

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO**



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE PGPR's DE MEZQUITE**  
*(Prosopis spp.)*

Tesis

Que presenta **BLANCA PATRICIA RAMOS ACOSTA**

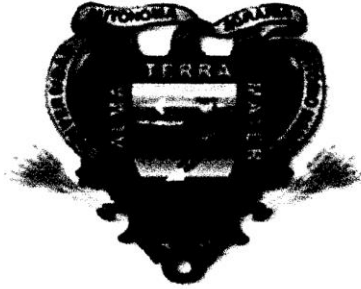
Como requisito parcial para obtener el Grado de  
**MAESTRO EN CIENCIAS AGRARIAS**

Torreón, Coahuila

Diciembre 2015

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO**



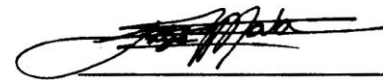
**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE PGPR's DE MEZQUITE  
(*Prosopis spp.*)**

**Tesis**

**Que presenta BLANCA PATRICIA RAMOS ACOSTA**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS AGRARIAS**

  
Dr. Vicente De Paul Alvarez Reyna

  
Dr. Jorge Sáenz Mata


Torreón, Coahuila


Diciembre 2015

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE PGPR's de  
Mezquite (*Prosopis spp.*)


Tesis

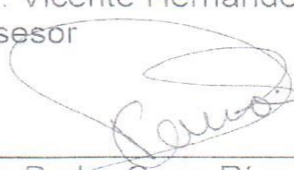
Elaborada por BLANCA PATRICIA RAMOS ACOSTA como  
requisito parcial para obtener el grado de Maestro en  
Ciencias Agrarias con la supervisión y aprobación del  
Comité de Asesoría

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Vicente de Paul Alvarez Reyna  
Asesor principal


  
\_\_\_\_\_  
Dr. Jorge Sáenz Mata  
Asesor

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Vicente Hernández Hernández  
Asesor

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Guillermo González  
Cervantes  
Asesor

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Pedro Cano Ríos  
Asesor

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Raúl Villegas Vizcaíno  
Jefe del Departamento de Postgrado

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Alberto Sandoval Rangel  
Subdirector de Postgrado

Torreón, Coahuila, diciembre de 2015

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer; a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, por darme la oportunidad de fortalecer mis conocimientos, y cumplir mis metas.

A mis asesores; Ph D. Pedro Cano Ríos, Dr. Guillermo González Cervantes, Ph D. Vicente Hernández Hernández, por la ayuda que me proporcionaron.

Al Ph D. Vicente de Paul Alvarez Reyna, por su apoyo y paciencia, para la realización de esta tesis.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Jorge Sáenz Mata, por aceptar ser mi guía en éste arduo camino de la investigación, inculcar en mí el sentido de responsabilidad y permitirme realizar el trabajo de investigación bajo su supervisión.

A mis compañeros de Laboratorio de Ecología Microbiana, los bebés; Benja, Lesly, Jee y Rubén que me han hecho sentir parte del equipo, ayudarme y siempre incluirme en las actividades.

¡¡GRACIAS!!

## DEDICATORIA

A mi esposo, Félix de Jesús Hernández, por su apoyo, paciencia, y quererme.

A mis amados hijos; Omar, Yamil, Blanca y Cecy, por soportar mis ausencias.

A mis mejores amigos; Ale, Romina, a los pequeños Félix Javier y Ashley, los amaré por siempre.

A mis padres, Alejandrina y Hermilo.

## ÍNDICE GENERAL

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	3
<b>La Rizósfera y su Influencia en la Comunidad Microbiana</b> .....	3
Exudados de la raíz.....	3
Colonización de la raíz.....	3
Interacción planta-microorganismo.....	4
<b>PGPR</b> .....	5
Mecanismos indirectos .....	6
Sideróforos... ..	6
$\beta$ -1, 3-glucanasas... ..	7
Quitinasas... ..	7
Mecanismos directos.....	8
Auxinas.....	8
Enzima ACC desaminasa.....	9
Solubilización de fosfatos.....	9
Fijación biológica de nitrógeno .....	10
<b>Mezquite (<i>Prosopis spp.</i>)</b> .....	10
<b>Degradación del Suelo</b> .....	11
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	12
<b>Área de Estudio</b> .....	12
Muestreo.....	13
<b>Análisis Microbiológico</b> .....	14
Tratamiento de muestras.....	14

## ÍNDICE GENERAL

Medios de cultivo .....	14
Siembra, purificación y conservación de aislados.....	15
Pre-selección de cepas... ..	15
<b>Ensayo <i>in vitro</i> con <i>A. thaliana</i></b> .....	15
Tratamiento de la semilla.....	16
Conteo de unidades formadoras de colonia (UFC).....	16
<b>Análisis Estadístico</b> .....	17
<b>Resistencia al Estrés Salino de las Rizobacterias</b> .....	17
<b>Pruebas Bioquímicas</b> .....	18
Producción de ácido indolacético.....	18
Solubilización de fosfatos.....	18
Producción de sideróforos.....	19
<b>Identificación Molecular</b> .....	19
<b>RESULTADOS</b> .....	20
<b>Análisis Físicoquímicos de Suelo</b> .....	20
<b>Análisis Microbiológico</b> .....	21
Ejido 20 de Noviembre.....	21
Poza Salada.....	22
<b>Ensayo <i>in vitro</i> con <i>A. thaliana</i></b> .....	23
Resultados del Ejido 20 de Noviembre.....	23
Resultados de la Poza Salada .....	26
<b>Evaluación de las Rizobacterias al Estrés Salino</b> .....	27
<b>Pruebas Bioquímicas</b> .....	28
Solubilización de fosfatos.....	30
Producción de Sideróforos.....	30

	ÍNDICE GENERAL	
<b>Identificación Molecular</b>	.....	31
<b>DISCUSIÓN</b>	.....	33
<b>CONCLUSIONES</b>	.....	36
<b>REFERENCIAS</b>	.....	37



## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Propiedades fisicoquímicas de los suelos muestreados.....	20
Cuadro 2. Total de bacterias aisladas del Ejido 20 de Noviembre... ..	21
Cuadro 3. Bacterias aisladas de la Poza Salada .....	22
Cuadro 4. Resultado del análisis estadístico de plántulas de <i>A. thaliana</i> inoculadas con aislados del Ejido 20 de Noviembre .....	24
Cuadro 5. Resultado del análisis estadístico de plántulas de <i>A. thaliana</i> inoculadas con aislados de la Poza Salada .....	27
Cuadro 6. Resultado de la evaluación de las rizobacterias al estrés salino.....	28
Cuadro 7. Concentración de ácido indolacético producido por las rizobacterias aisladas... ..	29
Cuadro 8. Identificación de las rizobacterias aisladas de mezquite ( <i>Prosopis spp.</i> )... ..	32

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ejido 20 de Noviembre, Coahuila, México.....	12
Figura 2. Poza Salada, Valle del Sobaco, Coahuila, México....	12
Figura 3. Conservación de muestras a 4° C .....	13
Figura 4. Raíces secundarias de <i>Arabidopsis thaliana</i> de; control (A), LBrizos6 (B), LBrizos2 (C), Cryecto15 (D), KBendo5 (E), LBrizos5 ( F), KBecto12 (G), LBecto8 (H), Cryrizos1 ( I ), KBecto1 (J), LBrizos1 (K), LBrizos3 (L), LBecto3 ( M), KBecto4 (N), Cryecto14 (O), Cryendo9 (P), G. Bacillus1 (Q), KBecto13 (R) y KBrizos4 (S).....	25
Figura 5. Raíces secundarias de <i>Arabidopsis thaliana</i> de; control (A), Ecto LB 3 (B), Rizo LB 9 (C), Rizo LB 7 (D), Ecto LB 15 (E), Rizo Nfree (F), Rizo NFb 0 (G), Rizo LB 11 (H), Ecto LB 2 (I), Rizo NFb 2 (J).....	26
Figura 6. Producción de AIA de rizobacterias; Ecto LB 15 (A), Cryrizos1 (B), KBecto4 (C), LBrizos3 (D), LBecto3 (E), Rizo NFb 2 (F) .....	29
Figura 7. Halos de solubilización de fosfatos de las cepas, Rizo NFb 2 y Ecto LB 15.....	30
Figura 8. Halos de producción de sideróforos por las cepas, LBrizos3 (A), LBecto3 (B), Cryrizos1 (C), KBecto4 (D) Ecto LB 15 (E) y Rizo NFb 2 (F).....	31
Figura 9. Longitud y cantidad de pelos radicales de la raíz principal de <i>A. thaliana</i> del, control (A), LBecto3 (B),	

Cryrizos1 (C), LBrizos3 (D), KBecto4 (E), Rizo NFb 2 (F), Ecto LB 15 (G).....	33
Figura 10. Estructura radical del control (A) y <i>B. toyonensis</i> (B).....	34

## RESUMEN

### **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE PGPR´s DE MEZQUITE (*Prosopis spp.*)**

**POR:**

Blanca Patricia Ramos Acosta

Maestro en Ciencias Agrarias

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

Vicente De Paul Alvarez Reyna

En el Ejido 20 de Noviembre y la Poza Salada ubicada en el Valle del sobaco, del estado de Coahuila, México, se realizaron dos muestreos de raíz de *Prosopis spp.* Este trabajo se realizó, con el objetivo de aislar, caracterizar e identificar rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR). Se aislaron 107 rizobacterias, 27 fueron pre seleccionadas y ensayadas *in vitro* con plántulas de *Arabidopsis thaliana*, para evaluar su potencial como promotoras de crecimiento vegetal. De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, las cepas denominadas KBecto4, LBecto3, LBrizos3, Cryrizos1, Ecto LB 15 y Rizo NFb 2 fueron seleccionadas e identificadas por medio de técnicas moleculares, con el gen 16S rRNA, como *Bacillus toyonensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus epidermidis*, respectivamente. Se les realizaron pruebas para Producción de

ácido indolacético, donde todas las cepas mostraron capacidad, sin embargo, LBrizos3, identificada como *Bacillus subtilis* fue superior, con una producción de 34.76  $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ . En solubilización de fosfatos, *Bacillus subtilis* (Ecto LB 15) y *Staphylococcus epidermidis* (Rizo NFb 2) presentaron esta habilidad. Mientras en producción de sideróforos, se observó que todas las cepas tuvieron potencial. Se evaluó su resistencia a estrés salino, con crecimiento de 0.85 M hasta 1.7 M, de NaCl, a excepción de *Bacillus toyonensis* (KBecto4), que creció hasta 0.85 M, las cuales pueden ser clasificadas como medianamente halófilas.

