrientes solubles presentes en el suelo; mientras que el indirecto se basa en disminuir, e incluso eliminar, la presencia de microorganismos patógenos (nematodos, bacterias y hongos), y así evitar y controlar los efectos negativos provocados por estos. Como consecuencia de esto, algunos autores tienden a agrupar a las PGPR en PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria) y PGPB-Biocontrol (148,149,150,151,152,153,154).

i. Directo:

Los mecanismos directos son (134,153,154,155):

- a) Solubilización de fosfato:** En el suelo se encuentran formas insolubles de fósforo orgánico e inorgánico, lo que los hace deficientes para las plantas, ya que no pueden ser asimilados y participar en los procesos biológicos, perjudicando a la planta considerablemente. Por tal la participación de las bacterias es primordial para resolver esta situación, permitiendo el paso del fósforo insoluble a soluble para que así puedan ser utilizado por las plantas. Estas bacterias realizan esta actividad mediante la producción de ácidos orgánicos y agentes quelantes para solubilizar el fósforo inorgánico; mientras que para la solubilización del fósforo orgánico se da por acción de la enzima fosfatasa (mineralización) (156,157,158,159).
- b) Fijación de nitrógeno:** Este elemento es muy requerido para las actividades metabólicas pero su disponibilidad es limitante en el suelo, de tal forma que el desarrollo y crecimiento de las plantas se ven afectas por esto. Sin embargo, existe una alternativa biológica para este inconveniente, que es el empleo de bacterias capaces de convertir el nitrógeno molecular atmosférico a amonio por medio de la enzima nitrogenasa (160,161,162).

c) **Producción de fitohormonas:** Este es la actividad por excelencia que realizan estas bacterias, debido a la producción de una gran variedad de sustancias orgánicas que promueven el crecimiento vegetal como las auxinas, giberilinas, citoquinas, entre otras, las cuales permiten la formación y desarrollo de la raíz, la maduración de los frutos, la florescencia, la germinación, etc. Las sustancias más importante, típica y esencial es el ácido indol-acético (AIA), un tipo de auxina, debido a su destacada actividad en diversos procesos como la división, elongación y diferencian celular, lo cual repercute de manera positiva en las raíces, hojas, frutos y otros órganos (163,164,165).

Dependiendo del tipo de bacteria, estas pueden emplear un solo o muchos mecanismos para ejercer su acción beneficiosa sobre las plantas, las cuales pueden ser estudiadas por diversas pruebas como el análisis morfológico de la parte aérea (hojas) y superficial (raíz) de la planta, análisis de la condición nutricional de la planta, ensayos a nivel químico y biológico, entre otros (166).

ii. Indirecto:

Los mecanismos directos son (134,167,168,169)

a) **Producción de sideróforos:** Este tipo de mecanismo consiste en la producción, por parte de las PGPR, de unos metabolitos llamados

sideróforos, los cuales ejercen su acción contra los microorganismos patógenos. Estos metabolitos son secretados con el fin de quelar el hierro presente (Fe^{+3}), debido su alta afinidad por este ion, trayendo como consecuencia la escasez de este elemento requerido para el desarrollo de estos patógenos (170,171,172).

- b) Producción de sustancias antimicrobianas:** Se basa en la síntesis de varias moléculas que son de acción antifúngicos, los antibióticos, capaces de suprimir a los microorganismos patógenos (173).

- c) Producción de enzimas:** Las bacterias pueden producir enzimas líticas para contrarrestar a los patógenos como las glucanasas, quitinas y proteasas, los cuales alteran la pared celular del hongo (174).

- d) Competencia:** La capacidad que presentan estas bacterias de desplazar a una infinidad de patógenos, por su potente colonización en la zona rizosférica (163).

- e) Hidrólisis de moléculas patogénicas:** Es la degradación o alteración de los compuestos producidos por los patógenos como el ácido fusárico, entre otros más (175).

f) **Inducción de la resistencia sistémica:** Es la producción de compuestos por las PGPR, como el ácido salicílico, sideróforos y lipopolisacáridos, que estimulan la resistencia de las plantas a patógenos, mediante la síntesis de otros compuestos de defensa como las fitoalexinas (130,176).

El empleo conjunto de ambos mecanismos contribuye satisfactoriamente al desarrollo y crecimiento de las plantas, incrementando la densidad y longitud de las raíces, así como de las hojas, frutos, flores, etc, lo cual permite así una alta productividad hasta del 50% en diversos cultivos de gran interés económico (papa, tomate, orégano, maíz, soja, trigo, etc) (177).

2.2.5.3. Controladores de Estrés (Metales Pesados)

Al ser organismos sésiles, las plantas tienden a enfrentar un gran número de perturbaciones que generan un ambiente variable y poco predecible. Existen dos tipos de factores responsables de la alteración ambiental: los bióticos y los abióticos. Se consideran factores bióticos a los organismos vivos presentes en el suelo; mientras que los abióticos incluyen a la temperatura, la concentración de CO₂, la disponibilidad de agua y las características del suelo (salinidad y presencia tanto de metales pesados como de micro y macro nutrientes, entre otras) (150).

Por tal, el empleo de microorganismos capaces de tolerar estas condiciones de estrés (principalmente la presencia de metales pesados) y, a la vez, estimular el óptimo

desarrollo y crecimiento de las plantas, son numerosos. Entre los cuales destacan y tienen una atención especial las PGPR, quienes interactúan con los suelos contaminados con metales pesados (suelo infértil) y consideradas buenos biofertilizantes (178). El uso de microorganismos que colonizan la rizósfera (rizobacterias) ha causado un particular interés como una alternativa para biorremediar y secuestrar sustancias tóxicas presentes en el suelo (179), empleándolos como una herramienta para la recuperación de suelos que se encuentran contaminados con metales pesados especialmente (180,181). Esto contribuye al desarrollo y crecimiento de las plantas, manifestado por un mayor crecimiento radicular, foliar, florecencia, etc. (19), y además, con la limpieza de los suelos contaminados, volviéndolos fértiles (178,182).

Como un indicador de la fitotoxicidad de metales pesados, varios autores reportaron diversas formas de monitorear estos efectos, uno de ellos está basado en la germinación, el crecimiento y el desarrollo de las plántulas (183,184,185). El principal indicador útil para evaluar el efecto benéfico por parte de las PGPR es el desarrollo radicular de la planta (134), cuya medición es conocida como PREP (Plant Root Elongation Promotion) (187,188), la cual se ve favorecida en densidad y longitud por las fitohormonas producidas por estas bacterias. La rápida colonización de las raíces (por propagación de las raíces laterales o elongación de la raíz primaria) resulta beneficioso para la planta a medida que aumenta su capacidad de anclaje al suelo y con ello la mejor captación de nutrientes y agua (186). Existen infinitos estudios

relacionados con las PGPR, que han permitido actualmente comercializarlas como potentes biofertilizantes, debido a sus acciones beneficiosas en diversos cultivos (174).

Como ya se mencionó en los apartados numéricos anteriores, los mecanismos directos e indirectos cumplen funciones claves para promover el crecimiento vegetal, sin embargo la literatura menciona otros posibles mecanismos destinados a sobrellevar las condiciones adversas generadas por los metales pesados. El empleo conjunto de todos estos mecanismos mejora la calidad estructural del suelo y la promoción evidente del desarrollo y crecimiento vegetal, a causa de su complementación unos con otros. Asimismo, entre más mecanismos empleen las PGPR, éstos la harán un inoculante recomendable, por la gran cantidad de propiedades adquiridas (187).

Estos otros posibles mecanismos aplicados por las PGPR frente a este tipo de perturbaciones son la producción de compuestos quelantes de metales como los sideróforos (14,15), adsorción de los iones metálicos en la pared celular, almacenamiento intracelular de los iones metálicos que ingresan por el sistema de transporte (16,17,18) y además, a través de la acción de la ACC desaminasa, enzima que disminuye la biosíntesis de etileno (19,189).

- a) **Adsorción de iones metálicos en la pared celular:** Es un proceso que mediante interacciones fisicoquímicas permite retener iones metálicos en la superficie de la célula bacteriana, lo cual es causado por la presencia de

cargas negativas atribuidas a los grupos funcionales (hidroxilo, sulfhidrilo, fosfato, carboxilo) presentes en los compuestos de la pared celular (190).

b) Almacenamiento intracelular de los iones metálicos: El secuestro intracelular, mediante la unión a proteínas, es la acumulación de metales en el citoplasma de manera tal de prevenir la exposición de componentes celulares esenciales al mismo (191,192).

c) Producción de sideróforos: Estos compuestos sintetizados por las bacterias ejercen su acción sobre los metales por quelación (14,15). Particularmente, estos compuestos son muy afines al hierro, permitiendo su eficaz captación mediante enlaces covalentes y su formación de complejos (193), sin embargo también pueden secuestrar otros iones metálicos como el zinc (Zn), níquel (Ni), cadmio (Cd), plomo (Pb), cobre (Cu), entre otros (194). Existen varios tipos de sideróforos como hidroxamato, catecolato, hidroxicarboxilato y el α -cetoácidos (14) y mientras más de estos produzcan una bacteria más eficiente será su acción.

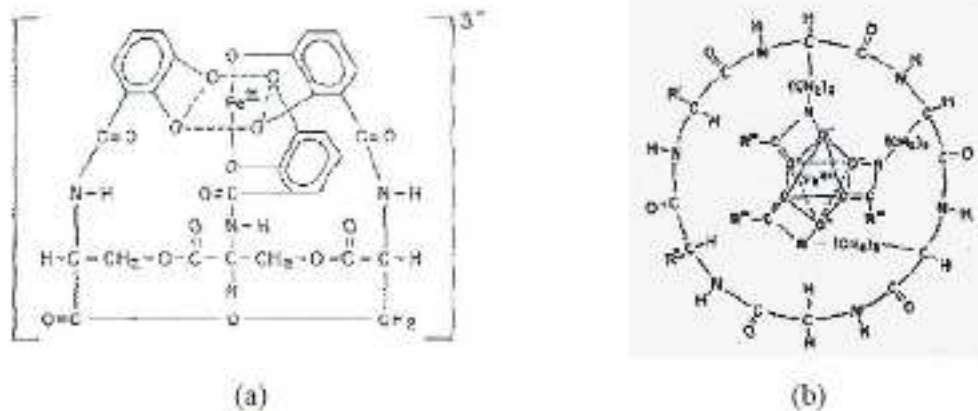


Figura 6: Estructura química de sideróforos. a) Catecolatos y b) Hidroxamatos.

Figura tomada de Neilands, 1995 (14).

d) ACC desaminasa: Un ambiente expuesto a condiciones de estrés, particularmente por metales pesados, estimula la abundante síntesis de etileno por parte de la planta, compuesto significativamente perjudicial para las mismas por su efecto limitante en la promoción radical y por la abscisión y senescencia foliar, floral y frutal, conduciéndolo hasta su muerte (195,196). Para contrarrestar esta situación, las bacterias participan mediante la producción de la enzima ACC desaminasa (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico), la cual hidroliza el precursor del etileno, el ACC, transformándolo en 2-oxobutanoato y NH_3 , y con esto reduciendo los niveles de etileno y elevando la cantidad de amonio disponible para las plantas (19,150). Esta enzima también es capaz de enfrentar y aliviar otras condiciones de estrés: microorganismos patógenos, salinidad, hidrocarburos poliarómicos, sequías, etc. (197).

2.2.5.4. Actinomicetos como Biofertilizantes

En el área de la Biotecnología Industrial y Ambiental, se ha registrado una variedad de investigaciones sobre los actinomicetos que han incrementado los conocimientos sobre ellos. Los propósitos de estos estudios están orientados a su posible utilización como biofertilizantes y por ello se han caracterizado como PGPR, confirmando sus propiedades beneficiosas para las plantas y los suelos. Los actinomicetos han sido reconocidos como bacterias que desempeñan una variedad de funciones en los ecosistemas, entre las cuales se encuentra la mejora de la calidad estructural del suelo y la síntesis de sustancias antagonistas para la inhibición de patógenos, como los antibióticos, siendo esta bacteria el productor principal de estos (24).

La literatura científica menciona diversas funciones que cumplen los actinomicetos, las cuales también son realizadas por las PGPR, por este motivo se consideran a estas bacterias dentro de este grupo, quienes ejercen beneficios sobre el suelo y las plantas, contribuyendo así con la actividad agrícola (23,198,199). Entre estas funciones se han descrito la síntesis de sideróforos (200,201), control biológico (producción de metabolitos antifúngicos y enzimas biodegradativas) (200,202,203), la producción de fitohormonas (204,205,206), la solubilización de fosfato (158,206,207), la fijación de nitrógeno (45,208), la descomposición de la materia orgánica por la acción de enzimas extracelulares (209), entre otras.

Entre todos los géneros de actinomicetos, el que más destaca es el género *Streptomyces* debido a que ha sido reportado como potente colonizador de la rizósfera, ejerciendo un control biológico contra microorganismos patógenos (hongos, bacterias, parásitos, etc), produciendo moléculas extracelulares (sideróforos) y reguladores de crecimiento (AIA) y promoviendo la nodulación. Todos estos contribuyen con el mejoramiento del suelo y favorecen de manera indirecta y directa el crecimiento vegetal y (200).

Existen trabajos que reportan la buena capacidad biofertilizante de estas bacterias, que contrarrestan este factor de estrés (metales pesados) como en *Triticum* (210), *Phaseolus vulgaris* (204), *Sparina densiflora* (211), *Brassica napus* (212), *Zea mays* (213), *Rye grass* (214), etc.

Por lo mencionado en los apartados anteriores, se conoce que los actinomicetos poseen características similares a las PGPR y como tales son consideradas una potencial alternativa como biofertilizantes sin representar una amenaza para otros microorganismos de la rizósfera, contribuyendo así al mantenimiento del equilibrio rizosférico. Esto representa uno de los principales pilares de las investigaciones en el campo de la Microbiología del Suelo y la Interacción Planta–Microorganismo (24). En la actualidad existen empresas biotecnológicas dedicadas a la venta de concentrados de distintos microorganismos que favorecen la restauración del suelo y el crecimiento de las plantas, dentro de los cuales se encuentra el género *Streptomyces*.

2.3. JUSTIFICACION

Actualmente existe información acerca de muchos microorganismos que presentan capacidades específicas para mejorar la calidad de los suelos y así favorecer la productividad de los cultivos. Uno de estos son las pertenecientes al grupo de las PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) que tienen la función específica de mejorar los suelos y los cultivos vegetales por diversos mecanismos biofísicoquímicos.

Dentro de las PGPR se encuentran los actinomicetos capaces de fijar el nitrógeno atmosférico, solubilizar los fosfatos, producir sideróforos, sintetizar fitohormonas y realizar un control biológico; es de especial atención su capacidad de contrarrestar los efectos nocivos de los metales pesados presentes en los suelos contaminados por mecanismos de adsorción, acumulación, producción de agentes quelantes y biotransformación de los mismos. Estas actividades hacen de los actinomicetos buenos biofertilizantes porque contribuyen a la recuperación de la fertilidad de los suelos y por tanto el rendimiento de los cultivos.

La presente investigación se justifica porque a) es necesario identificar a los metales pesados que pueden ser procesados y neutralizados por los actinomicetos, b) es necesario cuantificar los niveles tóxicos de los metales pesados tanto para las plantas como para los mismos actinomicetos, c) es necesario verificar y confirmar la capacidad descontaminante y promoción del crecimiento vegetal de los actinomicetos, d) la información existente referente a ésta capacidad de los actinomicetos ha sido limitada,

y e) contribuye al mejor conocimiento descontaminante y biofertilizante de estos microorganismos que se traduce como una alternativa de solución a la contaminación.

Finalmente, el presente estudio como otros similares enriquecen el conocimiento científico acerca de estos microorganismos que son un gran aporte al campo de la Biotecnología en el sector agrícola y agropecuario.

III. OBJETIVO GENERAL

El presente trabajo busca determinar la capacidad biofertilizante de los géneros de actinomicetos mediante su inoculación en semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) y *Medicago sativa* (alfalfa) expuestas a metales pesados, evaluadas a través de la germinación, desarrollo de la raíz y el crecimiento de las hojas.

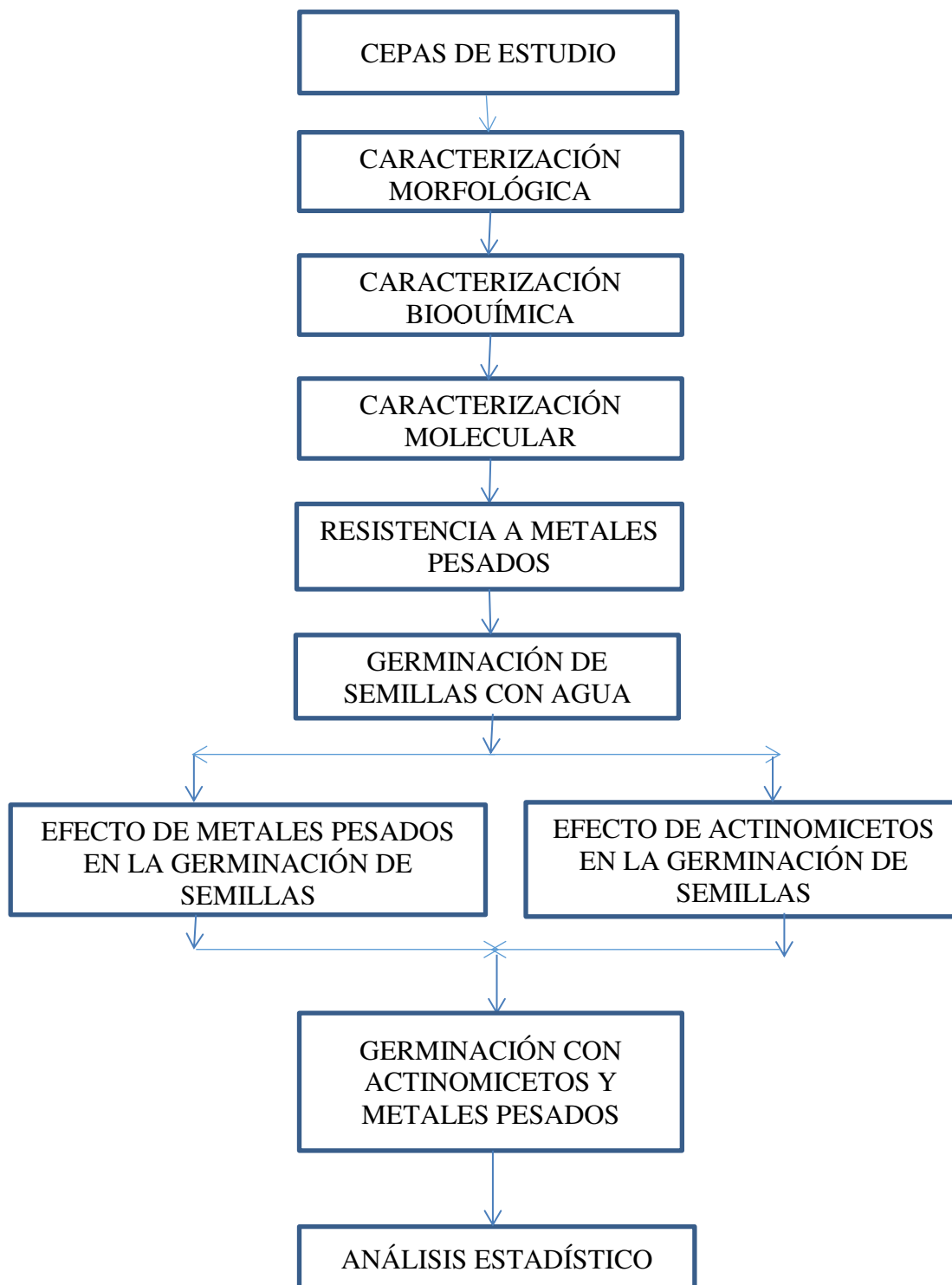
IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar morfológicamente los géneros de actinomicetos aislados a partir de minerales.
- Caracterizar bioquímicamente los géneros de actinomicetos aislados a partir de minerales.
- Caracterizar molecularmente los géneros de actinomicetos aislados a partir de minerales.
- Determinar la capacidad de resistencia de los géneros de actinomicetos a metales pesados (Cu, Fe, Zn, Pb, Cd y Hg).

- Estandarizar el método de germinación y crecimiento vegetal (desarrollo de raíz y hojas) de las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) y *Medicago sativa* (alfalfa) con agua (d).
- Determinar la capacidad de germinación y crecimiento vegetal (desarrollo de raíz y hojas) de las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) y *Medicago sativa* (alfalfa) expuestas a los géneros de actinomicetos.
- Determinar la capacidad de germinación y crecimiento vegetal (desarrollo de raíz y hojas) de las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) y *Medicago sativa* (alfalfa) expuestas a metales pesados.
- Determinar la capacidad biofertilizante (germinación, desarrollo de raíz y hojas) de los géneros de actinomicetos a través de su inoculación en semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) y *Medicago sativa* (alfalfa) expuestas a metales pesados.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Flujograma del Proceso



5.2. Material Biológico

Para el presente trabajo, se utilizaron 24 cepas de actinomicetos, 4 de los cuales han sido aislados en trabajos previos (215) y 20 fueron proporcionadas por el Laboratorio de Biotecnología Ambiental, perteneciente al LID (Laboratorio de Investigación y Desarrollo) de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Algunas de las 20 cepas han sido incluidas en un trabajo previo (34). Las cepas fueron: 6b, 6c, 6d, 6E1, 6E3, 11.1, 21, C2, E1, F, F1, Frep13, Frep14, Frep15, Fe5, K1A, K1B, K2, X, YA4, Y16, AB5, AB7 y K4.

5.3. Caracterización Morfológica

5.3.1. Caracterización Macroscópica

Con el objeto de determinar las características de cultivo de las cepas de actinomicetos, estas fueron sembradas por agotamiento en diferentes medios de cultivo: Agar Glicerol Extracto de Levadura (XGAL) (216), Agar Nutritivo (AN) (216) y Agar Almidón de Sales Inorgánicas (AAI) (217,242), adicionadas todas con Nistatina, por ser un antimicótico eficiente contra hongos no deseados y contaminantes (Anexo 3). El AN es un medio de cultivo usado normalmente en rutina para todo tipo de bacterias con propósitos generales, es un medio artificial para el crecimiento de actinomicetos (218). El medio XGAL y AAI fueron empleados debido a que permite una buena esporulación, facilitando la caracterización morfológica exacta de los

actinomicetos (219). Se incubaron a 28°C de 7 a 14 días en microaerofilia. Se observaron las características macroscópicas de cada una de las cepas crecidas en un estereoscopio. Se tuvo en cuenta la producción de pigmentos difusibles en los medios, el aspecto de la colonia y el color de micelio aéreo (superficie) y de micelio del sustrato (anverso) (35,219). Los resultados fueron comparados con las establecidas en el Manual de Determinación Bacteriológico de Bergey (35) y el Manual de Métodos para Caracterización de Especies de *Streptomyces* (219).

5.3.2. Caracterización Microscópica

5.3.2.1. Coloración Gram

La caracterización microscópica de las cepas de actinomicetos se realizó mediante la coloración Gram para determinar a qué clase de Gram corresponde y si estos actinomicetos presentan una forma filamentosa, esporulada o filamentosa fragmentada en bacilos, cocos y cocobacilos (Anexo 3). Se observó con un aumento de 100X (35). Los resultados fueron comparados con las establecidas en el Manual de Determinación Bacteriológica de Bergeys (35) y el Manual de Métodos para Caracterización de Especies de *Streptomyces* (219).

5.3.2.2. Laminilla en Plano Inclinado

Este método permitió observar el micelio del sustrato y aéreo, además de los propágulos formados. Las cepas de actinomicetos se sembraron de manera masiva en los cultivos de AN, XGAL y AAI adicionadas todas con Nistatina (Anexo 3). Simultáneamente se introdujeron en los medios de cultivo laminillas estériles (cubre-objeto) con una inclinación de 45° aproximadamente con respecto a la superficie del agar. Los medios de cultivo fueron incubados a 28°C de 7 a 14 días en microaerofilia. Luego las laminillas fueron retiradas con cuidado de los medios de cultivo y puestas sobre un porta-objeto, agregándole una gota de cristal violeta como colorante de contraste, que tiñe los micelios y filamentos de estas bacterias. Se observó con un aumento de 100X (35,219). Los resultados fueron comparados con las establecidas en el Manual de Determinación Bacteriológica de Bergeys (35) y el Manual de Métodos para Caracterización de Especies de *Streptomyces* (219).

5.4. Caracterización Bioquímica

La caracterización fisiológica se realizó para evaluar las actividades metabólicas de las cepas de actinomicetos mediante diferentes pruebas, pero previamente las cepas fueron sembradas en tubos con medio de cultivo de XGAL por 7 días a 28°C en microaerofilia para su uso (35). (Anexo 3). Los resultados fueron comparados con la establecidas en el Manual de Determinación Bacteriológico de

Bergey (35) y el libro *The Prokaryotes A Hand Book on the Biology of Bacteria* (248, 254).

5.4.1. Prueba de Rojo de Metilo y Voges Proskauer (RMVP)

Esta prueba se realizó con la finalidad de determinar la vía que emplean los microorganismos para fermentar la glucosa. Una es la vía ácida mixta con la generación de productos finales ácidos y la otra es la vía butanodiólica que genera productos finales neutros. Se empleó 10 μ L del cultivo de cada cepa y se colocó cada una en dos tubos con 5 ml del caldo RMVP (Anexo 3). Se incubaron a 28 °C por 7-14 días. Posterior a la incubación, se hizo uso de las soluciones indicadoras como reveladores de la prueba, donde la generación de productos finales ácidos fue determinada por el indicador rojo de metilo (vía ácida mixta), mientras que la generación de productos finales neutro (vía butanodiólica) se realizó con alfa naftol e hidróxido de potasio. Se colocó 3 gotas del indicador rojo de metilo a un tubo con cultivo bacteriano, mientras que al otro tubo con cultivo bacteriano se colocó 4 gotas del indicador KOH y 9 gotas de α - naftol. Se consideró como positivo para un vía el desarrollo de un color rojo en la superficie del medio.

5.4.2. Prueba de Citrato (C)

La prueba de citrato se realizó para determinar la capacidad de los microorganismos de utilizar como única fuente de carbono y energía, el citrato. Se

empleó 10 µL del cultivo de cada cepa y se colocó en tubos con 5 ml del medio Citrato Agar (Anexo 3). Se incubaron a 28 °C por 7-14 días. Se consideró como positivo el viraje del color del medio a azul, indicando la alcalinidad del medio.

5.4.3. Prueba de Lisina Hierro (LIA)

La realización de esta prueba permitió determinar si los microorganismos son capaces de producir la enzima lisina descarboxilasa, la cual al actuar sobre la lisina produce una diamina llamada cadaverina. Se empleó un asa en punta para la siembra del cultivo de cada cepa, la siembra fue por punción profunda en tubos con 5 ml del medio Lisina Hierro Agar (Anexo 3). Se incubaron a 28 °C por 7-14 días. Se consideró como positivo mediante la presencia del color morado en el medio, el cual se volvió alcalino, y negativo a un fondo amarillo, acidificando el medio.

5.4.4. Prueba de Hierro-Triple Azúcar (TSI)

Esta prueba fue realizada con el objetivo de determinar si los microorganismos presenta la capacidad de fermentar lactosa, sacarosa y glucosa. Se empleó un asa en punta para la siembra del cultivo de cada cepa, se picó el fondo y se extendió sobre la superficie del medio Hierro-Triple Azúcar Agar (Anexo 3). Se incubaron a 28 °C por 7-14 días. Se consideró positivo para la fermentación de lactosa, sacarosa y glucosa el viraje del color de todo el medio a amarillo, indicando la acidez en el medio (ácido en pico de flauta/ ácido en la profundidad- A/A). El viraje del color a amarillo solo en la

profundidad del medio fue positivo solo para la fermentación de glucosa, indicando acidez (alcalino en el pico de flauta/ácido en profundidad- K/A). La prueba fue considerada negativa para la fermentación de todos los azúcares mediante la continuidad del color rojo en el medio, es decir, no hubo viraje del color del medio, indicando así alcalinidad (alcalino en el pico de flauta/alcalino en la profundidad- K/K). Adicionalmente, se consideró también positivo para la producción de gas la formación de burbujas o la rotura del medio y la producción de ácido sulfhídrico fue evidenciada por el ennegrecimiento del medio.

5.4.5. Prueba de Licuefacción de la Gelatina

Con esta prueba se determinó la producción de gelatinasas (enzimas de tipo proteolíticas) por parte de los microorganismos, que licúan/hidrolizan la gelatina. Se empleó 10 µL del cultivo de cada cepa, los cuales fueron puestos en tubos con 5 ml del medio Gelatina Agar (Anexo 3). Se incubaron a 28 °C por 7-14 días. Luego, estos tubos se colocaron en la refrigeradora por 20 minutos. Se consideró positivo el tubo donde el medio se mantuvo líquido.

5.4.6. Prueba de Catalasa

Se realizó esta prueba con el objetivo de determinar si un microorganismo presenta la enzima catalasa. Se colocó sobre una lámina portaobjetos gotas de H₂O₂ al 3 %, y con un asa de siembra se tomó una pequeña cantidad de la colonia de cada cepa

y se homogenizo con la gota de H₂O₂. Se consideró como positivo, la reacción que libera burbujas de gas.

5.4.7. Prueba de Hidrólisis de Almidón

Esta prueba determinó si los microorganismos pueden hidrolizar el almidón por enzimas amilolíticas. En las placas con el medio Almidón Agar (AA), se sembró, con un asa en aro, una línea del cultivo de cada cepa (Anexo 3). Se incubaron a 28°C por 7 a 14 días. Posterior a la incubación, se hizo uso del lugol como revelador de la prueba. Se adiciona el reactivo de lugol sobre las colonias. La formación de una zona clara alrededor de la colonia se considera como positivo para la prueba de degradación de almidón. La longitud de las zonas claras fue medida.

5.4.8. Crecimiento en Diferentes pH

Esta prueba fue realizada con el propósito de determinar si un microorganismo es capaz de desarrollarse a diferentes pH. Se empleó 10 µL del cultivo de cada cepa, las cuales fueron colocadas en tubos con 5 ml de medio XGAL (Jhonson et al., 2009), con diferentes pH: 2.8, 4 y 7 (Anexo 3). El pH 7 fue considerada como control. Se incubaron a 28°C por 7 a 14 días. Se realizó dos repeticiones por tratamiento. Se evaluó el grado de crecimiento de las cepas: 3 (abundante), 2 (regular), 1 (escaso) y 0 (no hay crecimiento).

5.4.9. Crecimiento a Diferentes Niveles de Salinidad (NaCl)

Esta prueba se realizó para evaluar el desarrollo de un microorganismo a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl). Se empleó 10 µL de cultivo de cada cepa, las cuales fueron colocadas en tubos con 5 ml de medio XGAL con NaCl en diferentes concentraciones: 1.5, 5, 7 y 10 % (Anexo 3). Se incubaron a 28°C por 7 a 14 días. La concentración al 0% fue considerada como control. Se realizó dos repeticiones por tratamiento. Se consideró como positivo los tubos donde se observó crecimiento y se evaluó el grado de desarrollo de las cepas: 3 (abundante), 2 (regular), 1 (escaso) y 0 (no hay crecimiento).

5.5. Caracterización Molecular

La caracterización molecular se realizó con el objetivo de identificar molecularmente las cepas de genes 16S rRNA de actinomicetos. Para tal propósito, esta prueba se basó en la metodología planteada por Miller et al. (1999) y Cook et al. (2003) (220,221).

5.5.1. Extracción de ADN

Para realizar la prueba de extracción del material genómico, las 24 cepas de actinomicetos fueron previamente cultivadas en caldo XGAL e incubadas por 7 a 14 días a 28°C (Anexo 3). Se tomaron 1.5 mL del caldo de cultivo en un tubo eppendorf

(MCT-150-C Axygen® NY, USA) para luego centrifugar las células a 12 000 rpm por 5 minutos (Micro CL21 Thermo Scientific™ MA, USA). El sobrenadante fue descartado y se agregó al pellet 500 µL de Buffer de Lisis (SDS 1%, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA).

Posteriormente, el volumen resuspendido se trasladó a una matriz de lisis FastPrep® Lysis Beads – Matrix F (MP Biomedicals® CA, USA) la cual fue sometida a 6 ciclos de 20 segundos cada uno en un homogenizador de tejidos Thermo Sarvant FastPrep® 120 Cell Disrupter System (GMI© Inc. MN, USA). Una vez terminado, la matriz fue centrifugada por 5 minutos a 10 000 rpm y seguidamente el sobrenadante fue colectado en un nuevo tubo eppendorf. Posteriormente se agregó 385 µL de una solución de acetato de potasio 5M para luego incubar por 5 minutos en baño maría a 65°C. Luego, el tubo se retiró del baño maría y se colocó por 5 minutos en hielo.

Inmediatamente a esto, se agregó 500 µL de cloroformo, se mezcló el volumen total en MaxiMix™ I Vortex Mixer (Thermo Scientific™ MA, USA) por 5 segundos y finalmente se centrifugó el tubo por 5 minutos a 10 000 rpm. El sobrenadante fue retirado cuidadosamente (fase acusosa) y colocado en un nuevo tubo eppendorf. Se agregó 1 ml de isopropanol y luego centrifugado por 5 minutos a 10 000 rpm. Al pellet obtenido se agregó 100 µL de etanol al 70% y de nuevo centrifugado por 5 minutos a 10 000 rpm, posterior a este paso se pudo visualizar el pellet de ADN adherido al fondo del tubo.

Finalmente, el sobrenadante fue descartado y el tubo se puso a secar a temperatura ambiente hasta evaporar completamente el etanol. El ADN fue resuspendido en 50 μ L de Elution Buffer y guardado a -20°C (Anexo 4).

5.5.2. Evaluación de la Integridad del ADN Extraído

Para la evaluación de la calidad del ADN extraído se elaboró una electroforesis. Para ello se preparó un gel de agarosa al 1% en 100 mL buffer TAE 1X (Tris base 40mM, ácido acético 20mM, and EDTA 1mM). Adicionalmente se preparó una dilución del ADN obtenido (1:10 v/v) con buffer EB. Esta dilución se evaluó paralelamente al ADN del stock. La carga para cada carril estuvo compuesta por 8 μ L de agua PCR, 2 μ L de buffer de carga ADN Gel Loading Dye (6X) (Thermo Scientific™ MA, USA) y 2 μ L de la muestra de ADN. Se consideraron muestras de ADN y sus respectivas diluciones.

Asimismo, con la finalidad de comparar cualitativamente la cantidad de ADN se incluyeron controles de ADN de fago Lamda (10 ng/ μ L) (2800M Promega© WI, USA) por 3 μ L, 5 μ L y 7 μ L. Se incluyó también el marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific™ MA, USA). Finalmente, el gel se corrió a 80 V por 45 minutos en una cámara de electroforesis horizontal Sub-Cell® Model 96 (Bio-Rad© Laboratories CA, USA) y fue revelado en un transluminador con luz UV MS04 SmartView Transilluminator (Major Science® Inc. CA, USA) (Anexo 4).

5.5.3. Selección y Validación de Primers para la Amplificación del Gen 16S.

Con la finalidad de caracterizar la diversidad de los géneros empleados en este trabajo se amplificó el gen ribosomal 16S para su posterior análisis filogenético, para ello se revisó una variedad de trabajos que tuvieron como objetivo la identificación molecular de microorganismos pertenecientes al grupo de actinomicetos. Con esta información fue posible comparar los primers empleados en estos ensayos y evaluar su utilidad en esta propuesta. En el Anexo 4 se puede observar un listado de primers universales reportados por distintos autores para el estudio del gen 16S y que fueron usados en el desarrollo de este trabajo.

Los primers que fueron seleccionados para amplificar el gen 16S son: 8F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') (222,223,224) y 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (225,226,227,228), los cuales permiten amplificar casi en su totalidad este gen. Con los primers definidos se procedió a evaluar su especificidad por BLAST©5 y se predijo el tamaño del producto con la herramienta in silico PCR amplification (229,230) cuyo algoritmo fue configurado para aceptar como máximo un nucleótido de mismatch y consideró el genoma de *Corynebacterium glutamicum* como referencia. Adicionalmente se incluyó otras especies de actinobacterias en un segundo análisis para observar la estabilidad del producto en este grupo, de esta manera fueron incluidas *Frankia alni*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Nocardia brasiliensis*, *Propionibacterium acidipropionici*, *Streptomyces albus*.

5.5.4. Amplificación del Gen Ribosomal 16S por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Con el ADN extraído de cada muestra se procedió a amplificar el gen 16S por PCR, para este fin se utilizó el kit AmpliTaq™ (Applied Biosystems™ CA, USA) el cual considera agua grado PCR, primer 8F (40 µM), primer 1492R (40 µM), Buffer AmpliTaq™ 1X, dNTPs (2.5 mM), MgCl₂ (2.5 mM), DMSO al 10% y 0.5 U/µL de Taq Polimerasa AmpliTaq™.

El protocolo de PCR para este caso se desarrolló en el termociclador LightCycler® 480 II (Roche© WI, USA) con una pre incubación de 3 minutos a 94°C, continuado por 33 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 52°C y 1 minuto y medio a 72°C, y un paso final de 5 minutos a 72°C, este último permite que la extensión de la polimerasa abarque a los productos clonados en su totalidad. Este protocolo fue establecido según recomendaciones del fabricante. Los productos generados fueron guardados a 4°C y luego evaluados por medio de una corrida electroforética en gel de agarosa al 1% (Anexo 4).

5.5.5. Secuenciamiento de los Productos de PCR

Los productos de PCR de cada muestra fueron secuenciados por un servicio tercerizado (Macrogen© MD, USA). Cada alicuota fue preparada para que cuente con

el menos 50 ng/ μ L de ADN. Los primers universales seleccionados para el secuenciamiento fueron 8F (5-AGA GTT TGA TMC TGG CTC AG), 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'), 337F (5'-GAC TCC TAC GGG AGG CWG CAG-3'), 518R (5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG G-3'), 785F (5'-GGA TTA GAT ACC CTG GTA-3') y 907R (5'-CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT-3'), estos también fueron alicuotados y enviados a una concentración de 10 μ M con un volumen de 10uL para cada caso. Algunos detalles adicionales de estos primers pueden observarse en el Anexo 4. Los resultados de secuenciamiento fueron evaluados por BLASTn©5 y aquellos con un porcentaje de identidad mayor al 99% fueron considerados para el posterior análisis filogenético (Anexo 4).

5.5.6. Análisis Filogenético

Con la información proporcionada por el secuenciamiento de cada muestra se construyó un dendograma basado en el algoritmo *neighbor-joining unweighted pair group arithmetic mean* (UPGMA) con la finalidad de establecer grupos en base al coeficiente de similaridad de las secuencias ingresadas (231,232). El dendograma fue generado en el software ClustalW® (233,234) en el cual se alinearon las secuencias por medio de la técnica de máxima parsimonia y considerado un bootstrap con valor de 1000 para el remuestreo de los datos. Adicionalmente la secuencia del gen 16S de la actinobacteria *Bifidobacterium bifidum* (GenBank: S83624.1) fue incluida como referencia para la construcción del dendograma.

5.6. Resistencia a Metales Pesados

Se evaluó la capacidad de resistencia de las cepas de los géneros de actinomicetos a metales pesados con el propósito de establecer parámetro de concentraciones que puedan resistir estas bacterias, y así mismo poder realizar el estudio de biofertilización, sometiendo a las semillas a las concentraciones de metales, las cuales los actinomicetos puedan tolerar y desarrollar su capacidad biofertilizante.

La capacidad de resistencia de las cepas de actinomicetos a metales pesados fue determinada por su crecimiento en presencia de diferentes concentraciones de sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), sulfato de hierro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), cloruro de cadmio (CdCl_2), acetato de plomo ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) y cloruro de mercurio (HgCl_2). Se utilizaron concentraciones de 10, 50, 100, 200, 400 y 800 ppm de los iones metálicos presentes en los compuestos, las cuales se adicionaron al medio Agar Glicerol Extracto de Levadura Agar (XGAL) (Anexo 3). Las placas con el medio fueron divididas en 6 cuadrantes y en cada uno de ellos se colocó 10 μL de cada cepa. Se incubaron a 28°C por 7 a 14 días. Se realizaron dos repeticiones por tratamientos. Se evaluó el grado de crecimiento de las cepas: 3 (abundante), 2 (regular), 1 (escaso) y 0 (no hay crecimiento) (34).

5.7. Estandarización del Método de Germinación y Crecimiento Vegetal de las Semillas con Agua (d)

Se realizó un ensayo de germinación y crecimiento vegetal con los dos tipos de semillas: *Lactuca sativa* (lechuga) y *Medicago sativa* (alfalfa), y así asegurar la calidad de las semillas adquiridas y que el método empleado es adecuado para estas pruebas, pudiendo pasar al estudio de interés.

Se tomaron 10 semillas de cada tipo de planta, las cuales fueron desinfectadas y colocadas en placas Petri con papel filtro estéril (Anexo 3) (235,236,237). En una placa se pusieron, con una pinza estéril, las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) y en otra las de *Medicago sativa* (alfalfa), adicionándoles 8 ml de agua destilada estéril. Las placas se colocaron en un ambiente donde las semillas puedan obtener luz y así poder cumplir sus dos fases: luminosa y oscura. El desarrollo de las semillas fueron evaluadas por un periodo de 7 a 14 días. Los montajes de este ensayo fueron por triplicado. Las variables a evaluar fueron la cantidad de semillas germinadas, la longitud de la raíz y la cantidad de hojas desarrolladas (23,31).

5.8. Determinación de la Capacidad de Germinación y Crecimiento Vegetal en Semillas Expuestas a los Géneros de Actinomicetos

Esta prueba fue realizada con la finalidad de determinar el efecto de la presencia de los actinomicetos sobre la germinación y crecimiento vegetal en los dos tipos de semillas: *Lactuca sativa* (lechuga) y *Medicago sativa* (alfalfa).

Se prepararon los inóculos de cada cepa de actinomicetos, las cuales fueron sembradas en caldo Glicerol Extracto de Levadura Agar (XGAL) e incubadas por un tiempo de 7 a 14 días (Anexo 3). 10 semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) y 10 de *Medicago sativa* (alfalfa) fueron esterilizadas (Anexo 3) (235,236,237) y luego embebidas, por separado, en cada cultivo bacteriano por 30 a 45 minutos (Anexo 3). Seguidamente de este paso, con el uso de una pinza estéril las semillas fueron retiradas del cultivo y colocadas en una placa Petri con papel filtro estéril las de *Lactuca sativa* (lechuga) y en otra las de *Medicago sativa* (alfalfa), agregándoles 8 ml del cultivo bacteriano. Las placas se colocaron en un ambiente donde las semillas puedan obtener luz y así poder cumplir sus dos fases: luminosa y oscura. El desarrollo de las semillas fueron evaluadas por un periodo de 7 a 14 días. Los montajes de este ensayo fueron por triplicado. Las variables a evaluar fueron la cantidad de semillas germinadas, la longitud de la raíz y la cantidad de hojas desarrolladas (23,31,238).

5.9. Determinación de la Capacidad de Germinación y Crecimiento Vegetal en Semillas Expuestas a Metales Pesados

Esta prueba se realizó para establecer parámetro de concentraciones de metales pesados que puedan resistir estas plantas y así mismo, determinar el efecto de los mismos sobre la germinación y crecimiento vegetal en los dos tipos de semillas: *Lactuca sativa* (lechuga) y *Medicago sativa* (alfalfa).

