



“Aislamiento e identificación de bacterias endófitas productoras de ácido indolacético a partir de plantas de lenteja de agua del género *Spirodela*”

Abad Arce, Myriam Estefanía

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Flores Flor, Francisco Javier, PhD.

1 de marzo de 2021



Document Information

Analyzed document	Abad_Myriam_Tesis_I.docx (D96788724)
Submitted	2/28/2021 8:00:00 PM
Submitted by	
Submitter email	fjflores2@espe.edu.ec
Similarity	0%
Analysis address	fjflores2.espe@analysis.arkund.com

Sources included in the report



URL: [https://1library.co/document/y6eo9noz-bacterias-endofiticas-aisladas-elodea-potamo ...](https://1library.co/document/y6eo9noz-bacterias-endofiticas-aisladas-elodea-potamo...)
Fetched: 2/9/2021 2:43:45 AM



2



Firmado electrónicamente por:
FRANCISCO
JAVIER FLORES
FLOR



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, "**Aislamiento e identificación de bacterias endófitas productoras de ácido indolacético a partir de plantas de lenteja de agua del género *Spirodela***" fue realizado por la señorita **Abad Arce, Myriam Estefanía** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 1 de marzo de 2021



FRANCISCO
JAVIER FLORES
FLOR

.....
Flores Flor, Francisco Javier, PhD.

C. C.: 1713443479



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Abad Arce, Myriam Estefanía**, con cédula de ciudadanía n°1722228879, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Aislamiento e identificación de bacterias endófitas productoras de ácido indolacético a partir de plantas de lenteja de agua del género *Spirodela*”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 1 de marzo de 2021

Abad Arce, Myriam Estefanía

C.C.: 1722228879



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo, **Abad Arce, Myriam Estefanía**, con cédula de ciudadanía n°1722228879, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Aislamiento e identificación de bacterias endófitas productoras de ácido indolacético a partir de plantas de lenteja de agua del género *Spirodela*”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 1 de marzo de 2021

Abad Arce, Myriam Estefanía

C.C.: 1722228879

Dedicatoria

La presente investigación la dedico a mi familia, por su apoyo tanto emocional como económico. A mi madre, quien me dio la vida, educación, fuerza y consejos; y que ha guiado mi camino para conseguir mis objetivos. A mi hermana, quien nunca ha perdido la fe en mí y en mis capacidades. Y a mi novio Sebastián, por todo su amor y apoyo incondicional en todos estos años de mi carrera.

Agradecimiento

A Dios, por brindarme salud, paciencia y fortaleza.

A mi familia, por permitirme cumplir con excelencia el desarrollo de esta tesis.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas, por haber permitido formarme en ella y conocer a maestros extraordinarios y amigos incondicionales.

A la empresa Agrovitech, por haberme abierto las puertas y confiar en mi para seguir realizando investigación dentro de sus instalaciones.

A mi tutor, Francisco Flores, por darme la oportunidad de realizar este proyecto, compartir su conocimiento y experiencia para la realización de este trabajo y sobre todo por haberme permitido utilizar tanto equipos como reactivos del laboratorio IDgen.

A Fiana Guevara y Eduardo Moncayo, por brindarme su conocimiento y consejos durante el desarrollo de la parte molecular de este proyecto.

A Sebastián Olivo, por su motivación constante y predisposición a ayudarme cuando lo necesitaba.

Índice de Contenidos

Carátula.....	1
Urkund.....	2
Certificación.....	3
Responsabilidad de Autoría.....	4
Autorización de publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimiento	7
Índice de Contenidos.....	8
Índice de Tablas	11
Índice de Figuras.....	12
Listado de Abreviaturas	13
Resumen.....	14
Abstract.....	15
Capítulo I: Introducción.....	16
Formulación del Problema	16
Justificación	18
Objetivos.....	19
Objetivo General	19
Objetivos Específicos	20
Hipótesis	20
Capítulo II: Marco Teórico	21
Lenteja de Agua.....	21
Interacción Planta-Microorganismos	24

Bacterias Endófitas	25
Producción de Ácido Indolacético (AIA)	27
Métodos de Cuantificación de AIA	28
Métodos Moleculares para la Identificación Bacteriana.....	28
Capítulo III: Materiales y Métodos	31
Participantes del Proyecto	31
Zona de estudio	31
Periodo de investigación.....	31
Muestreo.....	31
Aislamiento de Bacterias Endófitas.....	32
Esterilización Superficial.....	32
Inoculación y Cuantificación de UFC/mL	33
Selección de Colonias	33
Obtención y Conservación de Cultivos Puros.....	33
Evaluación de la Producción de AIA	34
Determinación de Curvas de Calibración Absorbancia vs UFC/ml de Cepas.....	34
Curva Estándar de AIA.....	34
Cuantificación de la Producción in Vitro de AIA	35
Identificación Molecular de los Aislados Productores de AIA	36
Método Rápido de Extracción de DNA	36
Amplificación y Secuenciación del Gen 16S rDNA	36
Análisis Bioinformático de las Secuencias.....	37

	10
Análisis Estadístico	37
Capítulo IV: Resultados.....	38
Aislamiento de Bacterias Endófitas.....	38
Esterilización Superficial.....	38
Cuantificación de UFC/mL de Bacterias Endófitas	38
Cepas Aisladas	39
Evaluación de la Producción de AIA	40
Curvas de Calibración Absorbancia vs UFC/ml de cepas.....	40
Curva Estándar de AIA.....	42
Cuantificación de la Producción <i>in vitro</i> de AIA.....	42
Identificación Molecular de los Aislados Productores de AIA	44
Amplificación del Gen 16S rDNA.....	44
Análisis Bioinformático de las Secuencias.....	45
Resumen de Resultados.....	56
Capítulo V: Discusión	58
Capítulo VI: Conclusiones	67
Capítulo VII: Recomendaciones	68
Referencias	69

Índice de Tablas

Tabla 1 Condiciones de crecimiento de lenteja de agua	22
Tabla 2 Condiciones de cultivo de lenteja de agua del género <i>Spirodela</i>	32
Tabla 3 Estándares para la curva de calibración de AIA	35
Tabla 4 UFC/mL de bacterias endófitas de lenteja de agua del género <i>Spirodela</i>	38
Tabla 5 Características morfológicas coloniales de bacterias endófitas aisladas de lenteja de agua del género <i>Spirodela</i>	39
Tabla 6 Producción de AIA de bacterias endófitas aisladas de lenteja de agua del género <i>Spirodela</i>	42
Tabla 7 Características de las secuencias de los productos de PCR	46
Tabla 8 Secuencias que producen alineaciones significativas con la cepa A1	46
Tabla 9 Secuencias que producen alineaciones significativas con la cepa A2	47
Tabla 10 Secuencias que producen alineaciones significativas con la cepa A3	49
Tabla 11 Secuencias que producen alineaciones significativas con la cepa A4	50
Tabla 12 Secuencias que producen alineaciones significativas con la cepa C6	52
Tabla 13 Secuencias que producen alineaciones significativas con la cepa C7	53
Tabla 14 Secuencias que producen alineaciones significativas con la cepa C8	55
Tabla 15 Secuencias que producen alineaciones significativas con la cepa C9	55
Tabla 16 Resumen de resultados.....	57

Índice de Figuras

Figura 1 Lenteja de agua	21
Figura 2 Cultivo de lenteja de agua del género <i>Spirodela</i>	32
Figura 3 Curvas de calibración Absorbancia vs UFC/mL de la cepa A1-C9	41
Figura 4 Curva estándar de AIA	42
Figura 5 Producción de AIA de bacterias endófitas aisladas de lenteja de agua del género <i>Spirodela</i>	44
Figura 6 Bandas de los productos de amplificación del gen 16S rDNA de las bacterias productoras de AIA aisladas de plantas de lenteja de agua del género <i>Spirodela</i>	45
Figura 7 Árbol filogenético de las cepas A1 y A2	48
Figura 8 Árbol filogenético de la cepa A3	50
Figura 9 Árbol filogenético de la cepa A4	51
Figura 10 Árbol filogenético de la cepa C6	53
Figura 11 Árbol filogenético de la cepa C7	54
Figura 12 Árbol filogenético de la cepa C8 y C9	56

Listado de Abreviaturas

AIA	ácido indolacético
LB	Luria-Bertani
vs	versus
TKN	nitrógeno Kjeldahl total
PGPB	bacterias promotoras del crecimiento de las plantas
PGIB	bacterias inhibidoras del crecimiento de las plantas
HKY	Hasegawa-Kishino-Yano
TN93	Tamura-Nei 1993
G	distribución gamma
I	sitios invariables
T92	Tamura 3 parámetros
NCBI	Centro Nacional para Información Biotecnológica
BTEX	benceno, tolueno, etilbenceno y xileno

Resumen

La lenteja de agua es una planta pequeña de rápido crecimiento y gran capacidad para absorber nutrientes, es por ello, que ha sido investigada y utilizada en fitorremediación, producción de biocombustibles y alimentación; sin embargo, existen pocos estudios sobre su comunidad endófito con potencial para promover el crecimiento vegetal. Por lo cual, el objetivo de este proyecto fue aislar e identificar bacterias endófitas productoras de ácido indolacético a partir de plantas de lenteja de agua del género *Spirodela*. Para ello, se recolectó muestras de plantas de lenteja de agua cultivadas a diferentes condiciones de nutrientes y pH; se realizó la esterilización superficial de las muestras y se procedió a aislar las bacterias endófitas. Una vez obtenido los cultivos puros, se evaluó la producción de AIA utilizando el reactivo de Salkowski y a las cepas que presentaron capacidad de producir AIA se las identificó molecularmente, mediante PCR convencional del gen 16S rDNA. Se aisló 9 bacterias endófitas, de las cuales 8 revelaron ser productoras de AIA y pertenecer a los géneros *Curtobacterium*, *Brevundimonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus* y *Ochrobactrum*. La cepa A3, identificada como *Brevundimonas vesicularis/Brevundimonas nasdae* produjo significativamente más AIA que las demás ($10.03 \pm 0.080 \mu\text{g/mL}$), al ser cultivarla en medio suplementado con 1 mg/L de triptófano; por lo que podría ser considerada como un bioinoculante potencial para cultivos de interés agrícola.

Palabras clave:

- **COMUNIDAD ENDÓFITA**
- **PROMOVER EL CRECIMIENTO VEGETAL**
- **ESTERILIZACIÓN SUPERFICIAL**
- **TRIPTÓFANO**
- **16S rDNA**

Abstract

Duckweed is a small, fast-growing plant with a great capacity to absorb nutrients, that is why it has been investigated and used in phytoremediation, biofuel production and food; however, there are few studies on its endophytic community with the potential to promote plant growth. Therefore, the objective of this project was to isolate and identify endophytic bacteria that produce indoleacetic acid from duckweed plants of the genus *Spirodela*. For this, samples of duckweed plants grown at different nutrient and pH conditions were collected; the samples were superficially sterilized and the endophytic bacteria were isolated. Once the pure cultures were obtained, IAA production was evaluated using the Salkowski reagent and the strains that showed the ability to produce IAA were molecularly identified by conventional PCR of the 16S rDNA gene. Nine endophytic bacteria were isolated, of which 8 revealed to be IAA producers and to belong to the *Curtobacterium*, *Brevundimonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus* and *Ochrobactrum* genera. The A3 strain identified as *Brevundimonas vesicularis*/*Brevundimonas nasdae* produced significantly more IAA than the others ($10.03 \pm 0.080 \mu\text{g} / \text{mL}$) when cultured it in medium supplemented with 1 mg / L of tryptophan; therefore, it could be considered as a potential bioinoculant for crops of agricultural interest.

Keywords:

- **ENDOPHYTIC COMMUNITY**
- **PROMOTE PLANT GROWTH**
- **SURFACE STERILIZATION**
- **TRYPTOPHAN**
- **16S rDNA**

Capítulo I: Introducción

Formulación del Problema

Cada año la población mundial está creciendo aproximadamente 1.1% y si continúa esta tendencia, se estima que la población mundial alcance los 9.7 mil millones en 2050. Así mismo, el número de habitantes en América Latina y del Caribe en 2050 será de 760 millones y solo en Ecuador de 23 millones (ONU, 2019). De manera que, la prioridad para los gobiernos de todo el mundo es aumentar la producción agrícola del 25% al 70% para satisfacer la demanda de cultivos (Hunter et al., 2017) y lograr abastecer de alimento a la población; pero lograr este objetivo es complicado debido a la reducción de la tierra cultivable a través de la expansión urbana, el cambio climático y las malas prácticas agrícolas (Smith et al., 2016).

En las últimas décadas se ha logrado intensificar los sistemas agrícolas logrando un aumento significativo en la cantidad de alimentos, esto gracias a la aplicación de tecnologías como variedades de cultivos de alto rendimiento, fertilizantes y pesticidas químicos, riego y mecanización (Power, 2010). No obstante, una intensificación mal gestionada ha provocado una disminución de la fertilidad del suelo, contaminación de aguas subterráneas, aumento de la liberación de gases de efecto invernadero y pérdidas generales de biodiversidad (L. M. Castro et al., 2015).

En muchos lugares del mundo, el uso excesivo de fertilizantes sintéticos está causando eutrofización, deterioro del suelo (Smith et al., 2016), contaminación del agua y contribuyendo al calentamiento global (Capa et al., 2015).

Al comparar la huella de carbono en diferentes sistemas de producción de café de América Latina, van Rikxoort et al. (2014) reportaron los valores más altos en sistemas de monocultivo, donde el café se produce con aplicaciones regulares de fertilizantes sintéticos y pesticidas, y llegaron a la conclusión de que al gestionar intensivamente esos sistemas, cerca del 30% de la huella de carbono se debió a la

producción y aplicación de fertilizantes. Por otra parte, De Beenhouwer et al. (2014) informó de una fuerte reducción de la diversidad de microorganismos del suelo en los sistemas cafetaleros de manejo intensivo, donde se utilizan abundantemente fertilizantes químicos y pesticidas.

Específicamente en Ecuador, parroquia Anegado (Manabí), se ha informado que los suelos utilizados para sembrar maíz están erosionados y este deterioro fue principalmente por el uso continuo de fertilizantes químicos (Calderón, 2015). Así mismo, se ha reportado contaminación en el río Guayas, en donde se determinó una gran acumulación de N y P, en la cual los fertilizantes sintéticos fueron el mayor insumo de N (53%) y P (57%) (Borbor-Cordova et al., 2006).

En Ecuador, de acuerdo a las estadísticas del INEC en el año 2019, se informó que en el 56.5% de la superficie con cultivos permanentes se aplicaron insumos de síntesis química, en el 34.4% no se usó ningún tipo de insumo, en el 6.1% se aplicó insumo orgánico+químico y en el 3% se utilizó únicamente insumos orgánicos. Por otra parte, en cultivos transitorios, los valores mencionados anteriormente fueron de 79.6%, 8.4%, 8.4% y 3.7%, respectivamente. De igual manera, INEC reveló que solo en el cultivo permanente de banano se utilizaron 682 Kg/ha de fertilizantes y en el cultivo transitorio de papa 458 Kg/ha, siendo los cultivos que más fertilizante usaron en el año 2019.

Los agricultores ecuatorianos prefieren usar fertilizantes químicos, debido a que son de fácil manejo en comparación con los abonos orgánicos que requieren la aplicación de grandes cantidades, lo que incrementa la mano de obra, tiempo y costos. Sin embargo, el uso exclusivo y continuo de fertilizantes químicos está causando la degradación del suelo debido al desequilibrio biológico (Valverde et al., 2010).

Estos impactos perjudiciales sobre el medio ambiente motivan a la búsqueda de métodos más sostenibles de producción de alimentos. De modo que, en lugar de usar

productos químicos sintéticos o abusar de sustancias, se necesitan opciones alternativas sin comprometer la productividad de los cultivos (Elahi et al., 2019). Es por ello que, durante los últimos 30 años se ha estudiado en detalle las interacciones planta-microorganismo, con el fin de utilizar microorganismos benéficos como alternativa al uso de fertilizantes químicos sintéticos (Bulgarelli et al., 2013).

Justificación

Los resultados de varios estudios sugieren que la explotación de microorganismos beneficiosos es una mejor estrategia a largo plazo en comparación al uso de fertilizantes químicos, para aumentar el rendimiento de los cultivos (Pazos-Rojas et al., 2016). Además, las bacterias beneficiosas asociadas a las plantas podrían actuar contra los patógenos dentro del ecosistema microbiano, así como estabilizar el ecosistema, mejorar la biodiversidad y aumentar la productividad de la planta (Ho et al., 2017).

Identificar qué tipo de microorganismos promueven el crecimiento de las plantas y usarlos como biofertilizantes es una tecnología prometedora para la creación de una agricultura sostenible, proporcionar soluciones efectivas y amigables con el medio ambiente con el potencial de garantizar la seguridad alimentaria (B. R. Glick, 2014). Sin embargo, para lograr esto, los científicos aún necesitan forjar una comprensión más profunda de los mecanismos subyacentes a los beneficios de crecimiento vegetal por bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPB) (H. Liu et al., 2017).

De las 300 mil plantas conocidas en el mundo, apenas del 1 al 2% se ha estudiado para determinar su composición endófito. Además, solo unas pocas plantas se han estudiado por completo, es decir, los endófitos que se encuentran en todos sus tejidos (Strobel, 2018). Es por ello que se tiene un gran interés por estudiar la biodiversidad de los microorganismos endófitos y poder darles uso en productos y procesos en agricultura, medicina y biotecnología (Pandey et al., 2015).

Algunas bacterias endófitas pueden tener un amplio rango de hospedadores y pueden usarse como bioinoculantes para desarrollar un sistema agrícola seguro y sostenible (Afzal et al., 2019). Se ha demostrado que, la inoculación de bacterias endófitas productoras de AIA es una forma prometedora de mejorar la biomasa vegetal, la longitud, el número de ápices y el área superficial de las raíces (S. Ali et al., 2017).

En Ecuador, se ha estudiado los endófitos de ciertas plantas como el cacao (Melnick et al., 2011), papa (Ortuño et al., 2018), chirimoya (Corral, 2018) y tomatillo (Intriago & Plaza, 2020), enfatizando su uso como control biológico y recientemente como promotores de crecimiento. Sin embargo, no existen estudios de las bacterias endófitas de plantas de lenteja de agua, posiblemente porque no son muy conocidas en el país, pero a nivel mundial muchos investigadores han fijado su atención en estas plantas debido a su pequeño tamaño, rápido crecimiento y gran capacidad para absorber nutrientes (Fourounjian et al., 2020) y gracias a estas propiedades es que se las ha estado utilizando en fitorremediación, tratamiento de aguas residuales y explorando su uso en los campos de biocombustibles, producción de bioplásticos y la alimentación humana (Cao et al., 2018).

Por lo tanto, este proyecto busca aislar bacterias endófitas de plantas de lenteja de agua, con el fin de hallar bacterias productoras de ácido indolacético que puedan ser utilizadas como bioinoculantes y de esta manera impulsar la producción de insumos agrícolas a partir de organismos autóctonos ecuatorianos y reducir el uso de fertilizantes químicos que deterioran el medio ambiente, ofreciendo una alternativa ecológica para la producción de cultivos agrícolas.

Objetivos

Objetivo General

Aislar e identificar bacterias endófitas productoras de ácido indolacético a partir de plantas de lenteja de agua del género *Spirodela*.

Objetivos Específicos

- Aislar bacterias endófitas a partir de plantas de lenteja de agua del género *Spirodela*.
- Determinar la producción de AIA de los aislados bacterianos.
- Identificar molecularmente las bacterias productoras de AIA basadas en el marcador molecular 16S rDNA.

Hipótesis

Bacterias endófitas de lenteja de agua del género *Spirodela* producen AIA.