**Palabras clave:** Aislamiento, estrés salino, PGPR, *Prosopis spp.*, *Bacillus*, *Staphylococcus*.

## ABSTRACT

At Ejido 20 de Noviembre, and the Poza Salada ubicada in Valle del Sobaco, in Coahuila state, México, were realized two sampling of root *Prosopis spp.*, The work was done, with the objective of isolate, characterize and identify promoting plant growth rizobacteria PGPR. There were isolated 107 rhizobacteria, and 27 of they were preselected and tested *in vitro*, whit seedlings of *Arabidopsis thaliana* to evaluate their potential to promote plant-grow. According with the results obtained in the study, the strains called KBecto4, LBecto3, LBrizos3, Cryrizos1, Ecto LB 15 y Rizo NFb 2 they were selected and identified by molecular techniques with 16S rRNA gen as *Bacillus toyonensis*, *B. subtilis*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. subtilis* y *Staphylococcus epidermidis*, respectively. They were tested for indoleacetic acid production, all strains showed capability, although LBrizos3, identified as *B. subtilis* production was higher with 34.76  $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ . In phosphates solubilization, *B. subtilis* (Ecto LB 15) and *S. epidermidis* (Rizo NFb 2) had this ability. While in siderophores production it was observed that all strains had potential. It was evaluated the saline stress resistance, with growth 0.85 M to 1.7 M of NaCl, except for *B. toyonensis* (KBecto4), that grew to 0.85 M, and they can be classified as moderately halophilic.

Keywords: Isolated, saline stress, PGPR, *Prosopis spp*, *Bacillus*, *Staphylococcus*.

## INTRODUCCIÓN

El mezquite (*Prosopis spp.*), arbusto o árbol espinoso de la familia Leguminosae de hasta 10 m de altura forma parte fundamental de los ecosistemas áridos y semiáridos de México, caracterizado por su alta tolerancia a salinidad del suelo, resistencia a sequía, de rápido crecimiento y proliferación (Berendsen *et al.*, 2012). El área bajo su follaje presenta condiciones favorables para el desarrollo de otras plantas herbáceas y la actividad microbiológica del suelo es mucho mayor comparada con el área fuera del dosel del árbol (Olalde y Aguilera, 1998). Es en el suelo donde existe el mayor reservorio de diversidad biológica en el mundo (Hinsinger *et al.*, 2009).

La rizósfera definida como la interface entre las raíces de las plantas y el suelo es donde se llevan cabo numerosas interacciones entre microorganismos e invertebrados (Philippot *et al.*, 2013), influenciada por la raíz que activamente libera compuestos orgánicos modifica la química del suelo circundante incrementando la comunidad microbiana que puede ejercer un efecto perjudicial o benéfico en la planta (Stafford *et al.*, 2005; Raaijmakers *et al.*, 2009).

Las bacterias que confieren algún beneficio a las plantas se pueden derivar en las que forman una relación simbiótica que implica la formación de estructuras especializadas o nódulos en la raíz de la planta hospedante y las que son de vida libre en el suelo, las cuales se pueden encontrar en el rizoplano y rizósfera de las plantas. Este grupo de bacterias benéficas generalmente son denominadas rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal [en Inglés, Plant Growth Promoting rhizobacteria (PGPR)], y son encontradas en simbiosis con la raíz de numerosas plantas (Penrose y Glick, 2003). Las PGPR tienen la habilidad de utilizar mecanismos para promover el crecimiento vegetal; éstos mecanismos pueden ser directos, indirectos o en combinación. Los indirectos involucran la supresión de organismos patógenos mediante la actividad de

sideróforos, producción de enzimas hidrolíticas extracelulares y antibióticos. Los mecanismos directos comprenden la facilitación de nutrimentos mediante la fijación de nitrógeno y hierro, solubilización de fósforo y zinc, producción de fitohormonas; como el ácido indolacético, citoquininas y giberelinas; o por la acción de 1-aminociclopropano 1-carboxílico, enzima que puede reducir el nivel de etileno incrementado por estrés abiótico: inundación, sequía, metales pesados, ataques de patógenos, estrés salino y contaminantes orgánicos (Siddiquee *et al.*, 2010).

En México la degradación física y química afecta en alguna medida más de 75.4 millones de hectáreas de suelo en el período de 2003 a 2012; en términos monetarios la remediación de los daños tiene un costo estimado de 66, 433 millones de pesos (INEGI, 2014).

El incremento de la población mundial, genera necesidades alimentarias mayores, por lo que desde hace décadas se buscan alternativas ecológicas de fertilización para aumentar la producción de alimentos sin dañar el medio ambiente. El uso de PGPR es una alternativa conveniente por los beneficios que proporcionan a la planta como mayor captación y asimilación de nutrimentos. El objetivo de esta investigación fue aislar, caracterizar e identificar rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal de mezquite.



## REVISIÓN DE LITERATURA

### La Rizósfera y su Influencia en la Comunidad Microbiana

La rizósfera es la interfase entre la raíz de las plantas y suelo, que probablemente representa el hábitat más dinámico de la tierra, donde se lleva a cabo un gran número de interacciones entre microorganismos que afectan el crecimiento y tolerancia a distintos tipos de estrés, sean bióticos o abióticos (Hinsinger *et al.*, 2009; Philippot *et al.*, 2013). Ésta estrecha zona, influenciada por las secreciones de la raíz alberga una gran cantidad de microorganismos que utilizan estos compuestos orgánicos para sostenerse e incrementar su población (Stafford *et al.*, 2005). Además, donde por espacio, agua y nutrientes minerales, la raíz compite con plantas invasoras, microorganismos del suelo, como hongos, insectos y bacterias en un ambiente rico en compuestos orgánicos. (Walker *et al.*, 2003).

#### Exudados de la raíz

Los exudados, liberados por la planta no sólo modifican la química del suelo circundante donde se localiza la rizósfera sino que también afectan la densidad y variedad de población microbiana (Stafford *et al.*, 2005) y a su vez actúan como atrayentes o repelentes químicos en esta área, regularmente son mencionados como exudados de la raíz; y la eficacia que tiene para excretar esta gran variedad de compuestos es una de sus características metabólicas más destacada. La diversidad de compuestos depende en gran medida de la especie de la planta y hábitat en que se encuentra (Pii *et al.*, 2015). Los exudados de la raíz han sido agrupados en compuestos de bajo y alto peso molecular. En los de bajo peso molecular se encuentran los aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares y compuestos fenólicos, mientras que los de alto

peso molecular comprenden principalmente los mucílagos (formados por polisacáridos), además de la presencia de una variedad de metabolitos secundarios, que probablemente representan la mayoría de los exudados de la raíz (Walker *et al.*, 2003).

### Colonización de la raíz

La colonización de la raíz es la habilidad que tienen los microorganismos para habitar, reproducirse, sobrevivir y dispersarse en ella, aun con la existencia de especies nativas; lo cual pueden llevar a cabo una enorme cantidad de microorganismos, que al asociarse con estas especies y con la raíz de la planta hospedante tienen gran influencia en la germinación de la semilla, crecimiento, desarrollo y nutrición de las plantas (Mendes *et al.*, 2013; Choudhary & Johri, 2009). La colonización es una fase complicada y está determinada por las características de las bacterias, los exudados de la raíz, así como los factores bióticos y abióticos (Prakash *et al.*, 2010). Ésta se lleva a cabo con la emisión de señales entre la planta y el microorganismo, acción que determinará el tipo de interacción que tengan, pudiendo ser negativa, neutral o beneficiosa (Pii *et al.*, 2015).

### Interacción planta-microorganismo

La interacción negativa está directamente relacionada con la planta y bacterias fitopatógenas entre las que se encuentran *Agrobacterium spp.*, *Erwinia spp.*, *Ralstonia spp.*, entre otras y en estas interacciones negativas los microorganismos fitopatógenos pueden llegar a segregar sustancias con efectos tóxicos que repercutirán en el desarrollo general de la planta (Pii *et al.*, 2015), ocurre cuando hay interacción con algunos insectos, hongos y bacterias fitopatógenos (Walker *et al.*, 2003). La interacción neutra puede ser considerada

de esta manera por la aparente ausencia de efecto positivo y/o negativo en la planta, mientras que la Interacción benéfica es la asociación que se lleva a cabo entre la raíz de la planta y microorganismos no fitopatógenos, determinando una interacción benéfica, también conocida como simbiótica mutualista que causa efectos positivos en las plantas, entre las rizobacterias que ejercen este tipo de efecto están *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium* son también conocidas como PGPR (Mercado-Blanco y Bakker, 2007), que invaden la rizósfera, ya sea alrededor de la raíz, el rizoplano o dentro de los mismos tejidos de la raíz, las que generalmente son conocidas como extracelulares, se encuentran en la rizósfera En el rizoplano están ubicadas entre las células de la corteza de la raíz, o las intracelulares, son encontradas dentro de las células, en forma de estructuras especializadas (Prakash *et al.*, 2010).

### **PGPR**

Las PGPR, comprenden una amplia diversidad de bacterias, entre los géneros mencionados con actividad PGPR son: *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Artrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas* y *Serratia*; aunque las más estudiadas son *Bacillus* y *Pseudomonas* (Kumar *et al.*, 2011). Estas bacterias generalmente se multiplican, y habitan de forma natural el área rizosférica de diversas plantas y cultivos, además, al asociarse simbióticamente con estas, han evidenciado su potencialidad para promover el crecimiento y desarrollo de las mismas, que sucede a través de mecanismos que utilizan como defensa de las plantas ante el ataque de microorganismos fitopatógenos, o en la captación de nutrimentos. La inducción de estos mecanismos puede ser de forma indirecta o directa; (Quiñones *et al.*, 2010; Angulo *et al.*, 2014; Mapelli *et al.*, 2013; Jha *et al.*, 2012). Los miembros del género *Pseudomonas* pueden estar presentes en distintos entornos; la clave de su fácil adaptación se encuentra en su variedad

metabólica y fisiológica que le posibilita la colonización en hábitats terrestres y acuáticos. Entre los beneficios que las *Pseudomonas* ofrecen a las plantas son la eliminación de microorganismos fitopatógenos y síntesis de hormonas vegetales (Silby *et al.*, 2011). El género *Bacillus* se distingue por su versatilidad para promover crecimiento, pues tiene la cualidad de producir fitohormonas como ácido indolacético, fijar nitrógeno, en la producción de sideróforos, actividad para producir antibióticos, enzimas y solubilizar fósforo; en resumen es un excelente representante de las PGPR (Nabti *et al.*, 2013).

### Mecanismos indirectos

La forma en que las rizobacterias promueven crecimiento en las plantas de manera indirecta es mediante la producción de sustancias que llegan a cambiar la química del entorno rizosférico y por ende su ecología, por su función como controladores biológicos para organismos patógenos. Entre los compuestos producidos por las PGPR se encuentran los sideróforos, la enzima  $\beta$ -1, 3-glucanasa y quitinasas (Angulo *et al.*, 2014).

### Sideróforos

Los sideróforos, son definidos como sustancias de origen orgánico, de bajo peso molecular, quelantes de metales, los cuales pueden ser producidos por diferentes microorganismos y plantas. Aunque estos pueden formar complejos con otros metales, la primordial actividad de estos compuestos es de quelar hierro férrico (Fe III), para que sea disponible para las plantas. Este elemento es esencial para los organismos vivos, ya que forma parte de diferentes procesos enzimáticos, en el metabolismo del oxígeno, transferencia de electrones, síntesis de DNA y RNA, así como en la motilidad, y estabilidad del área matriz de los polisacáridos necesaria para que se puedan formar

biopelículas. Se conocen cerca de 500 distintos tipos de sideróforos, que están categorizados en tres grupos; los hidroxamatos, catecolatos, y los carboxilatos, esta división es de acuerdo a el grupo funcional que se encuentra presente en su estructura. Las bacterias que tienen esta habilidad pueden elaborar una gran variedad de estos compuestos. (Ahmed y Holmström, 2014). *Pseudomonas* es una de las especies bacterianas que ha destacado por ser buena productora de sideróforos, específicamente la pioverdina (Camelo *et al.*, 2011).