Se evaluó la capacidad de las semillas de germinar y crecer en presencia de diferentes concentraciones de cobre (Cu), hierro (Fe), zinc (Zn), cadmio (Cd), plomo (Pb) y mercurio (Hg). Se utilizaron concentraciones de 10, 50, 100, 200, 400 y 800 ppm. Se tomaron 10 semillas de cada tipo de planta, las cuales fueron desinfectadas (Anexo 3) (235,236,237) y colocadas, con una pinza estéril, en una placa Petri con papel filtro estéril las de *Lactuca sativa* (lechuga) y en otra las de *Medicago sativa* (alfalfa), a las cuales se adicionaron 8 ml de cada concentración de metal (Anexo 3). Las placas se colocaron en un ambiente donde las semillas puedan obtener luz y así poder cumplir sus dos fases: luminosa y oscura. El desarrollo de las semillas fueron evaluadas por un periodo de 7 a 14 días. Los montajes de este ensayo fueron por triplicado. Las variables a evaluar fueron la cantidad de semillas germinadas, la longitud de la raíz y la cantidad de hojas desarrolladas (23,31, 239).

5.10. Determinación la Capacidad Biofertilizante de los Actinomicetos en Semillas Expuestas a Metales Pesados

Se realizó esta prueba con la finalidad de evaluar el efecto de la presencia de los actinomicetos sobre la germinación y crecimiento vegetal en los dos tipos de semillas: *Lactuca sativa* (lechuga) y *Medicago sativa* (alfalfa), pero expuestas a un factor stress de metales pesados.

Primero se prepararon los inóculos de cada cepa de actinomicetos, las cuales se sembraron en medio Tryptic Soy Broth (TSB) (Anexo 3) y se incubaron por un periodo de 7 a 14 días. 10 semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) y 10 de *Medicago sativa* (alfalfa) fueron esterilizadas (Anexo 3) (235,236,237) y luego embebidas, por separado, en cada cultivo bacteriano por 30 a 45 minutos (Anexo 3). Seguidamente de este paso, con el uso de una pinza estéril las semillas fueron retiradas del cultivo y colocadas en una placa Petri con papel filtro estéril las de *Lactuca sativa* (lechuga) y en otra las de *Medicago sativa* (alfalfa), agregándoles 8 ml de cada concentración de metal (Cu, Fe, Zn, Cd, Pb y Hg): 10, 50, 100, 200, 400 y 800 ppm y 8 ml de cada cultivo bacteriano (Anexo 3). Las placas se colocaron en un ambiente donde las semillas puedan obtener luz y así poder cumplir sus dos fases: luminosa y oscura. El desarrollo de las semillas fueron evaluadas por un periodo de 7 a 14 días. Los montajes de este ensayo fueron por triplicado. Las variables a evaluar fueron la cantidad de semillas germinadas, la longitud de la raíz y la cantidad de hojas desarrolladas (23,31,188). Se usaron como

controles las pruebas de las semillas con agua destilada, con actinomicetos y con metales.

5.11. Conservación de las Cepas de Actinomicetos

Se realizó la conservación para mantener la viabilidad y la estabilidad genética de las cepas para su empleo a futuras investigaciones biotecnológicas. Las cepas se sembraron en tubos con medio Tryptic Soy Broth (TSB). Se centrifugaron a 3500 rpm por 30 minutos. Se descartaron los sobrenadantes y los pellets se resuspendieron con 1.5 ml de TSB. Estos pellets fueron colocados en viales que contenían TSB y glicerol al 10%. Los viales fueron almacenados a -20 y a -70 °C (240,241) (Anexo 5).

5.12. Análisis Estadístico

El análisis estadístico se aplicó para las pruebas de germinación y crecimiento vegetal. Los datos que se obtuvo de las variables cuantitativas: cantidad de semillas germinadas, cantidad de hojas desarrolladas y longitud (cm) de raíz, fueron registrados en el instrumento de recolección de datos, para después elaborar una base de datos en el software estadístico STATA versión 14.

Las variables cuantitativas se presentaron mediante la media (medida de tendencia central) y el error estándar (dispersión adecuada). La evaluación del efecto de las concentraciones de los distintos metales y los distintos géneros de actinomicetos,

así como la interacción de los mismos, en la germinación y crecimiento vegetal fue mediante el empleo la técnica de ANOVA medidas repetidas. Previamente se evaluó el supuesto de normalidad mediante la prueba de Shapiro Wilk y el supuesto de homogeneidad de varianzas mediante la técnica de Barlett. Debido a que se trabajó con medidas repetidas, se realizó la corrección de los valores de p, mediante el estadístico Box. Para realizar las comparaciones múltiples se empleó la técnica de Dunnett. Las pruebas estadísticas se aplicaron con un nivel de significación (α) de 0.05.

VI. RESULTADOS

6.1. Caracterización Morfológica

6.1.1. Caracterización Macroscópica

La caracterización macroscópica de las 24 cepas se evaluó a los 14 días en medios Agar Glicerol Extracto de Levadura (XGAL), Agar Nutritivo (AN) y Medio Agar Almidón de Sales Inorgánicas (AAI), hasta los 7 días algunas cepas todavía no habían presentado un desarrollo completo. Algunas cepas de actinomicetos presentaron un aspecto pulverulento, mientras que otras fueron costrosas. Los actinomicetos tuvieron un crecimiento lento y por tal requirieron 4 días para empezar a presentar estas características, antes de ese tiempo eran ligeramente húmedas y brillosas. La mayoría de las cepas fueron capaces de esporular en los tres medios de cultivo, produciendo un micelio aéreo pulverulento (83,3% en AN, 95,8% en XGAL y 95,8% en AAI), mientras que el porcentaje fue muy bajo para las cepas que presentaron un aspecto costrosa (16,7% en AN, 4,2% en XGAL y 4,2% en AAI). Todas las colonias de las cepas presentaron una consistencia firme y una adherencia fuerte al sustrato. (Figura 7) (Anexo 1: Fotos 1 y Anexo 2: Tablas 1, 2 y 3).

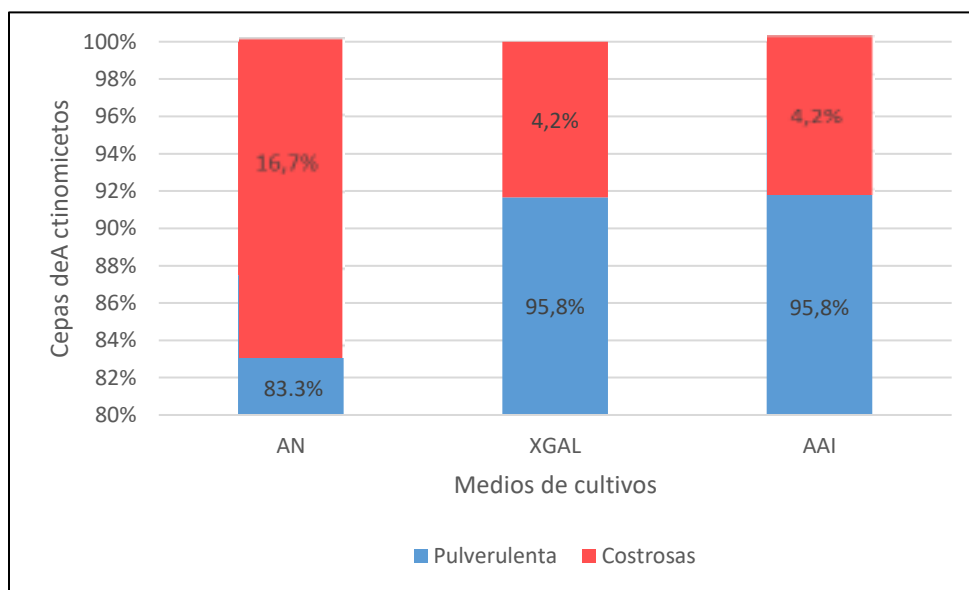


Figura 7: Porcentaje de las cepas de actinomicetos basadas en el aspecto macroscópico en Agar Nutritivo (AN), Agar Glicerol Extracto de Levadura (XGAL) y Agar Almidón de Sales Inorgánicas (AAI).

Las colonias de las cepas de actinomicetos lucieron una gran variedad de colores en los tres medios, tanto en el micelio aéreo como del sustrato y además algunas presentaron pigmentaciones. En el medio de cultivo AN, la mayoría de cepas (58,3%) mostraron un micelio aéreo de color plomo/blanco, mientras que una menor porción de las cepas presentaron un color plomo (16,7%), crema (8,2%), blanco/crema/plomo (4,2%), caramelo/plomo (4,2%), blanco/verde (4,2%) y blanco (4,2%). Por otro lado, en la parte anversa, las cepas revelaron una diversidad de colores del micelio de sustrato que variaron desde crema (75%), verde (16,6%), plomo (4,2%) hasta marrón (4,2%). Con respecto a la pigmentación, hubo producción de pigmentos verdes (54,1%),

marrones (4,2%) y rosados (4,2%), mientras otras no presentaron pigmentos (37,5%) (Figura 8) (Anexo 1: Fotos 1 y Anexo 2: Tablas 1).

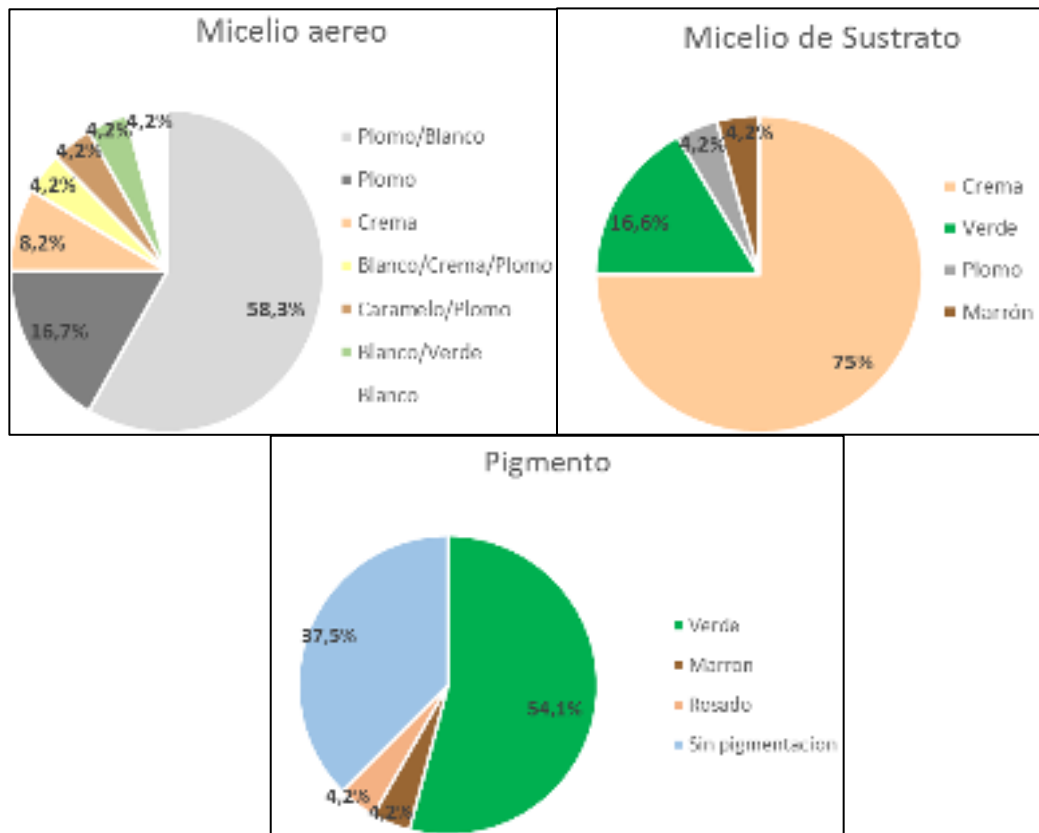


Figura 8: Porcentaje de las cepas de actinomicetos basadas en la coloración del micelio aéreo, del micelio del sustrato y la pigmentación en Agar Nutritivo (AN).

En el medio XGAL, la mayor cantidad cepas presentaron un micelio aéreo de color plomo/blanco (41,6%), seguido por micelio de color plomo (12,5%) y blanco/crema (12,5%), mientras que una menor proporción manifestaron colores como crema (8,2%), blanco/rojo (4,2%), blanco/crema/plomo (4,2%), blanco/caramelo (4,2%), caramelo (4,2%), blanco (4,2%) y crema/verde (4,2%). En la parte anversa, se mostraron una gran cantidad de colores del micelio del sustrato tales como crema

(58,3%), rojo (29,1%), plomo/rojo (4,2%), caramelo (4,2%) y blanco (4,2%). Por otra parte, hubo presencia de pigmentos verdes (16,7%) y rojos (4,2%) en menor cantidad, mientras que la ausencia de pigmentos en este tipo de medio prevaleció más (79,1%) (Figura 9) (Anexo 1: Fotos 1 y Anexo 2: Tabla 2).

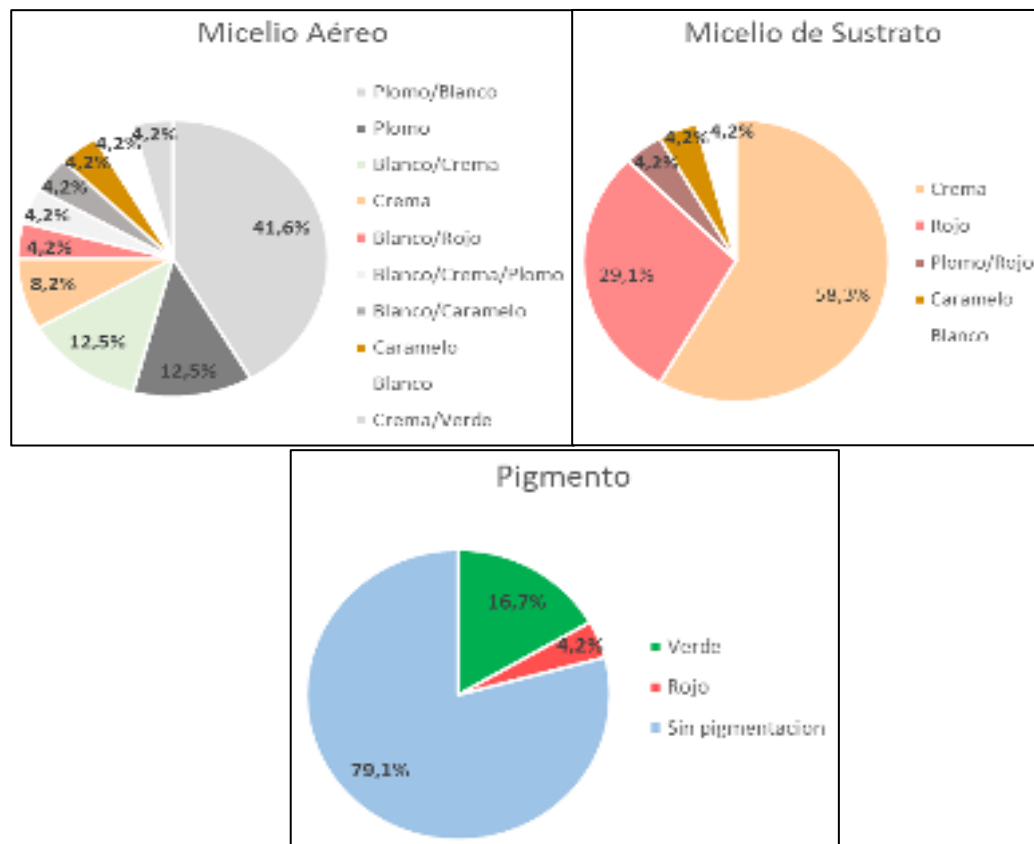


Figura 9: Porcentaje de las cepas de actinomicetos basadas en la coloración del micelio aéreo, del micelio del sustrato y la pigmentación en Agar Glicerol Extracto de Levadura (XGAL).

Con respecto al medio AAI, se encontró que las cepas presentaron micelios aéreos de colores múltiples, siendo el más representativo el plomo (50%), después plomo/blanco (25%), blanco/verde (8,2%), verde (4,2%), plomo claro (4,2%),

plomo/marrón (4,2%) y blanco (4,2%). El micelio del sustrato de la gran mayoría de cepas fueron cremas (58,3%), mientras que las demás revelaron colores como verdes (12,5%), cremas/verdes (8,2%), caramelos (4,2%), blancos (4,2%), amarillos (4,2%), crema/plomos (4,2%), y marrones (4,2%). Por otro lado, gran cantidad de cepas tuvieron la capacidad de producir pigmentos verdes (70,8%), seguido por las marrones (4,2%), sin embargo hubo una proporción que no presentaron pigmentación (25%) (Figura 10 y 11) (Anexo 1: Fotos 1 y Anexo 2: Tabla 3).

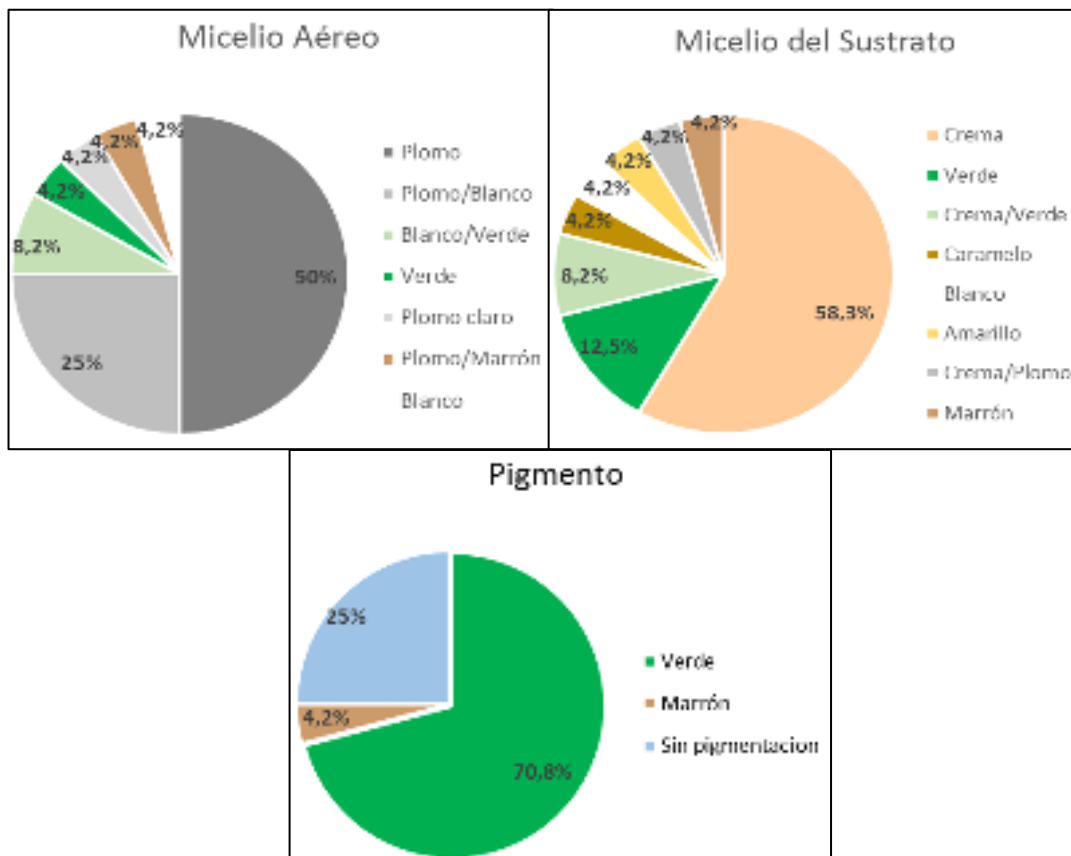


Figura 10: Porcentaje de las cepas de actinomicetos basadas en el color del micelio aéreo, del micelio del sustrato y la pigmentación en Agar Almidón de Sales Inorgánicas (AAI).



Figura 11: Morfología a nivel macroscópica de la cepa 6c de actinomicetos a los 14 días en medio de cultivo a) AN, costrosa con micelio aéreo crema, b) XGAL, pulverulenta con micelio aéreo plomo/caramelo y c) AAI, pulverulenta con micelio aéreo plomo/marrón. Observadas en el estereoscopio con un aumento de 2X.

Además, también se observó las diferentes formas de los bordes que presentan las colonias de las cepas de actinomicetos, siendo las más frecuentes el borde entero y el irregular. En AN y AAI presentaron los 4 tipos de bordes (entero, irregular, entero con anillos concéntricos y ondulados), mientras que en XGAL solo se presentaron 3 (entero, irregular y ondulado). En el medio AN, las colonias de la mayoría de las cepas mostraron un borde entero (50%), al igual que en el medio XGAL (50%), sucediendo todo lo contrario con el medio AAI (29,3%), en el cual el que predominó fue borde irregular (54,2%) (Figura 12 y 13) (Anexo 1: Fotos 1 y Anexo 2: Tablas 1, 2 y 3).

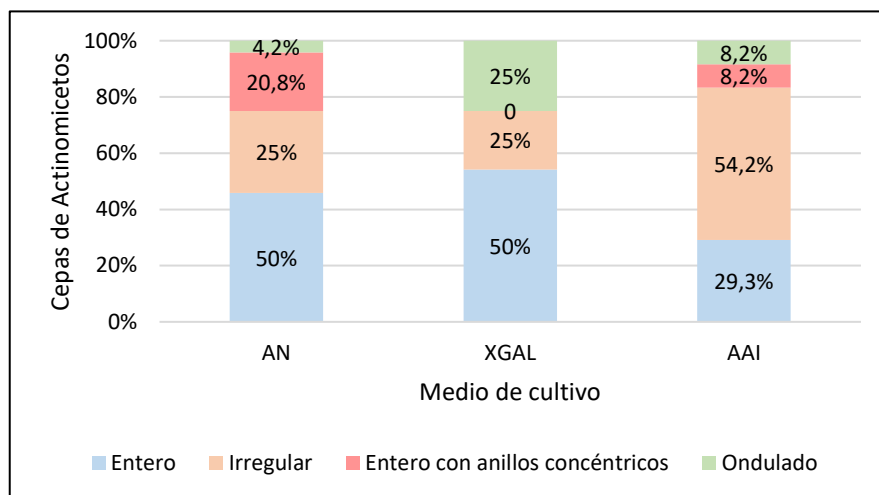


Figura 12: Porcentaje de las cepas de actinomicetos basadas en el tipo de borde en Agar Nutritivo (AN), Agar Glicerol Extracto de Levadura (XGAL) y Agar Almidón de Sales Inorgánicas (AAI).

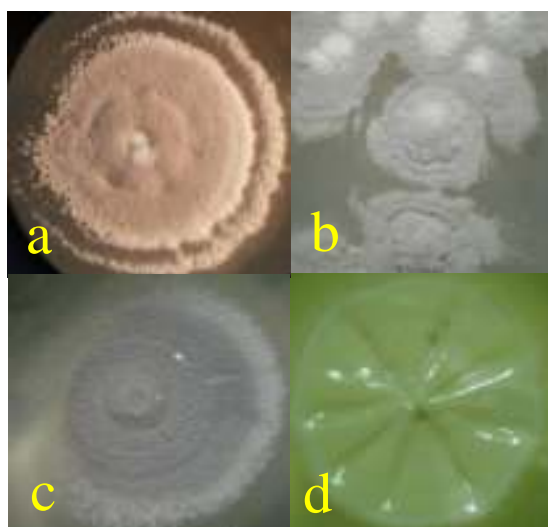


Figura 13: Morfología macroscópica de las diversas formas de los bordes de las cepas de actinomicetos en el medio de cultivo AN a los 14 días. a) Cepa 6E1, borde entero con anillos concéntricos, b) Cepa 21, borde irregular, c) Cepa K1B, borde entero y d) Cepa Frep15, borde ondulado. Observadas en el estereoscopio con un aumento de 2X.

6.1.2. Caracterización Microscópica

Esta prueba permitió identificar las características morfológicas a nivel microscópico de las cepas de actinomicetos de acuerdo Manual de Determinación Bacteriológico de Bergey (35) y en el Manual de Métodos para Caracterización de Especies de *Streptomyces* (219). Todas fueron identificadas como bacterias Gram positivas y presentaron estructuras miceliales con hifas ampliamente ramificadas no fragmentadas con un gran número de bacterias circundantes en forma de bacilos ovalados en los tres medio de cultivo AN, AAI y XGAL (Figura 14) (Anexo 1: Fotos 2).

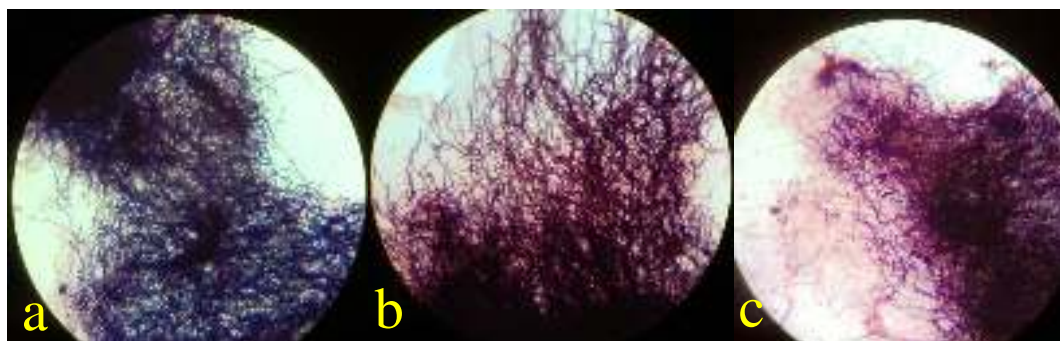


Figura 14: Morfología microscópica de las cepas de actinomicetos por coloración Gram. a) 6E1, b) 21 y c) K1B. Observadas en el microscopio con un aumento de 100X.

Por medio del empleo de la técnica de las laminillas se pudo identificar los posibles géneros de actinomicetos luego de hacer una comparación de las características registradas con las mencionadas en el Manual de Determinación Bacteriológico de Bergey (35) y en el Manual de Métodos para Caracterización de

Especies de *Streptomyces* (219). Se pudo determinar que las cepas de actinomicetos corresponden al género *Streptomyces*, las cuales presentaron un micelio de sustrato no fragmentado y un micelio aéreo con hifas de diferentes formas: flexibles, círculos, espirales imperfectas y ganchos, con presencia de esporas (simples, en pares o en cadenas cortas o largas) (Figura 15).

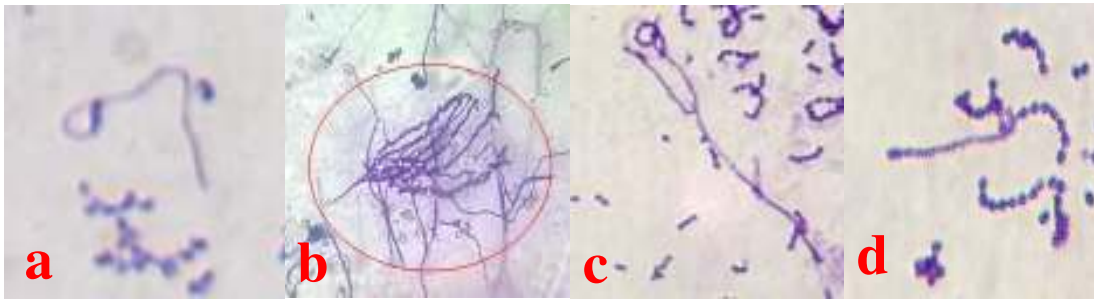


Figura 15: Morfología microscópica de las cepas de actinomicetos en laminillas. a) AB7, b) C2, c) K4 y d) E1. Observadas en el microscopio con un aumento de 100X.

6.2. Caracterización Bioquímica

Esta caracterización permitió determinar la actividad metabólica de los actinomicetos. La gran parte de los actinomicetos tuvieron la capacidad de producir diferentes enzimas como la lisina descarboxilasa (91,6%-LIA), catalasa (100%-Catalasa) y amilasas (91,7%-Almidón), sucediendo todo lo contrario con la producción de gelatinasa (16,7%-Gelatina). Además, se determinó que la mitad de las cepas pudieron metabolizar la glucosa a través de la vía ácido mixta (50%-RM), mientras que la otra mitad lo hicieron por la vía butanodiólica (50%-VP). Con respecto a la prueba

del citrato, una parte minoritaria de los actinomicetos pudieron usar el citrato como fuente de carbono y de energía para su desarrollo (16.7%-Citrato). Por otro lado, algunas cepas fermentaron glucosa, lactosa y/o sacarosa (16,7%) al mismo tiempo y acidificaron el medio, mientras que otras fueron negativas para estos tres tipos de azucares (75%), manteniendo el medio alcalino, sin embargo hubo la capacidad de una menor proporción de cepas de fermentar solo glucosa, pero no lactosa y/o sacarosa (8,3%-N/P). Algunas produjeron gas y ácido sulfhídrico (Figura 16 y 17) (Anexo 2: Tabla 4).

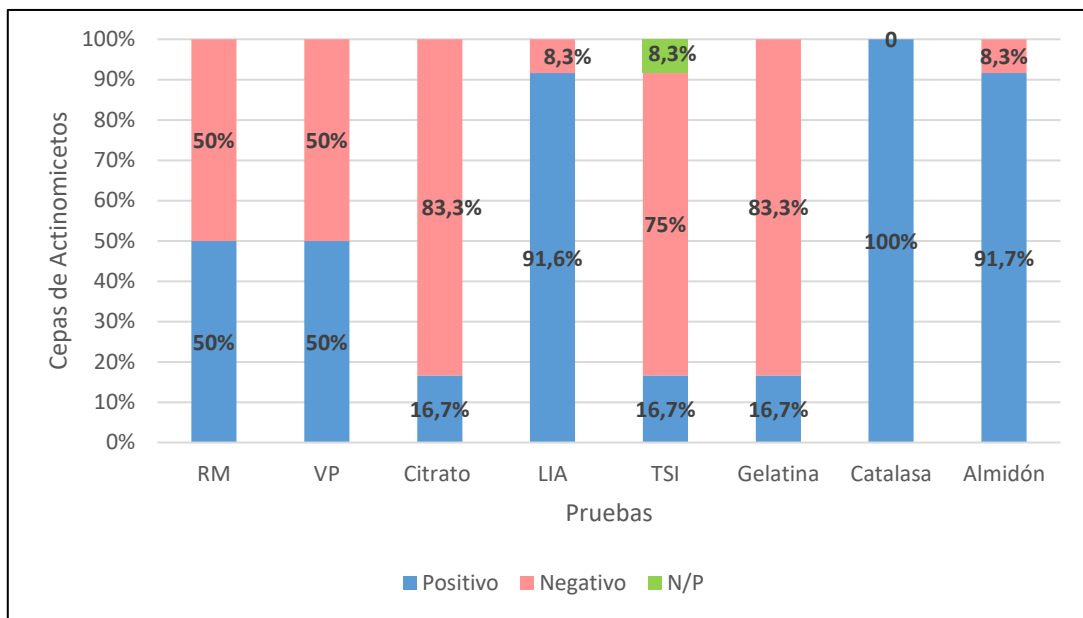


Figura 16: Porcentaje de las cepas de actinomicetos basada en pruebas de actividad metabólica. En la prueba de TSI, N/P: negativo para lactosa y/o sacarosa y positivo para glucosa.



Figura 17: Prueba de TSI de las cepas de actinomicetos. a) Pico ácido/fondo ácido - A/A (pico amarillo/fondo amarillo): YA4 y AB5 fermentaron lactosa, sacarosa y glucosa; b) pico alcalino /fondo ácido – K/A (pico rojo/fondo amarillo): 6E3 y 21 no fermentaron lactosa solo glucosa; c) pico alcalino/fondo alcalino – K/K (pico rojo/fondo rojo): 6B y K2 no son fermentadores de azúcares y d) Ennegrecimiento del medio: Frep 15 produjo ácido sulfhídrico.

Sobre el crecimiento a diferentes pH, todas las cepas de actinomicetos fueron capaces de crecer a los diferentes niveles de pH. Todas presentaron un abundante crecimiento a pH 2,8 (100%) y 4 (100%), las cuales fueron comparadas con el control, pH 7 (100%), demostrando una igualdad con respecto a su nivel de crecimiento (Figura 18) (Anexo 2: Tabla 5).

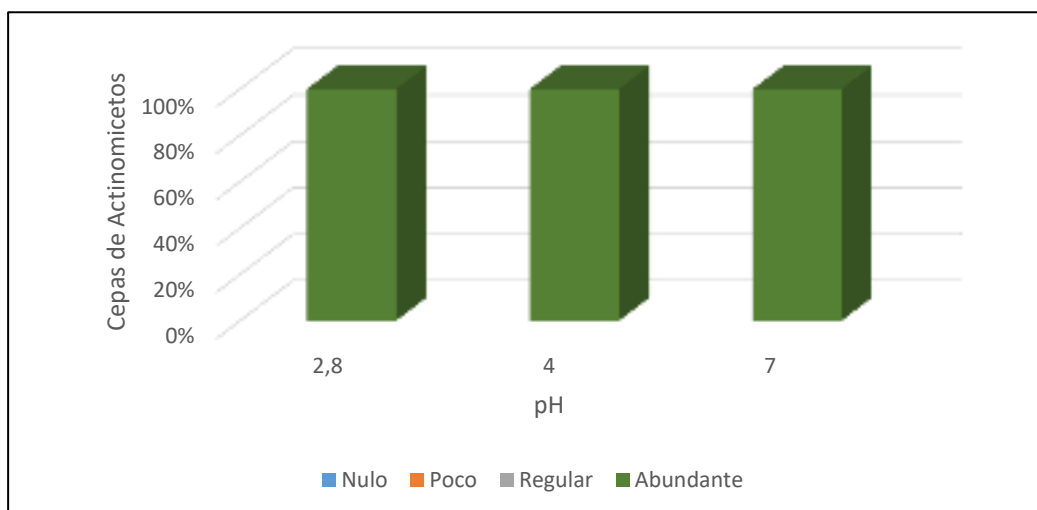


Figura 18: Porcentaje de las cepas de actinomicetos que crecieron a diferentes pH. Niveles de crecimiento, abundante; regular; poco y nulo.

Por otra parte, todas las cepas mostraron una tolerancia a las diferentes concentraciones de NaCl estudiadas y esto fue manifestado por su nivel de crecimiento, pero la relación entre el nivel de crecimiento y la concentración de NaCl fue inversamente proporcional, ya que a medida que se elevaba la concentración de NaCl, el nivel de crecimiento disminuía. La mayoría de las cepas presentaron un crecimiento abundante (83,5%) a 1,5% NaCl, muy similares con el control 0% NaCl, pero este tipo de crecimiento fue decreciendo hasta llegar a nulo en 10% NaCl. A partir de 5 % NaCl para adelante, una gran parte de las cepas mostraron un crecimiento regular, sin embargo el poco crecimiento de las cepas fue lo que prevaleció a 10% NaCl (62,5%). A pesar que el crecimiento se hizo débil conforme al aumento de la concentración de NaCl, todas las cepas mostraron tolerancia a todas las concentraciones evaluadas (Figura 19) (Anexo2: Tabla5).

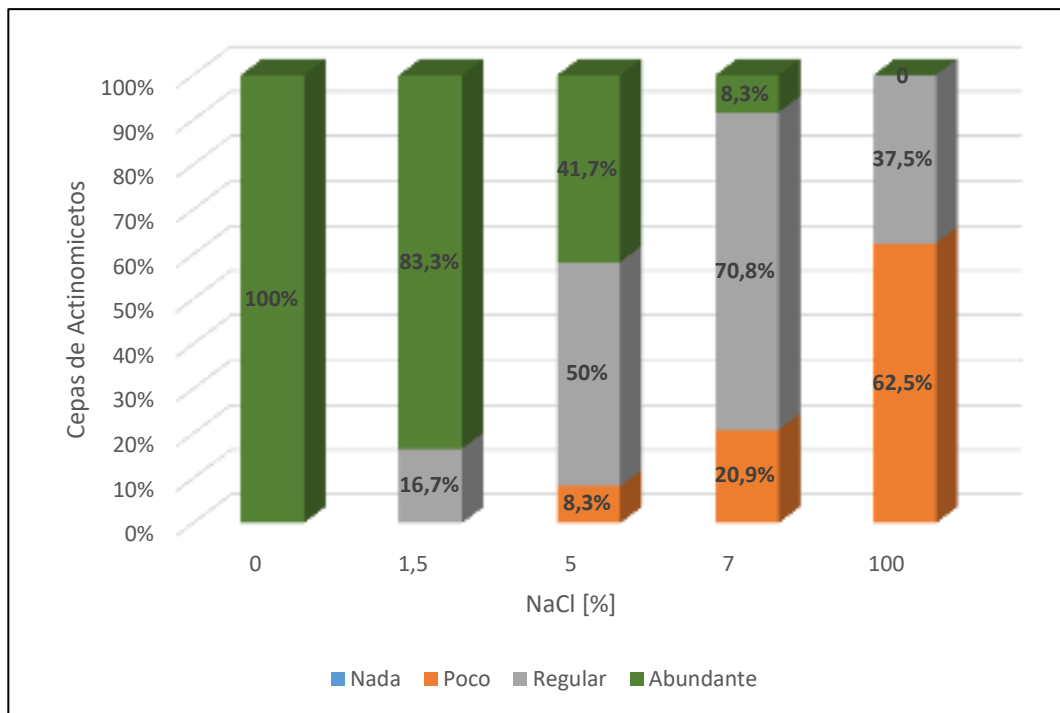


Figura 19: Porcentaje de las cepas de actinomicetos que crecieron a diferentes concentraciones de NaCl. Niveles de crecimiento, abundante; regular; poco y nulo.

Con todos los resultados obtenidos y comparadas con las establecidas en el Manual de Determinación Bacteriológico de Bergey (35) y el libro The Prokaryotes A Hand Book on the Biology of Bacteria (248, 254), no se observó una clara uniformidad, por lo cual se estima que podría pertenecer a diversos géneros. Por ejemplo, en el caso de la prueba de licuefacción de gelatina e hidrólisis de almidón, las cepas que fueron positivas pueden aproximarse a los géneros *Nocardia*, *Actinomadura* y *Streptomyces*, mientras que las que fermentan azúcares pertenecen a *Actinomadura* y *Streptomyces*. Asimismo, las que dieron positivas para el resto de pruebas podrían ser *Nocardia*,

Actinomadura y *Streptomyces*. Por todo esto, se requirió de técnicas moleculares para definir con claridad los géneros a los cuales pertenecen las cepas de estudio.

6.3. Caracterización Molecular

6.3.1. Evaluación de la Integridad del ADN Extraído

Los productos de extracción de ADN de las 24 cepas seleccionadas fueron sometidos a una corrida electroforética en gel de agarosa al 1% para evaluar cualitativamente el rendimiento del proceso de extracción y la integridad del material genético. Se observó en todos los casos que el tamaño del ADN extraído sobrepasaba los 16 000 pb, lo que señala que se ha extraído una gran cantidad.

Las extracciones de 6E1, K1B, K4, 6E3, 21, Frep15, 6C, F1, Frep13, F, AB5 indicaron una ligera degradación que se pudo apreciar como un smearing en los carriles que corresponden a estas pruebas, sin embargo a pesar de esta limitante la cantidad de ADN es suficiente para realizar una amplificación (Figuras 20 y 21).

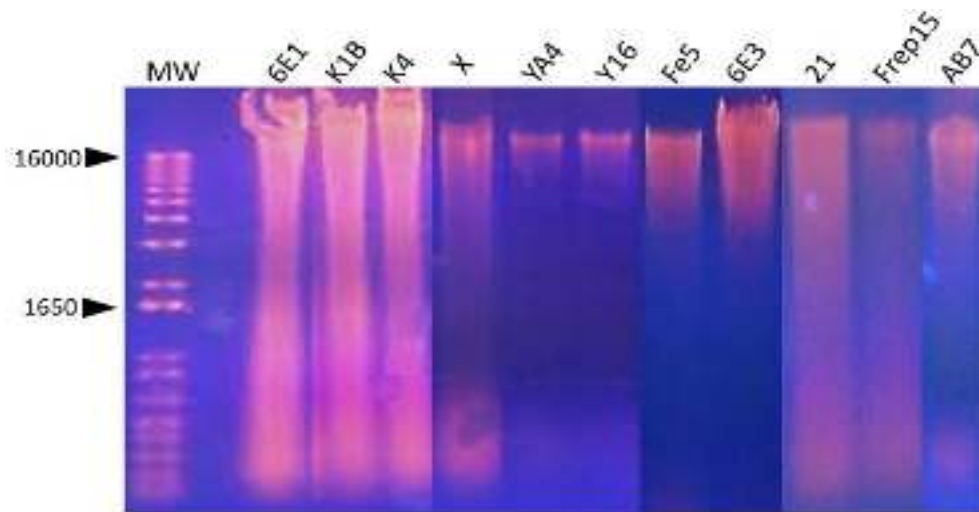


Figura 20. Evaluación de la extracción de ADN. Se observa los productos de extracción de las cepas seleccionadas enfrentados en una corrida electroforética en gel de agarosa al 1%. El marcador de peso molecular (MW) usado fue 1 Kb Plus DNA Ladder.

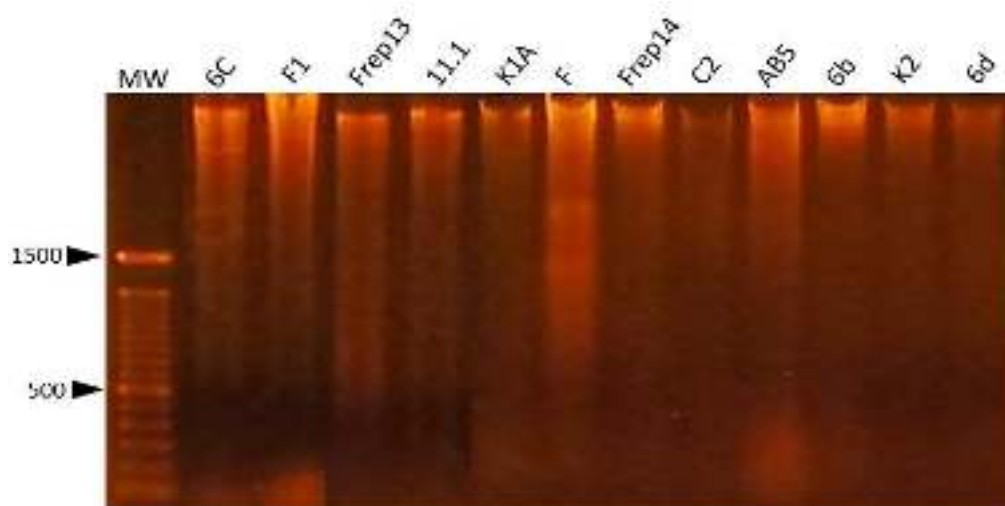


Figura 21. Evaluación de la extracción de ADN. Se observa los productos de extracción de las cepas seleccionadas enfrentados en una corrida electroforética en gel de agarosa al 1%. El marcador de peso molecular (MW) usado fue 100 bp DNA Ladder.

6.3.2. Validación de Primers 8F y 1492R para la Amplificación del Gen 16S

Los resultados del análisis de PCR *in silico* mostraron que, considerando como referencia el genoma de *Corynebacterium glutamicum*, *Frankia alni*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Nocardia brasiliensis*, *Propionobacterium acidipropionici* y *Streptomyces albus*; todos representantes de actinobacterias, el producto de PCR presenta un tamaño esperado de aproximadamente 1500 pb (Figura 22). El resultado de la simulación respalda la selección de los primer 8F y 1492R para la amplificación de la región 16S y debe ser extrapolable a nivel experimental.