Capítulo II: Marco Teórico

Lenteja de Agua

Las lentejas de agua son plantas acuáticas monocotiledóneas muy pequeñas (ver Figura 1), pertenecen a la familia Lemnaceae, la cual consta de cinco géneros: *Lemna*, *Landoltia*, *Spirodela*, *Wolfia* y *Wolffiella* y 36 especies en todo el mundo. El género *Spirodela* cuenta únicamente con dos especies: *S. polyrhiza* y *S. intermedia* (Bog et al., 2019). En general, todas las especies de esta familia tienen como cuerpo vegetal un talo/fronda formado por tejido parenquimatoso con grandes espacios intercelulares llenos de aire llamados aerénquimas, que ayudan a las plantas a flotar sobre la superficie del agua, estas frondas son diminutas, ovales y redondas, aplanadas, de alrededor de 1 mm a menos de 1 cm de ancho (Z. Ali et al., 2015).

Figura 1

Lenteja de agua



Nota. Lenteja de agua cultivada en la empresa Agrovitech.

Las plantas de lenteja de agua pueden crecer en una gran variedad de zonas geográficas y climáticas, sin embargo, la mayoría de las especies se desarrollan en áreas tropicales y subtropicales (Mwale & Gwaze, 2013). Habitan en aguas de cualquier profundidad, siempre y cuando sean lénticas, debido a que no pueden sobrevivir en

aguas que se mueven a más de 0.3 m/s, o si están expuestas al viento. Tienen un crecimiento máximo a temperaturas entre 17.5 y 30°C, a bajas temperaturas crecen lentamente y si se llega a superar los 35°C están plantas tienden a morir (Hasan & Chakrabarti, 2009). Toleran un amplio rango de pH (3-10), sin embargo su mejor crecimiento se da entre pH 5 y 7 (Vymazal, 2008).

Para mantener una óptima producción de estas macrófitas el TKN del agua no debe ser menor de 20-30 mg/L y el fósforo debe estar en concentraciones de 6 a 154 mg/L, sin embargo, las lentejas de agua pueden crecer incluso con niveles traza de estos nutrientes. La conductividad de los electrolitos parece tener algún efecto sobre el crecimiento de diferentes especies de lenteja de agua, por ejemplo, *L. perpusilla* y *S. polyrrhiza* de estanques y acequias en las carreteras de la India exhibieron biomasa máxima dentro de un rango de 650-1000 $\mu\text{S/cm}$ (Hasan & Chakrabarti, 2009). En la Tabla 1 se muestra un resumen de las condiciones óptimas de crecimiento de las plantas de lenteja de agua.

Tabla 1

Condiciones de crecimiento de lenteja de agua

Parámetro Ambiental	Mínimo	Máximo	Óptimo
Temperatura (°C)	>0	35	17.5-30
pH	3	10	5-7
Nitrógeno (mg/L NH ₃ -N)	Trazas	375	7-12
Fósforo (mg/L PO ₄ -P)	0.017	154	4-8
Conductividad ($\mu\text{S/cm}$)	200	1 090	-

Nota. Esta tabla muestra como la lenteja de agua tiene un rango extremo de tolerancia para la temperatura, pH, nitrógeno, fósforo y conductividad, pero tiene un rango bien definido de requisitos óptimos. Adaptado de: (Hasan & Chakrabarti, 2009).

La lenteja de agua se propaga asexualmente a través de gemación, su biomasa se puede duplicar cada 48 a 96 h, dependiendo de la especie y condiciones de cultivo, esto significa que crecen más rápido que la mayoría de plantas superiores. No obstante,

la vida útil de una fronda individual en la fase vegetativa es relativamente corta, de 3 a 10 semanas (Y. Liu et al., 2020). Tanto la tasa de crecimiento como la composición química de la lenteja de agua dependen en gran medida de la concentración de minerales en el agua, tasa de reposición, equilibrio, pH del agua, temperatura e incidencia de la luz solar (FAO, 2004). De manera que, esta planta acuática puede llegar a tener (en materia seca) un contenido de proteína cruda de 16 a 41.7%, fibra cruda de 8.8 a 15.6%, carbohidratos de 17.6 a 35%, almidón de 21 a 38% y lípidos de 4.5 a 9% (Verma & Suthar, 2015).

Esta planta sirve como una fuente ideal para el suministro de alimentos o piensos para animales de granja, la acuicultura y posiblemente también para los humanos (Ziegler et al., 2015) ya que tiene un alto contenido de proteínas y su composición en aminoácidos es similar a la de la proteína del suero, que es fácilmente digerida y asimilada por humanos y otros animales (Y. Liu et al., 2020). La proteína de lenteja de agua contiene 2.7% de metionina y cisteína, 7.7% de fenilalanina y treonina, 4.8% de lisina y es rica en leucina, treonina, valina e isoleucina (Appenroth et al., 2017).

La lenteja de agua tiene una alta capacidad de absorción de minerales y puede tolerar una elevada carga orgánica, por lo tanto, se utiliza para procesar aguas residuales, reducir la eutrofización y eliminar contaminantes (Ekperusi et al., 2019). De manera que son sistemas de tratamiento de bajo costo de construcción y mantenimiento, además que son simples de operar (Arroyave, 2004). Además tiene una capacidad de acumulación rápida de grandes cantidades de almidón, lo que la convierte en una materia prima alternativa para la producción de etanol, butanol y biogás (Cui & Cheng, 2015).

Estas plantas también son de interés como biofábricas potenciales para la producción de proteínas de fusión, proteínas de vacunas, albúmina sérica, hemoglobina y colágeno (Kuznetsova et al., 2019). El género *Spirodela* se considera un modelo para

la biología sintética debido a su pequeño genoma (158 Mb) y grandes frondas, lo que la hace conveniente para la investigación de biología molecular y cultivo de tejidos (Wang et al., 2014).

Interacción Planta-Microorganismos

Todas las plantas interactúan con microorganismos en una determinada etapa de su vida y llegan a albergar complejas comunidades microbianas endógenas y exógenas en simbiosis positiva o negativa (Yamakawa et al., 2018). Las comunidades ecológicas de plantas y microorganismos se ven afectadas por el genotipo de la planta (Bodenhausen et al., 2014) y los factores ambientales. La diferencia entre los genotipos provoca diferentes respuestas fisiológicas e inmunes y conduce a comunidades microbianas específicas del huésped. Los exudados de las raíces de las plantas (azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, nucleótidos, flavonoides, compuestos antimicrobianos y enzimas) (Baetz & Martinoia, 2014) difieren entre las especies de plantas, por lo que se esperan discrepancias en los microbiomas de la rizósfera de las diferentes especies de planta (Ho et al., 2017).

Las bacterias que promueven el crecimiento y la salud vegetal se denominan bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPB), mientras que las que inhiben el crecimiento se conocen como bacterias inhibidoras del crecimiento de las plantas (PGIB) (Ishizawa et al., 2017). Las PGPB benefician a las plantas al mejorar la absorción de nutrientes del medio ambiente, estimular el crecimiento de raíces y brotes al producir ácido indol acético, 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminasas y solubilizando fosfato (Ho et al., 2017). También mejoran la resistencia de las plantas al estrés abiótico como la sequía, los metales pesados, las sales y la deficiencia de nutrientes (H. Zhang et al., 2008); y al estrés biótico como la interacción con otros organismos, infección por patógenos y daño por plagas de insectos (Prashar et al., 2013). Las PGPB incluyen aquellas que viven libremente, aquellas que forman

relaciones simbióticas específicas con las plantas, endófitos bacterianos que pueden colonizar los tejidos interiores de una planta y las cianobacterias (Ramos Cabrera, 2018).

La primera cepa PGPB de lenteja de agua descubierta fue *Acinetobacter calcoaceticus* P23, aislada de la rizósfera de *Lemna aoukikusa*, la cual mejora el crecimiento de la lenteja de agua tanto en medios sintéticos como en el agua (Yamaga et al., 2010). Otro ejemplo, es la cepa *Aquitalea magnusonii* H3, aislada de *Lemna minor*, que puede promover el crecimiento de la lenteja de agua incluso en presencia de otras cepas bacterianas, incluidas las PGIB (Ishizawa et al., 2017).

Bacterias Endófitas

Las bacterias endófitas son microorganismos que viven dentro de los tejidos vegetales durante al menos una parte de su vida, sin causar ningún síntoma aparente de enfermedad en el huésped (Christina et al., 2013). Estas bacterias usan la endosfera de la planta como un nicho ecológico protector único que proporciona un ambiente seguro y consistente sin perturbar las condiciones ambientales fluctuantes que afectan a las bacterias rizosféricas y epífitas (Senthilkumar et al., 2011). Varios estudios han reportado bacterias endófitas que pueden promover el crecimiento de plantas como trigo, arroz, canola, papa, tomate y muchas más (Mei & Flinn, 2010).

Las bacterias endófitas pueden beneficiar a su huésped directa o indirectamente. Directamente, actúan mejorando la absorción de nutrientes, incluido el nitrógeno, fósforo y el hierro, y modulando las fitohormonas relacionadas con el crecimiento/estrés, como son auxinas, citoquinas o etileno (Santoyo et al., 2016). Indirectamente, intervienen al atacar plagas/patógenos y antagonizar las plantas competidoras, para ello, utilizan mecanismos como producción de antibióticos, enzimas que degradan la pared celular, reducción de los niveles de etileno de las plantas,

resistencia sistémica inducida, disminución de la cantidad de hierro disponible para los patógenos y síntesis de compuestos volátiles inhibidores de patógenos (B. Glick, 2020).

Para brindar estos beneficios, las bacterias deben colonizar competitivamente el interior de la planta, siendo este un proceso secuencial, que comienza desde la rizósfera (las bacterias responden a los exudados de la raíz de la planta) (Rosenblueth & Martínez, 2006), seguido por el rizoplano (superficies de la raíz) y la colonización del interior de la raíz. Una vez dentro, los endófitos competentes puede moverse a las partes aéreas de las plantas (Afzal et al., 2019). Cabe recalcar que aunque las bacterias endófitas generalmente ingresan a las plantas a través de la zona de las raíces, también pueden utilizar las partes aéreas de las plantas, incluidos los tallos, las hojas, las flores y los cotiledones (Zinniel et al., 2002).

El tipo de diversidad endófitas presente en una planta puede depender de varios factores como: especie de planta, forma de cultivo, etapa de crecimiento, tipo de tejido, localización geográfica, clima, sequía, salinidad, temporada, patógenos, método de esterilización y medios de cultivo (Hallmann & Berg, 2007). El tipo de suelo utilizado para cultivar una planta también puede determinar su comunidad endófitas, por ejemplo, el mismo cultivo de plantas que crece en diferentes suelos agrícolas puede tener bacterias endófitas muy variadas (Rashid et al., 2012). La diferencia en la comunidad endófitas también puede resultar de la preferencia impuesta por la planta huésped en respuesta a las condiciones del suelo y de estrés. Por lo tanto, la selección de comunidades bacterianas endófitas es un proceso dinámico que está estrictamente controlado por la planta huésped, donde las bacterias que favorecen a la planta huésped en una situación particular son preferidas por la planta sobre otras bacterias endófitas (Afzal et al., 2019).

Producción de Ácido Indolacético (AIA)

El ácido indol-3-acético (AIA) es la auxina más importante producida por las plantas, ya que tiene un papel significativo en la formación de hojas, desarrollo de embriones y raíces, abscisión, fototropismo, geotropismo, desarrollo de la fruta, entre otros (Chandra et al., 2018). El AIA influye en la división y alargamiento celular, dominancia apical, iniciación de raíces y producción de biomasa de las plantas (Raju et al., 2020).

La producción de AIA en bacterias (PGPBs y bacterias fitopatógenas), es una característica importante. Es así que, el AIA puede actuar como una molécula de señal entre bacterias y plantas (Mohite, 2013). Por ejemplo, bacterias consideradas patógenas de plantas como *Pseudomonas savastanoi* pv y *Agrobacterium* spp. producen corona de agallas y tumores en el tejido vegetal, respectivamente, que en plantas jóvenes ocasiona desarrollo anormal, retrasos en el crecimiento, susceptibilidad a otras enfermedades e incluso la muerte de la planta (P. Vega et al., 2016). Por otra parte, bacterias PGPBs productoras de altas concentraciones de AIA pueden aumentar la biomasa total de las raíces, lo que permite que la planta absorba mejor el agua y los minerales, que a su vez puede mejorar la colonización de bacterias (Gilbert et al., 2018). Algunos ejemplos de bacterias productoras de AIA se encuentran en los géneros *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Azospirillum* y *Azotobacter* (Khan et al., 2016).

El AIA se sintetiza generalmente de dos formas, la dependiente de triptófano (Trp) y la independiente de Trp. (Duca et al., 2014). Hay cuatro vías principales de síntesis de AIA dependientes de Trp en bacterias: Indol-3-piruvato (IPA), triptamina (TPM), indol-3-acetonitrilo (IAN) e indol-3-acetamida (IAM) (P. Zhang et al., 2019). Las vías IPA e IAM están más ampliamente distribuidas y son las más relevantes. La vía IPA se ha informado sobre todo en PGPBs, mientras que la vía IAM ha sido reportada

en bacterias fitopatógenas. Cabe recalcar que algunas cepa bacterianas son capaces de utilizar más de una vía (P. Vega et al., 2016).

Métodos de Cuantificación de AIA

Existen algunos métodos para detectar la biosíntesis de AIA. Entre ellos se tiene el método colorimétrico de Salkowski, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (Castillo et al., 2005), la cromatografía líquida y la espectrometría de masas en tándem de ionización por electrospray (LC-ESI-MS / MS), y mediante cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HPTLC) (Gang et al., 2019).

El método más utilizado es el colorimétrico, empleando el reactivo de Salkowski (Gordon & Weber, 1951). Este reactivo es una mezcla de cloruro férrico 0.5 M (FeCl_3) y ácido perclórico al 35% (HClO_4) que al reaccionar con AIA produce un color rosado, debido a la formación de complejos de AIA y a la reducción de Fe^{3+} (Kamnev et al., 2001). El color desarrollado por reacción positiva indica la presencia de diversos compuestos indólicos como producto del metabolismo del triptófano (A. Rahman et al., 2010).

Métodos Moleculares para la Identificación Bacteriana

Los métodos moleculares varían con respecto al poder discriminatorio, la reproducibilidad, la facilidad de uso y la facilidad de interpretación. Para la identificación bacteriana se puede utilizar métodos como la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR), Barcoding, huella digital de amplificación de DNA (DAF), fragmentos polimórficos amplificados al azar (RAPD), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) (Olubukola, 2003), electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), tipificación de secuencias multilocus (MLST), análisis multilocus de número variable de repeticiones en tándem (MLVA), ribotipificación, PCR basada en secuencias repetitivas (rep-PCR),

microarreglos de DNA e incluso secuenciación del genoma completo (Adzitey et al., 2013).

La PCR consiste en producir millones de copias de una porción de gen, un gen completo o grupos de genes con alta fidelidad (Malik et al., 2008). Cada ensayo de PCR requiere la presencia de DNA molde, cebadores, nucleótidos, DNA polimerasa y buffer, estos componentes se mezclan y luego se colocan en un termociclador, que permite que se produzcan ciclos repetidos de amplificación del DNA (M. T. Rahman et al., 2013) en tres pasos básicos: desnaturalización (separación de las hebras de DNA), alineamiento (los cebadores se unen a los segmentos de DNA diana) y extensión (la DNA polimerasa extiende los cebadores agregando nucleótidos a la cadena de DNA en desarrollo) (Garibyan & Avashia, 2013). La PCR es el método más utilizado para la amplificación del gen 16S rDNA, el cual es el marcador molecular más usado para la clasificación bacteriana (Srinivasan et al., 2015).

El gen 16S rDNA bacteriano tiene aproximadamente 1500 pb de largo y contiene regiones conservadas y variables que evolucionan a diferentes velocidades. Las bajas tasas de evolución de las regiones anteriores permiten el diseño de cebadores universales que amplifican genes en diferentes taxones, mientras que las regiones de rápida evolución reflejan diferencias entre especies y son útiles para la clasificación taxonómica (Kai et al., 2019). La tasa de sustitución estimada es ~7 mil veces mayor para las regiones hipervariables que para las altamente conservadas y se ha considerado que estas diferencias genéticas reflejan, para la mayoría de las bacterias, la divergencia del genoma, lo que hace que esta secuencia sea ideal para lograr un nivel confiable de información taxonómica. Es por ello, que es reconocida como la “estándar de oro” para la identificación bacteriana (Rosselli et al., 2016).

Hay dos métodos principales para visualizar los productos de la PCR: (1) tinción del producto de DNA amplificado con un colorante químico como el bromuro de etidio,

que se intercala entre las dos hebras del dúplex o (2) marcando los cebadores o nucleótidos de la PCR con fluorescencia tintes (fluoróforos) antes de la amplificación por PCR (Van Pelt-Verkuil et al., 2008). El método más utilizado para analizar el producto de la PCR es el uso de electroforesis en gel de agarosa, que separa los productos de DNA en función del tamaño y la carga. Una PCR exitosa produce una sola banda del tamaño esperado (Garibyan & Avashia, 2013).

Capítulo III: Materiales y Métodos

Participantes del Proyecto

El proyecto de tesis fue desarrollado por Myriam Estefanía Abad Arce, con la colaboración de Francisco Flores Ph,D. Director del Proyecto; y se contó con la participación de las empresas Agrovitech y el laboratorio IDgen.

Zona de estudio

En la empresa Agrovitech se recolectó todas las muestras y se realizó el aislamiento de las bacterias; este establecimiento se encuentra ubicado en la provincia de Pichincha, cantón Quito, parroquia Cotogchoa, con coordenadas Latitud: 0°21'36.4"S; Longitud: 78° 27'20.6" W.

En el laboratorio IDgen se realizó los ensayos colorimétricos y la identificación molecular; el cual se encuentra ubicado en la provincia de Pichincha, cantón Rumiñahui, Av. de los Granados E14-285 y Eloy Alfaro, con coordenadas Latitud: 0°09'56.9"S; Longitud: 78° 28'07.0" W.

Periodo de investigación

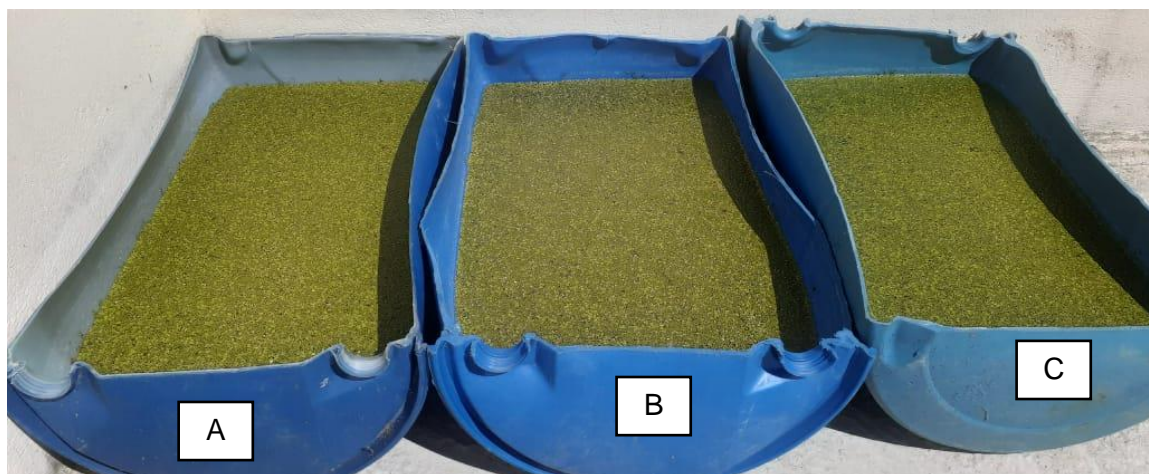
El proyecto se llevó a cabo en los meses de agosto hasta diciembre de 2020 y tuvo una duración de cinco meses.