### $\beta$ -1,3-glucanasas

Las glucanasas son enzimas que descomponen los  $\beta$ -glucanos, y pueden ser divididas de acuerdo al mecanismo que utilizan para realizar la degradación, que puede ser por rompimiento de cadenas de polisacáridos o por hidrolización de glucosa. Estas enzimas se pueden encontrar en gran diversidad de plantas superiores, hongos y bacterias. Son de gran importancia por la función que realizan al romper las paredes celulares de hongos y bacterias fitopatógenas como *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, y *Phytophthora sp.* las cuales están mayormente compuestos de 1,3- $\beta$ -glucanos y quitina (González *et al.*, 2011).

### Quitinasas

La quitinasa es una enzima que tiene la habilidad de hidrolizar la quitina en sus componentes más simples. La importancia de la quitinasa es debido a que tiene funciones primordiales en el proceso de muda de los insectos, así como en la digestión de alimentos quitinosos. La quitina es un compuesto abundante en la naturaleza, polímero formado por cadenas lineales de N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucosa, que es lo que le confiere la resistencia para formar tejidos que permiten la formación del exoesqueleto de insectos, nemátodos, así como las paredes celulares de muchos hongos. La quitinasa ha sido detectada en una

gran cantidad de hongos, plantas y bacterias, y les proporciona la habilidad de usarla como defensa contra organismos patógenos que están formados por quitina (Castro *et al.*, 2011).

### Mecanismos directos

Los mecanismos directos que utilizan las PGPR, es facilitando la absorción de nutrimentos y sintetizando compuestos que no son asimilables para ella, la producción fitohormonas, como el ácido indolacético, que forma parte del grupo de las auxinas, producción de la enzima 1-amino-ciclopropano-1 carboxilato (ACC) desaminasa, solubilización de fosfatos, y fijación biológica de nitrógeno (Bhavanath *et al.*, 2012; Angulo *et al.*, 2014).

### Auxinas

Las auxinas tienen la capacidad para realizar la división, extensión y diferenciación de las células de la raíz así como del xilema, además de que influye en el desarrollo del crecimiento, floración, producción de frutos en las plantas, proceso fotosintético y en la elaboración de pigmentos (Bashan y Bashan, 2010). En el grupo de las auxinas destaca el ácido indolacético debido a su habilidad para promover la diferenciación vascular, y desarrollo de órganos vegetativos. Los géneros bacterianos que han sido reportados como productores de esta fitohormona se mencionan *Azotobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Azospirillum sp.* (Camelo *et al.*, 2011).

### Enzima ACC desaminasa

Una importante cantidad de PGPR contiene la enzima 1-amino-ciclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa, que actúa desviando la ruta del etileno, con la

consecuente disminución de los niveles de esta fitohormona en plantas estresadas por distintos factores. Aunque es necesaria para que la germinación de la semilla sea más eficiente al romper su latencia; después de germinar, se presenta una inhibición en la elongación de la raíz. Las plantas que son inoculadas con PGPR que tienen la enzima ACC desaminasa, son evidentemente más resistentes al efecto ejercido por el etileno, el cual es sintetizado por la misma planta cuando se encuentra en situaciones de estrés como inundación, sequía, presencia de microorganismos fitopatógenos, presencia de metales pesados o de alta salinidad. Las PGPR que contienen la enzima ACC desaminasa son de gran utilidad al ser usadas en cultivos de plantas que son sensibles al etileno. (Penrose y Glick., 2003).

#### Solubilización de fosfatos

Uno de los elementos, que regularmente se encuentran limitado en suelo agrícola es el fósforo, cuya importancia radica en que forma parte de macromoléculas como los ácidos nucleicos, y fosfolípidos, de igual manera se le ha asociado también a la captación y transferencia de energía. Cuando el fósforo inorgánico es aplicado a suelo agrícola, para suplir su deficiencia, gran parte es inmovilizado después de la aplicación, y en consecuencia se encuentra en forma no disponible para las plantas, entonces, las PGPR que tienen la habilidad de solubilizar estos fosfatos pueden ser de gran utilidad para que estos sean sintetizados, de manera que las raíces de las plantas puedan absorberlos. Los géneros bacterianos *Bacillus* y *Enterobacter* se mencionan como algunos de los microorganismos que tienen la capacidad de solubilizar estos compuestos; especialmente las especies *Bacillus megaterium* y *B. subtilis* han sido de las bacterias más estudiadas en este mecanismo (Tejera *et al.*, 2011).

## Fijación biológica de nitrógeno

La fijación biológica de nitrógeno atmosférico, es uno de los procesos más importantes, llevado a cabo por un reducido número de organismos, que a través de la enzima nitrogenasa, reduce el  $N_2$  atmosférico a amonio, pasando a forma asimilable para las plantas. Especies como *Bacillus fusiformis*, *B. firmus*, *Rhizobium*, *B. cereus*, y *Azospirillum* han sido probadas de manera individual o combinada, para evaluar su capacidad para incrementar la absorción de  $N_2$  atmosférico a través de la actividad nitrogenasa (Tejera *et al.*, 2011).

### **Mezquite (*Prosopis spp.*)**

El mezquite (*Prosopis spp.*), es un árbol de la familia leguminosae, de la que 44 especies nativas de zonas áridas y semiáridas se encuentran distribuidas en Norteamérica, Sudamérica, África y Asia. En México, las 10 especies de mezquite más comunes son; *Prosopis palmeri*, *P. reptans* var. *cineroscens*, *P. pubescens*, *P. articulata*, *P. laevigata*, *P. velutina*, *P. juliflora*, *P. glandulosa* var. *Típica*, *P. glandulosa* var. *torreyana* y *P. mexicanum* (Valenzuela *et al.*, 2011). La importancia de este árbol se puede ver de dos puntos de vista; de la trascendencia que tiene su aprovechamiento tecnológico en la economía de comunidades rurales de las zonas áridas, que lo consideran como un recurso natural de gran valor, ya que su madera puede ser usada como combustible, sus vainas como alimento para ganado, además de que se pueden producir resina, barnices y de sus flores pueden extraer miel (De la Torre *et al.*, 2009), y de su importancia ambiental, pues la sombra de su copa propicia el desarrollo de plantas menores y desarrollo de microorganismos (Valenzuela *et al.*, 2011), como *Mezorhizobium chacoense*, *Rhizobium leguminosarum*, *sinorhizobium meliloti*, y *Bradyrhizobium*, que nodulan en las raíces de distintas especies de *Prosopis sp.*, favoreciendo la fijación de nitrógeno. En el entendimiento de que los microorganismos que habitan el área rizosférica llegan a modificar las



propiedades del suelo y permiten desarrollar estrategias para la recuperación de suelo degradado (Iglesias *et al.*, 2007).

### **Degradación del Suelo**

La degradación del suelo, se describe como la pérdida actual y/o futura, del desempeño eficiente en la productividad agrícola y ecosistemas (González *et al.*, 2009). En las tierras de zonas áridas y semiáridas, puede ser consecuencia de factores de origen climático y actividades humanas.

La degradación ha sido categorizada en dos grupos: uno, en el desplazamiento de las capas superficiales del suelo por erosión del agua y viento, que reduce la capacidad de producción del suelo y en consecuencia disminuye el rendimiento de los cultivos. El segundo grupo es el deterioro *in-situ* (Oldeman, 1992), que a su vez, es dividido en degradación física, química o biológica; en la física se incluye el encostramiento y compactación del suelo, provocado por la excesiva desecación del suelo y el otro por sobrepastoreo, y desmesurado uso de maquinaria agrícola, que reagrupa las partículas del suelo, con la consecuente pérdida de espacio poroso, donde la capacidad de crecimiento de la raíz disminuye así como la absorción de nutrientes. En la degradación biológica, se lleva a cabo la pérdida de la diversidad de microorganismos e invertebrados presentes en el área rizosférica de las plantas, siendo uno de los efectos negativos importantes, por la trascendencia que tiene en los ciclos que se llevan a cabo en el suelo (INE-SEMARNAT, 2007; González *et al.*, 2009). Finalmente, pero no menos importante, la degradación química; incluye la acidificación, causada por la aplicación de fertilizantes para incrementar el rendimiento de los cultivos (Baumhardt *et al.*, 2015), y la salinización, que es la acumulación de sales en el suelo (De Long, *et al.*, 2015), causada por diversos factores como; la intrusión de agua de mar o el riego con agua salina (Martínez *et al.*, 2015).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de Estudio

Se llevaron a cabo dos muestreos de raíz de Mezquite (*Prosopis spp.*) en el estado de Coahuila, México. El primero en el Ejido 20 de Noviembre municipio de Matamoros, coordenadas; 25° 42'36.6" N, 103° 19'35.1" W (Figura 1), y el segundo en la Poza Salada, ubicada en el Valle del Sobaco, municipio de San Pedro de las Colonias, coordenadas; 26°10'54" N, 102°42'24" W (Figura 2).

La raíz obtenida se trasladó al Laboratorio de Ecología Microbiana de la Facultad de Biología de la Universidad Juárez del Estado de Durango, donde se desarrolló la presente investigación.



Figura 1. Ejido 20 de Noviembre, Coahuila, México.



Figura 2. Poza Salada, Valle del Sobaco, Coahuila, México.

## Muestreo

La recolección de muestras de suelo, se llevó a cabo en los meses de diciembre del año 2014 y abril del 2015, y se colectaron de dos formas: una para el análisis fisicoquímico, y la otra para el microbiológico. Para el análisis fisicoquímico fue colectado un kilogramo de muestra de suelo rizosférico de mezquite (*Prosopis spp.*), el cual fue transportado en bolsa estéril a temperatura ambiente para su posterior análisis, que se realizó en el Laboratorio Agropecuario Regional de la Comarca Lagunera (Cooperativa Agropecuaria). Mientras que el muestreo para determinar las bacterias presentes en la zona radicular de mezquite (*Prosopis spp.*) fue de la siguiente manera, se tomaron muestras representativas de raíz, para el análisis microbiológico de la ectorizósfera, endorizósfera y rizoplano, las cuales se almacenaron en tubos falcon, que previamente fueron esterilizados, y para su conservación se transportaron en hielera a 4°C (Figura 3).



Figura 3. Conservación de muestras a 4°C.

## Análisis Microbiológico

El análisis microbiológico se realizó en el laboratorio de Ecología Microbiana de la facultad de Ciencias químicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango, México.

### Tratamiento de muestras

En el aislamiento de bacterias de ectorizósfera y rizoplano se pesó un gramo de raíz y de suelo rizósferico respectivamente, diluyéndose de forma independiente en nueve mililitros de PBS [por sus siglas en inglés, Phosphate Buffered Saline] al 0.5 % (Kirchhof *et al.*, 2001), mientras que para el aislamiento de la endorizósfera se tomó un gramo de raíz la cual se desinfectó con cloro al 20 % durante 15 minutos, y etanol al 70 % por dos minutos. Finalmente se enjuagó cuatro veces con agua destilada estéril y se maceraron las raíces con cinco ml de PBS al 0.5 %. Las suspensiones obtenidas de ectorizósfera, rizoplano y endorizósfera se diluyeron seriadamente hasta  $10^{-3}$ .

