

Universidad Autónoma de Baja California

Instituto de Ciencias Agrícolas



**“BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FÓSFORO
NATIVAS DEL VALLE DE MEXICALI: AISLAMIENTO,
CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN EN PLANTAS DE
ALGODÓN”**

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA

M.C. Lizbeth Moreno Ramírez

DIRECTOR Dr. en C. Daniel González Mendoza

La presente tesis "**Bacterias solubilizadoras de fósforo nativas del valle de Mexicali: aislamiento, caracterización y evaluación en plantas de algodón**" realizada por la **M.C. Lizbeth Moreno Ramírez**, ha sido evaluada y aprobada por el Comité Particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias Agropecuarias

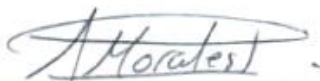
Comité Particular



Dr. Daniel González Mendoza
Director de Tesis



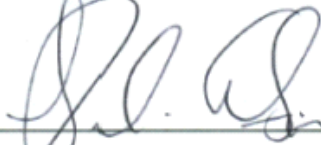
Dr. Onécimo Grimaldo Juárez
Asesor



Dra. Adriana Morales Trejo
Asesor



Dr. Alejandro Manelík García López
Asesor



Dra. Silvia Mónica Avilés Marín
Asesor

Esta tesis de doctorado fue financiada por la 18^a Convocatoria interna de la Universidad Autónoma de Baja California, mediante el proyecto numero: 2231, denominado: “Microorganismos nativos del valle de Mexicali como alternativa biotecnológica para el control de hongos causantes de la pudrición radicular en el cultivo de algodón”.



Agradecimientos

A **Dios y la Virgen de Guadalupe** por todas las bendiciones.

Profundamente al **Dr. Daniel González Mendoza** por su excelente trabajo de dirección.

A **Misael** por su sencillo coraje de quererme. Al **Destino** por encontrarnos.

Mención especial al señor **Fernando** por su inigualable calidad humana.

A los doctores **Adriana Morales Trejo, S. Mónica Avilés Marín, Alejandro M. García López y Onécimo Grimaldo Juárez** por su tiempo invertido en las revisiones del proyecto y aportar de manera significativa a mi formación académica.

Al M.C. **Carlos Ceseña Durán** por su gran compromiso con el proyecto.

A **Yolanda, Edgar, Horacio, Ricardo y Martín** por su amistad.

A la **Facultad de Ingeniería** de la UABC-Mexicali, por el préstamo del equipo de microscopía de fuerza atómica (MFA), empleado en este trabajo, así como también al **Dr. Rigo** que participó gentilmente durante su manejo.

A **Sandra L. Rojas Carranza** por su excelencia profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (**CONACYT**) por la concesión de beca, sin la cual no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma, colaboraron o participaron en la realización de esta investigación, hago extensivo mi más sincero agradecimiento.

A mis padres por todo su amor, apoyo y comprensión
A Esme y Mari, mujeres de ojos grandes y mirada limpia
A mi Valentina y Milo

TABLA DE CONTENIDO

	Página
Comité particular de tesis	i
Financiamiento	ii
Agradecimientos	iii
Dedicatoria	iv
Lista de figuras	viii
Lista de cuadros	x
Lista de anexos	xi
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	5
3. ANTECEDENTES	8
3.1 Historia del uso de microorganismos benéficos del suelo	8
3.2 Bacterias solubilizadoras de fósforo	14
3.2.1 Mecanismos de transformación del fósforo	15
3.2.1.1 Mineralización de fósforo orgánico	15
3.2.1.2 Inmovilización de fósforo	16
3.2.1.3 Solubilización de fósforo	16
3.2.1.3.1 Producción de ácidos	16
3.2.1.3.2 Reacción de óxido- reducción	20
3.2.1.3.3 Producción de sideróforos	21
3.2.1.3.4 Reducción de formas minerales de fosfato férrico	21
3.3 Mecanismos desarrollados por microorganismos solubilizadores de P para promover el crecimiento de plantas	22
3.3.1 Síntesis de fitohormonas	23
3.3.1.1 Producción de Auxinas	24
3.3.1.2 Producción de Giberelinas	25
3.3.2 Uso como agente biocontrol	26
3.3.2.1 Modo de acción de bacterias antagónicas	27
3.3.2.1.1 Producción de lipopéptidos	28
3.3.2.1.2 Inducción de mecanismos de resistencia sistémica	29
3.4 Uso de bacterias solubilizadoras de fósforo en México	30
3.4.1 Biofertilizantes a base de bacterias solubilizadoras de fósforo en México	32
3.5 Cultivo de algodón	36
4. JUSTIFICACIÓN	38
5. HIPOTESIS	39
6. OBJETIVOS	40
6.1. Objetivo General	40
6.2 Objetivos específicos	40

7. MATERIALES Y MÉTODOS	42
7.1 Aislamiento de microorganismos	42
7.1.1 Recolección de muestras	42
7.1.2 Aislamiento e identificación de BSF	42
7.1.3 Aislamiento e identificación de bacterias con actividad antagónica	43
7.2 Identificación molecular de microorganismos	44
7.3 Caracterización bioquímica de BSF	44
7.3.1 Acidificación de medio	44
7.3.1.1 Pruebas cualitativas de solubilización	45
7.3.1.2 Prueba cuantitativa de solubilización	45
7.3.2 Tolerancia a medio salino	45
7.3.3 Formación de biopelícula	46
7.3.4 Cuantificación de producción de fitohormonas	46
7.3.4.1 Detección de ácido indol-3 acético (AIA)	46
7.3.4.2 Detección de Giberelina-3 (AG ₃)	47
7.4 Determinación de carácter antagónico contra fitopatógenos	47
7.4.1 Cultivos duales	47
7.4.2 Análisis morfológico de fitopatógeno en contacto con bacterias antagónicas	48
7.4.3 Identificación de genes lipopeptídicos	48
7.5 Efecto de cepas solubilizadoras de fósforo en la germinación de semillas	49
7.5.1 Parámetros fisiológicos en plántulas inoculadas con BSF	50
7.5.2 Plántulas de algodón tratadas con bacterias antagónicas expuestas posteriormente a fitopatógeno	50
7.5.3 Aplicación de BSF en campo	52
7.6 Análisis estadístico	53
8. RESULTADOS Y DISCUSION	54
8.1. Aislamiento de microorganismos	54
8.1.1 Identificación molecular de BSF	54
8.1.2 Identificación molecular de bacterias con carácter antagonista	55
8.1.3 Identificación molecular de hongo aislado de plantas de algodón	57
8.2 Caracterización bioquímica de bacterias solubilizadoras de fósforo	57
8.2.1 Curva de crecimiento	58
8.2.2 Índice de solubilización	60
8.2.3 Acidificación de medio	62
8.2.4 Cuantificación de fósforo soluble	63
8.2.5 Resistencia a medio salino	64