Muestreo

Se cultivó plantas de lenteja de agua del género *Spirodela* proporcionadas por la empresa Agrovitech en tres tanques con agua potable (ver Figura 2) bajo las condiciones mostradas en la Tabla 2. Esto se realizó con el fin de obtener mayor variedad de bacterias.

Figura 2

Cultivo de lenteja de agua del género Spirodela



Nota. Los tanques fueron previamente desinfectados y rellenados con aproximadamente 80 L de agua.

Tabla 2

Condiciones de cultivo de lenteja de agua del género Spirodela

N° de Tanque	Nutrientes	Conductividad ($\mu\text{S/cm}$)	pH
A	Sin Nutrientes	150	6.5
B	Sin Nutrientes	150	8
C	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, KCl, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, MgSO_4 , FeSO_4 , $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ y Micromix	500	6.5

Se realizaron tres muestreos: a los 7, 14 y 21 días de cultivo. Se recolectó tres muestras en diferentes puntos de cada tanque con ayuda de un cernidor y se colocó en recipientes plásticos para su posterior procesamiento. De manera que se obtuvo un total de 27 muestras.

Aislamiento de Bacterias Endófitas

Esterilización Superficial

Se tomó 20 g de biomasa recolectada y se lavó con agua para limpiar restos de algas e impurezas. Entonces, se desinfectó con una solución de hipoclorito de sodio al

5% más dos gotas de Tween 20 durante 30 s y se enjuagó cinco veces con agua destilada estéril (Kittiwongwattana & Thawai, 2013). Con el fin de comprobar la correcta esterilización superficial se tomó alícuotas del último lavado, se sembró en agar LB y se incubó a 28°C, por 48 h.

Inoculación y Cuantificación de UFC/mL

Las plantas esterilizadas correctamente fueron maceradas en un mortero estéril y se agregó 20 mL de agua destilada estéril para conseguir una suspensión de la biomasa. A esta suspensión se le realizó diluciones seriadas tomando 1 mL de suspensión y colocando en tubos con 9 mL de agua destilada estéril. Entonces se inoculó 0.1 mL de cada dilución por extensión en placas Petri con agar LB por triplicado, se incubó por 96 h y se procedió al conteo de colonias (Ortega et al., 2017).

Selección de Colonias

Se seleccionaron colonias diferentes de acuerdo a su morfología tomando en cuenta: forma completa de la colonia, tamaño, borde/margen, pigmentación, opacidad y consistencia/textura. La mayoría de parámetros se evaluó a simple vista, únicamente para la valoración de la consistencia/textura se utilizó un asa de siembra (Vargas & Kuno, 2014).

Obtención y Conservación de Cultivos Puros

Las colonias seleccionadas se resembraron por estría cruzada en placas Petri con agar LB tres veces hasta la obtención de cultivos puros. Para la conservación de los mismos se sembró los aislados puros en tubos con caldo LB, se incubó durante 48 h a 28°C, se tomó alícuotas de 500 µL y se colocó en criotubos con 500 µL de glicerol estéril al 30%, se mezcló utilizando agitador vórtex y se almacenó a -20°C (Coila, 2018).

Evaluación de la Producción de AIA

Determinación de Curvas de Calibración Absorbancia vs UFC/ml de Cepas

Para evaluar la producción de AIA se requiere trabajar con la misma cantidad de biomasa por lo que fue necesario determinar la relación del número de bacterias vs absorbancia de cada cepa aislada. Con este fin se empleó el método de conteo en placas y el método turbidométrico, de manera que cada cepa se inoculó en tubos con 10 mL de caldo LB y se incubó por 48 h. Para el conteo en placas se realizó diluciones seriadas 1/100 tomando 0.1 mL de caldo bacteriano y colocando en tubos con 9.9 mL de agua destilada estéril, hasta conseguir la dilución 10^{-6} . Se procedió a sembrar por extensión 0.1 mL de las diluciones 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6} por triplicado en placas Petri con agar LB y se incubó a 28°C durante 48h; al final del periodo de incubación se realizó el conteo de colonias. Para el método turbidométrico también se realizó diluciones seriadas, sin embargo, las diluciones fueron 1/2 de manera que se tomó 3 mL de caldo bacteriano y se colocó en tubos con 3 mL de caldo LB estéril, hasta conseguir la dilución 1/16. Se midió las absorbancias de todos los tubos utilizando el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Diaz, 2011). Utilizando estos datos se halló las ecuaciones que relacionan la absorbancia en función del número de bacterias de cada cepa.

Curva Estándar de AIA

Para la obtención de la curva estándar de AIA se siguió el protocolo empleado por Gordon & Weber (1951) modificado. Se preparó una solución madre de 1 mg/mL de AIA y a partir de ella se realizó una curva patrón tomando concentraciones de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 45 $\mu\text{g/mL}$ de AIA (ver Tabla 3) por triplicado. 1 mL de cada solución fue tomado y se le aumentó 2 mL de reactivo de Salkowski (2% de FeCl_3 0.5 M en 35% de ácido perclórico), por 30 min se dejó reposar a temperatura ambiente y en oscuridad, y se leyó las absorbancias de los tubos a 540 nm utilizando el espectrofotómetro Nanodrop

2000. Se halló la ecuación que relaciona la absorbancia en función de la concentración de AIA utilizando los valores obtenidos.

Tabla 3

Estándares para la curva de calibración de AIA

[AIA] (µg/ml)	Volumen Solución Madre (µL)	Volumen de Agua (µL)
0	0	1000
5	5	995
10	10	990
15	15	985
20	20	980
25	25	975
30	30	970
35	35	965
40	40	960
45	45	955

Cuantificación de la Producción in Vitro de AIA

De acuerdo a la metodología de Ortega et al. (2017) se inoculó las cepas bacterianas en tubos con 10 mL de caldo LB y se incubó de 48 a 96 h. Transcurrido este periodo se midió la absorbancia de los tubos en el espectrofotómetro Nanodrop 2000, tomando en consideración las curvas de calibración absorbancia vs UFC/ml de cada cepa se diluyó los caldos bacterianos hasta fijarlos en una concentración de 5×10^7 UFC/mL. Entonces se tomó 0.2 mL de las diluciones bacterianas y se inoculó en tubos que contenían 4.9 mL de caldo LB con la adición de L-triptófano en las concentraciones de 1, 2 y 5 mg/L, por triplicado. Se utilizó como testigo una serie de tubos con caldo nutritivo sin L-triptófano. Los tubos fueron incubados a 28°C durante 96 h, se mezcló 1 mL de cultivos bacterianos con 2 mL de reactivo de Salkowski, se dejó durante 30 min en oscuridad, se leyó las absorbancias de los tubos a 540 nm y se interpoló en la curva estándar de AIA.

Las bacterias productoras de AIA *in vitro* fueron caracterizadas de acuerdo a lo enunciado por Khalid et al. (2004), en tres grupos: las que producen de 1 a 10 µg/mL

(bajas productoras); de 11 a 20 µg/mL (medianas productoras) y las que producen de 21 a 30 µg/mL (altas productoras).

Identificación Molecular de los Aislados Productores de AIA

Método Rápido de Extracción de DNA

Para la extracción de DNA se siguió el protocolo de Englen & Kelley (2000) modificado en esta investigación. De manera que, se realizó una resiembra de las cepas productoras de AIA; tras 48 h de incubación, se tomó cuatro asadas de colonias y se resuspendió en tubos Eppendorf estériles con 500 µL de agua destilada estéril. Se colocó en un baño de agua hirviendo por 15 min e inmediatamente se transfirió a un bloque de hielo a -20°C por 10 min. Entonces se centrifugó a 13 mil rpm durante 2 min, el sobrenadante obtenido se usó directamente en la reacción de PCR.

Amplificación y Secuenciación del Gen 16S rDNA

El gen 16S rDNA se amplificó utilizando los primers universales 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3') y 1492R (5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT3'), que abarca casi toda la longitud del gen 16S rDNA (Heuer et al., 1997), con un amplicón esperado de ~1500 pb. La mezcla de PCR (25 µL) contuvo: 2 µL de muestra (sobrenadante), 2 µL de primer 27F, 2 µL de primer 1492R, 12.5 µL de GoTaq® Green Master Mix, 2X (DNA polimerasa GoTaq®, tampón de reacción 2X Green GoTaq® (pH 8.5), dNTP 400 µM y MgCl₂ 3 mM) y 6.5 µL de agua libre de nucleasas; se centrifugó durante 30 s en una mini centrífuga. En un inicio la temperatura fue de 94°C durante 4 min, luego se configuró 40 ciclos de 94°C por 30 s, 54°C por 15 s, 72 °C por 45 s y para terminar 72°C por 5 min (Soto, 2018).

El método de evaluación de los productos de PCR fue una electroforesis en gel, que contenía 1% de agarosa y al cual se le agregó bromuro de etidio. Entonces, los amplicones del gen 16S rDNA de los aislados bacterianos se enviaron a la empresa Macrogen para su purificación y secuenciación.

Análisis Bioinformático de las Secuencias

Las secuencias del gen 16S rDNA fueron editadas utilizando el programa Geneious 2021.0.1 y se realizó la búsqueda de secuencias similares utilizando la herramienta BLASTn en GenBank del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI). A continuación, con ayuda del programa CLUSTAL W se hizo un alineamiento múltiple de secuencias entre las secuencias que presentaron los más altos porcentajes de similitud y las secuencias en estudio. Finalmente se construyó un árbol filogenético en el programa MEGA X, utilizando el mejor modelo determinado por el mismo software y un análisis de bootstrap de 1000 repeticiones.

Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el software Graphpad Prism, en donde se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis y las diferencias se consideraron significativas con $p < 0.05$. Posteriormente se realizó la prueba de comparación múltiple de Dunn.

Capítulo IV: Resultados

Aislamiento de Bacterias Endófitas

Esterilización Superficial

La esterilización superficial se realizó correctamente ya que no se presentó crecimiento bacteriano en todas las placas inoculadas con el agua del último lavado de las plantas de lenteja de agua.

Cuantificación de UFC/mL de Bacterias Endófitas

Se obtuvo crecimiento de colonias en placa de las muestras de plantas de lenteja de agua cultivadas en el tanque A (sin nutrientes, 150 μ S/cm, pH 6.5) y en el tanque C (con nutrientes, 500 μ S/cm, pH 6.5) como se puede ver en la Tabla 4. Sin embargo, en las placas de las muestras obtenidas del tanque A no se pudo obtener una medida confiable de UFC/mL debido a que el número de colonias visualizadas fue <30 . Por otra parte, ninguna muestra recolectada del tanque B (sin nutrientes, 150 μ S/cm, pH 8) presentó crecimiento bacteriano colonial, mientras que las UFC/mL obtenidas de la plantas del tanque C parecen incrementar con el paso del tiempo.

Tabla 4

UFC/mL de bacterias endófitas de lenteja de agua del género Spirodela

Muestreo	Tanque A		Tanque B		Tanque C	
	Colonias	UFC/mL	Colonias	UFC/mL	Colonias	UFC/mL
1	+	TFTC	-	0	+	TFTC
	+	TFTC	-	0	+	TFTC
	+	TFTC	-	0	+	TFTC
	+	TFTC	-	0	+	6x10 ²
2	+	TFTC	-	0	+	2X10 ³
	+	TFTC	-	0	+	5X10 ³
	+	TFTC	-	0	+	1x10 ⁴
3	+	TFTC	-	0	+	1x10 ⁴
	+	TFTC	-	0	+	2x10 ⁴

Nota. (UFC): Unidad Formadora de Colonia, (+): presencia de colonias bacterianas, (-) ausencia de colonias bacterianas, (TFTC): muy pocas para contar.

Cepas Aisladas

Se aislaron un total de nueve bacterias endófitas de las plantas de lenteja de agua del género *Spirodela*; cuatro de ellas (A1, A2, A3 y A4) se obtuvieron de las plantas de lenteja de agua del tanque A, mientras que las cinco restantes (C5, C6, C7, C8 y C9) se aislaron de las plantas de lenteja de agua del tanque C. Las características morfológicas de cada cepa se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Características morfológicas coloniales de bacterias endófitas aisladas de lenteja de agua del género Spirodela

Cepa	Forma	Tamaño (mm)	Borde	Pigmentación	Opacidad	Consistencia
A1	Circular	<1	Entero	Amarillo	Translúcida	Mucoide
A2	Circular	<1	Entero	Crema	Translúcida	Mucoide
A3	Circular	1-5	Entero	Anaranjado	Opaca	Mucoide
A4	Irregular	<2	Entero	Amarillo Oscuro	Opaca	Viscoso
C5	Circular	~1	Entero	Blanca	Opaca	Viscoso
C6	Irregular	~4	Ondulado	Blanca	Opaca	Quebradiza
C7	Irregular	<3	Entero	Transparente- Blanquecino	Transparente	Viscoso
C8	Circular	~5	Entero	Blanca	Opaca	Viscoso
C9	Circular	~3	Entero	Blanca	Opaca	Viscoso

Nota. Elaboración Propia.

Las formas de colonias halladas fueron circular e irregular; los tamaños variaron de <1 a ~5; los bordes fueron en casi su totalidad enteros, con excepción de una cepa con borde ondulado; la pigmentación varió entre los colores blanco, crema, amarillo y anaranjado; se diferenciaron opacidades: translúcida, opaca y transparente; y en cuanto a la consistencia algunas fueron mucoides, viscosas o quebradizas.

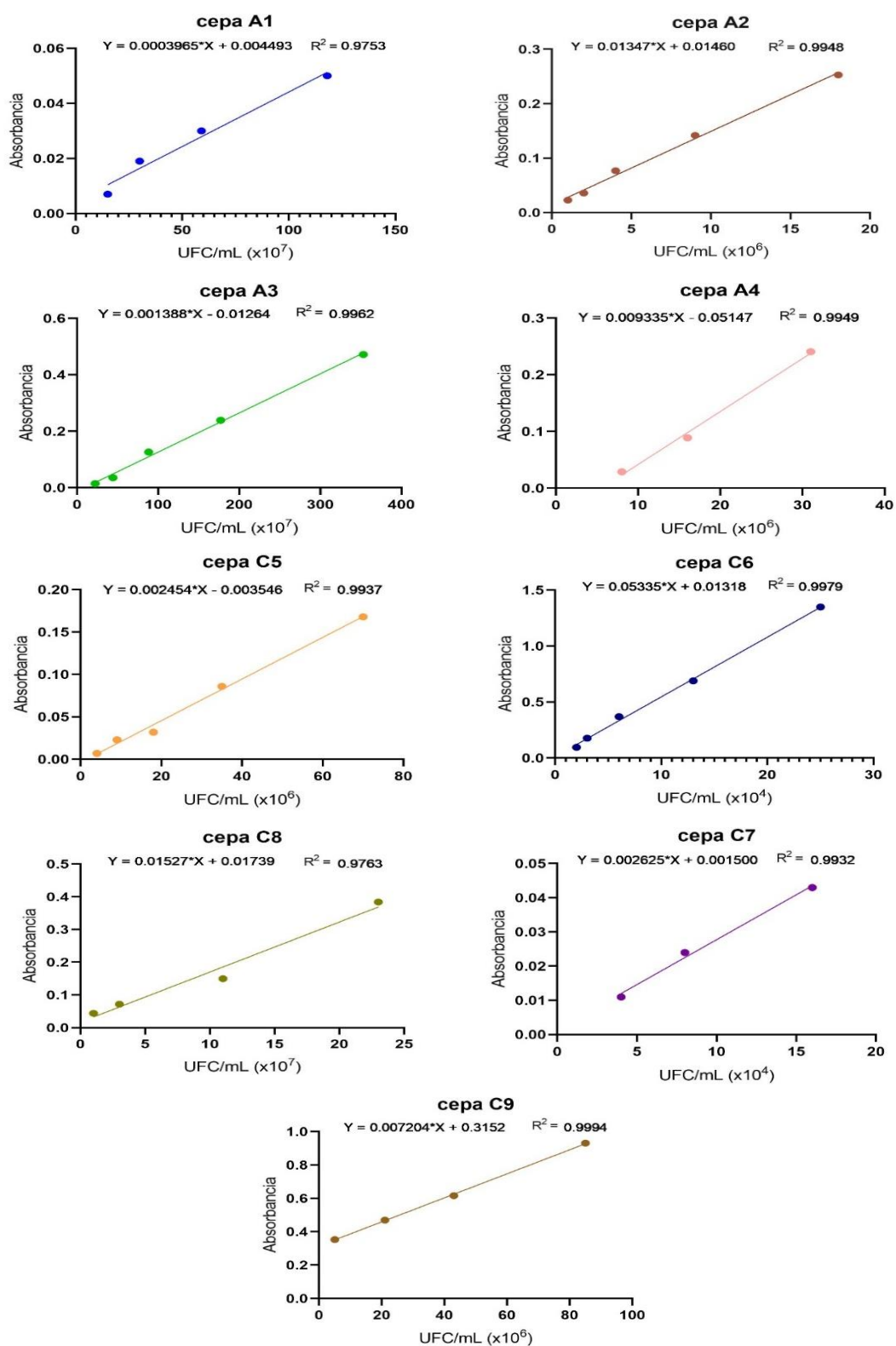
Evaluación de la Producción de AIA

Curvas de Calibración Absorbancia vs UFC/ml de cepas

Para poder fijar el mismo número de bacterias por cada cepa para la cuantificación de AIA, se requirió la elaboración de las curvas de calibración Abs vs UFC/ml de cada cepa aislada. Las curvas se muestran en la Figura 3 y contienen su respectiva ecuación y valor R^2 .

Figura 3

Curvas de calibración Absorbancia vs UFC/mL de la cepa A1-C9

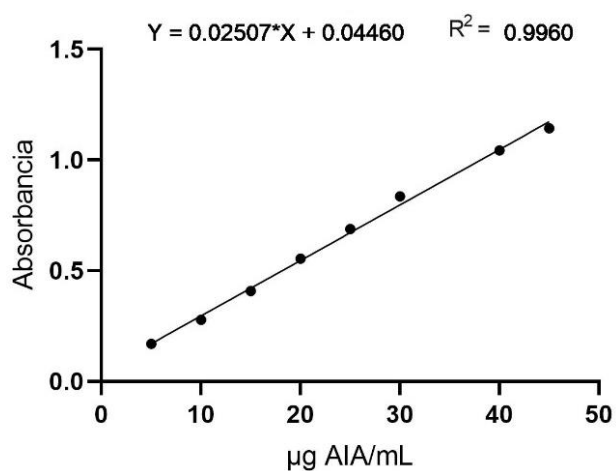


Curva Estándar de AIA

Para la cuantificación de la producción de AIA de los aislados bacterianos se requirió la elaboración de una curva estándar, misma que se muestra en la Figura 4, su ecuación es: $Y=0.02507*X+0.04460$ y su valor de R^2 es de 0.9960.