### Medios de Cultivo

Los medios de cultivo utilizados para el aislamiento de cepas bacterianas de los dos muestreos realizados; fueron en el caso del Ejido 20 de Noviembre: Luria Bertani (LB), que por sus componentes nutritivos permite aislar diversas bacterias, King B (KB), utilizado generalmente para el aislamiento de *Pseudomonas*, y Congo Red Yeast Extract Mannitol Agar (CRYEMA) es usado para aislar bacterias fijadoras de nitrógeno, y para el aislado de cepas del muestreo realizado en la Poza Salada, fueron utilizados los medios de

cultivo; LB, KB, Nitrogen free bromothymol blue (NFb) utilizado para el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno y Semi- solid N-free malate, para *Azospirillum*. Estos medios de cultivo fueron suplementados con el 3 % de cloruro de sodio (NaCl), para el aislamiento de rizobacterias tolerantes a salinidad.

#### Siembra, purificación y conservación de aislados

De las suspensiones seriadas realizadas de la ectorizósfera, endorizósfera y rizoplano de mezquite, se tomó una alícuota de 100 µl de cada dilución y se sembraron en los anteriores medios de cultivo: incubando de 24 a 72 h a 30°C. Luego se procedió a su purificación a través de resiembra hasta obtener cepas puras. Para su conservación se usaron 700 µl de cultivo bacteriano con 300 µl de glicerol al 50% y fueron almacenadas a -70°C.

#### Pre-selección de cepas

Para la pre-selección de cepas se tomó en cuenta la morfología colonial y se designaron con una clave que describe de qué lugar de la rizósfera proceden (ectorizósfera, endorizósfera, rizoplano), el medio del que se aislaron (LB, KB, NFb, CRYEMA o Semi-solid N-free malate) y número de colonia.

### **Ensayo *in vitro* con *Arabidopsis thaliana***

En la evaluación de la capacidad de promoción de crecimiento de las rizobacterias en planta se realizaron nueve ensayos, iniciando el 24 de febrero del 2015 hasta el 20 de junio del 2015. Estos ensayos fueron *in vitro* por cuadruplicado con plántulas de *Arabidopsis thaliana* (se eligió trabajar con A.

*thaliana* por su corto ciclo de vida que es de 6-8 semanas y pequeño tamaño), germinada en medio Murashige y Skoog (MS), y en cada uno de los ensayos, se llevaron a cabo los siguientes procedimientos.

#### Tratamiento de la semilla

La semilla de *A. thaliana*, fue desinfectada con cloro al 20 % por cinco min, seguido de cuatro enjuagues con agua destilada estéril y se vernalizaron por dos días a 4°C; se colocaron en medio MS y se dejaron germinar por cuatro días, fueron inoculadas por medio de asada en forma horizontal, a cinco cm de distancia de las plántulas en la parte inferior de las cajas Petri. Las plantas fueron crecidas en cámara bioclimática por 10 días con fotoperiodos de 16 horas de luz, ocho horas oscuridad y temperatura a 24°C; al término de tiempo las 15 plantas de *A. thaliana* fueron evaluadas de acuerdo a las siguientes variables: longitud de raíz principal, número de raíces secundarias, peso fresco total, peso fresco foliar y peso fresco de raíz (Lopez-Bucio *et al.*, 2007).

#### Conteo de unidades formadoras de colonia (UFC)

En cada uno de los ensayos, para la producción del inóculo bacteriano 5 cepas, de las 27 preseleccionadas se pusieron en crecimiento por 24 horas, a 34°C; y se preparó una suspensión a concentración de  $2 \times 10^8$  UFC/ml; para esto primeramente se determinó la cantidad de unidades de microorganismo por mililitro. El procedimiento para realizar el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) se llevó a cabo de la siguiente manera; para el lavado de las cepas se tomó un mililitro del crecimiento bacteriano y se trasladó a un tubo eppendorf, enseguida se centrifugó a 6,000 rpm por cinco minutos, se retiró el sobrenadante, se agregó un mililitro de PBS al 0.5 %, se aplicó vortexeo hasta disolver la pastilla bacteriana, se volvió a centrifugar, esta operación se realizó

cuatro veces para obtener colonias limpias (libres de medio de cultivo); después del lavado de las cepas se adicionó en el eppendorf un mililitro de PBS (0.5 %), se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-3}$ , y se llevó a cabo el recuento de UFC, en microscopio, utilizando una cámara Neubauer. Se agregaron 300  $\mu$ l de la suspensión bacteriana, del último factor de dilución en el área de cuadrícula de la cámara, se cubrió con un cubreobjetos, se ajustó el microscopio en el objetivo de 40x, se ubicó la cuadrícula, y utilizando los cuadros de las esquinas y el central para el conteo de las unidades; seguido del cálculo de la concentración de UFC, tomando en cuenta el número de células contabilizadas por casilla, el número de casillas de la cámara Neubauer, el factor de dilución, todo multiplicado por 10,000. Se hicieron los cálculos para elaborar la suspensión base stock de cada una de las cepas con concentración de  $2.5 \times 10^8$ .

### **Análisis Estadístico**

Las variables tomadas fueron analizadas en un diseño experimental completamente al azar; y en la prueba de medias se utilizó la prueba de Tukey, con probabilidad de  $P= 0.05$ . Los análisis se realizaron utilizando un complemento de Microsoft Excel (XLSTAT).

### **Resistencia al Estrés Salino de las Rizobacterias**

Las rizobacterias aisladas de la ectorizósfera y rizoplano de la raíz de *Prosopis* spp. LBecto3, KBecto4, Cryrizos1, LBrizos3, Ecto LB 15 y Rizo NFb 2, debido a la capacidad que mostraron para promover el crecimiento en *A. thaliana*, fueron ensayadas para determinar la habilidad de desarrollarse en condiciones de alta concentración de sal. Las cepas fueron sembradas con el método de estría

cruzada, en el medio de cultivo LB, adicionado con 0.85 M (5 %) 1.7 M (10 %) y 2.55 M (15 %) de NaCl.

## **Pruebas Bioquímicas**

### Producción de ácido indolacético

Las cepas bacterianas se sometieron a pruebas bioquímicas para determinar los mecanismos por los cuales promovieron crecimiento vegetal. En la evaluación de la producción de ácido indolacético (AIA) las cepas bacterianas fueron inoculadas en siete ml de caldo peptona adicionado con un mg de L-triptófano/ml dejándose en crecimiento con agitación por 15 días a 28°C. Se tomaron tres ml de la suspensión bacteriana y se centrifugaron a 7,000 rpm por 10 minutos, fueron extraídos dos ml del sobrenadante a los que se adicionaron dos gotas de ácido ortofosfórico y se agregaron cuatro ml de solución de Salkowsky (HCl al 35% con Fe Cl<sub>3</sub> 0.5 M), se dejaron reposar por 30 min a temperatura ambiente y se procedió a leer la absorbancia a 530 nm de longitud de onda; previamente se realizó una curva de calibración mediante diferentes concentraciones de AIA (5, 25, 50, 75 y 100 µg/ml) con la que fue comparada la absorbancia para determinar la concentración de AIA en las muestras inoculadas.

### Solubilización de fosfatos

La solubilización de fosfatos fue evaluada a través del medio sólido Pikovskaya; realizado con los siguientes reactivos: glucosa, 10.0 g; Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 5.0 g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5 g; KCl, 0.2 g; MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 0.1 g; MnSO<sub>4</sub>, trazas; FeSO<sub>4</sub>, trazas; Extracto de levadura, 0.5 g; Agar, 15.0 g; agua destilada 1000 ml) los reactivos fueron mezclados con el agua destilada en un matraz Erlenmeyer, se



esterilizaron; fueron vaciados en cajas Petri y se dejaron solidificar, las cepas bacterianas fueron sembradas en el medio sólido Pikovskaya, con el método de picadura, e incubadas por 48 h a temperatura de 30°C.

#### Producción de sideróforos

La producción de sideróforos se determinó mediante el medio Cromo Azurol S (CAS) agar, su preparación se realizó de la siguiente manera: se disolvieron; 60.5 mg de cromo azurol S en 50 ml de agua destilada, 72.9 mg de hexadecitrimetil amonio bromuro en 40 ml de agua destilada, 42.23 g/l de LB base, suspendido con 900 ml de agua destilada adicionando 10 ml de una solución de FeCl<sub>3</sub> 1mM disuelta en HCl 10 mM.; la mezcla fue esterilizada, se vació en cajas Petri y cuando solidificó, se realizó la siembra de las rizobacterias en el medio de cultivo CAS, con el método de picadura, enseguida se incubaron a 30°C, por 48 h.

#### Identificación Molecular

La identificación de las PGPR, se llevó a cabo por medio de la extracción de DNA por medio de la técnica de CTAB, de acuerdo al método de Doyle y Doyle (1990), luego se realizó la amplificación parcial del gen 16S rRNA por medio PCR usando los oligonucleótidos 27F 5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3' y 1492R 5'GGTTACCTTGTTACGACTT 3', el producto de PCR fue purificado usando el kit AxyPrep DNA gel extraction kit (Axygen) y posteriormente se envió a secuenciar a McLAB en San Francisco, CA, EEUU. Las secuencias obtenidas se sometieron a comparación usando BLAST (NCBI).

## RESULTADOS

### Análisis Físicoquímico del Suelo

Los resultados de los análisis físicoquímicos de suelo determinaron que el suelo rizósferico de las dos localidades tienen alta concentración de sal, y de acuerdo a los rangos óptimos para suelo agrícola, es catalogado como fuertemente salino, el Ejido 20 de Noviembre tiene una conductividad eléctrica de  $8.17 \text{ mScm}^{-1}$ , y la Poza Salada de  $10.12 \text{ mScm}^{-1}$ . De los resultados de este análisis podemos destacar que el suelo del Ejido 20 de Noviembre tuvo un porcentaje de materia orgánica de 1.25, capacidad de campo de 25.74 %, pH 8.64, nitrógeno 2.9 p.p.m., potasio 58.5 p.p.m. y fósforo 4.13 p.p.m., mientras que los resultados en la Poza Salada indican que el contenido de materia orgánica es de 1.27 %, mientras que la capacidad de campo es de 24.78 %, pH 8.61, y concentración de nitrógeno es de 6.2 p.p.m., potasio 175.0 p.p.m., por último fósforo con 51.0 p.p.m. (Cuadro 1).

Cuadro 1. Propiedades físicoquímicas de los suelos muestreados.