8.2.6 Formación de biopelícula	67
8.2.7 Cuantificación de fitohormonas	68
8.2.7.1 Cuantificación de ácido indol 3-acético (AIA)	68
8.2.7.2 Cuantificación de giberelina-3 (AG ₃)	69
8.2.8 Efecto en germinación de semillas	70
8.2.9 Efecto en promoción de crecimiento en plántulas de pepino por BSF	72
8.2.9.1 Efecto en promoción de crecimiento en plántulas de pepino por 3 dosis de una BSF	73
8.3 Evaluación de cepas de <i>Bacillus</i>	75
8.3.1 Carácter antagónico frente a fitopatógenos	75
8.3.2 Amplificación de genes lipopeptídicos	82
8.3.3 Cuantificación de fitohormonas	84
8.3.4 Análisis morfológico por microscopía de fuerza atómica de la interacción <i>Bacillus-Fusarium</i>	85
8.3.5 Valoración de plántulas de algodón tratadas con <i>Bacillus</i> ante la presencia de <i>Fusarium</i>	87
8.4 Inoculación de algodón con cepa <i>A. calcoaceticus</i> ICA02Ba a nivel de campo	91
9. CONCLUSIONES	97
11. LITERATURA CITADA	99
12. ANEXOS	119

Lista de Figuras

Número	Descripción	Página
1	Solubilización de fosfatos inorgánicos	17
2	Reducción de formas minerales de fosfato férrico	21
3	Proceso de recolección de muestras de suelo	42
4	Proceso de aislamiento de BSF	43
5	Identificación de cepas bacterianas con capacidad antagónica frente a fitopatógenos, en medio APD	43
6	Procedimiento realizado para observar el efecto de las BSF sobre la germinación de semillas	49
7	Inoculación de semillas a nivel de campo	52
8	Ubicación geográfica de la parcela donde se desarrolló el trabajo en campo	52
9	Amplificación de 16S ribosomal de cepas solubilizadoras de Fósforo.	54
10	Árbol filogenético basado en las secuencias del gen 16S ribosomal, de las bacterias solubilizadoras de P aisladas	55
11	Amplificación de 16S ribosomal de cepas con carácter antagonista	56
12	Árbol filogenético basado en las secuencias del gen 16S ribosomal, de las bacterias antagónicas aisladas	56
13	Amplificación de región ITS de hongo aislado en plantas de algodón	57
14	Aislamiento de BSF crecidas en medio Pikovskaya	58
15	Cinéticas de crecimiento de BSF aisladas	59
16	Índice de solubilización de BSF en medio Pikovskaya.	61
17	Cuantificación de Fósforo soluble en medio líquido por las BSF aisladas	62
18	Cuantificación de Fósforo soluble en medio líquido por las BSF aisladas	63
19	Evaluación de crecimiento en medio líquido de las BSF aisladas, a 4 concentraciones de NaCl y 7 intervalos de tiempo	66
20	Formación de biopelícula por las BSF aisladas	67
21	Cuantificación de auxinas detectadas en sobrenadantes bacterianos	68
22	Cuantificación de giberelinas detectadas en sobrenadantes bacterianos	69
23	Cajas Petri empleadas como cámaras húmedas durante experimentos de germinación.	71
24	Longitud radicular de semillas inoculadas con BSF.	72
25	Crecimientos duales de 3 cepas de <i>B. subtilis</i> aisladas en este trabajo (antagonistas) y 5 de <i>Fusarium</i> (patógeno) en el modelo <i>cuadro</i> .	76
26	Crecimientos duales de 3 cepas de <i>B. subtilis</i> (antagonistas) y 5 <i>Fusarium</i> (patógenos) en el modelo <i>confrontación</i> .	78
27	Crecimientos duales de 3 cepas de <i>B. subtilis</i> (antagonistas) y 5 <i>Fusarium</i> (patógenos) en el modelo <i>pozos</i>	80
28	Crecimientos duales de 3 cepas de <i>B. subtilis</i> (antagonistas) y 5 <i>Fusarium</i> (patógenos) en el modelo <i>papel</i> .	82
29	Amplificación de genes codificadores de antibióticos polipeptídicos en	83

	bacterias antagónicas	
30	Cambios en la morfología de <i>F. solani</i> hb observados luego de 48 h de interacción con 3 cepas de <i>B. subtilis</i> .	87
31	Plántulas de algodón a los 28 días de crecimiento pretratadas con <i>Bacillus</i> y expuestas posteriormente a <i>F. solani</i> hb.	90
32	Ubicación y extensión de tratamientos sobre área de parcela empleada.	94
33	Comparación de plantas de algodón de los 2 tratamientos, obtenidas en distintas fechas	95
34	Crecimiento del cultivo a los 193 días desde la siembra.	96

Lista de Cuadros

Número	Descripción	Página
1	Tratamientos analizados en plántulas de algodón tratadas con <i>Bacillus</i> expuestas posteriormente a <i>Fusarium</i>	51
2	Calendario de actividades en la inoculación en campo	53
3	Identificación de cepas solubilizadoras de Fósforo	55
4	Índice de solubilización de las BSF	61
5	Longitud de radícula de semillas de tomate, pepino y chile inoculadas con las bacterias solubilizadoras de Fósforo	71
6	Variables medidas en plántulas de pepino inoculadas con dos cepas de BSF.	73
7	Parámetros fisiológicos, microbiológicos y bioquímicos medidos a los 30 días de incubación de plántulas inoculadas con 3 dosis de la cepa ICA02Ba	74
8	Porcentaje de inhibición de crecimiento de 5 especies de <i>Fusarium</i> provocado por 3 cepas de <i>B. subtilis</i> , observados a 3, 6 y 9 días de incubación, en el modelo <i>cuadro</i>	76
9	. Porcentaje de inhibición de crecimiento de 5 especies de <i>Fusarium</i> provocado por 3 cepas de <i>B. subtilis</i> , observados a 3, 6 y 9 días de incubación, en el modelo <i>confrontación</i> .	77
10	Porcentaje de inhibición de crecimiento de 5 especies de <i>Fusarium</i> provocado por 3 cepas de <i>B. subtilis</i> , observados a 3, 6 y 9 días de incubación, en el modelo <i>pozos</i>	79
11	Porcentaje de inhibición de crecimiento de 5 especies de <i>Fusarium</i> provocado por 3 cepas de <i>B. subtilis</i> , observados a 3, 6 y 9 días de incubación, en el modelo <i>papel</i> .	81
12	Cuantificación de AIA y AG ₃ producidos por cepas de <i>B. subtilis</i>	85
13	Valores de longitud, alturas máxima y mínima de estructuras fúngicas observadas con MFA. Cada barra representa el promedio de 3 mediciones	86
14	Datos fisiológicos medidos en las plántulas de algodón pretratadas con <i>Bacillus</i> y expuestas posteriormente a <i>F. solani</i> hb	89
15	Datos bioquímicos medidos en las plántulas de algodón pretratadas con <i>Bacillus</i> y expuestas posteriormente a <i>F. solani</i> hb.	91
16	Resultados obtenidos en primer muestreo (18 días desde la inoculación) de experimento en campo.	91
17	Resultados obtenidos en segundo muestreo (136 días desde la inoculación) de experimento en campo.	92
18	Resultados obtenidos en tercer muestreo (184 días desde la inoculación) de experimento en campo	94