Figura 4

Curva estándar de AIA



Cuantificación de la Producción *in vitro* de AIA

Ocho de las nueve cepas de este estudio produjeron AIA *in vitro* y de acuerdo a la clasificación de Khalid et al. (2004) todas fueron bacterias bajas productoras (1 a 10 µg/mL) como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6

Producción de AIA de bacterias endófitas aisladas de lenteja de agua del género

Spirodela

Cepa	Producción de AIA (µg/mL)				Clasificación
	Testigo	Trp (1 mg/L)	Trp (2 mg/L)	Trp (5 mg/L)	
A1	1.745 ± 0.061*	0.255 ± 0*	0.229 ± 0.023	0.894 ± 0.069	Baja
A2	0.747 ± 0.046*	5.308 ± 0.122*	4.085 ± 0.144	1.838 ± 0.046	Baja
A3	1.519 ± 0.061*	10.03 ± 0.080*	2.184 ± 0.115	1.825 ± 0.023	Baja
A4	1.333 ± 0	2.370 ± 0	1.705 ± 0.083	2.077 ± 0.061	Baja
C5	0 ± 0	0 ± 0	0.043 ± 0.023	0 ± 0	NP

Cepa	Producción de AIA ($\mu\text{g/mL}$)				Clasificación
	Testigo	Trp (1 mg/L)	Trp (2 mg/L)	Trp (5 mg/L)	
C6	1.106 ± 0.023	$0.774 \pm 0.040^*$	$1.372 \pm 0.040^*$	0.987 ± 0.023	Baja
C7	$2.011 \pm 0,040$	$1.931 \pm 0.040^*$	2.064 ± 0.023	$4.019 \pm 0.083^*$	Baja
C8	4.550 ± 0.092	$4.683 \pm 0.040^*$	$3.566 \pm 0.080^*$	4.098 ± 0.023	Baja
C9	$5.042 \pm 0.080^*$	3.886 ± 0	4.777 ± 0.083	$3.168 \pm 0.069^*$	Baja

Nota. (NP): no productora de AIA, (*): diferencia estadísticamente significativa $p < 0.05$.

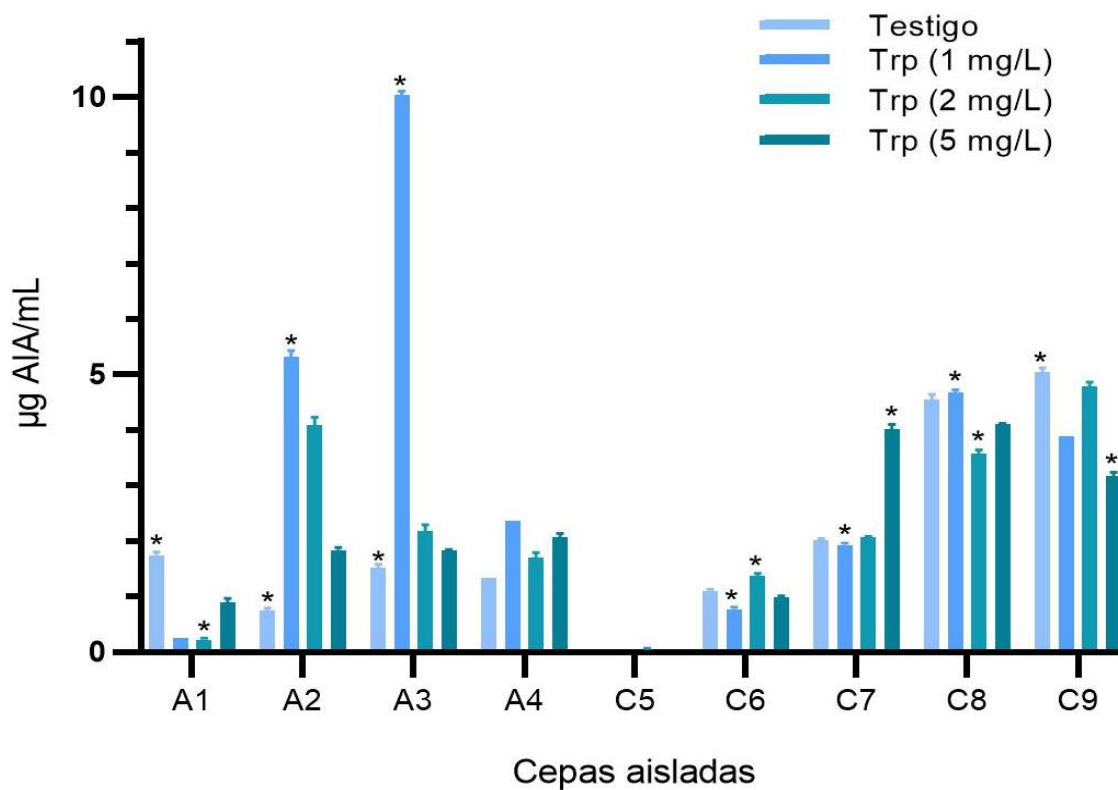
La cepa C5 fue la única clasificada como no productora de AIA.

Al comparar la producción de AIA frente a las diferentes concentraciones de triptófano para cada cepas aislada se obtuvo que las cepas A1 y C9 presentaron mayor producción sin la adición de triptófano, 1.745 ± 0.061 y $5.042 \pm 0.080 \mu\text{g/mL}$, respectivamente; la concentración de 1 mg/L de triptófano potenció la producción de AIA en las cepas A2 ($5.308 \pm 0.122 \mu\text{g/mL}$), A3 ($10.03 \pm 0.080 \mu\text{g/mL}$) y C8 ($4.683 \pm 0.040 \mu\text{g/mL}$); la concentración de 2 mg/L de triptófano acrecentó la producción de AIA en la cepa C6 ($1.372 \pm 0.040 \mu\text{g/mL}$) y únicamente la cepa C7 mostró una alta producción de AIA ($4.019 \pm 0.083 \mu\text{g/mL}$) con la adición de 5 mg/L de triptófano; no hubo diferencia significativa en la producción de AIA de la cepa A4 ($1-2 \mu\text{g/mL}$) sin la adición de triptófano o al variar sus concentraciones (ver Figura 5).

Figura 5

Producción de AIA de bacterias endófitas aisladas de lenteja de agua del género

Spirodela



Nota. (*): Diferencia estadísticamente significativa $p < 0.05$, (Trp): triptófano.

Además, al comparar la producción de AIA tomando en cuenta las diferentes bacterias aisladas se obtuvo que la cepa A3 produjo significativamente más AIA que las demás ($10.03 \pm 0.080 \mu\text{g/mL}$) al cultivarla en medio suplementado con 1 mg/L de triptófano.

Identificación Molecular de los Aislados Productores de AIA

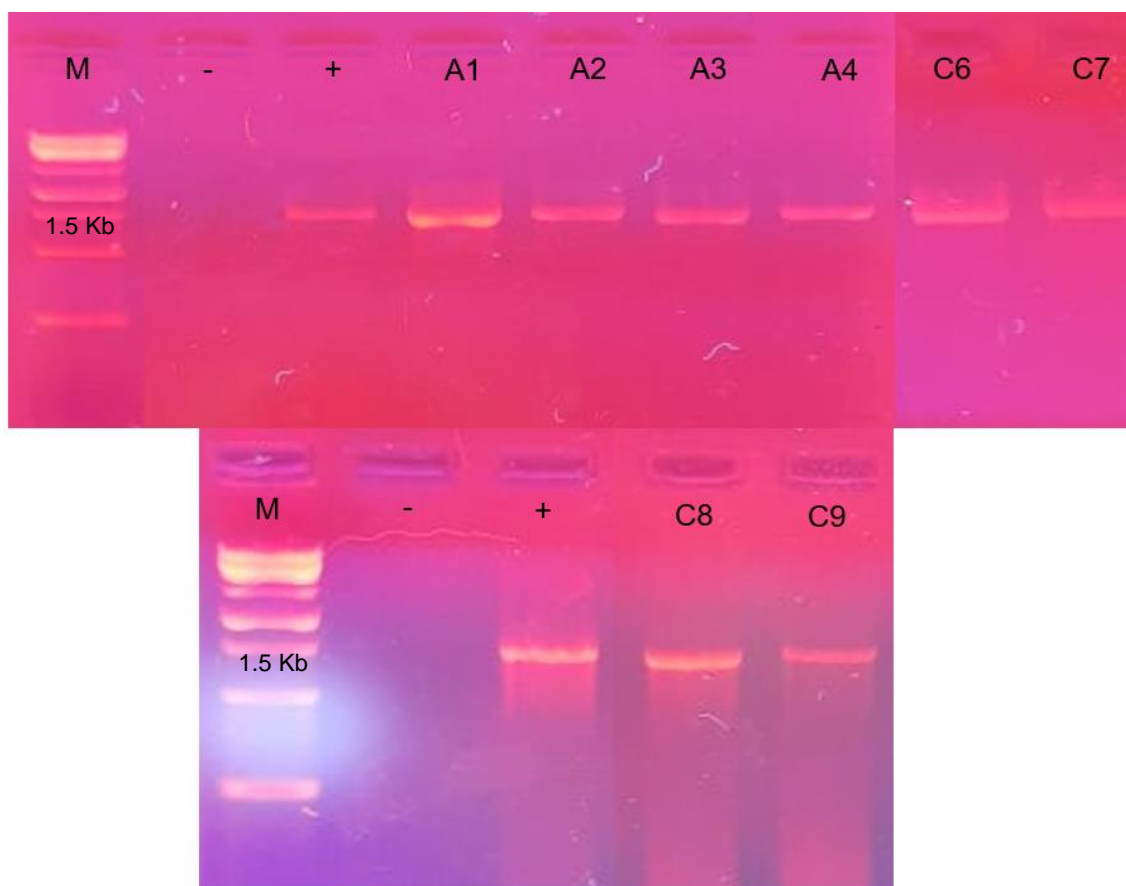
Amplificación del Gen 16S rDNA

Se continuó con la identificación molecular de las bacterias que revelaron capacidad de producir AIA, es decir, todas las cepas aisladas excepto la cepa C5. La electroforesis de los amplicones obtenidos reveló una única banda en todos los casos

de ~1.5 kb correspondiente al tamaño del gen 16S rDNA, como se puede ver en la Figura 6.

Figura 6

Bandas de los productos de amplificación del gen 16S rDNA de las bacterias productoras de AIA aisladas de plantas de lenteja de agua del género Spirodela



Nota. Electroforesis en gel de agarosa 1%, 100 V 30 min. (M): marcador de peso molecular de 1 kb, (-): control negativo (agua libre de nucleasas), (+): control positivo.

Análisis Bioinformático de las Secuencias

Una vez recibidas las secuencias, se procedió a analizar la calidad de las mismas, mediante el programa Geneious 2021.0.1. Las secuencias tenían una calidad superior a 87%, sin embargo, para obtener una mejor calidad se recortaron los

extremos debido a la baja resolución que presentaron los electroferogramas. De esta manera, se obtuvo secuencias con una calidad mayor al 91%.

Tabla 7

Características de las secuencias de los productos de PCR

Muestra	Longitud (bp)	% de Calidad
A1	1259	98.6
A2	1342	97.7
A3	1245	99.2
A4	1281	98.5
C6	1390	97.8
C7	1204	91.6
C8	1199	93.9
C9	913	99.5

Nota. (bp): pares de bases.

Las secuencias luego de su edición se encuentran en los Anexos 1-8. La búsqueda de secuencias con alineaciones significativas fue realizada para cada cepa y se muestra en las Tablas 8-15.

En la Tabla 8, se puede notar que de acuerdo a los porcentajes de identidad superiores al 99.44% todas las cepas pertenecen al género *Curtobacterium*. De manera que, la cepa A1 aislada en el presente estudio pertenece a este género. La cepa tipo con la que presentó mayor similitud fue *Curtobacterium flaccumfaciens* con un 99.68% de similitud.

Tabla 8

Secuencias que producen alineaciones significativas con la cepa A1

Nombre científico	E valor	% Identidad	N° Accesoión
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	0.0	99.68	MT760002.1
<i>Curtobacterium pusillum</i>	0.0	99.60	LN681569.1
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	0.0	99.52	MT758031.1
<i>Curtobacterium pusillum</i>	0.0	99.52	NR_042315.1
<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	0.0	99.44	NR_116064.1
<i>Curtobacterium pusillum</i>	0.0	99.44	MT760355.1

Nombre científico	E valor	% Identidad	N° Accesoión
<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	0.0	99.44	NR_104839.1

En la Tabla 9, se puede ver que según los porcentajes de identidad superiores al 99.70% todas las cepas pertenecen al género *Curtobacterium* (al igual que la cepa A1). Por lo que, se puede decir que la cepa A2 también pertenece a este género. La cepa tipo con la que presentó mayor similitud fue *Curtobacterium flaccumfaciens* con un 99.68%.

Tabla 9

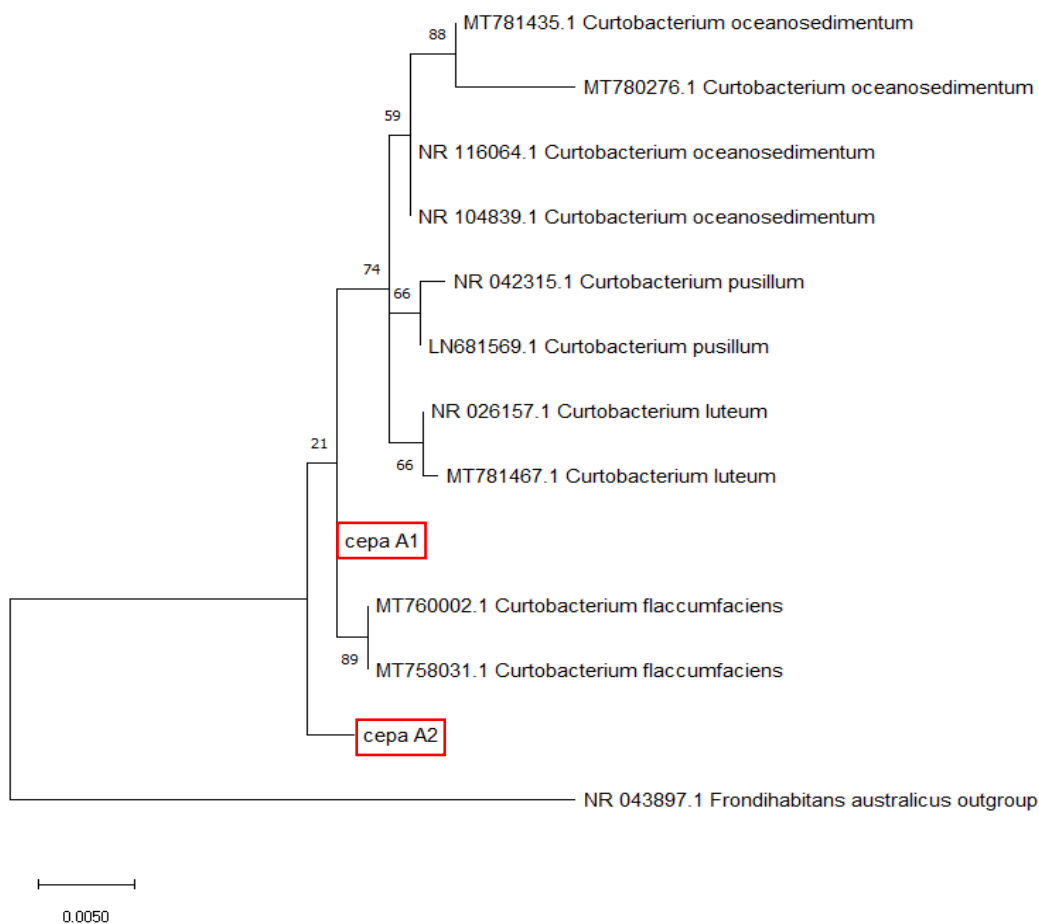
Secuencias que producen alineaciones significativas con la cepa A2

Nombre científico	E valor	% Identidad	N° Accesoión
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	0.0	99.70	MT760002.1
<i>Curtobacterium pusillum</i>	0.0	99.33	LN681569.1
<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	0.0	99.33	MT780276.1
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	0.0	99.55	MT758031.1
<i>Curtobacterium pusillum</i>	0.0	99.26	NR_042315.1
<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	0.0	99.18	NR_116064.1
<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	0.0	99.18	NR_104839.1
<i>Curtobacterium luteum</i>	0.0	99.40	MT781467.1
<i>Curtobacterium luteum</i>	0.0	99.03	NR_026157.1
<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	0.0	99.32	MT781435.1

A partir del alineamiento múltiple de secuencias de las cepas A1 y A2 con las secuencias obtenidas en la base de datos se construyó el árbol filogenético mostrado en la Figura 7, el cual refleja que las cepas A1 y A2 están estrechamente relacionadas al género *Curtobacterium*.

Figura 7

Árbol filogenético de las cepas A1 y A2



Nota. Para la elaboración de este árbol se utilizó el método de Máxima Verosimilitud y el modelo TN93+G+I.

Por otra parte, en la Tabla 10 se puede ver que según los porcentajes de identidad superiores al 99.36% todas las cepas pertenecen al género *Brevundimonas*. De manera que la cepa A3 pertenece a este género. La cepa A1 tuvo 100% de similitud con las especies *Brevundimonas vesicularis* y *Brevundimonas nasdae*.

Tabla 10

Secuencias que producen alineaciones significativas con la cepa A3

Nombre científico	E valor	% Identidad	N° Accesoión
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	0.0	100	NR_113586.1
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	0.0	100	LN681560.1
<i>Brevundimonas nasdae</i>	0.0	100	NR_028633.1
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	0.0	100	NR_037104.1
<i>Brevundimonas intermedia</i>	0.0	99.84	NR_041966.1
<i>Brevundimonas nasdae</i>	0.0	99.68	MW228832.1
<i>Brevundimonas intermedia</i>	0.0	99.68	MW228826.1
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	0.0	99.52	NR_112078.1
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	0.0	99.36	NR_116136.1

A partir del alineamiento múltiple de secuencias de la cepa A3 con las secuencias obtenidas en la base de datos se construyó el árbol filogenético mostrado en la Figura 8. Este árbol no brinda información clara de la filogenia de la cepa A3 ya que no se ve la formación de clados concisos para cada especie.

Figura 8

Árbol filogenético de la cepa A3



Nota. Para la elaboración de este árbol se utilizó el método de Máxima Verosimilitud y el modelo HKY+G.

En la Tabla 11, en cambio se puede ver que la cepa tipo con la que presentó mayor similitud la secuencia de la cepa A4 fue *Arthrobacter rhombi* con un 99.38%, debido a ello, se la puede identificar de esa manera.

Tabla 11

Secuencias que producen alineaciones significativas con la cepa A4

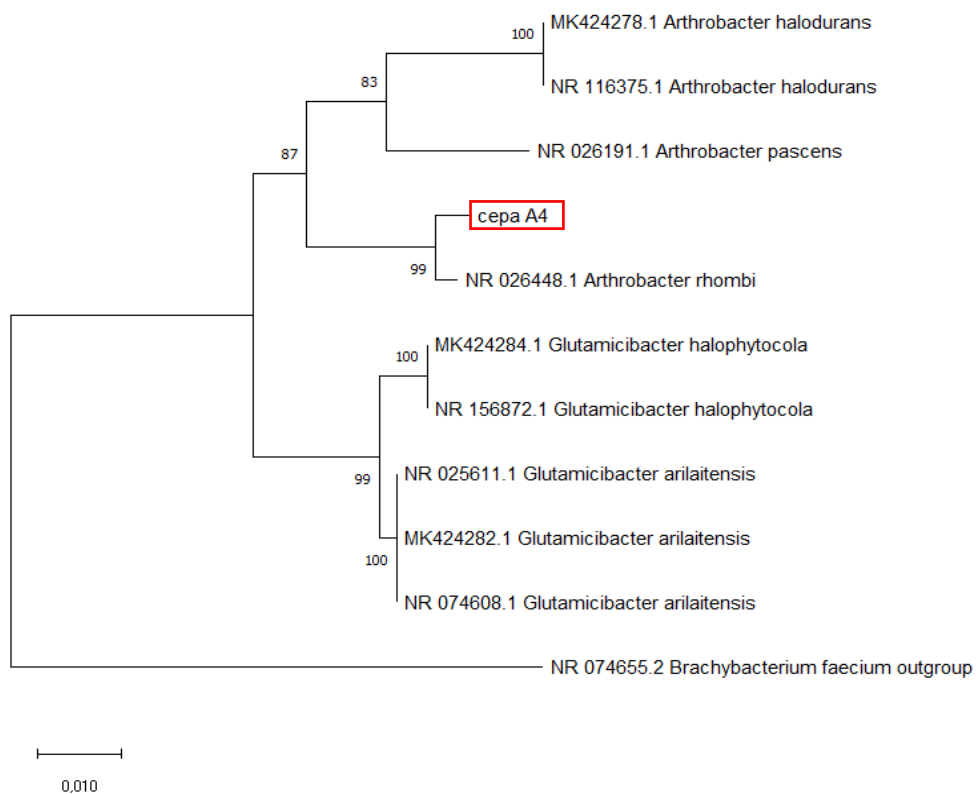
Nombre científico	E valor	% Identidad	N° Accesoión
<i>Arthrobacter rhombi</i>	0.0	99.38	NR_026448.1
<i>Glutamicibacter halophytocola</i>	0.0	97.5	MK424284.1
<i>Glutamicibacter arilaitensis</i>	0.0	97.5	MK424282.1
<i>Glutamicibacter halophytocola</i>	0.0	97.5	NR_156872.1
<i>Glutamicibacter arilaitensis</i>	0.0	97.5	NR_074608.1

Nombre científico	E valor	% Identidad	N° Accesoión
<i>Glutamicibacter arilaitensis</i>	0.0	97.5	NR_025611.1
<i>Arthrobacter halodurans</i>	0.0	97.42	MK424278.1
<i>Arthrobacter halodurans</i>	0.0	97.42	NR_116375.1
<i>Arthrobacter pascens</i>	0.0	97.42	NR_026191.1

A partir del alineamiento múltiple de secuencias de la cepa A4 con las secuencias obtenidas en la base de datos se construyó el árbol filogenético mostrado en la Figura 9, el cual refleja que la cepa A4 está estrechamente relacionada a la especie *Arthrobacter rhombi*.