	Ejido 20 de Noviembre	Poza Salada	Rangos* óptimos
Textura	Migajón-arenoso	Franco- arenoso	
Capacidad de Intercambio Catiónico (C.I.C) meq/100g.	18.90	13.00	25.0 – 50.0
Capacidad de campo %	25.74	24.78	
Materia Orgánica (M.O.) %	1.25 P	1.27 P	> 3
Nitratos de nitrógeno (N-NO <sub>3</sub> ) p.p.m.	2.9 B	6.20 B	> 30
Fósforo disponible (P) p.p.m.	4.13 B	51.00 A	> 30
Carbonatos totales (CaCO <sub>3</sub> ) %	19.05 A	16.40 A	< 15
Potasio (K) p.p.m.	58.5 B	175.0 A	> 170
pH	8.64 FA	8.61 FA	6.5 – 7.5
Conductividad eléctrica ( $\text{mScm}^{-1}$ )	8.17 FS	10.12 FS	2.0 – 8.0
Sodio meq/l	2.86	19.67	

\*Rangos óptimos para suelos agrícolas

Interpretación de resultados: en porcentaje de Materia orgánica: el rango de (0.6 a 1.8) = pobre, de (1.81 a 2.9) = medio, mayor a 3 = rico; el pH, LA= ligeramente alcalino, LAc= ligeramente ácido, MA= medianamente alcalino, MAc= medianamente ácido, FA= fuertemente alcalino, FAc= fuertemente ácido; y en la conductividad eléctrica, NS= no salino, LS= ligeramente salino, MS= medianamente salino, FS= fuertemente salino; y para los valores de nitrógeno y fósforo disponibles, B= suelo bajo (0 a 15 p.p.m), M= medio (15 a 30 p.p.m.), A= alto mayor a 30 p.p.m.

### Análisis Microbiológico

#### Ejido 20 de Noviembre

En el caso del ejido 20 de Noviembre, de las muestras para este análisis, se lograron aislar 64 cepas bacterianas, 16 de la endorizósfera, 28 de la ectorizósfera y 19 del rizoplano de mezquite con los medios de cultivo: CRYEMA (para el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno), KB (para *Pseudomonas*) y LB, que por sus componentes se pueden aislar una gran variedad de bacterias (Cuadro 2).

Cuadro 2. Total de bacterias aisladas del Ejido 20 de Noviembre.

Medio	Ejido 20 de Noviembre			
	Ectorizósfera	Endorizósfera	Rizoplano	Total aislados
LB	9	3	6	18
KB	6	5	7	18
CRYEMA	13	8	6	27
Total aislados	28	16	19	63

## Poza Salada

En el análisis microbiológico de la Poza Salada, fueron aisladas 43 cepas bacterianas, 11 de la endorizósfera, 15 de la ectorizósfera, y 17 del rizoplano de la raíz de mezquite (cuadro 3), y por las características fisicoquímicas del suelo de la Poza Salada estos medios de cultivo fueron suplementados con 3% de NaCl, para emular las condiciones del suelo de origen. En este caso se pre-seleccionaron nueve cepas bacterianas.

Cuadro 3. Bacterias aisladas de la Poza Salada.

Medio	Poza Salada			
	Ectorizósfera	Endorizósfera	Rizoplano	Total aislados
LB	8	5	8	21
KB	1	4	4	9
NFb	5	2	3	10
Semi-solid	1	1	1	3
Nfree	1	1	1	3
Total aislados	15	12	16	43

## Selección de cepas

En el primer muestreo realizado en el ejido 20 de Noviembre se aislaron 64 cepas, que fueron evaluadas por sus características morfológicas, de las cuales 18 cepas fueron pre-seleccionadas tomando en cuenta sus características morfológicas (tamaño, color, forma, elevación, bordes, consistencia): KBecto4, LBecto3, Cryrizos1, KBecto1, LBrizos3, Cryecto14, LBrizos5, LBrizos1, LBecto8, Cryecto15, LBrizos2, KBecto12, G.Bacillus1, KBrizos4, KBendo5,

LBrizos6, KBecto13 y Cryendo9. De igual forma, en el segundo muestreo de raíz de mezquite que se llevó a cabo en la Poza Salada, los 43 aislados fueron evaluados y pre-seleccionados por las mismas características morfológicas, eligiendo nueve cepas: Ecto LB 12, Rizo LB 7, Ecto LB 15, Rizo NFb 0, Rizo LB 11, Rizo NFb 2, Ecto LB 3, Rizo N-free y Rizo LB 9.

### **Ensayo *In vitro* con *A. thaliana***

#### Resultados del Ejido 20 de Noviembre

En el análisis estadístico, se detectó diferencia significativa en número de raíces secundarias de las plántulas de *A. thaliana*, inoculadas con las 18 cepas aisladas del ejido 20 de Noviembre (Cuadro 4). Sin embargo en longitud de raíz principal las plántulas del control fueron superiores con respecto a las plántulas inoculadas con las cepas. Mientras que en número de raíces secundarias 13 cepas (KBecto4, LBrizos3, LBecto3, KBecto1, Cryecto14, Cryrizos1, KBrizos4, G.Bacillus1, LBrizos6, KBendo5, Cryecto15, LBrizos2 y LBrizos1), promovieron mayor desarrollo que el control en la variable número de raíces secundarias. En peso fresco total, las cepas; LBecto3, KBecto4, Cryrizos1, LBrizos3 y LBrizos1 incrementaron el peso de las plántulas de *A. thaliana*, sobre el peso de las del control. El peso fresco foliar del control fue superado por 4 plántulas de *A. thaliana* inoculadas con las bacterias: LBecto3, KBecto4 y Cryrizos1. Con referencia al peso fresco de la raíz, el control fue menor que las plántulas inoculadas con: LBecto3, Cryrizos1, KBecto4, LBrizos3, LBrizos1, KBecto12, y KBecto1. De acuerdo a los resultados observados, los aislados denominados como: KBecto4, LBecto3, Cryrizos1 y LBrizos3, fueron seleccionados por promover mayor crecimiento en las plántulas de *A. thaliana* en las variables anteriormente mencionadas, en comparación con las del control, a excepción de la variable longitud de la raíz principal donde el control fue mejor (Figura 4).

Cuadro 4. Resultado del análisis estadístico de plántulas de *A. thaliana*, inoculadas con aislados del Ejido 20 de Noviembre.

Parámetros medidos en <i>A. thaliana</i>					
Tratamiento	Long. Final cm	Raíces secundarias No.	Peso fresco total g	Peso fresco foliar g	Peso fresco radicular g
Control	5.110 <sup>a</sup>	11.515 <sup>cd</sup>	0.126 <sup>abcde</sup>	0.106 <sup>abc</sup>	0.019 <sup>bcde</sup>
KBecto12	2.933 <sup>cdef</sup>	9.025 <sup>d</sup>	0.104 <sup>cdef</sup>	0.075 <sup>cd</sup>	0.029 <sup>abcde</sup>
LBecto8	3.513 <sup>bcdef</sup>	10.038 <sup>cd</sup>	0.105 <sup>cdef</sup>	0.087 <sup>bcd</sup>	0.017 <sup>bcde</sup>
LBrizos5	3.730 <sup>bcde</sup>	10.910 <sup>cd</sup>	0.113 <sup>bcdef</sup>	0.100 <sup>abc</sup>	0.013 <sup>cde</sup>
Cryecto15	3.265 <sup>cdef</sup>	11.910 <sup>cd</sup>	0.096 <sup>def</sup>	0.082 <sup>bcd</sup>	0.014 <sup>cde</sup>
LBrizos6	2.719 <sup>ef</sup>	12.622 <sup>cd</sup>	0.091 <sup>ef</sup>	0.077 <sup>cd</sup>	0.014 <sup>cde</sup>
LBrizos2	3.490 <sup>bcdef</sup>	11.848 <sup>cd</sup>	0.098 <sup>def</sup>	0.079 <sup>cd</sup>	0.019 <sup>bcde</sup>
KBendo5	2.722 <sup>ef</sup>	12.532 <sup>cd</sup>	0.099 <sup>def</sup>	0.080 <sup>bcd</sup>	0.018 <sup>bcde</sup>
KBecto1	3.820 <sup>bcd</sup>	13.915 <sup>cd</sup>	0.125 <sup>abcde</sup>	0.099 <sup>abc</sup>	0.026 <sup>abcde</sup>
LBrizos1	3.563 <sup>bcdef</sup>	11.723 <sup>cd</sup>	0.126 <sup>abcde</sup>	0.097 <sup>abcd</sup>	0.029 <sup>abcd</sup>
Cryrizos1	3.995 <sup>bc</sup>	13.128 <sup>cd</sup>	0.143 <sup>abc</sup>	0.110 <sup>ab</sup>	0.033 <sup>ab</sup>
Cryendo9	2.482 <sup>f</sup>	11.075 <sup>cd</sup>	0.076 <sup>f</sup>	0.066 <sup>d</sup>	0.011 <sup>cde</sup>
KBrizos4	2.741 <sup>ef</sup>	12.998 <sup>cd</sup>	0.093 <sup>ef</sup>	0.083 <sup>bcd</sup>	0.010 <sup>de</sup>
KBecto13	2.675 <sup>ef</sup>	11.133 <sup>cd</sup>	0.085 <sup>ef</sup>	0.078 <sup>cd</sup>	0.007 <sup>e</sup>
G.Bacillus1	2.786 <sup>def</sup>	12.783 <sup>cd</sup>	0.099 <sup>def</sup>	0.086 <sup>bcd</sup>	0.013 <sup>cde</sup>
Cryecto14	3.273 <sup>cdef</sup>	13.855 <sup>cd</sup>	0.107 <sup>cdef</sup>	0.094 <sup>abcd</sup>	0.013 <sup>cde</sup>
LBrizos3	3.810 <sup>bcd</sup>	18.648 <sup>b</sup>	0.135 <sup>abcd</sup>	0.104 <sup>abc</sup>	0.032 <sup>abc</sup>
LBecto3	4.390 <sup>ab</sup>	14.708 <sup>bc</sup>	0.162 <sup>a</sup>	0.122 <sup>a</sup>	0.040 <sup>a</sup>
KBecto4	4.522 <sup>ab</sup>	29.883 <sup>a</sup>	0.151 <sup>ab</sup>	0.120 <sup>a</sup>	0.032 <sup>abc</sup>

