

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN
PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
CIIDIR-IPN UNIDAD MICHOACÁN**



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS
PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL DE LA RIZÓSFERA DE
BACOPA MONNIERI WETTST**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA
SUSTENTABLE

PRESENTA:

LEONARDO YOGUEZ ALCANTAR

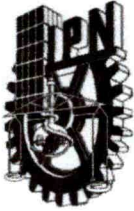
DIRECTORAS:

DRA. DIOSELINA ÁLVAREZ BERNAL

DRA. MARÍA SOLEDAD VÁSQUEZ MURRIETA

JIQUILPAN MICH.

NOVIEMBRE 2020



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14
REP 2017

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Jiquilpan, Mich. siendo las 12:00 horas del día 4 del mes de noviembre del 2020 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Posgrado de: CIIDIR IPN Unidad Michoacán para examinar la tesis titulada:

Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de Bacopa monnieri wettst del (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	Yoguez	Apellido Materno:	Alcantar	Nombre (s):	Leonardo
--------------------------	---------------	--------------------------	-----------------	--------------------	-----------------

Número de registro: B 1 8 0 9 7 7
Aspirante del Programa Académico de Posgrado: Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable

Una vez que se realizó un análisis de similitud de texto, utilizando el software antiplagio, se encontró que el trabajo de tesis tiene 20 % de similitud. **Se adjunta reporte de software utilizado.**

Después que esta Comisión revisó exhaustivamente el contenido, estructura, intención y ubicación de los textos de la tesis identificados como coincidentes con otros documentos, concluyó que en el presente trabajo **SI** **NO** **SE CONSTITUYE UN POSIBLE PLAGIO.**


JUSTIFICACIÓN DE LA CONCLUSIÓN:

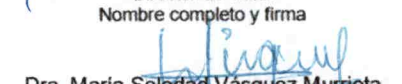
El resultado del 20% general resultante del análisis de similitud no implica plagio, esto debido a que el estudiante citó adecuadamente las fuentes; sin embargo, el software toma palabras comunes como similitud y por ello el % aumenta. Por otro lado; cabe recalcar que la mayor similitud se encuentra en la metodología la cual fue referenciada de las fuentes originales.

****Es responsabilidad del alumno como autor de la tesis la verificación antiplagio, y del Director o Directores de tesis el análisis del % de similitud para establecer el riesgo o la existencia de un posible plagio.**


Finalmente y posterior a la lectura, revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR** **SUSPENDER** **NO APROBAR** la tesis por **UNANIMIDAD** o **MAYORÍA** en virtud de los motivos siguientes:


La Tesis está sustentada en una revisión documental adecuada y bien referenciada, además de una sólida experimentación lo que permitió obtener resultados sobresalientes, obteniendo varias bacterias con potencial de promoción de crecimiento vegetal.



Dra. Dioselina Álvarez Bernal
Director de Tesis
Nombre completo y firma


Dra. María Soledad Vásquez Murrieta
2º Director de Tesis (en su caso)
Nombre completo y firma

COMISIÓN REVISORA DE TESIS

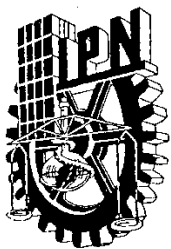

M. en C. Salvador Ochoa Estrada
Nombre completo y firma


M. en C. Marcos Alfonso Lastiri Hernández
Nombre completo y firma


M. en C. Héctor René Buelna Osben
Nombre completo y firma


Dra. Hortencia Gabriela Mena Violante
Nombre completo y firma

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES
COMISIÓN REVISORA DE TESIS
CIIDIR - IPN - U - 5




INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día 30 del mes de Noviembre del año 2020, el que suscribe **Leonardo Yoguez Alcantar** alumno del Programa de **Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable**, con número de registro **B180977**, adscrito al **C.I.I.D.I.R. I.P.N. Unidad Michoacán**, manifiesta que es el autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de las Dras. Dioselina Álvarez Bernal y María Soledad Vásquez Murrieta y cede los derechos del trabajo titulado **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL DE LA RIZÓSFERA DE *BACOPA MONNIERI* WETTST**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones leonardoyzar@gmail.com dalvarezb.ipn@gmail.com murrieta@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Leonardo Yoguez Alcantar

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las doctoras Dioselina y Soledad, por haberme guiado durante todo el proceso para la realización de este trabajo. Dra. Dioselina, gracias por todos los conocimientos que compartió conmigo, más que mi directora de tesis, ha sido una mentora a quien aprecio mucho. Gracias por enseñarme el valor del trabajo y la superación, siempre admiraré su fuerza, pasión y disciplina con la que realiza las cosas, gracias por el ser humano que es.

A la Dra. Soledad, por haberme abierto sus puertas en el laboratorio de Biotecnología Microbiana de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, sin usted, esto no hubiera sido posible. Infinitas gracias por la calidez y apertura que me mostró y que me hicieron sentir como en casa. A pesar de que no convivimos mucho, logré apreciar su valiosa calidad humana, y el cariño que comparte con los demás. De igual manera, externo mi agradecimiento a todo su equipo de estudiantes por haberme apoyado durante mi estancia, compañeros, gracias por compartir sus conocimientos, aprendí mucho de ustedes.

A mi comité tutorial, por sus aportaciones y comentarios que ayudaron a que este trabajo se llevara de una mejor manera.

A mis amigos, que siempre estuvieron en aquellos momentos difíciles, gracias por darme ánimo. Nunca olvidaré los momentos que pasamos en el CIIDIR, aquellas largas jornadas en el laboratorio, donde, sin lugar a dudas, la convivencia con ustedes hizo más llevadera esta etapa, gracias.

A mi mamá, hermano y abuelos, por siempre apoyarme a cumplir mis metas, sin ustedes nada de esto hubiera sido posible, gracias por compartir conmigo sus consejos y motivarme a seguir adelante.

Al CIIDIR-IPN, por haberme permitido formar parte de su familia y haber hecho posible la ejecución de este trabajo, a los docentes, personal administrativo y técnico que trabajan en esta institución, gracias por ser parte de mi formación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento de este proyecto, así como al programa de becas BEIFI.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
I. MARCO TEÓRICO	5
1.1. Suelos salinos	5
1.2. Suelos salinos en México	6
1.3. Plantas halófitas	6
1.3.1. Estrategias de supervivencia de las plantas halófitas	7
1.3.2. Impacto de la salinidad en las plantas	8
1.4. <i>Bacopa monnieri</i> (L.) Wettst	9
1.5. Rizósfera	10
1.5.1. Microorganismos rizosféricos y bacterias promotoras de crecimiento vegetal	11
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
IV. JUSTIFICACIÓN.....	18
V. HIPÓTESIS.....	19
VI. OBJETIVOS	20
6.1. Objetivo general	20
6.2. Objetivos específicos.....	20
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	21
7.1 Diagrama general de trabajo	21
7.2. Descripción del área de estudio	22
7.3. Muestreo y sitio de muestreo.....	23
7.4. Caracterización fisicoquímica del suelo	23
7.5. Obtención de microorganismos rizosféricos	25
7.6. Obtención de cultivos axénicos	25
7.7. Conservación de los aislados	25
7.8. Caracterización fenotípica	26
7.8.1. Caracterización morfológica colonial	26
7.8.2. Caracterización morfológica microscópica.....	26
7.9. Potencial de promoción de crecimiento vegetal de los aislados	26
7.9.1. Producción de ácido 3-indol acético	27
7.9.2. Producción de sideróforos	27
7.9.3. Solubilización de fosfatos	28

7.9.4. Solubilización de fitatos	28
7.9.5. Solubilización de carbonatos	29
7.9.6. Solubilización de zinc	29
7.9.7. Producción de compuestos poliméricos extracelulares (EPS)	30
7.9.8. Actividad proteolítica	30
7.9.9. Actividad aminolítica.....	31
7.10. Prueba de patogenicidad.....	31
7.11. Identificación genotípica de los aislados.....	32
7.11.1. Extracción de DNA y amplificación de la región 16S del gen rrs.....	32
7.11.2. Análisis bioinformático.....	33
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
8.1. Características fisicoquímicas del suelo rizosférico	35
8.2. Morfología microscópica y colonial de los aislados.....	39
8.3. Identificación molecular de los aislados.....	44
8.4. Tolerancia a la salinidad	50
8.5. Caracterización de la promoción de crecimiento vegetal de los aislados.....	53
IX. CONCLUSIONES.....	75
X. REFERENCIAS	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de los dos sitios de muestreo	37
Tabla 2. Contenido bacteriano del suelo 1 y suelo 2	40
Tabla 3. Caracterización colonial y microscópica de las cepas a las 48 h de crecimiento	42
Tabla 4. Identificación molecular de los aislados	46
Tabla 5. Tolerancia a la salinidad de los aislados.....	52
Tabla 6. Índices de producción de sideróforos en medio SP con cromoazurol.....	55
Tabla 7. Índices de solubilización de fitatos a diferentes concentraciones de NaCl	60
Tabla 8. Producción de sustancia polimérica extracelular	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de las partes que conforman la rizósfera	10
Figura 2. Mecanismos de tolerancia a la salinidad inducidos por bacterias rizosféricas promotoras de crecimiento vegetal.	13
Figura 3. Diagrama general de trabajo	21
Figura 4. Ubicación geográfica del área de estudio, Villamar, Michoacán.	22
Figura 5. Sitios de obtención de las muestras: a) Sitio 1 (suelo salino), b) Sitio 2 (suelo agrícola fuertemente salino)	35
Figura 6. Análisis de componentes principales para los diferentes sitios de muestreo del suelo.	39
Figura 7. Árbol filogenético general de las cepas aisladas de suelos salinos de la Región Ciénega de Chapala, Michoacán, construido con el análisis de las secuencias del gen 16 rRNA, mediante el método de máxima verosimilitud, empleando el modelo de sustitución nucleótida TIM3+I+G. Los valores de las ramas corresponden Bootstrap. Grupo externo Bacteroidetes.	48
Figura 8. Distribución de los géneros bacterianos en los suelos muestreados del municipio de Villamar, Michoacán.	50
Figura 9. Halomonas sp. en medio SP adicionado con cromoazurol para la determinación de producción de sideróforos.....	56
Figura 10. Índices de solubilización de fosfatos evaluados en medio NBRIP	58
Figura 11. Placas Petri con medio para solubilización de fitatos a diferentes concentraciones de NaCl, de izquierda a derecha (0 %, 3 % y 5 %)	61
Figura 12. Índices de solubilización de carbonatos a diferentes concentraciones de NaCl	63
Figura 13. Medio NBRIP adicionado con ZnO para la determinación de solubilización de zinc (Bacillus pumilus +).....	64
Figura 14. Índices de solubilización de zinc.....	65
Figura 15. Revelación de la prueba para la determinación de AIA, color amarillo (control), color rojo-naranja (prueba positiva).....	66

Figura 16. Producción de AIA de las cepas en diferentes concentraciones de NaCl a las 72 h.....	67
Figura 17. Medio Skim milk (10% de NaCl) para la determinación de producción de proteasas. De izquierda a derecha (Planococcus, Bacillus, Halobacillus)	69
Figura 18. Índices de actividad enzimática proteolítica en medio Skim milk al 10% de NaCl	69
Figura 19. Revelación de la prueba de producción de amilasas en medio enriquecido con almidón y NaCl al 10%.....	70
Figura 20. Índices de actividad enzimática aminolítica en medio almidón con NaCl al 10%.	71
Figura 21. Análisis de componentes principales para las diferentes cepas.....	74

RESUMEN

En la actualidad existen grandes extensiones de suelos con problemas de salinidad. Se estima que para el 2050, más del 50% del suelo cultivable será afectado por este problema. Estos suelos se destinan pocas veces a la producción agrícola por su baja productividad. Sin embargo, existen plantas con la capacidad de vivir en ambientes salinos, como *Bacopa monnieri* (L.) Wettst, se puede encontrar en la Región Ciénega de Chapala. El objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial de promoción de crecimiento vegetal de bacterias asociadas a la rizósfera de *B. monnieri* bajo condiciones de estrés salino. Para esto, se colectaron plantas de *B. monnieri* de una zona geotérmica denominada “Los Negritos”, perteneciente al municipio de Villamar, Michoacán. Se aislaron bacterias de la rizósfera en medio enriquecido salino (10% NaCl), las cuales se identificaron morfológica y molecularmente. Así mismo se evaluó el potencial de los aislados para producir Ácido 3-indol acético (AIA), sideróforos, proteasas y amilasas, y se determinó la capacidad de solubilización de zinc, fosfatos, fitatos y carbonatos, esto mediante pruebas *in vitro*. Se obtuvo un total de 24 aislados, dentro de los géneros encontrados destacan: *Oceanobacillus*, *Halomonas*, *Halobacillus*, *Nesterenkonia* y *Planococcus*. La mayoría de los aislados se clasificaron como bacterias halotolerantes, a excepción de *Halobacillus andaiensis*, que fue halófilo estricto. Diversas cepas tuvieron la capacidad de producir sideróforos, AIA, solubilizar fosfatos, fitatos, zinc y carbonatos bajo diferentes concentraciones de NaCl. Por otra parte, el 40% de las cepas aisladas presentó actividad proteolítica y aminolítica. Basándose en las pruebas *in vitro*, las cepas que se obtuvieron, presentan potencial de promover el crecimiento vegetal bajo condiciones controladas de estrés salino.

ABSTRACT

Nowadays have been reported conditions like drought and salinity in a number of soil across de world. It is estimated that by 2050 more than 50% of arable land will be affected by this problem. Saline soils are not destined for agriculture due to its low productivity which cause damage to the development and growth of the crops. However, there are plants that have the ability to grow in saline environments, such as *Bacopa monnieri* (L.) Wettst, that can be found in the Cienega de Chapala region. The aim of this study is to asses the plant growth promotion potential of bacteria from rhizosphere of halophyte *B. monnieri* under saline stress conditions. Samples of *B. monnieri* were collected from a geotermical area known as “Los Negritos” near to Villamar town, in the state of Michoacán. Halophilic medium (10% of NaCl) was used for the isolation and purification of rhizosphere bacteria. A total of 24 isolates were obtained, which were identified by using 16S rRNA analysis gene. Isolates were grown to evaluate the ability of production of IAA, siderophore and enzymatic activity, phosphate, phitate and zinc solubilization, by using in vitro assays. Phylogenetic analysis showed that bacterial strains belonged to *Oceanobacillus*, *Halobacillus*, *Bacillus*, *Halomonas*, *Planococcus*, *Psychrobacter*, *Vibrio* and *Nesterenkonia* genera. All bacterial strains were halotolerant except for *Halobacillus* that showed a moderated halophilic ability. Most of the bacterial strains were capable to produce siderophores, IAA, and exhibited zinc, phosphate and phytate solubilization activity under salt concentrations. 40% of the strains showed enzymatic protease and amylase activities at 10% NaCl concentration. The results obtained in this study indicated the potential of rhizoshere bacteria from *B. monnieri* to improve the growth and development of plants under saline conditions.

INTRODUCCIÓN

Existen diferentes factores ambientales que ejercen un efecto sobre la producción de cultivos, tales como: la sequía, temperatura, salinidad, contaminación del aire, metales pesados, pesticidas y el pH del suelo (El-Awady *et al.*, 2015). De estos factores, la salinidad es quizá el estrés abiótico con un efecto negativo sobre la producción de cultivos alrededor del mundo. Se puede mencionar que más del 6% del suelo del mundo presenta condiciones de salinidad, y el 20% de los suelos cultivables un estrés salino, siendo principalmente en zonas áridas y semiáridas donde se presenta este problema (Li *et al.*, 2017). Interacciones naturales como procesos geológicos, cambio climático y manejo de agua pueden causar la salinidad del suelo. Por otra parte, la salinidad del suelo también se puede inducir de manera antropogénica, mediante el uso excesivo de fertilizantes y la irrigación inadecuada de las tierras de cultivo (Szyma *et al.*, 2016).

El daño por salinidad en plantas se evidencia de diferentes maneras, por ejemplo, hojas amarillentas, disminución de la tasa de crecimiento, decrecimiento de la altura de la planta, así como la disminución del desarrollo radicular, lo que impide una adecuada absorción de nutrientes y agua. Lo anterior se atribuye a la inhibición de la elongación normal y división de las células causadas por el exceso de sales en el medio (Li *et al.*, 2017).

Las plantas halófitas utilizan diferentes estrategias para lograr vivir en ambientes salinos. Estas estrategias incluyen regulaciones internas de presión, específicamente en el citoplasma, exclusión de sodio de las células y la acumulación de este elemento en la vacuola. Otra manera de mitigar los efectos del estrés salino en plantas es la asociación con microorganismos benéficos rizosféricos (Szyma *et al.*, 2016).

En años recientes el uso de microorganismos benéficos ha sido una estrategia importante para reducir el daño en las plantas causado por el estrés salino y promover el crecimiento y desarrollo de los cultivos (Huashan *et al.*, 2017). Dentro de estos microorganismos se distingue la utilización de las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés), las cuales facilitan el

crecimiento de las plantas, mediante mecanismos conocidos como directos e indirectos (Bravo, 2017).

Dentro de los beneficios que aportan estos microorganismos se encuentra la capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico, producción de sideróforos, disolventes de fosfato, síntesis de fitohormonas y producción de enzimas que regulan el crecimiento (Li *et al.*, 2017).

I. MARCO TEÓRICO

1.1. Suelos salinos

El suelo constituye un componente más del medio ambiente, es vulnerable, de extensión limitada y se considera un recurso no renovable, debido a que su formación requiere de cientos de miles de años (Javier *et al.*, 2009).

En los últimos años el área de suelos afectada por la salinidad ha aumentado drásticamente, se estima que el 6% de la tierra cultivable en el mundo se ve afectada por la salinización, y el 20% del total de tierras irrigadas presenta este tipo de degradación química, no obstante, las áreas salinizadas incrementan de manera rápida por diversos factores (Shrivastava y Kumar, 2015), por lo que se prevé que para el 2050 la cifra de tierras afectadas por la salinización alcanzará el 50% (Li *et al.*, 2017; Muchate *et al.*, 2016).

La salinidad del suelo puede ser provocada por factores naturales o actividades humanas que incrementan la concentración de sales disueltas, principalmente cloruro de sodio (Ilangumaran y Smith, 2017). Dentro de los factores naturales figuran los procesos geológicos, manejo del agua y las condiciones climáticas de cada región, ya que en lugares cálidos y con poca precipitación los suelos tienden a ser salinos. Sin embargo, algunas actividades antropogénicas como lo es el uso inadecuado de fertilizantes, y las inapropiadas prácticas de irrigación pueden ser causantes comunes de la salinización del suelo (Shrivastava y Kumar, 2014; Szyma *et al.*, 2016).

Un suelo que presenta una conductividad eléctrica mayor o igual a 4 dS m⁻¹ es definido como salino, según el laboratorio de salinidad del USDA (United States Department of Agriculture) (Ilangumaran y Smith, 2017; Shrivastava y Kumar, 2014).

1.2. Suelos salinos en México

La salinización de suelos en México se considera un problema nacional, sin embargo, este se concentra principalmente en el centro, norte del país y a lo largo de la costa. El problema se agudiza especialmente en las regiones áridas y semiáridas, donde se ve presente una alta evaporación y poco drenaje, de igual manera, en las zonas con irrigación donde se estima que el 10% de estas está afectado por la salinización. La cifra estimada de suelos afectados por la salinización alcanza el millón de ha (Cerdea *et al.*, 2007; Serrano *et al.*, 2002). Se estima que un 3.2% del territorio nacional mexicano está afectado por la salinidad. El problema de salinización en México se ve principalmente en las cuencas cerradas, donde con el paso del tiempo ha habido una acumulación de sales en el horizonte del suelo (Gonzalez *et al.*, 2019; Serrano *et al.*, 2002).

En Michoacán, región Ciénega de Chapala, la salinización se ha descrito como un proceso continuo donde la acumulación de sales, principalmente NaCl, ha ocasionado la pérdida de fertilidad de los suelos, afectando significativamente la producción agrícola (Silva-García *et al.*, 2006).

Los suelos de la región de estudio se caracterizan por ser de textura pesada, y por presentar un gran contenido de arcillas, lo que agudiza los procesos de salinización. Los suelos predominantes son los vertisoles, en donde crecen plantas resistentes a la salinidad (Lastiri-hernández *et al.*, 2019).

1.3. Plantas halófitas

Las plantas halófitas son aquellas capaces de vivir y completar su ciclo de vida bajo concentraciones de sal que normalmente matarían al 99% de otras especies. En esta clasificación, podemos mencionar aquellas halófitas que naturalmente se encuentran en ambientes salinos, y que representan aproximadamente el 1% de las plantas terrestres (Yuan *et al.*, 2019) y, por otro lado, aquellas que a pesar de no vivir en ambientes salinos, tienen la capacidad de tolerar la sal. De esta manera, se

reconocen como halófitas aquellas que pueden soportar al menos 200 mM de NaCl (Flowers, 2008), en contraste, para las plantas glicófitas, una concentración arriba de 100Mm supondría la inhibición de su crecimiento (Volkov y Flowers, 2019).

Se consideran como plantas “halófitas obligadas” aquellas que requieren de sal para poder crecer, y como “halófitas facultativas” aquellas que pueden crecer en suelos desprovistos de sal, esto se basa en su demanda y tolerancia de sodio (Mishra y Tanna, 2017).

Existen otras clasificaciones de las halófitas que se basan en las características de los ambientes salinos donde se encuentran, o la composición de sus raíces, o en la habilidad para secretar iones (Flowers, 2008).

Las plantas halófitas se pueden encontrar tanto en suelos salinos, como en soluciones con sal. Muchas halófitas son capaces de crecer bajo concentraciones altas de sal, con irrigación de agua de mar a diferentes concentraciones. La mayoría de las halófitas toleran el sodio (Na^+), siendo este, el principal catión que se encuentra en los suelos salinos, junto con el cloro (Cl^-); sin embargo, otros aniones y cationes también contribuyen a la salinización del suelo, dentro de estos se encuentran: sulfatos, carbonatos, bicarbonatos de calcio, magnesio y potasio (Volkov y Flowers, 2019).

1.3.1. Estrategias de supervivencia de las plantas halófitas

La adaptación de las halófitas les ha permitido vivir y tolerar ambientes salinos, esto ha sido principalmente gracias a dos estrategias que utilizan; La primera es conocida como “salt tolerance” y la segunda como “ salt avoidance”, estas estrategias involucran mecanismos como, reducción de la afluencia de Na, compartimentalización, y la eliminación de iones de sodio mediante excreción, al mismo tiempo se presenta la secreción, derramamiento, incremento de la presión osmótica en el citoplasma, producción de solutos compatibles, acumulación de Na en la vacuola y succulencia. Se ha observado que algunas halófitas secretan el

exceso de sales en forma líquida a través de las hojas; sin embargo, al entrar en contacto con el aire estas se cristalizan (Mishra y Tanna, 2017; Szyma *et al.*, 2016).

Los mecanismos de tolerancia a la salinidad también involucran la generación de especies reactivas de oxígeno, vías de desintoxicación, osmoregulación o homeostasis iónica a través de osmoprotectores, y a nivel de expresión genética, o molecular, utilizan regulación de genes independientes o dependientes de ácido abscísico (Mishra y Tanna, 2017). Los mecanismos antioxidantes involucran enzimas como la superóxido dismutasa, glutatión reductasa, catalasas y peroxidasas; y moléculas como carotenoides, flavonoides, y otros compuestos que previenen del daño oxidativo provocado por las especies reactivas de oxígeno (Ilangumaran y Smith, 2017).

Otro mecanismo utilizado por las halófitas y halófitas facultativas es la asociación con microorganismos rizosféricos, estos ayudan a aminorar el daño causado por el estrés salino y promueven el crecimiento y desarrollo vegetal (Li *et al.*, 2017).

1.3.2. Impacto de la salinidad en las plantas

Todas las plantas pueden tolerar algo de NaCl presente en el medio en el que crecen; sin embargo, estas concentraciones son muy variables, las cuales van debajo de 50 mM a más de 1 M (Flowers *et al.*, 2019).

Como primer punto, el estrés salino limita la habilidad de planta para absorber el agua necesaria, provocando disminución de la evaporación, desajustes en la nutrición mineral, desbalances hormonales y formación de especies reactivas de oxígeno.