Figura 9

Árbol filogenético de la cepa A4



Nota. Para la elaboración de este árbol se utilizó el método de Máxima Verosimilitud y el modelo TN93+G+I.

Asimismo, en la Tabla 12 se muestran las secuencias que produjeron alineaciones significativas en BLASTn de GenBank con la secuencia de la cepa C6. En esta tabla se puede apreciar claramente que la cepa C6 pertenece al género *Bacillus*. Sin embargo, no se puede identificar a nivel de especie ya que la secuencia de la cepa A1 coincidió al 100% con varias especies (*Bacillus aerophilus*, *Bacillus aerius*, *Bacillus stratosphericus* y *Bacillus altitudinis*).

Tabla 12

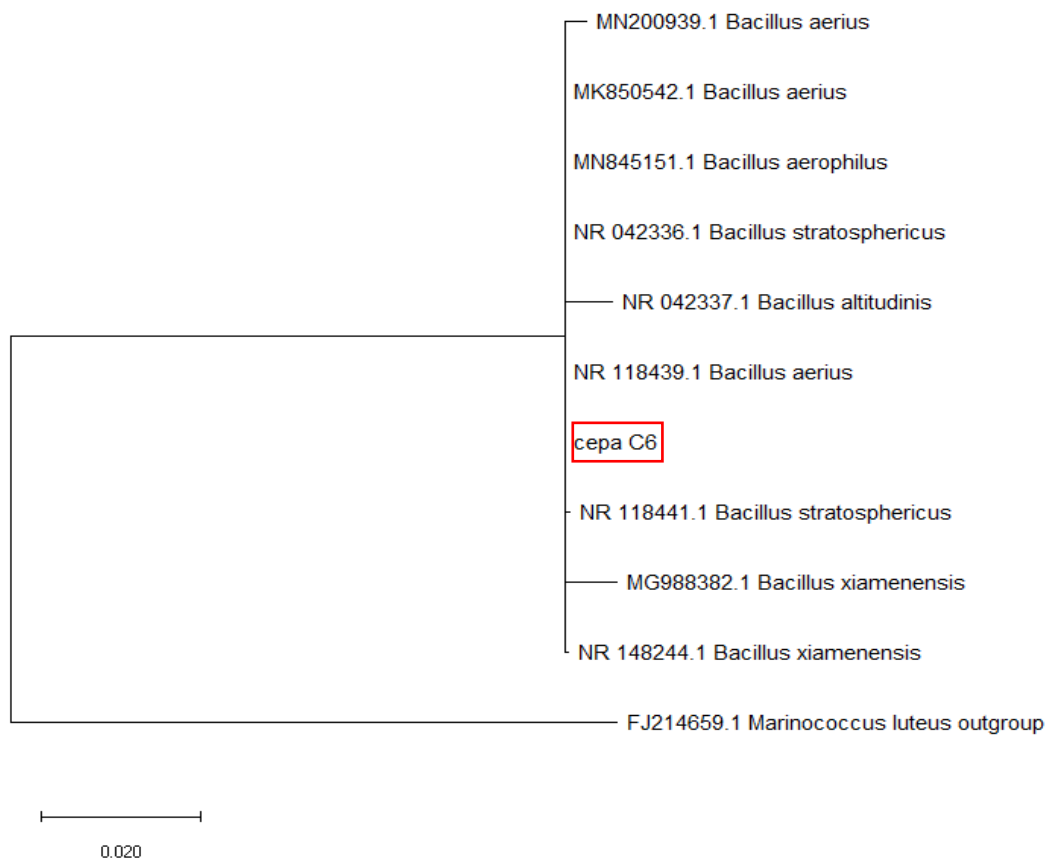
Secuencias que producen alineaciones significativas con la cepa C6

Nombre científico	E valor	% Identidad	N° Accesoión
<i>Bacillus aerophilus</i>	0.0	100	MN845151.1
<i>Bacillus aerius</i>	0.0	100	MK850542.1
<i>Bacillus aerius</i>	0.0	100	NR_118439.1
<i>Bacillus stratosphericus</i>	0.0	100	NR_042336.1
<i>Bacillus altitudinis</i>	0.0	100	NR_042337.1
<i>Bacillus aerius</i>	0.0	99.93	MN200939.1
<i>Bacillus xiamenensis</i>	0.0	99.93	MG988382.1
<i>Bacillus xiamenensis</i>	0.0	99.93	NR_148244.1
<i>Bacillus stratosphericus</i>	0.0	99.93	NR_118441.1

A partir del alineamiento múltiple de secuencias de la cepa C6 con las secuencias obtenidas en la base de datos se construyó el árbol filogenético mostrado en la Figura 10. Este árbol muestra que la cepa C6 está cercanamente relacionada con todas las especies enlistadas en la Tabla 12. De igual manera, no se aprecia la formación de clados concisos entre cepas de la misma especie.

Figura 10

Árbol filogenético de la cepa C6



Nota. Para la elaboración de este árbol se utilizó el método de Máxima Verosimilitud y el modelo HKY+I.

En la Tabla 13, se puede ver que la cepa C7 pertenece al género *Bacillus* (al igual que la cepa C6) y podría ser identificada como *Bacillus circulans* ya que presentó el mayor porcentaje de similitud con esta especie (98.05%).

Tabla 13

Secuencias que producen alineaciones significativas con la cepa C7

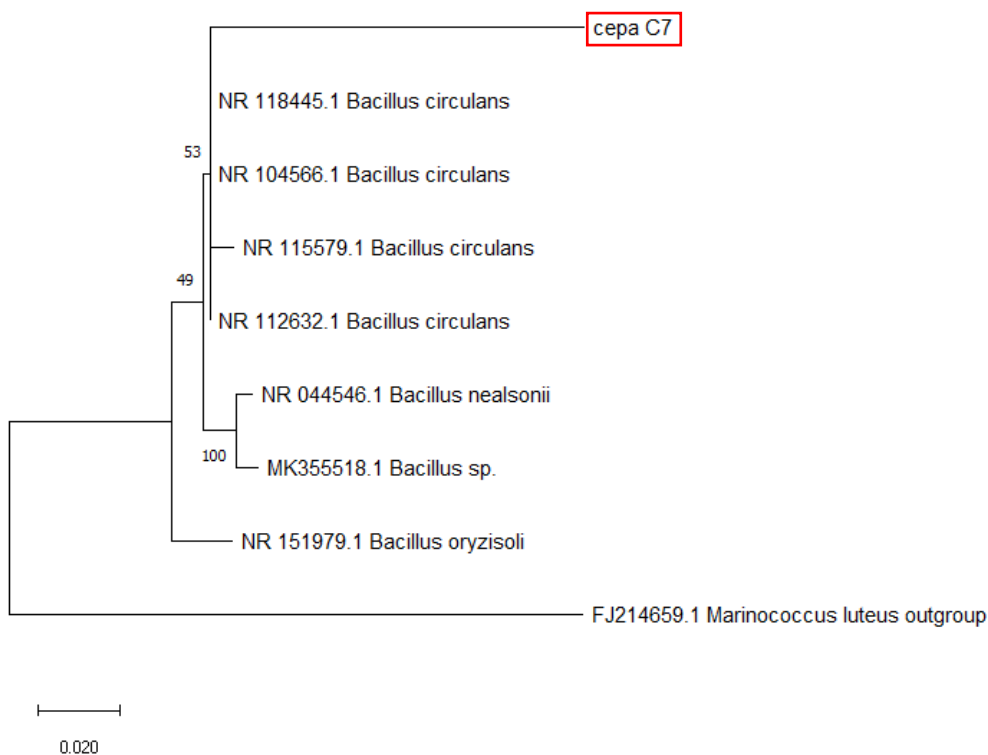
Nombre científico	E valor	% Identidad	N° Accesión
<i>Bacillus circulans</i>	0.0	98.05	NR_118445.1
<i>Bacillus circulans</i>	0.0	98.05	NR_112632.1
<i>Bacillus circulans</i>	0.0	97.96	NR_104566.1

Nombre científico	E valor	% Identidad	N° Accesoión
<i>Bacillus oryzae</i>	0.0	97.49	NR_151979.1
<i>Bacillus sp.</i>	0.0	97.31	MK355518.1
<i>Bacillus circulans</i>	0.0	96.93	NR_115579.1
<i>Bacillus nealsonii</i>	0.0	97.03	NR_044546.1

A partir del alineamiento múltiple de secuencias de la cepa C7 con las secuencias obtenidas en la base de datos se construyó el árbol filogenético mostrado en la Figura 11. En esta figura se ve que la cepa C7 mantiene una estrecha relación con la especie *Bacillus circulans* y ha formado un clado conciso con la misma.

Figura 11

Árbol filogenético de la cepa C7



Nota. Para la elaboración de este árbol se utilizó el método de Máxima Verosimilitud y el modelo HKY+G.

En la Tabla 14, se puede notar que la cepa C8 pertenece al género *Ochrobactrum* y coincide en un 99.58% con la especie *Ochrobactrum pseudogrignonense*, por lo que se lo identificó de esa manera.

Tabla 14

Secuencias que producen alineaciones significativas con la cepa C8

Nombre científico	E valor	% Identidad	N° Accesoión
<i>Ochrobactrum pseudogrignonense</i>	0.0	99.58	NR_042589.1
<i>Ochrobactrum thiophenivorans</i>	0.0	98.83	NR_042599.1
<i>Ochrobactrum sp.</i>	0.0	98.67	MG835335.1
<i>Ochrobactrum grignonense</i>	0.0	98.67	NR_114149.1
<i>Ochrobactrum grignonense</i>	0.0	98.58	NR_028901.1
<i>Ochrobactrum grignonense</i>	0.0	98.58	NR_115044.1
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	0.0	98.09	MH281752.1
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	0.0	98.09	NR_074243.1

Por otra parte, en la Tabla 15 se muestran las secuencias que produjeron alineaciones significativas en BLASTn de GenBank con la secuencia de la cepa C9. Al igual que la cepa C8, la cepa C9 pertenece al género *Ochrobactrum* y coincide en un 100% con la especie *Ochrobactrum pseudogrignonense*.

Tabla 15

Secuencias que producen alineaciones significativas con la cepa C9

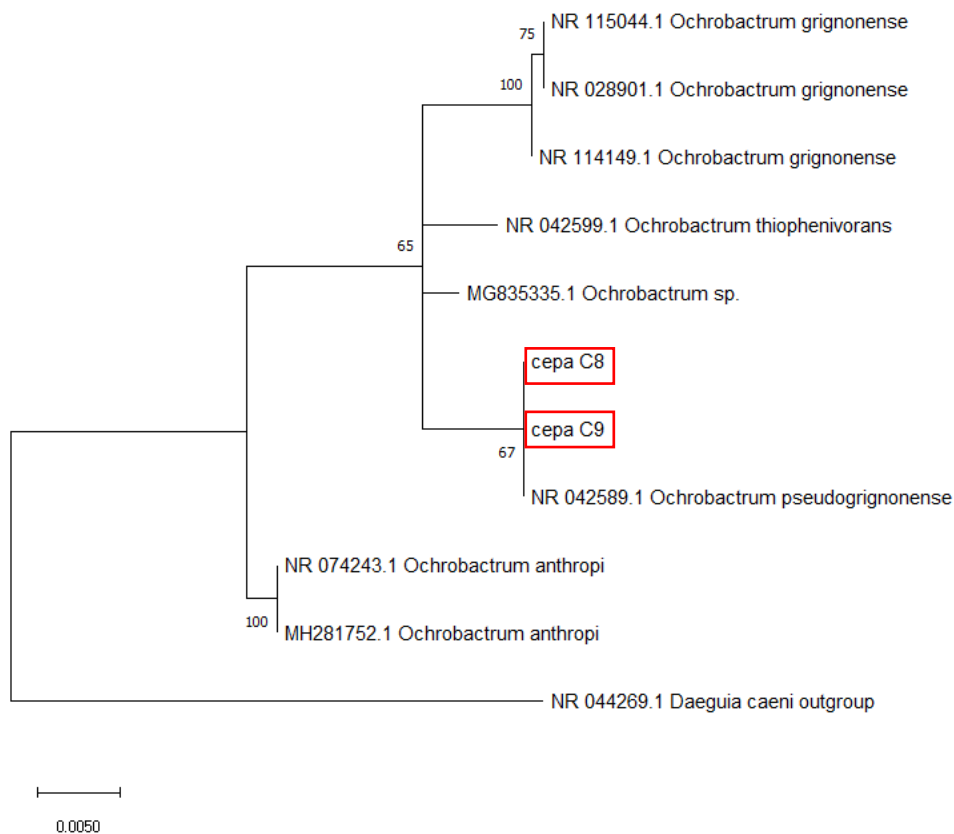
Nombre científico	E valor	% Identidad	N° Accesoión
<i>Ochrobactrum pseudogrignonense</i>	0.0	100	NR_042589.1
<i>Ochrobactrum thiophenivorans</i>	0.0	99.23	NR_042599.1
<i>Ochrobactrum grignonense</i>	0.0	99.01	NR_114149.1
<i>Ochrobactrum pituitosum</i>	0.0	99.01	NR_115043.1
<i>Ochrobactrum grignonense</i>	0.0	98.90	NR_028901.1
<i>Ochrobactrum grignonense</i>	0.0	98.90	NR_115044.1
<i>Ochrobactrum sp.</i>	0.0	98.80	MG835335.1

A partir del alineamiento múltiple de secuencias de las cepas C8 y C9 con las secuencias obtenidas en la base de datos se construyó el árbol filogenético mostrado

en la Figura 12, en donde se puede ver que las cepas C8 y C9 están estrechamente relacionadas con la especie *Ochrobactrum pseudogrignonense*.

Figura 12

Árbol filogenético de la cepa C8 y C9



Nota. Para la elaboración de este árbol se utilizó el método de Máxima Verosimilitud y el modelo T92+G+I.

Resumen de Resultados

Los endófitos productores de AIA encontrados en este estudio pertenecen a los filos Actinobacteria, Proteobacteria y Firmicutes; y a nivel de género forman parte de los géneros *Curtobacterium*, *Brevundimonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus* y *Ochrobactrum*. En la Tabla 16, se muestra la identificación de las cepas productoras de AIA y la cantidad de AIA producida por las mismas en diferentes concentraciones de triptófano en el medio

de cultivo. En este estudio, se obtuvo que la cepa A3 identificada como *Brevundimonas vesicularis*/*Brevundimonas nasdae* produjo significativamente más AIA que las demás ($10.03 \pm 0.080 \mu\text{g/mL}$), al cultivarla en medio suplementado con 1 mg/L de triptófano.

Tabla 16

Resumen de resultados

Cepa	Identificación	Producción de AIA ($\mu\text{g/mL}$)			
		Testigo	Trp (1 mg/L)	Trp (2 mg/L)	Trp (5 mg/L)
A1	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	$1.745 \pm 0.061^*$	$0.255 \pm 0^*$	0.229 ± 0.023	0.894 ± 0.069
A2	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	$0.747 \pm 0.046^*$	$5.308 \pm 0.122^*$	4.085 ± 0.144	1.838 ± 0.046
A3	<i>Brevundimonas vesicularis</i> / <i>Brevundimonas nasdae</i>	$1.519 \pm 0.061^*$	$10.03 \pm 0.080^*$	2.184 ± 0.115	1.825 ± 0.023
A4	<i>Arthrobacter rhombi</i>	1.333 ± 0	2.370 ± 0	1.705 ± 0.083	2.077 ± 0.061
C6	<i>Bacillus sp.</i>	1.106 ± 0.023	$0.774 \pm 0.040^*$	$1.372 \pm 0.040^*$	0.987 ± 0.023
C7	<i>Bacillus circulans</i>	$2.011 \pm 0,040$	$1.931 \pm 0.040^*$	2.064 ± 0.023	$4.019 \pm 0.083^*$
C8	<i>Ochrobactrum pseudogrignonense</i>	4.550 ± 0.092	$4.683 \pm 0.040^*$	$3.566 \pm 0.080^*$	4.098 ± 0.023
C9	<i>Ochrobactrum pseudogrignonense</i>	$5.042 \pm 0.080^*$	3.886 ± 0	4.777 ± 0.083	$3.168 \pm 0.069^*$

Nota. (*): Diferencia estadísticamente significativa $p < 0.05$, (Trp): triptófano, (AIA): ácido indolacético.

Capítulo V: Discusión

El procedimiento de aislamiento es un paso crítico al trabajar con bacterias endófitas ya que debe ser lo suficientemente sensible para recuperar los microorganismos endófitos, pero al mismo tiempo debe ser lo suficientemente fuerte como para eliminar los epífitos de la superficie de la planta (Anjum & Chandra, 2015). La validación del procedimiento de esterilización de la superficie es imprescindible, ya que solo de esa manera se puede suponer que los microorganismos aislados son endófitos. Una de las formas de verificar este proceso es cultivando alícuotas de agua del último lavado en medios nutritivos y si no se produce crecimiento microbiano en el medio, la esterilización de la superficie se considera completa (Hallmann et al., 2007). Por lo tanto, las bacterias aisladas en este estudio pueden ser consideradas endófitas ya que no se obtuvo crecimiento bacteriano en todas las placas inoculadas con el agua del último lavado de las plantas de lenteja de agua.

Existen muchos factores que pueden influir en la diversidad endófitas de una planta en particular, por ejemplo, la edad, el genotipo, la ubicación geográfica e incluso el tejido que se analiza (Hallmann & Berg, 2007). Además, las etapas de crecimiento de la planta hospedante también pueden determinar la diversidad endófitas de una planta, donde las etapas de la planta enriquecidas en disponibilidad de nutrientes tienden a tener una mayor diversidad bacteriana (Shi et al., 2014). Con el fin de obtener mayor diversidad de bacterias endófitas en el presente trabajo, se cultivó plantas de lenteja de agua en diferentes condiciones de nutrientes, conductividad eléctrica y pH. Fue así que se obtuvo endófitos bacterianos de las plantas cultivadas tanto en el tanque A (sin nutrientes, 150 $\mu\text{S/cm}$, pH 6.5) como en el C (con nutrientes, 500 $\mu\text{S/cm}$, pH 6.5). Cabe recalcar que en las muestras tomadas del tanque C (con nutrientes) se obtuvo un mayor número de UFC/mL que en los demás tanques, sin embargo, no se observó una mayor diversidad.