Valores con la misma letra son estadísticamente iguales

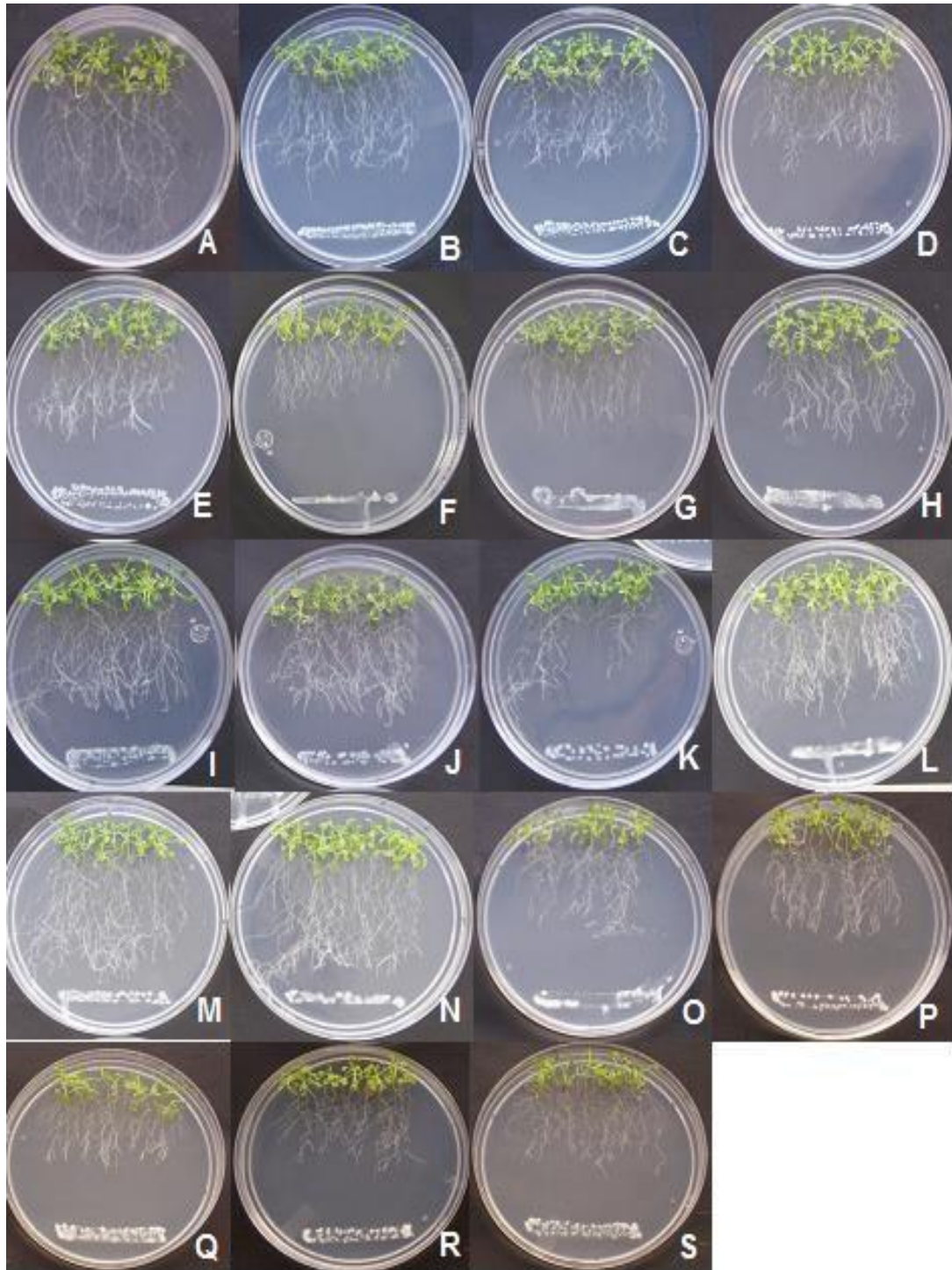


Figura 4. Raíces secundarias de *Arabidopsis thaliana* de; control (A), LBrizos6 (B), LBrizos2 (C), Cryecto15 (D), KBendo5 (E), LBrizos5 (F), KBecto12 (G), LBecto8 (H), Cryrizos1 (I), KBecto1 (J), LBrizos1 (K), LBrizos3 (L), LBecto3 (M), KBecto4 (N), Cryecto14 (O), Cryendo9 (P), G. Bacillus1(Q), KBecto13 (R) y KBrizos4 (S).

## Resultados de la Poza Salada

En las variables antes mencionadas: donde la longitud de la raíz principal del control superó a la de las raíces de *A. thaliana* inoculadas con las cepas aisladas. En el número de raíces secundarias se observó que las cepas que tuvieron mayor promoción en las plántulas fueron Rizo NFb 0, Ecto LB 15 y Ecto LB 2 (Figura 5). En peso fresco total y peso fresco foliar de *A. thaliana* las inoculadas con Ecto LB 15 y Rizo NFb 2 sobresalieron sobre el control, mientras que en el peso fresco de la raíz Ecto LB 15 y Rizo Nfree fueron mayores que el control (Cuadro 5).

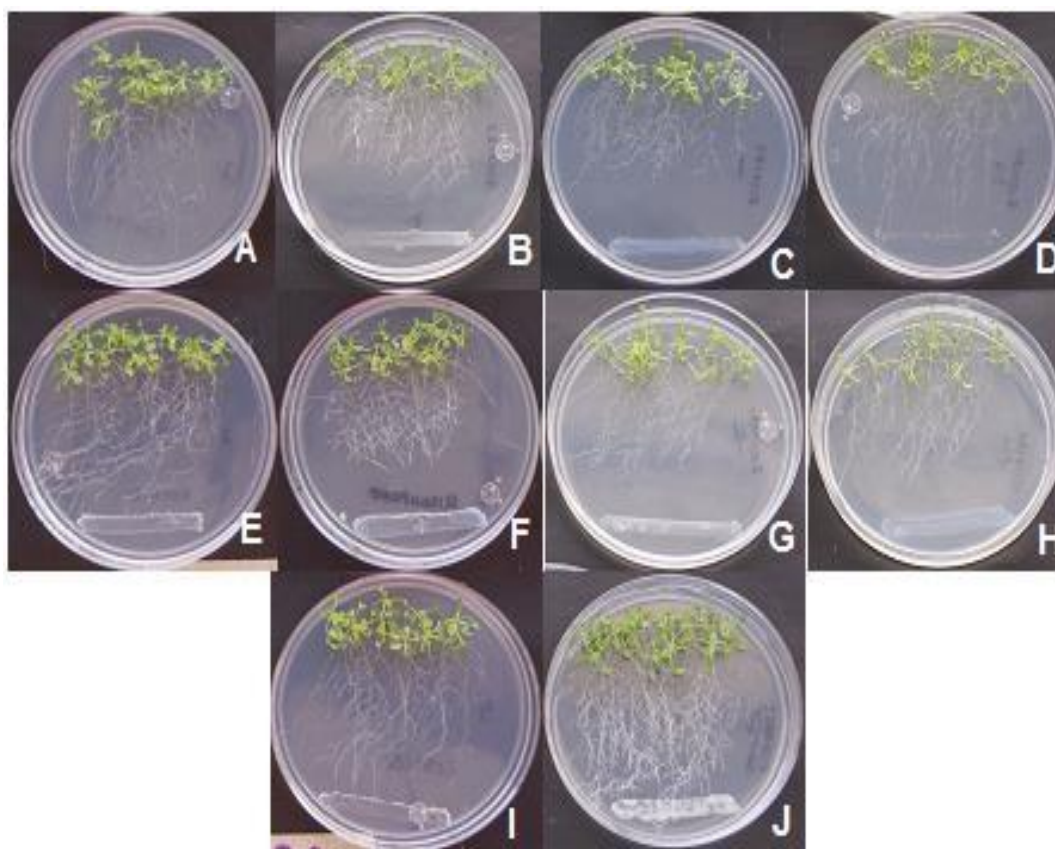


Figura 5. Raíces secundarias de *A. thaliana* de; control (A), Ecto LB 3 (B), Rizo LB 9 (C), Rizo LB 7 (D), Ecto LB 15 (E), Rizo Nfree (F), Rizo NFb 0 (G), Rizo LB 11 (H), Ecto LB 2 (I), Rizo NFb 2 (J).



Cuadro 5. Resultados del análisis estadístico plántulas de *A. thaliana*, inoculadas con aislados de la Poza Salada.

Tratamiento	Parámetros medidos en <i>A. thaliana</i>				
	Long.	Raíces secundarias	Peso fresco total	Peso fresco foliar	Peso fresco radicular
	Final cm.	No.	g.	g.	g.
Control	4.648 <sup>a</sup>	11.089 <sup>ab</sup>	0.161 <sup>b</sup>	0.147 <sup>b</sup>	0.014 <sup>a</sup>
Ecto LB 15	4.181 <sup>abc</sup>	14.487 <sup>a</sup>	0.216 <sup>a</sup>	0.216 <sup>a</sup>	0.018 <sup>a</sup>
Rizo Nfree	3.128 <sup>e</sup>	10.198 <sup>ab</sup>	0.085 <sup>c</sup>	0.085 <sup>c</sup>	0.017 <sup>a</sup>
Rizo NFb 0	4.122 <sup>abcd</sup>	14.555 <sup>a</sup>	0.099 <sup>c</sup>	0.099 <sup>c</sup>	0.014 <sup>a</sup>
Ecto LB 2	4.480 <sup>ab</sup>	14.347 <sup>a</sup>	0.090 <sup>c</sup>	0.090 <sup>c</sup>	0.013 <sup>a</sup>
Ecto LB 3	3.289 <sup>de</sup>	8.602 <sup>b</sup>	0.076 <sup>c</sup>	0.076 <sup>c</sup>	0.010 <sup>a</sup>
Rizo LB 7	4.241 <sup>abc</sup>	10.383 <sup>ab</sup>	0.097 <sup>c</sup>	0.097 <sup>c</sup>	0.009 <sup>a</sup>
Rizo LB 11	3.653 <sup>bcde</sup>	8.233 <sup>b</sup>	0.066 <sup>c</sup>	0.066 <sup>c</sup>	0.009 <sup>a</sup>
Rizo NFb 2	3.557 <sup>cde</sup>	9.248 <sup>b</sup>	0.186 <sup>ab</sup>	0.186 <sup>a</sup>	0.008 <sup>a</sup>
Rizo LB 9	2.906 <sup>e</sup>	8.115 <sup>b</sup>	0.072 <sup>c</sup>	0.072 <sup>c</sup>	0.007 <sup>a</sup>

Valores con la misma letra son estadísticamente iguales.

### Evaluación de las Rizobacterias al Estrés Salino

Las rizobacterias seleccionadas de los dos muestreos (KBecto4, LBecto3, Cryrizos1, LBrizos3, Ecto LB 15 y Rizo NFb 2), fueron probadas para determinar su resistencia a concentraciones de NaCl de 0.85 M (5 %), 1.7 M (10 %) y 2.55 M (15 %), en la que todos los aislados tuvieron la habilidad de crecer óptimamente en medio LB modificado con concentraciones al 5 y 10 % de NaCl, a excepción de KBecto4 que tuvo crecimiento hasta 5 %, (Cuadro 6).

Cuadro 6. Resultado de la evaluación de las rizobacterias al estrés salino.

CEPA	CONCENTRACIÓN DE NaCl		
	0.85 M (5 %)	1.7 M (10 %)	2.55 M (15 %)
LBecto3	+	+	-
Cryrizos1	+	+	-
LBrizos3	+	+	-
Ecto LB 15	+	+	-
Rizo NFb 2	+	+	-
KBecto4	+	-	-

### Pruebas Bioquímicas

Los resultados mostraron que en producción de ácido indolacético todas las cepas bacterianas seleccionadas evidenciaron la presencia de esta fitohormona (Figura 6), con valores desde 0.059 hasta 0.438  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (Cuadro 7).

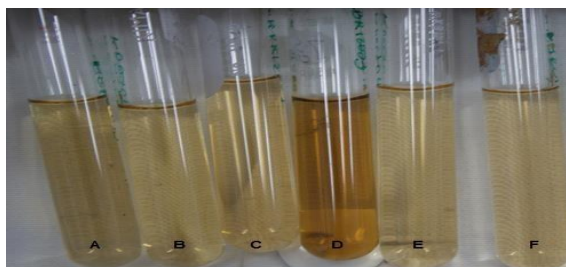


Figura 6. Producción de AIA, de las rizobacterias Ecto LB 15 (A), Cryrizos1 (B), KBecto4 (C), LBrizos3 (D), LBecto3 (E), Rizo NFb 2 (F).

Cuadro 7. Concentración de Ácido indolacético producido por las rizobacterias aisladas.