En las plantas glicófitas el estrés salino ocasiona malformación de hojas, hojas amarillas, disminución de la tasa de crecimiento y un decremento en el peso de la planta. Por otra parte, el estrés salino impide la elongación normal celular, reflejándose en un sistema radicular deficiente, lo que afecta la adecuada absorción y transporte de nutrientes y agua (Ilangumaran y Smith, 2017; Li *et al.*, 2017).

El estrés salino también se ve reflejado en cambios fisiológicos de la planta, principalmente por medio de un aumento en la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS), como son aniones radicales superóxido, peróxido de hidrógeno, y radicales libres hidroxilos. Estas especies ocasionan la peroxidación lipídica y el estrés oxidativo en plantas. Además, los cambios hormonales ocasionados por el estrés salino conducen a desórdenes metabólicos de las plantas, afectando su crecimiento y desarrollo normal (Kumar *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2017).

1.4. *Bacopa monnieri* (L.) Wettst

La mayoría de las plantas son glicófitas, esto quiere decir que son sensibles a la sal (Ilangumaran y Smith, 2017); sin embargo, dentro de la clasificación de las plantas halófitas, existen dos divisiones; las halófitas obligadas y facultativas (Mishra y Tanna, 2017). *Bacopa monnieri* se encuentra en esta última clasificación, ya que a pesar de que se considera una planta glicófito, se le puede encontrar en condiciones salobres. Estudios han demostrado su potencial para desarrollarse en ambientes salinos (Jathina y Syed, 2019).

B. monnieri es una planta perenne, rastrera y suculenta, se reconoce por sus atributos medicinales alrededor del mundo, dentro de la gama de fitocompuestos bioactivos que produce son los bacósidos A y B, utilizados para mejorar la inteligencia y memoria. Son diversas las propiedades medicinales que se le han atribuido, como es: efecto antiinflamatorio, analgésico, antipirético y sedante (Panda *et al.*, 2020; Pankaj *et al.*, 2020).

B. monnieri se distribuye ampliamente en India, donde su principal uso es en la medicina Ayurveda, de igual manera se le encuentra en regiones cálidas de América y Australia (Ahire *et al.*, 2018; Panda *et al.*, 2020).

Debido a las características y a la capacidad de crecer en suelos salinos se le ha utilizado como una alternativa para fitodesalinizar suelos salinos agrícolas en acompañamiento de la halófito *Sesuvium verrucosum* Raf. (Lastiri-hernández *et al.*,

2019). *B. monnieri* ha demostrado un aumento en su tolerancia a la salinidad cuando está asociada a bacterias rizosféricas promotoras de crecimiento vegetal en suelos salinos (Pankaj *et al.*, 2020).

1.5. Rizósfera

En 1904 Lorenz Hiltner fue el primer investigador que acuñó el término “rizósfera” para describir la interfaz de las raíces de las plantas y el suelo. La rizósfera se puede definir como aquel volumen de suelo que se encuentra estrechamente cercano a las raíces vivas (Singh *et al.*, 2017). La rizósfera se caracteriza por tener una mayor población y actividad microbiana en comparación de la mayor parte del suelo aledaño, dichas diferencias las promueven los diversos compuestos orgánicos y exudados que las plantas producen y emiten al exterior, además, dentro de esta zona se libera alrededor del 11% del carbón neto fijado por las mismas (Curl y Truelove, 1986; Hartmann *et al.*, 2008; Tkacz *et al.*, 2015).

La rizósfera supone el lugar de una fuerte interacción de tres componentes biológicos: suelo, raíces de las plantas y microfauna. Esta zona se considera como una de las interfaces más dinámicas de la Tierra (Figura 1) (Singh *et al.*, 2017).

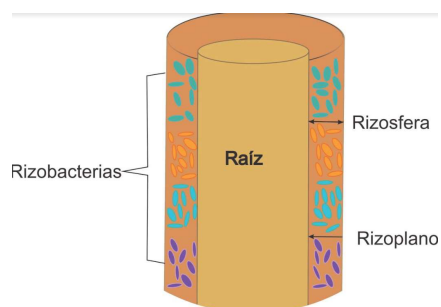


Figura 1. Representación esquemática de las partes que conforman la rizósfera

Fuente: Modificado de Bravo, 2017

Esta zona es densamente poblada por diversos microorganismos, tales como invertebrados, nemátodos, hongos y bacterias. Las raíces de las plantas secretan

metabolitos primarios como: ácidos orgánicos, carbohidratos y aminoácidos, y metabolitos secundarios como: alcaloides, terpenoides y fenoles; una de sus funciones es mantener comunicación y regular la microfauna en la rizósfera. Lo anterior permite a las plantas atraer y promover la población de microorganismos benéficos y combatir los patógenos (Venturi y Keel, 2016).

La microbiota de la rizósfera aumenta la capacidad de las plantas a adaptarse a diferentes ambientes (Bulgarelli *et al.*, 2012; Venturi y Keel, 2016). Diversos estudios han demostrado que las interacciones entre los componentes mencionados anteriormente se relacionan con la salud de la planta. Las comunidades microbianas que conforman la rizósfera son determinantes en la salud del hospedero, ya que intervienen en diversos mecanismos nutricionales y de defensa (Haney *et al.*, 2015).

1.5.1. Microorganismos rizosféricos y bacterias promotoras de crecimiento vegetal

Los microorganismos que conforman la microbiota de la rizósfera pueden ser neutrales, patógenos o benéficos, con la capacidad de ejercer efectos profundos en el crecimiento, nutrición y salud de las plantas, principalmente por la movilización de nutrientes y la protección contra patógenos, tales como las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés) (Compant *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2017).

El suelo que rodea a las raíces se caracteriza por presentar un complejo de interacciones que ocurren entre las raíces de las plantas, exudados de las raíces, suelo, y microorganismos. Las plantas dependen de su habilidad para comunicarse con el exterior, específicamente con los elementos más cercanos, uno de estos elementos es la población bacteriana que habita en la rizósfera (Singh *et al.*, 2017); una forma en la que esta compleja comunicación se lleva a cabo, es mediante los diferentes exudados de las raíces. Las PGPR se encuentran principalmente colonizando la superficie de las raíces y en espacios entre los pelos radiculares, por

lo que no precisamente se encuentran en contacto directo con las raíces de las plantas (Ilangumaran y Smith, 2017).

En 1978, Kloepper y colaboradores acuñaron el término PGPR, y desde entonces, este grupo de bacterias se ha visto como una alternativa para disminuir el estrés abiótico en la agricultura sustentable (Wang *et al.*, 2018). En los últimos años se le ha dado gran importancia a las PGPR debido a que estas poseen una o más propiedades de promoción de crecimiento vegetal, esto lo logran a través de diversos mecanismos, tales como aumento en la asimilación de nutrientes, fijación biológica de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de sideróforos, producción de fitohormonas como ácido 3-indol acético, control de patógenos por antagonismo o competición, etc. (Li *et al.*, 2017).

Las PGPR se caracterizan por ayudar a disminuir el estrés abiótico de manera directa e indirecta a través de diferentes mecanismos, un ejemplo de ello es el estrés salino. La PGPR halotolerantes tienen la capacidad de mitigar el estrés en plantas ocasionado por el exceso de sales, esto lo logran mediante la producción de diversos metabolitos mencionados anteriormente, que aumentan la biodisponibilidad y asimilación de nutrientes, la protección contra las sales mediante la exclusión de las mismas por medio de la producción de sustancias poliméricas extracelulares, y una compleja señalización entre planta-microorganismo (Ilangumaran y Smith, 2017). La actividad microbiana en suelos salinos puede favorecer el crecimiento de las plantas y aumentar su resistencia a la salinidad (Figura 2), (Arora y Vanza, 2017).

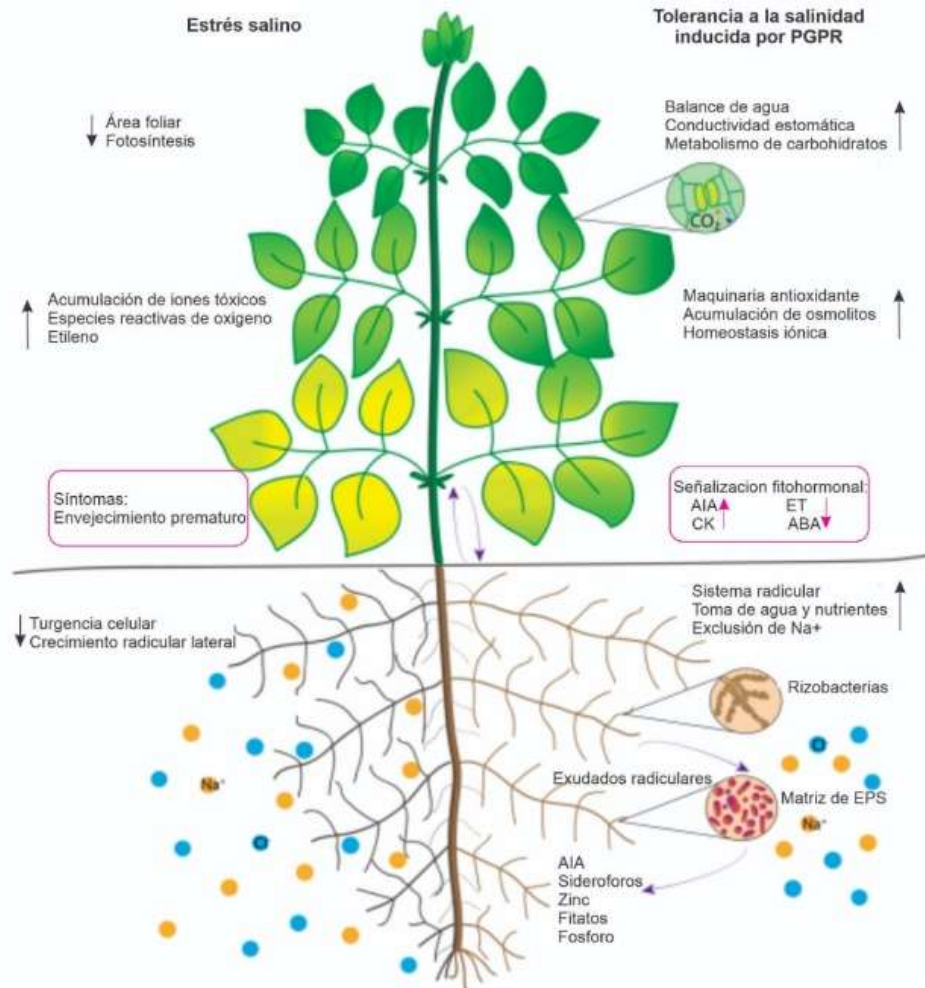


Figura 2. Mecanismos de tolerancia a la salinidad inducidos por bacterias rizosféricas promotoras de crecimiento vegetal.

Fuente: Ilangumaran y Smith, 2017

Mediante pruebas *in vitro* se ha evaluado la capacidad de las PGPR para promover el crecimiento vegetal, y se han tratado de explicar algunas de las relaciones entre estos microorganismos y las plantas que colonizan (Ilangumaran y Smith, 2017). De esta manera, diversas plantas son capaces de vivir en ambientes con altas concentraciones de sales, dentro de este grupo de plantas destacan las halófitas.

II. ANTECEDENTES

Se estima que solo el 1% de las plantas son halófitas, por lo tanto, el 99% restante se considera sensible a la salinidad (Yuan *et al.*, 2019). Las plantas capaces de vivir en ambientes salinos han desarrollado diversas estrategias para lidiar con el estrés salino; dentro de estas estrategias, la asociación con bacterias rizosféricas (Szyma *et al.*, 2016) ha recibido mucha atención en los últimos años por parte de los investigadores.

Son diversos los estudios que se han realizado respecto al análisis de la diversidad bacteriana asociada a plantas en suelos salinos, donde se ha pretendido conocer la relaciones entre planta-microorganismo. El objetivo de la mayoría de estos estudios ha sido determinar el potencial metabólico de estos microorganismos y su posible uso en la recuperación de suelos salinos o la mitigación del estrés salino en plantas, específicamente con las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal.

Por otro lado, se ha observado un aumento en la práctica de inoculación plantas de cultivo con microorganismos benéficos, debido a que estos facilitan la producción de cultivos bajo condiciones de estrés salino mediante el aumento de la tolerancia a la salinidad, lo que se traduce en un aumento del rendimiento (Ilangumaran y Smith, 2017).

En ambientes extremos como desiertos, océanos, o suelos salinos, habitan bacterias que han demostrado potencial para inducir la tolerancia a la salinidad en cultivos, un ejemplo es *Pseudomonas fluorescens*, que se aisló de palmeras datileras en Sahara, esta bacteria tuvo la capacidad de promover el crecimiento de las raíces de maíz en condiciones de salinidad. Unas raíces bien desarrolladas permiten que la planta tenga un mayor acceso a los nutrientes que se encuentran en el suelo (Zerrouk *et al.*, 2016). En otro trabajo, *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9, aumentó la resistencia al estrés salino (100 mM de NaCl) en plántulas de maíz en pruebas *in vitro*. Se observó que los mecanismos involucrados fueron en el sistema antioxidativo de la planta y reducción en el contenido interno de Na⁺ (Chen *et al.*, 2016).

Estudios han demostrado que las plantas halófitas albergan una gran cantidad de microorganismos en su rizósfera. El papel que desempeñan estos microorganismos en la promoción del crecimiento vegetal, especialmente en condiciones no favorables del suelo ha sido muy estudiado (Szyma *et al.*, 2016). Las pruebas *in vitro*, así como las técnicas de biología molecular han sido herramientas que permiten de manera rápida el estudio y selección de bacterias rizosféricas con potencial PGPR (Ilangumaran y Smith, 2017).

Se han aislado bacterias con potencial de promoción de crecimiento vegetal de plantas halófitas como *Sesuvium verrucosum*, *Salicornia europea*, *Salicornia brachiata*, etc. Dentro de estos microorganismos se puede mencionar a *Enterobacter cloacae*, *Vibrio sp*, *Bacillus pumillus*, *B. subtilis*, el género *Halomonas*, *Halobacillus*, entre otros. Estas bacterias se han reconocido por promover el crecimiento vegetal en cultivos, mediante la producción de diversos metabolitos, fitohormonas, enzimas y el aumento en la disponibilidad de nutrientes en el suelo (El-Awady *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017; Szyma *et al.*, 2016)

Las PGPR aisladas de plantas halófitas han demostrado la capacidad de aliviar el estrés salino a través de diversos mecanismos fisiológicos y moleculares. Estos incluyen modificaciones en el sistema radicular de la planta, procesos antioxidantes, producción de sideróforos, exopolisacáridos, regulación de fitohormonas como el ácido 3-indol acético y ACC desaminasa, síntesis de osmolitos, fijación de nitrógeno, solubilización de fósforo y control de los fitopatógenos (Ilangumaran y Smith, 2017; Kumar *et al.*, 2020). Es importante mencionar que se ha reportado una mayor diversidad metabólica en bacterias aisladas de suelos con mayor concentración de sales (Szyma *et al.*, 2016).

Trabajos han demostrado que la acumulación de osmolitos, así como la señalización fitohormonal inducida por las PGPR ayudan a superar el choque osmótico en las plantas por la salinización (Ilangumaran y Smith, 2017). La producción de AIA por parte las bacterias rizosféricas es uno de los mecanismos de señalización más amplio y estudiado en las interacciones entre planta-microorganismo. Diversos trabajos han demostrado que la producción de esta

fitohormona modula el desarrollo y crecimiento del sistema radicular de las plantas, lo que se traduce en un mayor acceso a los nutrientes disponibles en la matriz suelo (Numan *et al.*, 2018).

Los suelos salinos o calcáreos, donde predomina el pH alcalino, presentan un problema en la biodisponibilidad de nutrientes como el fósforo, por tal motivo, estudios se han enfocado en aislar bacterias capaces de obtener fósforo en condiciones de salinidad. Dentro de las bacterias que tienen la habilidad de solubilizar fosfatos, el género *Bacillus* se considera uno de los más comunes, además, se ha demostrado su capacidad para obtener fósforo en condiciones de salinidad (Jiang *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2020; Xiao *et al.*, 2011).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a causas naturales y antropogénicas, en la actualidad existen grandes extensiones de suelos que presentan problemas de salinidad. Se estima que para el 2050, más del 50% del suelo cultivable presentará este problema. Estos suelos pocas veces se destinan para la producción agrícola debido a que diversos cultivos no pueden desarrollarse bajo estas condiciones. Por lo anterior, surge la necesidad de la búsqueda de alternativas biológicas que permitan utilizar los suelos salinos al incrementar la tolerancia a la salinidad de los cultivos mediante la utilización de microorganismos.

IV. JUSTIFICACIÓN

Diversos estudios han demostrado que el suelo rizosférico contiene gran cantidad de bacterias capaces de proveer múltiples beneficios a las plantas mediante diferentes mecanismos. Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal han recibido gran atención debido a que poseen la capacidad de mejorar el sistema de defensa, disminuir el estrés abiótico y estimular el crecimiento de la planta, de manera directa a través de la producción de sustancias involucradas en los procesos de nutrición, y de manera indirecta mediante la síntesis de fitohormonas y compuestos antifúngicos.

Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal halotolerantes tienen el potencial de aliviar el estrés salino en plantas a través de varios mecanismos fisiológicos y moleculares. Esto incluye modificación del sistema radicular, producción de antioxidantes, exopolisacáridos, sideróforos, regulación de fitohormonas, síntesis de osmolitos, toma de minerales y control de fitopatógenos (Kumar *et al.*, 2020).

V. HIPÓTESIS

Si las plantas de *B. monnieri* se encuentran en suelos salinos, la fracción cultivable de bacterias asociadas al suelo rizosférico presentará potencial de promoción de crecimiento vegetal bajo condiciones de estrés salino.

VI. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Determinar el potencial de promoción de crecimiento vegetal de la fracción cultivable de bacterias rizosféricas asociadas a *B. monnieri* (L.) Wettst.

6.2. Objetivos específicos

- 1) Caracterizar fisicoquímicamente los suelos del municipio de Villamar Michoacán.
- 2) Aislar bacterias rizosféricas asociadas a la raíz de *B. monnieri*.
- 3) Identificar genotípicamente los aislados mediante un análisis de secuenciación del gen 16S rRNA.
- 4) Caracterizar el potencial de promoción de crecimiento vegetal de los aislados.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Diagrama general de trabajo

El esquema general metodológico para esta investigación se presenta en la figura 3.

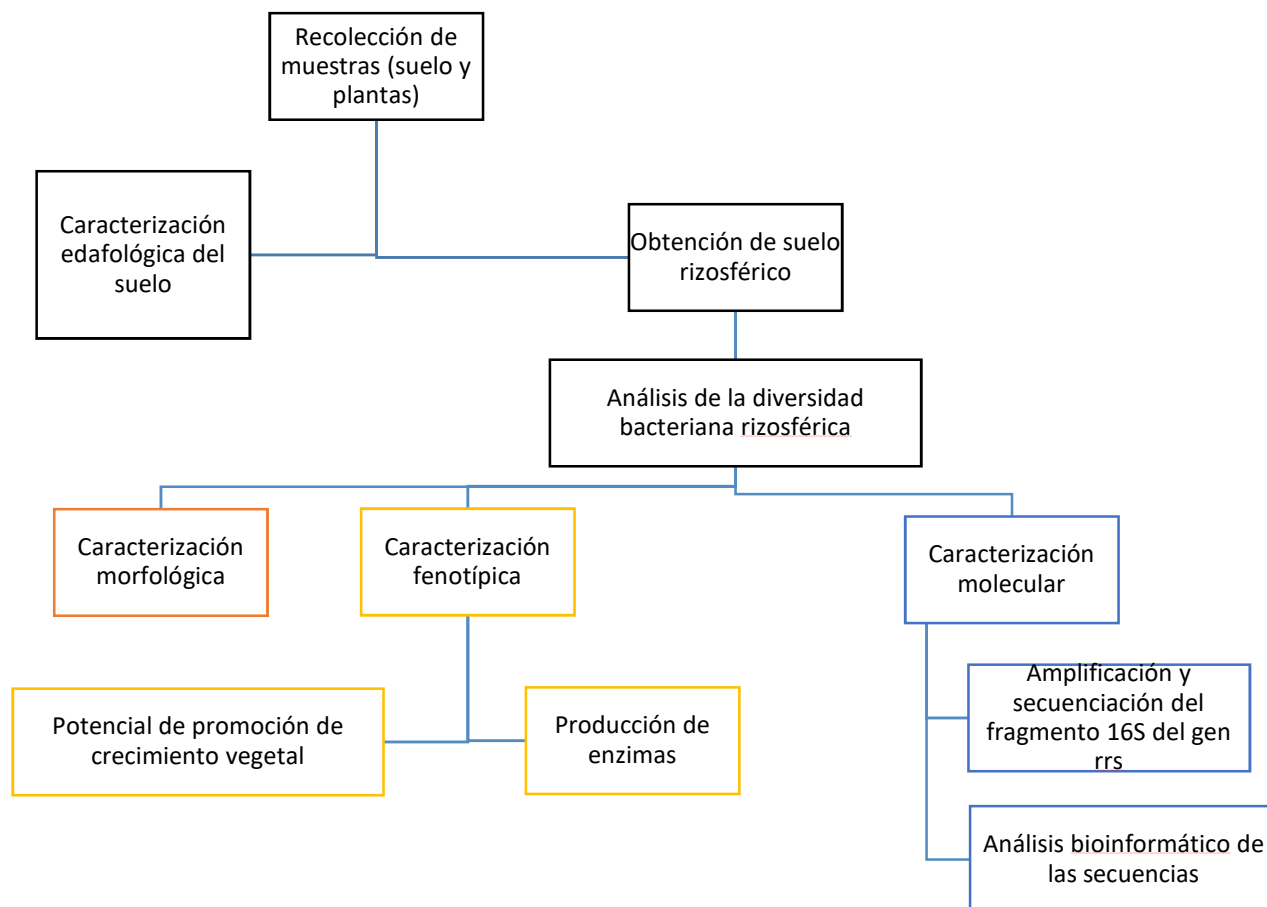


Figura 3. Diagrama general de trabajo

7.3. Muestreo y sitio de muestreo

Las muestras de planta y de suelo se obtuvieron de una zona geotérmica conocida como los negritos, perteneciente al municipio de Villamar, Michoacán. Se colectaron seis muestras compuestas de plantas de dos sitios con problemas de salinidad y una muestra compuesta de suelo de cada sitio. El primer sitio con coordenadas N 20° 03.806, W 102° 36.872 y el segundo sitio N 20° 02.814 y W 102° 36.992. El criterio de selección de los sitios fue por la diferencia de conductividad eléctrica y el estado de vegetación que cada uno presentó.

La recolección de las plantas y de los suelos se realizó en zigzag, trazando puntos imaginarios de referencia en los dos sitios. Las plantas se extrajeron del suelo con la ayuda de una pala, esto con la finalidad de conservar el suelo sujeto a las raíces. Las muestras se transportaron en bolsas de plástico negras hasta el laboratorio y se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta su posterior uso.

El suelo de los sitios se obtuvo a una profundidad de 0-30 cm, tomando en cuenta las especificaciones de muestreo que establece la norma oficial mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000.

7.4. Caracterización fisicoquímica del suelo

Como paso previo a la caracterización fisicoquímica del suelo, las muestras se secaron al aire libre y bajo la sombra, para lo cual, el suelo se extendió en una superficie de papel de manera homogénea, logrando crear una capa no mayor a 2.5 cm de profundidad. Una vez que el suelo se secó, se prosiguió a realizar la molienda, y posteriormente se hizo pasar por un tamiz con aberturas de 2 mm de diámetro, con la finalidad de obtener una muestra más homogénea.

La determinación de pH y conductividad eléctrica se realizó en el extracto de saturación, el porcentaje de materia orgánica a través del método propuesto por Walkley y Black (1934), la concentración de aniones solubles en el extracto de

saturación (carbonatos, bicarbonatos y cloruros) se determinó por titulometría volumétrica y sulfatos por turbidimetría a 340nm.