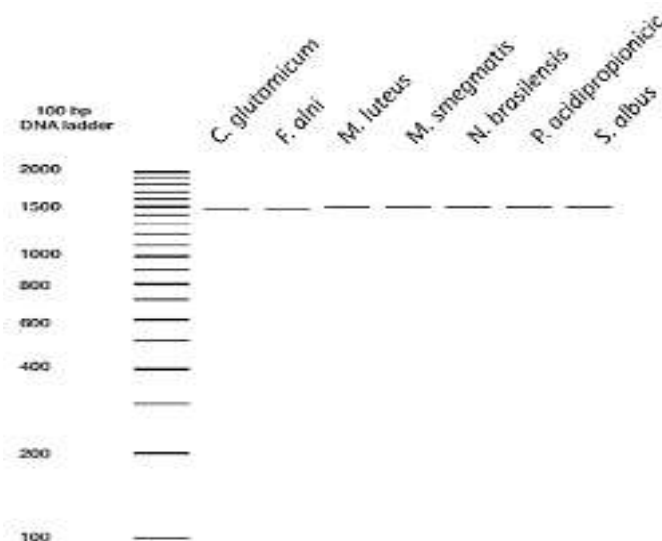


Figura 22. Resultado del PCR *in silico* para la región 16S con los primers 8F y 1492R. Se observa que para todas las especies de referencia se espera un producto de aproximadamente 1500 pb. *Corynebacterium glutamicum* (1478 bp), *Frankia alni* (1478 bp), *Micrococcus luteus* (1494 bp), *Mycobacterium smegmatis* (1495 bp), *Nocardia brasiliensis* (1495 bp), *Propionobacterium acidipropionici* (1494 bp) y *Streptomyces albus* (1482 bp).

6.3.3. Amplificación del Gen 16S por PCR

Con la validación *in silico* de los primers se procedió a desarrollar la PCR por el kit AmpliTaq™ (Applied Biosystems™ CA, USA) para las 24 muestras seleccionadas. El producto generado para todos los casos tuvo un tamaño de aproximadamente 1500 pb de acuerdo a lo esperado. Los productos obtenidos fueron evaluados mediante una corrida electroforética en un gel de agarosa al 1% (Figuras 23, 24, 25 y 26). Las muestras fueron agrupadas de manera aleatoria y evaluadas por PCR en días sucesivos.

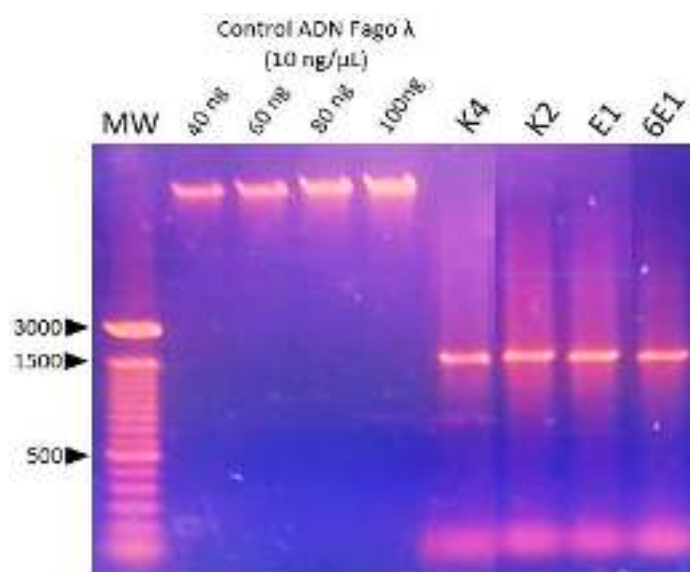


Figura 23. Electroforesis de los productos de PCR de las muestras K4, K2, E1 y 6E1. Los productos fueron evaluados en un gel de agarosa al 1% y enfrentados a un marcador de peso molecular (MW) GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific CA, USA). Los primeros 4 carriles de izquierda a derecha corresponden a controles cualitativos con ADN de fago lambda en 40, 60, 80 y 100 ng respectivamente.

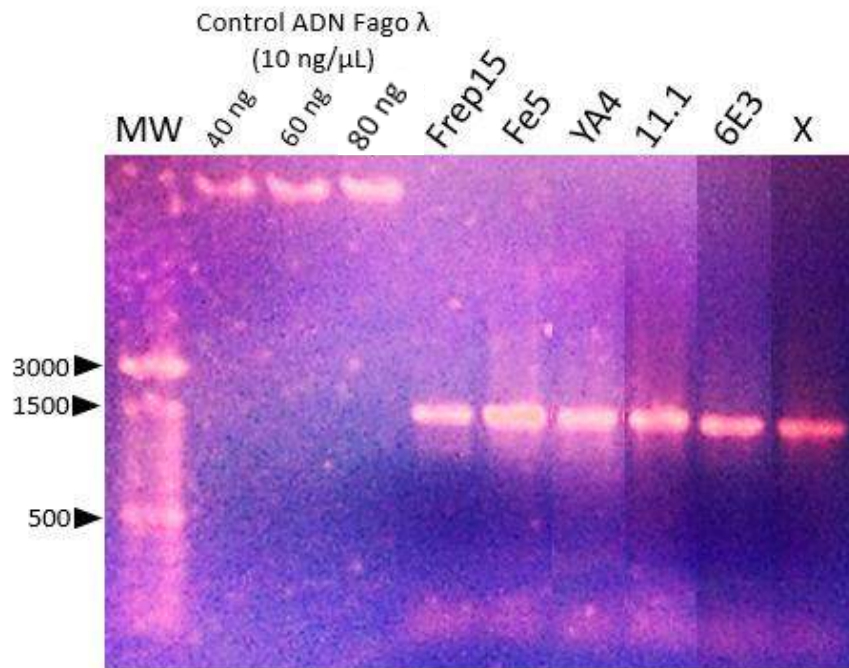


Figura 24. Electroforesis de los productos de PCR de las muestras Frep15, Fe5, YA4, 11.1, 6E3 y X. Los productos fueron evaluados en un gel de agarosa al 1% y enfrentados a un marcador de peso molecular (MW) GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific CA, USA. Los primeros 3 carriles de izquierda a derecha corresponden a controles cualitativos con ADN de fago lambda en 40, 60 y 80 ng respectivamente.

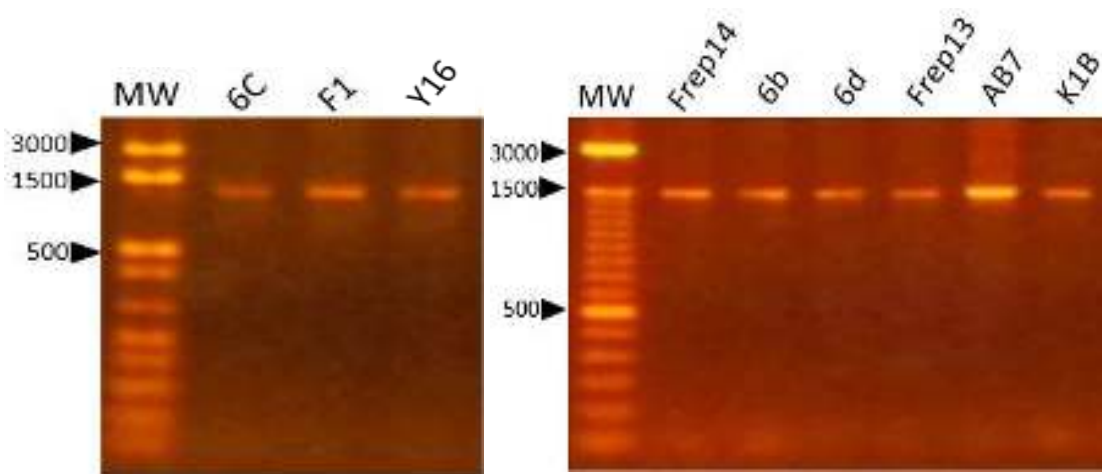


Figura 25. Electroforesis de los productos de PCR de las muestras 6C, F1, Y16, Frep14, 6b, 6d, Frep13, AB7 y K1B. Los productos fueron evaluados en un gel de agarosa al 1% y enfrentados a un marcador de peso molecular (MW) GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific CA, USA. Los primeros 3 carriles de izquierda a derecha corresponden a controles cualitativos con ADN de fago lambda en 40, 60 y 80 ng respectivamente.

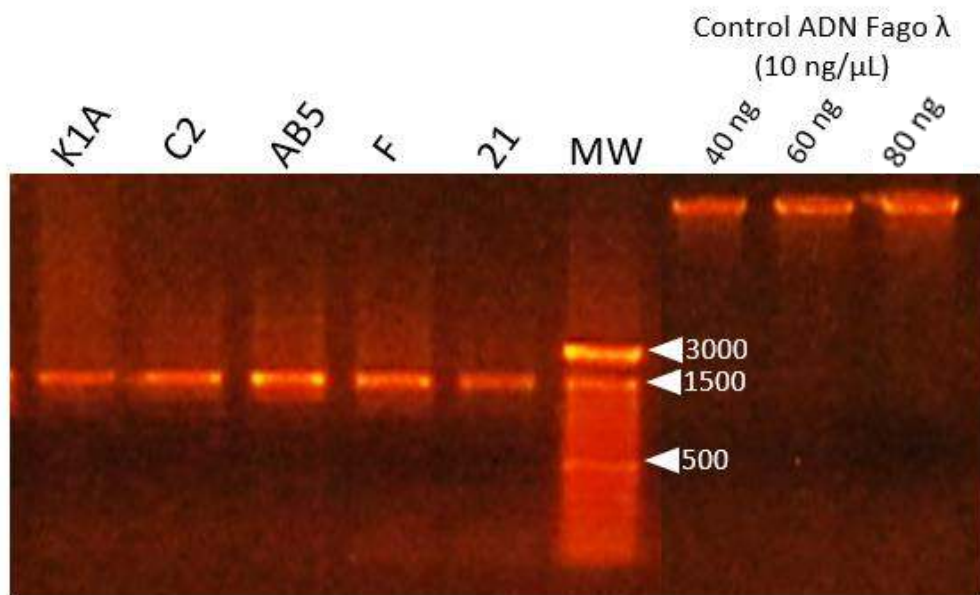


Figura 26. Electroforesis de los productos de PCR de las muestras K1A, C2, AB5, F y 21. Los productos fueron evaluados en un gel de agarosa al 1% y enfrentados a un marcador de peso molecular (MW) GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific CA, USA). Los últimos 3 carriles de izquierda a derecha corresponden a controles cualitativos con ADN de fago lambda en 40, 60 y 80 ng respectivamente.

6.3.4. Secuenciamiento de los Productos de PCR

El secuenciamiento de los 24 productos de amplificación correspondientes a las cepas seleccionadas fueron proporcionados por la empresa Macrogen© para el evaluaciones posteriores. La muestra E1 presentó gaps muy frecuentes en el output del secuenciamiento, por lo que fue excluida del grupo de muestras usado en la construcción del árbol filogenético.

6.3.5. Caracterización Molecular de las Cepas de Actinomicetos

El contraste por BLASTn© reconoció para las 24 cepas seleccionadas indicando para todas ellas un alto porcentaje de identidad (>99%) a la región 16S de origen bacteriano. De esta forma se pudo corroborar la pertenencia de las cepas evaluadas al grupo de actinomicetos. Tras este análisis se lograron identificar 2 géneros entre las 24 cepas evaluadas, las cuales en su gran mayoría (6B, 6C, 6D, 6E1, 6E3, 11.1, 21, C2, E1, F, F1, Frep13, Frep14, Frep15, K1A, K1B, K4, K2, X, YA4, Y16, AB5 y AB7) fueron afiliadas con el género *Streptomyces* representando el 95.83% del total convirtiéndose en el género más abundante y en contraste se identificó a Fe5 como la única cepa perteneciente al género *Actinomadura* representando el 4.17% del total.

De esta forma las cepas 11.1, F1, K2, AB5, E1, 6E3, AB7, 6E1, 6C y 6D fueron identificadas como *Streptomyces sp.* (GenBank: D63866.1) con un 99% de identidad

para todos los casos, representando un 41.7% del total de las cepas. Asimismo dentro del género *Streptomyces*, las cepas 21, K1A, F y X fueron identificadas como *Streptomyces variabilis* en respuesta a un 99% de homología con la secuencia de referencia (GenBank: KU953961.1), representando en conjunto 16.7% del total. Por otro lado, Y16, Frep14, C2 y 6B se identificaron como *Streptomyces heilongjiangensis* conformando el 16,7%. Finalmente se logró caracterizar a la cepa K1B como *Streptomyces thermocarboxydus* (Genbank: NR_026072.1), a la cepa Frep15 como *Streptomyces peruviansis* (Genbank: AJ310924.1), a Frep13 como *Streptomyces champavatii* (Genbank: EU273542.1), a K4 como *Streptomyces matensis* y YA4 fue indentificada como *Streptomyces albidoflavus* (Genbank: NR_119341.1). Estos últimos 5 representan cada uno el 20.8% del total de cepas incluidas en este género.

6.3.6. Análisis Filogenético

El dendograma generado por ClustalW® a partir de las 23 secuencias finales indicó una alta varibilidad entre las cepas secuenciadas, por lo que se observaron seis clusters que agruparon la mayoría de cepas (I, II, III, IV, V, VI). El cluster I estuvo conformado por las cepas K4, K1B, F1, K2 y Frep 15. Por su parte el cluster II agrupó a las cepas 21 y K1A, mientras que el clúster III lo hizo con 6E3, F y AB7. El cluster IV agrupó las cepas Y16, Frep14, C2, 6B y el cluster V hizo lo propio para 6E1, 6C. Finalmente el cluster VI estuvo conformado por Frep13, YA4 y 6D (Figura 27).

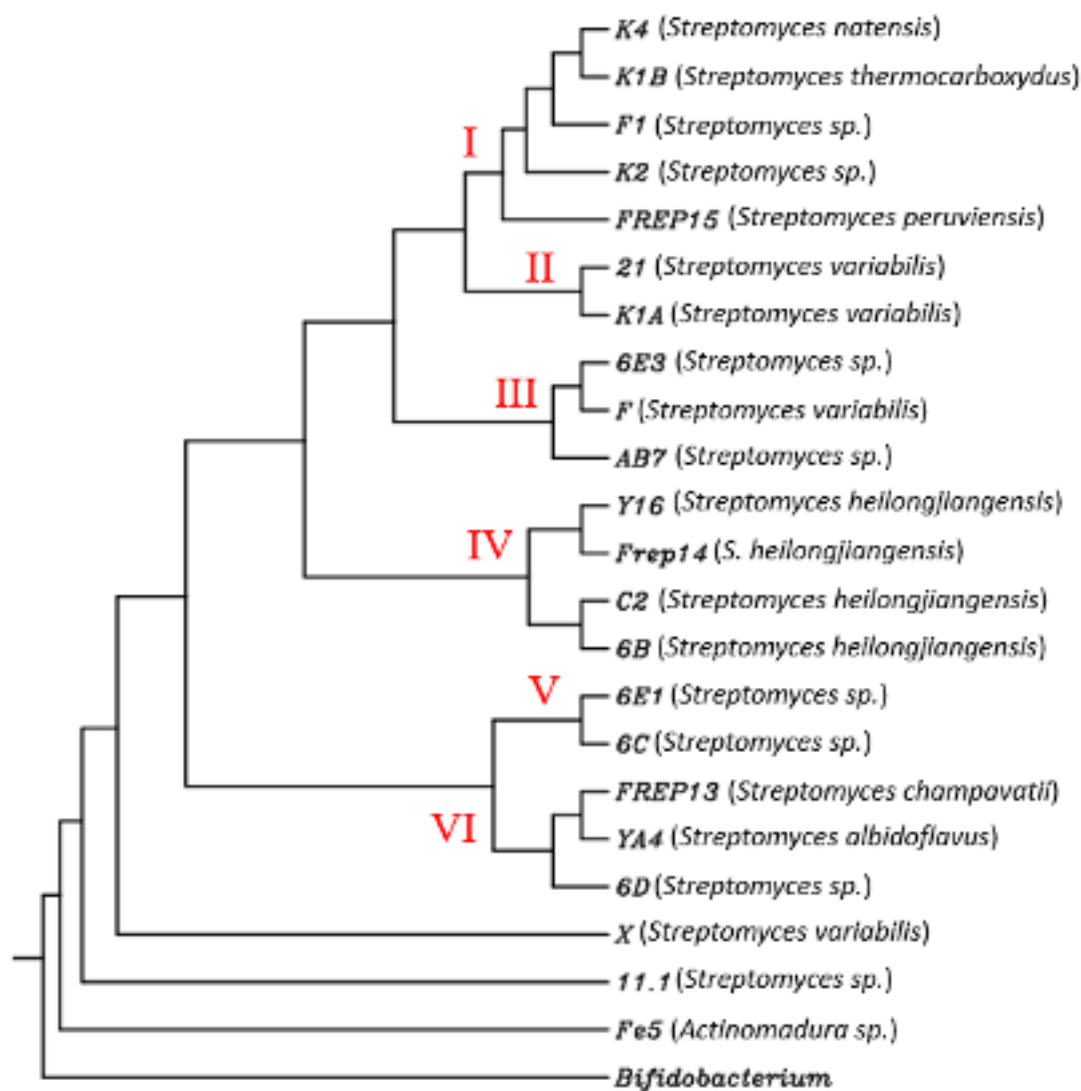


Figura 27. Árbol filogenético generado mediante el algoritmo neighbour-joining a partir de las secuencias correspondientes a la región 16S. Se muestran las cepas incluidas en el análisis y caracterizadas por homología en Blastn© para su identificación. Las secuencias fueron alineadas y agrupadas por su grado de similitud

6.4. Resistencia a Metales Pesados

La resistencia de las 23 cepas del género *Streptomyces* y 1 de *Actinomadura* a diferentes concentraciones de mercurio, zinc, hierro, cobre, plomo y cadmio fueron evaluadas mediante su crecimiento en medio XGAL. Todas las cepas de los dos géneros presentaron un crecimiento normal a 10 ppm de los 6 metales trabajados, sin embargo a medida que las concentraciones de los metales aumentaban la proporción de cepas disminuía, es decir, a mayor concentración de metal, el crecimiento de las cepas de ambos géneros se hizo más débil.

Con respecto a cada metal, se observó que la mayoría de las cepas crecieron de manera normal hasta 200 ppm de plomo, debido a esto se probó a concentraciones más elevadas, 400 y 800 ppm, demostrando crecimiento algunas de las cepas, es decir, su capacidad de resistencia ante este metal fue alta. Por el contrario, el cadmio limitó el crecimiento de algunas cepas, ya que a partir de 50 ppm la cantidad de cepas tendió a decrecer, indicando su susceptibilidad a este metal. Por otro lado, los resultados obtenidos para mercurio, hierro y zinc fueron similares, habiendo crecido más de la mitad de todas las cepas, a pesar que hubo un decrecimiento en la cantidad de las cepas a medida que aumentó la concentración del metal. Del mismo modo sucedió similar en el caso del cobre pero hasta 50 ppm, ya que a 100 y 200 ppm se notó una menor proporción de las cepas crecidas. Las concentraciones de 400 y 800 ppm no fueron trabajadas para mercurio, cobre, hierro, zinc y cadmio, a causa de que su crecimiento se hizo débil mientras se aproximó a 200 ppm, lo cual indicó una cierta sensibilidad a

las concentraciones estudiadas. Las cepas del género *Streptomyces* son las que mejor toleraron las diversas concentraciones de todos los metales en comparación con *Actinomadura* (Figura 28) (Anexo 2: Tabla 6).

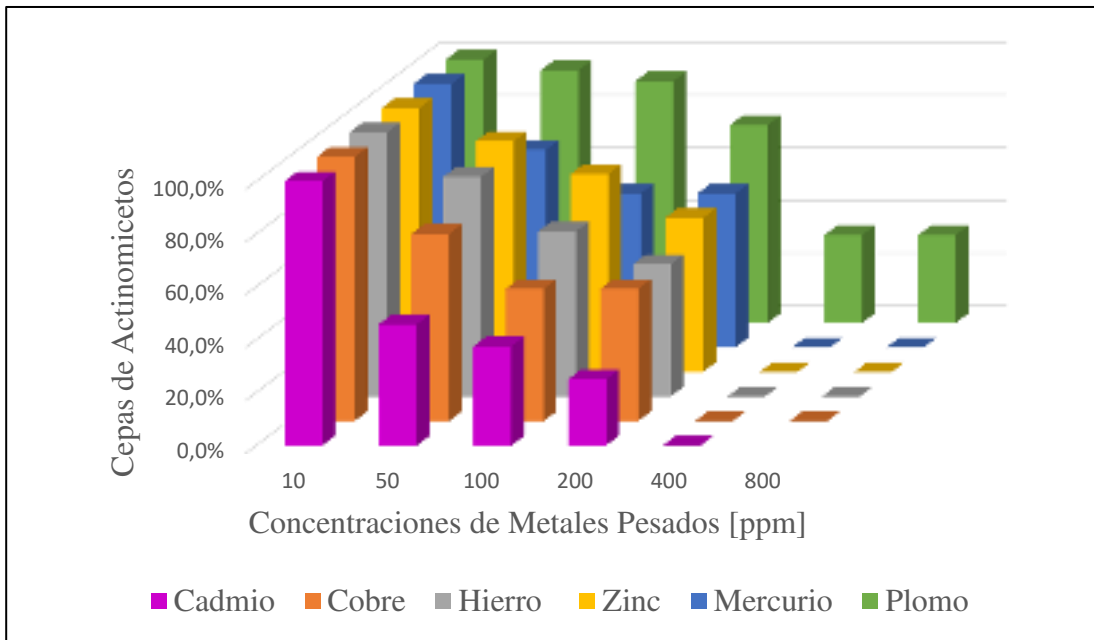


Figura 28: Porcentaje de las cepas de actinomicetos que crecieron a diferentes concentraciones de metales.

6.5. Estandarización del Método de Germinación y Crecimiento Vegetal de las Semillas con Agua (d)

Esta prueba fue realizada solo con agua destilada, la cual demostró que las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) y *Medicago sativa* (alfalfa) fueron de potencial germinación, ya que su rendimiento fue del 100%, manifestando un desarrollo normal

de la raíz y de hojas, y asegurando que el empleo de la metodología es adecuada para las siguientes pruebas.

Analizados estadísticamente, la cantidad de semillas germinadas en los dos tipos de plantas, se obtuvo que no hubo diferencias significativas entre las repeticiones del tratamiento, es decir, que no es una fuente de variación ($p > 0.05$), germinando las 10 semillas en total. Lo mismo ocurre con la variable hojas, en cual las plantas de los dos tipos presentaron 3 hojas por semilla ($p > 0.05$). La longitud de la raíz, también fue una variable evaluada, obteniendo que el promedio de la longitud de la raíz para la alfalfa fue de 5.41 ± 0.01 cm y para la lechuga de 5.35 ± 0.01 cm, entre las cuales tampoco se mostró una diferencia significativa entre las repeticiones del tratamiento ($p > 0.05$).

6.6. Determinación de la Capacidad de Germinación y Crecimiento Vegetal en Semillas Expuestas a los Géneros de Actinomicetos

En esta prueba se determinó el efecto de las cepas del género *Streptomyces* sobre las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) y *Medicago sativa* (alfalfa) mediante el registro de la cantidad de semillas germinadas, longitud (cm) de la raíz y cantidad de hojas desarrolladas. Las cepas empleadas fueron *Streptomyces heilongjiangensis* (C2), *Streptomyces variabilis* (AB5), *Streptomyces sp.* (E1), *Streptomyces sp.* (K2) y *Streptomyces variabilis* (X). Estas cepas fueron seleccionadas entre las 24 en total debido a su mejor tolerancia frente a metales pesados (Prueba de Resistencia a Metales Pesados).

Analizados estadísticamente, las variables de cantidad de semillas germinadas y cantidad de hojas en los dos tipos de plantas no representaron variación en este tratamiento. La cantidad de semillas germinadas fue 10 de 10 y el número de hojas fue 3 por semilla, por lo que estas variables no son una medición precisa (útil) de las características de germinación y crecimiento vegetal. Por el contrario, la variable longitud de raíz fue la más representativa en los dos tipos de semillas por su variación en los resultados obtenidos, siendo un indicador del efecto de estas cepas del género *Streptomyces* en las semillas.

Con respecto a las semillas de *Medicago sativa* (alfalfa), se apreció que el promedio de la longitud (cm) de la raíz expuesto a *Streptomyces heilongjiangensis* (C2) fue 5 ± 0 , seguido por *Streptomyces variabilis* (AB5) con 4.81 ± 0.01 , luego por *Streptomyces sp.* (E1) con 4.18 ± 0.35 y finalmente por *Streptomyces variabilis* (X) con 3.91 ± 0.01 y *Streptomyces sp.* (K2) con 3.81 ± 0.02 (Tabla 2, Figura 29).

El promedio de la longitud (cm) de la raíz presenta diferencias estadísticamente significativas entre las 5 cepas del género *Streptomyces*, es decir, el tipo de cepa del género *Streptomyces* afecta en la longitud de la raíz ($p < 0.05$).

Además se confirma que las diferencias de las longitudes de las raíces no se deben a las repeticiones del experimento, es decir, no es una fuente de variación significativa ($p > 0.05$).

Tabla 2: Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Medicago sativa* (alfalfa) expuestas a cepas del género *Streptomyces*.

Género	Cepas	M	±	ES
<i>Streptomyces variabilis</i>	AB5	4.81	±	0.01
<i>Streptomyces variabilis</i>	X	3.91	±	0.01
<i>Streptomyces sp.</i>	K2	3.81	±	0.02
<i>Streptomyces heilongjiangensis</i>	C2	5	±	0
<i>Streptomyces sp.</i>	E1	4.18	±	0.35

M: Media (cm), ES: Error Estándar de la Media (cm)

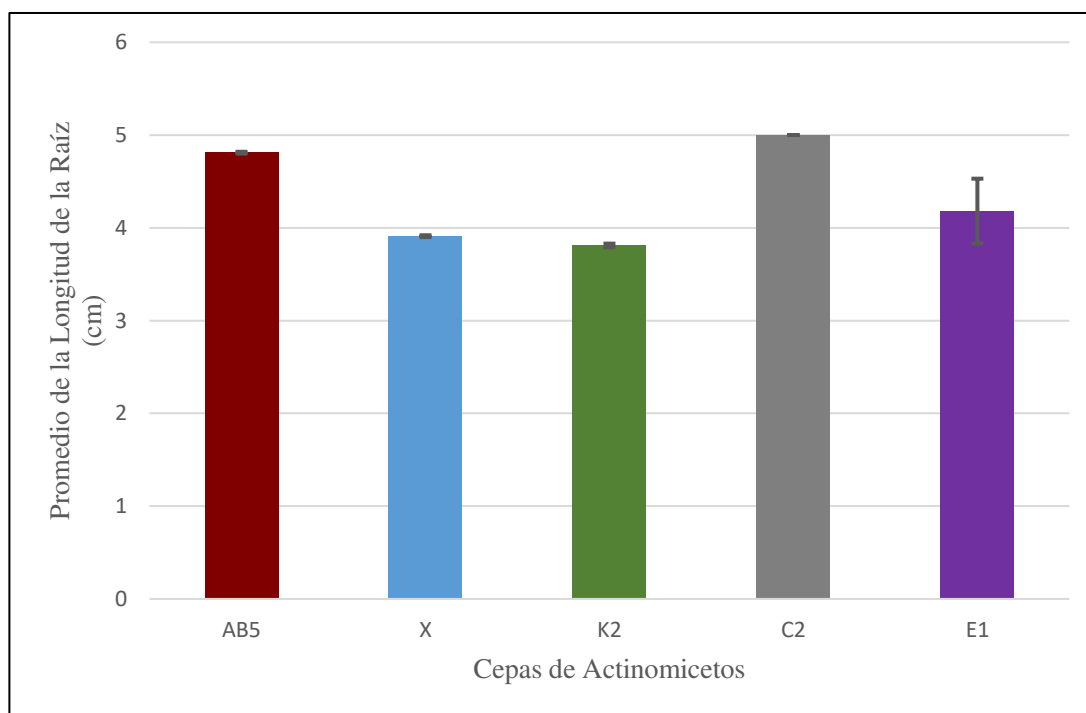


Figura 29: Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Medicago sativa* (alfalfa) expuestas a cepas del género *Streptomyces*.

En el caso de *Lactuca sativa* (lechuga), se obtuvo que el promedio de la longitud (cm) de la raíz expuesto a *Streptomyces heilongjiangensis* (C2) fue 4.95 ± 0.01 , seguido por *Streptomyces sp.* (E1) con 3.99 ± 0.01 , luego por *Streptomyces variabilis* (X) con 3.93 ± 0.03 y finalmente por *Streptomyces variabilis* (AB5) con 3.84 ± 0.02 y *Streptomyces sp.* (K2) con 3.83 ± 0.02 (Tabla 3, Figura 30).

El promedio de la longitud (cm) de la raíz presenta diferencias estadísticamente significativas según las cepas del género *Streptomyces*, es decir, el tipo de cepa del género *Streptomyces* afecta en la longitud de la raíz ($p < 0.05$). Sin embargo no existe diferencias estadísticamente significativas entre el promedio de la longitud de la raíz de *Streptomyces variabilis* (AB5) y *Streptomyces sp.* (K2) ($p > 0.05$). Además tampoco difieren significativamente el promedio de la longitud de la raíz entre *Streptomyces variabilis* (X) y *Streptomyces sp.* (E1) ($p > 0.05$) (Figura 30).

Además se confirma que las diferencias de las longitudes (cm) de las raíces no se deben a las repeticiones del experimento, es decir, no es una fuente de variación significativa ($p > 0.05$).

Tabla 3: Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas *Lactuca sativa* (lechuga) expuestas a cepas del género *Streptomyces*.

Género	Cepas	M	±	ES
<i>Streptomyces variabilis</i>	AB5	3.84	±	0.02
<i>Streptomyces variabilis</i>	X	3.93	±	0.03
<i>Streptomyces sp.</i>	K2	3.83	±	0.02
<i>Streptomyces heilongjiangensis</i>	C2	4.95	±	0.01
<i>Streptomyces sp.</i>	E1	3.99	±	0.01

M: Media (cm), ES: Error Estándar de la Media (cm)

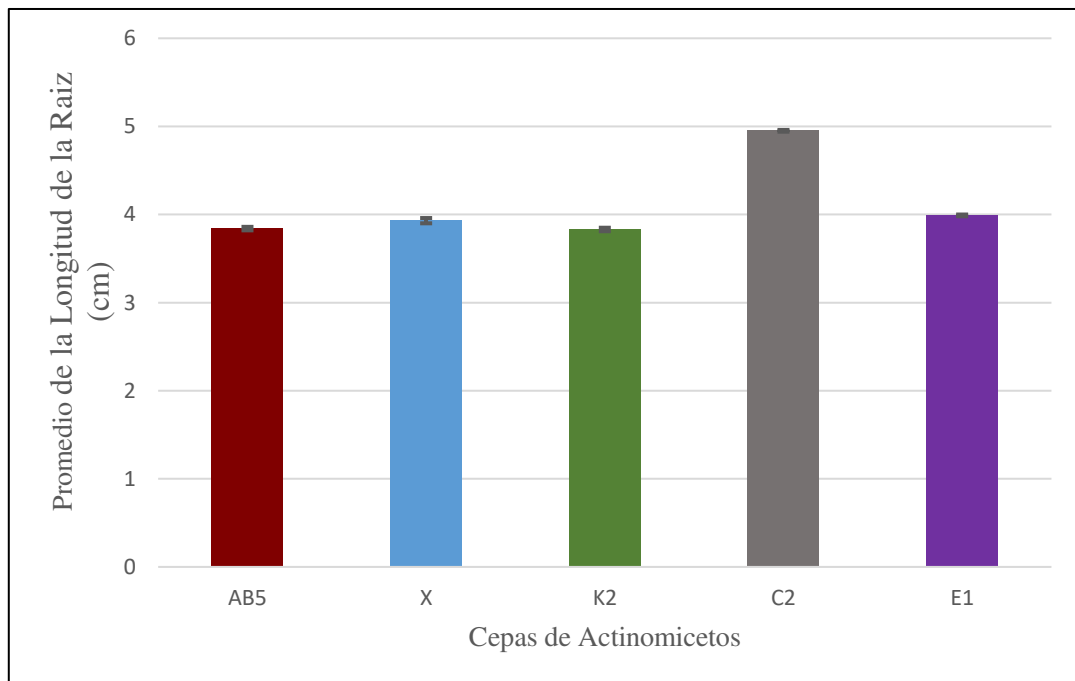


Figura 30: Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) expuestas a cepas del género *Streptomyces*.

Con todos los resultados obtenidos y analizados, el efecto ejercido por las 5 cepas del género *Streptomyces* en las semillas de *Medicago sativa* (alfalfa) y *Lactuca sativa* (lechuga) fue positivo para la germinación, desarrollo de la raíz y desarrollo de hojas.

6.7. Determinación de la Capacidad de Germinación y Crecimiento vegetal en Semillas Expuestas a Metales Pesados

En esta prueba se determinó el efecto de los metales pesados cobre, hierro, zinc y cadmio a diferentes concentraciones sobre las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) y *Medicago sativa* (alfalfa) mediante la evaluación de la cantidad de semillas germinadas, longitud (cm) de la raíz y cantidad de hojas desarrolladas. Las concentraciones empleadas fueron 10, 50, 100 y 200 ppm.

Entre todas las variables estadísticamente analizadas, las variables de cantidad de semillas y cantidad de hojas en los dos tipos de plantas no representaron variación en este tipo de tratamiento. En este caso la cantidad de semillas germinadas fue 10 de 10 y el número de hojas fue 3 por semilla, por lo que estas variables no son una medición precisa (útil) de las características de germinación y crecimiento vegetal. Por el contrario, la variable longitud (cm) de raíz fue la más representativa en los dos tipos de semillas por su variación en los resultados obtenidos, siendo un indicador del efecto de las diferentes concentraciones de estos metales en las semillas.

Con respecto a *Medicago sativa* (alfalfa), se observó que en cada uno de los metales, el promedio de la longitud (cm) de la raíz presenta diferencias estadísticamente significativas según las distintas concentraciones, es decir, las concentraciones para cada metal afectan en la longitud (cm) de la raíz ($p < 0.05$) (Tabla 4, Figura 31).

Además se confirma que las diferencias de las longitudes (cm) de las raíces no se deben a las repeticiones del experimento, es decir, no es una fuente de variación significativa ($p > 0.05$).

Tabla 4: Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Medicago sativa* (alfalfa) expuestas a metales pesados a diferentes concentraciones.

[ppm]	Cobre M±ES	Hierro M±ES	Zinc M±ES	Cadmio M±ES
10	1.58 ± 0.06	5.50 ± 0.12	5.40 ± 0.02	1.85 ± 0.05
50	0.75 ± 0.06	1.54 ± 0.01	1.54 ± 0.01	0.73 ± 0.01
100	0.51 ± 0.01	1.05 ± 0.00	1.51 ± 0.01	0.53 ± 0.01
200	0.37 ± 0.03	0.52 ± 0.01	0.50 ± 0.00	0.10 ± 0.00

M: Media (cm), ES: Error Estándar de la Media (cm)

[ppm]: Concentraciones de metales pesados

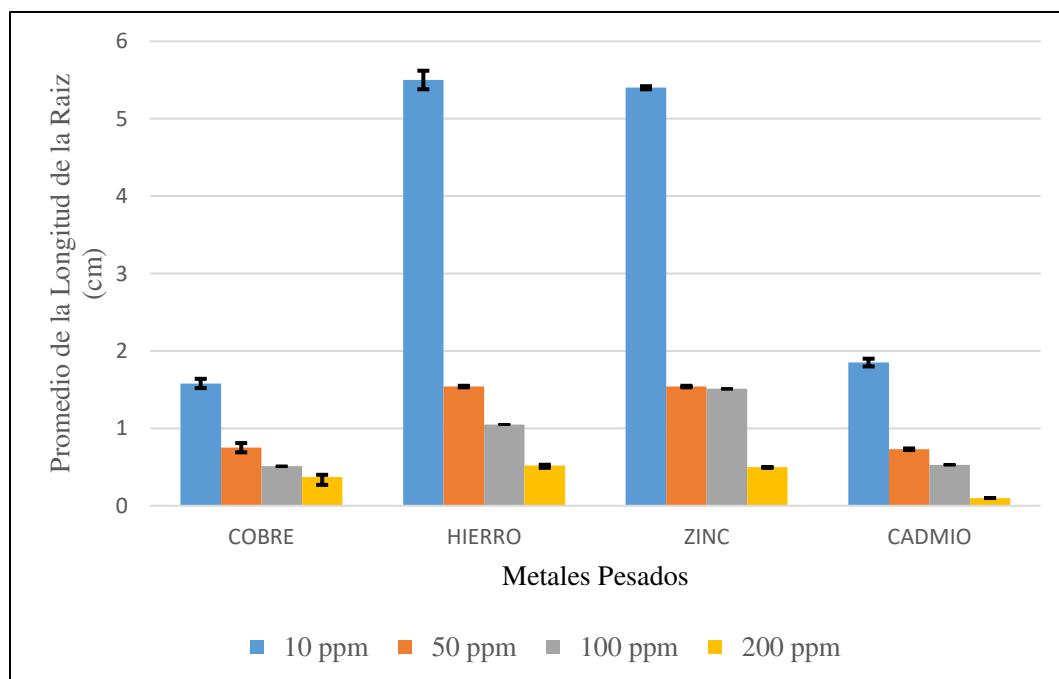


Figura 31: Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Medicago sativa* (alfalfa) expuestas a metales pesados a diferentes concentraciones.

Se puede apreciar que hay diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de las longitudes (cm) de la raíz a distintas concentraciones de cobre, hierro y cadmio ($p < 0.05$) (Figura 31).

También, se puede apreciar que hay diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de las longitudes (cm) de la raíz a distintas concentraciones de zinc ($p < 0.05$). Sin embargo, no presenta diferencias estadísticamente significativas entre la concentración 50 ppm y 100 ppm ($p > 0.05$) (Figura 31).

Por otro lado, el promedio de la longitud (cm) de la raíz del control-blanco presentan una diferencia estadísticamente significativa a partir de la concentración de 10 ppm de los metales de cobre, hierro y cadmio en 3.83, -0.09 y 3.56 cm, respectivamente ($p < 0.05$). Sin embargo, el promedio de la longitud (cm) de la raíz del control-blanco no presentan una diferencia estadísticamente significativa con la concentración de 10 ppm de zinc 0.003cm ($p > 0.05$).

En el caso de *Lactuca sativa* (**lechuga**), se obtuvo que en cada uno de los metales se aprecia que el promedio de la longitud (cm) de la raíz presenta diferencias estadísticamente significativas según las distintas concentraciones, es decir, las concentraciones para cada metal afectan en la longitud de la raíz ($p < 0.05$) (Tabla 5, Figura 32).

Además se confirma que las diferencias de las longitudes (cm) de las raíces no se deben a las repeticiones del experimento, es decir, no es una fuente de variación significativa ($p > 0.05$).

Tabla 5: Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) expuestas a metales pesados a diferentes concentraciones.

[ppm]	Cobre M±ES	Hierro M±ES	Zinc M±ES	Cadmio M±ES
10	0.30 ± 0.00	4.60 ± 0.20	4.58 ± 0.01	2.86 ± 0.01
50	0.19 ± 0.01	2.50 ± 0.40	0.47 ± 0.01	0.28 ± 0.01
100	0.10 ± 0.00	0.54 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.17 ± 0.00
200	0.10 ± 0.00	0.25 ± 0.00	0.17 ± 0.00	0.10 ± 0.00

M: Media (cm), ES: Error Estándar de la Media (cm)

[ppm]: Concentraciones de metales pesados

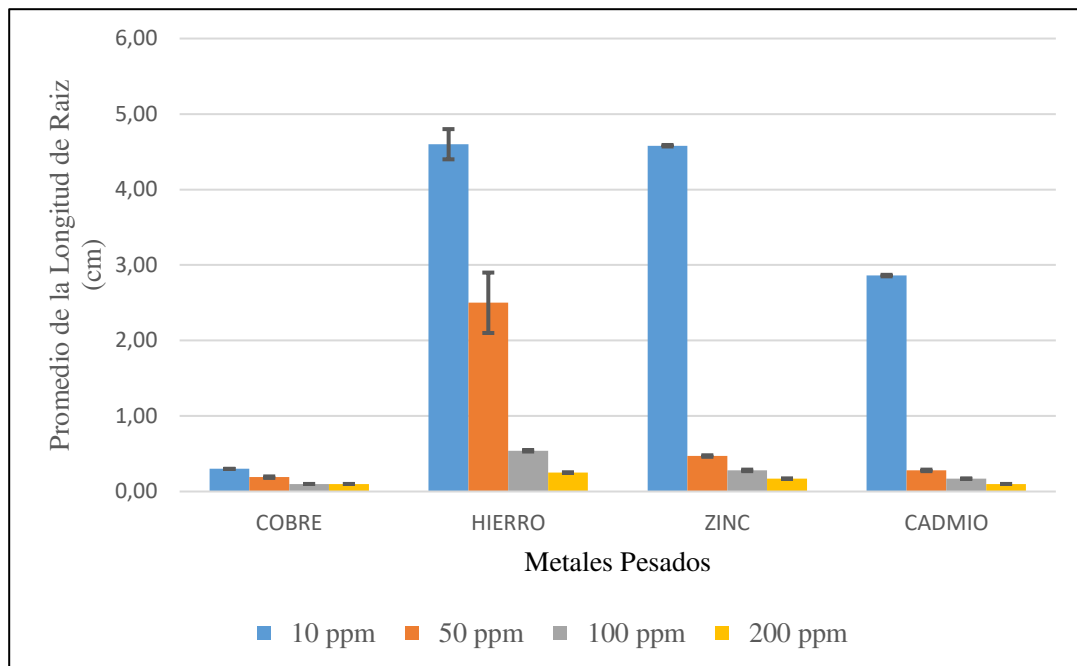


Figura 32: Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) expuestas a metales pesados a diferentes concentraciones.

Se puede apreciar que hay diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de las longitudes (cm) de la raíz a distintas concentraciones de hierro, zinc y cadmio ($p < 0.05$) (Figura 32).

También, se puede apreciar que hay diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de las longitudes (cm) de la raíz a distintas concentraciones de cobre ($p < 0.05$). Sin embargo, no presenta diferencias estadísticamente significativas entre la concentración 100 ppm y 200 ppm ($p > 0.05$) (Figura 32).

Por otro lado, el promedio de la longitud (cm) de la raíz del control-blanco presenta una diferencia estadísticamente significativa a partir de la concentración de 10 ppm de los metales de cobre, hierro, zinc y cadmio en 5.05, 0.74, 0.77 y 2.49 cm respectivamente ($p < 0.05$).

Con todos los resultados obtenidos y analizados, se pudo determinar que el efecto ejercido por todos los metales a diferentes concentraciones en las semillas de *Medicago sativa* (alfalfa) y *Lactuca sativa* (lechuga) fue perjudicial ya que limita el desarrollo de la raíz, no siendo así para la germinación y desarrollo de hojas. Los metales más perjudiciales fueron el cadmio y el cobre. *Lactuca sativa* (lechuga) fue un poco más sensible a todos estos metales que *Medicago sativa* (alfalfa). A estas pruebas se les ha denominado control-cobre, control-zinc, control-hierro y control-cadmio.

6.8. Determinación de la Capacidad Biofertilizante de los Géneros de Actinomicetos a través de su Inoculación en Semillas de *Medicago sativa* (alfalfa) y *Lactuca sativa* (lechuga) Expuestas a Metales Pesados

En esta prueba se determinó el efecto de las cepas del género *Streptomyces* sobre las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) y *Medicago sativa* (alfalfa) expuestas a metales pesados mediante la evaluación de la cantidad de semillas germinadas, longitud (cm) de la raíz y cantidad de hojas desarrolladas. Las cepas empleadas fueron *Streptomyces heilongjiangensis* (C2), *Streptomyces variabilis* (AB5), *Streptomyces sp.* (E1), *Streptomyces sp.* (K2) y *Streptomyces variabilis* (X). Los metales pesados fueron cobre, hierro, zinc y cadmio a 10, 50, 100 y 200 ppm.