Cepa	nm Absorbancia	$\mu\text{g ml}^{-1}$ Concentración de AIA
KBecto4	0.071	5.63
LBecto3	0.059	4.68
Cryrizos1	0.099	7.58
LBrizos3	0.438	34.76
Ecto LB 15	0.095	7.53
Rizo NFb 2	0.088	6.98

### Solubilización de fosfatos

En el ensayo realizado, para determinar la solubilización de fosfatos se observó, que las rizobacterias aisladas de la raíz de mezquite de la Poza Salada; Ecto LB 15 y Rizo NFb 2, mostraron potencial de crecimiento en medio sólido Pikovskaya, determinado por la formación de un halo claro alrededor del crecimiento bacteriano (Figura 7).



Figura 7. Halos de solubilización de fosfatos de las cepas Rizo NFb 2 y Ecto LB 15.

### Producción de sideróforos

En el ensayo realizado para demostrar la producción de sideróforos, las rizobacterias: LBrizos3, LBecto3, Cryryzos1, KBecto4, Ecto LB 15 y Rizo NFb 2, al ser sembradas en el medio de cultivo Cromo Azurol S (CAS), se observó que presentaron la formación de un halo naranja translúcido alrededor de su

crecimiento, lo cual permite aseverar, que estas cepas bacterianas tienen la habilidad para producir estas sustancias orgánicas de bajo peso molecular (figura 8).

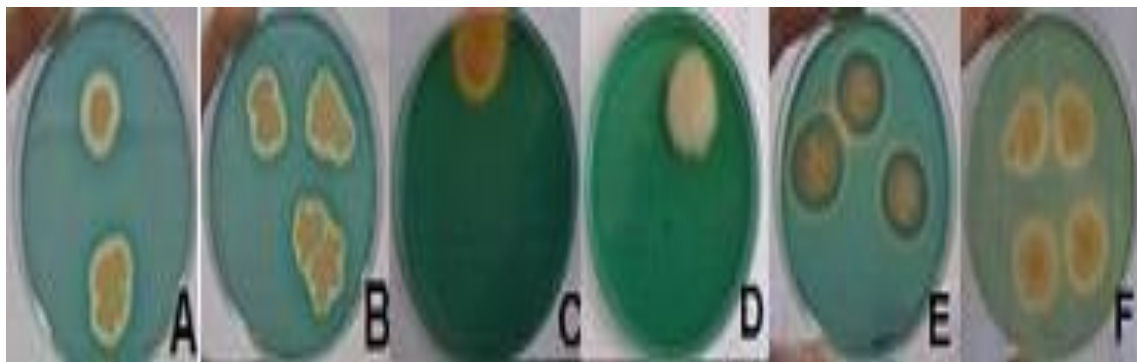


Figura 8. Halos de producción de sideróforos por las cepas, LBrizos3 (A), LBecto3 (B), Cryrizos1 (C), KBecto4 (D), Ecto LB 15 (E) y Rizo NFb 2 (F).

### Identificación Molecular

Las rizobacterias aisladas que promovieron crecimiento en plántulas de *A. thaliana*, fueron identificadas por medio de técnicas moleculares con amplificación del gen 16S rRNA. El análisis de las secuencias se realizó a través de la base de datos del programa de Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), de acuerdo a ésta base de datos, las rizobacterias aisladas de la ectorizósfera y rizoplano de la raíz de mezquite (*Prosopis spp.*) presentaron gran similitud con: KBecto4, muestra 99 % de similitud con *Bacillus toyonensis*; LBecto3, LBrizos3 y Ecto LB 15 tuvieron respectivamente 100, 99 y 99 % de similitud con *Bacillus subtilis*, Cryrizos1 tuvo similitud del 99 % con *Bacillus megaterium*; y Rizo NFb 2, con 99 % de similitud a *Staphylococcus epidermidis* (Cuadro 8).

Cuadro 8. Identificación de las rizobacterias aisladas de mezquite (*Prosopis spp.*).

	ORÍGEN	IDENTIFICACIÓN	SIMILITUD %	NÚMERO DE ACCESO	PB
Cryrizos1	Rizósfera	<i>Bacillus megaterium</i>	99	NR_074290.1	569
KBecto4	Ectorizósfera	<i>Bacillus toyonensis strain</i>	99	NR_121761.1	567
LBecto3	Ectorizósfera	<i>Bacillus subtilis strain 168</i>	100	NR_102783.1	367
LBrizos3	Rizósfera	<i>Bacillus subtilis strain 168</i>	99	NR_102783.1	611
Ecto LB 15	Ectorizósfera	<i>Bacillus subtilis strain 168</i>	99	NR_102783.1	565
Rizo NFb 2	Rizósfera	<i>Staphylococcus epidermidisRP62A strain</i>	99	NR_074995.1	494

## DISCUSIÓN

La inoculación con *Bacillus megaterium* tiene un efecto inhibitorio en el crecimiento de la longitud de la raíz principal debido al aumento de la cantidad de raíces secundarias y longitud de los pelos absorbentes (López-Bucio *et al.*, 2007). De los resultados obtenidos en el ensayo con *A. thaliana*, se observó que no solo las plántulas inoculadas con *B. megaterium* tuvieron un limitado crecimiento de la longitud de la raíz, sino que además las plántulas del control fueron superiores a las plántulas inoculadas con las PGPR. Aun cuando en este estudio el número y longitud de pelos radicales no fue tomada en cuenta para la selección, se observó su incremento en las plántulas de *A. thaliana* inoculadas con las rizobacterias KBecto4, Cryrizos1, LBecto3, LBrizos3, Ecto LB 15 y Rizo NFb 2 (que fueron las cepas seleccionadas) con respecto al control (Figura 9).

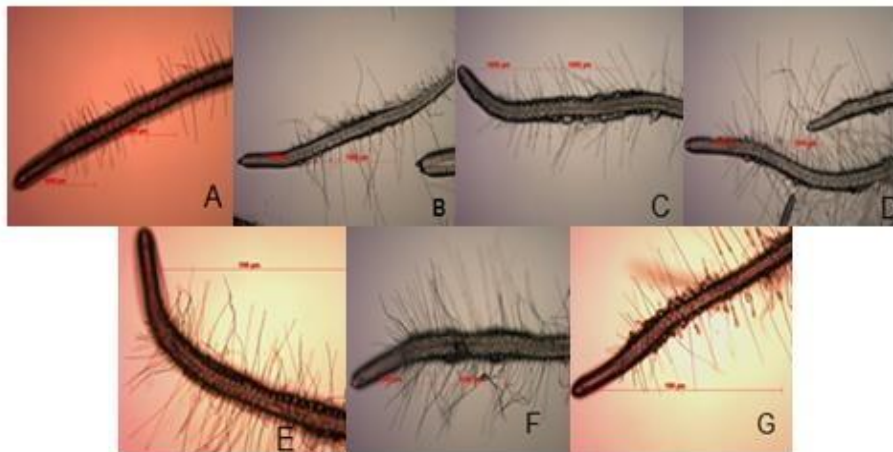


Figura 9. Longitud y cantidad de pelos radicales de la raíz principal de *A. thaliana* del; control (A), LBecto3 (B), Cryrizos1 (C), LBrizos3 (D), KBecto4 (E), Rizo NFb 2 (F) y Ecto LB 15 (G).

El género *Bacillus* ha destacado por el efecto promotor que ejerce sobre el crecimiento de las plantas. Se reporta que los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*,

*Aerobacter*, *Flavobacterium* y *Erwinia* tienen la habilidad para solubilizar fosfatos de su forma insoluble a una asimilable para las plantas (Hayat *et al.*, 2010). *B. megaterium* y *B. subtilis*, son los más estudiados para determinar la solubilización de fosfatos que es uno de los mecanismos que utilizan las PGPR para promover crecimiento (Tejera *et. al*, 2011), y de acuerdo a los resultados obtenidos, las cepas que desarrollaron este mecanismo fueron *B. subtilis* y *S. epidermidis*.

El ácido indolacético modifica y aumenta la estructura radical e incrementa el número de raíces secundarias en diversas plantas (Figura 10), (Battacharyya y Jha, 2010), en lo que si coincidió, al observar el efecto ejercido en las plántulas inoculadas con *B. toyonensis*, aunque tuvo baja producción de AIA.



Figura 10. Estructura radicular del Control (A), y *B. toyonensis* (B).

Gran cantidad de géneros bacterianos tienen la capacidad de producir esta fitohormona (Hayat *et al.*, 2010), aunque cabe mencionar que hay PGPR que tienen mayor capacidad de producción, como se pudo demostrar en el ensayo realizado para determinar la producción de ácido indolacético.

En cuanto a *B. toyonensis* se ha mencionado su utilización en la nutrición animal, aunque recientemente la reportaron con actividad como productora de un biofloculante (Okaiyeto *et al.*, 2015). De acuerdo a los resultados que mostró *B. toyonensis* en los diferentes ensayos, se puede llegar a catalogar como rizobacteria promotora de crecimiento vegetal, siendo este el primer trabajo donde se evalúa su potencial como PGPR.

*S. epidermidis* ha sido reportada como constituyente de la microbiota normal periocular y conjuntiva (Ruiz-Galindo *et al.*, 2010), aunque Gunn y Colwell, (1983), aislaron cepas de *S. epidermidis* de estuarios y agua marina, concluyendo que estos aislados tienen habilidades degradativas y que podrían



tener colaboración en la desintoxicación de desechos, así como al ciclo de nutrientes en el mar; además que las cepas de *S. epidermidis* difieren de los aislados clínicos mencionados en la literatura, su aseveración es porque realizaron pruebas bioquímicas con un aislado hospitalario de *Staphylococcus* y otro aislado de agua marina; este ensayo lo hicieron para determinar la similitud entre una cepa y otra; y aunque son muy parecidas, encontraron diferencia en la fermentación de la galactosa, y que las cepas ambientales son regularmente positivas para la DNasa, gelatinasa. Holguin y Bashan (1996) reportan que han logrado aislar *Staphylococcus sp.* de las raíces de mangle y que al preparar un cultivo bacteriano mixto de *Azospirillum brasilense Cd* y *Staphylococcus sp.* se incrementó significativamente la fijación de nitrógeno (N<sub>2</sub>) y en la investigación realizada por Nawangsih *et al.*, (2010) pudieron aislarlo de tallos sanos de tomate, y al probarlo como agente de control contra la bacteria *Ralstonia solanacearum* su efecto fue positivo, y mencionan que *S. epidermidis* no había sido reportada como bacteria endófito de tomate. Son pocos los reportes de *Staphylococcus epidermidis* que donde se menciona su capacidad para promover crecimiento vegetal.

## CONCLUSIONES

En la raíz de mezquite (*Prosopis sp.*), habitan diversos microorganismos, y algunos de ellos pertenecen al género *Bacillus*, que cuenta con destacados atributos para promover el crecimiento en plantas, a través de diferentes mecanismos.

Solo las plántulas inoculadas con *Bacillus toyonensis* mostraron diferencia significativa en el número de raíces secundarias.

Las rizobacterias aisladas de la ectorizosfera y rizoplano de la raíz de mezquite, tienen la capacidad de crecer en altas concentraciones de NaCl, por lo que se pueden considerar como rizobacterias halófilas.

La hipótesis de la investigación es aceptada, basándonos en las evidencias mostradas.