Lista de Anexos

Número	Descripción	Página
1	Composición del medio Pikovskaya sólido	119
2	Composición de Medio Nutritivo sólido	119
3	Composición de Medio Papa Dextrosa sólido	120
4	Composición de Medio Kirk líquido	120
5	Curva de calibración de ácido indol acético	121
6	Curva de calibración de AG ₃	122
7	Modelos de cultivos duales	123
8	Oligonucleótidos empleados en el trabajo	124
9	Ajuste de inóculo	125
10	Cámara húmeda para observar morfología fúngica por MFA	126
11	Recuento de Unidades de Colonia (RUFC)	127
12	Fórmulas empleadas para calcular parámetros fisiológicos	128
13	Técnicas de cuantificación de Auxinas, giberelinas, antioxidantes, fenoles totales y Flavonoides en tejido vegetal	129
14	Cuadro de apoyo de evaluación cualitativa de solubilización	132
15	Depósito de secuencias en la base de datos del Genbank correspondientes a los genes 16S ribosomal de las BSF	133
16	Artículos de divulgación científica publicados, originados del presente trabajo.	134

1. RESUMEN

El Valle de Mexicali (zona semiárida) es una región agrícola importante en el extremo noroeste de México. Uno de los principales problemas en la producción de cultivos intensivos en el Valle de Mexicali es la dependencia en el uso de fertilizantes de fosfato y el alto contenido de sales en el agua de riego de los cultivos. Una alternativa biotecnológica amigable con el ambiente es el uso de bacterias nativas de la rizosfera de mezquite (*Prosopis grandulosa* Torr.). Con el objetivo de identificar cepas nativas del valle de Mexicali con potencial biotecnológico como inoculantes microbianos. En el presente trabajo se aislaron y caracterizaron cepas bacterianas en base a su capacidad de acidificación de medio, índice de solubilización de fósforo, tolerancia a la salinidad y producción de fitohormonas. El análisis de las 7 secuencias obtenidas del gen 16S ribosomal mostraron una homología del 99%, 4 de ellas con el género *Acinetobacter*, que se depositaron en el Gen Bank con las siguientes nomenclaturas y números de acceso: ICA01 (KJ190162.1), ICA02Ba (KJ190163.1), ICA03Bs (KJ190164.1) e ICA04Ma (KJ190165.1) y 3 secuencias más identificadas como *Bacillus subtilis*, denominadas 1, 2 y 3. Ensayos *in vitro* demostraron la capacidad antagónica de las cepas de *B. subtilis* contra hongos fitopatógenos del género *Fusarium* aislados de plantas de algodón (*Gossypium hirsitum* L.) enfermas; se amplificaron en cada una estas cepas genes que codifican para biosíntesis de antibióticos polipeptídicos (*sboA*, *qk* e *ituA*), a excepción de la cepa *Bacillus subtilis* 2, donde solo dos genes se detectaron (*sboA* y *qk*). Se observó acidificación de medio en las 7 cepas aisladas, sin embargo, solamente las pertenecientes al género *Acinetobacter* mostraron capacidad solubilizadora, al formar un halo característico en medio sólido Pikovskaya; el mayor índice de solubilización se observó en ICA02Ba, la mayor disminución de pH y por lo tanto, mayor cuantificación fósforo soluble en medio líquido se detectó en ICA04 Ma. Todos los aislados fueron capaces de sintetizar fitohormonas, la mayor producción se registró en la cepa ICA02Ba. Los estudios realizados en campo, se llevaron a cabo en parcelas del Valle de

Mexicali, inoculando semillas de algodón con la cepa ICA02Ba, seleccionada debido a los resultados obtenidos durante su caracterización en el laboratorio, comparados con las demás cepas. Los resultados en campo evidenciaron que la bacteria influyó en el crecimiento y desarrollo de las plantas de algodón comparadas con el control, como resultado de la interacción planta-microorganismo que estimuló la disponibilidad de nutrientes, observada en mayor crecimiento vegetal y biosíntesis de hormonas de crecimiento, detectada en la medición en el laboratorio, comparadas con el control. Por otra parte, los experimentos realizados en plantas de algodón inoculadas con *B. subtilis* y posterior infección con *Fusarium*, demostró el carácter biocontrol de las bacterias, previamente obtenida en placas con cultivos duales. Finalmente, se requieren estudios posteriores donde se ensaye la interacción de las BSP y antagónicas aisladas para que en consorcio pudieran incrementar los beneficios a la planta.