Analizadas estadísticamente, las variables de cantidad de semillas y cantidad de hojas en los dos tipos de plantas no representaron variación en este tratamiento. En este caso la cantidad de semillas germinadas fue 10 de 10 y el número de hojas fue de 3 por cada semilla, por lo que estas variables no son una medición precisa (útil) de las características de germinación y crecimiento vegetal, por el contrario, la variable longitud (cm) de raíz fue la más representativa en los dos tipos de semillas por su variación en los resultados obtenidos, siendo un indicador del efecto de estas cepas del género *Streptomyces* en las semillas expuestas a metales pesados.

Con el análisis de ANOVA bifactorial medidas repetidas, se encontró que en *Medicago sativa* (alfalfa), el promedio de la longitud (cm) de raíz tratadas con las 5

cepas del género *Streptomyces* expuestas a las concentraciones de cobre presento diferencias significativas con el control-cobre ($p < 0.05$) (Tabla 6, Figura 33 y Anexo 1: Fotos 3).

Además se corrobora que las repeticiones de los experimentos no presentan diferencias significativas ($p > 0.05$).

En cada cepa del género *Streptomyces* a diferentes concentraciones de cobre se pudo apreciar una disminución estadísticamente significativa de la longitud (cm) de la raíz en la semillas de alfalfa ($p < 0.05$) (Figura 33).

Tabla 6: Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Medicago sativa* (alfalfa) expuestas a cepas del género *Streptomyces* y a diferentes concentraciones de cobre.

	Sin Cepa	<i>Streptomyces variabilis</i>	<i>Streptomyces variabilis</i>	<i>Streptomyces sp.</i>	<i>Streptomyces heilongjiangensis</i>	<i>Streptomyces sp.</i>
[ppm]	Control-Cu M ± ES	AB5 M ± ES	X M ± ES	K2 M ± ES	C2 M ± ES	E1 M ± ES
10	1.58 ± 0.01	3.94 ± 0.03	4.19 ± 0.06	3.77 ± 0.01	4.26 ± 0.06	3.73 ± 0.06
50	0.75 ± 0.01	2.86 ± 0.02	3.30 ± 0.02	2.91 ± 0.02	2.57 ± 0.01	3.41 ± 0.50
100	0.51 ± 0.01	2.60 ± 0.01	2.57 ± 0.01	2.75 ± 0.01	2.28 ± 0.01	3.17 ± 0.01
200	0.37 ± 0.03	1.86 ± 0.03	2.18 ± 0.20	1.70 ± 0.03	1.76 ± 0.02	2.38 ± 0.03

M: Media (cm), ES: Error Estándar de la Media (cm)

Control-Cu: Prueba solo con cobre

[ppm]: Concentraciones de cobre

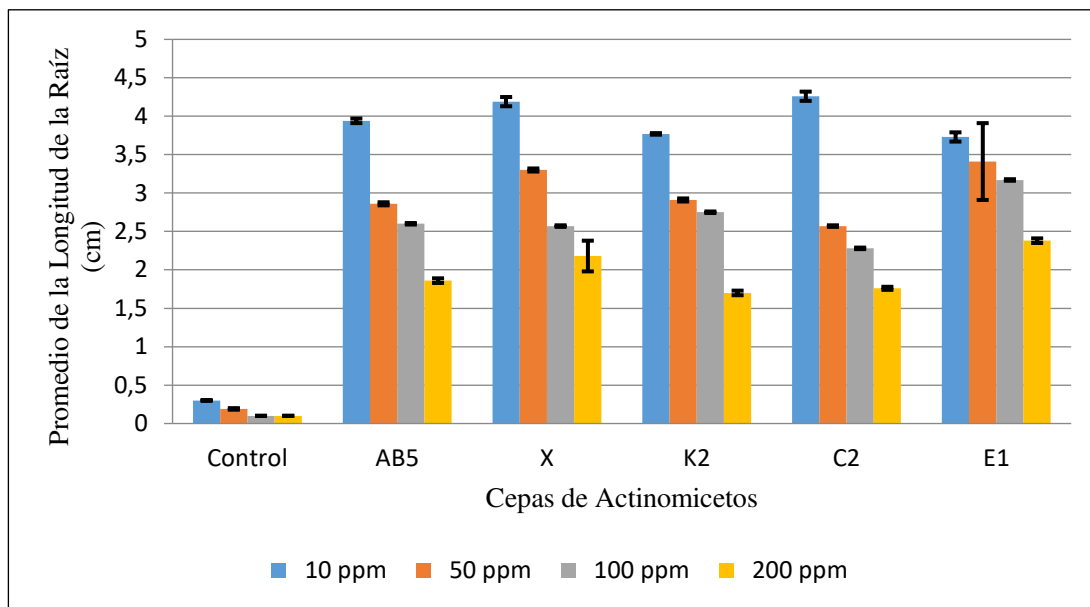


Figura 33: Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Medicago sativa* (alfalfa) expuestas a cepas del género *Streptomyces* y a diferentes concentraciones de cobre.

Con el análisis de ANOVA bifactorial medidas repetidas, se encontró que en *Medicago sativa* (alfalfa), el promedio de la longitud (cm) de raíz tratadas con cepas del género *Streptomyces* expuestas a las concentraciones de hierro presento diferencias significativas con el control-hierro ($p < 0.05$) (Tabla 7, Figura 34 y Anexo 1: Fotos 3).

Además se corroboró que las repeticiones de los experimentos no presentan diferencias significativas ($p > 0.05$).

En cada cepa del género *Streptomyces* a diferentes concentraciones de hierro se pudo apreciar una disminución estadísticamente significativa de la longitud (cm) de la raíz en la semilla de alfalfa ($p < 0.05$) (Figura 34).

Tabla 7: Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Medicago sativa* (alfalfa) expuestas a cepas del género *Streptomyces* y a diferentes concentraciones de hierro.

	Sin Ceba	<i>Streptomyces variabilis</i>	<i>Streptomyces variabilis</i>	<i>Streptomyces sp.</i>	<i>Streptomyces heilongjiangensis</i>	<i>Streptomyces sp.</i>
[ppm]	Control-Fe M ± ES	AB5 M ± ES	X M ± ES	K2 M ± ES	C2 M ± ES	E1 M ± ES
10	5.5 ± 0.01	5.60 ± 0.03	4.41 ± 0.02	6.69 ± 0.06	4.79 ± 0.01	4.21 ± 0.01
50	1.54 ± 0.01	4.52 ± 0.03	4.13 ± 0.04	4.69 ± 0.05	4.60 ± 0.02	3.54 ± 0.03
100	1.05 ± 0.01	4.21 ± 0.05	4.12 ± 0.02	4.57 ± 0.01	4.13 ± 0.06	3.39 ± 0.03
200	0.52 ± 0.01	2.96 ± 0.06	3.71 ± 0.03	4.32 ± 0.01	4.41 ± 0.02	2.89 ± 0.04

M: Media (cm), ES: Error Estándar de la Media (cm)

Control-Fe: Prueba solo con hierro

[ppm]: Concentraciones de hierro

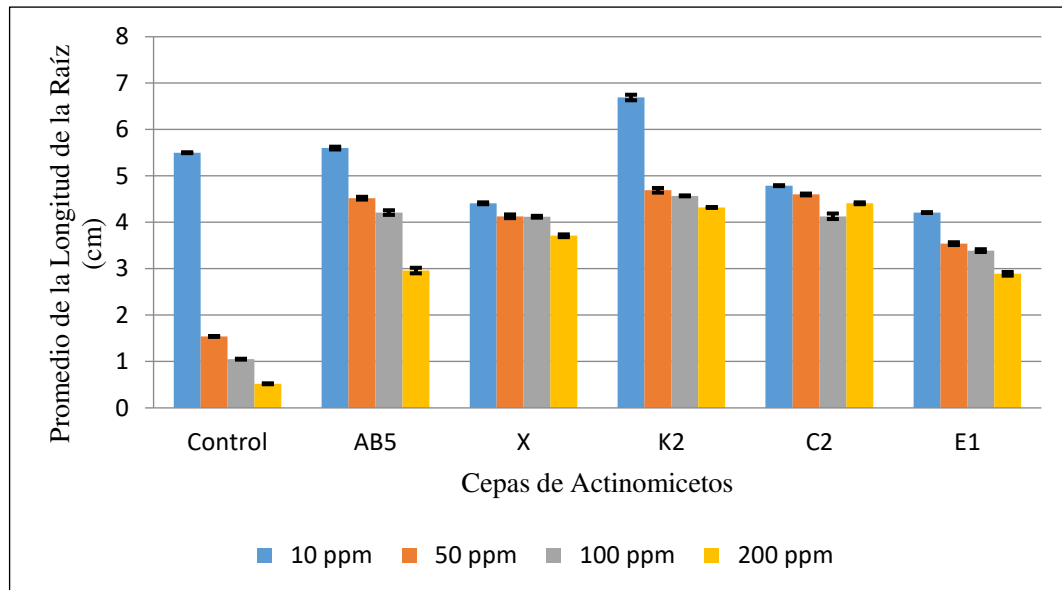


Figura 34: Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Medicago sativa* (alfalfa) expuestas a cepas del género *Streptomyces* y a diferentes concentraciones de hierro.

Con el análisis de ANOVA bifactorial medidas repetidas, se encontró que en *Medicago sativa* (alfalfa), el promedio de la longitud (cm) de raíz tratadas con cepas del género *Streptomyces* expuestas a las concentraciones de zinc presento diferencias significativas con el control-zinc ($p < 0.05$) (Tabla 8, Figura 35 y Anexo 1: Fotos 3).

Además se corrobora que las repeticiones de los experimentos no presentan diferencias significativas ($p > 0.05$).

En cada cepa del género *Streptomyces* a diferentes concentraciones de zinc se pudo apreciar una disminución estadísticamente significativa de la longitud (cm) de la raíz en la semilla de alfalfa ($p < 0.05$) (Figura 35).

Tabla 8: Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Medicago sativa* (alfalfa) expuestas a cepas del género *Streptomyces* y a diferentes concentraciones de zinc.

	Sin Cepa	<i>Streptomyces variabilis</i>	<i>Streptomyces variabilis</i>	<i>Streptomyces sp.</i>	<i>Streptomyces heilongjiangensis</i>	<i>Streptomyces sp.</i>
[ppm]	Control-Zn M ± ES	AB5 M ± ES	X M ± ES	K2 M ± ES	C2 M ± ES	E1 M ± ES
10	5.40 ± 0.02	5.50 ± 0.00	5.02 ± 0.02	5.01 ± 0.07	5.05 ± 0.03	4.43 ± 0.01
50	1.54 ± 0.01	2.93 ± 0.03	4.29 ± 0.08	4.82 ± 0.03	4.01 ± 0.20	3.74 ± 0.40
100	1.51 ± 0.01	2.55 ± 0.03	3.58 ± 0.01	4.57 ± 0.01	3.12 ± 0.05	3.64 ± 0.40
200	0.5 ± 0.00	2.58 ± 0.02	3.28 ± 0.04	2.88 ± 0.04	2.80 ± 0.02	2.80 ± 0.03

M: Media (cm), ES: Error Estándar de la Media (cm)

Control-Zn: Prueba solo con zinc

[ppm]: Concentraciones de zinc

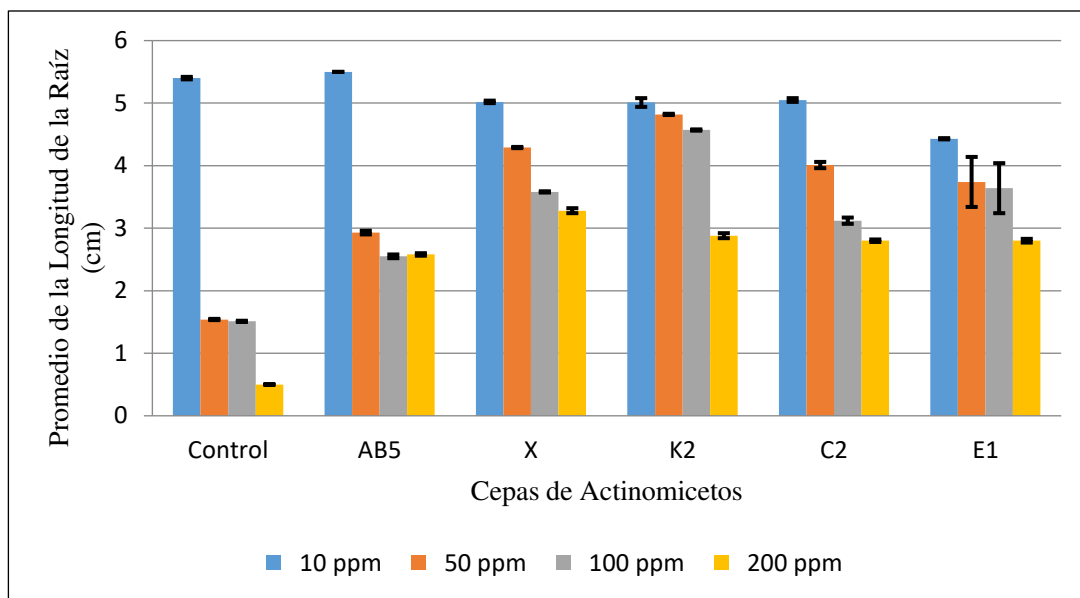


Figura 35: Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Medicago sativa* (alfalfa) expuestas a cepas del género *Streptomyces* y a diferentes concentraciones de zinc.

Con el análisis de ANOVA bifactorial medidas repetidas, se encontró que en *Medicago sativa* (alfalfa), el promedio de la longitud (cm) de raíz tratadas con cepas del género *Streptomyces* expuestas a las concentraciones de cadmio presento diferencias significativas con el control-cadmio ($p < 0.05$) (Tabla 9, Figura 36 y Anexo 1: Foto 3).

Además se corrobora que las repeticiones de los experimentos no presentan diferencias significativas ($p > 0.05$).

En cada cepa del género *Streptomyces* a diferentes concentraciones de cadmio se pudo apreciar una disminución estadísticamente significativa de la longitud (cm) de la raíz en la semilla de alfalfa ($p < 0.05$) (Figura 36).

Tabla 9: Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Medicago sativa* (alfalfa) expuestas a cepas del género *Streptomyces* y a diferentes concentraciones de cadmio.

	Sin Ceba	<i>Streptomyces variabilis</i>	<i>Streptomyces variabilis</i>	<i>Streptomyces sp.</i>	<i>Streptomyces heilongjiangensis</i>	<i>Streptomyces sp.</i>
[ppm]	Control-Cd M ± ES	AB5 M ± ES	X M ± ES	K2 M ± ES	C2 M ± ES	E1 M ± ES
10	1.86 ± 0.05	3.54 ± 0.04	3.67 ± 0.04	3.38 ± 0.04	3.81 ± 0.04	3.90 ± 0.05
50	0.73 ± 0.01	2.61 ± 0.05	2.85 ± 0.03	2.44 ± 0.03	3.20 ± 0.04	2.46 ± 0.03
100	0.53 ± 0.01	2.05 ± 0.01	2.34 ± 0.03	1.89 ± 0.02	1.97 ± 0.20	2.33 ± 0.02
200	0.10 ± 0.00	1.65 ± 0.04	1.80 ± 0.02	1.46 ± 0.01	1.41 ± 0.02	1.90 ± 0.02

M: Media (cm), ES: Error Estándar de la Media (cm)

Control-Cd: Prueba solo con cadmio

[ppm]: Concentraciones de cadmio

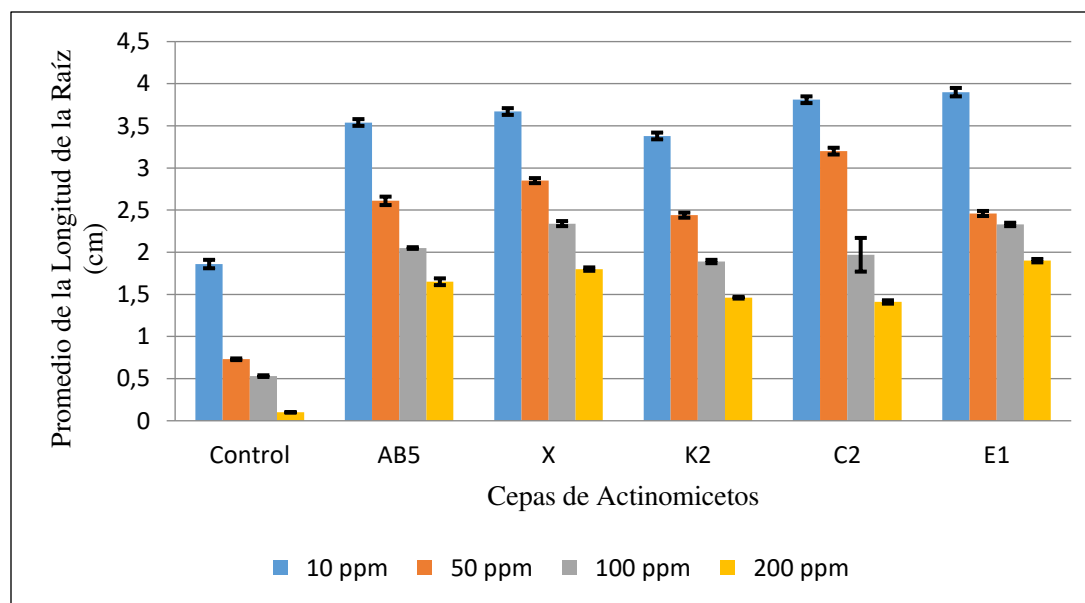


Figura 36: Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Medicago sativa* (alfalfa) expuestas a cepas del género *Streptomyces* y a diferentes concentraciones de cadmio.

Con respecto a *Lactuca sativa* (lechuga), con el análisis de ANOVA bifactorial medidas repetidas, se encontró que el promedio de la longitud (cm) de raíz tratadas con cepas del género *Streptomyces* expuestas a las concentraciones de cobre presento diferencias significativas con el control-cobre ($p < 0.05$) (Tabla 10, Figura 37 y Anexo 1: Fotos 4).

Además se corrobora que las repeticiones de los experimentos no presentan diferencias significativas ($p > 0.05$).

En cada cepa del género *Streptomyces* a diferentes concentraciones de cobre se pudo apreciar una disminución estadísticamente significativa de la longitud (cm) de la raíz en la semilla de lechuga ($p < 0.05$) (Figura 37).

Tabla 10: Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) expuestas a cepas del género *Streptomyces* y a diferentes concentraciones de cobre.

	Sin Cepa	<i>Streptomyces variabilis</i>	<i>Streptomyces variabilis</i>	<i>Streptomyces sp.</i>	<i>Streptomyces heilongjiangensis</i>	<i>Streptomyces sp.</i>
[ppm]	Control-Cu M ± ES	AB5 M ± ES	X M ± ES	K2 M ± ES	C2 M ± ES	E1 M ± ES
10	0.30 ± 0.00	3.38 ± 0.01	2.94 ± 0.01	3.35 ± 0.02	2.95 ± 0.03	3.84 ± 0.01
50	0.19 ± 0.01	1.92 ± 0.02	2.48 ± 0.02	2.45 ± 0.01	1.82 ± 0.01	2.88 ± 0.04
100	0.10 ± 0.00	1.61 ± 0.01	2.61 ± 0.03	1.94 ± 0.02	1.44 ± 0.03	2.68 ± 0.01
200	0.10 ± 0.00	1.38 ± 0.02	2.00 ± 0.00	1.46 ± 0.03	1.25 ± 0.02	1.79 ± 0.00

M: Media (cm), ES: Error Estándar de la Media (cm)

Control-Cu: Prueba solo con cobre

[ppm]: Concentraciones de cobre

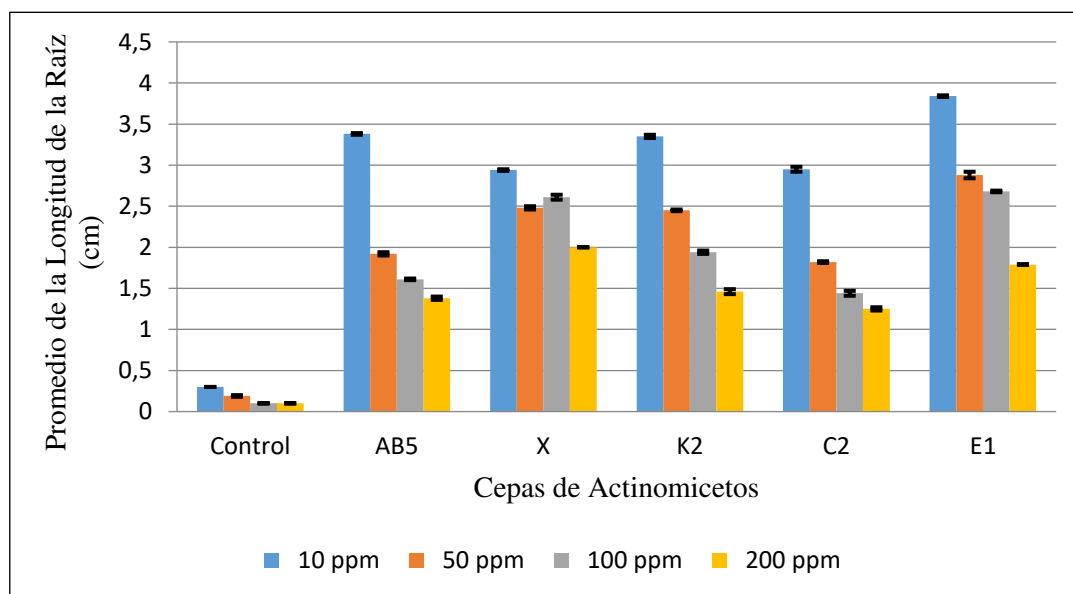


Figura 37: Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) expuestas a cepas del género *Streptomyces* y a diferentes concentraciones de cobre.

Con el análisis de ANOVA bifactorial medidas repetidas en *Lactuca sativa* (lechuga), se encontró que el promedio de la longitud (cm) de raíz tratadas con cepas del género *Streptomyces* expuestas a las concentraciones de hierro presento diferencias significativas con el control-hierro ($p < 0.05$) (Tabla 11, Figura 38 y Anexo 1: Fotos 4).

Además se corrobora que las repeticiones de los experimentos no presentan diferencias significativas ($p > 0.05$).

En cada cepa del género *Streptomyces* a diferentes concentraciones de hierro se pudo apreciar una disminución estadísticamente significativa de la longitud (cm) de la raíz en la semilla de lechuga ($p < 0.05$) (Figura 38).

Tabla 11: Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) expuestas a cepas del género *Streptomyces* y a diferentes concentraciones de hierro.

	Sin Cepa	<i>Streptomyces variabilis</i>	<i>Streptomyces variabilis</i>	<i>Streptomyces sp.</i>	<i>Streptomyces heilongjiangensis</i>	<i>Streptomyces sp.</i>
[ppm]	Control-Fe M ± ES	AB5 M ± ES	X M ± ES	K2 M ± ES	C2 M ± ES	E1 M ± ES
10	4.61 ± 0.02	4.23 ± 0.02	3.83 ± 0.02	4.28 ± 0.20	4.93 ± 0.01	4.67 ± 0.01
50	2.50 ± 0.04	3.80 ± 0.01	2.92 ± 0.02	4.13 ± 0.02	3.84 ± 0.02	4.51 ± 0.01
100	0.54 ± 0.01	3.41 ± 0.01	2.80 ± 0.00	3.87 ± 0.02	3.71 ± 0.01	4.35 ± 0.02
200	0.25 ± 0.01	3.37 ± 0.01	2.94 ± 0.02	2.94 ± 0.01	3.67 ± 0.04	3.38 ± 0.04

M: Media (cm), ES: Error Estándar de la Media (cm)

Control-Fe: Prueba solo con hierro

[ppm]: Concentraciones de hierro

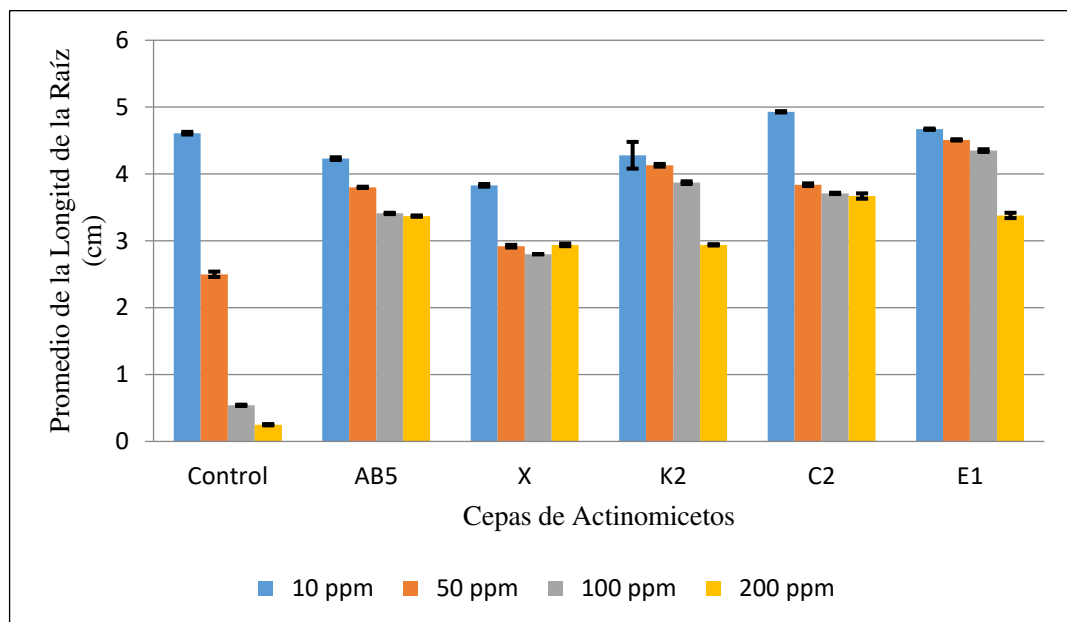


Figura 38: Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) expuestas a cepas del género *Streptomyces* y a diferentes concentraciones de hierro.

Con el análisis de ANOVA bifactorial medidas repetidas en *Lactuca sativa* (**lechuga**), se encontró que el promedio de la longitud (cm) de raíz tratadas con cepas del género *Streptomyces* expuestas a las concentraciones de zinc presento diferencias significativas con el control-**zinc** ($p < 0.05$) (Tabla 12, Figura 39 y Anexo 1:Fotos 4).

Además se corrobora que las repeticiones de los experimentos no presentan diferencias significativas ($p > 0.05$).

En cada cepa del género *Streptomyces* a diferentes concentraciones de zinc se pudo apreciar una disminución estadísticamente significativa de la longitud (cm) de la raíz en la semilla de lechuga ($p < 0.05$) (Figura 39).

Tabla 12: Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) expuestas a cepas del género *Streptomyces* y a diferentes concentraciones de zinc.

	Sin Cepa	<i>Streptomyces variabilis</i>	<i>Streptomyces variabilis</i>	<i>Streptomyces sp.</i>	<i>Streptomyces heilongjiangensis</i>	<i>Streptomyces sp.</i>
[ppm]	Control-Zn M ± ES	AB5 M ± ES	X M ± ES	K2 M ± ES	C2 M ± ES	E1 M ± ES
10	4.58 ± 0.01	3.99 ± 0.01	4.30 ± 0.01	3.99 ± 0.01	3.97 ± 0.01	4.37 ± 0.01
50	0.47 ± 0.01	3.45 ± 0.03	2.98 ± 0.01	3.33 ± 0.01	3.43 ± 0.01	2.80 ± 0.01
100	0.28 ± 0.01	2.97 ± 0.01	3.13 ± 0.03	3.06 ± 0.03	2.96 ± 0.02	2.37 ± 0.03
200	0.17 ± 0.00	2.58 ± 0.04	2.37 ± 0.04	2.03 ± 0.01	2.00 ± 0.00	2.44 ± 0.01

M: Media (cm), ES: Error Estándar de la Media (cm)

Control-Zn: Prueba solo con zinc

[ppm]: Concentraciones de zinc

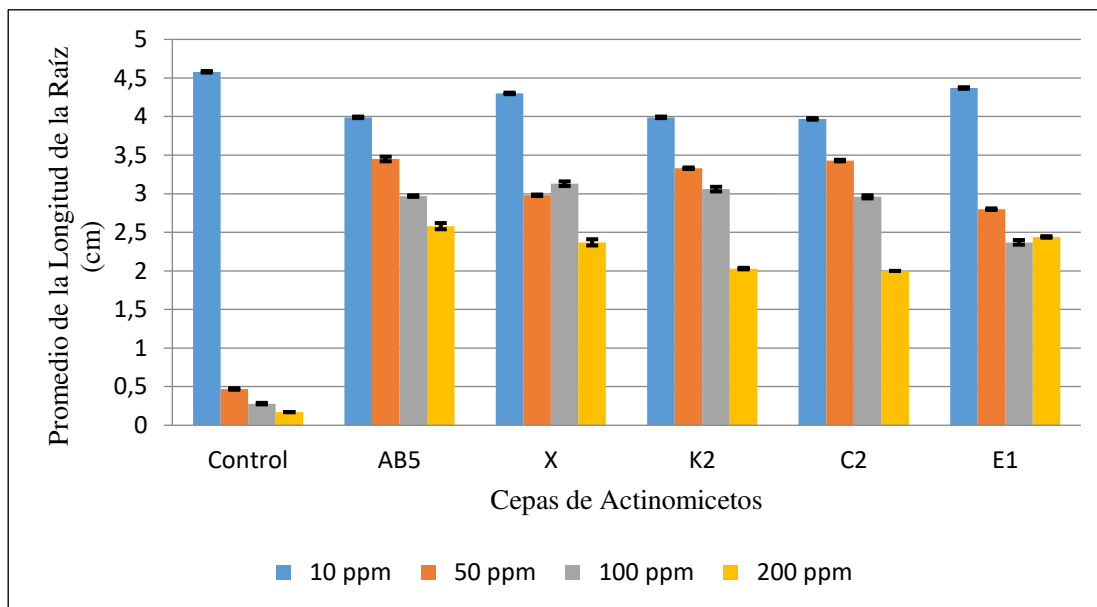


Grafico 39: Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) expuestas a cepas del género *Streptomyces* y a diferentes concentraciones de zinc.

Con el análisis de ANOVA bifactorial medidas repetidas en *Lactuca sativa* (**lechuga**), se encontró que el promedio de la longitud (cm) de raíz tratadas con cepas del género *Streptomyces* expuestas a las concentraciones de cadmio presento diferencias significativas con el control-**cadmio** ($p < 0.05$) (Tabla 13, Figura 40 y Anexo 1: Fotos 4).

Además se corrobora que las repeticiones de los experimentos no presentan diferencias significativas ($p > 0.05$).

En cada cepa del género *Streptomyces* a diferentes concentraciones de cadmio se pudo apreciar una disminución estadísticamente significativa de la longitud (cm) de la raíz en la semilla de lechuga ($p < 0.05$) (Figura 40).

Tabla 13: Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) expuestas a cepas del género *Streptomyces* y a diferentes concentraciones de cadmio.

	Sin Cepa	<i>Streptomyces variabilis</i>	<i>Streptomyces variabilis</i>	<i>Streptomyces sp.</i>	<i>Streptomyces heilongjiangensis</i>	<i>Streptomyces sp.</i>
[ppm]	Control-Cd M ± ES	AB5 M ± ES	X M ± ES	K2 M ± ES	C2 M ± ES	E1 M ± ES
10	2.86 ± 0.01	3.45 ± 0.03	3.40 ± 0.01	2.95 ± 0.01	3.03 ± 0.01	4.27 ± 0.01
50	0.28 ± 0.01	2.44 ± 0.02	2.95 ± 0.03	2.46 ± 0.02	1.38 ± 0.01	2.78 ± 0.04
100	0.17 ± 0.01	1.91 ± 0.02	2.10 ± 0.03	1.93 ± 0.01	1.11 ± 0.01	1.91 ± 0.02
200	0.10 ± 0.00	1.50 ± 0.00	1.67 ± 0.02	1.69 ± 0.01	1.16 ± 0.02	1.43 ± 0.02

M: Media (cm), ES: Error Estándar de la Media (cm)

Control-Cd: Prueba solo con cadmio

[ppm]: Concentraciones de cadmio

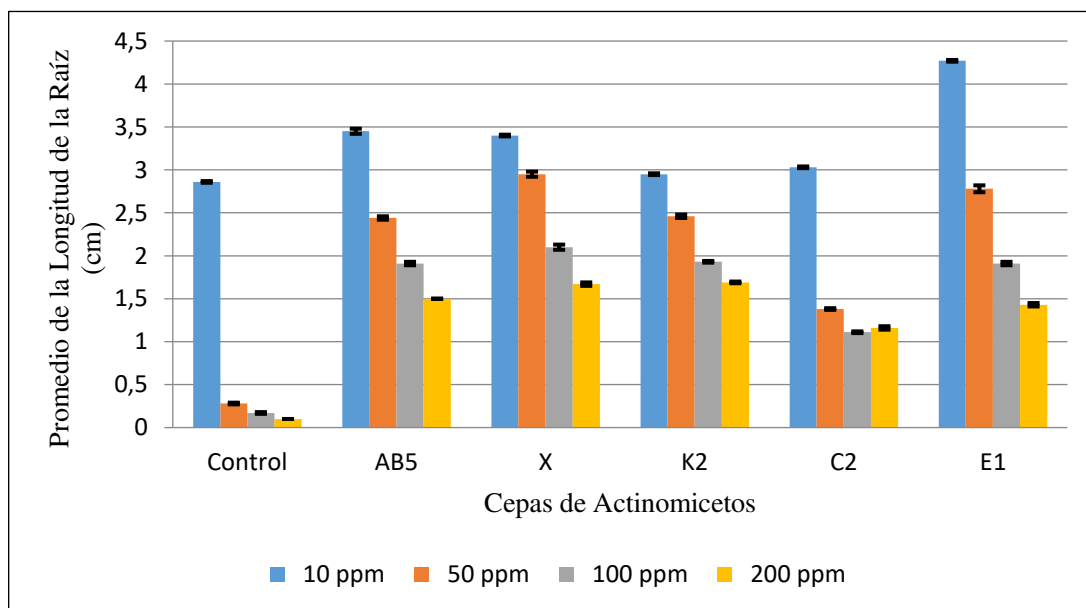


Grafico 40: Promedio de la longitud (cm) de la raíz en las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) expuestas a cepas del género *Streptomyces* y a diferentes concentraciones de cadmio.

Con todos los resultados obtenidos y analizados, se pudo determinar que el efecto de las 5 cepas del género *Streptomyces* en los dos tipos de semillas *Lactuca sativa* (lechuga) y *Medicago sativa* (alfalfa) expuestas a las diferentes concentraciones de cobre, hierro, zinc y cadmio fueron significativamente beneficiosas comparadas con el control que fueron expuestas solo con metales pesados; además se notó que con el cobre y el cadmio el beneficio de las cepas es a partir de 10 ppm, mientras que con el hierro y el zinc fue a partir de 50 ppm. Estos resultados son prácticamente iguales tanto para la alfalfa como para la lechuga. También, un resultado evidente, es que a mayor concentración de metal el beneficio disminuye gradualmente, evidenciado por la elongación de la raíz, registrados y presentados en las tablas y gráficos de resultados. A estas alturas, queda así demostrado la buena capacidad biofertilizante de las cepas del género *Streptomyces* frente a un factor de estrés de metales pesados.

Tabla 14: Resumen general de la longitud (cm) de la raíz de *Medicago sativa* (alfalfa) en presencia de agua, de actinomicetos, de metales pesados y de metales pesados con actinomicetos.

Con Agua	Con Actinomicetos	Con Metales Pesados (ppm)				Con Metales Pesados y Actinomicetos			
		10	50	100	200	10	50	100	200
5.41 (100%)	4.3 (80%)	3.58 (66.2%)	1.14 (20.3%)	0.90 (16.6%)	0.37 (6.8%)	4.2 (77.7%)	3.5 (64.8%)	3.0 (55.5%)	2.5 (46.3%)

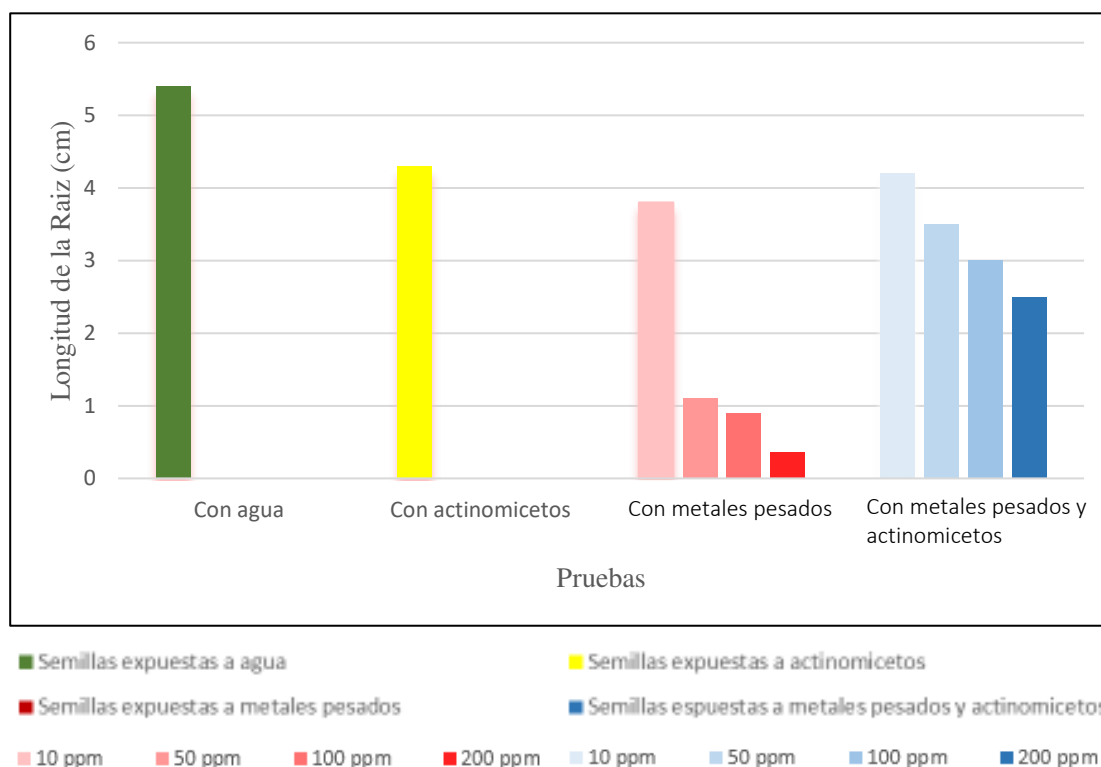


Figura 41: Resumen general de longitud (cm) de raíz de *Medicago sativa* (alfalfa) en presencia de agua, de actinomicetos, de metales pesados y de metales pesados con actinomicetos.

Tabla 15: Resumen general de la longitud (cm) de la raíz de *Lactuca sativa* (lechuga) en presencia de agua, de actinomicetos, de metales pesados y de metales pesados con actinomicetos.

Con Agua	Con Actinomicetos	Con Metales Pesados (ppm)				Con Metales Pesados y Actinomicetos			
		10	50	100	200	10	50	100	200
5.31 (100%)	4.1 (77.2%)	3.0 (56.5%)	0.86 (16.2%)	0.27 (5.1%)	0.15 (2.8%)	3.8 (71.5%)	2.9 (54.6%)	2.5 (47.1%)	2.1 (39.5%)

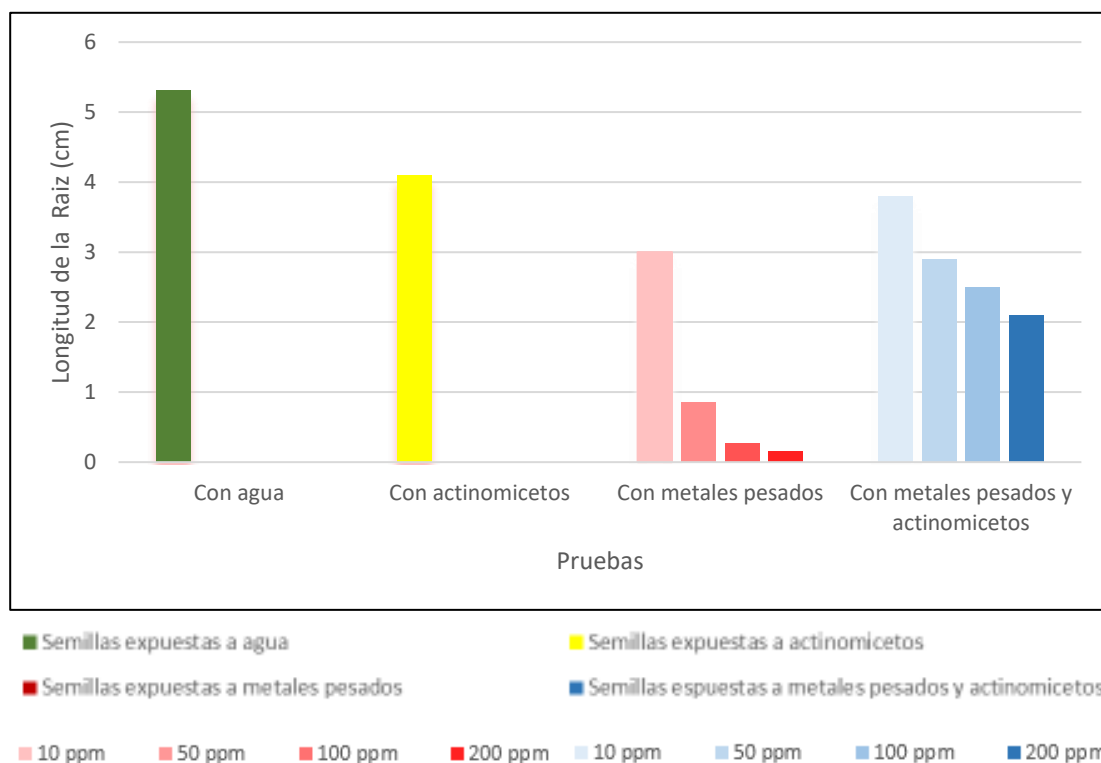


Figura 42: Resumen general de longitud (cm) de raíz de *Lactuca sativa* (lechuga) en presencia de agua, de actinomicetos, de metales pesados y de metales pesados con actinomicetos.

VII. DISCUSION

Los actinomicetos son bacterias que constituyen un conjunto de microorganismos que se encuentran distribuidos abundantemente en una variedad de ecosistemas naturales, representando una pieza clave para la descomposición de la materia orgánica (246). En el presente estudio se emplearon 24 cepas de actinomicetos, 6 de los cuales figuran en trabajos previos (34). Todas las cepas se sometieron a una variedad de pruebas para determinar sus características e identificación y luego pasar al estudio de interés, la biofertilización.

Las pruebas involucradas en la caracterización micro y macroscópica, bioquímica y molecular representan herramientas de suma importancia para el análisis morfológico de los actinomicetos (247).

La caracterización macroscópica de las cepas analizadas mostró morfologías diversas en aspecto y colores desarrollados en medios de cultivo Agar Nutritivo (AN), Glicerol Extracto de Levadura (XGAL) y Agar Almidón de Sales Inorgánicas (AAI). Esta diversidad morfológica puede atribuirse a las condiciones selectivas presentes en el medio de cultivo.