## REFERENCIAS

- AHMED, E., et al. Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial Biotechnology*. Sons Ltd and Society for Applied Microbiology [online]. 2014, vol. 7(3). 196-208. Available from: doi: 10.1111/1751-7915.12117
- ANGULO, V. C., E. A. SANFUENTES, F. RODRÍGUEZ and K. E. SOSA. Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. *Revista Argentina de Microbiología*. 2014, 46, 338-347.
- BASHAN, Yoav, et al. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes. *Advances in Agronomy* [online]. Elsevier. 2010, vol. 108. 77-136. Available from: 10.1016/S0065-2113(10)08002-8
- BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL. Consulta: 23 de agosto 2015.  
Disponible en: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- BATTACHARYYA, P.N., et al. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol biotechnol* [online]. Springer. Diciembre 2012, vol. 28. 1327-1350. Available from: doi: 10.1007/s11274-011-0979-9
- BAUMHARDT, B., et al. North American soil degradation: processes, practices and mitigating strategies. *Sustainability* [online]. 2015, vol. 7. 2936-2960. Available from: doi: 10.3390/su7032936

BERENDSEN, Roeland L. The rhizosphere microbiome and plant health. Trends in Plant Science [online]. Elsevier. August 2012, vol. 17. 478-486. Available from: doi: 10.1016/j.tplants.2012.04.001

CAMELO, M., S. P. VERA and R. R. BONILLA. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. Manejo y conservación de suelos y aguas. Revista Corpoica. 2011, 12, 159-166.

CASTRO, R., A. ÁLVAREZ, E. MACHADO, M. MENDOZA, R. GÓMEZ and P. GARCÍA. Caracterización de una quitinasa extracelular producida por *Serratia* sp. Biomi-363706 usando quitina coloidal como sustrato. Rev Soc Quím Perú. 2011, 77, 101-108.

CHOUDHARY, Devendra K. Interactions of Bacillus spp. And plants – With special reference to induced systemic resistance (ISR). Microbiological Research. Elsevier. 2009, vol. 164. 493-513. Available from: doi:10.1016/j.micres.2008.08.007

DE LA TORRE-ALMARAZ, R., F. M. COTA-TRUJILLO, J. L. GARCÍA-ROJAS, J. E. CAMPOS and F. SAN-MARTÍN. Etiología de la muerte descendente del mezquite (*Prosopis laevigata* L.) en la reserva de la biósfera del valle de Zapotitlán, México. Agrociencia. 2009, 43, 197-208.

DE LONG, C., et al. The soil degradation paradox: compromising our resources when we need them the most [online]. Sustainability. 2015, vol. 7. 866-879. Available from: doi: 10.3390/su7010866

GONZÁLEZ-CUETO, O., C. E. IGLESIAS-CORONEL and M. HERRERA-SUÁREZ. Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias. 2009, 18, 57-63.

- GONZÁLEZ, I., D. INFANTE, B. PETEIRA, B. MARTÍNEZ, Y. ARIAS, N. GONZÁLEZ and I. MIRANDA. Caracterización bioquímica de aislamientos de *Trichoderma spp.* Promisorios como agentes de control biológico. II. Expresión de actividad glucanasas. Rev. Protección Veg. 2011, 26, 23-29.
- GUNN, B. et al. Numerical taxonomy of staphylococci isolated from the marine environment. International Journal of Systematic bacteriology [online]. Octubre 1983, vol. 33(4). 751-759. Available from: doi: 10.1099/00207713-4-751
- HAYAT, R., et al. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. Ann Microbiol [online]. Agosto 2010, vol. 60. 579-598. Available from: doi: 10.1007/s13213-010-0117-1
- HINSINGER, P., et al. Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. Plant Soil [online]. 2009; 321: 117-152. Available from: doi: 10.1007/s11104-008-9885-9
- HOLGUIN, G. and Y. BASHAN. Nitrogen-fixation by *Azospirillum brasilense* cd mangrove rhizosphere bacterium (*Staphylococcus sp.*). Soil Biol Biochem. 1996, 28, 1651-1660.
- IGLESIAS, O., et al. Genetic characterization of fast-growing rhizobia able to nodulate *Prosopis alba* in North Spain. FEMS Microbiol Lette [online]. 2007. Vol. 277. 210-216. Available from: doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00968.x
- INE-SEMARNAT (2007) *La conservación de suelos, un asunto de interés público*. Consulta 10 de noviembre 2015. Disponible en: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/download/522.pdf>

INEGI (2014) *Comunicado Social. Cuentas económicas y ecológicas de México 2012*. Disponible en: [http://www.inegi.org.mx/prod\\_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/dervivada/economicas/medio\\_ambiente/MONOGRAFIA\\_SCEEM\\_2012.pdf](http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/dervivada/economicas/medio_ambiente/MONOGRAFIA_SCEEM_2012.pdf)

JHA, Bhavanath, et al. The roots of the halophyte *Salicornia brachiata* are a source of new halotolerant diazotrophic bacteria with plant growth-promoting potential. *Plant Soil* [online]. Springer. 2012, vol. 356. 265-277. Available from: doi: 10.1007/s11104-011-0877-9

KIRCHHOF, G., et al. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov. new nitrogen fixing bacterial species that occurs in C-4 fibre plants. *Int J Syst Evol Microbiol* [online]. 2001, vol. 51. 157-168. Available from: doi: 10.1099/00207713-51-1-157

KUMAR, Ankit. *Bacillus* as PGPR in crop ecosystem. En: *Bacteria in Agrobiolgy: Crop ecosystems*. Springer [online]. 2011, 37-59. Available from: doi: 10.1007/978-3-642-18357-7\_2

LÓPEZ-BUCIO, J., et al. *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin- and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *The American Phytopathological Society* [online]. MPMI. 2007, vol. 20(2). 207-217. Available from: doi: 10.1094/MPMI -20-2-0207

MAPELLI, F., et al. Potential for plant growth promotion of rhizobacteria associated with salicornia growing in Tunisian hypersaline soils. *BioMed. Research International* [online]. Hindawi. 2013, vol. 2013. 2-13. Available from: 10.1155/2013/248078

- MARTÍNEZ, R., et al. Co-inoculation of *Halomonas maura* and *Ensifer meliloti* to improve alfalfa yield in saline soils. *Applied Soil Ecology* [online]. Elsevier. 2015, vol. 87, 81-86. Available from: doi: 10.1016/j.apsoil.2014.11.03
- MENDES, Rodrigo et al., The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *Federation of European Microbiological Societies* [online]. *FEMS Microbiol Rev.* [online] July 2013, vol. 37, 634-663. Available from: doi: 10.1111/1574-6976.12028
- MERCADO-BLANCO, J. et al. Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas spp.*: exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonio Van Leeuwenhoek* [online]. 2007, vol. 92. 367-389. Available from: doi: 10.1007/s10482-007-9167-1
- NABTI, E. H., N. MOKRANE, M. GHOUL, H. MANYANI, M. DARY and M. G. MEGIAS. Isolation and characterization of two halophilic *Bacillus* (*B. licheniformis* and *Bacillus sp.*) with antifungal activity. *J. Eco. Heal. Env.* 2013, 1, 13-17.
- NAWANGSIH, A. A., et al. Selection and characterization of endophytic bacteria as biocontrol agents of tomato bacterial wilt disease. *Afr. J. Microbiol. Res.* [online]. 2010, 18(2). 66-70. Available from: doi: 10.5897/AJMR2012.2413
- OKAIYETO, K., U. U. NWODO and L. V. MABINYA. *Bacillus toyonensis* strain AEMREGG, a bacterium isolated from South African marine environment sediment samples produces a glycoprotein biofloculante. *Molecules.* 2015, 20, 5239-5259.

- OLALDE-PORTUGAL, V. and L.I. AGUILERA-GÓMEZ. Microorganismos y Biodiversidad. Terra Latinoamericana. 1998, 16, 289-292.
- OLDEMAN, L. R. Global extent of soil degradation. ISRIC Bi-Annual Report 1991-1992. 1992, 19-36.
- PENROSE, DONNA M. and B. GLICK. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiol Plant* [online], 2003, 118. 10-15.
- PHILLIPOT, Laurent, et al. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology* [online]. AOP. Septiembre 2013, review. 1-11. Available from: doi: 10.1038/nrmicro3109
- Pii, Youry, et al. Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. *Biol Fertil Soils* [online]. Springer. Mayo 2015, vol., 51 (4). 403-415. Available from: doi: 10.1007/s00374-015-0996-1
- PRAKASH, Jay et al. Impact of plant Growth Promoting rhizobacteria on crop production. *International Journal of Agricultural Research* [online]. 2010; vol. 5(11). 954-983. Available from: doi: 10.3923/ijar.2010.954.983
- QUIÑONES-GUTIÉRREZ, A., V. GONZÁLEZ-ONTIVEROS, J. R. CHÁVEZ PÉREZ, A. VARGAS-MARTÍNEZ and F. BARRIENTOS-DÍAZ. Evaluación de inoculantes promotores de crecimiento en la producción de plantas de mezquite [*Prosopis laevigata* (Humb. et Bonpl. Ex Willd.) M.C. Johnst.] en Durango. *Rev. Mex. Cien. For.* 2013, 4, 72-80
- RAAIJMAKERS, Jos M., et al. The rhizosphere: a playground and battlefield for soil borne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil* [online].



Springer. Febrero 2008, vol. 321. 341-361. Available from: doi: 10.1007/s11104-008-9568-6

RUIZ-GALINDO, E., C. MARTÍNEZ-CANSECO, R. LÓPEZ-REVILLA. Caracterización fenotípica de *Staphylococcus epidermidis* aislado de pacientes con endoftalmitis. Gac Méd Méx. 2010, 146, 112-117.

SIDDIKEE, M. A., P. S. CHAUHAN, R. ANANDHAM, G. H. HAN, and T. SA. Isolation, characterization, and use for plant growth promotion under salt stress, of ACC deaminase-producing halotolerant bacteria derived from coastal soil. J. Microbiol. Biotechnol 2010, 20, 1577-1584.

SILBY, Mark W., et al. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. FEMS Microbiology Review [online]. Marzo 2011, vol. 35. 652-680. Available from: doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x

STAFFORD, William H., et al. Bacterial diversity in the rhizosphere of proteaceae species. Environmental Microbiology [online]. Octubre 2005, vol. 7(11). 1755-1768. Available from: doi: 10.1111/j.1462-2920.2005.00929.x

TEJERA-HERNÁNDEZ, B., M. ROJAS-BADIA AND M. HEYDRICH-PÉREZ. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. Revista CENIC Ciencias Biológicas. Redalyc 2011, 42, 131-138.

VALENZUELA-NUNEZ, L. M., R. TRUCIOS-CACIANO, J. C. RÍOS-SAUCEDO, A. FLORES-HERNÁNDEZ and J. L. GONZÁLEZ-BARRIOS. Caracterización dasométrica y delimitación de rodales de mezquite (*Prosopis sp.*) en el estado de Coahuila. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 2011, 17, 87-96.

WALKER, Travis S., et al. Root exudation and rhizosphere biology. American Society of Plant Biologists [online]. Plant Physiol. August 2015, vol. 132. 44-51. Available from: doi:10.1104/pp.102.019661