Para la determinación de la capacidad de intercambio catiónico (CIC) se utilizó como solución saturante acetato de amonio y los cálculos se realizaron con la siguiente fórmula (Sumner y Miller, 1996).

$$CIC = 200xVxN$$

Donde:

CIC= Capacidad de intercambio catiónico (cmol_c*Kg⁻¹)

V=Volumen (ml) de HCl

N= Normalidad del HCl

La concentración de cationes intercambiables y solubles (Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺ y K⁺) se determinó por medio de espectrometría de absorción atómica con el espectrofotómetro AAS modelo SensAA. Por último, se determinó la Relación de Adsorción de Sodio (RAS) y el Porcentaje de Sodio Intercambiable (PSI) con las siguientes fórmulas:

$$RAS = \frac{Na^+}{\sqrt{\frac{Ca^{2+} + Mg^{2+}}{2}}}$$

Donde RAS= Relación de adsorción de sodio (mmol_c*L⁻¹)^{1/2}

Los cationes Na⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺ se cuantificaron en el extracto de saturación (Cationes solubles).

$$PSI = \frac{Nai^+}{CIC} x 100$$

Donde PSI= Porcentaje de sodio intercambiable

Nai⁺= Sodio intercambiable (mmol_c*L⁻¹)

7.5. Obtención de microorganismos rizosféricos

El suelo rizosférico se obtuvo mediante el cepillado de cada una de las raíces de las plantas, esto de manera cuidadosa y tratando de respetar la zona correspondiente al rizoplaneo.

De cada muestra se pesó 1 g de suelo rizosférico, con agitación vigorosa durante 10 min se hicieron diluciones seriadas hasta 1×10^{-8} en una solución con NaCl al 10% (Jorquera *et al.*, 2008). Posteriormente, de las diluciones 1×10^{-4} , 1×10^{-6} y 1×10^{-8} se tomaron 100 μ L y se sembró en placa por dispersión, utilizando perlas estériles. Lo anterior se realizó por duplicado y bajo condiciones estériles. Las placas se dejaron en incubación a temperatura ambiente durante 4 días. El medio de crecimiento que se utilizó es un medio nutritivo moderadamente salino (SP) modificado, específico para microorganismos halófilos; su composición por litro es: NaCl, 98 g; KCl 2.0 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.0 g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.36 g; $NaHCO_3$, 0.06 g; NaBr, 0.23 g; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 0.001 g; polipeptona 5.0 g; extracto de levadura, 10.0 g; glucosa, 1.0 g; pH final 7.0 (Caton *et al.*, 2004).

Después del tiempo de incubación se hizo el conteo de la carga bacteriana de los suelos con la ayuda de un contador de colonias.

7.6. Obtención de cultivos axénicos

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se hizo una diferenciación de las colonias que presentaron características morfológicas diferentes, estas se sembraron en medio SP por la técnica de la estría cruzada hasta obtener cultivos puros. Los aislados se mantuvieron en refrigeración y realizó resiembra cada 4 semanas en medio SP para su mantenimiento.

7.7. Conservación de los aislados

A partir de cultivo fresco (24 – 45 h) crecido en caldo SP se tomaron 500 μ L y se colocaron en tubos criogénicos, posteriormente se adicionaron 500 μ L de una solución de glicerol al 50%, se homogeneizó en vórtex y se almacenaron a -72 °C.

7.8. Caracterización fenotípica

Con el fin de determinar la tolerancia a la salinidad de los aislados, se realizaron pruebas en medio SP con un rango de concentración de NaCl de 0-25%, en intervalos de 2.5%. Por otro lado, los aislados se clasificaron en halotolerantes, halófilos moderados o halófilos, con base en el crecimiento que se observó en las diferentes concentraciones de NaCl (Wang *et al.*, 2015; Zhang y Feng, 2008).

7.8.1. Caracterización morfológica colonial

La caracterización morfológica colonial se llevó a cabo en placa, a partir de los aislados con 48-120 horas de crecimiento. Los parámetros que se tomaron en cuenta fueron: tamaño, forma, elevación, borde, textura y color.

7.8.2. Caracterización morfológica microscópica

A partir de cultivos frescos (48-72 h), se realizó una tinción de Gram modificada por Dussault para microorganismos halófilos, que consistió en hacer un frotis con una solución salina al 10% de NaCl, posteriormente el portaobjetos se sumergió en una solución de ácido acético al 2% por cinco minutos para retirar el exceso de sales. El portaobjetos se dejó secar al aire y se continuó con la tinción de Gram tradicional. Por último, se observó en el microscopio con el objetivo de 100x (Dussault, 1955).

7.9. Potencial de promoción de crecimiento vegetal de los aislados

7.9.1. Producción de ácido 3-indol acético

La evaluación de producción de ácido indol acético se llevó a cabo en cuatro concentraciones de sal (0, 3, 5, y 10% de NaCl), para esto, primeramente, los aislados se pusieron a crecer en caldo SP sin NaCl. A partir de cultivo fresco (24-48 h) se realizaron lavados de las células con agua destilada tipo 2 (para la prueba sin sal), y agua al 3, 5 y 10% de NaCl respectivamente. Se ajustó el inóculo bacteriano a una densidad óptica de 0.2 a 600 nm y se inocularon 100 µL en medio JP (Jean Patriquin) cuya composición es la siguiente (g/L): ácido succínico 2.5, sacarosa 5, K₂HPO₄ 6, KH₂PO₄ 4, NH₄CL 1, MgSO₄.7H₂O 0.20, NaCl 0.1, CaCl₂.2H₂O 0.02, FeCl₃.6H₂O 0.01, Na₂MoO₄.2H₂O 0.002, Triptofano 0.1, KOH 2.1, adicionando los porcentajes de NaCl requeridos para cada prueba. Una vez que se inocularon los viales se pusieron a incubar a 150 rpm a una temperatura de 25 °C durante siete días. Una vez transcurrido el periodo de incubación se tomó 1 mL del medio JP y se le añadió 1 mL de solución de Salkowski como agente revelador de esta prueba. La composición de esta solución es la siguiente (por 100 mL): 61.4 mL de H₂O, 38.61 mL de H₂SO₄ Y 1.2 g de FeCl₃. Después de haber agregado la solución de Salkowski se incubó la mezcla en oscuridad durante 30 min. El cambio de amarillo a rojo se consideró como un indicador positivo de producción de AIA (Orhan, 2016; Román-Ponce *et al.*, 2017). Posteriormente se realizó la cuantificación por espectrofotometría a una longitud de onda de 540 nm, y la concentración de AIA se determinó usando una curva de calibración de AIA puro, mediando un análisis de regresión lineal (Kumar *et al.*, 2009).

7.9.2. Producción de sideróforos

La producción de sideróforos se evaluó a diferentes concentraciones de NaCl utilizando como base el medio SP al 0, 3, 5 y 10% de NaCl, y una solución de cromoazurol (50 mL/L) cuya composición es: 60.2 mg de cromoazurol disueltos en 50 ml de agua, adicionado con 10 mL de HCL 10 mM con 0.0023 g de FeCl. Posteriormente se adicionaron 40 mL de una solución de CTAB (Bromuro de

hexadeciltrimetilamonio) (Alexander y Zuberer, 1991). Las placas se inocularon utilizando la técnica de siembra por picadura a partir de cultivo fresco (24 h aproximadamente) y se incubaron a 30°C durante 72 h, monitoreando en intervalos de 24 h. Se utilizó a *Pseudomonas aeruginosa* como control positivo. La prueba se consideró positiva si se observó presencia de un halo amarillo o traslúcido alrededor de la colonia, posteriormente se hizo la medición del diámetro del halo de solubilización y diámetro de la colonia a todos aquellos aislados que resultaron positivos, esto para calcular el índice de producción de sideróforos (Pérez-miranda *et al.*, 2007; Schwyn y Neilands, 1987).

7.9.3. Solubilización de fosfatos

La capacidad para solubilizar fosfatos se evaluó en el medio NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate Growth Medium) (Nautiyal, 1999), cuya composición es (g/L): glucosa 10 g, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g, KCl 0.2 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1, adicionando 1.5% de agar bacteriológico y ajustando a un pH de 7. Las placas se inocularon con cultivo bacteriano fresco (24 h) por la técnica de la picadura, se incubaron a 28 °C durante 72 h y se estuvieron monitoreando cada 24 h. La evaluación de esta prueba fue semicuantitativa, y se consideró como positiva al observar la presencia de un halo de solubilización alrededor de la colonia. Como control positivo se tomó de referencia la actividad de *Paraburkholderia tropica*. Posteriormente se calculó el índice de solubilización (IS) para todos aquellos aislados que resultaron positivos en esta prueba (Román-Ponce *et al.*, 2017).

7.9.4. Solubilización de fitatos

Para evaluar la capacidad de las cepas para solubilizar fosfatos a partir de fuentes orgánicas se utilizó el medio propuesto por Kerovuo *et al.* (1998), cuya composición es la siguiente (g/L): glucosa, 10; fitato de Na^+ , CaCl_2 , 2; NH_4NO_3 , 5; KCl, 0.5;

MgSO₄·7H₂O, 0.5; FeSO₄·7H₂O 0.003; MnSO₄·H₂O, 0.01; agar, 15. Para evaluar la capacidad de solubilización bajo estrés salino, al medio se le agregó NaCl al 3, 5 y 10%. El medio se ajustó a un pH de 7. Las placas se inocularon con cultivo fresco (24 h) utilizando la técnica de la picadura, se incubaron a 28°C durante 120 h y se estuvieron monitoreando cada 24 h. Como control positivo se tomó de referencia la actividad de *Pseudomona aeruginosa*. La evaluación de esta prueba fue semicuantitativa, y se consideró como positiva al observar la presencia de un halo de solubilización alrededor de la colonia. Posteriormente se calculó el índice de solubilización (IS) para todos aquellos aislados que resultaron positivos en esta prueba.

7.9.5. Solubilización de carbonatos

La capacidad de solubilización de carbonatos se evaluó en placa, en ausencia y presencia de NaCl al 3, 5 y 10%, utilizando el medio Foster (Rivadeneira *et al.*, 2004), cuya composición es (g/L): glucosa 50, peptona 5, KH₂PO₄ 1, MgSO₄·7H₂O 1, CaCO₃ 1.5, adicionado con 1.5% de agar bacteriológico y un pH final de 7. Las placas se inocularon con cultivo fresco (24 h) por medio de la técnica de la picadura. Se evaluó la presencia de halo de solubilización alrededor de la colonia bacteriana. Los aislados que presentaron halo de solubilización se consideraron como positivos, para lo cual se calculó el índice de solubilización, midiendo el diámetro del halo de solubilización y el diámetro de la colonia. Como control positivo se utilizó a *Paraburkholderia tropica*.

7.9.6. Solubilización de zinc

Para evaluar la capacidad de solubilización de zinc de los aislados se utilizó el medio NBRIP modificado, propuesto por Fasim *et al.* (2002) cuya composición es (g/L): glucosa 10 g, ZnO 5 g, MgCl₂ 6H₂O 5 g, MgSO₄ 7H₂O 0.25 g, KCl 0.2 g, (NH₄)₂SO₄ 0.1, adicionando 1.5% de agar bacteriológico y se ajustó a un pH de 7. Las placas

se incubaron a 28 °C durante 120 h y se monitorearon cada 24 h. Como control positivo se tomó de referencia la actividad de *Paraburkholderia tropica*. La evaluación de esta prueba fue semicuantitativa, y se consideró como positiva al observar la presencia de un halo de solubilización alrededor de la colonia. Posteriormente se calculó el índice de solubilización (IS) para todos aquellos aislados que resultaron positivos en esta prueba (Kamran *et al.*, 2017).

7.9.7. Producción de compuestos poliméricos extracelulares (EPS)

Para evaluar la producción de compuestos extracelulares de manera cualitativa se utilizó el medio ATCC, cuya composición es (g/L): KH₂PO₄ 0.2, K₂HPO₄ 0.8, MgSO₄.7H₂O 0.2, CaSO₄.2H₂O 0.1, FeCl₃ 2 mg, extracto de levadura 0.5, sacarosa 20, NaCl 100, agar 15. Se ajustó a un pH final de 7.2. La inoculación de las placas se realizó con cultivo fresco por medio de la técnica de estría abierta y se incubaron a 28°C durante cinco días. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluó la presencia de mucosidad o sustancias mucosas en las placas, lo que tradujo como prueba positiva.

Para confirmar y cuantificar la producción de EPS se utilizó un segundo medio (alginato) cuya composición es la siguiente (g/L): alginato de Na 5, (NH₄)₂SO₄ 5, K₂HPO₄ 2, MgSO₄.7H₂O 1, agar 15. Para evaluar la producción, pero bajo estrés salino, se agregaron 100 g de NaCl al medio. El medio se ajustó a un pH de 7.2-7.4. La siembra en placa se realizó por medio de la técnica de la picadura; en cada placa se inoculó por triplicado utilizando biomasa fresca. Las placas se incubaron a 28 °C durante cinco días. La prueba se reveló utilizando una solución de yodo-lugol al 10%. Los aislados que tuvieron la capacidad de producir EPS presentaron un halo de coloración alrededor de la colonia. Posteriormente se hizo la medición de los halos de producción para calcular el índice de producción de EPS.

7.9.8. Actividad proteolítica

La capacidad de los aislados para catalizar la hidrólisis de proteínas bajo condiciones de estrés salino se evaluó en placa, utilizando el medio sólido de leche descremada (Skim milk) cuya composición es la siguiente (g/L): $MgSO_4$ 9.7; $MgCl_2 \cdot H_2O$, 7; $CaCl_2$, 3.6; KCl, 2; $NaHCO_3$, 0.06; NaBr, 0.026; Citrato de amonio, 0.625; NaCl, 81; Extracto de levadura, 0.25; Skim milk al 3% (30 g/L). Se ajustó a un pH final de 7.3.

Las placas se inocularon por triplicado con cultivo fresco (24 h), se incubaron a 28°C durante cinco días. La presencia de un halo transparente alrededor de la colonia bacteriana se consideró como positivo para esta prueba. Con las medidas del diámetro del halo y diámetro de la colonia se calculó el índice de actividad proteolítica (Yuttavanichakul *et al.*, 2012).

7.9.9. Actividad aminolítica

La actividad aminolítica de los aislados se evaluó en placa utilizando un medio adicionado con almidón (20 g/L), cuya composición es la siguiente (g/L): citrato diamónico 0.625, extracto de levadura 0.250, KH_2PO_4 0.375, Na_2CO_3 0.375 y $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Para crear condiciones de salinidad se adicionó NaCl al 10% (Mukhtar *et al.*, 2019).

7.10. Prueba de patogenicidad

Para evaluar la capacidad de lisis de las bacterias, estas se cultivaron en medio agar sangre, adicionado con 5% de sangre humana (Salmerón *et al.*, 2014). Las bacterias se sembraron por triplicado utilizando la técnica de la picadura, con la finalidad de obtener colonias aisladas, posteriormente se incubaron a 30°C durante 24 h. La presencia de un halo translúcido alrededor de la colonia bacteriana se tomó como un indicativo de patogenicidad.

7.11. Identificación genotípica de los aislados

7.11.1. Extracción de DNA y amplificación de la región 16S del gen rrs

El DNA de los aislados se extrajo de acuerdo a la metodología propuesta por Hoffman y Winston (1987), con algunas modificaciones. Se inocularon los aislados en medio SP para su crecimiento y posterior obtención de células. Para ello, después de 24 h de crecimiento el caldo de cultivo se centrifugó a 4500 rpm durante 15 minutos en tubos eppendorf. Una vez que se obtuvo pastilla de biomasa suficiente, a los tubos de eppendorf se agregaron 500 µL de agua destilada estéril y 500 µL de solución de buffer de lisis (Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM), se mezcló en un vórtex hasta resuspender y homogeneizar completamente la pastilla de biomasa. Posteriormente los tubos eppendorf se incubaron a 4°C durante 24 h.

Transcurrido el tiempo de incubación se adicionó a cada uno de los tubos 100 µL de fenol y 100 µL de cloroformo puro y perlas de vidrio (0.5 µm de diámetro), se agitaron en vórtex a máxima potencia durante 4 min. Posteriormente los tubos se colocaron en un termoblock a 65°C durante 30 min, y en seguida se sometieron a un choque térmico con un baño en agua fría durante 4 minutos. Se agregaron 200 µL de buffer TE, pH 8 y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 15 min. Posteriormente la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 ml y se adicionó 1 ml de isopropanol frío, se mezcló cuidadosamente por inversión y posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min. Se decantó el isopropanol y se adicionó 1 ml de etanol al 70%, se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min. El etanol se evaporó con la ayuda de un termoblock a 65°C. Por último, la pastilla de DNA se resuspendió en 50 µL de agua pura estéril. El DNA se almacenó a -20 °C hasta su posterior uso.

Para comprobar la calidad del DNA extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

La amplificación del DNA se llevó a cabo por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). La reacción se realizó para una mezcla

con un volumen final de 25 μ L. La composición de la reacción fue la siguiente: 3 μ L de $MgCl_2$ 25 mM, 0.5 μ L de cada primer universal: sentido 27 F y 1492 R (Baker *et al.*, 2003) a una concentración final de 10 pM, 0.5 μ L de mezcla de dNTPs (10 mM de cada uno), 2.5 μ L de buffer libre de Mg^{2+} , 2 μ L de BSA (10 mg/mL) y 0.125 μ L de Taq DNA polimerasa marca Thermo Scientific.

Una vez que se realizó la mezcla de componentes se prosiguió a dar inicio a la reacción con las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 5 min y 30 ciclos de 94°C (1 min), 56°C (30 seg), 72°C (2 min); y un ciclo final de extensión a 72°C por 10 min.

Para evaluar la calidad de la amplificación se realizó una electroforesis de los amplicones en gel de agarosa al 1%, y se visualizó en un transluminador con luz azul. Una vez que se corroboró la integridad de las muestras, se enviaron a Macrogen Inc. (Seoul, Korea) para su secuenciación.

7.11.2. Análisis bioinformático

A partir de los electroferogramas que se obtuvieron de las secuencias de la región 16S del gen *rrs* se hizo una revisión y corrección de las secuencias en el programa Clustal X (Versión 1.83) y Seaview 4 (Gascuel *et al.*, 2010). Una vez que se editaron las secuencias se realizó una comparación con la base de datos del GenBank (NCBI) por alineamiento local utilizando el algoritmo BLAST ver 2.8.1.+, de igual manera se hizo una comparación con la base de datos EzBiocloud (Yoon *et al.*, 2017). Los resultados se colectaron basándose en el criterio propuesto por Rosselló-Mora (para todos aquellos que presentaran >97 % de identidad) para la creación del alineamiento múltiple de secuencias. Los alineamientos se realizaron en el programa UGENE versión 1.30.0. utilizando el algoritmo MUSCLE (Okonechnikov *et al.*, 2012), este alineamiento se utilizó para la construcción del árbol filogenético con la ayuda del programa PAUP* versión 4.0a164 (Swofford 2003), con el método de la máxima parsimonia y por el método bayesiano bajo el criterio probabilístico, utilizando el programa PhyML 3.0 (Guindon y Ranc, 2010) o

Beast 2 (Bouckaerd *et al.*, 2014). Para estimar el mejor modelo evolutivo se utilizó el programa jModelTest 2 (Darriba *et al.*, 2012) para calcular el soporte estadístico de las distancias de las ramas se realizó un análisis de 1000 bootstrap o 10,000,000 de repeticiones del método probabilístico. La edición del árbol filogenético se realizó en el software Figtree.

7.12. Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos todas las pruebas se realizaron por triplicado de los diferentes parámetros evaluados. Se realizó un análisis de la varianza para examinar los efectos de los factores estudiados en cada una de las variables.

La prueba de Tukey ($p < 0.05$) se utilizó para determinar si el valor de la media de cada variable analizada variaba significativamente entre las pruebas. Todos los análisis se realizaron en los programas estadísticos SAS 9.1 y minitab.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Características fisicoquímicas del suelo rizosférico

En la Figura 5 se observan los dos suelos muestreados del municipio de Villamar, Michoacán. El suelo 1 presenta una mayor cobertura vegetal (*B. monnieri*) en comparación con el suelo 2, esto se debe a que el suelo 2 tiene una mayor actividad agrícola lo que interrumpe el crecimiento de plantas nativas. Por otro lado, el suelo 1 tiene un mayor contenido de humedad ya que se está localizado a las orillas del lago “la alberca”.



Figura 5. Sitios de obtención de las muestras: a) Sitio 1 (suelo salino), b) Sitio 2 (suelo agrícola fuertemente salino)

La interpretación del estado de salinización de los suelos se realizó con base en la Norma Oficial Mexicana NOM-2021-SEMARNAT-2000 que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos.

Los sitios de muestreo se caracterizaron por ser suelos arcillosos, con una densidad aparente de 1.2, el porcentaje de porosidad fue de 56.22 y la capacidad de retención de agua de 156%. La gran capacidad de retención de agua se debe, en gran parte, a la naturaleza arcillosa de los suelos (Castruita *et al.*, 2000). La arcilla permite que

los suelos sean porosos, y que tengan una gran capacidad de intercambio catiónico, características que se observaron en el presente trabajo (Riaz & Marschner, 2020).

Los parámetros fisicoquímicos que presentaron los suelos correspondientes a los sitios de donde se obtuvieron las bacterias se muestran en la Tabla 1. El suelo 1 (S1) y el suelo 2 (S2) presentaron un pH ligeramente alcalino. Por otro lado, la conductividad eléctrica del S1 corresponde a un suelo salino, y la CE del S2 pertenece a un suelo fuertemente salino, esto con base en la NOM-021-SEMARNAT-2000. Es interesante observar que, aunque el S2 presenta una mayor CE, el S1 tiene un pH más alcalino, esto se puede relacionar con la presencia y concentración de otros aniones solubles como son: carbonatos, bicarbonatos, cloruros y sulfatos; aniones que se encuentran en mayor cantidad en el S1 (Ilangumaran y Smith, 2017; Leogrande y Vitti, 2018).

El Na^+ fue el catión que se encontró en mayor concentración en los dos sitios, seguido del Ca^{2+} , Mg^{2+} y por último el K^+ . Los suelos salinos se caracterizan por presentar una elevada concentración de estos elementos en solución y se encuentran formando distintas sales, que alteran los valores de pH y CE (Leogrande y Vitti, 2018).

Los parámetros para definir los problemas de sodicidad es la relación de adsorción de sodio del extracto de saturación (RAS) y el porcentaje de sodio intercambiable (PSI). La RAS del S2 fue casi tres veces mayor que la del S1; sin embargo, el PSI fue similar en los dos suelos.

Con base en los valores de los parámetros anteriores, los dos suelos se pueden clasificar como salinos sódicos (Bui, 2017).

La región de la Ciénega de Chapala en el estado de Michoacán, se caracteriza por ser una región semiárida y por presentar una gran actividad en la producción de cultivos forrajeros. Sin embargo, el uso de agua de riego de mala calidad ha contribuido a la salinización de los suelos agrícolas, lo que ha disminuido su productividad con el paso del tiempo (Lastiri-hernández *et al.*, 2019; Silva-García *et al.*, 2006).

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de los dos sitios de muestreo

Parámetro	S1	S2
pH	8.37 ± 0.005 <u>Ligeramente alcalino</u>	7.84 ± 0.003 <u>Ligeramente alcalino</u>
CE (dS/m)	7.76 ± 0.008 <u>Salino</u>	11.18 ± 0.0.23 <u>Fuertemente salino</u>
Carbonatos (mmol/L)	2.03 ± 0.000	0.88 ± 0.020
Bicarbonatos (mmol/L)	9.14 ± 0.000	3.63 ± 0.010
Cloruros (mmol/L)	24.19 ± 0.000	20.23 ± 0.030
Sulfatos (mmol/L)	367.64 ± 0.000	132.4 ± 0.350
Materia orgánica (%)	4.80 ± 0.15	4.32 ± 0.12
CIC (cmol/Kg)	46.67 ± 0.000	68.27 ± 0.250
Ca²⁺ i (cmol/Kg)	42.18 ± 0.014	19.93 ± 0.010
Mg²⁺ i (cmol/Kg)	7.62 ± 0.005	14.12 ± 0.020
K⁺ i (cmol/Kg)	5.18 ± 0.006	9.93 ± 0.012
Na⁺ i (cmol/Kg)	19.96 ± 0.011	28.79 ± 0.230
Ca²⁺ s (cmol/Kg)	3.81 ± 0.026	101.64 ± 0.310
Mg²⁺ s (cmol/Kg)	2.166 ± 0.005	85.87 ± 0.250
K⁺ s (cmol/Kg)	2.89 ± 0.001	72.51 ± 0.180
Na⁺ s (cmol/Kg)	22.53 ± 0.000	375.59 ± 0.100
RAS	13.03 ± 0.025	38.78 ± 0.012
PSI	42.77 ± 0.023	42.18 ± 0.025

i: catión intercambiable, s: catión soluble, Relación de adsorción de sodio (**RAS**), Porcentaje de sodio intercambiable (**PSI**) Los valores representan la media de tres repeticiones y su desviación estándar.