Wendisch & Kutzner (1986) indicaron que la coloración del micelio aéreo está fuertemente influenciado por la composición del medio a causa de la difusión dentro de las hifas aéreas del pigmento producido por el micelio de sustrato, el cual permite la modificación de su coloración verdadera (248). Por otro lado, se ha indicado que

estos microorganismos no son específicos para una sola fuente de carbono ni de nitrógeno (249), pero que cada nutriente tiene un efecto variable sobre la esporulación, el cual puede estimularse por el uso de medios de cultivos orgánicos que contengan extracto de levadura, extracto de avena, almidón, entre otros y la desecación estimula la formación del micelio aéreo y posterior esporulación (250). Asimismo Magarvey et al. (2004) y Kalakoutskii et al. (1976) mencionan que un compuesto orgánico como el extracto de carne podría retardar la formación del micelio aéreo y la esporulación en algunos actinomicetos por los efectos inhibitorios de las poliaminas y proteínas presentes en el extracto de carne (249,251). En estudios realizados por Kontro et al. (2007) se determinó que el extracto de levadura, la glucosa, triptona y el almidón caseína son compuestos muy eficaces para inducir la esporulación (250). En los resultados, también se observó que algunas cepas presentaron bordes con anillos concéntricos, lo que indica que es una respuesta quimiotrófica inducida por el gradiente de nutrientes en el medio (252), característica también observada por Magarvey et al. (2004) en miembros de la familia Micromonosporaceae (251).

Las características morfológicas a nivel microscópico permitieron identificar las estructuras de estas cepas de actinomicetos y completar las características culturales para su identificación. Considerando las características micro y macroscópicas obtenidas y comparadas con las reportadas en el Manual de Determinación Bacteriológico de Bergey (35) y el Manual de Métodos para Caracterización de Especies de *Streptomyces* (219), se determinó que las cepas presentaron una similitud con el género *Streptomyces*.

Para demostrar con claridad las características bioquímicas de estos microorganismos es necesario desarrollar pruebas bioquímicas, consideradas ensayos simples que permiten determinar la ausencia o presencia de actividades enzimáticas, de grupos de enzimas o de rutas metabólicas, los cuales se realizan mediante la incorporación de sustratos en los medios de cultivo a emplear, siendo capaz la bacteria de transformarlos o no, evidenciado por su crecimiento en los medios. El empleo de estas pruebas contribuirá con la identificación de géneros o especies de los microorganismos a través de su comparación entre las características bioquímicas obtenidas y las descritas por la literatura (253). Para la caracterización bioquímica se realizaron una variedad de pruebas como el RMVP, Citrato, TSI, Hidrolisis de almidón, LIA, Gelatina y Catalasa. Los resultados fueron comparados midiendo la similitud con los establecidos para diferentes géneros de actinomicetos en el Manual de Determinación Bacteriológico de Bergey (35) y en el libro *The Prokaryotes A Hand Book on the Biology of Bacteria* (248,254), evidenciándose una clara desuniformidad, por lo cual no se pudo definir con precisión a que géneros pertenecen, sin embargo permitió una asociación aproximada con los géneros *Nocardia*, *Actinomadura* y *Streptomyces*.

Por otro lado, se evaluó la condición de salinidad, en la cual todas las cepas de todos géneros demostraron tolerancia al NaCl en todas las concentraciones estudiadas, desde 1,5% hasta 10 % de NaCl. Los niveles de NaCl utilizadas en este estudio fueron elegidas después de examinar las respuestas de tolerancia en trabajos previos. La capacidad de tolerar altas concentraciones de salinidad (10%) podría explicarse a la

alta presión osmótica que presentan estos géneros de bacterias (255,256). Estos resultados son similares a los obtenidos por Kuchari (1999), Tresner et al. (1968) y Matsubara et al. (2013) (257,258,34). Estos autores también reportaron que medios con concentraciones más altas del 10% NaCl, son perjudiciales para el crecimiento de estos géneros. Fuera de estos rangos de concentraciones de NaCl (>10%) provoca la inhibición de las mismas porque ocurre el incremento de la presión osmótica celular reduciendo la actividad del agua y ocasionando la deshidratación y muerte celular (259). Por otra parte, este suceso al parecer podría ocurrir por la presencia de un exceso de sodio que inhibe la toma de cationes esenciales como calcio y potasio, dando como resultado una toxicidad perjudicial para muchas enzimas intracelulares (260).

En lo referente a la condición de pH, se registró que el crecimiento a diferentes rangos de pH de todas las cepas de los géneros de actinomicetos fue óptimo entre 2,8 y 7, es decir, que los actinomicetos son acidófilos y neutros. Los niveles de pH utilizados en este estudio fueron elegidos después de examinar las respuestas de tolerancia en trabajos previos. El crecimiento a condiciones ácidas se debe a que fueron aislados a partir de cultivos ácidos (34). A pesar que la mayoría de investigaciones han demostrado que los actinomicetos son neutros y que incluso pueden resistir niveles alcalinos (34,261), también existen tolerantes a condiciones ácidas (262) como se demuestran en los estudios hechos por Seong et al. (1993) quienes trabajaron a pH 4.5 hasta 5, Hagedorn (1976) con pH 3 hasta 6, Xu et al. (2006) a un pH 4.5, Piñero et al. (2004) con pH 5 y Matsubara et al (2013) entre un rango de pH de 4 a 6, mientras que Norris et al. (2011) lo hicieron a pH 2.5 (263,264,265,266,34,267). Slonczewski (2000),

menciona que las bacterias producen moléculas procedentes de la expresión de genes inducidos por el pH ácido, que permite ya sea cambiar el pH interno o externo de la célula, o transportar protones para lograr la homeostasis, siendo esto un mecanismo de respuesta a las condiciones adversas por pH ácido (268). Este mecanismo consiste fundamentalmente en mantener el pH intracelular próximo a neutro a causa de que los componentes del citoplasma son sensibles al pH ácido (269).

Los actinomicetos han sido caracterizados e identificados mediante técnicas tradicionales como los ensayos morfológicos y fisiológicos, pero estos no han sido suficientes para lograr una completa y definida clasificación e identificación, por tal se requiere de técnicas más avanzadas y mejoradas para lograr este propósito. Entre ellas se encuentran la microscopía de luz y el análisis a nivel molecular, que son técnicas sofisticadas que permiten una precisa caracterización e identificación de estos microorganismos, logrando determinar el género y la especie a la cual pertenecen. Especialmente la técnica molecular permite analizar la presencia en su material genético del contenido de guanina y citosina, además, actualmente constituyen un aporte esencial para la clasificación bacteriana. Existe una alta diversidad en la familia Actinomycetaceae, siendo el género *Streptomyces* el más involucrado, debido a su alta divergencia con respecto a sus características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, además de sus acciones como productoras de antibióticos, por tal razón se han originado numerosas técnicas que contribuyen a su clasificación e identificación (24,202,270).

El análisis filogenético de las muestras empleadas en este trabajo determinó la presencia de 2 géneros: *Streptomyces* y *Actinomadura*, siendo el primero el que abarca la mayor parte de las cepas. La predominancia de *Streptomyces sp.* es consistente con reportes previos correspondientes a análisis metagenómicos donde este género también se presenta como el más abundante (172,271). De manera más específica este trabajo ha identificado 7 especies de este género: *S. variabilis*, *S. heilongjiangensis*, *S. thermocarboxydus*, *S. peruviansis*, *S. champavattii*, *S. albidoflavus* y *S. matensis*.

S. variabilis ha sido previamente reportado como componente frecuente de la microbiota en suelos y ecosistemas marinos (272). Por su parte *S. heilongjiangensis* es también una especie común en los suelos y recientemente se le ha encontrado como simbiote en cultivos de soya y otras especies de actividad económica (273). En contraparte otros estudios han indicado que *S. thermocarboxydus* está poco representado en abundancia, probablemente como consecuencia de su carácter moderadamente termofílico (274) hecho que es congruente con los resultados obtenidos en este trabajo. De manera similar *S. peruviansis* es una especie muy poco representada, se ha reportado su presencia terrenos reservados donde puede prospera sin competir con otros microorganismos (275, 276). Finalmente, se ha señalado que *S. champavatti*, *S. albidoflavus* y *S. matensis* son parte de la microbiota simbiote en terrenos moderadamente áridos (277).

El efecto de factores ecológicos sobre la estructura poblacional ha sido bien descrito en estudios sobre la diversidad genética de *S. albidoflavus* y otras bacterias

donde se destaca el impacto de la recombinación en la microevolución de consorcios (278,279, 280). Observando la composición de los clusters del género *Streptomyces* se puede inferir que la mayoría de cepas son producto de un proceso de divergencia reciente, lo que sugiere que estos grupos se han generado como eventos de recombinación a partir de un ancestro en común que probablemente sería *S. variabilis*. El tamaño de la muestra limita el poder de resolución de este análisis ya que no permite apreciar si existen genotipos más representados en cada clúster.

En el caso del género *Actinomadura* identificado en una cepa de este trabajo, el análisis filogenético indica un reducido polimorfismo en su secuencia hecho que lo distingue de *Streptomyces*. De manera más destacada, esta diferencia es lo suficientemente fuerte para distinguirlo también del control *Bifidobacterium bifidum*, este fenómeno podría deberse a la fuerte presión de selección de las especies del género *Streptomyces* sobre el total de la microbiota lo que conlleva a las especies menos representadas a una poca variabilidad como producto de una limitada frecuencia de recombinación. El efecto de este último factor ha sido mencionado en un estudio en miembros de la familia Thermomonosporaceae donde se destaca la poca variabilidad del género *Actinomadura* (281).

La prueba de resistencia a metales pesados por parte de los actinomicetos demostró que el plomo fue el metal más tolerado y el cadmio fue uno de los más tóxicos, mientras que el cobre, hierro, mercurio y zinc tuvieron resultados intermedios. Las concentraciones de metales pesados utilizados en este estudio fueron elegidas después

de examinar las respuestas de tolerancia en trabajos previos (34). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por El Baz et al. (2015) y Singh et al. (2014) (282,283). Además, también se encontró una similitud con los encontrados por Abbs et al. (1989) y Rifaat (2009), quienes describieron los efectos de los metales pesados pero en diferentes especies de *Streptomyces* (284,285). La tolerancia a los metales pesados puede deberse a la habilidad de estos microorganismos de adherir iones metálicos en su pared celular, acumular metales intracelularmente por medio de un sistema de transporte, la producción de agentes quelantes (283,286) y la biotransformación y posterior precipitación (287). Los actinomicetos pueden presentar más de un mecanismo de resistencia. Estos mecanismos de resistencia a metales pueden haber sido adquiridos por procesos adaptativos (286) o por procesos hereditarios (288).

Con respecto al cobre, Mattuschka et al. (1994) indicaron que estas bacterias son capaces de resistir este metal por la adsorción en su pared celular; mientras que Kothe et al. (2010) mencionaron que fue por la producción de melanina, un agente antioxidante que captura los radicales libres de oxígeno, generados por esta situación de estrés. A mayor concentración de cobre, existe una mayor producción de melanina (289,286).

Por otro lado, Summers (1985) menciona que *Streptomyces sp.* es capaz de detoxificar el mercurio pasando de Hg^{2+} a Hg^0 por medio de la enzima mercurio reductasa (290).

Streptomyces sp. acumula cadmio y el zinc principalmente en la pared celular seguido por una acumulación intracelular (291). La superficie externa de las células bacterianas puede adsorber varios metales pesados por medio de enlaces iónicos a su grupo químico intrínseco. Los grupos aniónicos tales como carboxilatos y fosfatos de peptidoglicanos y ácidos teicoicos son considerados como principales sitios de unión al metal (292).

En el caso del plomo, El Baz et al. (2015) reportaron que *Streptomyces sp.* resistió este metal por el mecanismo de acumulación y la producción de sideróforos (282). Los sideróforos cumplieron una función de agentes quelantes mediante el secuestro de este ion metálico. Nakouti et al. (2013) y Rajkumar et al (2010) también indican que este fenómeno se cumple para otros iones como Mn, Co, Cd, Ni, Al, Li, Cu, Zn y Mg, mientras que Franco (2008) lo menciona para el ion de Fe (293,358,23).

A partir de estas pruebas de resistencia de las 24 cepas de los géneros *Streptomyces* y *Actinomadura* a metales pesados se seleccionaron las cepas con mejor tolerancia a estos, lo que significa alta proporción de cepas sobrevivientes. Estas cepas fueron *Streptomyces heilongjiangensis* (C2), *Streptomyces variabilis* (AB5), *Streptomyces sp.* (E1), *Streptomyces sp.* (K2) y *Streptomyces variabilis* (X) trabajadas a diferentes concentraciones de Cu, Zn, Fe, Cd, Pb y Hg a 10, 50, 100, 200 ppm. Luego con estas cepas seleccionadas se procedió a las pruebas de germinación y crecimiento vegetal de semillas.

Las pruebas de germinación y crecimiento vegetal fueron realizadas con semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) y *Medicago sativa* (alfalfa), las cuales fueron evaluadas por medio de las variables: cantidad de semillas germinadas, longitud de raíz y cantidad de hojas desarrolladas. De estas tres variables, la de relativa mayor importancia es la evaluación de la raíz en razón de ser el primero en ser colonizado y por su papel esencial en la captación de agua y nutrientes (294,295), contribuyendo así al desarrollo óptimo de la planta, por tales motivos la raíz es considerada el órgano principal de esta (296). La raíz, también, es la zona de la planta más sensible a factores positivos (agua y nutrientes) y negativos (metales pesados y patógenos) y su elongación representa un indicador subletal que permite evaluar en las plantas los efectos biológicos, con lo cual se obtiene información que complementa a las obtenidas en los estudios referidos al efecto en la germinación (297). En el presente trabajo en todas las pruebas del estudio las variables de cantidad de semillas germinadas y cantidad de hojas desarrolladas en los dos tipos de plantas no mostraron variación significativa, por lo que estas variables no se consideraron útiles para el análisis posterior. Por el contrario la longitud de raíz mostro variación significativa, por lo que fue considerado un indicador útil del efecto de factores positivos y negativos.

La primera prueba de germinación realizada fue con el objeto de saber el potencial de germinación de las semillas adquiridas, por ende se procedió a una prueba solamente con agua destilada. Para la elaboración de estos bioensayos se seleccionaron dos tipos de plantas, la primera fue la lechuga, la cual es un planta que se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial por ser sus hojas substanciales para la

alimentación general. Esta planta tiende a adaptarse a una variedad de terrenos, siendo de su preferencia los suelos que contienen abundante materia orgánica y nitrógeno. La lechuga se escogió por su rapidez en la germinación, que en condiciones estándar abarca un periodo entre 2 y 3 días, y también por su vertiginoso crecimiento (109). Por otra parte, la segunda planta elegida fue la alfalfa por ser considerada un indicador en la realización de “screening” para numerosas cepas microbianas, permitiendo una observación de la respuesta bacteriana sobre las plantas, y además por su gran valor económico en nuestro medio para la alimentación animal (25).

De los resultados obtenidos, se dedujo que las semillas de los dos tipos de plantas tenían un potencial de germinación normal, debido a que el rendimiento fue del 100%, es decir, que todas las semillas habían dejado el estado de latencia, manifestando un desarrollo normal de la raíz. El proceso de la germinación inicia con un brote por parte del embrión, el cual es llamado radícula, convirtiéndose posteriormente en la raíz primaria. Después de emerger la radícula, el siguiente órgano en aparecer es el hipocótilo y a partir de la expansión y desarrollo de este se forma el tallo (298). Estos resultados permitieron confiar en la metodología aplicada para continuar con el proceso de estudio.

La siguiente prueba consistió en someter las semillas de los dos tipos de plantas al efecto de las 5 cepas seleccionadas del género *Streptomyces* para determinar su capacidad de germinación y crecimiento vegetal (desarrollo de raíz y hojas). Se pudo apreciar que las 5 cepas del género *Streptomyces* influyeron claramente sobre estas

semillas, evidenciado por su significativo crecimiento de la raíz, lo cual permite deducir que estas bacterias son potentes promotoras de crecimiento vegetal. A pesar que la actividad de agua fue mínima en el cultivo bacteriano su respuesta fue similar a la prueba de germinación con agua, la cual estuvo considerada como control positivo. Esta promoción del crecimiento se da por las actividades de los actinomicetos, entre las cuales están la producción de sideróforos, la síntesis de reguladores de crecimiento (AIA), la producción de metabolitos anti fúngicos y enzimas biodegradativas (control biológico), la producción de enzimas extracelulares para la degradación de la materia orgánica, la fijación de nitrógeno y solubilización de fosfato (24, 31, 146, 154, 158, 162, 200, 202, 203, 205, 209, 210). Cabe resaltar que numerosas investigaciones orientadas al estudio de la actividad promotora de crecimiento vegetal de los actinomicetos resaltan al género *Streptomyces*, siendo así escasos los descritos para los demás de géneros (24,158,202,299,230). En otros trabajos se han reportado la buena capacidad fertilizante de los actinomicetos en cultivos de *Glycine max* (soya) (301), *Solanum tuberosum Linnaeu* (papa) (302), *Trifolium repens* L. (trébol blanco) (23), *Phaseolus vulgaris* L. (frijol) (23,158,204), *Cicer arietinum* (garbanzo) (303), *Camellia sinensis* (te) (304), *Oryza sativa* (arroz) (305,307), *Lycopersicon esculentum* (tomate) (158), *Pisum sativum* (guisante) (200), *Triticum* (trigo) (210, 301, 306), *Sorghum* (sorgo), *Zea mays* (maíz) (308), cereales y zanahorias (*Daucus carota*)(359).

Los actinomicetos ejercen capacidad de control biológico debido a la presencia de sideróforos producidos por ellos mismos, el cual actúa como agente quelante mediante el secuestro del hierro presente, haciendo su disponibilidad menor para los

microorganismos patógenos y por ende inhibiendo su crecimiento (201). Existen trabajos donde se han demostrado que los géneros *Streptomyces*, *Nocardia* y *Actinomadura* son los más resaltantes dentro del grupo de actinomicetos con respecto a la producción de sideróforos. En los estudios realizados por Müller et al. (1984) se reportó que *Streptomyces pilosus* produce el sideróforo ferrioxamina, mientras que Lee et al (2012) reportaron la producción del sideróforo enterobactina por este mismo género; por otra parte con referente a *Nocardia*, varios autores indicaron la producción de muchos sideróforos como brasilibactina (312), asterobactina (313), nocobactina (314) y uno que comparten ambos géneros nocardamina (315, 316, 317, 318).

También, esta capacidad de biocontrol se debe a la producción de enzimas biodegradativas como quitinasas, celulasas, amilasas, glucanasas, hemicelulasas, peroxidases, entre otras, involucradas en la degradación de la pared celular de los hongos fitopatógenos (319) y por tal, importantes en el micoparasitismo que realizan estas bacterias (199,200,320). Dentro de este último, los géneros *Microbispora*, *Micromonospora*, *Nocardia* y *Streptomyces* son los más representativos (321). Asimismo, Tokala et al (2002), Gomes et al (2001), Inbar et al (2005) y Zhao et al (2013) reportaron que el género *Streptomyces* presenta un mayor impacto en el crecimiento vegetal que otros géneros por la producción de metabolitos como quitinasas y glucanasas (200,322,324,325). Por otra parte, debido a que estas bacterias son grandes productores de antibióticos, este es considerado otro mecanismo de biocontrol para la supresión de fitopatógenos presentes en el suelo (326,327). Los actinomicetos ejercen su acción sobre fitopatógenos como *Alternaria sp.*, *Verticillum*,

Botrytis cinerea, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum musae*, *Stenocarpella maydis*, *Macrophomina*, *Cladosporium fulvum*, *Phytophthora*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia eragrostides*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia*, *Dickeya sp*, *Pseudomonas sp*, *Bacillus sp* y *Erwinia amylovora* (59,328,329,330,331,332,376,377).

Los actinomicetos, también han demostrado su capacidad generadora de fitohormonas (auxinas, giberelinas y citoquinas) que favorecen la germinación de semillas, el engrosamiento, la densidad y longitud de la raíz, los que le confieren una mayor absorción de agua y nutrientes. Estas fitohormonas actúan estimulando la división, elongación y diferenciación celular (200,327,333). Además, el género *Streptomyces* ha sido reportado como productoras de estas hormonas (auxina-AIA) por Manulis et al. (1994) y Matsukawa et al. (2007) (334,335). Shutsrirung et al. (2013) realizaron experimentos con *Citrus reticulata* (mandarina) inoculados con estas bacterias del género *Streptomyces*, obteniendo un mejoramiento en el desarrollo de la planta, el cual fue atribuido por estos potenciales sustancias reguladoras, los mismo resultados obtuvieron Harikrishnan et al. (2014) pero en *Oryza sativa* (arroz), mientras que Shrivastava et al (2008) lo obtuvieron pero con el género *Kitasatospora*. (336,337,338).

En el caso de la solubilización de fosfato, los actinomicetos demuestran habilidades para transformar las formas insolubles del fósforo que se encuentra en forma orgánica u inorgánica a formas solubles a través de dos vías: por la acción de ácidos orgánicos generados por ellos que actúan como agentes quelantes y por la vía

enzimática a través de las fosfatasa producidas por estas bacterias (30,339). El fósforo es un constituyente de los ácidos nucleicos y por ende participa en los procesos de reproducción y la constitución genética vegetal, también interviene en las reacciones bioquímicas que tienen que ver con el metabolismo de las proteínas, carbohidratos y grasas interviniendo como donante y aceptor de energía en determinadas reacciones. Los actinomicetos tienen la capacidad de solubilizar la roca fosfórica demostrados en estudios de El-Tarabily et al. (2006) y Fankem et al. (2006) (158,341). Hamdali et al. (2008) reportaron la solubilización de fosfato por los géneros de *Streptomyces* y *Micromonospora*, y Anwar et al (2016) lo hicieron para 6 cepas de *Streptomyces* en *Triticum aestivum* (trigo) (210,341).

Respecto a la fijación de nitrógeno, los actinomicetos son microorganismos importantes en la fijación de nitrógeno atmosférico para las plantas. Este proceso es básicamente enzimático que consiste en transformar el nitrógeno del aire en amoníaco y amonio mediante la enzima nitrogenasa, las cuales son integradas posteriormente a las proteínas y ácido nucleicos de las plantas (342). Algunos actinomicetos de la familia de Micromonosporaceae y Thermomonosporaceae y de los géneros *Streptomyces* y *Frankia* han sido descritos como fijadoras de nitrógeno por Valdés et al. (2005), Franco (2008) y Prakash et al (1988). (45,23,342). Además, en estudios de Anwar et al (2016) y Gauthier et al (1981) también se reportaron los mismos resultados con respecto a varias especies de *Streptomyces* (341,343).

De modo general, en este estudio, de acuerdo a las variables analizadas, se ha notado que el número de semillas germinadas y cantidad de hojas no han sido afectadas por las concentraciones trabajadas a 10, 50, 100 y 200 ppm de cobre, hierro, zinc y cadmio en *Lactuca sativa* (lechuga) y *Medicago sativa* (alfalfa), en cambio la longitud de las raíces se ha visto perjudicada a partir de 10 ppm de todos los metales mostrando diferencias significativas con el control-blanco; a medida que aumentaba la concentración de los metales utilizados, disminuyó el crecimiento de la raíz, llegando a un desarrollo mínimo a 200 ppm. Para Wang (1991) y Lewis (1995), el crecimiento radical es el indicador más importante del desarrollo porque es el órgano que presenta mayor sensibilidad a condiciones tóxicas en comparación a la germinación, la cual es muy variable (344,345). Resulta así que la evaluación radicular representa un indicador relevante que complementa información a la prueba tradicional de la germinación (346).

Sin embargo, a bajas concentraciones (10 ppm) se dedujo que los metales pesados promueven ligeramente el desarrollo de la raíz. Es el caso del zinc que en un cultivo hidropónico a 3mM tuvo un ligero efecto positivo en la planta de *Cyperus elegans* contrastada con la muestra control (347), es el mismo caso del cadmio que ha sido mencionado por Tang et al. (2009) (348). Este evento es parte de un concepto conocido como hormesis, término normalmente empleado en el campo de la toxicología que hace referencia a los efectos estimulantes de los agentes tóxicos cuando están presentes en niveles bajos de concentración (349, 350). Este fenómeno no está del todo aclarado.

En general se deduce que los metales pesados ejercen un efecto tóxico en el desarrollo radicular, esto puede deberse, entre muchas razones, a la alteración de la actividad de las proteínas, desplazamiento de elementos esenciales en su metabolismo estándar y producción de estrés oxidativo hasta causar su muerte (5).

Para el caso de *Lactuca sativa* (lechuga) y *Medicago sativa* (alfalfa), el cadmio y cobre resultaron teniendo el efecto más nocivo a todas las concentraciones, resultados que concuerdan con Alonso et al. (2015)(297). El cadmio es absorbido y distribuido rápidamente a través del sistema vascular, ocasionando en forma general una depresión del crecimiento e incluso la muerte de la planta (351). Este metal, aun en concentraciones muy pequeñas, produce efectos tóxicos en las plantas por su alta movilidad, de los cuales existen numerosos estudios (351,352). El cadmio también provoca alteraciones en los procesos fotosintéticos, respiración y en el metabolismo del nitrógeno, inhibe la acción de la enzima nitrato reductasa en tallos (353), ocasiona desequilibrios nutricionales e hídricos en la planta interfiriendo con el ingreso, transporte y uso de elementos como K, Ca, P y Mg, (182,351) y daño oxidativo (354). El cadmio tiene referencias de sus efectos oxidativos a proteínas por generar grupos carbonilo, también afecta la capacidad antioxidantes de las enzimas (355). Se han reportado estudios donde se ha evaluado la toxicidad del cadmio, incluso en bajas concentraciones, en semillas de *Lens culinaris* (lentejas) (354), *Glycine max* (soya) (356), *Oryza sativa* (arroz) (114) y *Vicia faba* (haba) (115). Los resultados del presente trabajo concuerdan con los descritos anteriormente.

Con respecto al cobre, sus efectos nocivos se manifiestan en gran medida en el crecimiento de las raíces y su morfología, ya que el cobre tiende a acumularse en el tejido de la raíz pero es poco translocado a los brotes (357). Este elemento es tóxico para la raíz en general por su efecto en su elongación, en su organización y en su división celular en el ápice (360); también, es conocido por catalizador en la producción de radicales libres de oxígeno provocando el estrés oxidativo (361) e induce cambios en la actividad y el contenido de algunos componentes de las vías de antioxidantes (362). Esta toxicidad además provoca interferencia con los procesos celulares de la respiración y la fotosíntesis (360), reducción de la biomasa y alteración las estructuras del cloroplasto y composición de la membrana tilacoide (117), y puede competir con la absorción de hierro y, en ocasiones, de molibdeno o zinc. Los resultados obtenidos fueron similares con los estudiados en los cultivos de *Coffea* (café) (116), *Spinacia oleracea* (espinaca) (117), *Origanum vulgare* (orégano) (118), *Lactuca sativa* (lechuga) (119). Existen muchos estudios al respecto referentes al efecto provocado por este metal en *Triticum* (trigo) (120) y *Brassica pekinensis* (col china) (122), *Phyllostachys pubescens* (bambo moso) (363), *Pisum sativum* (guisante) (364).

Por otro lado, los metales menos nocivos para los dos tipos de plantas materia del presente estudio son el hierro y el zinc, resultados que concuerdan con Alonso et al. (2015) (297). Para el caso del hierro, en suelos con altas concentraciones de este metal provoca una elevada absorción del mismo porque incrementa la permeabilidad radicular y el aumento de Fe^{+3} a Fe^{+2} en la rizósfera por acción microbiana, hechos que afectan negativamente a la planta. La presencia de altas concentraciones de Fe en el

citoplasma celular produce efectos tóxicos (365) como el incremento de la actividad de la polifenol oxidasa, la que ocasiona el bronceamiento de las hojas por la aparición de fenoles oxidados. Además, el sistema radicular se ve afectado por su escaso crecimiento y, a la vez, están recubiertas superficialmente por una capa de color pardo oscuro, el cual limita la captación de nutrientes y agua (366). Esta toxicidad también se debe a la producción de radicales de oxígeno, que son fitotóxicos, causantes de la degradación de las proteínas y la peroxidación lipídica de la membrana celular (366). Todo esto ha sido manifestado en cultivos de *Oryza sativa* (arroz) por Dobermann et al, 2000 (366).

En el caso de zinc, su acción nociva es por la alteración de la permeabilidad de la membrana celular, la inhibición del paso de los carbohidratos en el floema y la limitación de la fijación del CO₂ (367). Haslett et al. (2001) reportaron que el Zn presenta alta movilidad en el floema, demostrado por la acumulación de este metal encontrado en las regiones meristemáticas a nivel foliar y radicular cuando el Zn, en forma de ZnSO₄, fue aplicado a la planta de *Triticum aestivum* (trigo) en sus hojas y raíces, habiendo afectado también el crecimiento del retoño (368). Asimismo, ha sido demostrado que el Zn altera el flujo de agua en las membranas por la interferencia de los movimientos estomáticos (369). En el estudio de Wallnöfer et al. (1995), se mencionó que la alta concentración de Zn reduce la producción de giberelinas y triptofano, siendo este último el precursor de AIA y agente activo de la división celular, todo lo cual justifica la reducción en el crecimiento vegetal (370). Zinc afecta a muchas enzimas y proteínas, la producción de hormonas de crecimiento y el alargamiento de

entrenados (113). Igualmente este metal compite con el fósforo, el hierro, el manganeso o el cobre para ser absorbido por la planta y provoca deficiencias de ellos en el tejido (113). Otras referencias relacionadas con los efectos tóxicos del Zn en *Solanum lycopersicum* (tomate) (121,124), *Solanum nigrum* (hierba mora) (121), *Phaseolus vulgaris* (frijol) (371), *Typha latifolia* (lirios salvajes) (372), *Eruca sativa* (rúcula) (373) y *Beta vulgaris* (betarraga) (123).

En este estudio se han realizado 612 pruebas con semillas, de las cuales 480 han sido dedicados a la prueba de biofertilización en presencia de metales y de cepas del género *Streptomyces* para semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) y *Medicago sativa* (alfalfa). Dell' Amico et al., 2008 mencionaron que para poder evaluar y analizar el efecto que generan las PGPR en el crecimiento y desarrollo de las plantas, expuestas a metales pesados, se emplea un tipo de medición conocida como PREP (Plant Root Elongation Promotion), el cual mide el tamaño radicular de las plantas. Esto se basa en el análisis de la promoción de crecimiento radicular como marcador del sinergismo entre las plantas y las rizobacterias (187).

La inoculación con cepas del género *Streptomyces* promovió el crecimiento de *Lactuca sativa* (lechuga) y *Medicago sativa* (alfalfa) ante la exposición a todas las concentraciones de cobre, hierro, zinc y cadmio. Además, se observó que con el cobre y cadmio el beneficio de las cepas es a partir de 10 ppm, mientras que con el hierro y el zinc fue a partir de 50 ppm.

Los actinomicetos promueven el desarrollo vegetal en tres formas: 1) por fertilización directa, 2) por inhibición del efecto perjudicial del metal y 3) por la acción contrarrestante de la enzima ACC desaminasa. En el caso de fertilización directa, los actinomicetos, catalogadas como PGPR, cumplen diversas actividades biofísicoquímicas beneficiosas para las plantas que ya han sido descritas en detalle anteriormente, los cuales son la producción de sideróforos, la producción de fitohormonas como el AIA, la producción de metabolitos antifúngicos, producción de enzimas extracelulares, la fijación de nitrógeno y la solubilización de fosfato. Por otro lado, la inhibición del efecto perjudicial del metal, sucede por la acción de estas bacterias de adherir iones metálicos en su pared celular, acumular metales intracelularmente por medio de un sistema de transporte, la producción de agentes quelantes, y la biotransformación. Por último, actinomiceto produce la enzima ACC desaminasa, que contrarresta las concentraciones de etileno, el que es una manifestación de la planta en respuesta a la presencia de metales pesados que conlleva la reducción del crecimiento de la raíz hasta causar a su muerte. Esta enzima actúa desaminando ACC, el cual es el precursor del etileno, y lo convierte en 2-oxobutanoato y NH_3 , incrementando la disponibilidad de este último en las rizósfera (197,150).

Estos resultados referidos al beneficio de los actinomicetos para las plantas frente a un factor de estrés que son los metales pesados han sido también reportados por otros autores como El Sayed et al. (2015) indicando que la inoculación con *Streptomyces sp.* HM1 mejora el crecimiento de *Zea mays* en presencia de cadmio y disminuye la acumulación del mismo en la planta (213). Por otro lado, con referencia

al cobre, Andrades-Moreno et al. (2014) trabajaron con *Sparina densiflora* observando su buen crecimiento con estas bacterias (211). Valencia et al. (2007) demostraron que *Arthrobacter sp.* UMCV permitió el crecimiento de *Phaseolus vulgaris* por la acción de sideróforos que son capaces de actuar como agente quelante frente al Fe^{+3} de poca solubilidad y convirtiéndolo a Fe^{+2} soluble (374). He et al. (2010) y Khan et al. (2015) mencionan los mismos resultados con *Micrococcus sp.*, *Arthrobacter sp.* y *Microbacterium sp.* inoculadas en las plantas *Brassica napus* y *Rye grass* en presencia de zinc, cobre y cadmio, a través de la acción de la enzima ACC desaminasa, AIA, sideroforos y la solubilización de fosfatos (375,212,214).

A partir de los resultados obtenidos se determinó la capacidad biofertilizante que ejercen los actinomicetos en las plantas cuando se encuentran frente a factores adversos (presencia de metales pesados) ejerciendo un efecto protector a la planta por la disminución de la toxicidad de estos metales, permitiendo mejorar la fertilidad de los suelos y el rendimiento en la germinación y crecimiento vegetal. Este estudio resulta siendo así un aporte en el tema remediación de suelos contaminados y propiciar el desarrollo de especies vegetales.

VIII. CONCLUSIONES

- Se han logrado identificar las características morfológicas de las 24 cepas de actinomicetos basadas en su color, textura, pigmentación y estructuras microscópicas, presentando una gran variedad que concuerdan con los patrones de la microbiología general, indicando que las cepas presentaron una similitud con el género *Streptomyces*.
- Se han logrado determinar las propiedades bioquímicas de las 24 cepas de actinomicetos, luego de realizar diversos experimentos, logrando complementar los resultados de las características morfológicas.
- A través de la técnica molecular, se ha podido identificar claramente que de las 24 cepas de actinomicetos, 23 corresponden al género *Streptomyces* y 1 al género *Actinomadura*.
- Las 23 cepas del género *Streptomyces* y 1 de *Actinomadura* probadas por exposición ante los metales pesados cobre, hierro, zinc, cadmio, plomo y mercurio en concentraciones de 10, 50, 100 y 200 ppm han manifestado una tolerancia a estos metales en diversos niveles siendo mayor a menor concentración de los metales. La tolerancia se ha evidenciado a través de la medición del crecimiento bacteriano.

- Las semillas *Lactuca sativa* (lechuga) y *Medicago sativa* (alfalfa) sometidas por inmersión solamente con agua destilada han manifestado un desarrollo general óptimo (germinación y desarrollo de raíz y hojas) a un nivel de 100%, lo que ha permitido mantener esta técnica como adecuada y de comparación para todas las pruebas en todo el proceso del presente trabajo.
- Las semillas de *Medicago sativa* (alfalfa) y *Lactuca sativa* (lechuga) sometidas por inmersión solamente con cultivo bacteriano de las 5 cepas del género *Streptomyces* han manifestado una germinación y un desarrollo de hojas del 100%, mientras que el desarrollo de raíz para *Medicago sativa* (alfalfa) fue a un nivel de 80%, en cambio las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) fue de 77.2%, ligeramente menor, lo que permite deducir que estas bacterias no son nocivas.
- Las semillas de *Medicago sativa* (alfalfa) y *Lactuca sativa* (lechuga) sometidas por inmersión solamente con los metales pesados cobre, hierro, zinc y cadmio en concentraciones de 10, 50, 100 y 200 ppm han manifestado una germinación y desarrollo de hojas de 100 %, mientras que el desarrollo de raíz para *Medicago sativa* (alfalfa) fue notoriamente menor a un nivel de 66.2%, 20%, 16.6% y 6.8%, respectivamente; en cambio, las semillas de *Lactuca sativa*

(lechuga) fueron de 56.5%, 16.2%, 5.1% y 2.8%, respectivamente, lo que permite deducir que los metales pesados son notoriamente nocivos.

- Las semillas de *Medicago sativa* (alfalfa) y *Lactuca sativa* (lechuga) sometidas por inmersión con los metales pesados cobre, hierro, zinc y cadmio en concentraciones de 10, 50, 100 y 200 ppm y con las 5 cepas del género *Streptomyces* han manifestado una germinación y desarrollo de hojas de 100 %, mientras que el desarrollo de raíz para *Medicago sativa* (alfalfa) fue notoriamente mayor a la obtenida solamente con metales pesados a un nivel de 77%, 64%, 55.5% y 46%, respectivamente; en cambio las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) fueron de 71.5%, 54.6%, 47.1% y 39.5%, respectivamente, lo que permite deducir que estas bacterias han demostrado tener la capacidad biofertilizante en ambas semillas contrarrestando los efectos nocivos de los metales pesados, ya anteriormente confirmados, y por lo tanto pudiendo permitir la restauración del suelo contaminado con metales pesados.

IX. RECOMENDACIONES

- Profundizar el estudio de los mecanismos de resistencias de estas bacterias a metales pesados y otros factores adversos.
- Determinar los compuestos orgánicos presentes en el sistema empleado y su participación como un biosorbente.
- Realizar estudios para identificar con precisión las funciones propias de cada género de los actinomicetos con el objeto de plantear y establecer su mejor utilidad en la biotecnología.
- Estudiar detalladamente los mecanismos de acción directos e indirectos, que promueven el crecimiento vegetal, con las cepas de estudio.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Demirevska K, Simova L, Stoyanova Z, Holzer R, Feller U. Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese. *Environ Exp Bot.* 2004; 52:253–266.
2. Vaillant N, Monnet F, Hitmi A, Sallanon H, Coudret A. Comparative study of responses in four *Datura* species to a zinc stress. *Chemosphere.* 2005; 59(7): 1005–1013.
3. Patra M, Bhowmik N, Bandopadhyay B, Sharma A. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environ Exp Bot.* 2004; 52(3): 199-223.
4. Dong J, Wu F, Zhang G. Influence of cadmium on antioxidant capacity and four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*). *Chemosphere.* 2006; 64:1659–1666.
5. Navarro J, Aguilar I, López J. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas.* 2007; 16(2): 10-25.

6. Azpilicueta C, Pena L, Gallego S. Los metales y las plantas: entre la nutrición y la toxicidad. *Rev Cien Hoy*. 2010; 20 (1): 16.
7. Mejía C. Metales pesados en suelos y plantas: Contaminación y fitotoxicidad. Lima: Oficina central de investigación, Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión; 2011.
8. Olalde V, Aguilera L. Microorganismos y Biodiversidad. *Terra*. 1998; 16 (3): 289-292.
9. Kloepper J, Lifshitz R, Zablotowicz R. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol*. 1989; 7(2): 39-44.
10. Frankenberger WT, Arshad M. *Phytohormones in soil: microbial production and function*. NY (NY): Marcel Dekker; 1995.
11. Arshad M, Frankenberger WT Jr. Plant growth regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. *Adv Agron*. 1997; 62: 145-151.
12. Ahmad F, Ahmad I, Khan MS. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol Res*. 2008; 163(2): 173-181.

13. Essaid A, Belarbi A, Hachet C, Nowak J, Audran. J. Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth –promoting rhizobacteria. FEMS Microb. Lett. 2000; 71 (4): 92 – 95.
14. Neilands JB. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. J Biol Chem. 1995; 270(45): 26723-26726.
15. Sánchez L. Metabolito bacteriano a partir de *Burkholderia cepacia* como agente biocontrolador en cultivos de interés agrícola. Cuba: CENSA; 2006.
16. Beveridge TJ, Murray RG. Uptake and retention of metals by cell walls of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol. 1976; 127(3): 1502–1518.
17. Doyle RJ, Matthews TH, Streips UN. Chemical basis for selectivity of metal ions by the *Bacillus subtilis* cell wall. J. Bacteriol. 1980; 143(1): 471–480.
18. Raff J, Soltmann U, Matys S, Selenska-Pobell S, Bottcher H, Pompe W. Biosorption of uranium and copper by biocers. Chem Mater. 2003; 15(1): 240–244.
19. Glick BR, Penrose DM, Li J. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. J Theor Bio. 1998; 190(1): 63-68.

20. Reis VM, Baldani JI, Baldani VLD, Dobereiner J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. *Crit Rev Plant Soil*. 2000; 19(3): 227-247.
21. Garrido MF, Cárdenas DM, Bonilla R, Baldani VL. Efecto de los factores edafoclimaticos y la especie de pasto en la diversidad de bacterias diazotroficas. *Pastos y Forrajes*. 2010; 33(4):1-12.
22. Cárdenas DM, Garrido MF, Bonilla R, Baldani VL. Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp. en pasto Guinea (*Panicum maximum* Jacq.) del Valle del Cesar. *Pastos y Forrajes*. 2010; 33(4).
23. Franco M. Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas [tesis doctoral]. Granada (AND): Granada Univ.; 2008.
24. Franco M. Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilizacion. *Rev Peru Biol*. 2009; 16 (2): 239-242.
25. Asociación Tecnología y Desarrollo (TECNIDES). Estudio sobre cultivos in vitro de tara (*Caesalpinia spinosa*). Lima (Perú): Documento emitido por la FAO; 1994: 47.

26. Serrano J, Sandoval A. Identificación y Diagnóstico de Actinomicetales Patógenos. 1 ed. Mérida: Venezonala C.A; 2005.
27. Madigan MT, Martinko JM, Parker JV, Clark DP. Brock: Biology of the microorganisms. 12 ed. New Jersey: Prentice-Hall International; 2009.
28. Koneman E. Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas a Color. 5 ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2001.
29. Prescott L. Microbiology. 5 ed. Boston: McGraw Hill Boston; 2002. p. 524-528.
30. Sylvia D, Furthmann J, Hartel P, Zuberer D. Principles and Applications of Soil Microbiology. 2 ed. New Jersey: Peason Prentice Hall; 2005
31. Salazar A, Ordoñez C. Aislamiento e identificación de Actinomicetos fijadores de nitrógeno en suelo del jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira [tesis de licenciatura]. Pereira (RIS): Tecnológica de Pereira Univ.; 2013.
32. Rigali S, Titgemeyer F, Barends S, Mulder S, Thomae AW, Hopwood DA, et al. Feast or Famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO Rep.* 2008; 9(7): 670-675.

33. Johnson BD, Bacelar-Nicolau, P, Okibe N, Thomas A, Hallberg KB. *Ferrimicrobium acidiphilum* gen. nov., sp. Nov and *Ferrithrix thermotolerans* gen. nov., sp. nov.: heterotrophic, iron-oxidizing, extremely acidophilic actinobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2009; 59(5): 1082-1089.
34. Matsubara A, Hurtado JE. Isolation and characterization of actinomycetes from acidic cultures of ores and concentrates. *Adv Mater Res.* 2013; 825:406-409.
35. Bergey J, Hendricks D, Holt J. *Bergeys Manual of Determinative Bacteriology.* 9 ed. Philadelphia: Lippincott. Williams & Wilkins; 2000.
36. Ben N, Larbi M, Arias JM, Gonzales MT. Comparative heavy metal biosorption study of Brewery yeast and *Myxococcus xanthus* biomass. *Chemosphere.* 1997; 35 (10): 2277-2283.
37. Mikami Y, Yazawa K. Susceptibility patterns of pathogenic *Nocardia* to some selected antimicrobial agents and their usefulness in the identification work in a clinical laboratory. *Bull JFCC.* 1989; 5: 89–95.
38. *Microbiología de Actinomicetos.* Washington (DC): Microbe Beta World; 2012.