Por otra parte, ninguna muestra recolectada del tanque B (sin nutrientes, 150 $\mu\text{S/cm}$, pH 8) presentó crecimiento bacteriano colonial. Esto pudo deberse a que el pH más elevado del agua afectó negativamente a la planta, ya que se observó con raíces más delgadas y débiles; y en este caso en particular el protocolo de esterilización que se utilizó pudo haber sido muy fuerte para la planta. Hollants et al. (2010) menciona que sustancias como el cloro o derivados del mercurio no son adecuados para la esterilización de superficie de muestras delicadas.

Las bacterias endófitas productoras de AIA de plantas de lenteja de agua del género *Spirodela* hallados en esta investigación fueron de los filos Actinobacteria, Proteobacteria y Firmicutes. Lo que coincide con los reportes de Kittiwongwattana (2015) y Gilbert et al. (2018) al estudiar la biodiversidad endófito de la lenteja de agua de los géneros *Wolffia*, *Lemna*, *Spirodela* y *Landoltia*. Del filo Actinobacteria, se encontró los géneros *Curtobacterium* y *Arthrobacter*; del filo Proteobacteria los géneros *Brevundimonas* y *Ochrobactrum*; y del filo Firmicutes el género *Bacillus*. Los géneros *Brevundimonas* y *Bacillus* han sido reportados por los autores mencionados anteriormente; sin embargo, los géneros *Curtobacterium*, *Arthrobacter* y *Ochrobactrum* no habían sido reportados como endófitos de lenteja de agua. Esto se explica ya que de acuerdo a Acosta et al. (2020) la lenteja de agua tiene un conjunto de taxones bacterianos presentes de manera constante, no obstante las bacterias que se encuentran en la lenteja de agua en un sitio y que no se encuentran en otro podrían ser bacterias específicas de ese lugar. Además, las plantas utilizadas en este estudio fueron cultivadas, a diferencia de las estudiadas por otros autores, las cuales eran silvestres; respecto a ello, Glassner et al. (2015) menciona que pueden existir diferencias sustanciales entre los taxones de plantas cultivadas y silvestres en relación al tipo de endófitos que las colonizan.

Aunque no todos los géneros de este estudio han sido reportados anteriormente como endófitos de lenteja de agua, si lo han sido de muchas otras plantas. El género *Curtobacterium*, se encontró como endófito de varios cultivos, incluido el ñame (Tör et al., 1992), uva (Bell et al., 1995), trébol rojo y papa (Sturz et al., 1998), pino (Bent & Chanway, 1998), arroz (Elbeltagy et al., 2000; Mano et al., 2006), cítricos (Araújo et al., 2001), plantas de la pradera (Zinniel et al., 2002), cafeto arábigo (F. Vega et al., 2005), álamo (Ulrich et al., 2008), pasto varilla (Gagne-Bourgue et al., 2013), raigrás (Kukla et al., 2014), cáñamo (Afzal et al., 2015), rambután (Suhandono et al., 2016), *Kobreasia capillifolia* (WANG et al., 2016), manzana (Miliute et al., 2016) y morera (Xu et al., 2019).

El género *Brevundimonas*, además de haber sido reportado como endófito de lenteja de agua (Kittiwongwattana, 2015), ha sido nombrado como endófito de maíz (Montañez et al., 2012), melocotón (Liaqat & Eltem, 2016), planta medicinal *Ferula songorica* (Y. H. Liu et al., 2016), jarilla (Afzal et al., 2016), té (Yan et al., 2018), sorgo (Mareque et al., 2018) y arroz (Shen et al., 2019).

El género *Arthrobacter*, se encontró como endófito resistente a metales en las plantas hiperacumuladoras de níquel *Alyssum bertolonii* (Barzanti et al., 2007), cadmio *Solanum nigrum* (Luo et al., 2011) y cobre *Commelina communis* (Sun et al., 2010). También se reportó *Arthrobacter spp.* endófitos de álamos que crecen en sitios contaminado con BTEX (Moore et al., 2006), uvas (Marasco et al., 2013), hipérico (Egamberdieva et al., 2017) y en plantas acuáticas como *Azolla* (Forni et al., 1992) y *Elodea potamogeton* (Coila, 2018).

El género *Bacillus*, se ha mencionado como endófito de fresa (Dias et al., 2009), ginseng (Vendan et al., 2010), eucalipto (Paz et al., 2012), banano (Andrade et al., 2014), jengibre (Chen et al., 2014), semillas de frijol (Chimwamurombe et al., 2016), zamarilla (Hassan, 2017), tomate (Tian et al., 2017), judía (Bhutani et al., 2018), maíz (Ribeiro et al., 2018), alfalfa (Chinnaswamy et al., 2018), semillas de garbanzo

(Mukherjee et al., 2020), *Pulicaria incisa* (Fouda et al., 2021) y en lenteja de agua (Kittiwongwattana, 2015; Gilbert et al., 2018) como ya se mencionó.

El género *Ochrobactrum*, se ha hallado como endófito de arroz (Tripathi et al., 2006), nódulos del garbanzo (Imran et al., 2010), manglares (Renata A. Castro et al., 2014), guaranazeiro (M. C. dos S. e Silva, 2015), semillas de guaraná (M. C. S. Silva et al., 2016), regaliz (Li et al., 2016) planta medicinal cálamo aromático (Singh & Khunjamayum, 2018), nódulos de alfalfa (Navarro-Torre et al., 2019) y maíz (U. C. Silva et al., 2021).

Los géneros *Curtobacterium*, *Brevundimonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus* y *Ochrobactrum* en muchos estudios han revelado tener cepas productoras y no productoras de AIA, además, las cantidades producidas por cada cepa ha sido variable. Por otra parte, en algunos casos la adición de triptófano al medio de cultivo potenció la producción de AIA de algunas cepas, pero en otros casos no ha existido influencia.

En cuanto a la producción de AIA por parte del género *Curtobacterium*, WANG et al. (2016) informó que la cepa *C. flaccumfaciens* 262XY10, endófito de *Kobreasia capillifolia*, generó 5.53 ± 0.122 $\mu\text{g/mL}$, en medio al que se adicionó 1 mg/L de triptófano. S. Ali et al. (2018) reportó que, endófitos *Curtobacterium* spp. aislados de la savia del maíz, producían de 3 a 4 $\mu\text{g/mL}$ en medio con 200 mg/L de triptófano. *C. flaccumfaciens* MOSEL-w15 aislada del cáñamo por Afzal et al. (2015) reveló producción de 1.8 $\mu\text{g/mL}$ en medio sin triptófano y 5.1 $\mu\text{g/mL}$ en medio suplementado con 200 mg/L de triptófano (el triptófano potenció ligeramente la producción de AIA en esta cepa). Por otra parte, endófitos *C. flaccumfaciens* aislados por R. A. Castro (2011) de manglares, revelaron una producción de AIA de 16 a 23 $\mu\text{g/mL}$ en medio suplementado con 1 g/L de triptófano, mientras que, en estas mismas condiciones, Kukla et al. (2014) reportó endófitos de raigrás *C. flaccumfaciens* cepas S3, S4 y S21 con producciones de 1.9 ± 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 1.0 ± 0.1 $\mu\text{g/mL}$ y 28.7 ± 0.2 $\mu\text{g/mL}$,

respectivamente. Es importante mencionar que también se encontró cepas aisladas del arroz, no productoras de AIA (Elbeltagy et al., 2000).

En este estudio, la cepa A1 identificada como *C. flaccumfaciens* manifestó únicamente producción de AIA en medio sin triptófano (1.745 ± 0.061 µg/mL), mientras que la cepa A2, perteneciente a la misma especie, reveló producir AIA (5.308 ± 0.122 µg/mL, valor máximo) solo en presencia de triptófano y no hubo diferencia significativa entre concentraciones.

Respecto al género *Brevundimonas*, Liaqat & Eltem (2016) reportó a *B. vesicularis* EGE-B-4, aislada de porta injertos del melocotón, como productora de AIA con 9.6 ± 2.9 µg/mL en medio al que se le agregó 1 g/L de triptófano. *Brevundimonas* sp. EMA-177 aislada por Montañez et al. (2012) reveló una producción de AIA de 49.0 µg/mL en medio con 2 g/L de triptófano. También, se ha dado el caso de informes donde ninguna cepa aislada del género *Brevundimonas* mostró capacidad de producir AIA, como por ejemplo, endófitos de la planta de té aislados por Yan et al. (2018) y *B. vesicularis*, endófito de arroz (Shen et al., 2019).

En esta investigación, la cepa A3 identificada como *B. vesicularis/B. nasdae* reveló producción de AIA tanto en medio con triptófano como sin él. Sin embargo, en medio suplementado con 1 mg/L de triptófano exhibió una mayor producción (10.03 ± 0.080) en comparación con los demás tratamiento y respecto a las demás cepas estudiadas.

Por otra parte, Luo et al. (2011) aisló endófitos de *Arthrobacter* de *Solanum nigrum* y notificó que la cepa endófito *Arthrobacter* sp. LKR03 tuvo la capacidad de producir 8.8 ± 0.1 µg/mL de AIA, mientras que las cepas LKR02 y LKS02 revelaron ser no productoras de AIA. Sun et al. (2010), también reportó dos cepas endófitas productoras de AIA, aisladas de *Commelina communis*, *Arthrobacter* spp. GM21 y YM21, con valores de 12.4 ± 4.5 y 41.1 ± 4.7 µg/mL; y una cepa no productora

(*Arthrobacter* sp. YM11). Egamberdieva et al. (2017) informó que el endófito de hipérico, *A. crystallopoietes* S1, produjo 19.8 µg/mL de AIA en medio sin triptófano y 22.1 µg/mL en medio con triptófano (el triptófano potenció ligeramente la producción de AIA en esta cepa). Estos estudios evaluaron la producción de AIA en medio suplementado con 500 mg/L de triptófano. De igual manera, *Arthrobacter* spp. fueron aisladas de especies de helechos acuáticos *Azolla pinnata* y *Azolla filiculoides*; estas bacterias produjeron AIA únicamente en medio al que se le añadió triptófano. La máxima producción de AIA (10 µg/mL) fue producido por *A. globiformis* en medio suplementado con 600 mg/L de triptófano, seguido de 4.4 µg/mL generado por *A. nicotianae*, en medio con 400 mg/L de triptófano. El contenido de AIA varió según la concentración de triptófano agregado al medio de cultivo, generalmente más alto a 400 y 600 mg/L de triptófano (Forni et al., 1992).

En este estudio, la cepa A4 identificada como *Arthrobacter rhombi* reveló una producción de 1-2 µg/mL de AIA y no hubo diferencia significativa entre tratamientos. Estos valores fueron inferiores a los reportados en bibliografía de otras especies pertenecientes al mismo género.

En cuanto al género *Bacillus*, Bhutani et al. (2018) reportó *Bacillus* spp. (endófitos de nódulos de judías) productores de AIA en un rango de 4.93 a 92.03 µg/mL en medio suplementado con 100 mg/L de triptófano. Andrade et al. (2014) aisló endófitos de este género de la planta de banano, que revelaron ser productores de AIA en un rango de 0.05 a 47.88 03 µg/mL en medio con 100 mg/L de triptófano y de 0.80 a 4.39 µg/mL en medio sin triptófano, revelando una notable influencia del triptófano en el medio. Igualmente, Dias et al. (2009) encontró productores de AIA endófitos de fresa, los cuales mostraron generar de 1 a 20 µg/mL en medio con 100 mg/L de triptófano. Ribeiro et al. (2018), también informó de *Bacillus* spp. endófitos productores de AIA del

maíz, cuya producción iba de 3.2 a 61.6 $\mu\text{g/mL}$ en medio suplementado con 1g/L de triptófano.

En este proyecto, la cepa C6 identificada como *Bacillus sp.* manifestó producción de AIA en medio sin triptófano ($1.106 \pm 0.023 \mu\text{g/mL}$) y en medio suplementado con 2 mg/L de triptófano ($1.372 \pm 0.040 \mu\text{g/mL}$), no hubo diferencia significativa entre estos valores. Así mismo, la cepa C7 identificada como *Bacillus circulans* produjo AIA en todos los tratamientos, pero presentó una concentración máxima de AIA (4.019 ± 0.083) en medio suplementado con 5 mg/L de triptófano.

Con respecto al género *Ochrobactrum*, Imran et al. (2010) reportó que endófitos *Ochrobactrum spp.* de nódulos de garbanzo podían producir hasta 6.5 $\mu\text{g/mL}$ de AIA (cuantificado mediante HPLC). Por otra parte, la cepa *Ochrobactrum intermedium* AcRz3, endófito de cálamo aromático reveló una producción de 29.61 $\mu\text{g/mL}$, en medio suplementado con 2 mg/mL de triptófano (Singh & Khunjamayum, 2018). Así mismo, Yu et al. (2017) reportó que *Ochrobactrum sp.* MGJ11, aislado de la rizosfera de la soya produjo 121.1 $\mu\text{g/mL}$ de AIA en medio con 500 mg/L de triptófano.

La cepa C8 y C9 aisladas en esta investigación fueron identificadas como *Ochrobactrum pseudogrignonense* y ambas produjeron AIA tanto en medio con y sin triptófano. La cepa C8 produjo una cantidad máxima de AIA ($4.683 \pm 0.040 \mu\text{g/mL}$) en medio suplementado con 1 mg/L de triptófano, mientras que la cepa C9 reveló máxima producción ($5.042 \pm 0.080 \mu\text{g/mL}$) en medio sin triptófano.

En esta investigación hubo cepas que produjeron AIA en presencia y ausencia de triptófano como fue el caso de la cepa A3, A4, C6, C7, C8 y C9. Sin embargo, la cepa A1 solo produjo AIA en ausencia de triptófano y la cepa A2 únicamente en presencia del mismo. La razón de este comportamiento diferencial entre cepas, podría ser explicado por Patten & Glick (1996), quienes mencionan que el AIA es un metabolito que puede ser producido mediante vías dependientes e independientes de triptófano y

más de una vía podría estar presente en una bacteria. Sin embargo, la existencia de la vía independiente de triptófano se ha cuestionado, debido a que no se ha caracterizado ninguna enzima de misma (Patten & Glick, 1996). Cabe recalcar que, el conocimiento actual sobre la biosíntesis de AIA en bacterias se remonta a finales del siglo pasado, ya que no hay estudios recientes sobre las vías biosintéticas de AIA en bacterias.

Además, se dio el caso de que las cepas A3, C6, C7, C8 y C9 presentaron una producción máxima de AIA a diferentes concentraciones de triptófano, mientras que las cepas A2 y A4 no tuvieron diferencia significativa con respecto a la concentración de triptófano en el medio. Esto se explica debido a que existen cepas que producen altas cantidades de AIA hasta una cierta concentración de triptófano, que al sobrepasarla produce efectos adversos sobre la producción de AIA, empezando a decaer, como es el caso de *Acetobacter diazotrophicus* L1, que a concentraciones más altas de 1.2 g/L de triptófano disminuye su producción de AIA (Patil et al., 2011). Otro caso es el de la cepa PVM de *Pantoea agglomerans*, la cual disminuye su producción de AIA al aumentar la concentración de triptófano por encima de 1 g/L. Es por ello que la concentración de triptófano como precursor influye mucho en la producción de AIA de ciertas bacterias (Bharucha et al., 2013). Por otra parte, el triptófano en el medio puede no influir significativamente en la producción de AIA, ya que como se mencionó anteriormente las bacterias podrían utilizar vías independientes de triptófano para la producción de AIA (Patten & Glick, 1996).

Esta investigación ha permitido aislar bacterias endófitas productoras de AIA de plantas de lenteja de agua del género *Spirodela* y estos resultados contribuyen al conocimiento de la diversidad de las fitobacterias endófitas de estas plantas y a la caracterización de uno de los atributos promotores de crecimiento, que es la producción

de fitohormonas, específicamente el AIA. Se evidenció que 8 de 9 aislados fueron capaces de producir AIA, destacando la cepa A3, que produjo significativamente más AIA que las demás ($10.03 \pm 0.080 \mu\text{g/mL}$) al cultivarla en medio suplementado con 1 mg/L de triptófano. Esta cepa podría ser considerada como un bioinoculante potencial para cultivos de interés agrícola.

Capítulo VI: Conclusiones

Mediante técnicas microbiológicas se logró aislar bacterias endófitas de lenteja de agua *Spirodela* con capacidad de producción de AIA, siendo esta una característica de promoción de crecimiento en plantas.

Ocho de las nueve cepas de este estudio fueron capaces de producir AIA en un rango de 1 a 10 µg/mL, siendo la cepa *Brevundimonas vesicularis/Brevundimonas nasdae* A3 la que produjo mayor concentración de AIA (10.03 ± 0.080 µg/mL).

El uso de técnicas moleculares y bioinformáticas permitió una identificación molecular a nivel de especie en la mayoría de los casos, comprobando que el gen 16S rDNA es un buen marcador molecular para la identificación bacteriana.

Se determinó que los endófitos productores de AIA de esta planta pertenecen a los géneros *Curtobacterium*, *Brevundimonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus* y *Ochrobactrum*, los cuales han sido reportados como endófitos de una variedad de cultivos y también han revelado capacidad de promover el crecimiento vegetal.

Capítulo VII: Recomendaciones

Antes de realizar la esterilización superficial de las plantas para obtener las bacterias endófitas, se debe estandarizar un protocolo adecuado que permita eliminar las bacterias del rizoplasma, sin afectar a la planta y a su comunidad endófitas.

Utilizar otros marcadores moleculares (*rpoB*, *gyrB*) para llegar a identificar a nivel de especie a la cepa de mayor producción de AIA (*Brevundimonas vesicularis*/*Brevundimonas nasdae* A3).

Complementar la identificación molecular con técnicas microbiológicas y/o bioquímicas, no solo para ayudar en la identificación bacteriana sino también para darle soporte a los resultados obtenidos mediante técnicas moleculares.

Caracterizar las cepas bacterianas obtenidas para otros atributos de PGPB como fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, efecto antagónico, etc. Y realizar ensayos *in vivo* para comprobar el efecto promotor de crecimiento.