ABSTRACT

Mexicali Valley (semiarid region) is an important agricultural area in the northwest corner of Mexico country. One of the main problems in the production of intensive crops in the Mexicali Valley is the reliance on the use of phosphate fertilizers and the high salt content in the irrigate water applied to crops. A friendly alternative biotechnology with the environmental is the use of native bacteria from the rhizosphere of mesquite (*Prosopis grandulosa* Torr.). In order to identify native strains Mexicali Valley with biotechnological potential as microbial inoculants. In the present work were isolated and characterized bacterial strains based on their ability to acidification medium, rate of solubilization of phosphorus and salt tolerance phytohormone production. The analysis of the 7 sequences obtained by 16S ribosomal gene showed 99% homology, 4 of them within the genus *Acinetobacter*, which were deposited in GenBank with the following classifications and accession numbers: ICA01 (KJ190162.1) ICA02Ba (KJ190163.1) ICA03Bs (KJ190164.1) and ICA04Ma (KJ190165.1) and 3 more sequences identified as *Bacillus subtilis*, called 1, 2 and 3. *In vitro* assays demonstrated the ability of antagonistic strains of *B. subtilis* against phytopathogenic *Fusarium*, isolated from sick plants of cotton (*Gossypium hirsitium* L.). Were amplified in each of these strains genes encoding biosynthesis polypeptide antibiotics (*sboA*, *qk* and *ItuA*), except for the *Bacillus subtilis* 2, who only two genes (*sboA* and *qk*) were detected. Medium acidification in seven isolates was observed, however only belonging to the genus *Acinetobacter* showed solubilizing capacity, to form a halo on agar characteristic Pikovskaya. The highest rate of solubilization was observed in ICA02Ba, the largest decrease in pH and therefore an increased level phosphorus soluble in liquid medium was detected in ICA04 Ma. All isolates were able to synthesize plant hormones, the major production was recorded in the strain ICA02Ba. The field studies were carried out in plots in the Mexicali Valley, cotton seed inoculation with ICA02Ba strain, selected because of the previous results obtained during characterization in the laboratory, compared with the other strains. Field results showed that the bacteria influenced the growth and development of

cotton plants compared to control, as a result of the plant-stimulated microorganism nutrient availability, observed in more plant growth and growth hormones biosynthesis interaction detected by laboratory measurement compared to the control. Furthermore, experiments on cotton plants inoculated with *B. subtilis* and subsequent infection with *Fusarium*, demonstrated the character biocontrol bacteria, previously obtained with dual culture plates. Finally, subsequent studies are needed interested in the interaction and antagonistic bacteria solubilizing phosphate in order to analyze consortiums that could increase profits to the plant under yield conditions.

2. INTRODUCCIÓN

En la actualidad el hambre es un problema de dimensión mundial que conduce al aumento y propagación de enfermedades en la población como consecuencia de la desnutrición (FAO, 2013). Esta necesidad ha llevado a la utilización de materiales de alta eficiencia en la agricultura, variedades vegetales con ciclos de producción más cortos, agroquímicos que surten las necesidades nutricionales y provean protección frente a factores bióticos adversos (plagas y enfermedades) (Voinnet, 2005). Sin embargo, estas estrategias utilizadas en la agricultura moderna han generado impactos ambientales negativos entre los que se destacan la contaminación de aguas freáticas, eutrofización, aumento de gases de invernadero y acumulación de sustancias tóxicas en la cadena trófica, son algunos de los graves problemas que se presentan por el uso indiscriminado de agroquímicos Singh y Kapoor (1994).

En busca de reducir los daños al ambiente, en los últimos años, se han desarrollado estrategias para reemplazar los fertilizantes químicos. Los microorganismos han demostrado cumplir funciones que mantienen el equilibrio del suelo y promueven el crecimiento de forma directa e indirecta y poseen una serie de mecanismos complejos que interactúan entre sí para establecer relaciones benéficas, especialmente con las raíces de las plantas (Ahmad *et al.*, 2009). El estudio y entendimiento de los microorganismos promotores del crecimiento vegetal han sido temas de gran importancia en muchas investigaciones a nivel mundial (Arshad y Frankenberger, 1991). Entre los procesos de mayor importancia se encuentra el de la solubilización de fosfatos, el cual, mediante distintos mecanismos, logra la liberación del ion fosfato, haciéndolo asimilable por la planta (Barber, 1984). La importancia de este proceso microbiológico radica en que el fósforo se encuentra limitado en el suelo y es un nutriente vital para el desarrollo de la planta (Holford 1997).

Diversos géneros bacterianos se han destacado como potenciales solubilizadores de fosfato y pueden ser utilizados como biofertilizantes que podrían permitir la formulación de un producto agrícola de calidad y sin generar

consecuencias al ambiente (Bobadilla y Rincón, 2008). Según Ogut *et al.*, (2010) las cepas pertenecientes al género de *Acinetobacter* fueron las solubilizadoras más efectivas comparadas con otros géneros como *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Pantoea*, y *Bacillus*, los cuales han demostrado efecto en diversos cultivos.

La aplicación de microorganismos se realiza a través de la utilización de inoculantes sobre las semillas y sobre el suelo, con el fin de establecer una asociación benéfica entre la planta y el microorganismo. La inoculación de bacterias solubilizadoras de fósforo según resultados de diversos estudios, se ha traducido en mayor producción agrícola a través de una mayor captación de fósforo por la planta (Zaidi, 1999). La disponibilidad de fósforo en suelo puede ser facilitada por la acción de bacterias solubilizadoras de fosfato (Goldstein, 2007; Ponmurugan y Gopi, 2006; Saber *et al.*, 2005 y Kucey *et al.*, 1989).

En México, específicamente en la región noroeste, los estudios realizados con bacterias solubilizadoras de fósforo son escasos, la gran mayoría han sido desarrollados por investigadores del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), como es el trabajo que describe el aislamiento de BSP provenientes de manglares (Vázquez *et al.*, 2000) y otro de Puente *et al.*, (2004) donde observaron que la colonización de *Azospirillum* (BSP) en cactus, promueve crecimiento, aumento en la secreción de protones y ácidos orgánicos provocando la disminución de pH de la rizosfera, convirtiendo al fósforo a su forma disponible para las plantas. En la región sureste, existe otro grupo de investigadores que se ha interesado por las bacterias solubilizadoras de fósforo, el Colegio de Posgraduados (COLPOS Tabasco), en el que se integraron BSP a biofertilizantes y evaluó su efecto en el crecimiento de *Musa paradisiaca* AAA Simmonds y *Citrus aurantium* L. ambos realizados por Rivera-Cruz, *et al.*, (2008) y (2010), respectivamente.

Por otra parte, Rojas *et al.*, (2001), observó que la acción conjunta de bacterias fijadoras de nitrógeno (*Phyllobacterium* sp) y solubilizadoras de fósforo (*B. licheniformis*) aisladas de raíces de mangle, provocaron un incremento en la fijación de nitrógeno y solubilización de fósforo, lo cual indica una promoción de la

actividad diazotrófica en bacterias fijadoras de nitrógeno al asociarse con otras bacterias (Holguin y Bashan, 1996). Lo anterior sugiere que la formulación de inoculantes mixtos basado en una selección previa de cepas puede tener un efecto benéfico en las plantas. Para el caso específico de cultivo de algodón a nivel internacional se han desarrollado estudios a nivel de campo que indican mejoras en la producción y calidad de fibra (Kumar *et al.*, 2014; Qureshi, *et al.*, 2012; Akhtar *et al.*, 2010; Egamberdiyeva y Höflich, 2004). Sin embargo en el noroeste de México, no se han realizado estudios sobre el uso de inoculantes en este cultivo.