39. Leiva S, Yañez M, Zaror L, Rodríguez H, García-Quintasna H. Actividad antimicrobiana de Actinomycetales aislados desde ambientes acuáticos de sur de Chile. *Rev Med Chile*. 2004; 132(2): 151-159.
40. Fernández C. Vida microbiana en el suelo. 2 ed. Habana: Pueblo y Educación; 1998. p. 306-331.
41. Martin A. Introducción a la microbiología del suelo. 2 ed. México: AGT; 1981.
42. Tate R. *Soil Microbiology*. 2 ed. New York: Wiley; 2000. p. 47-56.
43. Bowden G. Actinomycosis in: *Baron's Medical Microbiology*. 4 ed. Texas: Univ of Texas Medical Branch; 1996.
44. Holt J. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9 ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1994.
45. Valdés M, Pérez NO, Estrada-de Los Santos P, Caballero-Mellado J, Peña-Cabriales JJ, Normand P, et al. Non-Frankia Actinomycetes Isolated from Surface-Sterilized Roots of *Casuarina equisetifolia* Fix Nitrogen. *Appl Environ Microbiol*. 2005; 71(1): 460-466.
46. Prescott L, Harley J, Klein D. *Microbiología*. 5 ed. España: McGraw Hill Interamericana; 2004.

47. Goodfellow M, Cross T. The biology of the Actinomycetes Classification.
In: Goodfellow M, Mordarski M, Williams ST, editors. Bergey's Manual of systematic Bacteriology. London: Academic Press Inc; 1984. p. 7-164.
48. Mcneil MM, Brown JM. The medically important aerobic Actinomycetes: Epidemiology and Microbiology. Clin Microbiol Rev. 1994; 7(3): 357-417.
49. Wellington E, Williams S. Host ranges of phages isolated to *Streptomyces* and other genera. Zentel Bacteriol Hygene. 1981; 11: 93-98.
50. Anderson AS, Wellington EM. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. Int J Syst Evol Microbiol. 2001; 51(3): 797-814.
51. Rodicio MR, Mendoza MC. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARN 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2004; 22(4): 238-245.
52. Garrett R, Grisham C. Biochemistry. In: Nucleotides and Nucleic Acids, Different classes. California: Books/Cole; 2009.
53. Herrera J. Filogenia bacteriana mediante el análisis del rRNA 16S. Universidad Nacional Autónoma de México; 2003.
54. Madigan M, Martinko J, Parker J. Brock. Biología de los microorganismos. 8 ed. Barcelona: Prentice May; 1998.

55. Rosado AS, Duarte GF, Seldin L, Elsas JD. Molecular Microbial Ecology: a Minireview. *Rev Microbiol.* 1997; 28(3): 135-147.
56. Penny S, Haldeman D. Phylogenetic Analysis and Implications for subsurface microbiology. In: Penny S, Haldeman D, editors. *The Microbiology of the terrestrial deep subsurface.* 1 ed. Boca Raton: CRC Press; 1997.
57. Kitasano University. Discover Life – Bacteria: Actinobacteria – Actinomycetes. on line]. 2007 Enero.
<http://www.discoverlife.org/mp/20o?search=Actinobacteria>
58. Stackebrandt E, Rainey FA, Ward-Rained NL. Proposal for a New Hierarchic Classification System, Actinobacteria classis nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1997; 47(2): 479-491.
59. Quiñones EE, Evangelista Z, Rincón G. Los actinomicetos y su aplicación biotecnológica. *Elementos.* 2016; 101: 59-64.
60. Trujillo ME, Alonso-Vega P, Rodríguez R, Carro L, Cerda E, Alonso P, et al. The genus *Micromonospora* is widespread in legume root nodules: the example of *Lupinus angustifolius*. *ISME J.* 2010; 4(10): 1265-1281.

61. Passow H, Rothstein A, Clarkson TW. The general pharmacology of heavy metals. *Pharmacol Rev.* 1961; 13:185-224.
62. Duffus JH. "Heavy metals" a meaningless term (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem.* 2002; 74(5): 793-807.
63. Bosecker K. Microbial leaching in environmental clean-up programmers. *Hydrometallurgy.* 2001; 59(2): 245–248.
64. Jong T, Parry DL. Removal of sulphate and heavy metal by sulphate reducing bacteria in short-term bench scale upflow anaerobic packed bed reactor runs. *Water Res.* 2003; 37(14): 3379-3389.
65. Moosa S, Nemati M, Harrison STL. A kinetic study on anaerobic reduction of sulphate, part I: Effects of sulphate concentration. *Chem Eng Sci.* 2002; 57(14): 2773-2780.
66. Iwamoto T, Nasu M. Current bioremediation practice and perspective. *J Biosci Bioeng.* 2001; 92(1): 1-8.
67. Abollino O, Aceto M, Malandrino M, Mentasti E, Sarzanini C, Barberis R. Distribution and mobility of metals in contaminated sites. chemometric investigation of pollutant profiles. *Environ Pollut.* 2002; 119(2):177-193.

68. Hogan CM. Heavy metal. Encyclopedia of Earth. National Council for Science and the Environment. 1 ed. Washington D.C (WA): E. Monosson & C. Cleveland; 2010.
69. Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ. Heavy Metals Toxicity and the Environment. *EXS*. 2012; 101:133-164.
70. Tsukamoto TK, Killion HA, Miller GC. Column experiments for microbiological treatment of acid mine drainage: low-temperature, low-pH and matrix investigations. *Water Res*. 2004; 38(6): 1405-1418.
71. Veglio F, Beolchini F. Removal of metals by biosorption: a review. *Hydrometallurgy*. 1997; 44(3): 301-316.
72. Hutton M, Symon C. The Quantities of Cadmium, Lead, Mercury and Arsenic Entering the U.K. Environment from Human Activities. *Sci Total Environ*. 1986; 57: 129-150.
73. Battarbee R, Anderson N, Appleby P, Flower R, Fritz S, Haworth E, et al. Lake Acidification in the United Kingdom 1800-1986. Illustrated ed. London: ENSIS Publishing; 1988.
74. Nriagu JO. A global Assessment of Natural Sources of Atmospheric Trace Metals. *Nature*. 1989; 338: 47-49.

75. Hincapié U. Diagnóstico para la implementación de sistemas de gestión ambiental en el distrito minero Segovia - Remedios. Medellín: Gobernación de Antioquia; 2006.
76. Habashi F. Environmental Issues in the Metallurgical Industry: Progress and Problems. In: Singhal RK, Mehrotra AK, Fytas K, Collins J, editors. Environmental Issues and Waste Management in Energy and Mineral Production. 2 ed. Alberta: Balkema, Rotherdam; 1992. p. 1143 -1153.
77. Garbarino J, Hayes H, Roth D, Antweider R, Brinton T, Taylor H. Contaminants in the Mississippi River. USA: Geological; 1995.
78. Peplow D. Environmental Impacts of Mining in Eastern Washington. Rev. Mex Cienc Agríc. 1999; 6(7).
79. Ramos C, Estévez S, Giraldo E. Nivel de contaminación por metilmercurio en la región de la Mojana. Bogotá: Departamento de Ingeniería Civil y Ambiente, Centro de Investigación en Ingeniería Ambiental (CIIA); 2000.
80. Davis G, Mertz W. Copper. In: Mertz W, editor. Trace Elements in Human and Animal Nutrition. 5 ed. New York: Academic Press; 1986. p. 301-364.
81. Wright John. Environmental Chemistry. 1 ed. New York: Psychology Press; 2003.

82. Britton RS, Leicester KL, Bacon BR. Iron toxicity and chelation therapy. *Int J Hematol.* 2002; 76(3): 219-228.
83. Greenwood NN, Earnshaw A. *Chemistry of the Elements*. 2 ed. New York: Butterworth-Heinemann; 1997.
84. Lenntech. *Water Treatment and Air Purification*. Netherlands: Lenntech; 2004.
85. Shetty A. Metal anion removal from wastewater using Chitosan in a polymer enhanced diafiltration system [master thesis]. New England: Worcester Polytechnic Inst.; 2006.
86. Sparks DL. Toxic metals in the environment: the role of surfaces. *Elements*. 2005; 1(4): 193-197. 2005.
87. Duruibe JO, Ogwuegbu MOC, Egwurugwu JN. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *Int J Phys Sci.* 2007; 2(5):112-118.
88. Dunagan SC, Gilmore MS, Varekamp JC. Effects of mercury on visible/near-infrared reflectance spectra of mustard spinach plants (*Brassica rapa* P.). *Environ Pollut.* 2007; 148 (1): 301-311.

89. Zhang L, Wong MH. Environmental mercury contamination in China: sources and impacts. *Environ Int.* 2007; 33(1): 108-121.
90. Jaja ET, Odoemena CSI. Effect of Pb, Cu and Fe compounds on the germination and early seedling growth of tomato varieties. *J Appl Sci Environ Manag.* 2004; 8(2): 51–53.
91. Bux F, Swalaha F, Kasan H. Microbiological Transformation of Metal Contaminated Effluents. South Africa: Water Research Commission; 1994. p. 357-394.
92. Martin CW. Heavy Metals Trends in Floodplain Sediments and Valley Fill. *Catena.* 2000; 39(1): 53-68.
93. Pineda HR. Presencia de Hongos Micorrízicos Arbusculares y Contribución de Glomus Intraradices en la Absorción y Translocación de Cinc y Cobre en Girasol (*Helianthus Annuus* L.) Crecido en un Suelo Contaminado con Residuos de Mina [tesis doctoral]. Tecoman (COL): Colima Univ.; 2004.
94. Wang YP, Chao CC. Effects of Vesicular- Arbuscular Mycorrhizae and Heavy Metals on the Growth of Soybean and Phosphate and Heavy Metal Uptake by Soybean in Major Soil Groups of Taiwan. *J Agric Assoc China.* 1992; 157: 6-20.

95. Baur M. Pollution, Environmental. In: Meyers RA, editor. Encyclopedia of Physical Science and Technology. 3 ed. Los Angeles: Academic Press; 2004.
96. Calvo De Anta R. Manejo de suelos en cultivos de Eucalyptus. Un ejemplo de estudio de la influencia de la vegetación sobre las propiedades del suelo. En: Aguilar J, Martínez RA, Roca A, editores. Evaluación y manejo de suelos. Granada. 1996. p. 181-193.
97. Gupta VK, Singh P, Rahman N. Adsorption behavior of Hg (II), Pb (II), and Cd (II) from aqueous solution on Duolite C-433: a synthetic resin. J Colloid Interface Sci. 2004; 275 (2): 398-402.
98. Han FX, Banin A, Kingery WL, Triplett GB, Zhou LX, Zheng SJ, et al. New Approach to Studies of Heavy Metal Redistribution in Soil. Adv Environ Res. 2003; 8(1): 113-120.
99. Mahler R. General overview of nutrition for field and container crops. In: Riley LE, Dumroese RK, Landis TD. Tech Coords. National Proceeding: Forest and Conservation Nursery Associations. Illinois: RMRS-P-33; 2003.
100. Lasar M. The use of plants for the removal of toxic metals from contaminated soil. American Association for the Advancement of Science, Environmental Science and Engineering Fellow; 2000.

101. Prieto J, Gonzales C, Román A, Prieto F. Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelo y agua. *Trop Subt Agro*. 2009; 10(1): 29-44. 1
102. Angelova V, Ivanova R, Delibaltova V, Ivanov K. Bioaccumulation and distribution of heavy metals in fibre crops (flax, cotton and hemp). *Ind Crop Prod*. 2004; 19(3): 197-205.
103. John D, Leventhal J. Bioavailability of metals. In: Du B, editor. Preliminary compilation of descriptive geoenvironmental mineral deposit models. Denver: USGS; 1995.
104. Hernández JP, de-Bashan LE, Rodríguez DJ, Rodríguez Y, Bashan Y. Growth promotion of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by the nitrogen-fixing, plant growth-promoting bacterium *Bacillus pumilus* from arid zone soils. *Eur J Soil Biol*. 2009; 45(1): 88-93.
105. López N, Vitoria V, Rico O, Fernández-Portal J, Somoza J, Gil M, et al. *Biología y Geología Nº1 Bachillerato*. 1 ed. Madrid: Editex; 2008.
106. Barceló J, Llugany M, Lombini A, Poschenrieder C. Glycine may contribute to the protection of *Silene armeria* against excess copper. In: C.J. Li, editor. *Plant nutrition for food security, human health and environmental protection*. Beijing: Tsinghua University Press; 2005. p. 634-635.

107. MacFarlane GR, Burchett MD. Cellular distribution of copper, lead and zinc in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Aquat Bot.* 2000; 68(1): 45-59.
108. Lux A, Sottníková A, Opatrná J, Greger M. Differences in structure of adventitious roots in *Salix* clones with contrasting characteristics of cadmium accumulation and sensitivity. *Physiol Plant.* 2004; 120(4): 537-545.
109. Alassimone J, Naseer S, Geldner N. A developmental framework for endodermal differentiation and polarity. *PNAS.* 2010; 107 (11): 5214-5219.
110. Kabata A. Trace elements in soils and plants. 3 ed. Boca Raton: CRC Press; 2000.
111. Dietz K, Baier M, Krämer U. Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. In: Prasad MNV, Hagemeyer J, editors. Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems. Berlin: Springer-Verlag; 1999. p. 73–97.
112. Van Assche F, Clijsters H. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ.* 1990; 13(3): 195-206.
113. Rout GR, Das P. Effect of metal toxicity on Plant Growth and Metabolism: I.Zinc. *Agronomic.* 2003; 23:3-11.

114. Muramoto S, Aoyama I. Effects of fertilizers on the Vicissitude of cadmium in rice plants. *J Environ Sci Health*. 1990; 25(6): 629-636.
115. Ünyayar S, Güzel A, Çelik A, Çekiç F, Çevik S. Cadmium-Induced Antioxidant Status and Sisterchromatid Exchanges in *Vicia faba* L. *Turk J Biol*. 2010; 34(4): 413-422.
116. Granados L, Bornemisza E. Efectos de la concentraciones de cobre en el suelo sobre los contenidos de nutrimentos en plantas de almacigo de café cv. Catuai Rojo. *Agron Costarricense*. 1990; 15(1/2): 5-56.
117. Baszyński T, Tukendorf A, Ruzkowska M, Skórzyńska E, Maksymiec W. Characteristics of the photosynthetic apparatus of copper non-tolerant spinach exposed to excess copper. *J Plant Physiol*. 1988; 132(6): 708-713.
118. Panou-Filotheou H, Bosabalidis AM, Karataglis S. Effects of copper toxicity on leaves of oregano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*). *Ann Bot*. 2001; 88(2): 207-214.
119. Christiansen KS, Borggaard OK, Holm PE, Vijver MG, Hauschild MZ, Peijnenburg WJ. Experimental determinations of soil copper toxicity to lettuce (*Lactuca sativa*) growth in highly different copper spiked and aged soils. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2015; 22(7): 5283-5292.

120. Huang JS, Wei DP, Guo XY, Ma YB. Toxicity and accumulation of copper and nickel in wheat plants cropped on alkaline and acidic field soils. *Huan Jing Ke Xue*. 2012; 33(4):1369-1375.
121. Al Khateeb W, Al-Qwasemeh H. Cadmium, copper and zinc toxicity effects on growth, proline content and genetic stability of *Solanum nigrum* L., a crop wild relative for tomato; comparative study. *Physiol Mol Biol Plants*. 2014; 20(1): 31-39.
122. Xiong ZT, Wang H. Copper toxicity and bioaccumulation in Chinese cabbage (*Brassica pekinensis* Rupr.). *Environ Toxicol*. 2005; 20(2): 188-194.
123. Sagardoy R, Morales F, López-Millán A, Abadía A, Abadía J. Effects of zinc toxicity on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants grown in hydroponics. *Plant Biol*. 2009; 11(3): 339-350.
124. Muschitz A, Faugeron C, Morvan H. Response of cultured tomato cells subjected to excess zinc: role of cell wall in zinc compartmentation. *Acta Physiol Plant*. 2009; 31: 1197–1204.
125. Yruela I. Copper in plants. *Braz J Plant Physiol*. 2005; 17(1):145-156.

126. De Souza ML, Vitti GC, Trevizam AR. Heavy metal toxicity in rice and soybean plants cultivated in contaminated soil. *Rev Ceres*. 2014; 61(2): 248-254.
127. Foy CD, Chaney RL, White MC. The physiology of metal toxicity in plants. *Annu Rev Plant Physiol*. 1978; 29:511–566.
128. Brown JC, Jones WE. Heavy metal toxicity in plants: A crisis in embryo. *Commun Soil Sci Plant Anal*. 1975; 6: 421–438.
129. Street RA, Kulkarni MG, Stirk WA, Southway EC, Van Staden J. Toxicity of Metal Elements on Germination and Seedling Growth of Widely Used Medicinal Plants Belonging to Hyacinthaceae. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2007; 79(4): 371-376.
130. Van Loon LC, Bakker PA, Pieterse CM. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol*. 1998; 36: 453-483.
131. Gamalero E, Trotta A, Massa N, Copetta A, Martinotti MG, Berta G. Impact of two fluorescent pseudomonads and an arbuscular mycorrhizal fungus on tomato plant growth, root architecture and P acquisition. *Mycorrhiza*. 2004; 14(3): 185-192.

132. Persello-Cartieaux F, Nussaume L, Robaglia C. Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant Cell Environ.* 2003; 26(2): 189-199.
133. Kloepper JW, Zablotowicz RM, Tipping EM, Lifshitz R. Plants growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. Kluwer Academic Publishers. 1991; 14: 315-326.
134. Glick B, Karaturovic D, Newell P. A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting pseudomonads. *Can J Microbiol.* 1995; 41(6): 533-536.
135. Probanza A, Lucas JA, Ruiz M, Ramos B, Gutiérrez FJ. *Pinus pinea* L. seedling growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR Bacillus (*B. licheniforme* CECT 5106 and *B. pumilus* CECT 5106). *Appl Soil Ecol.* 2002; 20(2): 75-84.
136. Compant S, Duffy B, Nowak J, Clement C, Ait Barka E. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, Mechanisms of Action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71(9): 4951-4959.

137. Kloepper J. Plant growth promoting rhizobacteria (other system). In: Okon Y, editor. *Azospirillum* Plant Association. Boca Raton: CRC Press; 1994. p. 1994.
138. Fan TWM, Lane AN, Pedler J, Crowley D, Higashi RM. Comprehensive Analysis of Organic Ligands in Whole Root Exudates Using Nuclear Magnetic Resonance and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Anal Biochem.* **1997**; *251(1)*: 57-68.
139. Ponce MA, Scervino JM, Erra-Balsells R, Ocampo JA, Godeas AM. Flavonoids from shoots, roots and roots exudates of *Brassica alba*. *Phytochemistry.* 2004; *65(23)*: 3131-3134.
140. Thompson LK, Hale MG. Effects of kinetin in the rooting medium on root exudation of free fatty acids and sterols from roots of *Arachis hypogaea* L.'argentine'under axenic conditions. *Soil Biol Biosci.* 1983; *15*: 125.
141. Mavrodi OV, Mavrodi D, Park A, Weller D, Thomashow L. The role of *dsbA* in colonization of the wheat rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* Q8r1-96. *Microbiol.* 2006; *152*: 863-872.
142. Landa M, Mavrodi O, Raaijmakers M, Mcspadden B, Thomashow L, Weller D. Differential ability of genotypes of 2,4-diacetylphloroglucinolproducing *Pseudomonas fluorescens* strains to

- colonize the roots of pea plants. *Appl environ microbial*. 2002; 68(7): 3226-3237.
143. Bashan Y, Levanony H. Current status of *Azospirillum* as a challenge for agricultura. *Can. J. Microbiol*. 1990; 36: 591-608.
144. Okon Y, Lavandera CA. Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol Biochem*. 1994; 26(12): 1591-1601.
145. Tang W. Yield-increasing bacteria (YIB) and biocontrol of sheath blight of rice. In: Ryder MH, Stephens PM, Bowen GD, editors. *Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria*. Adalaide: Division of soils CSIRO; 1994. p. 267-273.
146. Barea J, Honrubia M. La microrrizacion dirigida de la planta forestal. En: Vallejo R, Alloza JA, editores. *Avances en el Estudio de la Gestión del Monte Mediterráneo*. Valencia: CEAM; 2004. p. 215-260.
147. Bharathi V, Sudhakar R, Parimala K, Reddy VA. Evaluation of Bioagents and Biofertilizers for the Management of Seed and Seedling Diseases of *Sesamum indicum* (Sesame). *Sci J Plant Pathol*. 2013; 2(3): 179-186.

148. Cattelan AJ, Hartel P, Fuhrmann JJ. Screening for Plant Growth Promoting Rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci Soc Am.* 1999; 63(6): 1670-1680.
149. Bashan Y, Holguin G. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (Plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biol Biochem.* 1998; 30(8): 1225-1228.
150. Esquivel R, Gavilanes M, Cruz R, Huante P. Importancia agrobiotecnologica de la enzima ACC Desaminasa. *Rev Fitotec Mex.* 2013; 36 (3): 251-258.
151. Glick BR. *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications.* Scientifica (Cairo). 2012; 2012: 963401.
152. Kang YJ, Cheng J, Mei LJ, Hu J, Piao Z, Yin SX. Action mechanisms of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): a review. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao.* 2010; 21(1): 232-8.
153. Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud ML, Touraine B, Moëgne-Loccoz Y, Muller D, et al. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front Plant Sci.* 2013; 4: 356.

154. Dobbelaere S, Vanderleyden J, Okon Y. Plant Growth-Promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *CRC Crit Rev Plant Sci.* 2003; 22(2):107-149.
155. Chanway CP. Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: an emerging technology for reforestation. *Forest Sci.* 1997; 43(1): 99-112.
156. Jones DL. Organic acids in the rhizosphere-a critical review. *Plant Soil.* 1998; 205: 25-44.
157. Zhang H, Huang Y, YE X, XU F. Analysis of the contribution of acid phosphatase to P efficiency in *Brassica napus* under low phosphorus conditions. *Sci China Life Sci.* 2010; 53:709-717.
158. El-Tarabily KA, Nassar AH, Sivasithamparam K. Promoting of growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a calcareous soil by a phosphate-solubilizing, rhizosphere-competent isolate of *Micromonospora endolithica*. *Appl Soil Ecol.* 2008; 39(2): 161-171.
159. Rodriguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacterial and their role in plant growth promotion. *Biotecnol Adv.* 1999; 17: 319-339.
160. Peters JW, Szilagyik RK. Exploring new frontiers of nitrogenase structure and mechanism. *Curr Opin Chem Biol.* 2006; 10: 101–108.

161. Boddey RM, Dobereiner J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent progress and perspectives for the future. 1995; 42(1): 241-250.
162. Zahir AZ, Arshad M, Frankenbergt WT. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Applications and Perspectives in Agriculture. *Adv Agron.* 2004; 81: 97-108.
163. Lugtenberg B, Kamilova F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2009; 63: 541-556.
164. Tsavkelova EA, Klimova S, Cherdyntseva TA, Netrusov AI. Microbial Producers of Plant Growth Stimulators and Their Practical Use: A Review. *Prikl Biokhim Mikrobiol.* 2006; 42(2): 133-143.
165. Blakeslee JJ, Peer WA, Murphy AS. MDR/PGP Auxin transport proteins and endocytic cycling. *Plant cell Monogr.* 2005; 1:159-176
166. Artursson V, Finlay RD, Jansson JK. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environ Microbiol.* 2006; 8(1): 1-10.
167. Shah J. Plants under attack: systemic signals in defense. *Curr Opin Plant Biol.* 2009; 12(4):459-464.

168. Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Barka EA. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71(9): 4951–4959.
169. Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia LMP. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet Mol Biol.* 2012; 35(4 Suppl): 1044-1051.
170. O’Sullivan DJ, O’Gara F. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol Rev.* 1992; 56(4): 662-676.
171. Naik PR, Sakthivel N. Functional characterization of a novel hydrocarbonoclastic *Pseudomonas* sp. strain PUP6 with plant-growth-promoting traits and antifungal potential. *Res Microbiol.* 2006; 157(6):538-46.
172. Cao L, Qiu Z, You J, Tan H, Zhou S. Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of *Fusarium* wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. *FEMS Microbiol Lett.* 2005; 247(2): 147-152.
173. Whipps JM. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J Exp Bot.* 2001; 52: 487-511.

174. Sarabia M, Madrigal R, Martínez M, Carreón Y. Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Biológicas*. 2010; 12 (1): 65-71.
175. Toyoda H, Utsumi R, inventors; Method for the prevention of *Fusarium* diseases and microorganisms used for the same. US Patent 4, 988, 586. 1991.
176. Lemanceau P, Alabouvette C. 1993. Suppression of *Fusarium* wilts by fluorescent pseudomonads: mechanisms and applications. *Biocontrol Sci Technol*. 1993; 3: 219-34.
177. Jiménez R, Virgen G, Tabares S, Olalde V. Bacterias promotoras del crecimiento de plantas: Agro Biotecnología. *Avance y Perspectiva*. 2001; 20: 395-400.
178. Ma Y, Prasad MN, Rajkumar M, Freitas H. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnol Adv*. 2011; 29(2): 248-258.
179. Zaidi S, Usmani S, Singh BR, Musarrat J. Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ-101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*. *Chemosphere*. 2006; 64(6): 991-997.

180. Kuiper I, Lagendijk E, Bloemberg G, Lugtenberg B. Rhizoremediation: a beneficial plant–microbe interaction. *Mol Plant Microbe Interact.* 2004; 17(1): 6-15.
181. Wu SC, Cheung KC, Luo YM, Wong MH. Effects of inoculation of plant growth–promoting rhizobacteria on metal uptake by *Brassica juncea*. *Environ Pollut.* 2006; 140(1): 124–135.
182. Singh S, Eapen S, D’Souza SF. Cadmium accumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative system in an aquatic plant, *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere.* 2006; 62(2): 233-246.
183. Abdul-Baki AA, Anderson JD. Vigour determination in soybean by multiple criteria. *Crop Sci.* 1973; 13(6): 630-633.
184. Sethy SK, Shyamasree G. Effect of heavy metals on germination of sedes. *J Nat Sci Biol Med.* 2013; 4(2): 272–275.
185. Mhatre G, Chaphekar S. Effect of heavy metals on seed germination and early growth. *J Environ Biol.* 1982; 3: 53-63.
186. Volkmar KM, Bremer E. Effects of seed inoculation with a strain of *Pseudomonas fluorescens* on root growth and activity of wheat in well-

- watered and drought-stressed glass-fronted rhizotrons. *Can J Plant Sci.* 1998; 78: 545-551.
187. Dell'Amico E, Cavalca L, Andreoni V. Improvement of *Brassica napus* growth under cadmium stress by cadmium-resistant rhizobacteria. *Soil Biol Biochem.* 2008; 40: 74-84.
188. Escalante S, Rodríguez A, Vásquez MS, Rodríguez AV, Guerrero LA, Pérez NO, et al. Evaluación del efecto de cadmio sobre la germinación elongación radical de semillas bacterizadas de *Axonopus affinis* y *Festuca rubra*. *Polibotánica.* 2012; 34: 205-221.
189. Carlos MH, Stefani PV, Janette AM, Melani MS, Gabriela PO. Assessing the effects of heavy metals in ACC deaminase and IAA production on plant growth-promoting bacteria. *Microbiol Res.* 2016;188-189: 53-61.
190. Gautam RK, Mudhoo A, Lofrano G, Chattopadhyaya MC. Biomass-derived biosorbents for metal ions sequestration: Adsorbent modification and activation methods and adsorbent regeneration. *J Environ Chem Eng.* 2014; 2(1): 239-259.
191. Haferburg G, Kothe E. Microbes and metals: interactions in the environment. *J Basic Microbiol.* 2007; 47(6): 453-67.

192. Agrawal J, Sherameti I, Varma A. Detoxification of Heavy Metals: State. Vol 30. 1 ed. Berlin (NY): Springer; 2011. p. 1-34.
193. Jurkevitch E, Hadar Y, Chen Y. Differential Siderophore Utilization and Iron Uptake by Soil and Rhizosphere Bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1992; 58(1): 119-124.
194. Barton KK, Hemming BB. Iron chelation in plants and soil microorganisms. Academic Press. London, UK. 1993.
195. Abeles FB, Morgan PW, Saltveit ME. Ethylene in Plant Biology. 2a ed. San Diego (C.A): Academic Press; 1992. p. 414.
196. Des Marais D, Juenger T. Pleiotropy, plasticity, and the evolution of plant abiotic stress tolerance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2010; 1206:56-79.
197. Glick BR, Cheng Z, Czarny J, Duan J. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur J Plant Pathol.* 2007; 119(3): 329-339.
198. Orjuela P, Sandón A, Franco M, Martínez M. Evaluación de cepas antagónicas de actinomicetos y de *Trichoderma* sp. aislados a partir de suelos de cultivos de arroz (*Oryza sativa*) para el control de *Rhizoctonia solani*. *Rev Mund Microbiol.* 2003; 2(2): 9-14.

199. Franco M. Aislamiento, Caracterización y Evaluación de Actinomycetes inhibidores de algunos hongos fitopatógenos [tesis de maestría]. Bogotá D.C. (BO): Colombia Univ.; 1999.
200. Tokala RK, Strap JL, Jung CM, Crawford DL, Salove MH, Deobald LA, et al. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68(5): 2161-2171.
201. Dimkpa C, Svatos A, Merten D, Büchel G, Kothe E. Hydroxamate siderophores produced by *Streptomyces acidiscabies* E13 bind nickel and promote growth in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) under nickel stress. *Can J Microbiol.* 2008; 54(3): 163-72.
202. El-Tarabily KA, Sivasithamparam K. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biol Biochem.* 2006; 38(7):1505– 1520.
203. Márquez M, Martínez M, Franco M. Aislamiento de *Trichoderma sp.* y actinomycetes a partir de suelos de clavel (*Dianthus caryophyllus*) y evaluación de su capacidad antagónica in vitro sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi. *Rev Agron Colomb.* 2002; 19(1-2): 81-87.

204. Nassar AH, El-Tarabily KA, Sivasithamparam K. Growth Promoting of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a poliamine-producing isolate of *Streptomyces griseoluteus*. *Plant Growth Regul.* 2003; 40: 97-106.
205. Kurklinsky-Sobral J, Araújo WL, Mendes R, Geraldi IO, Pizzirani-Kleiner AA, Azevedo JL. Isolation and characterization of soy-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ Microbiol.* 2004; 6(12): 1244-1251.
206. Jeon JS, Lee SS, Kim HY, Ahn TS, Song HG. Plant growth promotion in soil by some inoculated microorganisms. *J Microbiol.* 2003; 41: 271–276.
207. Sahu MK, Sivakumar K, Thangaradjou T, Kannan L. Phosphate solubilizing actinomycetes in the estuarine environment: an inventory. *J Environ Biol.* 2007; 28(4):795-8.
208. Gauthier D, Diem HG, and Dommergues Y. In Vitro Nitrogen Fixation by Two Actinomycete Strains Isolated from *Casuarina* Nodules. *Appl Environ Microbiol.* 198; 41(1): 306-308.
209. Ezziyyani M, Pérez C, Requena ME, Ahmed AS, Candela ME. Evaluación del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*. *An Biol.* 2004; 26: 61-68.

210. Hamdali H, Hafidi M, Virolle M, Ouhdouch Y. Rock phosphate-solubilizing actinomycetes: screening for plant growth-promoting activities. *World J Microbiol Biotechnol.* 2008; 24(11): 2565-2575
211. Andrades-Moreno L, Del Castillo I, Parra R, Doukkali B, Redondo-Gómez S, Pérez-Palacios P, et al. Prospecting metal-resistant plant-growth promoting rhizobacteria for rhizoremediation of metal contaminated estuaries using *Spartina densiflora*. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2014; 21(5): 3713–3721.
212. He H, Ye Z, Yang D, Yan J, Xiao L, Zhong T, et al. Characterization of endophytic *Rahnella* sp. JN6 from *Polygonum pubescens* and its potential in promoting growth and Cd, Pb, Zn uptake by *Brassica napus*. *Chemosphere.* 2013; 90(6): 1960–1965.
213. El Sayed HE, Othaimen HS, Aburas MMA, Jastaniah SD. Efficiency of an Cd-Tolerant Actinomycete Isolate Obtained From Wastewater in Removal of Heavy Metals and Enhancing Plant growth of *Zea mays*, L. *Plant. Int J Curr Microbiol App Sci.* 2015; 4(6): 553-565.
214. Khan MU, Sessitsch A, Harris M, Fatima K, Imran A, Arslan M, et al. Cr-resistant rhizo- and endophytic bacteria associated with *Prosopis juliflora* and their potential as phytoremediation enhancing agents in metal-degraded soils. *Front Plant Sci.* 2015; 5: 755.

215. Matsubara A. Aislamiento y Caracterización de Actinomicetos a partir de cultivos ácidos de minerales [tesis de licenciatura]. Lima (LIM): Cayetano Heredia Univ.; 2012.
216. Sánchez M. Microbiología de suelos: Técnicas, métodos y medios de cultivo. México: UAM; 2004.
217. Küster E. Outline of a comparative study of criteria used in characterization of the actinomycetes. *Int Bull Bacteriol Nomencl Taxon.* 1959; 9: 97-104.
218. Pérez DA, García NY, Gallegos G, Ruiz MF, Berlanga DI, Ríos C. Isolation of actinomycetes associated to apple trees rhizosphere antagonistic to *Fusarium equiseti*. *Rev Mex Cienc Agríc.* 2015; 6(7): 1629-1638.
219. Shirling E, Gottlieb D. Methods for characterization of Streptomyces species. *Int J Syst Bacteriol.* 1966; 16(3): 313-340.
220. Miller DN, Bryant JE, Madsen EL, Ghiorse WC. Evaluation and Optimization of DNA Extraction and Purification Procedures for Soil and Sediment Samples. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65(11): 4715-4724.

221. Cook AE, Meyers PR. Rapid identification of filamentous Actinomycetes to the genus level using genus-specific 16S rRNA gene restriction fragment patterns. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003; 53: 1907-1915.
222. Okibe N, Gericke M, Hallberg KB, Johnson DB. Enumeration and characterization of acidophilic microorganism isolated from a pilot plant stirred-tank bioleaching operation. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69(4): 1936-1943.
223. Jeffrey LSH. Isolation, characterization and identification of actinomycetes from agriculture soils at Semongok, Sarawak. *Afr J Biotechnol.* 2008; 7(20): 3697-3702.
224. Barghouthi SA. A universal method for the identification of bacteria based on general PCR primers. *Indian J Microbiol.* 2011; 51(4): 430-444.
225. Eden PA, Schmidt TM, Blakemore RP, Pace NR. Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16 S rRNA-specific DNA. *Int J Syst Bacteriol.* 1991; 41: 324-325.
226. Paramasivam S, Ruban P, Govindasamy C. Histamine-Producing Bacteria (S-96)—A Molecular Approach. *J Biotechnol.* 2011; 1(3): 1-5.

227. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16 S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 1991; 173(2): 697-703.
228. Jiang H, Dong H, Zhang G, Yu B, Chapman LR, Fields MW. Microbial diversity in water and sediment of Lake Chata, an athalassohaline lake in northwestern China. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72(6): 3832-3845.
229. Bikandi J, San Millán R, Rementeria A, Garaizar J. In silico analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR and endonuclease restriction. *Bioinformatics.* 2004; 20(5): 7798–7999.
230. San Millán RM, Martínez-Ballesteros I, Rementeria A, Garaizar J, Bikandi J. Online exercise for the design and simulation of PCR and PCR-RFLP experiments. *BMC Res Notes.* 2013; 6: 513.
231. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987; 4: 406-425.
232. Sneath PH. The application of computers to taxonomy. *J Gen Microbiol.* 1957; 17: 201-226.
233. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 2007; 23: 2947–2948.

234. Chenna, R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, et al. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31: 3497-3500.
235. Kortemaa H, Rita H, Haahtela K, Smolander A. Root colonization ability of antagonistic *Streptomyces griseoviridis*. *Plant Soil.* 1994; 163 (1): 77-83
236. Diaz P, Ferrera R, Almaraz JJ, Alcántar G. Inoculación de Bacterias promotoras de crecimiento en Lechuga. *Terra.* 2001; 19: 327-335.
237. Zúñiga D. Manual de Microbiología Agrícola: Rhizobium, PGPR, indicadores de fertilidad e inocuidad. In: Ed. Olaya M. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2008. p. 107.
238. Ogata K, Arellano C, Zuñiga D. Efecto de diferentes bacterias aisladas de rizósfera de *Caesalpinia spinosa* en la germinación de diferentes especies vegetales cultivados. *Zonas Áridas.* 2008; 12 (1).
239. Sheng XF, Xia JJ. Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium-resistant bacteria. *Chemosphere.* 2006; 64(6): 1036-1042.
240. Bayona MA. Conservación y mantenimiento de cepas Microbianas con fines docentes e investigativos. En: Colombia Laboratorio Actual. CÓDICE

- LTDA. Procedente del 6to Congreso Internacional Del Colegio Nacional De Bacteriólogos; 2003 Oct-Nov 31-3; Medellín, Colombia. Bogotá; 2003. p. 35-39.
241. Weng Z, Díaz OE, Álvarez I. Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer? *Rev Cubana Hig Epidemiol.* 2005; 43 (3) :1-7.
242. Zimbro MJ, Power DA, Miller SM, Wilson GE, Johnson JA, editores. *Difco & BBL Manual: Manual of Microbiological Culture Media.* 2 ed. Maryland: Becton, Dickinson and Company; 2009.
243. Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods.* 2003; 55: 541-555.
244. Jaric M, Segal J, Silva-Herzoq E, Schneper L, Mathee K. Better primer design for metagenomics applications by increasing taxonomic distinguishability. *BMC Proc.* 2013; 7 (Suppl 7).
245. Gram C. The differential staining of Schizomycetes in tissue sections and in dried preparations. *Fortschritte der Medizin.* 1884; 2: 185-189.
246. Ghanem NB, Sabry SA, El-sherif ZM, Abu El-Ela GA. Isolation and Enumeration of marine Actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. *J Gen Appl Microbiol.* 2000; 46: 105-111.

247. Duraipandiyan V, Sasi AH, Islam VIH, Valanarasu M, Ignacimuthu S. Antimicrobial properties of actinomycetes from the soil of Himalaya. *J Med Mycol.* 2010; 20: 15-20.
248. Wendish F, Kutzner J. The family Streptomycetaceae. In Star PM, Stolp H, Truper GH, Balows A, Schlegel GH, editors. *The prokaryotes. A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria.* 2 ed. New York: Springer Science+Business Media; 1986. p. 921-995.
249. Kalakoutskii LV, Agre NS. Comparative Aspects of Development and Different in Actinomycetes. *Bacteriol Rev.* 1976; 40: 469-524.
250. Kontro MH, Lignell U, Hyvarinen A, Vahteristo M, Hirvonen MR, Nevalainen A. Nutrient effects on ten *Streptomyces sp.* sporulation. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology.* 2007; 1: 137-142.
251. Magarvey NA, Keller JM, Bernan V, Dworkin M, Sherman DH. Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70: 7520-7529.
252. León J, Liza L, Soto I, Cuadra D, Patiño L, Zerpa R. Actinomycetes bioactivos de sedimento marino de la costa central del Perú. *Rev Peru Biol.* 2007; 14: 259-270.

253. MacFaddin. Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria. 3 ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 2000.
254. Dworkin M. The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes. 3 ed. Media: Springer Science+Business; 2006.
255. Abdulla H, May E, Bahgat M, Dewedar A. Characterization of Actinomycetes isolated from ancient stone and their potential for deterioration. Pol J Microbiol. 2008; 57: 213-220.
256. Zenova GM, Manucharova NA, Zvyagintsev DG. Extremophilic and extremotolerant actinomycetes in different soil types. Eurasian Soil Sci. 2011; 44: 417-436.
257. Kuchari M. The isolation of halotolerant pigmented actinomycetes from Jeddah Sea shore. J King Abdulaziz Univ. 1999; 11: 5-12.
258. Tresner HD, Hayes JA, Backus EJ. Differential Tolerance of Streptomycetes to Sodium Chloride as a Taxonomic Aid. Appl Microbiol. 1968; 16: 1134-1136.
259. Bremer E, Krämer R. Doping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. In: Storz

- G, Hengge-Aronis R, editors. Bacterial Stress Responses. Washington: ASM Press; 2000. p. 79-97.
260. Killham M, Firestone MK. Salt stress control of intracellular solutes *in Streptomyces indigenus* to saline soils. Appl Environ Microbiol. 1984; 47: 301-306.
261. Ara I, Bukhari NA, Wijayanti DR, Bakir MA. Proteolytic activity of alkaliphilic, salt-tolerant actinomycetes from various regions in Saudi Arabia. Afr J Biotechnol. 2012; 11: 3849-3857.
262. Momose I, Iinuma H, Kinoshita W, Momose Y, Kunimoto S, Hamada M, et al. Decatronomicins A and B, New antibiotics produced by *Actinomadura* sp. MK 73-NF4. I. Taxonomy, Isolation, Physicochemical properties and biological activities. J Antibiot. 1999; 52: 781-786.
263. Seong C, Goodfellow M, Ward A, Hang Y. Numerical Classification of Acidophilic Actinomycetes Isolated from Acid Soil in Korea. Korean J Microbiol. 1993; 31: 355-363.
264. Hagedorn C. Influences of Soil Acidity of *Streptomyces* Populations Inhabiting Forest Soils. Appl Environ Microbiol. 1976; 32: 368-375.

265. Xu C, Wang L, Cui Q, Huang Y, Liu Z, Zheng G, et al. Neutrotolerant acidophilic *Streptomyces* species isolated from acidic soils in China. Int J Syst Evol Microbiol. 2006; 56: 1109-1115.
266. Piñero J, Rivas N. Aislamiento y caracterización de una cepa de actinomiceto celulolítico, termófilo moderado y acidófilo. Rev Cient FCV-Luz. 2004; 14(5): 412-418.
267. Norris PR, Davis-Belmar CS, Brown CF, Calvo-Baldo LA. Autotrophic, sulfur-oxidizing actinobacteria in acidic environments. Extremophiles. 2011; 15: 155-163.
268. Slonczewski J. L. Encyclopedia of Microbiology - pH stress. Academic Press, vol. 3, 2nd edition. 2000: 625 – 632.
269. Wiley J, Sons L. Bacterial Responses to pH. West Sussex (ENG): Novartis Foundation; 1999.
270. Taddei A, Rodríguez MJ, Márquez-Vilchez E, Castelli C. Isolation and identification of *Streptomyces* spp. from Venezuelan soils: Morphological and biochemical studies. Microbiol Res. 2006; 161: 222-231.
271. Passari AK, Mishra VK, Saikia R, Gupta VK, Singh BP. Isolation, abundance and phylogenetic affiliation of endophytic actinomycetes

associated with medicinal plants and screening for their in vitro antimicrobial biosynthetic potential. *Front Microbiol.* 2015; 6: 273.

272. Pan E, Jamison M, Yousufuddin M, MacMillan JB. Ammosamide D, an oxidatively ring opened ammosamide analog from a marine-derived *Streptomyces variabilis*. *Org Lett.* 2012; 14: 2390-2393.

273. Liu C, Wang X, Yan Y, Wang J, Zhang B, Zhang J, et al. *Streptomyces heilongjiangensis* sp. nov., a novel actinomycete that produces borrelidin isolated from the root surface of soybean [*Glycine max* (L.) Merr]. *Int J Syst Evol. Microbiol.* 2013; 63: 1030-1036.