En el S1, que se localiza a un costado del lago “La alberca”, los problemas de salinización han sido producto de procesos geológicos naturales, pues esta zona se caracteriza por presentar actividad geotérmica. Por otro lado, el S2 se encuentra en una zona agrícola, donde el uso de agua de mala calidad (rica en sales) ha ocasionado la acumulación de sales en los suelos a lo largo del tiempo (Silva-García *et al.*, 2006).

Por medio de un análisis de componentes principales se pudo observar la clara separación entre los suelos utilizados para el presente trabajo (Figura 6). Se aprecia que, a pesar de que las muestras se obtuvieron de dos sitios, existen diferencias entre muestras de cada sitio. Los suelos del sitio 1 se caracterizaron por presentar un pH alto, originado por las altas concentraciones de aniones solubles. Por otro lado, los suelos del sitio 2, se caracterizaron por presentar una CE elevada, producto de los altos valores de los diferentes cationes, especialmente Na⁺ (Leogrande y Vitti, 2018).

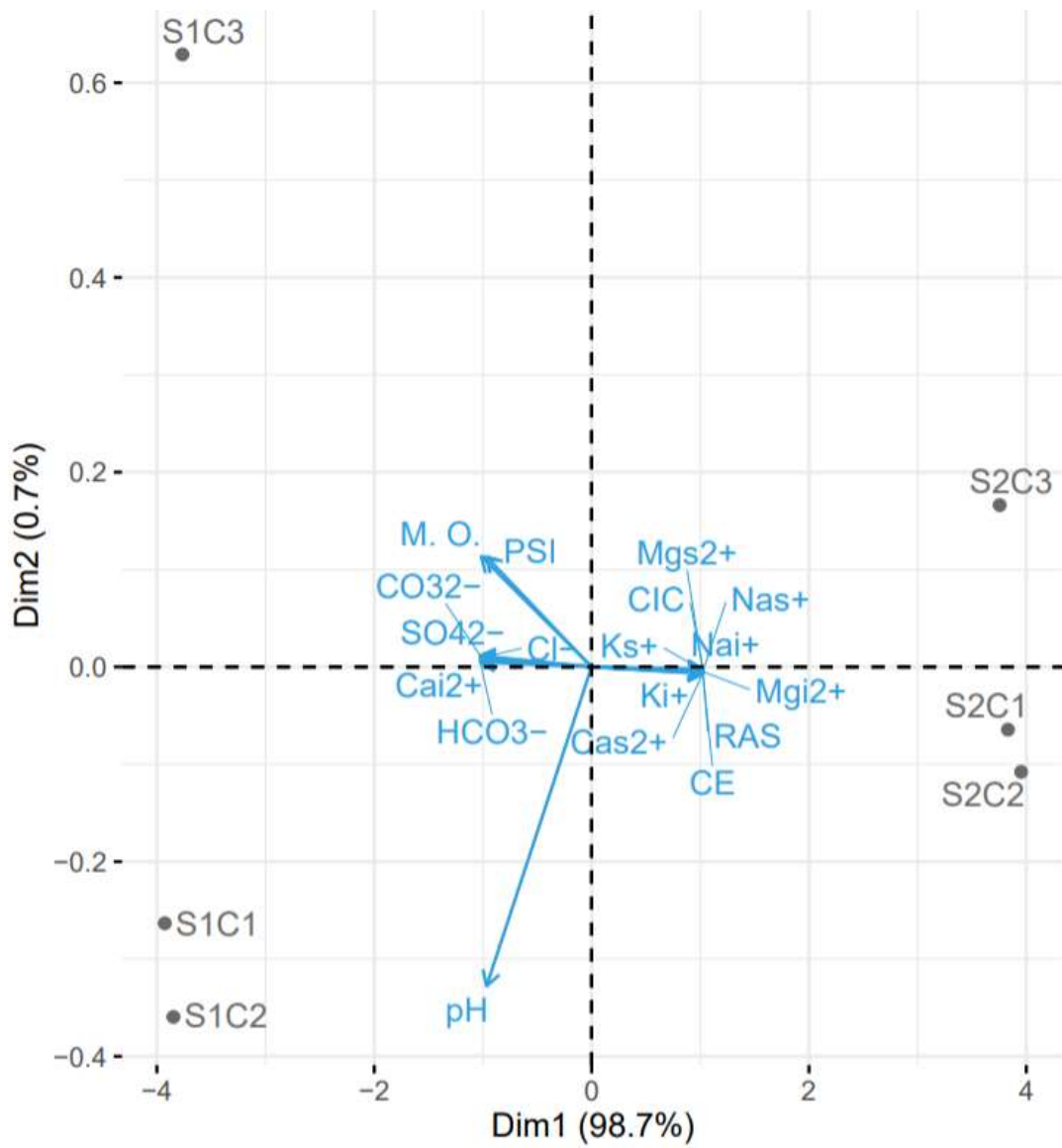


Figura 6. Análisis de componentes principales para los diferentes sitios de muestreo del suelo.

8.2. Morfología microscópica y colonial de los aislados

La carga bacteriana se determinó mediante la cuenta viable en placa de la fracción cultivable de bacterias del suelo rizosférico. Se encontró una diferencia en la carga bacteriana entre los dos sitios de muestreo (Tabla 2). El S1, que corresponde a una zona con poca actividad humana presentó mayor contenido de microorganismos en medio salino, por el contrario, la carga microbiana del S2 que corresponde a una

zona agrícola, fue menor. Es importante mencionar que el S2 se caracterizó por tener una mayor concentración de sales en comparación del S1, lo que puede influir en la diversidad bacteriana que habita en ellos.

Tabla 2. Contenido bacteriano del suelo 1 y suelo 2

Sitio	Campo	Carga bacteriana
S1	C1	1.82x10 ³
	C2	1.40x10 ³
	C3	1.65x10 ³
S2	C1	1.11x10 ³
	C2	1.4x10 ³
	C3	1.02x10 ³

Los microorganismos cumplen un papel muy importante en el suelo, ya que encabezan los procesos de mineralización de la materia orgánica y el ciclado de nutrientes en el sistema. Por lo anterior, la diversidad de las comunidades microbianas es de gran importancia para el buen funcionamiento y el equilibrio del ecosistema. Un factor clave que puede relacionarse con el contenido de microorganismos en los suelos estudiados en este trabajo, es el grado de salinidad que presentan. Como se menciona en el trabajo de Leogrande y Vitti (2018), la salinidad influye en la actividad microbiana, la biomasa, y por ende, en la conversión de la materia orgánica. Sin embargo, existen algunos microorganismos que han desarrollado mecanismos para resistir el estrés ocasionado por la salinidad, no obstante, otros son vulnerables a estos ambientes salinos.

Se obtuvo un total de 24 bacterias que presentaron una gran diversidad de características coloniales, algunas de estas características se tomaron en cuenta para realizar la diferenciación morfológica colonial (Tabla 3). La mayoría de las cepas se caracterizaron por tener una textura cremosa con bordes enteros. La forma circular y la elevación convexa se observó en más del 50% de las cepas.

La cepa S2C1-6, perteneciente al género *Halomonas*, tuvo características muy peculiares; se caracterizó por ser una colonia irregular, umbeliforme, con una textura mebranosa y la presencia de pigmentación amarilla. Es importante destacar que, una vez que se realizó la identificación molecular la morfología microscópica fue corroborada basándose en el manual de Bergey's.

La comparación de las características morfológicas con el manual de Bergey's nos ayudó a corroborar la identidad de los microorganismos aislados. De acuerdo a lo establecido en este manual, en el género *Planococcus* (S1C2-12, S1C2-13, S1C1-21, S1C2-22, S1C2-23) las colonias son circulares, ligeramente convexas, cremosas, brillantes y pueden presentar coloración amarilla o naranja (Shivaji, 2015). El género *Halomonas* presentó colonias blancas a beige, las cuales con el paso del tiempo tomaban tonalidades cafés, lo que concuerda con lo descrito en el manual de Bergey's para *Halomonas* (Vreeland y Dobson, 2015).

Entre las cepas del género *Bacillus* (S1C2-10, S1C2-16, S2C2-19, S2C3-20) fueron notables diferencias en las características coloniales, lo cual es distintivo de este género (Logan y Vos, 2015). Se encontraron colonias desde pequeñas hasta grandes, elevaciones convexas, planas y umbilicado, con texturas cremosas y mucosas. Las colonias bacterianas de la cepa S1C2-24 (*Vibrio rumoiensis*) presentaron forma circular, traslúcidas, con ausencia de color y pigmentación; estas características concuerdan con las reportadas por Yumoto *et al.* (1999), quien caracterizó esta cepa.

Tabla 3. Caracterización colonial y microscópica de las cepas a las 48 h de crecimiento

AISLADO	MORFOLOGÍA COLONIAL						MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA	PIGMENTO
	Tamaño	Forma	Elevación	Borde	Textura	Color		
S2C1-1	Grande	Circular	Umbilicado	Entero	Creмоса	Blanquecino	Bacilos Gram +	No
S2C1-2	Mediana	Circular	Convexo	Entero	Creмоса	Beige	Bacilos Gram -	No
S2C1-3	Grande	Circular	Convexo	Lobulado	Creмоса	Blanquecino	Bacilos Gram -	No
S2C1-4	Pequeña	Circular	Convexo	Entero	Creмоса	Amarillento	Bacilos Gram -	Si
S2C1-6	Pequeña	Irregular	Umbeliforme	Lobulado	Membranosa	Amarillento	Bacilos Gram -	Si
S1C1-7	Grande	Irregular	Plano	Lobulado	Creмоса	Blanca	Bacilos Gram -	No
S1C1-8	Pequeña	Puntiforme	Convexo	Entero	Creмоса	Beige	Bacilos Gram -	No
S1C2-9	Pequeña	Circular	Convexo	Entero	Creмоса	Beige	Bacilos Gram -	No
S1C2-10	Grande	Circular	Plano	Entero	Mucosa	Beige	Bacilos Gram +	No
S1C2-11	Mediana	Puntiforme	Plano	Entero	Creмоса	Beige	Cocos Gram -	No
S1C2-12	Grande	Circular	Convexo	Entero	Creмоса	Naranja	Estafilococos Gram +	Si
S1C2-13	Pequeña	Circular	Convexo	Entero	Creмоса	Naranja	Estafilococos Gram +	Si
S1C2-14	Pequeña	Circular	Convexo	Entero	Creмоса	Beige	Bacilos Gram +	No
S1C2-15	Mediana	Circular	Convexo	Entero	Creмоса	Blanquecino	Bacilos Gram +	No
S1C2-16	Mediana	Circular	Umbilicado	Entero	Creмоса	Blanquecino	Bacilos Gram +	No
S1C1-17	Mediana	Circular	Plana	Entero	Creмоса	Blanca	Bacilos Gram -	No
S1C1-18	Mediana	Circular	Plana	Entero	Creмоса	Beige	Bacilos Gram -	No
S2C2-19	Mediana	Circular	plana	Entero	Mucosa	Beige	Bacilos Gram +	No
S2C3-20	Pequeña	Puntiforme	Plana	Lobulado	Creмоса	Blanquecino	Bacilos Gram +	No
S1C1-21	Pequeña	Puntiforme	Convexa	Entero	Creмоса	Naranja	Estafilococos Gram +	Si
S1C2-22	Pequeña	Puntiforme	Convexa	Entero	Creмоса	Naranja	Estafilococos Gram +	Si
S1C2-23	Grande	Puntiforme	Convexa	Entero	Creмоса	Naranja	Estafilococos Gram +	Si
S1C2-24	Mediana	Circular	Plana	Entero	Creмоса	Traslucida	Bacilos Gram -	No
S2C2-25	Pequeña	Circular	Convexa	Entero	Creмоса	Amarilla	Bacilos Gram +	Si

*La clave de los aislados denotan el suelo (S1 o S2) y el campo de dónde se obtuvieron (C1, C2 o C3), así como el orden en que fueron registrados (últimos dígitos).

De acuerdo con los resultados de la caracterización microscópica de los aislados (Tabla 3), se observa cómo la cantidad de bacterias Gram positivas (Gram +) es apenas mayor que la cantidad de bacterias Gram negativas (Gram -). Szyma *et al.* (2016) obtuvieron una mayor cantidad de bacterias Gram + cultivadas, aisladas de la rizósfera de la halófito *Salicornia europea* L.; sin embargo, el análisis PLFA (Phospholipid Fatty Acid Analysis, por sus siglas en inglés), mostraron una mayor cantidad de bacterias Gram -.

Por otro lado, se observa que algunos de los aislados presentaron pigmentación o producción de pigmentos, lo cual se puede relacionar con un mecanismo empleado para tolerar la salinidad, conocido como “síntesis de solutos compatibles”, mediante el que se producen diversos compuestos orgánicos de bajo peso molecular (Ramírez *et al.*, 2006). Especies de los géneros *Halomonas*, *Planococcus* y *Nesterenkonia* produjeron pigmentaciones de color naranja o amarillo en sus colonias bacterianas.

8.3. Identificación molecular de los aislados

La identificación molecular de las cepas mediante secuenciación del fragmento 16S del gen *rrs* se hizo con una longitud del fragmento amplificado de aproximadamente 1500 pares de bases (bp) (Tabla 4).

Tomando el criterio de Roselló-Mora para todas aquellas cepas que presentaron más del 97% de identidad se lograron identificar 24 cepas, que se distribuyeron en ocho géneros: *Bacillus*, *Oceanobacillus*, *Halobacillus*, *Halomonas*, *Nesterenkonia*, *Planococcus*, *Psychrobacter* y *Vibrio*. Ocho cepas pertenecieron al género *Halomonas*, siendo este el que mayor número de aislados tuvo en comparación con los demás géneros. De los géneros *Nesterenkonia*, *Halobacillus* y *Vibrio*, solo se logró recuperar una cepa respectivamente.

Estos géneros se han recuperado en trabajos anteriores, un ejemplo son los estudios de Mukhtar *et al.*, (2019) y Mukhtar *et al.*, (2018), en los cuales, a partir de suelo rizosférico de plantas halófitas, aislaron especies bacterianas pertenecientes a géneros como *Bacillus*, *Oceanobacillus*, *halobacillus* *Halomonas*, *Planococcus* y *Vibrio*.

Por otro lado, El-Awady *et al.* (2015) encontraron especies como *Vibrio cholerae*, y *Escherichia coli* asociados a la halófito *Sesuvium verrucosum*. Jha *et al.* (2012), aislaron *Halomonas sp* y *Vibrio alginolyticus* de las raíces de la halófito *Salicornia brachiata*.

La concentración de sales en los suelos influye en la selección de bacterias halotolerantes, de igual manera sucede con las bacterias que se encuentran en la rizósfera de las plantas; no obstante, los microorganismos que colonizan el suelo rizosférico tienden a incrementar la tolerancia a condiciones no favorables, como es la salinidad (Szyma *et al.*, 2016).

Géneros encontrados en este trabajo como es *Halomonas*, *Oceanobacillus*, *Halobacillus* y *Nesterenkonia*, se han reportado comúnmente en suelos salinos o asociadas a plantas halófitas nativas (Desale *et al.*, 2013).

El género *Halobacillus* tiene la capacidad de crecer en altas concentraciones de sal, por lo que diversas especies de este género se han aislado de ambientes salinos, tales como, suelos salinos, lagunas saladas, etc. *Halobacillus andansis* NEAU-ST-10-40 comparte una similitud de 98.8% en su secuencia con *H. alkaphilus* FP5 (Wang *et al.*, 2015). Delgado y colaboradores aislaron *H. andaensis* de suelos salinos en México, y encontraron que esta bacteria presentó una correlación positiva con cationes como el magnesio (Delgado-garcía *et al.*, 2018).

Numerosas especies del género *Bacillus* muestran capacidad para crecer en condiciones salinas, por tal motivo es común que se encuentren en ambientes salinos, por ejemplo: *B. pumilus* y *B. gibsonii* que se han recuperado de suelos salinos; estas bacterias han mostrado capacidad para crecer en condiciones alcalinas, y sus enzimas han ganado importancia en aplicaciones biotecnológicas (Ahmadian *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2013).

Oceanobacillus fue descrito por (Lu *et al.*, 2001), quien aisló del mar diversas especies de este género. La tolerancia a la salinidad de este género se reporta hasta un 22% de NaCl; la especie *Oceanobacillus kimchii* se considera una especie halotolerante, por lo que puede ser encontrada en ambientes poco salinos (Amoozegar *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2001).

Tabla 4. Identificación molecular de los aislados

Aislado	Nombre	% Similitud	Longitud secuencia (bp)
S2C1-1	<i>Oceanobacillus kimchii</i> X50	97.51	1492
S2C1-2	<i>Halomonas zhanjiangensis</i> JSM078169	97.34	1439
S2C1-3	<i>Halomonas zhanjiangensis</i> JSM078169	96.53	1451
S2C1-4	<i>Halomonas songnenensis</i> NEAU-ST10-39	99.86	1445
S2C1-6	<i>Halomonas songnenensis</i> NEAU-ST10-39	99.65	1447
S1C1-7	<i>Halomonas lutescens</i> Q1U	98.60	1448
S1C1-8	<i>Halomonas boliviensis</i> LC1	97.37	1455
S1C2-9	<i>Psychrobacter pulmonis</i> CECT5989	98.09	1449
S1C2-10	<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061	98.03	1469
S1C2-11	<i>Psychrobacter alimentarius</i> JG-100	99.10	1453
S1C2-12	<i>Planococcus rifietoensis</i> M8	98.02	1471
S1C2-13	<i>Planococcus maitriensis</i> S1	97.15	1468
S1C2-14	<i>Halobacillus andaensis</i> NEAU-ST10-40	99.51	1485
S1C2-15	<i>Psychrobacter pulmonis</i> CECT 5989	98.24	1455
S1C2-16	<i>Bacillus zanthoxyli</i> 1433	99.16	1473
S1C1-17	<i>Halomona lutescens</i> Q1U	97.97	1451
S1C1-18	<i>Halomonas lutescens</i> Q1U	98.53	1449
S2C2-19	<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061	98.70	1462
S2C3-20	<i>Bacillus gibsonii</i> DSM 8722	98.77	1464
S1C1-21	<i>Planococcus maitriensis</i> S1	98.44	1467
S1C2-22	<i>Planococcus maitriensis</i> S1	98.86	1466
S1C2-23	<i>Planococcus rifietoensis</i> M8	98.22	1474
S2C2-24	<i>Vibrio rumoiensis</i> S-1	98.07	1454
S2C2-25	<i>Nesterenkonia halotolerans</i> YIM 70084	97.57	1440

En la Figura 7 se muestra el árbol filogenético general de los aislados. El grupo externo que se utilizó fue el de los Bacteroidetes. Claramente se visualiza la separación de los filos bacterianos. Las cepas se representan por tres filos: Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria, el porcentaje de cepas pertenecientes a cada filo fue: 50%, 46% y 4% respectivamente. Las cepas se distribuyeron dentro de 8 géneros; *Vibrio* (4.16%), *Halomonas* (33.33%), *Psychrobacter* (12.5%), *Planococcus* (20.83%), *Bacillus* (16.66%), *Nesterenkonia* (4.16%), *Halobacillus* (4.16%) y *Oceanobacillus* (4.16%).

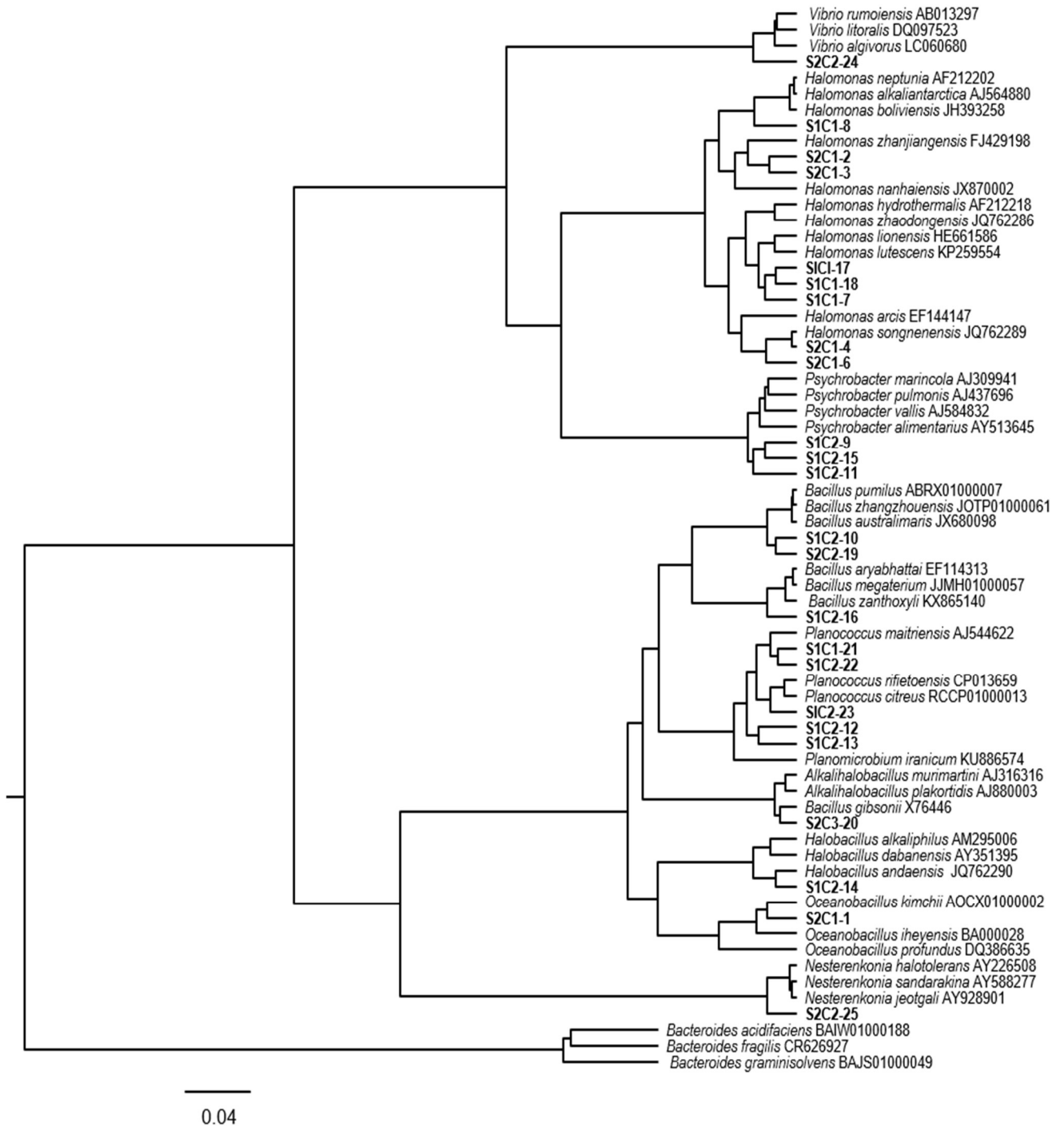


Figura 7. Árbol filogenético general de las cepas aisladas de suelos salinos de la Región Ciénega de Chapala, Michoacán, construido con el análisis de las secuencias del gen 16 rRNA, mediante el método de máxima verosimilitud, empleando el modelo de sustitución nucleótida TIM3+I+G. Los valores de las ramas corresponden Bootstrap. Grupo externo Bacteroidetes.

Los suelos tuvieron géneros exclusivos y en común (Figura 8). En el S1 fue donde más géneros bacterianos se lograron aislar, dentro de ellos se encuentran: *Psychrobacter*, *Planococcus*, *Halobacillus* y *Vibrio*. Por otro lado, del S2 (correspondiente a una zona agrícola) solo se aislaron cepas pertenecientes al género *Nesterenkonia* y *Oceanobacillus*. Los géneros que se encontraron en ambos sitios de muestreo fueron *Halomonas* y *Bacillus*.

Es importante mencionar que el S1 es una zona muy cercana al lago conocido como “La alberca”, por lo que su porcentaje de humedad es relativamente alto, condiciones favorables para el desarrollo de especies del género *Vibrio*. En este sitio se aisló *Vibrio rumoiensis* (S2C2-24), esta especie se clasifica como una bacteria psicrófila, ya que posee la capacidad de crecer en un rango de temperatura que va de los 2°C - 34°C. Por otro lado, se ha reportado que requiere la presencia de NaCl para su crecimiento (3 – 6 %); sin embargo, existen especies en las cuales el requerimiento de NaCl es bajo, lo que les permite desarrollarse en aguas dulces, siendo este el caso de la cepa aislada en el presente trabajo (Yumoto *et al.*, 1999).