En la región noroeste, el valle de Mexicali B.C., se caracteriza por ser una región árida pero altamente productiva, destacando el cultivo de algodón a nivel nacional, con una superficie de siembra de 25 mil ha, para el ciclo primavera-verano (SAGARPA, 2014). No obstante, la presencia de suelos con altos niveles de salinidad pueden afectar la absorción de fósforo por la planta e incrementar el uso de fertilizantes químicos al suelo. Por lo que una alternativa biotecnológica para reducir el uso de fertilizantes químicos y favorecer la disponibilidad de fósforo hacia la planta es el uso de bacterias solubilizadoras de fósforo asociadas a la flora nativa del valle de Mexicali.

3. ANTECEDENTES

3.1 Historia del uso de microorganismos benéficos del suelo

Antes de 1683 no se conocía la existencia de las bacterias, hasta que en ese año van Leewenhoek las describió; su utilización para estimular el crecimiento de las plantas se remonta siglos atrás. Teofrasto (287 a.C.) y Virgilio (30 a.C.) sugerían mezclar el suelo donde se habían cultivado leguminosas con suelo donde no se habían cultivado, para remediar sus defectos y adicionarle fuerza (Tisdale y Nelson, 1975). Desde el siglo XVIII se inocularon hongos en plántulas de encino para incrementar la producción de trufas, que son hongos que tienen alto valor económico por su enorme importancia gastronómica. Las trufas eran colocadas en los “cajetes” donde las plántulas de los encinos eran sembradas. Esto ocurrió mucho antes de que en 1885 se acuñara el vocablo “micorriza” (Smith y Read, 1997).

A finales del siglo XIX, la práctica de mezclar suelo con semillas, se convirtió en un método recomendado para inocular leguminosas en Estados Unidos; poco después, Nitragín registró la primer patente para inocular plantas con bacterias del género *Rhizobium* sp. En los años 1930's y 1940's, la inoculación con bacterias rizosféricas asociativas con cepas de los géneros *Azotobacter* y *Bacillus* fue utilizada a gran escala en Rusia y Europa del Este. Sin embargo, estas prácticas no tuvieron éxito y fueron abandonadas durante la Segunda Guerra Mundial (Barea *et al.*, 2005; Bashan, 2008). Todo apuntaba que el futuro de los biofertilizantes era promisorio en el desarrollo de la agricultura del siglo XX. Sin embargo, la asombrosa industrialización y urbanización que surgió después de 1945, demandó una gran cantidad de materias primas y alimentos. Es aquí donde la demanda de los fertilizantes, que son capaces de generar una rápida respuesta productiva, tuvieron su extensa utilización (Duxbury, 1994).

Por casi 100 años se han producido inoculantes de *Rhizobium*, alrededor del mundo producidos particularmente por compañías pequeñas. Algunas leguminosas, tales como la soya en Brasil, solamente se inoculan, no se fertilizan con nitrógeno. En la mayoría de países en desarrollo de Asia, África,

Centroamérica y Suramérica, y en México, la tecnología de los inoculantes no ha tenido mayor impacto en la productividad de las granjas familiares, debido en gran parte a que no se utilizan inoculantes o los que se usan son de baja calidad (Bashan, 2008). En años recientes en el noroeste mexicano y Argentina, se ha iniciado la inoculación semi-comercial a gran escala con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y bacterias promotoras de crecimiento en plantas (BPCP) del género *Azospirillum*, principalmente; se han investigado otras especies bacterianas, las cuales raras veces han alcanzado las prácticas agrícolas (Bashan, 2008).

Con las crisis energéticas en la década de 1970, el estudio de los biofertilizantes avanzó rápidamente en algunos países europeos y asiáticos; sin embargo, el avance fue menor en México y países latinoamericanos (Okon y Labandera-González, 1994).

En los años treinta y cuarenta principalmente, la inoculación con bacterias rizosféricas no simbióticas y asociativas, tales como la fijadora de nitrógeno *Azotobacter*, o como la solubilizadora de fosfatos *Bacillus megaterium* fue utilizada a gran escala en Rusia y Europa del este. Sin embargo, estas prácticas no dieron resultados conclusivos y fueron abandonadas durante la segunda guerra mundial.

Los dos descubrimientos más importantes para la tecnología de inoculación de plantas se dieron a finales de los años 70's por un lado, se encontró que *Azospirillum* mejoraba el crecimiento de plantas no leguminosas, afectando directamente el metabolismo de la planta. Por otra parte, se iniciaron estudios intensivos en bacterias como agentes de control biológico de plagas, principalmente *Pseudomonas fluorescens* y *P. putida*. En años recientes han sido evaluados varios géneros de BPCP tales como *Bacillus*, *Flavobacterium*, varios microorganismos relacionados con *Azospirillum* y bacterias endófitas tales como *Gluconobacter* (Bashan y Honguín, 1994). Aunque los inoculantes de *Rhizobium* han estado en el mercado por cerca de un siglo, sólo recientemente han aparecido las primeras preparaciones comerciales de BPCP y HMA (Dobbelaere *et al.* 2001). Se reconoce que los productos biológicos han tenido una penetración menos espectacular que los pesticidas químicos en el mercado. Se han hecho grandes