274. Kim SB, Falconer C, Williams E, Goodfellow M. *Streptomyces thermocarboxydovorans* sp. nov. and *Streptomyces thermocarboxydus* sp. nov., two moderately thermophilic carboxydotrophic species from soil. *Int J Syst Bacteriol.* 1998; 48: 59-68.

275. Postma J, Schilder MT, Bloem J, Van Leeuwen-Haagsma WK. Soil suppressiveness and functional diversity of the soil microflora in organic farming systems. *Soil Biol Biochem.* 2008; 40: 2394-2406.

276. Garbeva P, Van Veen JA, Van Elsas JD. Microbial diversity in soil: selection microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annu Rev Phytopathol.* 2004; 42: 243-270.

277. Aouar L, Lerat S, Ouffroukh A, Boulahrouf A, Beaulieu C. Taxonomic identification of rhizospheric actinobacteria isolated from Algerian semi-arid soil exhibiting antagonistic activities against plant fungal pathogens. *Can J Plant Pathol.* 2012; 34: 165-176.
278. Fraser C, Hanage WP, Spratt BG. Recombination and the nature of bacterial speciation. *Science.* 2007; 315: 476-480.
279. Fraser C, Alm EJ, Polz MF, Spratt BG, Hanage WP. The bacterial species challenge: making sense of genetic and ecological diversity. *Science.* 2009; 323: 741–746.
280. Cheng K, Rong X, Pinto AA, Fernandez M, Murillo C, Huang Y. Population genetic analysis of *Streptomyces albidoflavus* reveals habitat barriers to homologous recombination in the diversification of streptomycetes. *Appl. Environ Microbiol.* 2015; 81: 966–975.
281. Zhang Z, Kudo T, Nakajima Y, Wang Y. Clarification of the relationship between the members of the family Thermomonosporaceae on the basis of 16S rDNA, 16S-23S rRNA internal transcribed spacer and 23S rDNA sequences and chemotaxonomic analyses. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001; 51: 373-383.

282. El Baz S, Baz M, Barakate M, Hassani L, El Gharmali A, Imziln1 B. Resistance to and Accumulation of Heavy Metals by Actinobacteria Isolated from Abandoned Mining Areas. *Sci World J.* 2015; 2015: 14.
283. Singh S, Pandey S, Singh H. Actinomycetes: tolerance against heavy metals and antibiotics. *Int J Bioassays.* 2014; 3: 3376-3383.
284. Abbs A, Edwards C. Effects of metals on a range of *Streptomyces* species. *Appl Environ Microbiol.* 1989; 55: 2030-2035.
285. Riffat HM, Mahrous KF, Khalil WKB. Effect of heavy metals upon metallothioneins in some *Streptomyces* species isolated from Egyptian soil. *J Appl Sci Environ Sanit.* 2009; 4: 197-206.
286. Kothe E, Dimkapa C, Haferburg G, Schmidt A, Schütze E. *Streptomyces* heavy metal resistance: Extracellular and intracellular mechanisms. *Soil Biol.* 2010; 18: 225-235.
287. Gadd GM. Metals and microorganisms: a problem of definition. *FEMS Microbiol Lett.* 1992; 100: 197-203.
288. Alvarez A, Catalano SA, Amoroso MJ. Heavy metal resistant strains are widespread along *Streptomyces* phylogeny. *Mol Phylogenet Evol.* 2013; 66: 1083-1088.

289. Mattuschka B, Straube G, Trevors JT. Silver, copper, lead and zinc accumulation by *Pseudomonas stutzeri* AG259 and *Streptomyces albus*: electron microscopy and energy dispersive X-ray studies. *BioMetals*. 1994; 7: 201-208.
290. Summers AO. Bacterial resistance to toxic elements. *Trends Biotechnol*. 1985; 3: 122-125.
291. Lin Y, Wang X, Wang B, Mohamad O, Wei G. Bioaccumulation characterization of zinc and cadmium by *Streptomyces zinc resistens*, a novel actinomycete, *Ecotoxicol Environ Saf*. 2012; 77: 7-17.
292. Rho J, Kim J. Heavy metal biosorption and its significance to metal tolerance of streptomycetes. *J Microbiology*. 2002; 40: 51-54.
293. Nakouti I, Hobbs G. A new approach to studying ion uptake by actinomycetes. *J Basic Microbiol*. 2013; 53: 913-916.
294. Mishra A, Choudhari MA. Amelioration of lead and mercury effects on germination and rice seedling growth by antioxidants. *Biol Plantarum*. 1998; 41: 469-473.

295. Carrillo G, Juárez J, Ruiz D, Müller R. Aumento del rendimiento de tomate (*Lycopersicon esculentum*) cuando la raíz se desarrolla colonizada por microorganismos. *Biotechnol Apl.* 2000; 17: 171-176.
296. Enebak SA, Wei G, Klopper JW. Effects of plant growth – promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedlings. *Ann Forest Sci.* 1998; 44: 139-144.
297. Alonso FS, López T. Efectos tóxicos agudos de metales pesados sobre el crecimiento radicular de *Lactuca sativa*. *Rep Cient FACEN.* 2015; 6: 21-29.
298. Craviotto R, Arango M. La Calidad contada por la propia semilla. Informe Técnico. Córdoba (Ar): Instituto Nacional Técnico Agropecuario (INTA); 2003.
299. Kai M, Piechulla B. Plant growth promotion due to rhizobacterial volatiles – An effect of CO₂. *FEBS Lett.* 2009; 583: 3473-3477.
300. Han Y, Li Z, Miao X, Zhang F. Statistical optimization of medium components to improve the chitinase activity of *Streptomyces* sp. Da11 associated with the South China Sea sponge *Craniella australiensis*. *Process Biochem.* 2008; 43: 1088–1093.

301. Doolotkeldieva T, Bobusheva S, Konurbaeva M. Effects of *Streptomyces* Biofertilizer to Soil Fertility and Rhizosphere's Functional Biodiversity of Agricultural Plants. *Adv Microbiol.* 2015; 5: 555- 571.
302. Rico M. Capacidad promotora de crecimiento vegetal por bacterias del genero *Azotobacter* y Actinomicetos aislados de cultivos de *Solanum tuberosum* Linnaeus, 1753 (papa) cultivados en zonas alto andinas del Perú [tesis de licenciatura]. Lima (LIM): San Marcos Univ.; 2009.
303. Sreevidya M, Gopalakrishnan S, Kudapa H, Varshney RK. Exploring plant growth-promotion actinomycetes from vermicompost and rhizosphere soil for yield enhancement in chickpea. *Braz J Microbiol.* 2016; 47(1): 85–95.
304. Phukan I, Madhab M, Bordoloi M, Sarmah SR, Dutta P, Begum R, et al. Exploitation of PGP microbes of tea for improvement of plant growth and pest suppression: a novel approach. *Two & a Bud.* 2012; 59: 69–74.
305. Gopalakrishnan S, Vadlamudi S, Bandikinda P, Sathya A, Vijayabharathi R, Rupela O, et al. Evaluation of *Streptomyces* strains isolated from herbal vermicompost for their plant growth-promotion traits in rice. *Microbiol Res.* 2014; 169: 40–48.
306. Sadeghi A, Karimi E, Dahazi PA, Javid MG, Dalvand Y, Askari H. Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of

- Streptomyces under saline soil condition. *World J Microbiol Biotechnol.* 2012; 28: 1503-1509.
307. Tamreihao K, Ningthoujam DS, Nimaichand S, Singh ES, Reena P, Singh SH, et al. Biocontrol and plant growth promoting activities of a *Streptomyces corchorusii* strain UCR3-16 and preparation of powder formulation for application as biofertilizer agents for rice plant. *Microbiol Res.* 2016; 192: 260-270.
308. Cakmakci R, Donmez F, Aydın A, Sahin, F. Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil Biol Biochem.* 2006; 38(6): 1482–1487.
309. Lee J, Postmaster A, Soon HP, Keast D, Carson KC. Siderophore production by actinomycetes isolates from two soil sites in Western Australia. *Biometals.* 2012; 25: 285-296.
310. Müller G, Matzanke BF, Raymond KN. Iron transport in *Streptomyces pilosus* mediated by ferrichrome siderophores, rhodotorulic acid, and enantio-rhodotorulic acid. *J Bacteriol.* 1984; 160: 313-318.
311. Kannahi M, Senbagam N. Studies on siderophore production by microbial isolates obtained from rhizosphere soil and its antibacterial activity. *J Chem Pharm Res.* 2014; 6:1142-1145.

312. Tsuda M, Yamakawa M, Oka S, Tanaka Y, Hoshino Y, Mikami Y, et al. Brasilibactin A, a cytotoxic compound from actinomycete *Nocardia brasiliensis*. J Nat Prod. 2005; 68: 462-464.
313. Nemoto A, Hoshino Y, Yazawa K, Ando A, Mikami Y, Komaki H, et al. Asterobactin, a new siderophore group antibiotic from *Nocardia asteroides*. J Antibiot. 2002; 55: 593-597 (2002).
314. Ratledge C, Snow GA. Isolation and structure of nocobactin NA, a lipid-soluble iron-binding compound from *Nocardia asteroides*. Biochem J. 1974; 139:407-413.
315. DeBoer C. Dietz, A. The description and antibiotic production of *Streptomyces hygroscopicus* var. Geldanus. J Antibiot. 1976; 29: 1182–1191.
316. Ueki M, Suzuki R, Takamatsu S, Takagi H, Uramoto M, Ikeda H, et al. Nocardamine production by *Streptomyces avermitilis*. Actinomycetologica. 2009; 23: 34-39.
317. Stoll A, Brack A, Renz J. Nocardamin, ein neues antibioticum aus einer *Nocardia*-Art Schweiz Z. Pathol Bacteriol, 1951; 14: 225-233.

318. Zähler H, Bachmann E, Hütter R, Nuesch J. Sideramine, eisenhaltige wachstumsfaktoren aus mikroorganismen. *Pathol Microbiol*, 1962; 25: 708–736.
319. Sastoque E. Aislamiento y selección de microorganismos productores de quitinasas a partir de residuos de concha de camarón con potencial biocontrolador [tesis de licenciatura]. Bogotá D.C. (BO): Javeriana Univer.; 2005.
320. Márquez M, Martínez M, Franco M. Aislamiento de *Trichoderma sp.* y actinomicetes a partir de suelos de clavel (*Dianthus caryophyllus*) y evaluación de su capacidad antagónica in vitro sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi. *Rev Agron Colomb.* 2003; 19(1-2): 81-88.
321. Fialho de Oliveira M, Germano da Silva M, Van Der Sand S. Potencial antifitopatógico de actinobacterias endofíticas aisladas para plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) del sur de Brasil y caracterización de *Streptomyces sp.* R18(6), un agente potencial de biocontrol. *Res Microbiol.* 2010; 161: 565- 572.
322. Gomes RC, Sêmedo LT, Soares RM, Linhares LF, Ulhoa CJ, Alviano CS, et al. Purification of a thermostable endochitinase from *Streptomyces* RC1071 isolated from a cerrado soil and its antagonism against phytopathogenic fungi. *J Appl Microbiol.* 2001; 90: 653-661.

323. Da Silva C, Fermino AC, Da Silva M. Characterization of streptomycetes with potential to promote plant growth and biocontrol. *Sci Agric*. 2008; 65: 50-55.
324. Inbar E, Green SJ, Hadar Y, Minz D. Competing factors of compost concentration and proximity to root affect the distribution of streptomycetes. *Microb Ecol*, 2005; 50: 73-81.
325. Zhao J, Xue Q, Niu G, Xue L, Shen G, Du J. Extracellular enzyme production and fungal mycelia degradation of antagonistic *Streptomyces* induced by fungal mycelia preparation of cucurbit plant pathogens *Ann Microbiol*. 2013; 63: 809.
326. Doumbou CL, Hamby MK, Crawford DL, Beaulieu C. Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection*. 2001; 82: 85-102.
327. Sharma M. Actinomycetes: Source, Identification, and Their Applications. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2014; 3: 801-832.
328. Yucel S, Yamac M. Selection of *Streptomyces* isolates from turkish karstic caves against antibiotic resistant microorganisms. *Pak J Pharm Sci*. 2010; 23: 1-6.

329. Bressan W, Figueiredo JEF. Biological Control of *Stenocarpella maydis* in Maize Seed with Antagonistic *Streptomyces sp.* Isolates. J Phytopathol. 2005; 153: 623-626.
330. Montesinos E. Antimicrobial peptides and plant disease control. FEMS Microbiol Lett. 2007; 270: 1-11.
331. Chattopadhyay, S.K., and B. Nandi. 1982. Inhibition of *Helminthosporium oryzae* and *Alternaria solani* by *Streptomyces longisporus* (Krasil'nikov) Waksman. Plant Soil 69: 171-175.
332. Valois, D., K. Fayad, T. Barasubiye, M. Gagnon, C. Déry, R. Brzezinski, and C. Beaulieu. 1996. Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1630- 1635.
333. Aldesuquy, H.S., F.A. Mansour, and S.A. Abo- Hamed. 1998. Effect of the culture filtrates of *Streptomyces* on growth and productivity of wheat plants. Folia Microbiol. 43: 465-470.
334. Manulis S, Shafrir H, Epstein E, Lichter A, Barash I. Biosynthesis of indole-3-acetic acid via the indole-3-acetamide pathway in *Streptomyces sp.* Microbiology. 1994; 140: 1045-1050.

335. Matsukawa E, Nakagawa Y, Iimura Y, Hayakawa M. Stimulatory effect of indole-3-acetic acid on aerial mycelium formation and antibiotic production in *Streptomyces* spp. *J Actinomycetol.* 2007; 21: 32-39.
336. Shutsrirung A, Chromkaew Y, Pathon-Aree W, Choonluchanon S, Boonkerd N. Diversity of endophytic actinomycetes in mandarin grown in northern Thailand, their phytohormone production potential and plant growth-promoting activity. *Soil Sci Plant Nutr.* 2013; 59: 322-330.
337. Harikrishnan H, Shanmugaiyah V, Balasubramanian N, Sharma M, Kotchoni S. Antagonistic potential of native strain *Streptomyces aurantiogriseus* VSMGT1014 against sheath blight of rice disease. *World J Microbiol. Biotechnol.* 2014; 30(12): 3149–3161.
338. Shrivastava S, D'Souza SF, Desai PD. Production of indole-3-acetic acid by immobilized actinomycetes (*Kitasatospora sp.*) for soil application. *Curr Sci.* 2008; 94: 1595-1604.
339. Nautiyal CS. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett.* 1999; 17: 265-270.
340. Fankem H, Nwaga D, Deubel A, Dieng L, Merbach W, Etoa FX. Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from

- oil palm tree (*Elaeis guineensis*) rhizosphere in Cameroon. Afr J Biotechnol. 2006; 5: 2450-2560.
341. Anwar S, Ali B, Sajid I. Screening of Rhizospheric Actinomycetes for Various In-vitro and In-vivo Plant Growth Promoting (PGP) Traits and for Agroactive
342. Prakash RK, Cummings B. Creation of novel nitrogen-fixing actinomycetes by protoplast fusion of Frankia with streptomycetes. Plant Mol Biol. 1988; 10:281-289.
343. Gauthier D, Diem HG, Dommergues Y. In Vitro Nitrogen Fixation by Two Actinomycete Strains Isolated from Casuarina Nodules. Appl Environ Microbiol. 1981; 41: 306–308.
344. Wang W. Literature review on higher plants for toxicity testing. Water Air Soil Pollut. 1991; 59: 381-400.
345. Lewis MA. Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review. Environ Pollut. 1995; 87: 319-336.
346. Wang WC, Freemark K. The use of plants for environmental monitoring and assessment. Ecotoxicol Environ Saf. 1995; 30: 289-301.

347. Labra D, Guerreo LA, Rodríguez AV, Montes S, Pérez S y Rodríguez A. Respuesta de crecimiento y tolerancia a metales pesados de *Cyperus elegans* y *Echinochloa polystachya* inoculadas con una rizobacteria aislada de un suelo contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo. Rev Int Contam Ambient. 2012; 28: 7-16.
348. Tang Y, Qiu R, Zeng X, Ying R, Yua F, Zhou X. Lead, zinc, cadmium hyperaccumulation and growth stimulation in *Arabis paniculata* Franch. Environ Exp Bot. 2009; 66(1): 126-134.
349. Forbs VE. Is hormesis an evolutionary expectation?. Funct Ecol. 2000; 14: 12-24.
350. Roosens N, Verbruggen N, Meerts P, Ximenez P, Smith JAC. Natural variation in cadmium tolerance and its relationship to metal hyperaccumulation for seven populations of *Thlaspi caerulescens* from western Europe. Plant Cell Environ. 2003; 26: 1657-1672.
351. Andresen E, Kupper H. Cadmium toxicity in plants. Met Ions Life Sci. 2013; 11: 395-413.
352. Nazar R, Iqbal N, Masood A, Khan MIR, Syeed S, Khan NA. Cadmium Toxicity in Plants and Role of Mineral Nutrients in Its Alleviation. Am J Plant Sci. 2012; 3: 1476-1489.

353. Das P, Samantaray S, Rout GR. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environ Pollut.* 1997; 98 (1): 29-36.
354. Kiran Y, Şahin A. The effects of cadmium on seed germination, root development and mitotic of root tip cells of Lentil (*Lens culinaris* Medik). *World J Agric Sci.* 2006; 2: 196-200.
355. Romero MC, Palma JM, Gómez M, Del Río LA, Sandalio LM. Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant Cell Environ.* 2002; 25: 677-686.
356. Balestrasse KB, Benavides MP, Gallego SM, Tomaro ML. Effect of cadmium stress on nitrogen metabolism in nodules and root of soybean plants. *Funct Plant Biol.* 2003; 30: 57-64.
357. Theriault G, Nkongolo K. Nickel and Copper Toxicity and Plant Response Mechanisms in White Birch (*Betula papyrifera*). *Bull Environ Contam Toxicol.* 2016; 97: 171-176.
358. Rajkumar M, Ae N, Prasad MN, Freitas H. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends Biotechnol.* 2010; 28: 142-149.

359. Merriman PR, Price RD, Kollmorgen JF, Piggott T, Ridge EH. Effect of seed inoculation with *Bacillus subtilis* and *Streptomyces griseus* on the growth of cereals and carrots. *Aust J Agric Res.* 1974; 25: 219-226.
360. Küpper H, Götz B, Mijovilovich A, Küpper FC, Meyer-Klaucke W. Complexation and Toxicity of Copper in Higher Plants. I. Characterization of Copper Accumulation, Speciation, and Toxicity in *Crassula helmsii* as a New Copper Accumulator. *Plant Physiol.* 2009; 151: 702-714.
361. Madejón P, Ramírez JE, Corrales I, Barceló J, Poschenrieder C. Copper-induced oxidative damage and enhanced antioxidant defenses in the root apex of maize cultivars differing in Cu tolerance. *Environ Exper Bot.* 2009; 67: 415-420.
362. De Vos CHR, Vonk MJ, Voojis R, Schat H. Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*. *Plant Physiol.* 1992; 98: 853-858.
363. Chen J, Peng D, Shafi M, Li S, Wu J, Ye Z, et al. Effect of copper toxicity on root morphology, ultrastructure, and copper accumulation in Moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*). *Z Naturforsch C.* 2014; 69: 399-406.
364. Mohanty N, Vass I, Demeter S. Copper Toxicity Affects Photosystem II Electron Transport at the Secondary Quinone Acceptor, Q_B^1 . *Plant Physiol.* 1989; 90: 175–179.

365. Mengel K, Kirkby E, Kosegarten H, Appel T. Principles of plant nutrition. 5 ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2001.
366. Dobermann A, Fairhurst T. Toxicidad de hierro en arroz. Rice: Nutrient disorders & Nutrient management. 1 ed. Los Baños (LAG): International Rice Research Institute; 2000.
367. Marschner H. Mineral nutrition of higher plants. 2 ed. San Diego (CA): Academic Press; 1998. p. 313-396.
368. Haslett BS, Reid RJ, Rengel Z. Zinc mobility in wheat: uptake and distribution of zinc applied to leaves or roots. *Ann Bot.* 2001; 87: 379-386.
369. Yang HM, Zhang XY, Wang GX. Effects of heavy metals on stomatal movements in broad bean leaves. *Russ J Plant Physiol.* 2004; 51: 464-468.
370. Wallnöfer P, Engelhardt G. Schadstoffe aus dem Boden. In: Hock B, Elstner EF, editors. *Schadwirkungen auf Pflanzen.* Spektrum. Berlin: 1995. p. 118-140.
371. Ramani S, Kannan S. Studies on translocation of zinc in bean plants: evidence for retranslocation during new growth. *J Plant Physiol.* 1985; 121(4): 313-318.

372. Ye ZH, Baker AJM, Wong MH, Willis AJ. Zinc, lead and cadmium tolerance, uptake and accumulation by *Typha latifolia*, *New Phytol.* 1997; 136(3): 469–480
373. Al-Qurainy F. Application of inter simple sequence repeat (ISSR marker) to detect genotoxic effect of heavy metals on *Eruca sativa* (L.) *African J Biotechnol.* 2010; 9: 467–474.
374. Valencia E, Hernández E, Velásquez C, López J, Alfaro R, López J. Role of dissimilatory fermentative iron-reducing bacteria in Fe uptake by common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown in alkaline soil. *Plant Soil.* 2007; 291(1): 263-273.
375. He LY, Zhang YF, Ma HY, Su LN, Chen ZJ, Wang QY, Qian M, Sheng XF. Characterization of copperresistant bacteria and assessment of bacteria communities in rhizosphere soils of copper-tolerant plants. *Appl Soil Ecol.* 2010; 44: 49–55.
376. Rincón G, López L, Quiñones EE. Efectividad biológica in vitro de actinomicetos sobre el agente causal del tizón de halo en frijol. *Rev Fitotec Mex.* 2014; 37: 229-234.
377. Manulis S, Zutra D, Kleitman F, Dror O, David I. Distribution of streptomycin resistant strains of *Erwinia amylovora* in Israel and occurrence of blossom blight in the autumn. *Phytoparasitica.* 1998; 26: 223-230.

ANEXO 1

Fotos 1

Características Macroscópicas

6b

AN



7 días

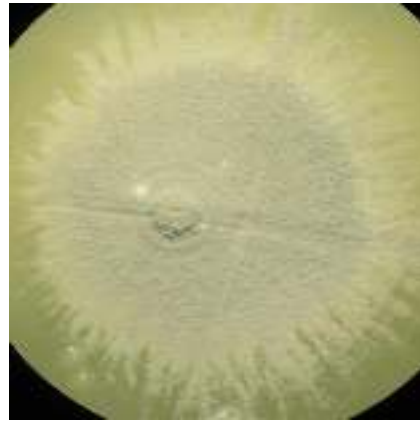


14 días

AII



7 días



14 días

XGAL



7 días



14 días

6c

AN



7 días



14 días

AAI



7 días



14 días

XGAL



7 días



14 días

6d

AN



7 días



14 días

AAI



7 días

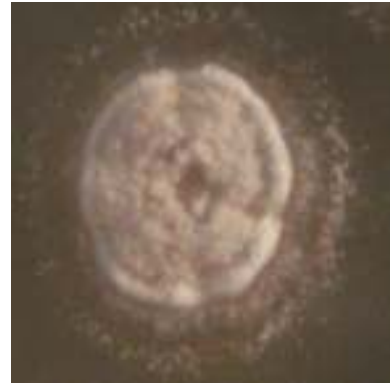


14 días

XGAL



7 días



14 días

6E1

AN



7 días

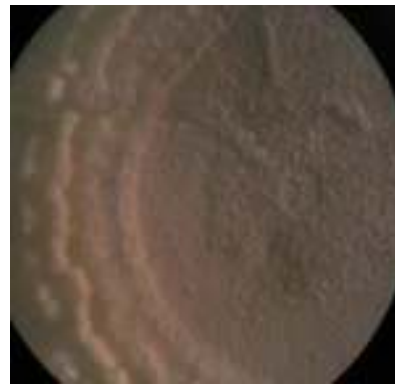


14 días

AAI



7 días



14 días

XGAL



7 días



14 días

6E3

AN

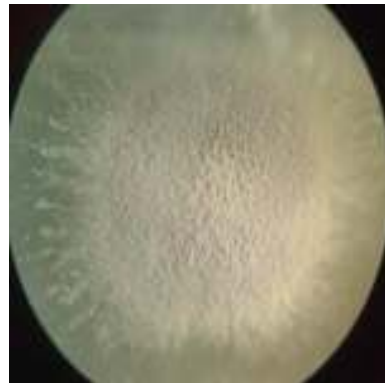


7 días

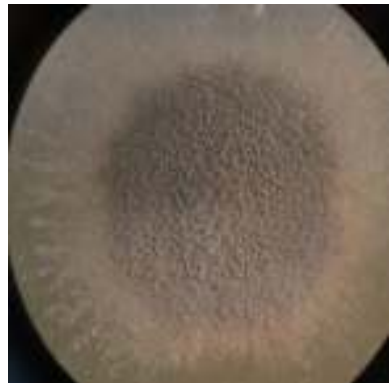


14 días

AAI

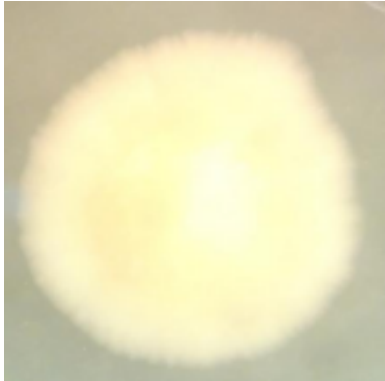


7 días

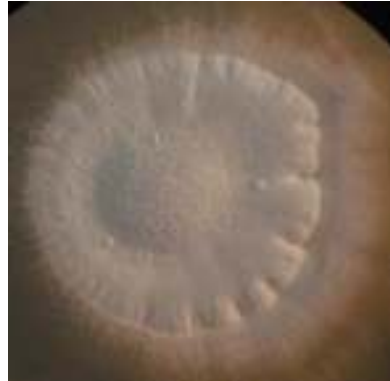


14 días

XGAL



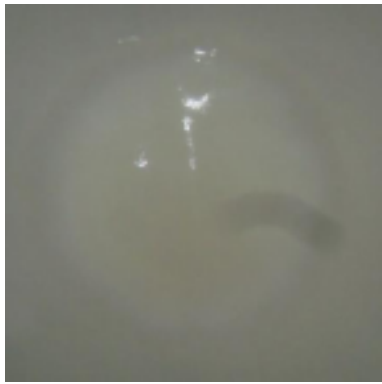
7 días



14 días

11.1

AN



7 días

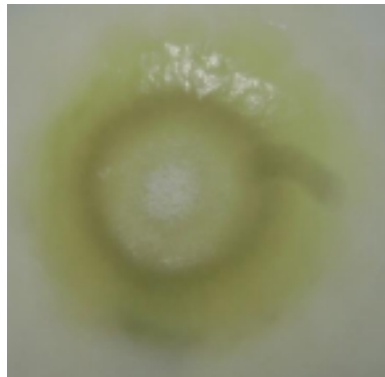


14 días

AAI



7 días



14 días

XGAL



7 días



14 días

21

AN



7 días



14 días

AAI



7 días



14 días

XGAL



7 días



14 días

C2

AN



7 días

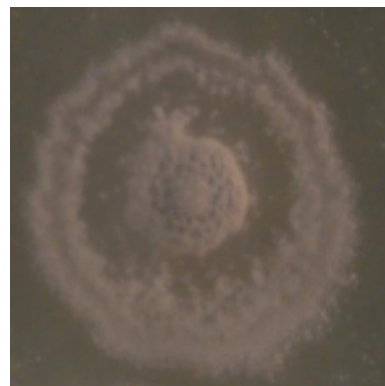


14 días

AAI

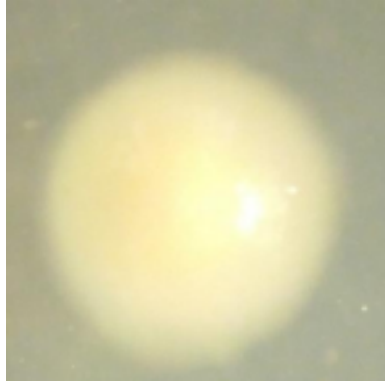


7 días



14 días

XGAL



7 días



14 días

E1

AN



7 días



14 días

AAI



7 días



14 días

XGAL



7 días



14 días

F

AN



7 días



14 días

AAI



7 días



14 días

XGAL



7 días



14 días

Frep 13

AN



7 días



14 días

AAI

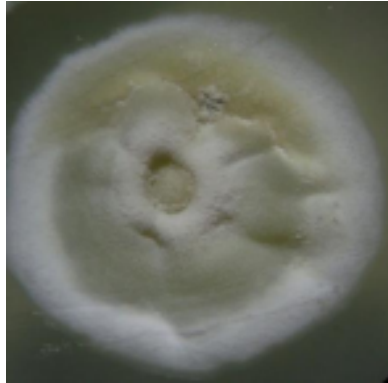


7 días



14 días

XGAL



7 días



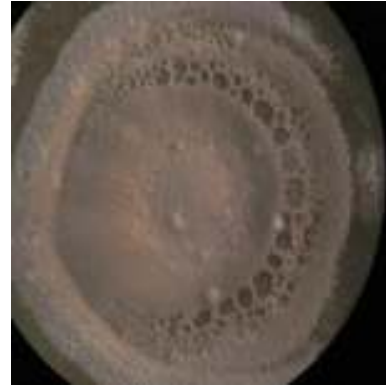
14 días

Frep 14

AN



7 días



14 días

AAI



7 días



14 días

XGAL



7 días



14 días

Frep 15

AN

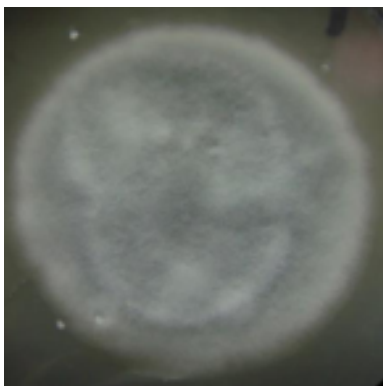


7 días

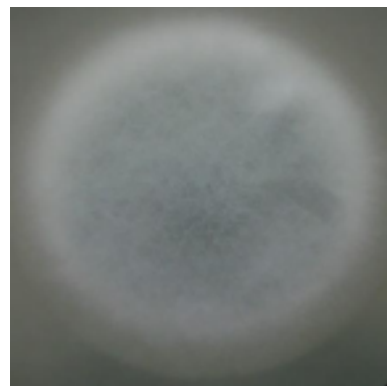


14 días

AAI



7 días



14 días

XGAL



7 días



14 días

Fe5

AN



7 días



14 días

AAI



7 días



14 días

XGAL



7 días



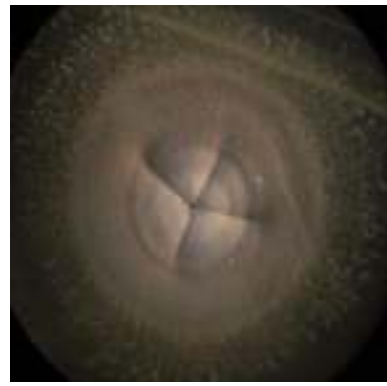
14 días

K1A

AN



7 días



14 días

AAI



7 días



14 días

XGAL



7 días



14 días

K1B

AN



7 días



14 días

AAI



7 días



14 días

XGAL



7 días



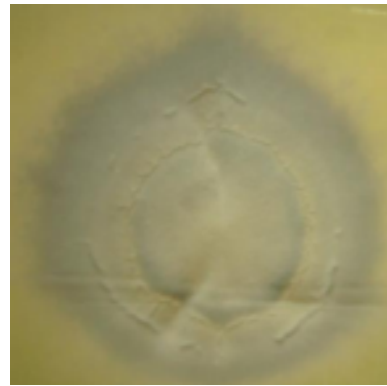
14 días

K2

AN



7 días



14 días

AAI

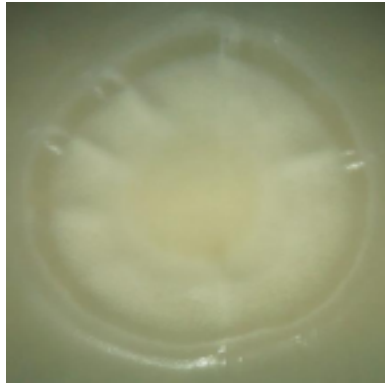


7 días



14 días

XGAL



7 días



14 días

X

AN



7 días



14 días

AAI



7 días



14 días

XGAL



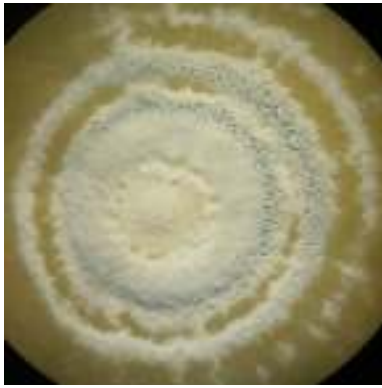
7 días



14 días

Y16

AN



7 días



14 días

AAI

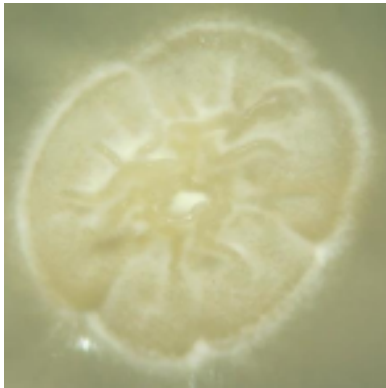


7 días



14 días

XGAL



7 días



14 días

AB5

AN



7 días



14 días

AAI

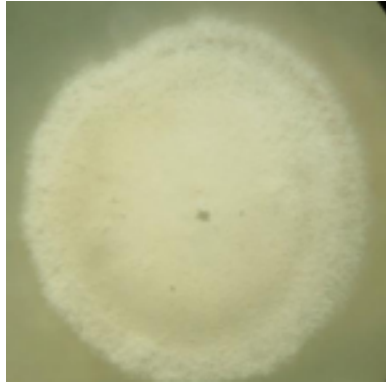


7 días



14 días

XGAL



7 días



14 días

K4

AN



7 días



14 días

AAI



7 días



14 días

XGAL



7 días



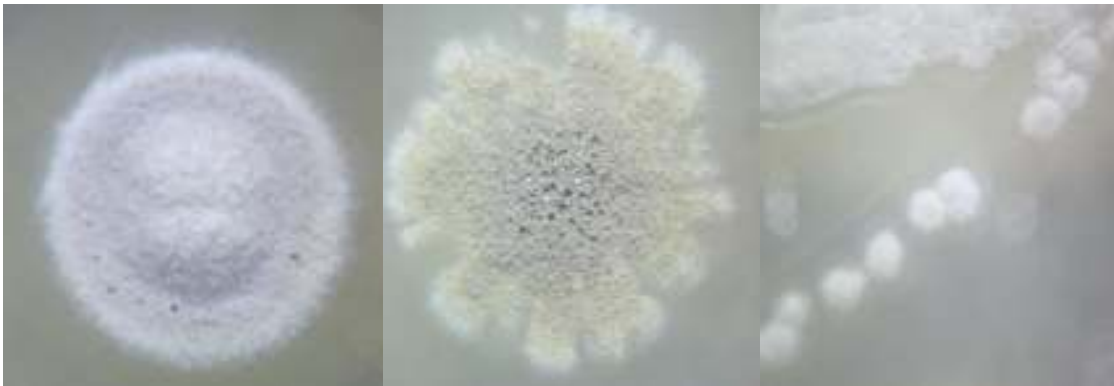
14 días

***F1**

AN

AAI

XGAL



14 días

***YA4**

AN

AAI

XGAL



14 días

***AB7**

AN

AAI

XGAL



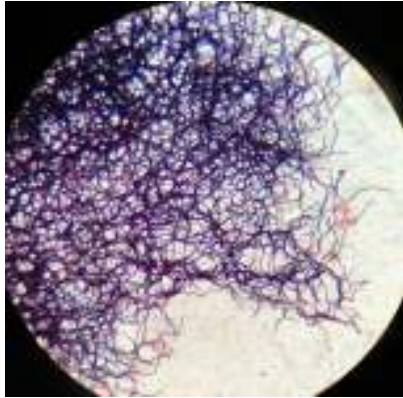
14 días

*No se obtuvieron fotos a los 7 días.

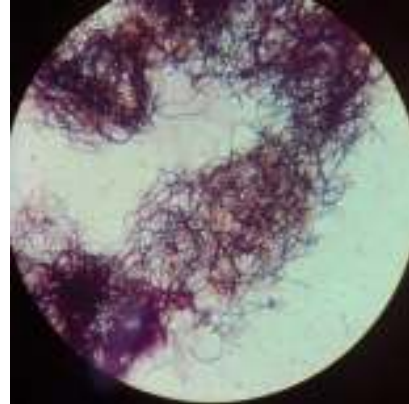
Fotos 2

Características Microscópicas

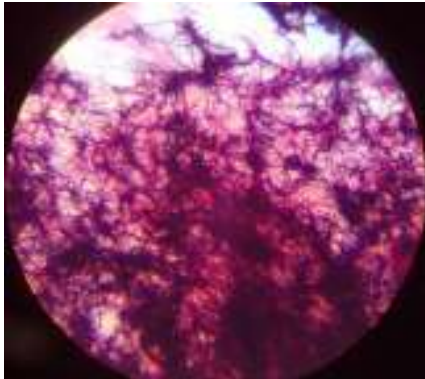
6b



6c



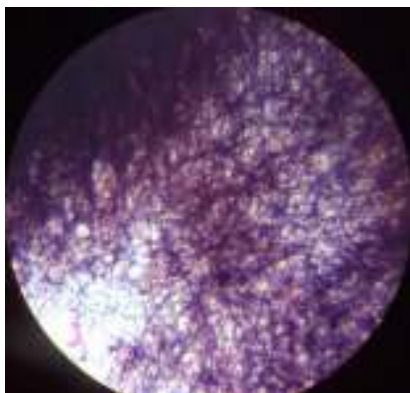
6d



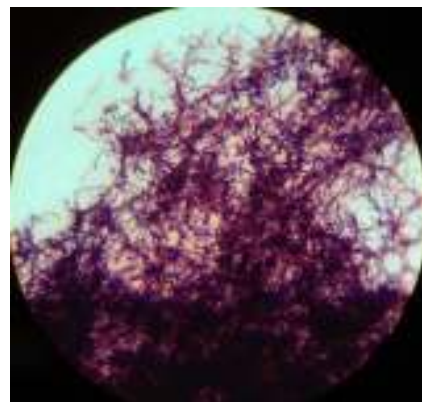
6E1



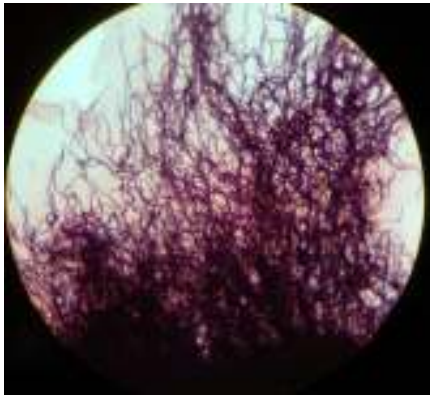
6E3



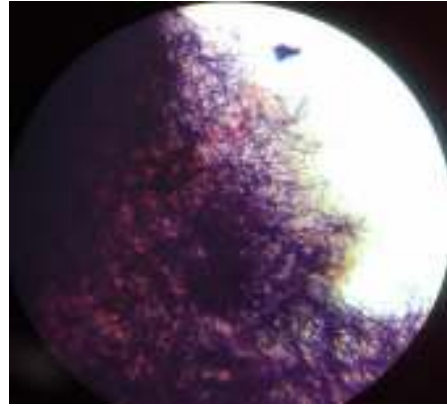
11.1



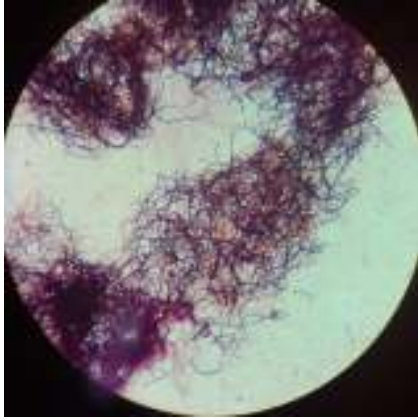
21



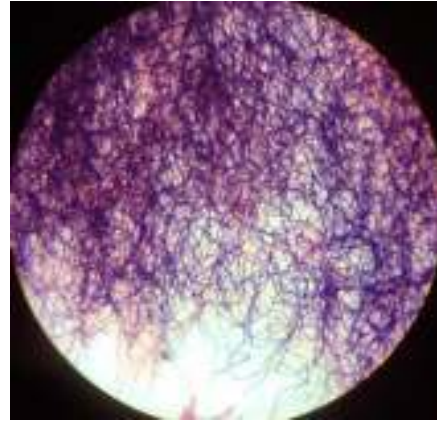
C2



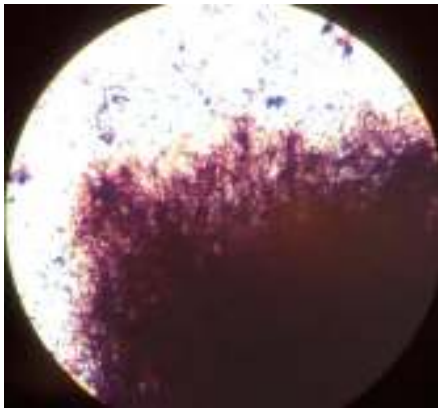
E1



F



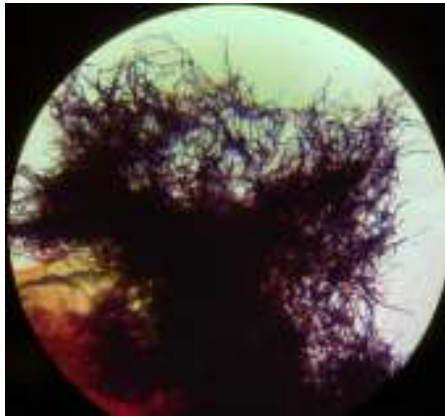
F1



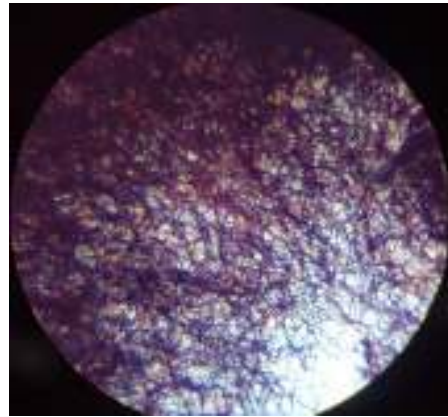
Frep 13



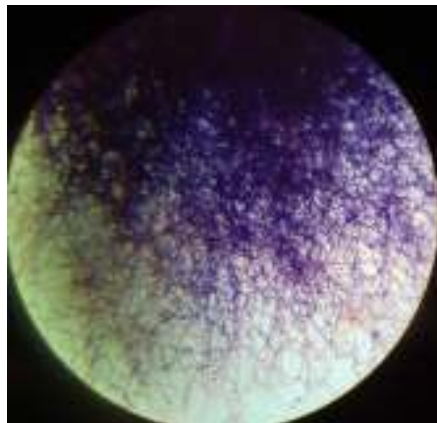
Frep 14



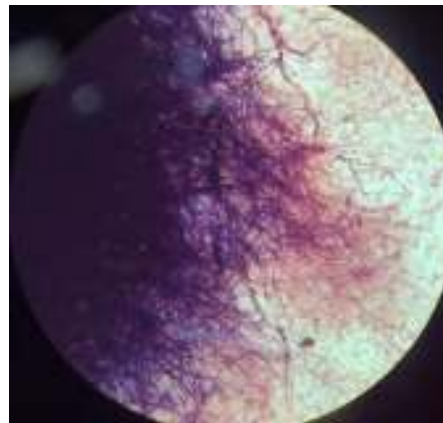
Frep 15



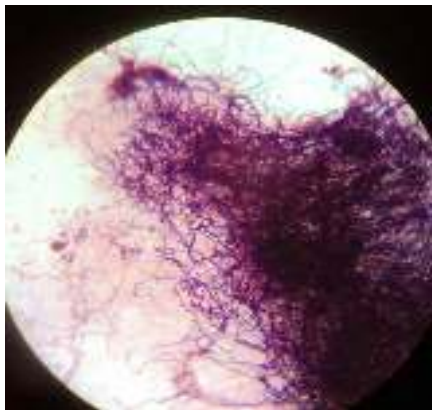
Fe5



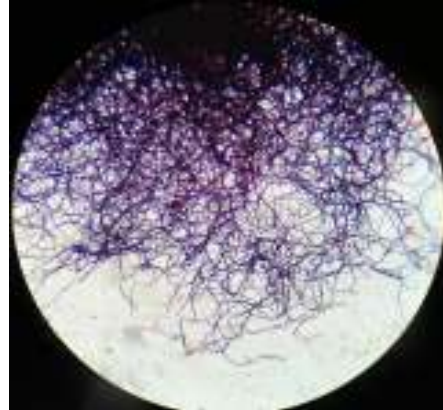
K1A



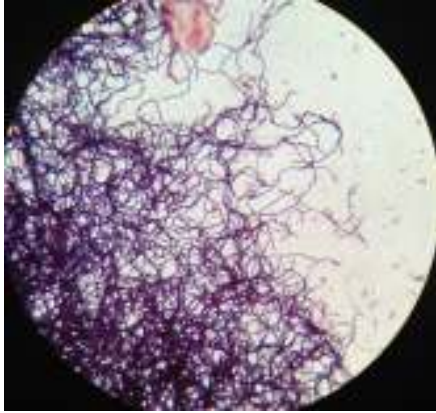
K1B



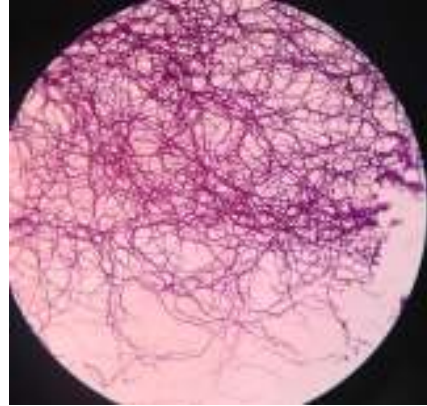
K2



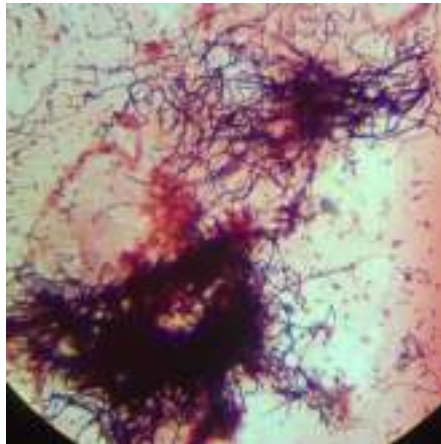
X



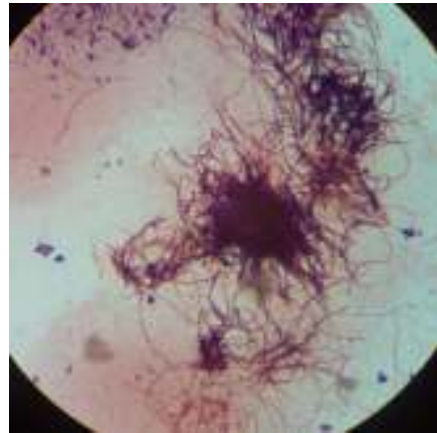
YA4



Y16



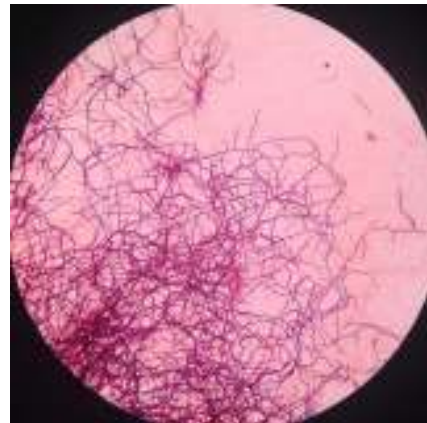
AB5



AB7



K4



Fotos 3

Prueba de Germinación y Crecimiento Vegetal

Medicago sativa (Alfalfa)