Oceanobacillus es un género que agrupa bacterias capaces de tolerar concentraciones altas de sal, tal es el caso de *Oceanobacillus kimchii*, una especie halotolerante que crece en un rango de NaCl de 0-22% (Amoozegar *et al.*, 2014). *Nesterenkonia* es un género que pertenece a la familia *Micrococcaceae*, del filo *Actinobacteria*, comprende pocas especies, muchas de las cuales se han identificado en los últimos cinco años, este género se caracteriza por su habilidad de crecer en ambientes salinos (L. Li *et al.*, 2018; W. Li *et al.*, 2005). El S2 presentó un mayor contenido de sales y CE en comparación del S1, esto delimita la diversidad bacteriana en el S2, por lo que, solo aquellas bacterias que son capaces de adaptarse a concentraciones relativamente altas de sal pueden desarrollarse en este tipo de condiciones.

El género *Bacillus* comprende especies con una diversidad de adaptaciones, dentro de las que destacan la tolerancia a la alcalinidad y salinidad del ambiente, gracias

a esto, se han aislado especies de este género de ambientes salinos (Logan y Vos, 2015).

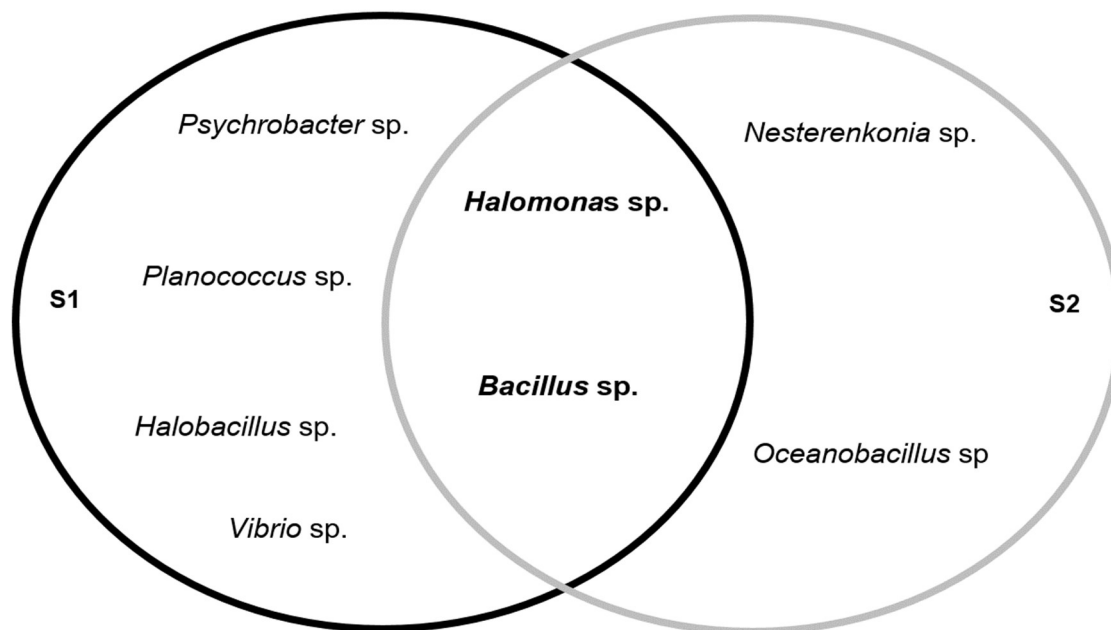


Figura 8. Distribución de los géneros bacterianos en los suelos muestreados del municipio de Villamar, Michoacán.

Los microorganismos que crecen en ambientes salinos se pueden clasificar en función del requerimiento de NaCl para su crecimiento y desarrollo. De acuerdo con Ramírez *et al.* (2006), la clasificación consiste en cuatro grupos que se basan en el porcentaje de NaCl: los halófilos extremos (> 20%), los halófilos moderados (10-20%), los halófilos ligeros o débiles que toleran (0.5-10%) y por último, encontramos a los halotolerantes, que tienen la capacidad de crecer en presencia de NaCl, sin embargo, no es un componente esencial, ya que pueden crecer en ausencia de esta sal.

8.4. Tolerancia a la salinidad

La mayoría de las cepas presentó crecimiento hasta en un 15% de NaCl; sin embargo, el mayor crecimiento se registró del 5-12.5% de concentración de NaCl (Tabla 5). Conforme las concentraciones de NaCl sobrepasaron la concentración de

12.5% se apreció una disminución en el crecimiento y cambios morfológicos coloniales. Algunas cepas presentaron cambio de pigmentación y/o textura, mientras que otras se volvieron más mucosas.

Posiblemente, dentro de los mecanismos que permitieron que las cepas aisladas en este trabajo crecieran en altas concentraciones de NaCl se encuentra el denominado “*salt in*” y “*salt out*”: en el primero, la célula aumenta la concentración de iones K⁺ y Cl⁻ en su interior, lo que permite que todos los componentes intracelulares se adapten a las altas concentraciones de sales; y en el segundo, también conocido como “síntesis de solutos compatibles” la célula produce compuestos que se acumulan en el citoplasma y ayudan a mantener el equilibrio osmótico, este mecanismo es común en bacterias halófilas y no halófilas (Arora y Vanza, 2017).

Tres cepas fueron capaces de crecer hasta en un 25% de NaCl, se identificaron como: *Oceanobacillus Kimchii* (S2C1-1), *Halomonas Boliviensis* (S1C1-8) y *Halobacillus andaensis* (S1C2-14).

O. kimchii es miembro de la familia *Bacillaceae*, la mayoría de las especies del género *Oceanobacillus* se caracterizan por ser organismos haloalcalínicos, y se han encontrado en ambientes salinos o alcalinos (Amoozegar *et al.*, 2014; Hyun *et al.*, 2015).

Las bacterias halofílicas moderadas pueden crecer en un rango de 5-20 % de NaCl, para ello utilizan estrategias de osmoregulación, por ejemplo, *O. kimchii* puede utilizar osmolitos o síntesis de solutos compatibles, tales como, betaínas, polioles, ectoínas para tolerar altas condiciones de salinidad (Hyun *et al.*, 2015). *Halobacillus andaensis* se caracterizó por ser la única cepa que no presentó crecimiento en ausencia de NaCl, por lo que se clasificó como una potencial bacteria halofílica, esto concuerda con Arora y Vanza (2017), donde mencionaron la dependencia de Cl⁻ para su metabolismo celular. Como estrategia de tolerancia a la salinidad, este género sintetiza solutos compatibles que intercambian con el medio. En ambientes intermedios de salinidad se ve favorecida la producción de glutamato y glutamina,

mientras que en ambientes muy salinos predomina la síntesis de ectoína y prolina (Arora y Vanza, 2017).

El 96% de las cepas se clasificaron como halotolerantes, siendo estos microorganismos los que pueden crecer tanto en ausencia, como en presencia de NaCl, incluso pudiendo tolerar altas concentraciones de sal.

Tabla 5. Tolerancia a la salinidad de los aislados

Aislado	Concentración de NaCl (%)										
	0	2.5	5	7.5	10	12.5	15	17.5	20	22.5	25
S2C1-1	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
S2C1-2	X	X	X	X	X	X	X	X			
S2C1-3	X	X	X	X	X	X	X	X			
S2C1-4	X	X	X	X	X	X	X	X			
S2C1-6	X	X	X	X	X	X	X	X			
S1C1-7	X	X	X	X	X	X	X	X			
S1C1-8	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
S1C2-9	X	X	X	X	X						
S1C2-10	X	X	X	X	X						
S1C2-11	X	X	X	X	X	X	X				
S1C2-12	X	X	X	X	X	X	X				
S1C2-13	X	X	X	X	X	X	X				
S1C2-14		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
S1C2-15	X	X	X	X	X						
S1C2-16	X	X	X	X	X	X					
S1C1-17	X	X	X	X	X	X	X	X			
S1C1-18	X	X	X	X	X	X	X	X			
S2C2-19	X	X	X	X	X	X	X				
S2C3-20	X	X	X	X	X						
S1C1-21	X	X	X	X	X	X					
S1C2-22	X	X	X	X	X	X	X				
S1C2-23	X	X	X	X	X	X					
S2C2-24	X	X	X	X	X	X					
S2C2-25	-	X	X	X	X	X	X				

X: crecimiento -: poco crecimiento.

8.5. Caracterización de la promoción de crecimiento vegetal de los aislados

8.5.1. Producción de sideróforos

Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular que tienen la capacidad de quelar metales. El complejo hierro-sideróforo lo reconocen las plantas; por lo tanto, los sideróforos pueden incrementar la disponibilidad de este elemento para las plantas. Algunos autores resaltan la importancia de la relación entre la síntesis microbiana de sideróforos y la capacidad de fijación de nitrógeno, debido a que el hierro juega un papel como cofactor de la nitrogenasa (Alexander *et al.*, 2019; Szyma *et al.*, 2016).

Por otro lado, se ha reportado que la producción de sideróforos influye en la solubilización de fosfatos metálicos, sin embargo, no se ha establecido una relación directa entre estas dos habilidades (Prabhu *et al.*, 2019).

En los suelos salinos, la solubilidad de elementos traza como el Fe se disminuye. Estudios sugieren que la salinidad se correlaciona de manera negativa con la biodisponibilidad de Fe para las plantas. Diversos reportes han resaltado la importancia de los sideróforos microbianos en la promoción del crecimiento vegetal bajo condiciones de estrés salino (Ferreira *et al.*, 2019; Sadeghi y Karimi, 2012).

Algunas cepas tuvieron la capacidad de producir sideróforos a las cuatro concentraciones de sal evaluadas; sin embargo, presentaron una mayor producción al 3% de NaCl (Tabla 6), esto se puede atribuir a un mayor crecimiento bacteriano. Los géneros que presentaron esta capacidad fueron: *Oceanobacillus*, *Halomonas*, *Planococcus*, *Psychrobacter* y *Bacillus*. Sin embargo, las cepas que presentaron mayor producción fueron *Planococcus matriensis* y *Vivrio rumoiensis* con 3.33 y 3.50 respectivamente a 3% de NaCl.

Psychrobacter sp. se ha reportado como auxiliar en la fitorremediación de suelos contaminados por metales mediante la producción de sideróforos y ácidos orgánicos. Algunos de los metales que puede quelar este género son Zn, Ni y Fe (Prabhu *et al.*, 2019).

Sadeghi y Karimi (2012) obtuvieron índices de producción de sideróforos de 1.0-1.6 para *Streptomyces*, presentándose la mayor producción a 1.75% de NaCl (300 Mm), esto concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo, donde se observó un incremento en la producción a una concentración del 3% de NaCl. Por otro lado, en estudios previos se ha demostrado la capacidad de producción de sideróforos de los géneros *Halomonas* y *Bacillus* bajo condiciones de estrés salino (Ferreira *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2018).

Las bacterias halotolerantes promotoras de crecimiento vegetal capaces de producir sideróforos en condiciones de estrés salino han recibido gran atención, debido a que la quelación de Fe se modula principalmente por el pH presente en el medio. La gran cantidad de carbonatos presentes en suelos salinos inactiva el Fe soluble. En suelos con pH mayor a 6.5 se produce la oxidación del óxido ferroso (soluble) a óxido férrico (insoluble) (Kumar *et al.*, 2020).

Tabla 6. Índices de producción de sideróforos en medio SP con cromoazuroI

Cepa	Concentración de NaCl (%)			
	0	3	5	10
S2C1-1	2.16 ^a ± 0.29	2.00 ^{ab} ± 0.00	1.66 ^b ± 0.14	0.00 ^c
S2C1-2	2.26 ^a ± 0.35	1.19 ^b ± 0.00	1.20 ^b ± 0.00	1.15 ^b ± 0.00
S2C1-3	1.27 ^b ± 0.23	1.15 ^b ± 0.00	1.15 ^b ± 0.00	2.07 ^a ± 0.12
S2C1-4	1.21 ^b ± 0.07	2.05 ^a ± 0.08	0.00 ^c	0.00 ^c
S2C1-6	1.15 ^b ± 0.08	2.5 ^a ± 0.00	0.00 ^c	0.00 ^c
S1C1-7	1.20 ^c ± 0.03	3.00 ^a ± 0.00	2.16 ^b ± 0.28	1.33 ^c ± 0.00
S1C1-8	1.18 ^b ± 0.05	1.50 ^a ± 0.00	1.50 ^a ± 0.00	1.14 ^b ± 0.00
S1C2-9	2.00 ^a ± 0.00	1.50 ^b ± 0.00	1.66 ^b ± 0.00	0.00 ^c
S1C2-11	1.50 ^b ± 0.00	2.55 ^a ± 0.192	1.55 ^b ± 0.08	0.00 ^c
S1C2-12	2.22 ^a ± 0.48	2.61 ^a ± 0.20	2.50 ^a ± 0.00	0.00 ^b
S1C2-13	2.33 ^b ± 0.14	3.33 ^a ± 0.14	0.00 ^c	0.00 ^c
S1C2-15	1.97 ^{ab} ± 0.29	2.36 ^a ± 0.05	1.57 ^b ± 0.05	0.00 ^c
S1C2-16	1.10 ^c ± 0.02	1.35 ^b ± 0.10	2.00 ^a ± 0.00	1.33 ^b ± 0.00
S1C1-17	1.09 ^c ± 0.00	1.21 ^c ± 0.02	2.06 ^a ± 0.11	1.66 ^b ± 0.00
S1C1-18	1.30 ^b ± 0.04	1.50 ^a ± 0.00	1.11 ^c ± 0.00	0.00 ^d
S2C2-19	1.10 ^b ± 0.08	1.30 ^a ± 0.00	0.00 ^c	0.00 ^c
S2C3-20	1.83 ^a ± 0.02	1.50 ^a ± 0.00	0.00 ^b	0.00 ^b
S1C1-21	1.91 ^a ± 0.14	1.65 ^a ± 0.13	0.00 ^b	0.00 ^b
S1C2-22	2.44 ^a ± 0.19	2.66 ^a ± 0.57	0.00 ^b	0.00 ^b
S1C2-23	2.31 ^b ± 0.33	3.50 ^a ± 0.00	0.00 ^c	0.00 ^c
S2C2-25	2.33 ^a ± 0.28	2.33 ^a ± 0.00	0.00 ^b	0.00 ^b

Los valores representan la media de tres repeticiones más menos su desviación estándar. En cada columna letras diferentes representan diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

La presencia de un halo de coloración alrededor de la colonia bacteriana, indica la producción de sideróforos (Figura 9). Es importante mencionar que algunos halos de coloración presentaron fluorescencia al ser iluminados con una lámpara UV, lo anterior se puede relacionar con la producción de diferentes tipos de sideróforos.

Sin embargo, basándose en la coloración que presentaron los diferentes aislados, se puede deducir la producción de dos tipos de sideróforos; carboxilatos e hidroxamato, los cuales, de acuerdo con Pérez-miranda *et al.* (2007) se caracterizan por tener tonalidades naranjas y amarillas. La utilización O-CAS nos ayudó a identificar de manera preliminar los aislados capaces de producir sideróforos.

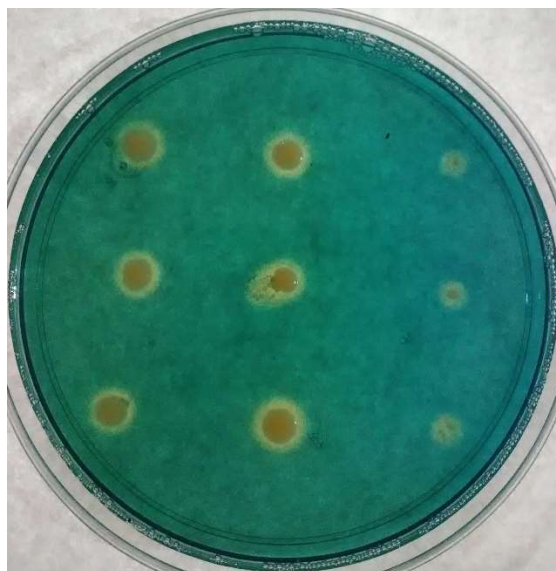


Figura 9. *Halomonas sp.* en medio SP adicionado con cromoazuril para la determinación de producción de sideróforos

8.5.2. Solubilización de fósforo

El fósforo (P) es uno de los elementos más importantes en la nutrición de las plantas, se requiere en grandes cantidades, por lo tanto, una deficiencia de este elemento limita el crecimiento vegetal. A pesar de que muchos suelos tienen porcentajes altos de P total, se estima que en suelos salinos y calcáreos (suelos predominantemente alcalinos: pH > 7.4) alrededor del 60-70% del P que se aplica al suelo se convierte en formas no biodisponibles, esto debido a su precipitación con los iones de calcio (Ca^{2+}) y de magnesio (Mg^{2+}) (Jiang *et al.*, 2018b). La salinidad de los suelos limita la toma de fósforo del suelo debido a procesos de sorción, y a que facilita la acumulación de este en formas insolubles (Soni, Rokad, & Sharma, 2013).

En el caso de la zona de estudio del presente trabajo, los suelos se caracterizan por presentar un pH alcalino, que oscila de 7.8 a 8.5, como consecuencia de las altas concentraciones de sales, dentro de las que destacan sales de calcio, magnesio y sodio

Debido a este problema, Lastiri-hernández et al., (2019) utilizaron a *B. monnieri* como planta extractora de sales. En su estudio realizado en campo, encontraron que esta planta al estar expuesta a altos niveles de salinidad, aumentó su concentración de Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^+ en la parte aérea, lo que ayuda a disminuir la conversión del P soluble a formas insolubles. El uso de esta planta extractora de sal y los microorganismos asociados a sus raíces se postulan como una alternativa ecológica para el manejo y recuperación de suelos salinos.

Los géneros capaces de solubilizar fosfatos fueron *Bacillus* y *Planococcus*, siendo el género *Bacillus* el que tuvo la capacidad de solubilizar fósforo al 0 y 3% de NaCl, y donde se observaron diferencias significativas (Figura 10). Estas condiciones de salinidad provocan un aumento de pH en el medio, neutralizando los ácidos producidos por los aislados. Estos resultados concuerdan con otros estudios previos (Jiang et al., 2018b; Xiao et al., 2011), donde reportan que en concentraciones mayores a 0.4 M (>23.2 g/L) se disminuye la actividad solubilizadora de las bacterias.

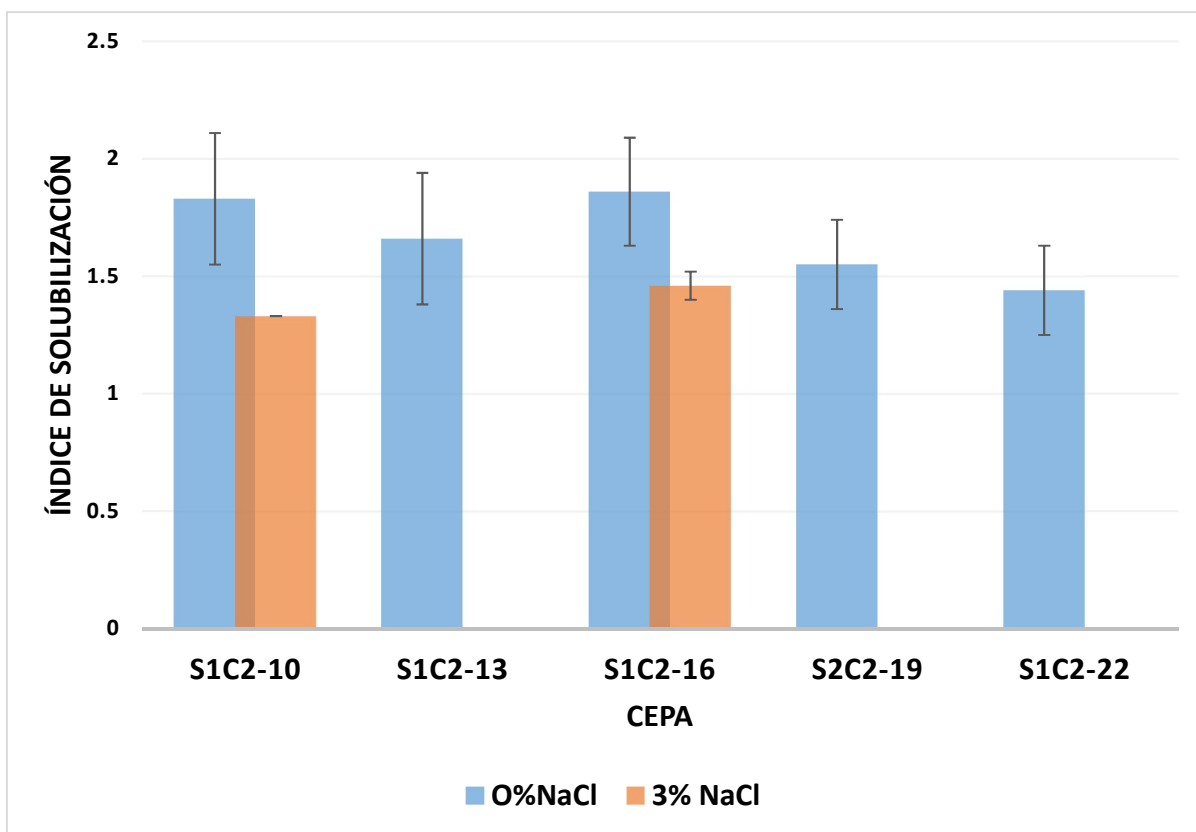


Figura 10. Índices de solubilización de fosfatos evaluados en medio NBRIP

Los resultados que se obtuvieron en este trabajo concuerdan con los reportados por (Jiang *et al.*, 2018a), donde mencionan que el género *Bacillus* se considera como uno de los solubilizadores de fosfatos más comunes, seguido de *Pseudomonas*. Dentro de los microorganismos registrados en la literatura con mayor potencial para solubilizar fosfatos se encuentra *Bacillus sp.*, *Pseudomonas* y *Rizhobium* (Restrepo-Franco *et al.*, 2015; Soni *et al.*, 2013). El género *Bacillus* también ha mostrado capacidad solubilizadora en suelos salinos (Kumar *et al.*, 2020).

Los microorganismos que son capaces de solubilizar fosfatos son un grupo de PGPR que se destacan por aumentar la biodisponibilidad de los niveles de fósforo en el suelo. Estas bacterias utilizan tanto fuentes orgánicas como inorgánicas de fósforo; para ello utilizan diferentes mecanismos (Reyes *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2011) .

Las bacterias utilizan diversos mecanismos para la solubilización de fosfatos, en donde convierten las formas insolubles a formas solubles como HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- .

Dentro de estos mecanismos se encuentran la quelación, reacciones de intercambio y la formación de sustancias poliméricas (Soni *et al.*, 2013); sin embargo, uno de los principales mecanismos de solubilización de fosfatos es mediante la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular. Estos ácidos funcionan como acidificadores de las bases conjugadas de fosfatos, lo que se traduce en una mayor solubilización como resultado de la disminución de pH en el suelo (Jiang *et al.*, 2018).

Se ha reportado que los microorganismos solubilizadores de fosfatos producen ácidos como el ácido acético, ácido fórmico; láctico, glucónico, glicónico; oxálico, succínico; málico; cítrico, entre otros; Dentro de la gran variedad de ácidos producidos por las bacterias, el ácido glucónico ha sido considerado como el ácido clave en la solubilización de fosfatos (Prabhu *et al.*, 2019), ya que este no solo libera fosfatos mediante la acidificación del medio, sino que además forma compuestos insolubles con el Ca^{2+} mediante quelación (Saeid *et al.*, 2018).

Estos estudios son de gran importancia para la actividad agrícola, ya que tanto microorganismos halófilos o halotolerantes que tiene la habilidad de solubilizar fosfatos bajo estrés salino pueden incrementar significativamente el rendimiento de los cultivos (Jiang *et al.*, 2018b), por medio de la movilización, conversión y aumento de la biodisponibilidad de este elemento (Prabhu *et al.*, 2019).

8.5.3. Solubilización de fitatos

Los fitatos, o también conocidos como fosfatos orgánicos, son derivados de la biomasa del suelo (plantas, microorganismos, etc.). Las plantas y microorganismos son capaces de obtener fósforo a partir de fuentes orgánicas existentes en el suelo. Esto incluye la expresión de enzimas como la fosfatasa y fitasa que permite liberar fósforo a partir de fosfatos orgánicos: fitatos (Shulse *et al.*, 2019). El mecanismo por el cual las bacterias son capaces de obtener fósforo a partir de fuentes orgánicas está modulado por cuatro grupos de enzimas: fosfatasa no específica, fitasas, fosfonatasas y C-P liasas (Jorquera *et al.*, 2008).