promesas que no han llenado las expectativas del mercado (Bashan, 2008). La respuesta inmediata a la inoculación del suelo con BPCP varía considerablemente, dependiendo del tipo de bacteria, especies de plantas, tipo de suelo, densidad del inoculante y condiciones ambientales (Bashan *et al.*, 1996). En general, poco después de que la bacteria ha sido introducida en el suelo, su población declina progresivamente, éste fenómeno (aunado a la producción de biomasa bacteriana y al estado fisiológico de la bacteria en el inoculante) puede impedir la acumulación en la rizósfera de una población de BPCP lo suficientemente grande para obtener una respuesta positiva en la planta (Bashan y Levanony, 1990). El principal obstáculo es el hecho de que el suelo es un ambiente heterogéneo e impredecible, donde en muchos casos las bacterias inoculadas no pueden encontrar un nicho vacío donde puedan sobrevivir, con excepción de suelos esterilizados, condición que no existe en agricultura a gran escala. Estas bacterias deben competir con una microflora nativa a menudo mejor adaptada y afrontar la predación por protozoarios. En este sentido, el inoculante proporciona a la bacteria introducida un microambiente más apropiado (aun temporalmente), que evita la rápida disminución de la población bacteriana una vez inoculada en el suelo. El primer objetivo a tomar en cuenta cuando se considera la inoculación con bacterias benéficas, es encontrar la mejor bacteria o el mejor HMA disponible. Como siguiente paso es necesario estudiar la formulación específica del inoculante. En términos prácticos, la formulación escogida determina el éxito potencial del inoculante. Muchas bacterias que han sido reportadas en la literatura científica como potenciales bacterias benéficas nunca han aparecido en el mercado comercial, tal vez debido a una formulación inapropiada o a que no hay real éxito en los experimentos intensivos de campo, necesarios para establecer el valor práctico real de cada inoculante. La optimización técnica de una formulación del inoculante es independiente de la cepa bacteriana usada, debido a que la mayoría de las cepas de la misma especie bacteriana o del HMA comparten muchas propiedades fisiológicas (Bashan *et al.*, 1996). Puede asumirse que un proceso tecnológico desarrollado para una cepa específica es fácilmente adaptable a otra cepa de la misma especie, solo con

modificaciones menores. Este principio normalmente no puede aplicarse en el caso de diferentes géneros bacterianos. Aparte de esta regla de oro, las combinaciones cepa-formulación deben ser mejoradas en los casos de preparaciones que se sabe causan estrés a la bacteria, tales como formulaciones en polvo o líquidas. Formulaciones avanzadas de hongos micorrízicos son aún más complicadas, debido a la necesidad de mantener en la formulación también el material vegetal necesario para estos hongos. Hoy en día, las “formulaciones” usadas en México son simplistas (raíces y suelos de plantas colonizadas por HMA) (Bashan, 2008).

El grupo de microorganismos que están involucrados en procesos que afectan la transformación de fósforo del suelo y son componentes integrales del ciclo del fósforo. Los microorganismos participan en la solubilización del fosfato inorgánico y en la mineralización del fosfato orgánico, así como en su inmovilización (Richardson, 1984).

Los microorganismos solubilizadores de fosfato abundan en la rizósfera, representando un 10% de la población microbiana del suelo. Existe una gran variedad de microorganismos incluyendo bacterias Gram negativas y positivas, incluso algunas especies de estreptomicetos (Babenko, 1984).

Pikovskaya (1948), encontró que la disponibilidad de fósforo en los suelos está estrechamente relacionada en el desarrollo vegetal, además logró estandarizar el primer medio para el aislamiento de microorganismos solubilizadores de fosfato. Como resultado de este trabajo, a finales de la década de los 50's apareció en el mercado la fosfobacterina, el primer biofertilizante producido en Rusia, a base de microorganismos solubilizadores de fosfato (Urbanek, 1987; Menkina, 1963; Cooper, 1959). Subba-Rao y Bajpai (1965) reportaron la presencia de hongos con capacidad fosfato solubilizadora en la rizósfera de cultivos de maíz, soya y chile en suelos ácidos. Los hongos aislados eran pertenecientes al género *Aspergillus* sp. Pocos años después, en la India Sundara y Sinha (1963) confirman la habilidad de varios microorganismos para solubilizar formas inorgánicas, como el fosfato tricálcico, además de las formas orgánicas.

Posteriormente, se desarrolló un producto comercial de tipo fosfórico obtenido por la fusión de roca fosfórica con azufre elemental y activado con la inoculación de bacterias del género *Thiobacillus* (Urbanek, 1987). En Cuba, en 1997, Herrera estableció un cepario de microorganismos solubilizadores de fosfato, junto con microorganismos que sintetizan sustancias promotoras de crecimiento vegetal, organizado y dirigido por el Ministerio de Agricultura Cubano, reportó 40 cepas con capacidad solubilizadora, entre las que se destacan los géneros bacterianos de *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Arthrobacter*, 12 cepas de hongos y 5 actinomicetos. Dichas cepas son la base para la formulación de un nuevo producto denominado fosforina, que incrementa la producción de algunos cultivos entre 5% y 25% y reduce aplicación de fertilizantes fosforados entre 50% y 100%. Los inoculantes a base de bacterias solubilizadoras de fosfato incluyen especies de *Bacillus*, *Escherichia*, *Arthrobacter* y *Pseudomonas* los cuales según Datta *et al.*, (1982) pueden ser adicionados en combinación con P_2O_5 en una cantidad aproximada de $30-35 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$.

En Colombia, Bohorquez *et al.*, (1999) aislaron bacterias solubilizadoras de fosfato a partir de la rizosfera de tomillo (*Thimus vulgarices* L), identificadas como *Acinetobacter calcoaceticus*, *Serratia marcencens* y *Klebsiella pneumoniae*.

En la India el trabajo de Sahu y Jana (2000) logró ampliar el valor de la roca fosfórica combinado con bacterias solubilizadoras de fosfato, para ser utilizado como fertilizante en estanques de peces, obteniendo buenos resultados con el plancton en el nivel de ortofosfatos en el agua, en este mismo país los biofertilizantes fosfóricos como la fosfobacterina han mostrado de 10-15% más producción en las cosechas.

Durante los últimos 10 años, el conocimiento sobre los microorganismos solubilizadores de fosfato (MSP) ha aumentado significativamente. Entre los MSP se encuentran las bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPB (del inglés: plant growth promotion rhizobacteria). Estas bacterias son de vida libre en el suelo y son capaces de adaptarse, colonizar y persistir en la rizósfera de la planta y favorecer su crecimiento o desarrollo (Bashan, 1998). Las rizobacterias

pueden ser benéficas o antagónicas para la planta (Lemanceau, 1992). Las bacterias solubilizadoras de fósforo pertenecen al grupo de las PGPBs y son capaces de solubilizar fosfato inorgánico de diferentes compuestos, como son el fosfato bicálcico, fosfato tricálcico y rocas fosfóricas. Con el término rocas fosfóricas se conoce a los minerales que contienen fósforo como es el caso de las apatitas, incluyendo fluorapatita, cloroapatita e hidroxiapatita. Hay grandes depósitos en Rusia, Estados Unidos, África del Norte y China; también existen importantes reservas en Brasil, Perú y México (Sperber 1958; Hoffland, 1992). Existen 13 géneros de bacterias con la capacidad de solubilizar fosfato: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Mesorhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Erwinia* (Sperber, 1958; Goldstein, 1986; Rodríguez y Fraga, 1999).