Streptomyces variabilis (AB5)

Cu 10 ppm



Cu 50 ppm



Cu 100 ppm



Cu 200 ppm



Fe 10 ppm



Fe 50 ppm



Fe 100 ppm



Fe 200 ppm



Zn 10 ppm



Zn 50 ppm



Zn 100 ppm



Zn 200 ppm



Cd 10 ppm



Cd 50 ppm



Cd 100 ppm



Cd 200 ppm



Streptomyces variabilis (X)

Cu 10 ppm



Cu 50 ppm



Cu 100 ppm



Cu 200 ppm



Fe 10 ppm



Fe 50 ppm



Fe 100 ppm



Fe 200 ppm



Zn 10 ppm



Zn 50 ppm



Zn 100 ppm



Zn 200 ppm



Cd 10 ppm



Cd 50 ppm



Cd 100 ppm



Cd 200 ppm



Streptomyces sp. (K2)

Cu 10 ppm



Cu 50 ppm



Cu 100 ppm



Cu 200 ppm



Fe 10 ppm



Fe 50 ppm



Fe 100 ppm



Fe 200 ppm



Zn 10 ppm



Zn 50 ppm



Zn 100 ppm



Zn 200 ppm



Cd 10 ppm



Cd 50 ppm



Cd 100 ppm



Cd 200 ppm



Streptomyces Heilongjiangensis (C2)

Cu 10 ppm



Cu 50 ppm



Cu 100 ppm



Cu 200 ppm



Fe 10 ppm



Fe 50 ppm



Fe 100 ppm



Fe 200 ppm



Zn 10 ppm



Zn 50 ppm



Zn 100 ppm



Zn 200 ppm



Cd 10 ppm



Cd 50 ppm



Cd 100 ppm



Cd 200 ppm



Streptomyces sp. (E1)

Cu 10 ppm



Cu 50 ppm



Cu 100 ppm



Cu 200 ppm



Fe 10 ppm



Fe 50 ppm



Fe 100 ppm



Fe 200 ppm



Zn 10 ppm



Zn 50 ppm



Zn 100 ppm



Zn 200 ppm



Fotos 4

Prueba de Germinación y Crecimiento Vegetal

Lactuca sativa (Lechuga)

Streptomyces variabilis (AB5)

Cu 10 ppm



Cu 50 ppm



Cu 100 ppm



Cu 200 ppm



Fe 10 ppm



Fe 50 ppm



Fe 100 ppm



Fe 200 ppm



Zn 10 ppm



Zn 50 ppm



Zn 100 ppm



Zn 200 ppm



Cd 10 ppm



Cd 50 ppm



Cd 100 ppm



Cd 200 ppm



Streptomyces variabilis (X)

Cu 10 ppm



Cu 50 ppm



Cu 100 ppm



Cu 200 ppm



Fe 10 ppm



Fe 50 ppm



Fe 100 ppm



Fe 200 ppm



Zn 10 ppm



Zn 50 ppm



Zn 100 ppm



Zn 200 ppm



Cd 10 ppm



Cd 50 ppm



Cd 100 ppm



Cd 200 ppm



Streptomyces sp. (K2)

Cu 10 ppm



Cu 50 ppm



Cu 100 ppm



Cu 200 ppm



Fe 10 ppm



Fe 50 ppm



Fe 100 ppm



Fe 200 ppm



Zn 10 ppm



Zn 50 ppm



Zn 100 ppm



Zn 200 ppm



Cd 10 ppm



Cd 50 ppm



Cd 100 ppm



Cd 200 ppm



Streptomyces Heilongjiangensis (C2)

Cu 10 ppm



Cu 50 ppm



Cu 100 ppm



Cu 200 ppm



Fe 10 ppm



Fe 50 ppm



Fe 100 ppm



Fe 200 ppm



Zn 10 ppm



Zn 50 ppm



Zn 100 ppm



Zn 200 ppm



Cd 10 ppm



Cd 50 ppm



Cd 100 ppm



Cd 200 ppm



Streptomyces sp. (E1)

Cu 10 ppm



Cu 50 ppm



Cu 100 ppm



Cu 200 ppm



Fe 10 ppm



Fe 50 ppm



Fe 100 ppm



Fe 200 ppm



Zn 10 ppm



Zn 50 ppm



Zn 100 ppm



Zn 200 ppm



Cd 10 ppm



Cd 50 ppm



Cd 100 ppm



Cd 200 ppm



Tabla 1. Características morfológicas a nivel macroscópico de las 24 cepas de actinomicetos en medio Agar Nutritivo (AN) a 14 días.

Géneros	Cepas	Micelio Aéreo	Micelio del Sustrato	Pigmento	Borde	Aspecto
<i>Streptomyces heilongjiangensis</i>	6b	Plomo/Blanco	Crema	Verde	Entero con anillos concéntricos	Pulverulenta
<i>Streptomyces sp.</i>	6c	Crema	Crema	-	Entero	Costrosa
<i>Streptomyces sp.</i>	6d	Blanco/Plomo	Crema	Verde	Entero	Pulverulenta
<i>Streptomyces sp.</i>	6E1	Plomo	Crema	Verde	Entero con anillos concéntricos	Pulverulenta
<i>Streptomyces sp.</i>	6E3	Plomo/Blanco	Crema	Verde	Irregular	Pulverulenta
<i>Streptomyces sp.</i>	11.1	Crema	Crema	-	Entero	Costrosa
<i>Streptomyces variabilis</i>	21	Plomo/Blanco	Verde	-	Entero	Pulverulenta
<i>Streptomyces heilongjiangensis</i>	C2	Plomo/Blanco	Crema	Verde	Entero con anillos concéntricos	Pulverulenta
<i>Streptomyces sp.</i>	E1	Blanco/Crema/Plomo	Crema	Rosado	Entero	Pulverulenta
<i>Streptomyces variabilis</i>	F	Plomo	Plomo	-	Entero	Pulverulenta

Tablas de Resultados

ANEXO 2

<i>Streptomyces sp.</i>	F1	Plomo/Blanco	Crema	Verde	Entero	Pulverulenta
<i>Streptomyces champavatii</i> .	Frep13	Plomo/Blanco	Verde	-	Entero con anillos concéntricos	Pulverulenta
<i>Streptomyces heilongjiangensis</i>	Frep14	Plomo/Blanco	Verde	-	Entero	Pulverulenta
<i>Streptomyces peruviansis</i>	Frep15	Crema	Marrón	-	Ondulado	Costrosa
<i>Actinomadura sp.</i>	Fe5	Crema	Crema	-	Entero	Costrosa
<i>Streptomyces variabilis</i>	K1A	Plomo/Blanco	Crema	Verde	Irregular	Pulverulenta
<i>Streptomyces thermocarboxydus</i>	K1B	Plomo/Blanco	Crema	Verde	Entero	Pulverulenta
<i>Streptomyces matensis</i>	K2	Plomo/Blanco	Crema	Verde	Irregular	Pulverulenta
<i>Streptomyces sp.</i>	X	Plomo/Blanco	Crema	Verde	Irregular	Pulverulenta
<i>Streptomyces variabilis</i>	YA4	Blanco/Verde	Verde	-	Entero	Pulverulenta
<i>Streptomyces albidoflavus</i>	Y16	Plomo	Crema	-	Entero con anillos concéntricos	Pulverulenta
<i>Streptomyces heilongjiangensis</i>	AB5	Plomo/Blanco	Crema	Verde	Irregular	Pulverulenta
<i>Streptomyces sp.</i>	AB7	Plomo/Blanco	Crema	Verde	Entero	Pulverulenta
<i>Streptomyces sp.</i>	K4	Plomo	Crema	Verde	Irregular	Pulverulenta

*-: No hay producción.

Tabla 2. Características morfológicas a nivel macroscópico de las 24 cepas de actinomicetos en medio Agar Glicerol Extracto de Levadura (XGAL) a los 14 días.

Géneros	Cepas	Micelio Aéreo	Micelio del Sustrato	Pigmento	Borde	Aspecto
<i>Streptomyces heilongjiangensis</i>	6b	Plomo/Blanco/Crema	Crema	Verde	Irregular	Pulverulenta
<i>Streptomyces sp.</i>	6c	Caramelo/Plomo	Crema	Marrón	Entero	Pulverulenta
<i>Streptomyces sp.</i>	6d	Plomo/Blanco	Crema	-	Ondulado	Pulverulenta
<i>Streptomyces sp.</i>	6E1	Plomo	Rojo	-	Ondulado	Pulverulenta
<i>Streptomyces sp.</i>	6E3	Plomo	Rojo	-	Irregular	Pulverulenta
<i>Streptomyces sp.</i>	11.1	Blanco	Crema	-	Irregular	Costrosa
<i>Streptomyces variabilis</i>	21	Plomo/Blanco	Crema	-	Irregular	Pulverulenta
<i>Streptomyces heilongjiangensis</i>	C2	Plomo/Blanco	Crema	-	Ondulado	Pulverulenta
<i>Streptomyces sp.</i>	E1	Blanco/Rojo	Plomo/Rojo	-	Entero	Pulverulenta
<i>Streptomyces variabilis</i>	F	Plomo/Blanco	Rojo	-	Entero	Pulverulenta

<i>Streptomyces sp.</i>	F1	Blanco/Crema	Crema	Verde	Entero	Pulverulenta
<i>Streptomyces champavatii</i> .	Frep13	Blanco/Caramelo	Crema	Verde	Entero	Pulverulenta
<i>Streptomyces heilongjiangensis</i>	Frep14	Plomo/Blanco	Crema	-	Entero	Pulverulenta
<i>Streptomyces peruviansis</i>	Frep15	Caramelo	Caramelo	-	Ondulado	Pulverulenta
<i>Actinomadura sp.</i>	Fe5	Blanco	Blanco	-	Entero	Pulverulenta
<i>Streptomyces variabilis</i>	K1A	Blanco/Crema	Rojo	-	Ondulado	Pulverulenta
<i>Streptomyces thermocarboxydus</i>	K1B	Plomo	Rojo	-	Irregular	Pulverulenta
<i>Streptomyces matensis</i>	K2	Plomo/Blanco	Crema	Rojo	Entero	Pulverulenta
<i>Streptomyces sp.</i>	X	Plomo/Blanco	Rojo	-	Entero	Pulverulenta
<i>Streptomyces variabilis</i>	YA4	Crema/Verde	Crema	-	Irregular	Pulverulenta
<i>Streptomyces albidoflavus</i>	Y16	Plomo/ Blanco	Crema	-	Ondulado	Pulverulenta
<i>Streptomyces heilongjiangensis</i>	AB5	Plomo/Blanco	Rojo	-	Entero	Pulverulenta
<i>Streptomyces sp.</i>	AB7	Plomo/Blanco	Crema	Verde	Entero	Pulverulenta
<i>Streptomyces sp.</i>	K4	Blanco/Crema	Crema	-	Entero	Pulverulenta

*-: No hay producción.

Tabla 3. Características morfológicas a nivel macroscópico de las 24 cepas de actinomicetos en medio Agar Almidón de Sales Inorgánicas (AAI) a los 14 días.

Géneros	Cepas	Micelio Aéreo	Micelio del Sustrato	Pigmento	Borde	Aspecto
<i>Streptomyces heilongjiangensis</i>	6b	Plomo	Verde	Verde	Irregular	Pulverulenta
<i>Streptomyces sp.</i>	6c	Plomo/Marrón	Caramelo	Marrón	Irregular	Pulverulenta
<i>Streptomyces sp.</i>	6d	Plomo/Blanco	Crema	Verde	Irregular	Pulverulenta
<i>Streptomyces sp.</i>	6E1	Plomo	Crema	Verde	Entero con anillos concéntricos	Pulverulenta
<i>Streptomyces sp.</i>	6E3	Plomo	Crema	Verde	Irregular	Pulverulenta
<i>Streptomyces sp.</i>	11.1	Verde	Amarillo	-	Entero	Costrosa
<i>Streptomyces variabilis</i>	21	Plomo Claro	Verde	Verde	Irregular	Pulverulenta
<i>Streptomyces heilongjiangensis</i>	C2	Plomo	Crema	Verde	Entero con anillos concéntricos	Pulverulenta
<i>Streptomyces sp.</i>	E1	Plomo	Crema/Plomo	-	Entero	Pulverulenta
<i>Streptomyces variabilis</i>	F	Plomo	Plomo	Verde	Irregular	Pulverulenta

<i>Streptomyces sp.</i>	F1	Plomo/ Blanco	Crema	Verde	Ondulado	Pulverulenta
<i>Streptomyces champavatii</i> .	Frep13	Blanco/Verde	Marrón	Verde	Entero con anillos concéntricos	Pulverulenta
<i>Streptomyces heilongjiangensis</i>	Frep14	Plomo	Crema	Verde	Irregular	Pulverulenta
<i>Streptomyces peruviansis</i>	Frep15	Blanco/Plomo	Crema	Verde	Entero	Pulverulenta
<i>Actinomadura sp.</i>	Fe5	Blanco	Blanco	-	Entero	Pulverulenta
<i>Streptomyces variabilis</i>	K1A	Plomo/ Blanco	Crema	Verde	Irregular	Pulverulenta
<i>Streptomyces thermocarboxydus</i>	K1B	Plomo	Crema	Verde	Irregular	Pulverulenta
<i>Streptomyces matensis</i>	K2	Plomo	Crema	Verde	Irregular	Pulverulenta
<i>Streptomyces sp.</i>	X	Plomo/Blanco	Crema	Verde	Entero	Pulverulenta
<i>Streptomyces variabilis</i>	YA4	Blanco/Verde	Crema/Verde	-	Entero	Pulverulenta
<i>Streptomyces albidoflavus</i>	Y16	Plomo/Blanco	Crema	Verde	Irregular	Pulverulenta
<i>Streptomyces heilongjiangensis</i>	AB5	Plomo	Verde	-	Entero	Pulverulenta
<i>Streptomyces sp.</i>	AB7	Plomo	Crema/Verde	-	Irregular	Pulverulenta
<i>Streptomyces sp.</i>	K4	Plomo	Crema	Verde	Irregular	Pulverulenta

*-: No hay producción.

Tabla 4. Características bioquímicas de las cepas de actinomicetos (RM, Rojo de Metilo; VP, Voges Proskauer; LIA, Agar Hierro Lisina; TSI, Triple Azúcar Hierro; +, positivo; -, negativo).

Géneros	Cepas	RM	VP	Citrato	LIA	*TSI	*Almidón	Catalasa	Gelatina
<i>Streptomyces heilongjiangensis</i>	6b	+	-	-	+	K/K	+ 0.1 cm	+	-
<i>Streptomyces sp.</i>	6c	+	-	+	+	K/K	+ 1.7 cm	+	-
<i>Streptomyces sp.</i>	6d	+	-	+	+	K/K producción de gas	+ 2 cm	+	-
<i>Streptomyces sp.</i>	6E1	+	-	-	+	K/K	+ 0.2 cm	+	-
<i>Streptomyces sp.</i>	6E3	-	+	-	+	K/A	+ 0.3 cm	+	-
<i>Streptomyces sp.</i>	11.1	-	+	-	-	A/A producción de gas	- -	+	-
<i>Streptomyces variabilis</i>	21	+	-	-	-	K/A	+ 0.5 cm	+	-
<i>Streptomyces heilongjiangensis</i>	C2	+	-	-	+	K/K	+ 1.5 cm	+	-
<i>Streptomyces sp.</i>	E1	-	+	+	+	K/K producción de gas	+ 0.2 cm	+	-
<i>Streptomyces variabilis</i>	F	+	-	-	+	K/K	+ 0.3 cm	+	-

<i>Streptomyces sp.</i>	F1	-	+	-	+	K/K	+	0.5 cm	+	+
<i>Streptomyces champavatii</i> .	Frep13	-	+	-	+	K/K	+	0.3 cm	+	+
<i>Streptomyces heilongjiangensis</i>	Frep14	+	-	-	+	K/K	+	1.2 cm	+	-
<i>Streptomyces peruviansis</i>	Frep15	+	-	-	+	producción de sulfuro	+	0.2 cm	+	-
<i>Actinomadura sp.</i>	Fe5	+	-	-	+	K/K producción de gas	+	0.1 cm	+	-
<i>Streptomyces variabilis</i>	K1A	-	+	-	+	K/K	+	0.3 cm	+	+
<i>Streptomyces thermocarboxydus</i>	K1B	-	+	-	+	K/K	+	0.3 cm	+	-
<i>Streptomyces matensis</i>	K2	+	-	-	+	K/K	+	0.5 cm	+	+
<i>Streptomyces sp.</i>	X	-	+	-	+	K/K	+	2.2 cm	+	-
<i>Streptomyces variabilis</i>	YA4	-	+	-	+	A/A	+	1.7 cm	+	-
<i>Streptomyces albidoflavus</i>	Y16	-	+	+	+	K/K	+	0.3 cm	+	-
<i>Streptomyces heilongjiangensis</i>	AB5	+	-	-	+	A/A	+	0.3 cm	+	-
<i>Streptomyces sp.</i>	AB7	-	+	-	+	K/K	-	-	+	-
<i>Streptomyces sp.</i>	K4	-	+	-	+	K/K	+	0.5 cm	+	-

Datos incluyen medición del halo de degradación de almidón en centímetros

*TSI: K/K, no hay fermentación de lactosa, sacarosa y glucosa.; K/A, no fermentación de lactosa, solo de glucosa; A/A, fermentación de lactosa, sacarosa y glucosa.

<i>Streptomyces sp.</i>	F1	3	3	3	3	3	3	2	1
<i>Streptomyces champavatii</i> .	Frep13	3	3	3	3	3	3	3	2
<i>Streptomyces heilongjiangensis</i>	Frep14	3	3	3	3	2	2	2	2
<i>Streptomyces peruviansis</i>	Frep15	3	3	3	3	3	2	2	2
<i>Actinomadura sp.</i>	Fe5	3	3	3	3	2	1	1	1
<i>Streptomyces variabilis</i>	K1A	3	3	3	3	3	2	2	1
<i>Streptomyces thermocarboxydis</i>	K1B	3	3	3	3	3	3	2	2
<i>Streptomyces matensis</i>	K2	3	3	3	3	3	3	2	1
<i>Streptomyces sp.</i>	X	3	3	3	3	3	2	1	1
<i>Streptomyces variabilis</i>	YA4	3	3	3	3	3	3	3	2
<i>Streptomyces albidoflavus</i>	Y16	3	3	3	3	3	2	2	1
<i>Streptomyces heilongjiangensis</i>	AB5	3	3	3	3	3	3	2	2
<i>Streptomyces sp.</i>	AB7	3	3	3	3	3	2	2	1
<i>Streptomyces sp.</i>	K4	3	3	3	3	3	3	2	1

Tabla 6: Evaluación del crecimiento de las cepas de actinomicetos a diferentes concentraciones de metales (3, Crecimiento abundante; 2, Crecimiento regular; 1, Poco crecimiento; 0, Ausencia de crecimiento)

Géneros	Cepas	Mercurio (ppm)				Zinc (ppm)				Hierro (ppm)				Cobre (ppm)				Plomo (ppm)				Cadmio (ppm)				Control		
		10	50	100	200	10	50	100	200	10	50	100	200	10	50	100	200	10	50	100	200	400*	800*	10	50		100	200
<i>Streptomyces heilongjiangensis</i>	6b	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	0	3
<i>Streptomyces sp.</i>	6c	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	-	-	1	1	1	1	3
<i>Streptomyces sp.</i>	6d	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	-	-	1	0	0	0	3
<i>Streptomyces sp.</i>	6E1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	-	-	1	0	0	0	3
<i>Streptomyces sp.</i>	6E3	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	-	-	1	1	0	0	3
<i>Streptomyces sp.</i>	11.1	1	0	0	0	1	1	1	0	3	3	1	0	1	1	0	0	3	3	3	3	-	-	1	0	0	0	3
<i>Streptomyces variabilis</i>	21	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	0	0	1	1	1	1	2	2	2	0	-	-	1	0	0	0	3
<i>Streptomyces heilongjiangensis</i>	C2	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	2	2	2	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	3
<i>Streptomyces sp.</i>	E1	1	1	1	1	3	3	3	3	3	3	2	2	3	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	3
<i>Streptomyces variabilis</i>	F	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	2	2	2	0	-	-	1	0	0	0	3

<i>Streptomyces sp.</i>	F1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	2	2	2	0	-	-	1	0	0	0	3
<i>Streptomyces champavatii</i>	Frep13	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	-	-	1	0	0	0	3
<i>Streptomyces heilongjiangensis</i>	Frep14	1	1	1	1	1	0	0	0	3	3	1	1	1	1	0	0	2	2	2	2	2	2	1	1	1	0	3
<i>Streptomyces peruviansis</i>	Frep15	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2	0	0	1	0	0	0	3	3	3	3	-	-	1	0	0	0	3
<i>Actinomadura sp.</i>	Fe5	1	0	0	0	2	1	0	0	3	2	0	0	1	0	0	0	2	1	0	0	-	-	0	0	0	0	3
<i>Streptomyces variabilis</i>	K1A	1	1	0	0	2	1	0	0	2	1	0	0	1	1	1	1	2	2	2	0	-	-	1	0	0	0	3
<i>Streptomyces thermocarboxydus</i>	K1B	1	0	0	0	1	1	1	1	3	3	0	0	1	0	0	0	3	3	3	3	-	-	1	0	0	0	3
<i>Streptomyces matensis</i>	K4	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	3	3	3	3	-	-	1	0	0	0	3
<i>Streptomyces sp.</i>	K2	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	2	2	1	1	1	1	3	1	1	3	2	2	1	1	1	1	3
<i>Streptomyces variabilis</i>	X	1	1	1	1	2	1	1	1	3	2	1	1	1	1	1	1	3	3	3	3	2	1	2	1	1	1	3
<i>Streptomyces albidoflavus</i>	YA4	1	0	0	0	1	1	1	0	3	3	1	0	1	0	0	0	3	3	3	3	-	-	1	1	0	0	3
<i>Streptomyces heilongjiangensis</i>	Y16	1	1	1	1	1	1	1	0	3	2	1	1	1	1	0	0	3	3	3	3	1	1	1	1	1	0	3
<i>Streptomyces sp.</i>	AB5	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	2	2	2	1	1	1	3	3	3	3	2	1	1	1	1	1	3
<i>Streptomyces sp.</i>	AB7	1	0	0	0	1	1	0	0	3	3	2	0	1	1	0	0	3	3	3	3	-	-	1	0	0	0	3

* :400 y 800 ppm probadas solo en el caso del plomo, debido a que las cepas mostraron alta sensibilidad a concentraciones bajas de los otros metales;
- : No fueron evaluados

ANEXO 3

Medios de Cultivo, Diluyente, Soluciones Nutritivas, Coloración Gram y Esterilización de Semillas

1.- Medio Glicerol Extracto de Levadura Agar (XGal) (216)

Glicerol	5.0 ml
Extracto de Levadura	2.0 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 ml
Nistatina	1 ml
pH	7

2.- Medio Nutritivo Agar (AN) (216)

Extracto de res	3.0 g
Peptona	5.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 ml
Nistatina	1 ml
pH	7

3.- Medio Almidón de Sales Inorgánicas Agar (AAI) (217, 242)

Solución I:

Disolver 10 gramos de almidón en una pequeña cantidad de agua destilada fría y llevarla a un volumen de 500 ml.

Solución II:

K_2HPO_4	1.0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.0 g
NaCl	1.0 g
$(NH_4)_2SO_4$	2.0 g
$CaCO_3$	2.0 g
Agua destilada	500 ml
*Solución de sales traza	1 ml
Ajustar el pH	7.0 – 7.4

Mezclar la suspensión de almidón
(Solución I) y la solución de sales
(Solución II).

Agregar Agar	15 g
--------------	------

***Solución de sales Trazas**

FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.1 g
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0.1 g
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.1 g
Agua destilada	100 ml

4.- Medio Tryptic Soy Broth (TSB) (242)

Bacto Tryptone	17,0 g
(digerido pancreático de caseína)	
Bacto Soytone	3,0 g
(digerido péptico de harina de soja)	
Glucosa (dextrosa)	2,5 g
Cloruro sódico	5,0 g
Fosfato dipotásico de hidrógeno	2,5 g
Agua destilada	1000 ml

5.- Medio RMVP Caldo (242)

Polipeptona	7,0 g
Glucosa	5,0 g
Fosfato dipotásico	5,0 g
Agua destilada	1000 ml
pH	6,9

* Se requiere de soluciones indicadores para la revelación de la prueba: Rojo de metilo, α - naftol y KOH.

6.- Medio Simmons Citrato Agar (242)

Citrato de sodio	2,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Fosfato dipotásico	1,0 g
Fosfato monoamónico	1,0 g
Sulfato de magnesio	0,2 g
Azul de bromotimol	0.08 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1000 ml
pH	6.9 \pm 0.2

7.- Medio Lisina Hierro Agar (242)

Peptona de gelatina	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Glucosa	1,0 g
Lisina	10,0 g
Citrato de hierro y amonio	0,5 g
Tiosulfato de sodio	0.04 g
Púrpura de brocmocresol	0,02 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1000 ml
pH	6.7 ± 0.2

8.- Hierro-Triple Azúcar Agar (TSI) (242)

Extracto de carne	3,0 g
Pluripeptona	20,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Lactosa	10,0 g
Sacarosa	10,0 g
Glucosa	1,0 g

Sulfato de hierro y amonio	0,2 g
Tiosulfato de sodio	0,2 g
Rojo de fenol	0.025 g
Agar	13,0 g
Agua destilada	1000 ml
pH	7.3 ± 0.2

9.- Medio Gelatina Agar (Gel) (242)

Extracto de res	3,0 g
Peptona	5,0 g
Gelatina	120,0 g
Agua destilada	1000 ml
pH	7

10.- Medio Almidón Agar (AA) (242)

Extracto de res	3,0 g
Almidón	10,0 g
Agar	12,0 g
Agua destilada	1000 ml
pH	7

11.- Medio Caldo Glicerol Extracto de Levadura (XGal) (216)

Glicerol	5.0 ml
Extracto de Levadura	2.0 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
Agua destilada	1000 ml
Nistatina	1 ml
pH	7

12.- Medio Caldo Glicerol Extracto de Levadura (XGal) con 1.5% NaCl (216)

Glicerol	5.0 ml
Extracto de Levadura	2.0 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
NaCl	15 g
Agua destilada	1000 ml
Nistatina	0.5%
pH	7

13.- Medio Caldo Glicerol Extracto de Levadura (XGal) con 5% NaCl (216)

Glicerol	5.0 ml
Extracto de Levadura	2.0 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
NaCl	50 g
Agua destilada	1000 ml
Nistatina	0.5%
pH	7

14.- Medio Caldo Glicerol Extracto de Levadura (XGal) con 7% NaCl (216)

Glicerol	5.0 ml
Extracto de Levadura	2.0 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
NaCl	70 g
Agua destilada	1000 ml
Nistatina	0.5%
pH	7

15.- Medio Caldo Glicerol Extracto de Levadura (XGal) con 10% NaCl (216)

Glicerol	5.0 ml
Extracto de Levadura	2.0 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
NaCl	100 g
Agua destilada	1000 ml
Nistatina	0.5%
pH	7

**16.- Medio Glicerol Extracto de Levadura Agar (XGal) con metales pesados
(34,216)**

Glicerol	5.0 ml
Extracto de Levadura	2.0 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 ml
Nistatina	0.5%
pH	7

***Solución Stock Madre (2000 ppm)**

Sulfato de Cobre	2g
Agua destilada	1000 ml

* El medio XGAL se autoclava y la solución stock madre se esteriliza mediante filtración.

*10 ppm: 5 ml de la solución stock madre + 995 ml del medio XGAL

50 ppm: 25 ml de la solución stock madre + 975 ml del medio XGAL

100 ppm: 50 ml de la solución stock madre + 950 ml del medio XGAL

200 ppm: 100 ml de la solución stock madre + 900 ml del medio XGAL

400 ppm: 200 ml de la solución stock madre + 800 ml del medio XGAL

800 ppm: 400 ml de la solución stock madre + 600 ml del medio XGAL

Este mismo procedimiento se realiza para sulfato de hierro, sulfato de zinc, cloruro de cadmio, cloruro de mercurio y acetato de plomo.

17.- Soluciones con Metales para Semillas (34)

Solución Stock Madre (2000 ppm)

Sulfato de Cobre	2g
Agua destilada	1000 ml

* La solución stock madre se esteriliza mediante filtración.

*10 ppm:	5 ml de la solución stock madre	+	995 ml de agua destilada estéril
50 ppm:	25 ml de la solución stock madre	+	975 ml de agua destilada estéril
100 ppm:	50 ml de la solución stock madre	+	950 ml de agua destilada estéril
200 ppm:	100 ml de la solución stock madre	+	900 ml de agua destilada estéril
400 ppm:	200 ml de la solución stock madre	+	800 ml de agua destilada estéril
800 ppm:	400 ml de la solución stock madre	+	600 ml de agua destilada estéril

Este mismo procedimiento se realiza para sulfato de hierro, sulfato de zinc, cloruro de cadmio, cloruro de mercurio y acetato de plomo.

18.- Coloración Gram (245)

- Cristal Violeta
- Lugol
- Alcohol acetona
- Safranina

Metodología

- 1.- Fijar una muestra de cultivo bacteriano
- 2.- Agregar cristal violeta, esperar 1 minuto y enjuagar con agua
- 3.- Agregar lugol, esperar 1 minuto y enjuagar con agua
- 4.- Decolorar la muestra fijada con alcohol-acetona y enjuagar con abundante agua
- 5.- Agregar el colorante de contraste, safranina y esperar 40 segundos
- 6.- Enjuagar con agua, esperar a que la preparación seque y observar en el microscopio

19.- Esterilización de Semillas (235,236,237)

- Lavar con alcohol de 96°C durante 2 a 5 minutos.
- Lavar con hipoclorito comercial durante 5 minutos.
- Lavar con agua destilada estéril durante 5 minutos.
- Repetir 4 veces el último paso.

ANEXO 4

Extracción y Amplificación de ADN

1.- Extracción de ADN (220, 221)

- Preparar la cámara de flujo (ESCO clase II tipo AB), en la cual se realiza todo el procedimiento de la extracción de ADN.
- Agregar 1.5 mL del cultivo bacteriano en un eppendorf estéril Axygen.
- Centrifugar (Thermo Scientific Micro CL21) por 5 minutos a 12 000 rpm.
- Descartar el sobrenadante.
- Agregar 500 μ L de Buffer de Lisis (SDS, TRIS – HCl, EDTA) en el eppendorf que contiene el pellet.
- Vortexear por 5 segundos.
- Agregar la mezcla en un vial estéril que contiene los Bits/Perlas de sílica de 0.1 mm Zirconio (permiten romper las células).
- Colocar el vial en el equipo Fast Prep FP 120 (Bio101-Thermo Savant) por 6 veces, cada uno por 20 segundos a velocidad 6.
- Centrifugar el vial por 5 minutos a 10 000 rpm.
- Pasar el sobrenadante a un eppendorf estéril Axygen.
- Agregar 385 μ L de Acetato de Potasio 5M para separar el ADN.

- Colocar el eppendorf a 65°C en baño maría (Fisher Scientific – Dry bath incubator) por 5 minutos.
- Vortexear por 5 segundos.
- Colocar el eppendorf en hielo por 5 minutos.
- Agregar 500 µL de Cloroformo para separar residuos.
- Vortexear por 5 segundos.
- Centrifugar por 5 minutos a 10 000 rpm.
- Pasar el sobrenadante a un eppendorf estéril.
- Agregar 1ml de Isopropanol, el cual compite con la molécula de H₂O permitiendo precipitar la molécula de ADN.
- Vortex por 5 segundos
- Colocar el eppendorf en la nevera por 5 minutos para ayuda a precipitar el ADN.
- Centrifugar por 5 minutos a 10 000 rpm.
- Descartar el sobrenadante.
- Agregar 100 µL de Etanol al 70% para humedecer.
- Centrifugar por 5 minutos a 10 000 rpm para poder visualizar del ADN como pellet.
- Descartar el sobrenandate.
- Dejar secar bien.
- Resuspender el ADN en 50 µL de Elution Buffer.

2.- Corrida Electroforética de la Extracción de ADN (220, 221)

- Preparar el gel de agarosa al 1% (1gr en 100 mL de TAEX 1X).
- Verter el preparado al soporte de la cámara de electroforesis.
- Dejar gelificar
- Colocar el soporte en la cámara de electroforesis.
- Diluir el ADN extraído 1 en 10 en un eppendorf estéril Axygen: 5 μ L del ADN resuspendido en Elution Buffer en 45 μ L de Elution Buffer.
- Se tomó un pedazo de Parafilm para realizar las mezclas a correr.
- Mezclar 8 μ L de Agua para PCR, 2 μ L de Sample Buffer y 2 μ L de la muestra de ADN concentrado.
- Repetir el paso anterior pero con la muestra del ADN diluido 1/10.
- Cargar en un pocillo del gel de agarosa 10 μ L de la muestra preparada.
- Cargar en otro pocillo del gel de agarosa 4 μ L del marcador de peso molecular 1Kb.
- Cargar en otros pocillos del gel de agarosa el marcador fago Lamda 3 μ L (30 ng), 5 μ L (50 ng), 7 μ L (70 ng).
- Correr la cámara de electroforesis a 80 voltios por 45 minutos.
- Remojar el gel de agarosa en Bromuro de Etidio por 15 minutos.
- Lavar ligeramente en agua destilada.
- Colocar el gel de agarosa en el equipo de transiluminador de UV para comprobar la extracción y calidad del ADN.

- Tomar foto.

3.- Amplificación de ADN (220, 221)

- Preparar la cámara de flujo (ESCO clase II tipo AB).
- Calcular las concentraciones requeridas para trabajar según la tabla.

	[Stock]	[Final]	Volumen (100 uL)
H ₂ O PCR	-	-	60
Buffer PCR	10 x	1x	10
dNTPs	2.5mM	0.2mM	10
MgCl ₂	2.5mM	2mM	5-10
DMSO	-	10 %	10
Primer1	40uM	0.5uM	1.25
Primer2	40uM	0.5uM	1.25
Tag	5 U/μl	0.025 U/μl	0.5

- Preparar el mix en eppendorf estéril Axygen (mezclar todos los compuestos de la tabla a las concentraciones con las que se desea trabajar).
- Colocar 50 μL del mix y 1 μL del ADN extraído en eppendorf Axygen para PCR.
- Colocar en el Stear por un par de segundos para mezclar.

- Colocar en el termociclador de PCR. Los tiempos y temperaturas fueron:
 - 1er paso: 94°C por 3 minutos.
 - 2do paso: 94°C por 1 minuto.
 - 3er paso: 52 °C por 1 minuto.
 - 4to paso: 72°C por 1 minuto y 30 segundos.
 - 5to paso: repetir los pasos 2, 3 y 4 por 33 veces.
 - 6to paso: 72°C por 5 minutos
 - 7mo paso: 4°C por tiempo indeterminado para conservar la muestras por 24 o 72 horas.

4.- Corrida Electroforética de la Amplificación de ADN (220, 221)

- Preparar el gel de agarosa al 1% (1g en 100 mL de TAEX 1X).
- Verter el preparado al soporte de la cámara de electroforesis.
- Dejar gelificar
- Colocar el soporte en la cámara de electroforesis.
- Agregar 6 uL de H₂O de PCR, 4 µL del Producto Amplificado y 2 µL de Sample Buffer en un eppendorf Axygen.
- Cargar en un pocillo del gel de agarosa 10 µL de la muestra preparada.
- Cargar en otro pocillo del gel de agarosa 4 µL del marcador de peso molecular 100 bp.

- Cargar en otros pocillos del gel de agarosa el marcador lambda 4 μL (40 ng), 6 μL (60 ng), 8 μL (80 ng).
- Correr la cámara de electroforesis a 80 voltios por 45 minutos.
- Remojar el gel de agarosa en Bromuro de Etidio por 15 minutos.
- Lavar ligeramente en agua destilada.
- Colocar el gel de agarosa en el equipo de transiluminador de UV para comprobar la extracción y calidad del ADN.
- Tomar foto.

5.- Preparación de los Muestras para Secuenciar (220,221)

Los productos amplificados y primers fueron preparados para mandar a secuenciar a Macrogen. El procedimiento fue el siguiente:

- Rotular y sellar con parafilm el eppendorf que contienen el producto amplificado.
- Preparar los primers a una concentración de 10 μM con un volumen de 10 μL .
- Rotular y sellar con parafilm los eppendorf que contienen los primers.
- Enviar los primers y la muestra a Macrogen USA.

6.- Detalle de los Primers Universales Usados en este Trabajo.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Referencia
8F	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	Okibe et al., 2003 (222); Jeffrey et al., 2008 (223); Barghouthi et al., 2011 (224).
337F	GAC TCC TAC GGG AGG CWG CAG	Baker et al., 2003 (243); Jaric et al., 2013(244).
785F	GGA TTA GAT ACC CTG GTA	Jaric et al., 2013(244); Eden et al., 1991 (225).
518R	GTA TTA CCG CGG CTG CTG G	Jaric et al., 2013 (244); Jiang et al., 2006 (228).
907R	CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT	Jeffrey et al., 2008 (223); Weisburg et al., 1991 (227); Jiang et al., 2006 (228); Jaric et al., 2013 (244).
1492R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	Eden et al., 1991 (225); Paramasivam et al., 2011 (226); Weisburg et al., 1991 (227); Jiang et al., 2006 (228);

ANEXO 5

Conservación de Cepas

1.- Conservación de Cepas a -20°C (240)

- Preparar viales con 1.2 ml de medio de Tryptic Soy Broth (TSB) y 0.3 ml de glicerol (correspondiente al 20%).
- Rotular los viales con las cepas a guardar.
- Sembrar las cepas en tubos Falcon con 5 ml de medio de cultivo de TSB
- Incubar a 28°C en microaerofilia. por 7 a 14 días.
- Centrifugar a 3500 rpm por 30 minutos.
- Descartar el sobrenadante.
- Resuspender los pellets en 1.5 mL de medio TSB.
- Adicionar los pellets resuspendidos a los viales que contienen 1.2 mL de TSB y 0.3 mL de glicerol. (Concentración final de glicerol en el vial: 10%).
- Homogenizar los viales.
- Guardar a -20°C.

2.- Conservación de Cepas a -70°C (240)

- Sembrar las cepas en tubos Falcon con 5 mL de TSB.
- Incubar a 28°C por 7 a 14 días en microaerofilia.
- Centrifugar a 3500 rpm por 30 minutos.
- Descartar el sobrenadante
- Resuspender los pellets en 1 mL de TSB más glicerol al 80%.

	1 ml	10 ml
Caldo	690 ul	6.9 ml
Glicerol	310 ul	3.1 ml

- Pasar a viales.
- Homogenizar los viales.
- Guardar a -70 °C.