Las cepas mostraron una tendencia de aumentar su capacidad solubilizadora a 3 y 5% de NaCl (Tabla 7, Figura 11). Siendo a 3% de NaCl donde se obtuvieron los mayores índices de solubilización por *Psychrobacter pulmonis* y *alimentarius*. Estos aislados fueron capaces de mostrar actividad incluso al 10% de NaCl.

Tabla 7. Índices de solubilización de fitatos a diferentes concentraciones de NaCl

Cepa	Concentración de NaCl (%)			
	0	3	5	10
S2C1-1	0.00 ^b	1.35 ^a ± 0.04	1.43 ^a ± 0.05	0.00 ^b
S2C1-2	0.00 ^c	1.29 ^a ± 0.07	1.12 ^b ± 0.00	0.00 ^c
S2C1-3	0.00 ^b	0.00 ^b	1.12 ^a ± 0.00	0.00 ^b
S2C1-6	0.00 ^b	0.00 ^b	1.25 ^a ± 0.00	0.00 ^b
S1C1-7	0.00 ^b	1.50 ^a ± 0.00	1.97 ^a ± 0.40	0.00 ^b
S1C1-8	1.52 ^b ± 0.20	1.40 ^b ± 0.00	1.85 ^a ± 0.00	1.40 ^b ± 0.00
S1C2-9	2.44 ^b ± 0.09	5.33 ^a ± 1.15	2.00 ^b ± 0.00	1.55 ^b ± 0.38
S1C2-10	1.23 ^b ± 0.02	1.43 ^a ± 0.06	0.00 ^c	0.00 ^c
S1C2-11	3.22 ^b ± 0.19	4.33 ^a ± 0.28	1.66 ^c ± 0.00	2.00 ^c ± 0.00
S1C2-14	0.00	0.00	0.00	2.00 ^a ± 0.00
S1C2-15	2.68 ^{bc} ± 0.57	4.83 ^a ± 0.28	3.11 ^b ± 0.38	2.00 ^c ± 0.00
S1C2-16	0.00	1.26 ^a ± 0.00	0.00	0.00
S1C1-17	0.00	0.00	1.4 ^a ± 0.00	0.00
S1C1-18	0.00	2.00 ^a ± 0.00	0.00	0.00
S2C2-24	0.00	0.00	2.91 ^a ± 0.14	0.00

Los valores representan la media de tres repeticiones más menos su desviación estándar. En cada columna letras diferentes representan diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Por otro lado, la cepa S1C2-14 (*Halobacillus andaensis*) solo presentó capacidad de solubilizar fitatos a 10% de NaCl, este se puede atribuir a que en concentraciones más bajas de sal tuvo un menor desarrollo.

Halobacillus andaiensis mostró únicamente actividad al 10% de NaCl, siendo el segundo aislado con mayor índice de producción (3.96), superado por *Psychrobacter pulmonis* con 5.00 al 3% de NaCl. *Halomonas boliviensis*, *Bacillus zanthoxyli* y *Vibrio rumoiensis* también fueron capaces de solubilizar fitatos.

Halobacillus es el primer género reportado como dependiente de cloruro, por lo que muchas funciones celulares dependen del Cl^- para su máxima actividad (Arora y Vanza, 2017).

Estudios sugieren que, como respuesta ante la presencia de un nutriente limitante, ciertos microorganismos sintetizan fitasas, que les permite mineralizar el P presente en compuestos orgánicos, por otro lado, las características del suelo rizosférico influyen en la capacidad de utilizar diferentes formas de P (Jorquera *et al.*, 2008), no obstante, Reyes *et al.* (2006) sugiere que los exudados de las plantas también determinan el potencial solubilizador de P de las bacterias rizosféricas.

Dentro de la gran diversidad PGPR, las bacterias solubilizadoras de fitatos han sido de gran interés debido a su capacidad para liberar P de fuentes orgánicas y en algunas ocasiones inorgánicas, su potencial ha sido utilizado para diversas aplicaciones biotecnológicas, donde destaca la elaboración inoculantes agrícolas (Jorquera *et al.*, 2008).

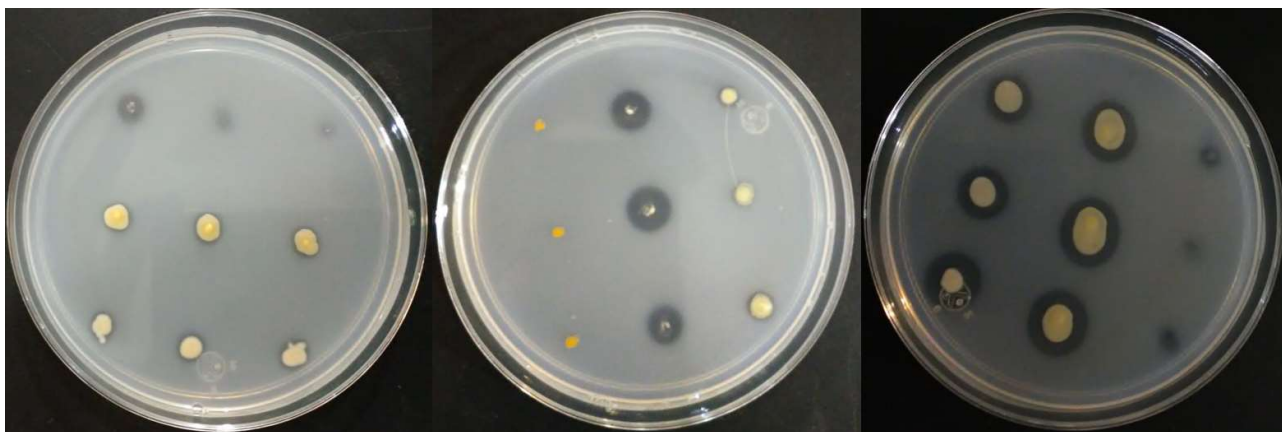


Figura 11. Placas Petri con medio para solubilización de fitatos a diferentes concentraciones de NaCl, de izquierda a derecha (0 %, 3 % y 5 %)

8.5.4. Solubilización de carbonatos

Siete cepas fueron capaces de solubilizar carbonatos a diferentes concentraciones de NaCl. De acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) se observaron diferencias significativas en la solubilización de carbonatos en las diferentes concentraciones de sal (Figura 12), la fuente utilizada fue el carbonato de calcio. Las cepas *Psychrobacter alimentarius* (S1C2-11), *Bacillus Zanthoxyli* (S1C2-16) y *Vibrio rumoiensis* (S2C2-24), mostraron una disminución de su capacidad solubilizadora al aumentar la concentración de NaCl, la mayor actividad se presentó en ausencia de sal. Por otro lado, *Halomonas boliviensis* (S1C2-8) y *Psychrobacter pulmonis* (S1C2-9) mantuvieron una actividad estable hasta un 5% de NaCl, en concentraciones mayores su actividad fue nula.

La cepa S1C2-15 (*Psychrobacter pulmonis*) aumentó su actividad en NaCl al 3%; sin embargo, en concentraciones mayores se observó un decremento de esta.

Halobacillus andaensis no fue capaz de solubilizar carbonatos en concentraciones menores al 10% de NaCl. Esta especie es reportada como una bacteria halófila moderada, cuyo requerimiento de sal para su crecimiento son de 3-15% de NaCl, con un óptimo de 8% (Wang *et al.*, 2015). La nula actividad de esta bacteria en tres de las concentraciones evaluadas se debe a su naturaleza halófila, por lo que requiere ciertas concentraciones de sal para exponer su potencial.

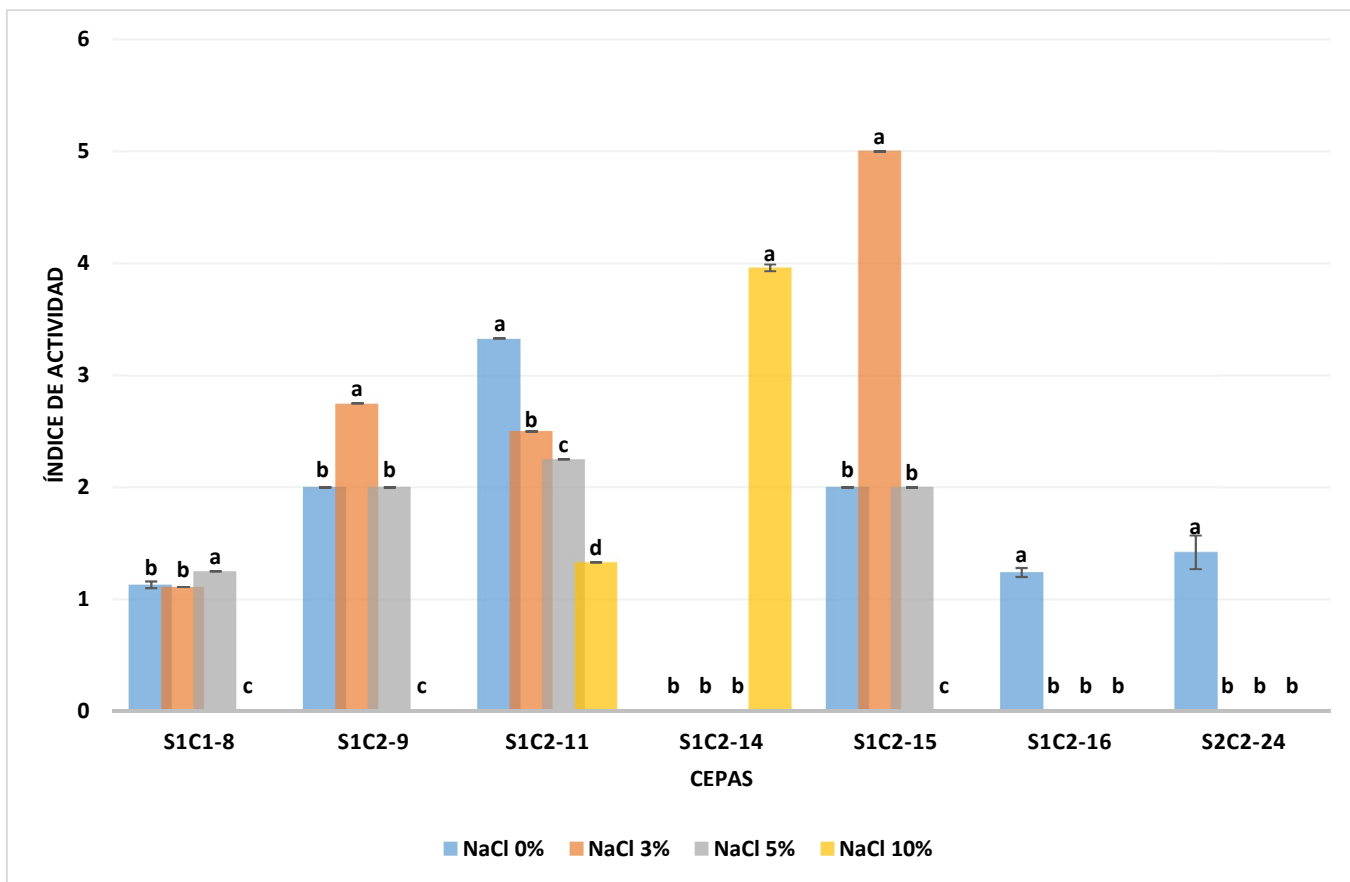


Figura 12. Índices de solubilización de carbonatos a diferentes concentraciones de NaCl

La capacidad de las bacterias para solubilizar carbonatos en hábitats naturales, como en pruebas *in vitro* ha sido descrita por diversos autores; Sin embargo, el papel y los mecanismos mediante los cuales las bacterias participan en la formación de carbonatos no es bien conocida.

El contenido de sales presentes en el medio, es uno de los factores más importantes que influyen en la biodisponibilidad de carbonatos. Las bacterias halófilas constituyen un componente biológico importante en la formación y biodisponibilidad de carbonatos en el suelo, debido a que estas pueden crecer en un rango amplio de estrés osmótico originado por la salinidad (Rivadeneira *et al.*, 2004).

8.5.5. Solubilización de zinc

El halo translúcido alrededor de la colonia bacteriana indica la solubilización de zinc (Figura 13).

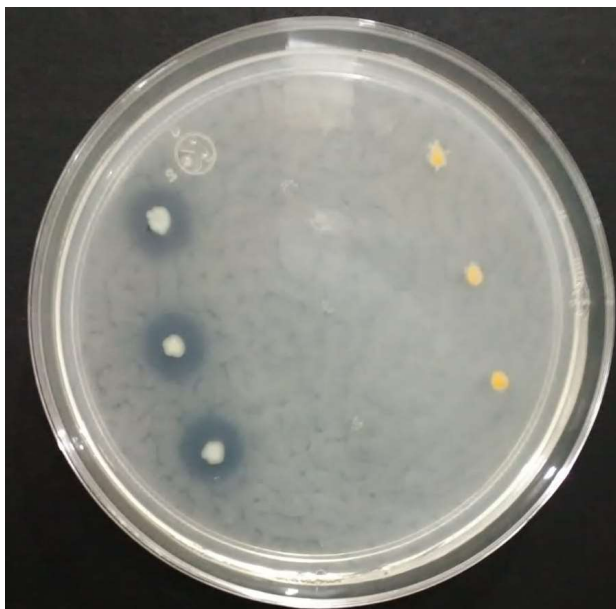


Figura 13. Medio NBRIP adicionado con ZnO para la determinación de solubilización de zinc (*Bacillus pumilus* +)

Bacillus pumilus y *Bacillus zanthoxyli* fueron las dos especies con la capacidad de solubilizar zinc, siendo el aislado 19 el que presentó el mayor índice de solubilización (Figura 14). No se observó solubilización de zinc a partir de 3% de NaCl. En este medio (NBRIP-modificado) se observó menos crecimiento colonial, lo que se puede atribuir como una de las causas que impidió la solubilización de zinc, posiblemente requiriendo mayor tiempo de experimentación

Kamran et al., (2017) obtuvieron un índice de solubilización promedio de 1.8 para *Bacillus pumilus*, *Rhizobium sp*, y *Enterobacter cloacae*. Saravanan et al. (2004) obtuvieron índices de producción en un rango de 1.28-1.83 para *Pseudomonas sp* y *Bacillus sp*. en ausencia de NaCl.

El zinc es un elemento esencial para las plantas, específicamente, porque está involucrado en el metabolismo de carbohidratos y auxinas y actúa como un importante antioxidante. La deficiencia de zinc causa un crecimiento retardado,

clorosis, susceptibilidad a infecciones por hongos, entre otros problemas. (Kamran *et al.*, 2017).

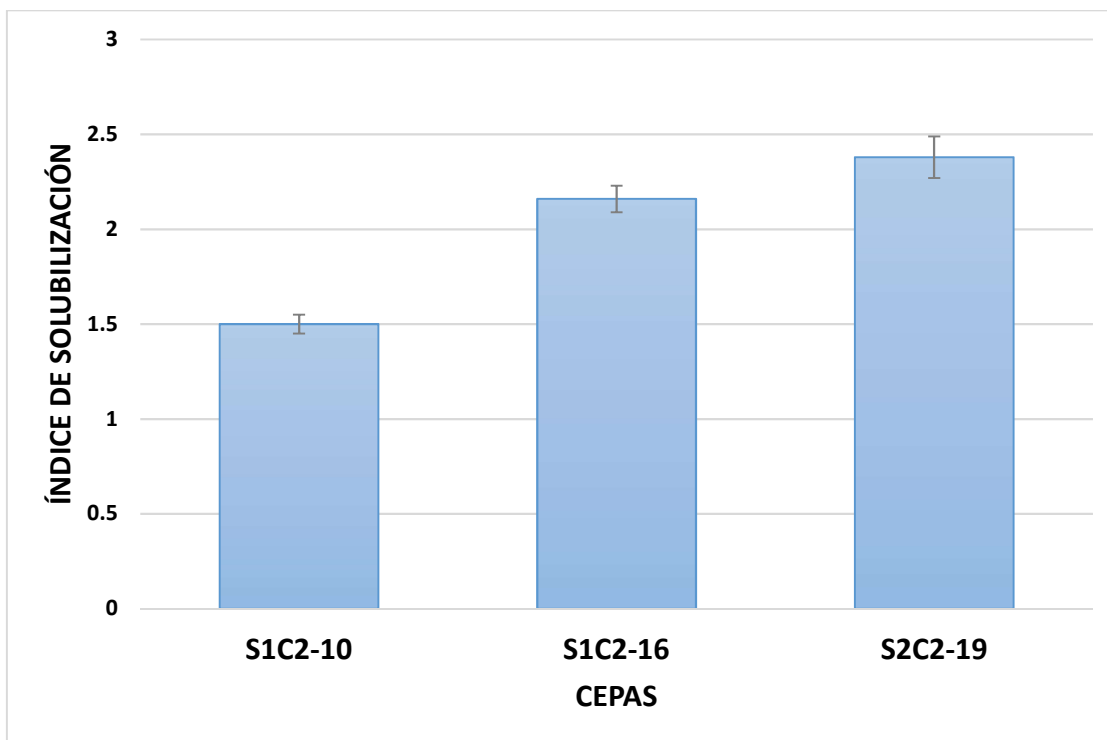


Figura 14. Índices de solubilización de zinc

Los microorganismos benéficos como las PGPR que tienen la capacidad de estimular el metabolismo de carbohidratos, mejoran la tasa de crecimiento y permiten una óptima translocación de la biomasa, esto mediante el aumento de la biodisponibilidad de zinc (Ilangumaran y Smith, 2017). Se conocen varios mecanismos por los cuales los microorganismos solubilizadores de zinc convierten las formas insolubles en solubles de este elemento, uno de ellos es mediante la acidificación del medio. Estos microorganismos producen ácidos orgánicos que son liberados en el suelo circundante, y que tienen la capacidad de secuestrar el zinc al mismo tiempo que disminuyen el pH del suelo. Otro mecanismo que posiblemente está involucrado en la solubilización de zinc es la producción de sideróforos (Kamran *et al.*, 2017) ya que algunos estudios demuestran que estos compuestos quelantes son capaces de secuestrar metales como zinc, níquel y fierro (Prabhu *et al.*, 2019).

8.5.6. Producción de ácido 3-indol acético

En la Figura 15 se observa la revelación de la prueba de producción de AIA. Los tubos contienen el medio JP y la solución reveladora de Salkowski con un tiempo de incubación de 30 minutos. La presencia de color rojo en los tubos se considera como indicador positivo de producción de AIA. Las diferentes tonalidades de rojo representan la concentración de AIA producido por las cepas. Se observa que los blancos presentan un color amarillo, indicando la ausencia de AIA.

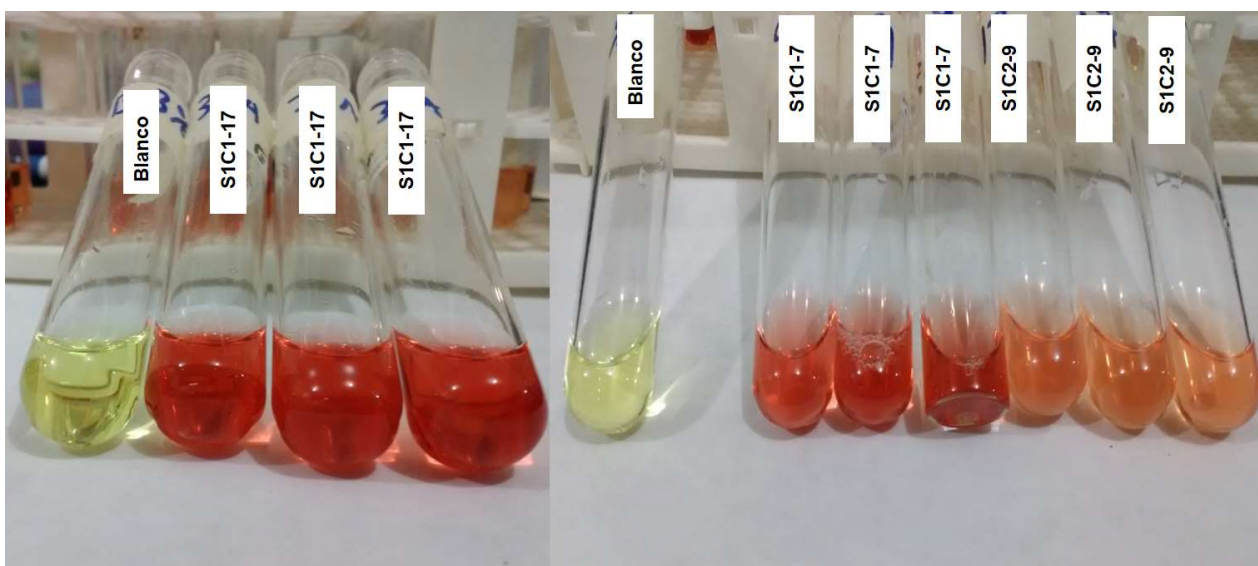


Figura 15. Revelación de la prueba para la determinación de AIA, color amarillo (control), color rojo-naranja (prueba positiva)

El 37.5 % de las cepas (9 cepas) tuvo la capacidad de producir AIA, a las 72 h, siendo este el tiempo en el que se obtuvo la mayor producción de esta fitohormona. De acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) se observaron diferencias significativas en la producción de AIA en las diferentes concentraciones de sal (Figura 16).

Todas las cepas que produjeron ácido 3-indol acético aumentaron su producción en presencia de NaCl, a excepción de *Bacillus Zanthoxyli* (SIC2-16). Este comportamiento se relaciona con la naturaleza de las bacterias, ya que en ausencia

de NaCl se observó muy poco crecimiento. Los géneros que fueron positivos para esta prueba fueron: *Halomonas*, *Psychrobacter* y *Bacillus*.

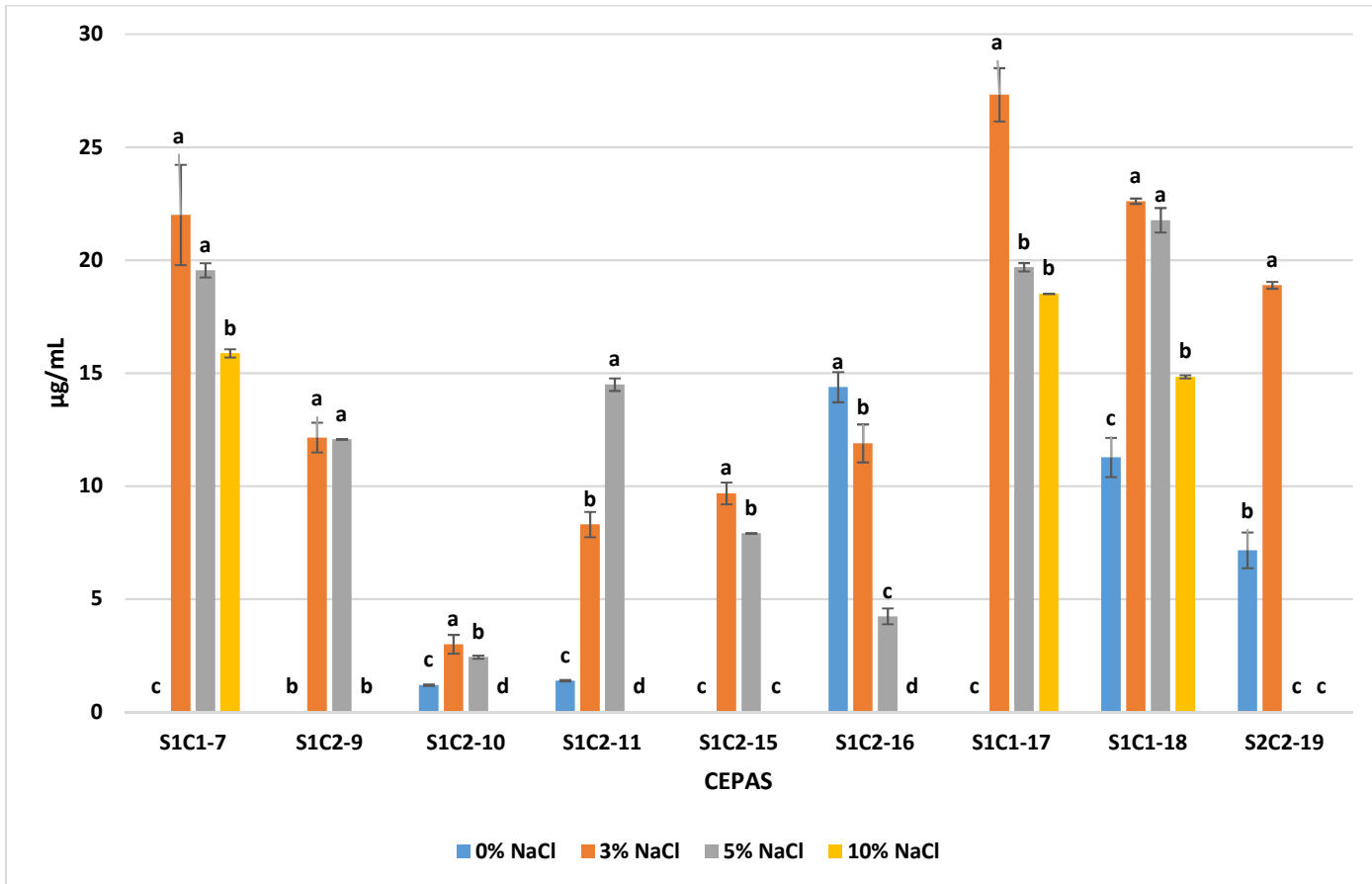


Figura 16. Producción de AIA de las cepas en diferentes concentraciones de NaCl a las 72 h.