Referencias

- Acosta, K., Xu, J., Gilbert, S., Denison, E., Brinkman, T., Lebeis, S., & Lam, E. (2020). Duckweed hosts a taxonomically similar bacterial assemblage as the terrestrial leaf microbiome. *PLoS ONE*, *15*(2), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228560>
- Adzitey, F., Huda, N., & Ali, G. R. R. (2013). Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks. *3 Biotech*, *3*(2), 97–107. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0074-4>
- Afzal, I., Iqar, I., Shinwari, Z. K., & Yasmin, A. (2016). Plant growth-promoting potential of endophytic bacteria isolated from roots of wild *Dodonaea viscosa* L. *Plant Growth Regulation*, *81*(3), 399–408. <https://doi.org/10.1007/s10725-016-0216-5>
- Afzal, I., Shinwari, Z. K., & Iqar, I. (2015). Selective isolation and characterization of agriculturally beneficial endophytic bacteria from wild hemp using canola. *Pakistan Journal of Botany*, *47*(5), 1999–2008.
- Afzal, I., Shinwari, Z. K., Sikandar, S., & Shahzad, S. (2019). Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological Research*, *221*(December 2018), 36–49. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001>
- Ali, S., Charles, T. C., & Glick, B. R. (2017). Endophytic Phytohormones and Their Role in Plant Growth Promotion. In *Functional Importance of the Plant Microbiome* (pp. 89–105). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-65897-1_6
- Ali, S., Isaacson, J., Kroner, Y., Saldias, S., Kandasamy, S., & Lazarovits, G. (2018). Corn sap bacterial endophytes and their potential in plant growth-promotion. *Environmental Sustainability*, *1*(4), 341–355. <https://doi.org/10.1007/s42398-018-00030-4>
- Ali, Z., Waheed, H., Kazi, A., Hayat, A., & Ahmad, M. (2015). Duckweed: An Efficient

- Hyperaccumulator of Heavy Metals in Water Bodies. *Plant Metal Interaction: Emerging Remediation Techniques*, 411–429. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803158-2.00016-3>
- Andrade, L. F., de Souza, G. L. O. D., Nietsche, S., Xavier, A. A., Costa, M. R., Cardoso, A. M. S., Pereira, M. C. T., & Pereira, D. F. G. S. (2014). Analysis of the abilities of endophytic bacteria associated with banana tree roots to promote plant growth. *Journal of Microbiology*, *52*(1), 27–34. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-3019-2>
- Anjum, N., & Chandra, R. (2015). Endophytic bacteria: Optimizaton of isolation procedure from various medicinal plants and their preliminary characterization. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, *8*(4), 233–238.
- Appenroth, K. J., Sree, K. S., Böhm, V., Hammann, S., Vetter, W., Leiterer, M., & Jahreis, G. (2017). Nutritional value of duckweeds (Lemnaceae) as human food. *Food Chemistry*, *217*(2017), 266–273. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.116>
- Araújo, W. L., Maccheroni Jr., W., Aguilar-Vildoso, C. I., Barroso, P. A. V., Saridakis, H. O., & Azevedo, J. L. (2001). Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Canadian Journal of Microbiology*, *47*(3), 229–236. <https://doi.org/10.1139/cjm-47-3-229>
- Arroyave, M. (2004). La lenteja de agua (*Lemna minor* L.): Una planta acuática promisoría. *Revista EIA*, *1*(1), 33–38. <https://doi.org/10.24050/reia.v1i1.121>
- Baetz, U., & Martinoia, E. (2014). Root exudates: The hidden part of plant defense. *Trends in Plant Science*, *19*(2), 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.11.006>
- Barzanti, R., Ozino, F., Bazzicalupo, M., Gabbrielli, R., Galardi, F., Gonnelli, C., & Mengoni, A. (2007). Isolation and characterization of endophytic bacteria from the nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii*. *Microbial Ecology*, *53*(2), 306–316. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9164-3>

- Bell, C. R., Dickie, G. A., Harvey, W. L. G., & Chan, J. W. Y. F. (1995). Endophytic bacteria in grapevine. *Canadian Journal of Microbiology*, *41*(1), 46–53.
<https://doi.org/10.1139/m95-006>
- Bent, E., & Chanway, C. P. (1998). The growth-promoting effects of a bacterial endophyte on lodgepole pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, *44*(10), 980–988.
<https://doi.org/10.1139/w98-097>
- Bharucha, U., Patel, K., & Trivedi, U. B. (2013). Optimization of Indole Acetic Acid Production by *Pseudomonas putida* UB1 and its Effect as Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Mustard (*Brassica nigra*). *Agricultural Research*, *2*(3), 215–221.
<https://doi.org/10.1007/s40003-013-0065-7>
- Bhutani, N., Maheshwari, R., Negi, M., & Suneja, P. (2018). Optimization of IAA production by endophytic *Bacillus* spp. from *Vigna radiata* for their potential use as plant growth promoters. *Israel Journal of Plant Sciences*, *65*(1–2), 83–96.
<https://doi.org/10.1163/22238980-00001025>
- Bodenhausen, N., Bortfeld-Miller, M., Ackermann, M., & Vorholt, J. A. (2014). A Synthetic Community Approach Reveals Plant Genotypes Affecting the Phyllosphere Microbiota. *PLOS Genetics*, *10*(4), 1–12.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004283>
- Bog, M., Appenroth, K., & Sree, S. (2019). Duckweed (Lemnaceae): Its Molecular Taxonomy. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, *3*(December), 1–7.
<https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00117>
- Borbor-Cordova, M. J., Boyer, E. W., McDowell, W. H., & Hall, C. A. (2006). Nitrogen and phosphorus budgets for a tropical watershed impacted by agricultural land use: Guayas, Ecuador. *Biogeochemistry*, *79*(1–2), 135–161.
<https://doi.org/10.1007/s10533-006-9009-7>

- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., Van Themaat, E. V. L., & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology*, *64*, 807–838. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120106>
- Calderón, J. (2015). Evaluación del impacto ambiental por uso inadecuado de fertilizantes químicos en cultivo de maíz de la Parroquia el Anegado. Propuesta De Manejo Ambiental. In *Universidad De Guayaquil*. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/26466>
- Cao, H. X., Fourounjian, P., & Wang, W. (2018). The Importance and Potential of Duckweeds as a Model and Crop Plant for Biomass-Based Applications and Beyond. In *Handbook of Environmental Materials Management* (pp. 1–16). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-58538-3_67-1
- Capa, D., Pérez-Esteban, J., & Masaguer, A. (2015). Unsustainability of recommended fertilization rates for coffee monoculture due to high N₂O emissions. *Agronomy for Sustainable Development*, *35*(4), 1551–1559. <https://doi.org/10.1007/s13593-015-0316-z>
- Castillo, G., Altuna, B., Michelena, G., Sánchez Bravo, J., & Acosta Echeverría, M. (2005). Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. *Anales de Biología*, *27*, 137–142. <https://www.um.es/analesdebiologia/numeros/27/PDF/16-CUANTIFICACION.pdf>
- Castro, L. M., Calvas, B., & Knoke, T. (2015). Ecuadorian banana farms should consider organic banana with low price risks in their land-use portfolios. *PLoS ONE*, *10*(3), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120384>
- Castro, Renata A., Quecine, M. C., Lacava, P. T., Batista, B. D., Luvizotto, D. M., Marcon, J., Ferreira, A., Melo, I. S., & Azevedo, J. L. (2014). Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove

- ecosystem. *SpringerPlus*, 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-382>
- Castro, Renata Assis. (2011). *Estudo da comunidade bacteriana endofítica cultivável associada aos manguezais de Cananéia e Bertioga SP* [Universidade de São Paulo]. <https://doi.org/10.11606/D.64.2011.tde-22032012-145555>
- Chandra, S., Askari, K., & Kumari, M. (2018). Optimization of indole acetic acid production by isolated bacteria from *Stevia rebaudiana* rhizosphere and its effects on plant growth. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 581–586. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.09.001>
- Chen, T., Chen, Z., Ma, G. H., Du, B. H., Shen, B., Ding, Y. Q., & Xu, K. (2014). Diversity and potential application of endophytic bacteria in ginger. *Genetics and Molecular Research*, 13(3), 4918–4931. <https://doi.org/10.4238/2014.July.4.6>
- Chimwamurombe, P. M., Grönemeyer, J. L., & Reinhold-Hurek, B. (2016). Isolation and characterization of culturable seed-associated bacterial endophytes from gnotobiotically grown Marama bean seedlings. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(6), 1–11. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw083>
- Chinnaswamy, A., Coba de la Peña, T., Stoll, A., de la Peña Rojo, D., Bravo, J., Rincón, A., Lucas, M. M., & Pueyo, J. J. (2018). A nodule endophytic *Bacillus megaterium* strain isolated from *Medicago polymorpha* enhances growth, promotes nodulation by *Ensifer medicae* and alleviates salt stress in alfalfa plants. *Annals of Applied Biology*, 172(3), 295–308. <https://doi.org/10.1111/aab.12420>
- Christina, A., Christopher, V., & Bhore, S. (2013). Endophytic bacteria as a source of novel antibiotics: An overview. *Pharmacognosy Reviews*, 7(13), 11–16. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.112833>
- Coila, P. (2018). *Bacterias endofíticas aisladas de Elodea potamogeton ("llachu") de aguas contaminadas de la bahía interior del lago titicaca*. Universidad Nacional De San Agustín.

- Corral, M. (2018). *Aislamiento y caracterización de microorganismos endófitos a partir de chirimoya (annona cherimola) con potencial antagónico frente a hongos patógenos*. UDLA.
- Cui, W., & Cheng, J. J. (2015). Growing duckweed for biofuel production: A review. *Plant Biology*, 17(s1), 16–23. <https://doi.org/10.1111/plb.12216>
- De Beenhouwer, M., Muleta, D., Peeters, B., Van Geel, M., Lievens, B., & Honnay, O. (2014). DNA pyrosequencing evidence for large diversity differences between natural and managed coffee mycorrhizal fungal communities. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(1), 241–249. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0231-8>
- Dias, A. C. F., Costa, F. E. C., Andreote, F. D., Lacava, P. T., Teixeira, M. A., Assumpção, L. C., Araújo, W. L., Azevedo, J. L., & Melo, I. S. (2009). Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(2), 189–195. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9878-0>
- Diaz, C. (2011). *Adherencia y Colonización de Pseudomonas Fluorescens sobre Sustratos sólidos: Influencia de la Topografía y Composición Química de la Superficie* [Universidad Nacional de la Plata]. <https://doi.org/https://doi.org/10.35537/10915/2685>
- Duca, D., Lorv, J., Patten, C. L., Rose, D., & Glick, B. R. (2014). Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 106(1), 85–125. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0095-y>
- Egamberdieva, D., Wirth, S., Behrendt, U., Ahmad, P., & Berg, G. (2017). Antimicrobial activity of medicinal plants correlates with the proportion of antagonistic endophytes. *Frontiers in Microbiology*, 8(FEB), 1–11.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00199>

Ekperusi, A. O., Sikoki, F. D., & Nwachukwu, E. O. (2019). Application of common duckweed (*Lemna minor*) in phytoremediation of chemicals in the environment: State and future perspective. *Chemosphere*, *223*(2019), 285–309.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.025>

Elahi, E., Weijun, C., Zhang, H., & Nazeer, M. (2019). Agricultural intensification and damages to human health in relation to agrochemicals: Application of artificial intelligence. *Land Use Policy*, *83*(February), 461–474.

<https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2019.02.023>

Elbeltagy, A., Nishioka, K., Suzuki, H., Sato, T., Sato, Y. I., Morisaki, H., Mitsui, H., & Minamisawa, K. (2000). Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. *Soil Science and Plant Nutrition*, *46*(3), 617–629. <https://doi.org/10.1080/00380768.2000.10409127>

Englen, M., & Kelley, L. (2000). A rapid DNA isolation procedure for the identification of *Campylobacter jejuni* by the polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*, *31*(6), 421–426. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00841.x>

FAO. (2004). *DUCKWEED: A tiny aquatic plant with enormous potential for agriculture and environment*. Agris.

<http://www.fao.org/ag/againfo/resources/documents/DW/Dw2.htm>

Forni, C., Riov, J., Grilli Caiola, M., & Tel-Or, E. (1992). Indole-3-acetic acid (IAA) production by *Arthrobacter* species isolated from *Azolla*. *Journal of General Microbiology*, *138*(2), 377–381. <https://doi.org/10.1099/00221287-138-2-377>

Fouda, A., Eid, A. M., Elsaied, A., El-Belely, E. F., Barghoth, M. G., Azab, E., Gobouri, A. A., & Hassan, S. E. D. (2021). Plant growth-promoting endophytic bacterial community inhabiting the leaves of *pulicaria incisa* (LAM.) DC inherent to arid regions. *Plants*, *10*(1), 1–22. <https://doi.org/10.3390/plants10010076>

- Fourounjian, P., Fakhoorian, T., & Cao, X. H. (2020). Importance of Duckweeds in Basic Research and Their Industrial Applications. In *The Duckweed Genomes* (pp. 1–17). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11045-1_1
- Gagne-Bourgue, F., Aliferis, K. A., Seguin, P., Rani, M., Samson, R., & Jabaji, S. (2013). Isolation and characterization of indigenous endophytic bacteria associated with leaves of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) cultivars. *Journal of Applied Microbiology*, *114*(3), 836–853. <https://doi.org/10.1111/jam.12088>
- Gang, S., Sharma, S., Saraf, M., Buck, M., & Schumacher, J. (2019). Analysis of indole-3-acetic acid (IAA) production in *Klebsiella* by LC-MS/MS and the Salkowski method. *Bio-Protocol*, *9*(9), 1–9. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.3230>
- Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, *133*(3), 1–4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
- Gilbert, S., Xu, J., Acosta, K., Poulev, A., Lebeis, S., & Lam, E. (2018). Bacterial production of indole related compounds reveals their role in association between duckweeds and endophytes. *Frontiers in Chemistry*, *6*(JUL), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00265>
- Glassner, H., Zchori-Fein, E., Compant, S., Sessitsch, A., Katzir, N., Portnoy, V., & Yaron, S. (2015). Characterization of endophytic bacteria from cucurbit fruits with potential benefits to agriculture in melons (*Cucumis melo* L.). *FEMS Microbiology Ecology*, *91*(7), 1–13. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv074>
- Glick, B. (2020). Biocontrol of Bacteria and Fungi. In *Beneficial Plant-Bacterial Interactions* (pp. 181–230). Springer, Cham. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-44368-9_6
- Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, *169*(1), 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009>

- Gordon, S., & Weber, R. (1951). Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology*, 26(1), 192–195. <https://doi.org/10.1104/pp.26.1.192>
- Hallmann, J., & Berg, G. (2007). Spectrum and Population Dynamics of Bacterial Root Endophytes. *Microbial Root Endophytes*, 9, 15–31. https://doi.org/10.1007/3-540-33526-9_2
- Hallmann, J., Berg, G., & Schulz, B. (2007). Isolation Procedures for Endophytic Microorganisms. *Microbial Root Endophytes*, 9, 299–319. https://doi.org/10.1007/3-540-33526-9_17
- Hasan, M., & Chakrabarti, R. (2009). Use of algae and aquatic macrophytes as feed in small-scale aquaculture: a review. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*, 531, 1–123. <http://www.fao.org/3/i1141e/i1141e.pdf>
- Hassan, S. E. D. (2017). Plant growth-promoting activities for bacterial and fungal endophytes isolated from medicinal plant of *Teucrium polium* L. *Journal of Advanced Research*, 8(6), 687–695. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.09.001>
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., & Wellington, E. M. H. (1997). Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(8), 3233–3241. <https://doi.org/10.1128/aem.63.8.3233-3241.1997>
- Ho, Y.-N., Mathew, D. C., & Huang, C.-C. (2017). Plant-Microbe Ecology: Interactions of Plants and Symbiotic Microbial Communities. *Plant Ecology - Traditional Approaches to Recent Trends*, 93–119. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69088>
- Hollants, J., Leliaert, F., De Clerck, O., & Willems, A. (2010). How endo- is endo-? Surface sterilization of delicate samples: A Bryopsis (Bryopsidales, Chlorophyta) case study. *Symbiosis*, 51(1), 131–138. <https://doi.org/10.1007/s13199-010-0068-0>
- Hunter, M. C., Smith, R. G., Schipanski, M. E., Atwood, L. W., & Mortensen, D. A.

- (2017). Agriculture in 2050: Recalibrating targets for sustainable intensification. *BioScience*, 67(4), 386–391. <https://doi.org/10.1093/biosci/bix010>
- Imran, A., Hafeez, F. Y., Frühling, A., Schumann, P., Malik, K. A., & Stackebrandt, E. (2010). *Ochrobactrum ciceri* sp. nov., isolated from nodules of *Cicer arietinum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(7), 1548–1553. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.013987-0>
- INEC. (2019). *Información Agroambiental y Tecnificación Agropecuaria, Módulo ESPAC 2019*. https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Encuestas_Ambientales/Modulo_Ambiental_ESPAC_2019/PRINC_RESUL_MOD_AGROTEC_2019_05_2.pdf
- Intriago, J., & Plaza, I. (2020). Obtención de bacterias endófitas del tomatillo (*Lycopersicon pinpinelifolium* L.) como promotoras de crecimiento vegetal [Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López]. In *ESPAMMFL*. <http://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/1055/1/TTMAI5.pdf>
- Ishizawa, H., Kuroda, M., Morikawa, M., & Ike, M. (2017). Evaluation of environmental bacterial communities as a factor affecting the growth of duckweed *Lemna minor*. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0746-8>
- Kai, S., Matsuo, Y., Nakagawa, S., Kryukov, K., Matsukawa, S., Tanaka, H., Iwai, T., Imanishi, T., & Hirota, K. (2019). Rapid bacterial identification by direct PCR amplification of 16S rRNA genes using the MinION™ nanopore sequencer. *FEBS Open Bio*, 9(3), 548–557. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12590>
- Kamnev, A. A., Shchelochkov, A. G., Perfiliev, Y. D., Tarantilis, P. A., & Polissiou, M. G. (2001). Spectroscopic investigation of indole-3-acetic acid interaction with iron(III). *Journal of Molecular Structure*, 563–564, 565–572. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(00\)00911-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(00)00911-X)
- Khalid, A., Arshad, M., & Zahir, Z. A. (2004). Screening plant growth-promoting

- rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*, 96(3), 473–480. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02161.x>
- Khan, A., Halo, B. A., Elyassi, A., Ali, S., Al-Hosni, K., Hussain, J., Al-Harrasi, A., & Lee, I. J. (2016). Indole acetic acid and ACC deaminase from endophytic bacteria improves the growth of *Solanum lycopersicum*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 21(2016), 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.02.001>
- Kittiwongwattana, C. (2015). Biodiversity of endophytic bacteria isolated from duckweed (*Landoltia punctata*) and their IAA production. *Thammasat International Journal of Science and Technology*, 20(1), 1–11.
- Kittiwongwattana, C., & Thawai, C. (2013). *Rhizobium paknamense* sp. nov., isolated from lesser duckweeds (*Lemna aequinoctialis*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART10), 3823–3828. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.051888-0>
- Kukla, M., Płociniczak, T., & Piotrowska-Seget, Z. (2014). Diversity of endophytic bacteria in *Lolium perenne* and their potential to degrade petroleum hydrocarbons and promote plant growth. *Chemosphere*, 117(1), 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.05.055>
- Kuznetsova, T., Politaeva, N., Smyatskaya, Y., & Ivanova, A. (2019). *Lemna* Minor Cultivation for Biofuel Production. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 272(2), 1–8. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/272/2/022058>
- Li, L., Li, Y. Q., Jiang, Z., Gao, R., Nimaichand, S., Duan, Y. Q., Egamberdieva, D., Chen, W., & Li, W. J. (2016). *Ochrobactrum endophyticum* sp. nov., isolated from roots of *Glycyrrhiza uralensis*. *Archives of Microbiology*, 198(2), 171–179. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1170-8>
- Liaqat, F., & Eltem, R. (2016). Identification and characterization of endophytic bacteria isolated from in vitro cultures of peach and pear rootstocks. *3 Biotech*, 6(2), 1–8.

<https://doi.org/10.1007/s13205-016-0442-6>

Liu, H., Carvalhais, L. C., Crawford, M., Singh, E., Dennis, P. G., Pieterse, C. M. J., & Schenk, P. M. (2017). Inner plant values: Diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 8(DEC), 1–17.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02552>

Liu, Y. H., Guo, J. W., Salam, N., Li, L., Zhang, Y. G., Han, J., Mohamad, O. A., & Li, W. J. (2016). Culturable endophytic bacteria associated with medicinal plant *Ferula songorica*: molecular phylogeny, distribution and screening for industrially important traits. *3 Biotech*, 6(2). <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0522-7>

Liu, Y., Xu, H., Yu, C., & Zhou, G. (2020). Multifaceted roles of duckweed in aquatic phytoremediation and bioproducts synthesis. *GCB Bioenergy*, 13(1), 70–82.

<https://doi.org/10.1111/gcbb.12747>

Luo, S. lian, Chen, L., Chen, J. liang, Xiao, X., Xu, T. ying, Wan, Y., Rao, C., Liu, C. bin, Liu, Y. tang, Lai, C., & Zeng, G. ming. (2011). Analysis and characterization of cultivable heavy metal-resistant bacterial endophytes isolated from Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and their potential use for phytoremediation. *Chemosphere*, 85(7), 1130–1138.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.07.053>

Malik, S., Beer, M., Megharaj, M., & Naidu, R. (2008). The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environment International*, 34(2), 265–276.