El estudio de las bacterias promotoras de crecimiento se ha realizado desde hace muchos años. Las bacterias promotoras del crecimiento poseen varios mecanismos, entre los cuales se debe destacar la fijación biológica de nitrógeno (FBN), síntesis de fitohormonas, sinergismo con otros microorganismos benéficos para las plantas, inhibición de la producción de etileno por parte de las plantas y la solubilización de elementos como el fósforo, el cual es de vital importancia en el desarrollo de las células vegetales (Fuentes-Ramírez y Caballero-Mellado, 2005; Boddey *et al.*, 2001). Teniendo en cuenta las características de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, se han realizado varios esfuerzos formular y utilizar a estos microorganismos como biofertilizantes, los cuales pueden ser definidos según Fuentes-Ramírez y Caballero-Mellado (2005), como productos que contienen microorganismos vivos, los cuales ejercen un efecto benéfico en las plantas, utilizando diferentes mecanismos. Ejemplos claros de cómo las bacterias pueden intervenir en los ciclos biogeoquímicos pueden observarse en las bacterias solubilizadoras de fosfato (BSP), ampliamente utilizadas como principios activos de biofertilizantes empleados en la agricultura moderna.

En cuanto a investigaciones de campo, Pandey *et al.* (2006) han demostrado el potencial biotecnológico de la aplicación de microorganismos nativos en la promoción de crecimiento vegetal. La inoculación de suelos o

semillas con microorganismos solubilizadores de fosfato ha sido ampliamente utilizada para mejorar el crecimiento y la producción de las cosechas (Banerjee *et al.*, 2010). Por otra parte, Guang-Can *et al.* (2008) reportaron una correlación positiva entre el número de bacterias solubilizadoras de fosfato en la rizósfera y la toma de fosfato y rendimiento de grano en varios cultivos agrícolas.

Según Banerjee *et al.* (2010), los microorganismos solubilizadores de fosfato han sido aislados de suelos rizosféricos de varias plantas de interés agrícola como arroz (Chaiharn y Lumyong, 2009), trigo (Ahmad *et al.*, 2008), soya (Son *et al.*, 2006) mostaza (Chandra *et al.*, 2007), berenjena y chile (Ponmurugan y Gopi, 2006). Scervino *et al.* (2010) evaluaron la capacidad de solubilización de varias fuentes de fósforo por parte de aislamientos fúngicos aislados de la rizósfera de varios cultivos, que tienen la capacidad de ser agentes biocontroladores contra hongos patógenos como *Sclerotinia sclerotiorum*, y encontraron que cada aislado muestra diferentes patrones de producción de ácidos orgánicos, involucrados en la solubilización de sales de fosfato.

Una alternativa de manejo para mejorar el estado nutricional de los suelos es el uso de mecanismos biológicos que permitan restituir su fertilidad, sin perturbar y/o empeorar su condición (Dodd *et al.*, 1990).

3.2 Bacterias solubilizadoras de Fósforo

El fósforo, después del nitrógeno es el nutriente inorgánico más requerido por las plantas y microorganismos. En el suelo, es el factor limitante del desarrollo vegetal pues las concentraciones de Fósforo asimilables son muy bajas, normalmente varían entre 5 y 30 mg·kg⁻¹. Esto se debe a que el fósforo soluble reacciona con iones como el calcio, el hierro o el aluminio, que provocan su precipitación o fijación, disminuyendo su disponibilidad para las plantas. Los fosfatos inorgánicos aplicados como fertilizantes químicos también son inmovilizados en el suelo y como consecuencia no pueden ser aprovechados totalmente por los cultivos (Alexander, 1980; Atlas y Bartha, 1997).

Por otro lado, el fósforo es importante por su participación en los procesos de reproducción y en la constitución genética de las plantas por ser un componente de los ácidos nucleicos. Interviene además en muchas reacciones bioquímicas relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas en las que participa como intermediario, donando o aceptando energía en rutas bioquímicas específicas (Domínguez *et al.*, 2001). Giaconi y Escaff (1993) afirman que la presencia de este elemento es indispensable para la buena fecundación de las flores, estimula el desarrollo del sistema radical y aumenta la resistencia del vegetal a las enfermedades. Además, es uno de los nutrientes que regula los efectos derivados de la presencia de un exceso de nitrógeno.

Existen bacterias capaces de transformar las formas insolubles del fósforo en formas solubles, a través de reacciones enzimáticas, haciéndolo disponible para las necesidades de las plantas (Sudhansu, 1998). La inoculación de semillas o suelos con bacterias capaces de solubilizar fosfato, mejora entonces la absorción del fosfato del suelo, así como el aplicado de manera artificial, dando como resultado el aumento del rendimiento de los cultivos (Nautiyal, 1999).

Muchos autores atribuyen la solubilización de fosfato inorgánico insoluble por los microorganismos, a la producción de ácidos orgánicos y ácidos quelantes de azúcares, la producción de estos ácidos orgánicos resulta en la acidificación del medio que rodea a la célula bacteriana (Rodríguez y Fraga, 1999).

3.2.1 Mecanismos de transformación del fósforo

3.2.1.1 Mineralización de fósforo orgánico

En particular, las bacterias solubilizadoras de fosfato (BSP) solubilizan tanto fosfato orgánico, como inorgánico (Banik y Dey, 1982; Goldstein *et al.*, 2003). El fosfato orgánico es mineralizado por la enzima fosfatasa excretada por algunos microorganismos, produciendo la liberación de éste (Gerretsen, 1948; Kucey *et al.*, 1989). Las bacterias *Bacillus megaterium*, *Bacillus mesentericus* y *Pseudomonas putida* mineralizan las formas orgánicas de fósforo (ortofosfato) (Tarafdar y

Claassen, 1988; Das *et al.*, 2003). Los suelos cultivados normalmente tienen bajas cantidades de fósforo disponible para las plantas, la deficiencia de este elemento se constituye en un limitante serio para la productividad vegetal. El fósforo se encuentra en diferentes compuestos orgánicos como fosfolípidos, fosfoazúcares, fosfatos de inositol, ácidos nucleicos, ATP, entre otros, que llegan al suelo mediante aporte de excretas de animales y de hojarasca (Chen *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2002; Pradhan y Sukla, 2005).

3.2.1.2. Inmovilización de fósforo

En la inmovilización de fósforo éste es incorporado en componentes celulares, formando nueva biomasa microbiana, constituyendo ácidos nucleicos, fosfolípidos y otras sustancias protoplasmáticas.