El ácido indol acético es una forma activa de auxina (hormona vegetal) y un importante regulador del crecimiento vegetal. El sistema radicular es activado por el AIA, lo que está relacionado con el acceso a los nutrientes del suelo (Numan *et al.*, 2018). El AIA se considera como la principal auxina de las plantas, ya que controla diversos procesos fisiológicos como la elongación y división celular (Vega-Celedón *et al.*, 2016). Por otro lado, en estudios previos se ha encontrado que la síntesis de AIA está transcripcionalmente relacionada con la elevación de los niveles de etileno en las plantas vía expresión gen ACC sintetasa, a su vez, el etileno incrementa la tolerancia a la salinidad de las plantas, por lo que se ha propuesto que una

apropiada producción de AIA podría ser utilizado como aliviador del estrés salino (Kumar *et al.*, 2020).

Sadeghi y Karimi (2012) obtuvieron con *Streptomyces* un aumento en la producción de AIA a una mayor concentración de NaCl: 2.4uL/mL en 0mM NaCl a 4.7 uL/mL en 300mM. Por otro lado, Kamran *et al.*, (2017) obtuvieron valores de 12.125 ug/ml para *Enterobacter cloacae* sin NaCl, sin embargo, *Bacillus pumilus* no presentó producción de AIA.

En este trabajo se observó un efecto positivo en la producción de AIA al aumentar la concentración de sal, esto puede estar relacionado con el aumento en el crecimiento bacteriano a mayor concentración de sal.

Es de gran importancia estudiar los microorganismos que pueden llevar a cabo todas sus funciones metabólicas bajo estrés salino, ya que en la mayoría se ve reducida la tasa de respiración, biomasa y actividad microbiana (Szyma *et al.*, 2016).

8.5.7. Producción de enzimas hidrolíticas

Los géneros que presentaron capacidad de hidrolizar proteína en presencia de NaCl al 10% fueron: *Psychrobacter*, *Bacillus*, *Planococcus* y *Halobacillus*. De acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) se observaron diferencias significativas en la producción de proteasas entre las diferentes cepas (Figura 17 y 18), donde *Planococcus rifietoensis* se caracterizó por presentar el mayor índice de producción.

Del total de las cepas que se obtuvieron en este trabajo, el 40 % presentó actividad proteolítica, destacaron los géneros *Halobacillus* y *Planococcus*. Se ha sugerido que la producción de enzimas proteolíticas puede fungir como un mecanismo antimicrobiano, lo que puede estar relacionado con el sistema de defensa contra patógenos de las plantas (Moustaine *et al.*, 2017; Yuttavanichakul *et al.*, 2012). Por otro lado, se ha observado que las bacterias capaces de producir enzimas proteolíticas, tienen una mayor ventaja de resistir estrés ambiental, sea químico o mecánico (Moustaine *et al.*, 2017).

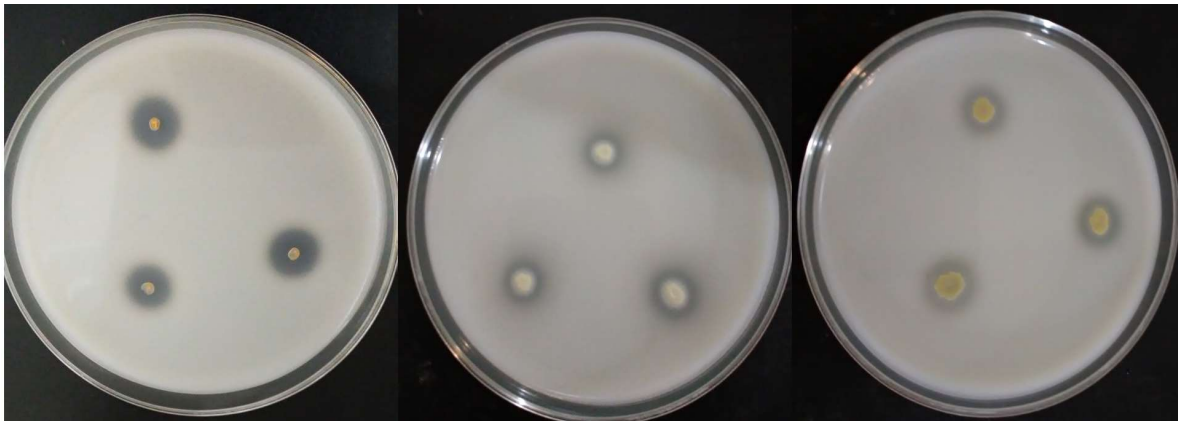


Figura 17. Medio Skim milk (10% de NaCl) para la determinación de producción de proteasas. De izquierda a derecha (*Planococcus*, *Bacillus*, *Halobacillus*)

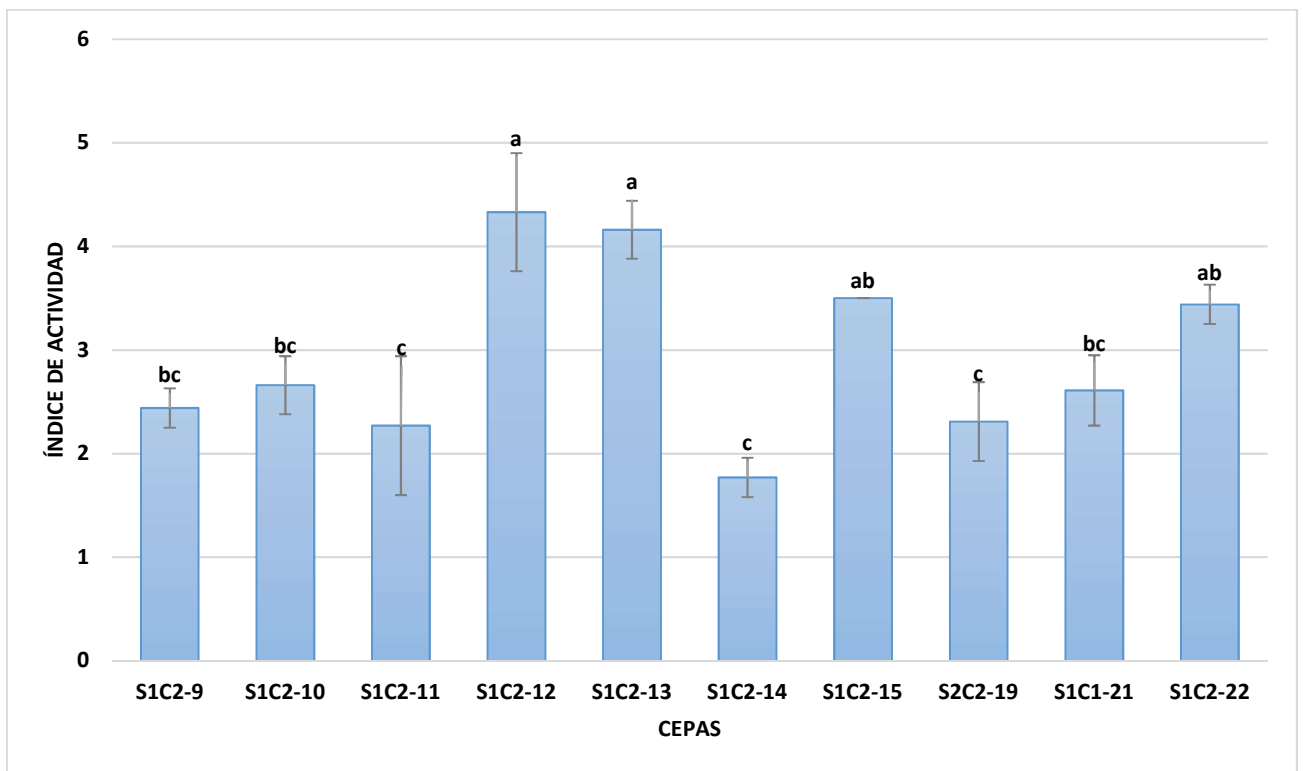


Figura 18. Índices de actividad enzimática proteolítica en medio Skim milk al 10% de NaCl

Respecto a la capacidad de producción de amilasas, solo el 16% del total de las cepas resultaron positivas en esta prueba. De acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) se observaron diferencias significativas en la producción de amilasas entre los diferentes aislados (Figura 19 y 20). *Planococcus matriensis* y *halobacillus andaiensis* tuvieron también la capacidad de solubilizar el almidón. *Bacillus zanthoxyli* solo presentó actividad aminolítica. Mukhtar et al., (2019) demostraron el potencial enzimático bajo condiciones salinas de *Bacillus* y *Halobacillus*, aislados de plantas halófitas en Pakistán y lo relacionaron de manera indirecta como un mecanismo de promoción de crecimiento vegetal.

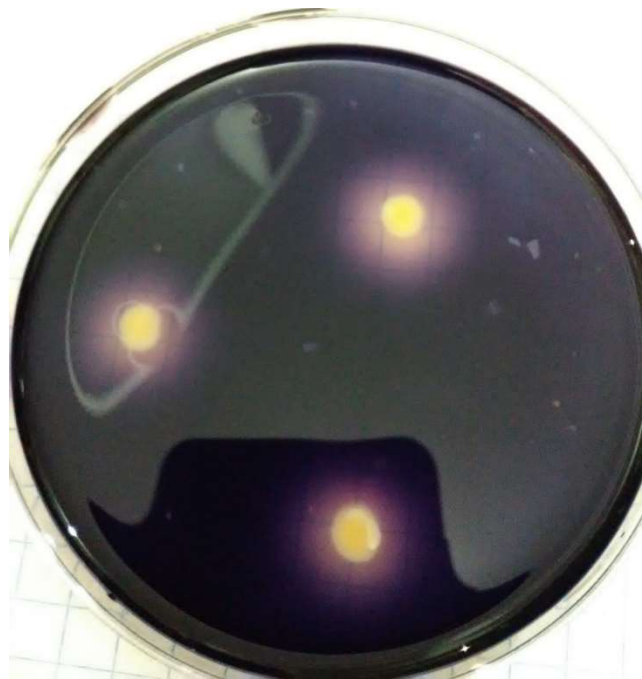


Figura 19. Revelación de la prueba de producción de amilasas en medio enriquecido con almidón y NaCl al 10%

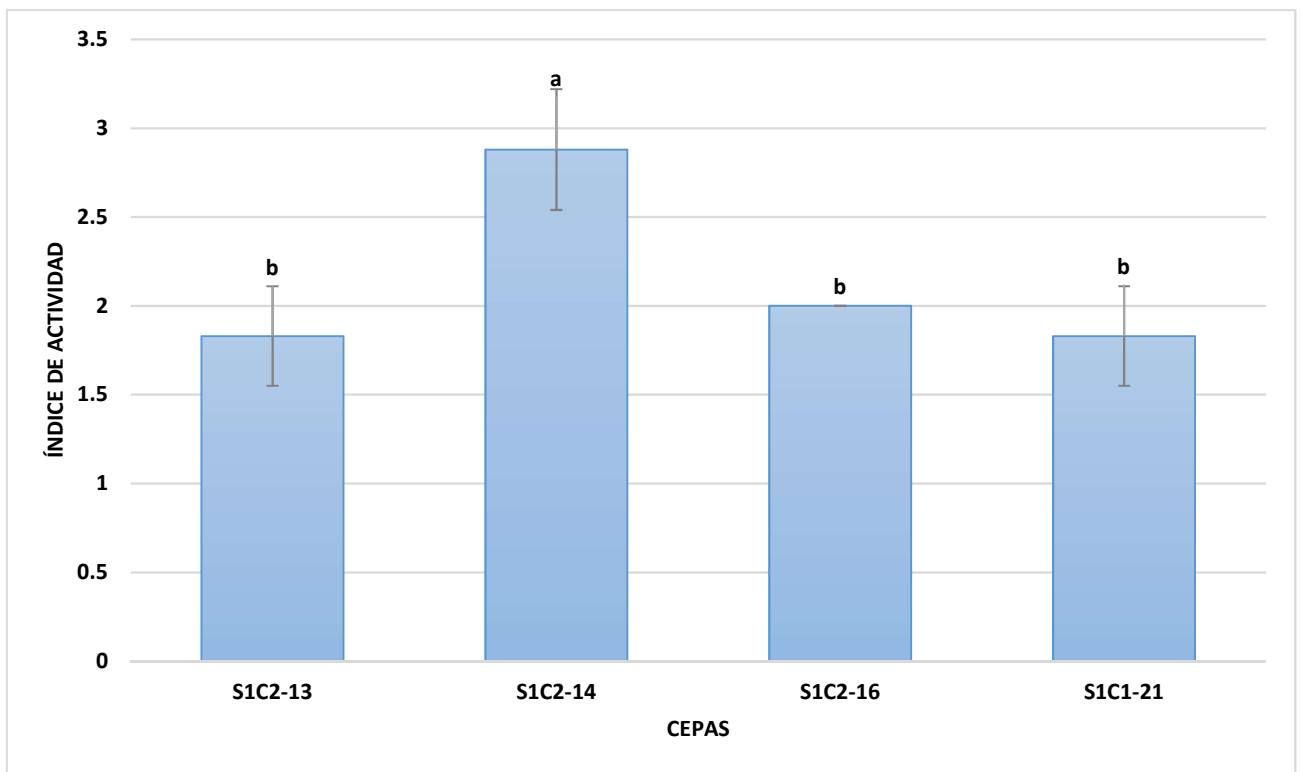


Figura 20. Índices de actividad enzimática aminolítica en medio almidón con NaCl al 10%.

Las bacterias halófilas o halotolerantes proveen una fuente potencial de nobles enzimas que pueden trabajar bajo condiciones de estrés salino. Ciertas de estas enzimas han sido utilizadas para biorremediar suelos salinos. La capacidad proteolítica y aminolítica bacteriana se ha considerado como un mecanismo indirecto de promoción de crecimiento vegetal (Mukhtar *et al.*, 2019). Por otra parte, las amilasas producidas por las bacterias cumplen un papel importante en los ciclos biogeoquímicos (Amoozegar *et al.*, 2003).

8.5.8. Producción de sustancias poliméricas extracelulares

En el presente trabajo, los géneros que tuvieron la capacidad de producir EPS fueron: *Oceanobacillus*, *Halomonas*, *Planococcus*, *Halobacillus*, *Psychrobacter* y *Bacillus* (Tabla 8). Al aumentar la concentración de sal al 10% la actividad de varias cepas se vio afectada negativamente; sin embargo, *Oceanobacillus Kimchii*,

Halomonas lutescens, *Halomonas boliviensis*, y *Halobacillus andaiensis* fueron capaces de producir EPS en NaCl al 10%. *Planococcus rifietoensis* solo produjo EPS en ausencia de sal, es importante destacar que en un estudio realizado por Qurashi y Sabri (2012) encontraron que *Planococcus rifietoensis*, al igual que *Halomonas variabilis* mostraron un incremento significativo en la agregación del suelo. Numerosas especies del género *Bacillus* producen EPS que retienen moléculas de agua, lo que ayuda a las plantas a resistir el estrés osmótico (W. Xiao *et al.*, 2020).

Las sustancias poliméricas extracelulares (EPS, por sus siglas en inglés) se producen en gran parte por microorganismos en respuesta al estrés. Se ha reportado que la producción de exopolisacáridos tiene un efecto indirecto en la solubilización de fosfatos, debido a que tienen la capacidad de unirse con metales en el suelo. De esta manera, pueden influir en la solubilización de fosfatos metálicos (Prabhu *et al.*, 2019).

Además de los componentes nutricionales, las características físicas del suelo juegan un papel muy importante en el desarrollo y crecimiento vegetal. La producción de EPS por parte de las bacterias rizosféricas permite la formación de microagregados, que mejoran la estructura del suelo, y se traduce en un mejor drenaje, aireación, penetración de las raíces y formación de microporos en el sistema suelo. Los microagregados en el suelo tienen la capacidad de retener nutrientes y moléculas de agua, que posteriormente la planta puede utilizar (Ilangumaran y Smith, 2017; Kumar *et al.*, 2020).

Tabla 8. Producción de sustancia polimérica extracelular

Cepa	0% NaCl	10% NaCl
S2C1-1	+	+
S2C1-2	-	-
S2C1-3	+	-
S2C1-4	+	-
S2C1-5	-	-
S2C1-6	-	-
S1C1-7	+	+
S1C1-8	+	+
S1C2-9	-	-
S1C2-10	-	-
S1C2-11	-	-
S1C2-12	+	-
S1C2-13	+	-
S1C2-14	+	+
S1C2-15	+	-
S1C2-16	+	-
S1C1-17	-	-
S1C1-18	-	-
S2C2-19	-	+
S2C3-20	+	+
S1C1-21	+	-
S1C2-22	+	-
S1C2-23	+	-
S2C2-24	+	-
S2C2-25	+	-

Cabe destacar que la sustancia polimérica extracelular es un excelente acondicionador del suelo, y funciona como una reserva de carbono (Kumar *et al.*, 2020), además, es el componente principal de las biopelículas, una herramienta que las bacterias utilizan para adherirse y colonizar las raíces de las plantas (Compant *et al.*, 2010).

El análisis de componentes principales de las cepas, muestra la similitud de las bacterias con base en el potencial de promoción de crecimiento vegetal que presentaron en las diferentes pruebas realizadas *in vitro* (Figura 21). De manera

general se destacan tres grupos, donde uno de ellos, conformado por las cepas S1C-7, S1C1-18, S1C1-17 y S1C2-16 es claramente discriminado del resto, debido a que estas cepas presentaron un gran potencial de promoción de crecimiento vegetal en comparación con el resto de las cepas.

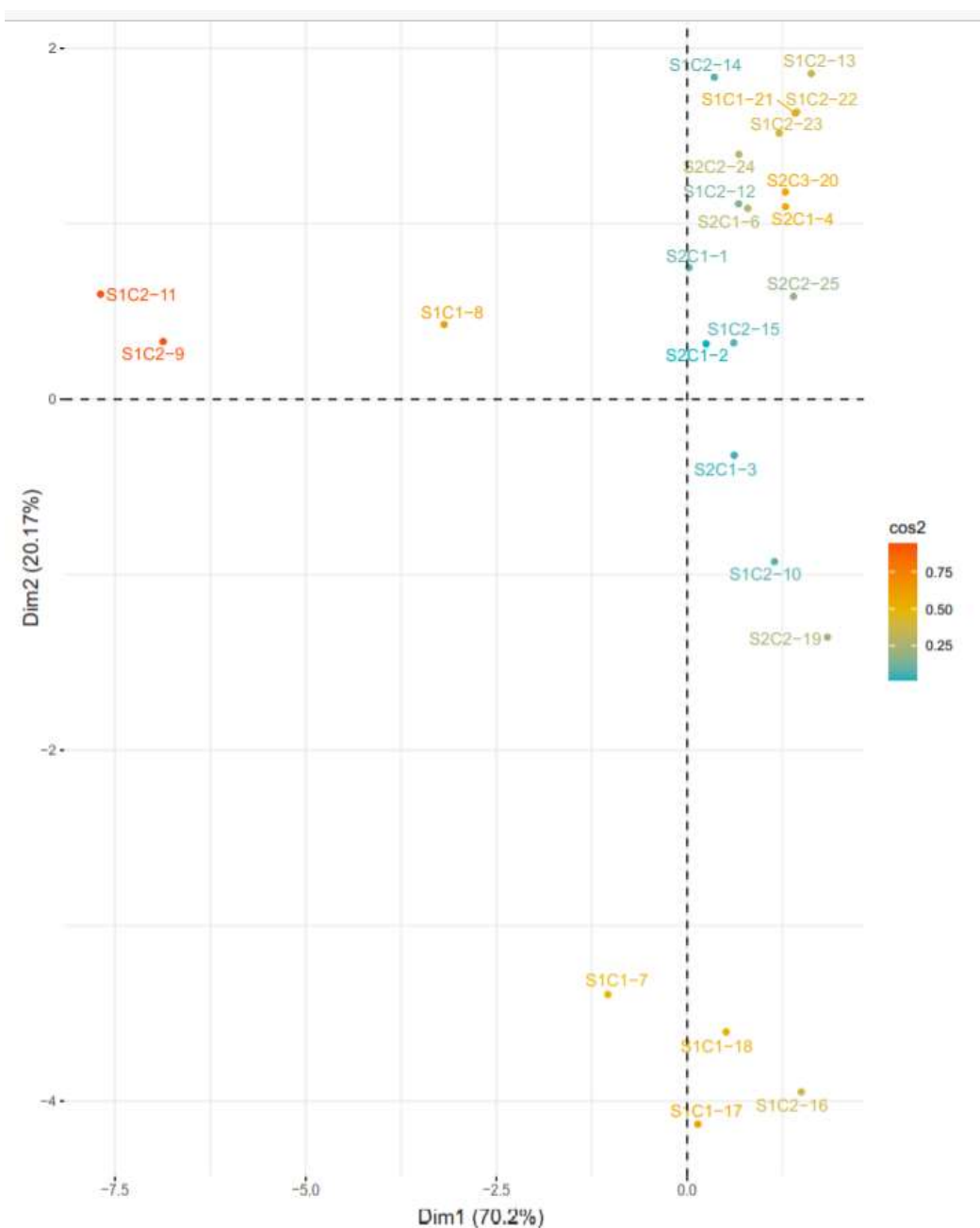


Figura 21. Análisis de componentes principales para las diferentes cepas.

IX. CONCLUSIONES

Los suelos presentaron problemas de salinidad. Con base en la conductividad eléctrica que presentaron se clasificaron como suelo salino (S1) y fuertemente salino (S2). Los cationes que se encontraron en mayor concentración fueron Na^+ y Ca^{2+} .

Las bacterias aisladas de la rizósfera de *B. monnieri* fueron en su mayoría bacterias Gram positivas. Las 24 cepas se representaron por los filos Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria, y se distribuyeron en ocho géneros: *Ocebobacillus*, *Halobacillus*, *Bacillus*, *Halomonas*, *Planococcus*, *Psychrobacter*, *Vibrio* y *Nesterenkonia*. Todas las cepas se clasificaron como bacterias halotolerantes, a excepción de *Halobacillus andaensis* (S1S2-14) que se caracterizó como bacteria halofílica.

La mayoría de las cepas presentaron potencial de promoción de crecimiento vegetal en condiciones de salinidad, principalmente con la producción de AIA y sideróforos. La salinidad influyó en la actividad metabólica de los aislados. La producción de AIA y sideróforos, así como la solubilización de fitatos y carbonatos se vio favorecida con el aumento de la salinidad, mientras que la solubilización de fosfatos y de zinc disminuyó en presencia de NaCl. Por otra parte, el 40% de las cepas presentó mecanismos indirectos de PGPR mediante la producción de enzimas hidrolíticas como proteasas y amilasas.