<https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.09.001>

Mano, H., Tanaka, F., Watanabe, A., Kaga, H., Okunishi, S., & Morisaki, H. (2006). Culturable Surface and Endophytic Bacterial Flora of the Maturing Seeds of Rice Plants (*Oryza sativa*) Cultivated in a Paddy Field. *Microbes and Environments*, 21(2), 86–100. <https://doi.org/10.1264/jsme2.21.86>

- Marasco, R., Rolli, E., Fusi, M., Cherif, A., Abou-Hadid, A., El-Bahairy, U., Borin, S., Sorlini, C., & Daffonchio, D. (2013). Plant growth promotion potential is equally represented in diverse grapevine root-associated bacterial communities from different biopedoclimatic environments. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/491091>
- Mareque, C., Da Silva, T. F., Vollú, R. E., Beracochea, M., Seldin, L., & Battistoni, F. (2018). The Endophytic Bacterial Microbiota Associated with Sweet Sorghum (*Sorghum bicolor*) Is Modulated by the Application of Chemical N Fertilizer to the Field. *International Journal of Genomics*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7403670>
- Mei, C., & Flinn, B. (2010). The Use of Beneficial Microbial Endophytes for Plant Biomass and Stress Tolerance Improvement. *Recent Patents on Biotechnology*, 4(1), 81–95. <https://doi.org/10.2174/187220810790069523>
- Melnick, R. L., Suárez, C., Bailey, B. A., & Backman, P. A. (2011). Isolation of endophytic endospore-forming bacteria from *Theobroma cacao* as potential biological control agents of cacao diseases. *Biological Control*, 57(3), 236–245. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.03.005>
- Miliute, I., Buzaitė, O., Gelvonauskienė, D., Sasnauskas, A., Stanys, V., & Baniulis, D. (2016). Plant growth promoting and antagonistic properties of endophytic bacteria isolated from domestic apple. *Zemdirbyste*, 103(1), 77–82. <https://doi.org/10.13080/z-a.2016.103.010>
- Mohite, B. (2013). Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13(3), 638–649. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162013005000051>
- Montañez, A., Blanco, A. R., Barlocco, C., Beracochea, M., & Sicardi, M. (2012).

- Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects in vitro. *Applied Soil Ecology*, 58, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.02.009>
- Moore, F. P., Barac, T., Borremans, B., Oeyen, L., Vangronsveld, J., van der Lelie, D., Campbell, C. D., & Moore, E. R. B. (2006). Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: The characterisation of isolates with potential to enhance phytoremediation. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(7), 539–556. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.11.012>
- Mukherjee, A., Singh, B. K., & Verma, J. P. (2020). Harnessing chickpea (*Cicer arietinum* L.) seed endophytes for enhancing plant growth attributes and bio-controlling against *Fusarium* sp. *Microbiological Research*, 237(February), 126469. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126469>
- Mwale, M., & Gwaze, F. (2013). Characteristics of duckweed and its potential as feed source for chickens reared for meat production: A review. *Scientific Research and Essays*, 8(18), 689–697. <https://doi.org/10.5897/SREX12.003>
- Navarro-Torre, S., Rodríguez-Llorente, I. D., Doukkali, B., Caviedes, M. A., & Pajuelo, E. (2019). Competition for alfalfa nodulation under metal stress by the metal-tolerant strain *Ochrobactrum cytisi* Azn6.2. *Annals of Applied Biology*, 175(2), 184–192. <https://doi.org/10.1111/aab.12528>
- Olubukola, O. B. (2003). Molecular techniques: An overview of methods for the detection of bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 2(12), 710–713. <https://doi.org/10.5897/AJB2003.000-1127>
- ONU. (2019). World population prospects 2019. In *Department of Economic and Social Affairs. World Population Prospects 2019*. (Issue 141). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12283219>
- Ortega, O., López, E., Rodríguez, A., Guerrero, L., & Rodríguez, A. (2017). Isolated

- phytobacteria producing indole acetic acid from *Lemna gibba* plants and their ecological role in a water channel of chinampera zone of Lake Xochimilco, Mexico. *Hidrobiológica*, 27(2), 153–161.
<https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2017v27n2/rodriguez>
- Ortuño, N., Córdoba, M., Claros, M., & Castillo, J. (2018). Evaluación de bacterias endófitas de papa nativa (*Solanum tuberosum* L.) y el desarrollo de un biofertilizante. *Revista Latinoamericana de La Papa*, 22(1), 12–37.
<https://doi.org/10.37066/ralap.v22i1.288>
- Pandey, P. K., Samanta, R., & Yadav, R. N. S. (2015). Plant Beneficial Endophytic Bacteria from the Ethnomedicinal *Mussaenda roxburghii* (Akshap) of Eastern Himalayan Province, India . *Advances in Biology*, 2015, 1–8.
<https://doi.org/10.1155/2015/580510>
- Patil, N. B., Gajbhiye, M., Ahiwale, S. S., Gunjal, A. B., & KapDNais, B. P. (2011). Optimization of Indole 3 - acetic acid (IAA) production by *Acetobacter diazotrophicus* L1 isolated from Sugarcane. *International Journal of Environmental Sciences*, 2(1), 295–302.
- Patten, C. L., & Glick, B. R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, 42(3), 207–220. <https://doi.org/10.1139/m96-032>
- Paz, I. C., Santin, R. C., Guimarães, A. M., Rosa, O. P., Dias, A. C., Quecine, M. C., Azevedo, J. L., & Matsumura, A. T. (2012). Eucalyptus growth promotion by endophytic *Bacillus* spp. *Genetics and Molecular Research : GMR*, 11(4), 3711–3720. <https://doi.org/10.4238/2012.August.17.9>
- Pazos-Rojas, L. A., Marín-Cevada, V., Elizabeth, Y., García, M., & Baez, A. (2016). Uso de microorganismos benéficos para reducir los daños causados por la revolución verde. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 3(7), 72–85.
- Power, A. G. (2010). Ecosystem services and agriculture: Tradeoffs and synergies.

- Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1554), 2959–2971. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0143>
- Prashar, P., Kapoor, N., & Sachdeva, S. (2013). Biocontrol of Plant Pathogens Using Plant Growth Promoting Bacteria. *Sustainable Agriculture Reviews*, 12, 319–360. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5961-9_10
- Rahman, A., Sitepu, I. R., Tang, S. Y., & Hashidoko, Y. (2010). Salkowski's reagent test as a primary screening index for functionalities of rhizobacteria isolated from wild dipterocarp saplings growing naturally on medium-strongly acidic tropical peat soil. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 74(11), 2202–2208. <https://doi.org/10.1271/bbb.100360>
- Rahman, M. T., Uddin, M. S., Sultana, R., Moue, A., & Setu, M. (2013). Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal*, 4(1), 30–36. <https://doi.org/10.3329/akmmcj.v4i1.13682>
- Raju, C., Aslam, A., Thangadurai, D., Sangeetha, J., Kathiravan, K., & Shajahan, A. (2020). Indole acetic acid (IAA) producing endophytic bacteria on direct somatic embryogenesis and plant regeneration of *Exacum travancoricum* Bedd. *Vegetos*, 33(4), 690–702. <https://doi.org/10.1007/s42535-020-00159-w>
- Ramos Cabrera, E. (2018). Interacciones entre Plantas y Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal. *Revista Citecsa*, 10(15), 23–31.
- Rashid, S., Charles, T. C., & Glick, B. R. (2012). Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Applied Soil Ecology*, 61(2012), 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.09.011>
- Ribeiro, V. P., Marriel, I. E., Sousa, S. M. de, Lana, U. G. de P., Mattos, B. B., Oliveira, C. A. de, & Gomes, E. A. (2018). Endophytic *Bacillus* strains enhance pearl millet growth and nutrient uptake under low-P. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.06.005>

- Rosenblueth, M., & Martínez, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(8), 827–837.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0827>
- Rosselli, R., Romoli, O., Vitulo, N., Vezzi, A., Campanaro, S., De Pascale, F., Schiavon, R., Tiarca, M., Poletto, F., Concheri, G., Valle, G., & Squartini, A. (2016). Direct 16S rRNA-seq from bacterial communities: A PCR-independent approach to simultaneously assess microbial diversity and functional activity potential of each taxon. *Scientific Reports*, 6(July), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep32165>
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Orozco-Mosqueda, M. del C., & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183(2016), 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>
- Senthilkumar, M., Anandham, R., Madhaiyan, M., Venkateswaran, V., & Sa, T. (2011). Endophytic Bacteria: Perspectives and Applications in Agricultural Crop Production. In D. Maheshwari (Ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems* (pp. 61–96). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-18357-7_3
- Shen, F. T., Yen, J. H., Liao, C. Sen, Chen, W. C., & Chao, Y. T. (2019). Screening of rice endophytic biofertilizers with fungicide tolerance and plant growth-promoting characteristics. *Sustainability (Switzerland)*, 11(4).
<https://doi.org/10.3390/su11041133>
- Shi, Y., Yang, H., Zhang, T., Sun, J., & Lou, K. (2014). Illumina-based analysis of endophytic bacterial diversity and space-time dynamics in sugar beet on the north slope of Tianshan mountain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(14), 6375–6385. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5720-9>
- Silva, M. C. dos S. e. (2015). Bioprospecção e caracterização de microrganismos endofíticos de isolados de sementes de guaranazeiro e o controle da antracnose (*Colletotrichum* spp.) [Universidade de São Paulo]. In *Keefektifan Penerapan*

Pendekatan Keterampilan Proses dalam Pembelajaran IPA terhadap Minat Belajar Siswa Kelas IV SD Negeri Golo Yogyakarta (Vol. 16, Issue 2).

<https://doi.org/10.11606/D.64.2015.tde-05052015-095919>

Silva, M. C. S., Polonio, J. C., Quecine, M. C., de Almeida, T. T., Bogas, A. C., Pamphile, J. A., Pereira, J. O., Astolfi-Filho, S., & Azevedo, J. L. (2016). Endophytic cultivable bacterial community obtained from the Paullinia cupana seed in Amazonas and Bahia regions and its antagonistic effects against Colletotrichum gloeosporioides. *Microbial Pathogenesis*, *98*, 16–22.

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.06.023>

Silva, U. C., Cuadros-Orellana, S., Silva, D. R. C., Freitas-Júnior, L. F., Fernandes, A. C., Leite, L. R., Oliveira, C. A., & Dos Santos, V. L. (2021). Genomic and Phenotypic Insights Into the Potential of Rock Phosphate Solubilizing Bacteria to Promote Millet Growth in vivo. *Frontiers in Microbiology*, *11*(January), 1–17.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.574550>

Singh, Y. R., & Khunjamayum, R. (2018). Plant growth and grain yield production of black rice as influenced by Ochrobactrum intermedium AcRz3, an endophyte associated with medicinal plant. *Crop Research*, *53*(3&4).

<https://doi.org/10.31830/2454-1761.2018.0001.16>

Smith, P., House, J. I., Bustamante, M., Sobocká, J., Harper, R., Pan, G., West, P. C., Clark, J. M., Adhya, T., Rumpel, C., Paustian, K., Kuikman, P., Cotrufo, M. F., Elliott, J. A., Mcdowell, R., Griffiths, R. I., Asakawa, S., Bondeau, A., Jain, A. K., ... Pugh, T. A. M. (2016). Global change pressures on soils from land use and management. *Global Change Biology*, *22*(3), 1008–1028.

<https://doi.org/10.1111/gcb.13068>

Soto, J. (2018). Caracterización bioquímica y molecular de bacterias asociadas a nódulos de cuatro leguminosas en la provincia de Santa Elena, Ecuador. *CIENCIA*

Ergo-Sum, Revista Científica Multidisciplinaria de Prospectiva, 25(1), 1–15.

<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=10453975006>

- Srinivasan, R., Karaoz, U., Volegova, M., MacKichan, J., Kato-Maeda, M., Miller, S., Nadarajan, R., Brodie, E. L., & Lynch, S. V. (2015). Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens. *PLoS ONE*, 10(2), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117617>
- Strobel, G. (2018). The emergence of endophytic microbes and their biological promise. *Journal of Fungi*, 4(2). <https://doi.org/10.3390/jof4020057>
- Sturz, A. V., Christie, B. R., & Matheson, B. C. (1998). Associations of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. *Canadian Journal of Microbiology*, 44(2), 162–167. <https://doi.org/10.1139/w97-146>
- Suhandono, S., Kusumawardhani, M. K., & Aditiawati, P. (2016). Isolation and Molecular Identification of Endophytic Bacteria From Rambutan Fruits (*Nephelium lappaceum* L.) Cultivar Binjai. *HAYATI Journal of Biosciences*, 23(1), 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.hjb.2016.01.005>
- Sun, L. N., Zhang, Y. F., He, L. Y., Chen, Z. J., Wang, Q. Y., Qian, M., & Sheng, X. F. (2010). Genetic diversity and characterization of heavy metal-resistant-endophytic bacteria from two copper-tolerant plant species on copper mine wasteland. *Bioresource Technology*, 101(2), 501–509. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.011>
- Tian, B., Zhang, C., Ye, Y., Wen, J., Wu, Y., Wang, H., Li, H., Cai, S., Cai, W., Cheng, Z., Lei, S., Ma, R., Lu, C., Cao, Y., Xu, X., & Zhang, K. (2017). Beneficial traits of bacterial endophytes belonging to the core communities of the tomato root microbiome. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 247(2), 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.06.041>

- Tör, M., Mantell, S. H., & Ainsworth, C. (1992). Endophytic bacteria expressing β -glucuronidase cause false positive in *Discorea* species. *Plant Cell Reports*, 11(9), 452–456.
- Tripathi, A. K., Verma, S. C., Chowdhury, S. P., Lebuhn, M., Gattinger, A., & Schloter, M. (2006). *Ochrobactrum oryzae* sp. nov., an endophytic bacterial species isolated from deep-water rice in India. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(7), 1677–1680. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63934-0>
- Ulrich, K., Ulrich, A., & Ewald, D. (2008). Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions. *FEMS Microbiology Ecology*, 63(2), 169–180. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00419.x>
- Valverde, F., Torres, C., Ribadeneira, J., Parra, R., Cartagena, Y., & Alvarado, S. (2010). *Efecto de la aplicación de abonos orgánicos en la productividad de papa (Solanum tuberosum L.) variedad INIAP-FRIPAPA en Cotopaxi y Tungurahua.*
- Van Pelt-Verkuil, E., Van Belkum, A., & Hays, J. P. (2008). Analysis of PCR Amplification Products. In *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification* (pp. 141–182). Springer Science. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6241-4_9
- van Rikxoort, H., Schroth, G., Läderach, P., & Rodríguez-Sánchez, B. (2014). Carbon footprints and carbon stocks reveal climate-friendly coffee production. *Agronomy for Sustainable Development*, 34(4), 887–897. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0223-8>
- Vargas, T., & Kuno, A. (2014). Morfología bacteriana. *Revista de Actualización Clínica*, 49(2), 2594–2598.
http://metabase.uaem.mx/bitstream/handle/123456789/1466/280_2.pdf?sequence=1
- Vega, F., Pava-Ripoll, M., Posada, F., & Buyer, J. S. (2005). Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. *Journal of Basic Microbiology*, 45(5), 371–380.

<https://doi.org/10.1002/jobm.200410551>

- Vega, P., Canchignia, H., González, M., & Seeger, M. (2016). Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales*, 37(especial), 33–39. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.5158.3609>
- Vendan, R. T., Yu, Y. J., Lee, S. H., & Rhee, Y. H. (2010). Diversity of endophytic bacteria in ginseng and their potential for plant growth promotion. *Journal of Microbiology*, 48(5), 559–565. <https://doi.org/10.1007/s12275-010-0082-1>
- Verma, R., & Suthar, S. (2015). Utility of Duckweeds as Source of Biomass Energy: a Review. *Bioenergy Research*, 8(4), 1589–1597. <https://doi.org/10.1007/s12155-015-9639-5>
- Vymazal, J. (2008). Constructed Wetlands, Surface Flow. In *Encyclopedia of Ecology* (pp. 765–776). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00079-3>
- Wang, W., Haberer, G., Gundlach, H., Gläßer, C., Nussbaumer, T., Luo, M. C., Lomsadze, A., Borodovsky, M., Kerstetter, R. A., Shanklin, J., Byrant, D. W., Mockler, T. C., Appenroth, K. J., Grimwood, J., Jenkins, J., Chow, J., Choi, C., Adam, C., Cao, X. H., ... Messing, J. (2014). The *Spirodela polyrhiza* genome reveals insights into its neotenus reduction fast growth and aquatic lifestyle. *Nature Communications*, 5(3311), 1–13. <https://doi.org/10.1038/ncomms4311>
- WANG, Y., YANG, C. de, YAO, Y. ling, WANG, Y. qin, ZHANG, Z. fen, & XUE, L. (2016). The diversity and potential function of endophytic bacteria isolated from *Kobresia capillifolia* at alpine grasslands on the Tibetan Plateau, China. *Journal of Integrative Agriculture*, 15(9), 2153–2162. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61248-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61248-5)
- Xu, W., Wang, F., Zhang, M., Ou, T., Wang, R., Strobel, G., Xiang, Z., Zhou, Z., & Xie, J. (2019). Diversity of cultivable endophytic bacteria in mulberry and their potential for antimicrobial and plant growth-promoting activities. *Microbiological Research*,

- 229(August), 126328. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126328>
- Yamaga, F., Washio, K., & Morikawa, M. (2010). Sustainable biodegradation of phenol by acinetobacter calcoaceticus P23 isolated from the rhizosphere of duckweed lemna aoukikusa. *Environmental Science and Technology*, 44(16), 6470–6474. <https://doi.org/10.1021/es1007017>
- Yamakawa, Y., Jog, R., & Morikawa, M. (2018). Effects of co-inoculation of two different plant growth-promoting bacteria on duckweed. *Plant Growth Regulation*, 86(2), 287–296. <https://doi.org/10.1007/s10725-018-0428-y>
- Yan, X., Wang, Z., Mei, Y., Wang, L., Wang, X., Xu, Q., Peng, S., Zhou, Y., & Wei, C. (2018). Isolation, diversity, and growth-promoting activities of endophytic bacteria from tea cultivars of Zijuan and Yunkang-10. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUL), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01848>
- Yu, X., Li, Y., Cui, Y., Liu, R., Li, Y., Chen, Q., Gu, Y., Zhao, K., Xiang, Q., Xu, K., & Zhang, X. (2017). An indoleacetic acid-producing *Ochrobactrum* sp. MGJ11 counteracts cadmium effect on soybean by promoting plant growth. *Journal of Applied Microbiology*, 122(4), 987–996. <https://doi.org/10.1111/jam.13379>
- Zhang, H., Kim, M. S., Sun, Y., Dowd, S. E., Shi, H., & Paré, P. W. (2008). Soil bacteria confer plant salt tolerance by tissue-specific regulation of the sodium transporter HKT1. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(6), 737–744. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-6-0737>
- Zhang, P., Jin, T., Sahu, S. K., Xu, J., Shi, Q., Liu, H., & Wang, Y. (2019). The distribution of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid synthesis pathways in bacteria unraveled by large-scale genomic analysis. *Molecules*, 24(7), 1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules24071411>
- Ziegler, P., Adelman, K., Zimmer, S., Schmidt, C., & Appenroth, K. J. (2015). Relative in vitro growth rates of duckweeds (Lemnaceae) - the most rapidly growing higher

plants. *Plant Biology*, 17(1), 33–41. <https://doi.org/10.1111/plb.12184>

Zinniel, D. K., Lambrecht, P., Harris, N. B., Feng, Z., Kuczmarski, D., Higley, P., Ishimaru, C. A., Arunakumari, A., Barletta, R. G., & Vidaver, A. K. (2002). Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2198–2208. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2198-2208.2002>