X. REFERENCIAS

- Ahire, M. L., Kumar, S. A., & Mundada, D. L. P. S. (2018). The vacuolar proton pyrophosphatase gene (SbVPPase) from the Sorghum bicolor confers salt tolerance in transgenic Brahmi [Bacopa monnieri (L .) Pennell]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 24(5), 809–819. <https://doi.org/10.1007/s12298-018-0586-4>
- Ahmadian, G., Degrassi, G., Venturi, V., Zeigler, D. R., Soudi, M., & Zanguinejad, P. (2007). Bacillus pumilus SG2 isolated from saline conditions produces and secretes chitinases. *Journal of Applied Microbiology*, 103(4), 1081–1089. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03340.x>
- Alexander, A., Mishra, A., & Jha, B. (2019). Halotolerant Rhizobacteria: A Promising Probiotic for Saline Soil-Based Agriculture. In *Saline Soil-based Agriculture by Halotolerant Microorganisms*. Springer, Singapore (pp. 53–73). <https://doi.org/10.1007/978-981-13-8335-9>
- Alexander, B., & Zuberer, D. A. (1991). Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 12(1), 39–45.
- Amoozegar, M. A., Bagheri, M., Makhdoumi-kakhki, A., Didari, M., Schumann, P., Spro, C., & Sa, C. (2014). Oceanobacillus limi sp . nov ., a moderately halophilic bacterium from a salt lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(4), 1284–1289. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.057265-0>
- Amoozegar, M. A., Malekzadeh, F., & Malik, K. A. (2003). Production of amylase by newly isolated moderate halophile , Halobacillus sp . strain MA-2. *Journal of Microbiological Methods*, 52(3), 353–359.
- Arora, S., & Vanza, M. (2017). Microbial Approach for Bioremediation of Saline and Sodic Soils. *Biorremediation of Salt Affected Soil: An Indian Perspective*. Springer, 87–100. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-48257-6>
- Baker, G. C., Smith, J. J., & Cowan, D. A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*, 55(3), 541–555. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.009>

-
- Bouckaerd, R., Vaughan, T., Wu, C., Xie, D., Suchard, M. A., Rambaut, A., & Drummond, A. J. (2014). BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Comput Biol.*, 10(4), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003537>
- Bravo, I. A. (2017). Búsqueda y caracterización de bacterias rizosféricas provenientes de la planta de café (*Coffea arabica*). (Tesis de Licenciatura). *Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*.
- Bui, E. N. (2017). Causes of soil salinization, sodification, and alkalinization. *Oxford Research Encyclopedia of Environmental Science*, (June), 1–25. <https://doi.org/10.1093/acrefore/9780199389414.013.264>
- Bulgarelli, D., Rott, M., Schlaeppi, K., Ver, E., Themaat, L. Van, Ahmadinejad, N., ... Schulze-iefert, P. (2012). Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature*, 488(7409), 91–95. <https://doi.org/10.1038/nature11336>
- Castruita, M. A. S., Gutiérrez, C., S, C. A. O., & D, D. J. G. (2000). Clay Soils of the Eastern Zone of the State of Mexico. *Terra Lationoamericana*, 18(1), 35–44.
- Caton, T. M., Witte, L. R., Ngyuen, H. D., Buchheim, J. A., Buchheim, M. A., & Schneegurt, M. A. (2004). Halotolerant Aerobic Heterotrophic Bacteria from the Great Salt Plains of Oklahoma Halotolerant. *Microbial Ecology*, 48(4), 449–462. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0211-7>
- Cerda, R., Nuncio, A., Rogelio, A., Trejo, M., Alfredo, J., Hernández, F., ... Cesar, J. (2007). Exploitation and improvement of saline soils through the establishment of forage grasses. *Técnica Pecuaria En México*, 45(1), 19–24.
- Chen, L., Liu, Y., Wu, G., Veronican, K., Shen, Q., & Zhang, N. (2016). Induced maize salt tolerance by rhizosphere inoculation of *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. *Physiologia Plantarum*, 158(1), 34–44. <https://doi.org/10.1111/ppl.12441>
- Compant, S., Clément, C., & Sessitsch, A. (2010). Soil Biology & Biochemistry Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants : Their role , colonization , mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5), 669–678. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>

-
- Curl, E. A., & Truelove, B. (1986). *The Rhizosphere*. Springer Berlin Heidelberg.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *CircadiOmics: integrating circadian genomics, transcriptomics, proteomics. Nature Methods*, 9(8), 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Delgado-garcía, M., Contreras-, S. M., Aguilar, C. N., & Camacho-Ruíz, R. M. (2018). Isolation of halophilic bacteria associated with saline and alkaline-sodic soils by culture dependent approach. *Heliyon*, 4(11). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00954>
- Desale, P., Patel, B., Singh, S., Malhotra, A., & Nawani, N. (2013). Plant growth promoting properties of *Halobacillus* sp. and *Halomonas* sp. in presence of salinity and heavy metals. *Journal of Basic Microbiology*, 54(8), 781–791. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200778>
- Dussault, H. P. (1955). An improved technique for staining red halophilic bacteria. *Journal of Bacteriology*, 70(4), 484–485.
- El-Awady, M. A. M., Hassan, M. M., & Al-Sodany, Y. M. (2015). Isolation and Characterization of Salt Tolerant Endophytic and Rhizospheric Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) Associated with the Halophyte Plant (*Sesuvium Verrucosum*) Grown in KSA. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 3(3), 552–560. <https://doi.org/10.3126/ijasbt.v3i3.13440>
- Fasim, F., Ahmed, N., Parsons, R., & Gadd, G. M. (2002). Solubilization of zinc salts by a bacterium isolated from the air environment of a tannery. *FEMS Microbiology Letters*, 213(1), 1–6.
- Ferreira, M. J., Silva, H., & Cunha, A. (2019). Siderophore-Producing Rhizobacteria as a Promising Tool for Empowering Plants to Cope with Iron Limitation in Saline Soils: A Review. *Pedosphere: An International Journal*, 29(4), 409–420. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(19\)60810-6](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(19)60810-6)
- Flowers, T. J. (2008). Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist*, 945–963.
- Flowers, T. J., Glenn, E. P., & Volkov, V. (2019). Could vesicular transport of Na⁺ and Cl⁻ be a feature of salt tolerance in halophytes? *Annals of Botany*, 123, 1–18. <https://doi.org/10.1093/aob/mcy164>

-
- García, E. (1998). *Climas (clasificación de Koppen, modificado por García). Escala 1:1000000. México: UNAM.*
- Gascuel, O., Gouy, M., & Lyon, D. (2010). SeaView Version 4 : A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. *Molecular Biology and Evolution*, 27(2), 221–224. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>
- Gonzalez, N. T., Méndez, J. P., García, F. P., Sandoval, O. A. A., & Santillán, Y. M. (2019). TECNOLOGÍAS DE REMEDIACIÓN PARA SUELOS SALINOS . UN CASO DE ESTUDIO : MÉXICO. *Avances En Ciencia e Ingeniería*, 10(1), 13–26.
- Guindon, P. G., & Ranc, J. E. A. N. (2010). New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies : Assessing the Performance of PhyML 3 . 0. *Systematic Biology*, 59(3), 307–321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
- Haney, C. H., Samuel, B. S., Bush, J., & Ausubel, F. M. (2015). Associations with rhizosphere bacteria can confer an adaptive advantage to plants. *Nature Plants*, 1(6), 1–9. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.51>
- Hartmann, A., Rothballer, M., & Schmid, M. (2008). Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and Soil*, 312(1–2), 7–14. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9514-z>
- Hoffman, C. S., & Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of Escherichia coli. *Gene*, 57(2–3), 267–272.
- Hyun, D. W., Whon, T. W., Kim, J. Y., Kim, P. S., Shin, N. R., Kim, M. S., & Bae, J. W. (2015). Genomic Analysis of the Moderately Haloalkaliphilic Bacterium *Oceanobacillus kimchii* Strain X50 with improve High-Quality Draft Genome Sequences. *J. Microbiol. Biotechnol*, 25(12), 1971–1976.
- Ilangumaran, G., & Smith, D. L. (2017). Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Amelioration of Salinity Stress : A Systems Biology Perspective. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01768>
- Jathina, M., & Syed, S. (2019). Histological and Morphological Responses of *Bacopa monnieri* (L.) Pennell in Glycophytic and Halophytic Conditions. *International*

-
- Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(1), 407–411.
[https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10\(1\).407-11](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10(1).407-11)
- Javier, F., Restrepo, C., & Correa, F. J. (2009). *Análisis de la contaminación del suelo: revisión de la normativa y posibilidades de regulación económica*. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/41003079>
- Jha, B., Gontia, I., & Hartmann, A. (2012). The roots of the halophyte *Salicornia brachiata* are a source of new halotolerant diazotrophic bacteria with plant growth-promoting potential. *Plant and Soil*, 356(2), 265–277.
<https://doi.org/10.1007/s11104-011-0877-9>
- Jiang, H., Qi, P., Wang, T., Chi, X., Wang, M., Chen, M., ... Pan, L. (2018). Role of halotolerant phosphate-solubilising bacteria on growth promotion of peanut (*Arachis hypogaea*) under saline soil. *Annals of Applied Biology*, 174(1), 20–30.
<https://doi.org/10.1111/aab.12473>
- Jiang, H., Qi, P., Wang, T., Wang, M., Chen, M., Chen, N., ... Chi, X. (2018). Isolation and characterization of halotolerant phosphate-solubilizing microorganisms from saline soils. *3 Biotech*, 8(11), 461. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1485-7>
- Jorquera, M. A., Hernández, M. T., Rengel, Z., Marschner, P., De, M., & Mora, L. (2008). Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. *Biology and Fertility of Soils*, 44(8), 1025–1034.
<https://doi.org/10.1007/s00374-008-0288-0>
- Kamran, S., Shahid, I., Baig, D. N., Rizwan, M., & Malik, K. A. (2017). Contribution of Zinc Solubilizing Bacteria in Growth Promotion and Zinc Content of Wheat. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2593. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02593>
- Kumar, A., Verma, R., Verma, M., Bhattacharya, A., & Verma, P. (2020). Halotolerant plant growth promoting rhizobacteria for improving productivity and remediation of saline soils. *Journal of Advanced Research*, 26, 69–82.
<https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.07.003>
- Kumar, K. V., Srivastava, S., Singh, N., & Behl, H. M. (2009). Role of metal resistant plant growth promoting bacteria in ameliorating fly ash to the growth of *Brassica*

-
- juncea. *Journal of Hazardous Materials*, 170(1), 51–57.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.04.132>
- Lastiri-hernández, M. A., Álvarez-bernal, D., Ochoa-, S., Contreras-ramos, S. M., Álvarez-bernal, D., Ochoa-, S., & Maribel, S. (2019). Potential of *Bacopa monnieri* (L .) Wettst and *Sesuvium verrucosum* Raf . as an agronomic management alternative to recover the productivity of saline soils. *International Journal of Phytoremediation*, 22(4), 343–352.
<https://doi.org/10.1080/15226514.2019.1663484>
- Leogrande, R., & Vitti, C. (2018). Use of organic amendments to reclaim saline and sodic soils : a review. *Arid Land Research and Management*, 33(1), 1–21.
<https://doi.org/10.1080/15324982.2018.1498038>
- Li, H., Lei, P., Pang, X., Li, S., Xu, H., Xu, Z., & Feng, X. (2017). Enhanced tolerance to salt stress in canola (*Brassica napus* L .) seedlings inoculated with the halotolerant *Enterobacter cloacae* HSNJ4. *Applied Soil Ecology*, 119(May), 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.05.033>
- Li, L., Li, Y., Fu, Y., Zhang, H., Alkhalifah, D. H. M., Salam, N., & Hozzein, W. N. (2018). *Nesterenkonia endophytica* sp . nov ., isolated from roots of *Glycyrrhiza uralensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(8), 2659–2663. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002905>
- Li, W., Chen, H., Kim, C., Zhang, Y., Park, D., Lee, J., ... Jiang, C. (2005). *Nesterenkonia sandarakina* sp. nov. and *Nesterenkonia luta* sp. nov., novel actinobacteria, and emended description of the genus *Nesterenkonia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), 463–466. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.63281-0>
- Li, Z., Bai, Z., Zhang, B., Xie, H., Hu, Q., Hao, C., & Xue, W. (2005). Newly isolated *Bacillus gibsonii* S-2 capable of using sugar beet pulp for alkaline pectinase production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(8–9), 1483–1486. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-7025-8>
- Logan, N. A., & Vos, P. De. (2015). *Bacillus*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–163.
<https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00530>.

-
- Lu, J., Nogi, Y., & Takami, H. (2001). A deep-sea extremely halotolerant and alkaliphilic species isolated from a depth of 1050 m on the Iheya Ridge. *Microbiology Letters*, *205*(2), 291–297.
- Mishra, A., & Tanna, B. (2017). Halophytes : Potential Resources for Salt Stress Tolerance Genes and Promoters. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 829. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00829>
- Moustaine, M., Elkahkahi, R., Benbouazza, A., Benkirane, R., & Achbani, E. H. (2017). Effect of plant growth promoting rhizobacterial (PGPR) inoculation on growth in tomato (*Solanum Lycopersicum L.*) and characterization for direct PGP abilities in Morocco. *Internacional Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, *22*(2).
- Muchate, N. S., Nikalje, G. C., Rajurkar, N. S., Suprasanna, P., & Nikam, T. D. (2016). Physiological responses of the halophyte *Sesuvium portulacastrum* to salt stress and their relevance for saline soil bio-reclamation. *Flora*, *224*, 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2016.07.009>
- Mukhtar, S., Mehnaz, S., Mirza, M. S., & Malik, K. A. (2019). Isolation and characterization of bacteria associated with the rhizosphere of halophytes (*Salsola stocksii* and *Atriplex amnicola*) for production of hydrolytic enzymes. *Brazilian Journal of Microbiology*, *50*(1), 85–97.
- Mukhtar, S., Saeed, B., Samina, M., Muhammad, M., Mirza, S., & Mclean, J. (2018). Impact of soil salinity on the microbial structure of halophyte rhizosphere microbiome. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *34*(9), 136. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2509-5>
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, *170*(1), 265–270.
- NOM-021-SEMARNAT-. (2000). *Especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. SEMARNAT 2000.*
- Numan, M., Bashir, S., Khan, Y., & Mumtaz, R. (2018). Plant growth promoting bacteria as an alternative strategy for salt tolerance in plants: A review. *Microbiological Research*, *209*, 21–32.

<https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.02.003>

- Nurminen, I. V. I., Kerovuo, J., Lauraeus, M., Kalkkinen, N., & Apajalahti, J. (1998). Isolation , Characterization , Molecular Gene Cloning , and Sequencing of a Novel Phytase from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6), 2079–2085.
- Okonechnikov, K., Golosova, O., & Fursov, M. (2012). Unipro UGENE : a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 28(8), 1166–1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
- Orhan, F. (2016). Alleviation of salt stress by halotolerant and halophilic plant growth-promoting bacteria in wheat (*Triticum aestivum*). *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(3), 621–627. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.04.001>
- Panda, D., Barik, J. R., Barik, J., & Behera, P. K. (2020). Suitability of Brahmi (*Bacopa monnieri* L .) cultivation on fly ash-amended soil for better growth and oil content. *International Journal of Phytoremediation*, 0(0), 1–8. <https://doi.org/10.1080/15226514.2020.1791052>
- Pankaj, U., Singh, D. N., Mishra, P., Gaur, P., Babu, C. S. V., & Shanker, K. (2020). Autochthonous halotolerant plant growth-promoting rhizobacteria promote bacoside A yield of *Bacopa monnieri* (L .) Nash and phytoextraction of salt-affected soil. *Pedosphere: An International Journal*, 30(5), 671–683. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(20\)60029-7](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(20)60029-7)
- Pérez-miranda, S., Cabirol, N., George-téllez, R., Zamudio-rivera, L. S., & Fernández, F. J. (2007). O-CAS , a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of Microbiological Methods*, 70(1), 127–131. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.03.023>
- Prabhu, N., Borkar, S., & Garg, S. (2019). Phosphate solubilization by microorganisms : overview , mechanisms , applications and advances. *Advances in Biological Science Research*, 161–176. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817497-5.00011-2>
- Qurashi, A. W., & Sabri, A. N. (2012). Bacterial exopolysaccharide and biofilm formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress. *Journal of Basic Microbiology*, 43(3), 1183–1191.

-
- Ramírez D., Ninfa; Serrano R., José Antonio; Sandoval T., H. (2006). Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(3), 56–71.
- Restrepo-Franco, G. M., Marulanda-moreno, S., & Fe-pérez, Y. De. (2015). Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 44(1), 63–76.
- Reyes, I., Valery, A., & Valduz, Z. (2006). Phosphate-solubilizing microorganisms isolated from rhizospheric and bulk soils of colonizer plants at an abandoned rock phosphate mine. *Developments in Plant and Soil Sciences*, 69–75.
- Riaz, M., & Marschner, P. (2020). Sandy Soil Amended with Clay Soil : Effect of Clay Soil Properties on Soil Respiration , Microbial Biomass , and Water Extractable Organic C. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 1–6.
- Rivadeneira, M. A., Delgado, R., Del Moral, A., Ferrer, M. R., Ramos-cormenzana, A., & Delgado, G. (2004). Biomineralization of carbonates by *Halobacillus trueperi* in solid and liquid media with different salinities. *FEMS Microbiology Ecology*, 48(1), 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2003.12.008>
- Román-Ponce, B., Reza Vázquez, D. M., Gutiérrez-Paredes, S., De Haro-Cruz, M. J., Maldonado-Hernández, J., Bahena-Osorio, Y., ... Vásquez-Murrieta, M. S. (2017). Plant Growth-Promoting Traits in Rhizobacteria of Heavy Metal-Resistant Plants and Their Effects on *Brassica nigra* Seed Germination. *Pedosphere*, 27(3), 511–526. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60347-3](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60347-3)
- Sadeghi, A., & Karimi, E. (2012). Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of *Streptomyces* under saline soil conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1503–1509. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0952-7>
- Saeid, A., Prochownik, E., & Dobrowolska-iwanek, J. (2018). Phosphorus Solubilization by *Bacillus* Species. *Molecules*, 23(11), 1–18. <https://doi.org/10.3390/molecules23112897>
- Salmerón, H., Barajas, P., Cantero, V., & Santoyo, G. (2014). Isolation and characterization of genetic variability in bacteria with β -hemolytic and antifungal

-
- activity isolated from the rhizosphere of *Medicago truncatula* plants. *Genetics and Molecular Research*, 13(3), 4967–4975.
- Saravanan, V. S., Subramoniam, S. R., & Raj, S. A. (2004). Assessing in vitro solubilization potential of different zinc solubilizing bacterial (ZSB) isolates. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35(1–2), 121–125.
- Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal Chemical Assay for the Detection and Determination of Siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1), 47–56.
- Serrano, S., Ortíz, A., Dimas, L., & Berúmen, P. (2002). Aplicación de lavado y estiércol para recuperar suelos salinos en la Comarca Lagunera, México. *Terra Latinoamericana*, 20(3), 239–336.
- Shivaji, S. (2015). Planococcus. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1, 1–11. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00561>.
- Shrivastava, P., & Kumar, R. (2014). Soil Salinity: A serious environmental issue and Plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi Journal Of Biological Sciences*, 22(2), 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.12.001>
- Shrivastava, P., & Kumar, R. (2015). Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(2), 123–131. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2014.12.001>
- Shulse, C. N., Chovatia, M., Agosto, C., Wang, G., Hamilton, M., Deutsch, S., ... Blow, J. (2019). crossm Engineered Root Bacteria Release Plant-Available Phosphate from Phytate. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(18), 1–11.
- Silva-García, Estrada, O., Acevedo, C., & Godoy, E. (2006). Chemical Quality of Groundwater of the Cienega of Chapala as a Factor of Soil Degradation. *Terra Latinoamericana*, 24(4), 503–513.
- Singh, V., Kumari, S., Prakash, J., Kumar, A., Aeron, A., Kumar, P., ... Dotaniya, M. L. (2017). Plant beneficial rhizospheric microorganism (PBRM) strategies to improve nutrients use efficiency : A review. *Ecological Engineering*, 107, 8–32. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.06.058>

-
- Soni, A., Rokad, S., & Sharma, P. (2013). Screening of efficient halotolerant phosphate solubilizing bacteria and their effect on seed germination under saline conditions. *Journal of Scientific and Innovative Research*, 2(5), 932–937.
- Sumner, M. E., & Miller, W. P. (1996). Cation Exchange Capacity and Exchange Coefficients. *Methods of Soil Analysis: Part 3*, 5, 1201–1229.
- Szyma, S., Plociniczak, T., Pitrowska, Z.-S., & Hryniewicz, K. (2016). Endophytic and rhizosphere bacteria associated with the roots of the halophyte *Salicornia europaea* L. – community structure and metabolic potential. *Microbiological Research*, 192(3), 37–51. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.05.012>
- Tkacz, A., Cheema, J., Chandra, G., Grant, A., & Poole, P. S. (2015). Stability and succession of the rhizosphere microbiota depends upon plant type and soil composition. *The ISME Journal*, 9(11), 2349–2359. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.41>
- Vega-Celedón, P., Martínez, H. C., & González, M. (2016). Review Biosynthesis of indole-3-acetic acid and plant growth promoting by bacteria. *Cultivos Tropicales*, 37, 33–39. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.5158.3609>
- Venturi, V., & Keel, C. (2016). Signaling in the Rhizosphere. *Trends in Plant Science*, 21(3), 187–198. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.005>
- Volkov, V., & Flowers, T. J. (2019). Mechanisms of ion Transport in Halophytes: From Roots to leaves. *Sabkha Ecosystems*. Springer, 125–150.
- Vreeland, R. H., & Dobson, V. P. (2015). Halomonas. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–19. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01190>.
- Walkley, A., & Black, I. A. (1934). An Examination Of the Degtjareff Method for Determining Soil Organic Matter, and a Proposed Modification of the Chromic Acid Titration Method. *Soil Science*, 37(1), 29–38.
- Wang, K., Meng, L., Yang, Y., Pan, Y., Liu, H., & Jiang, J. (2015). *Halobacillus andaensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from saline and alkaline soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(6), 1908–19014. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.000198>
- Wang, Kaibiao, Zhang, L., Li, J., & Pan, Y. (2015). *Planococcus dechangensis* sp.

-
- nov ., a moderately halophilic bacterium isolated from saline and alkaline soils in Dechang Township, Zhaodong City, China. *Antonie van Leeuwenhoek*, *107*(4), 1075–1083. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0399-1>
- Wang, W., Wu, Z., He, Y., Huang, Y., Li, X., & Ye, B. (2018). Plant growth promotion and alleviation of salinity stress in *Capsicum annuum* L . by *Bacillus* isolated from saline soil in Xinjiang. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *164*, 520–529. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.08.070>
- Xiao, C., Chi, R., Li, X., & Xia, M. (2011). Biosolubilization of Rock Phosphate by Three Stress-Tolerant Fungal Strains. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *165*(2), 719–727. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9290-3>
- Xiao, W., Wu, Q., Wei, X., & Wu, F. (2020). Salt Tolerance Mechanism and Species Identification of the Plant Rhizosphere Bacterium JYZ - SD2. *Current Microbiology*, *77*(3), 388–395. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01835-0>
- Yoon, S., Ha, S., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., & Chun, J. (2017). *Introducing EzBioCloud : a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies.* 1613–1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>
- Yuan, F., Guo, J., Shabala, S., & Wang, B. (2019). Reproductive Physiology of Halophytes : Current Standing. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 1954. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01954>
- Yumoto, I., Iwata, H., Sawabe, T., Ueno, K., Ichise, N., Matsuyama, H., ... Kawasaki, K. (1999). Characterization of a Facultatively Psychrophilic Bacterium , *Vibrio rumoiensis* sp . nov ., That Exhibits High Catalase Activity. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(1), 67–72.
- Yuttavanichakul, W., Lawongsa, P., Wongkaew, S., & Teaumroong, N. (2012). Improvement of peanut rhizobial inoculant by incorporation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as biocontrol against the seed borne fungus , *Aspergillus niger*. *Biological Control*, *63*(2), 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.06.008>
- Zerrouk, I. Z., Benchabane, M., Khelifi, L., Yokawa, K., Ludwig-müller, J., & Baluska, F. (2016). A *Pseudomonas* Strain Isolated from Date-Palm Rhizospheres

Improves. *Journal of Plant Physiology*, 191, 111–119.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.12.009>

Zhang, B., Fan, R., Bai, Z., & Wang, S. (2013). Biosorption characteristics of *Bacillus gibsonii* S-2 waste biomass for removal of lead (II) from aqueous solution. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(3), 1367–1373.
<https://doi.org/10.1007/s11356-012-1146-z>

Zhang, W., & Feng, Y. (2008). Characterization of nitrogen-fixing moderate halophilic cyanobacteria isolated from saline soils of Songnen Plain in China. *Progress in Natural Science*, 18(6), 769–773. <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2008.01.022>