3.2.1.3 Solubilización de fósforo

La solubilización ocurre por producción de ácidos orgánicos e inorgánicos y mecanismos de oxidoreducción. Las cepas de *Pseudomonas* sp, *Bacillus* sp y *Rhizobium* sp son los microorganismos con mayor poder de solubilización de fosfatos minerales; así como la acción de fosfatasas ácidas las cuales juegan un papel importante en la mineralización de fósforo en el suelo (Alexander, 1994).

3.2.1.3.1 Producción de ácidos

La habilidad de los microorganismos de solubilizar complejos de fósforo ha sido atribuida a la habilidad de reducir el pH de los alrededores, ya sea mediante la liberación de ácidos orgánicos o protones. Ácidos orgánicos como el citrato, lactato, succinato, entre otros, que son secretados por las bacterias solubilizadoras de fósforo, contribuyen a la solubilización de fósforo en la rizosfera. En general, se acepta que el mecanismo más común de solubilización del fosfato mineral es la acción de ácidos orgánicos sintetizados por las BSP (Goldstein, 1995; Wan y Wong, 2004). Los ácidos orgánicos secretados pueden directamente

disolver fosfatos minerales como resultado de un intercambio de anión o pueden quelar ambos iones de hierro y aluminio asociados con fosfato (Bajpai y Sundara-Rao, 1971). Finalmente la forma insoluble de fósforo es convertida a soluble en iones de monobásico (H_2PO_4) y dibásico (HPO_4^{2-}), un proceso referido como solubilización de fosfato mineral (Figura 1), lo que permite un incremento en la disponibilidad de fósforo para las plantas y en su momento, su captación por éstas (Gyaneshwar, *et al.* 2002), dicha conversión se lleva a cabo por bacterias que utilizan la ruta metabólica de la glucosa para la producción de estos ácidos, provocando la liberación del fosforo al medio (Plazas, 2007).



Figura 1. Solubilización de fosfatos inorgánicos.

Los ácidos orgánicos que solubilizan fosfato son de bajo peso molecular y poseen uno o más grupos carboxilo. Dependiendo de las propiedades de disociación y el número de grupos carboxilo, los ácidos orgánicos tienen carga negativa, por lo que pueden formar complejos con cationes metálicos en solución y el desplazamiento de aniones de la solución del suelo (Stevenson, 1967; Sagoe *et al.*, 1998). Los ácidos orgánicos de bajo peso molecular provienen del metabolismo de compuestos de alto peso molecular, como carbohidratos, péptidos y lípidos (Baziramakenga *et al.*, 1995). Éstos juegan un papel determinante en el ciclo biológico de nutrientes, en la agricultura y los ecosistemas forestales. Los ácidos orgánicos o carboxílicos son sustancias polares y son capaces de formar puentes de hidrógeno entre sí y con el agua. La mayoría de los ácidos orgánicos producidos por las BSP son alifáticos, es decir, son ácidos no aromáticos. El entendimiento de la química y biología de la rizósfera es esencial para la determinación de la movilidad y disponibilidad de los metales en la interface raíz-suelo. La producción de ácidos orgánicos por las BSP tiene acción directa en la acidificación, quelación, precipitación y las reacciones de óxidoreducción en la rizósfera (Kucey *et al.*, 1989).

La solubilización de fosfato por los ácidos orgánicos depende del pH y la mineralogía del suelo. Existen dos mecanismos para que esto ocurra. El primero es un intercambio del ácido, por ejemplo, los H^+ provenientes del citrato se intercambian por el fósforo ligado a la superficie de los cristales de $Al(OH)_3$ o $Fe(OH)_3$ reduciéndolos y liberando al fósforo (Andrews, 1990; Halder *et al.* 1990). El segundo mecanismo depende de la concentración de los ácidos orgánicos producidos por las BSP, el cual involucra la formación de complejos con iones de metales provenientes de la roca fosfórica (Singh y Amberger, 1998).

A veces las cantidades de producción de ácidos orgánicos no son significativas en algunos microorganismos solubilizadores de fosfato (Illmer y Schinner, 1995; Chen *et al.* 2006). Por esta razón, se han propuesto otros mecanismos de solubilización, como la liberación de protones (Illmer y Schinner, 1995), a parte de los ácidos orgánicos, la producción de sustancias quelantes (Sperberg, 1957) y ácidos inorgánicos (Hopkins y Whiting, 1916).

La cantidad enorme de rutas metabólicas generadoras de ácidos por las bacterias, han hecho imposible el desarrollo de un conocimiento unificado sobre la microbiología de la solubilización del fosfato. Lo anterior no ha ocurrido en el estudio de fijación de N_2 , donde todas las rutas deben converger a alguna variación del sistema de la nitrogenasa (Beever y Burns, 1980; Ohtake *et al.* 1996). Illmer y Schinner (1995) sugieren que los ácidos orgánicos producidos por las BSP no son determinantes para la solubilización y el único factor determinante para la solubilización de fósforo es la concentración de H^+ originados que se producen de la respiración o asimilación de NH_4^+ .

La oxidación directa es una de las cuatro rutas metabólicas para la utilización de glucosa por las bacterias. Para muchas especies bacterianas, la ruta de oxidación directa es el mecanismo primario para la utilización de aldosas. La primera oxidación se cataliza por la quinoproteína glucosa deshidrogenasa, así llamada porque pertenece al grupo de enzimas bacterianas que utilizan el cofactor quinónico PQQ (2, 7, 9-tricarboxil-1Hpirrol[2,3-f]quinolina-4,5-diona). La PQQGDH transfiere dos electrones directamente de las aldosas a la ubiquinona en la membrana plasmática, ocurren dos oxidaciones que generan protones y que están

mediadas por el cofactor PQQ. La oxidación directa de glucosa al ácido glucónico genera un protón transmembranal que puede usarse para la bioenergética y funciones de transporte de la membrana, mientras el protón del ácido glucónico está disponible para la solubilización de fosfatos. Las bacterias que producen ácido 2- cetoglucónico, normalmente llevan a cabo la segunda oxidación del ácido glucónico periplásmico a 2-cetoglucónico (Liu *et al.*, 1992). La fisiología de solubilización de fosfato no se ha estudiado completamente. Algunos trabajos indican que ciertos elementos minerales juegan un papel en este proceso. Es necesaria una concentración de K crítica (concentración mínima necesaria) para la solubilización óptima, mientras que la concentración de Mg y Na parecen ser importantes en algunos hongos (Beever y Burns, 1980), pero no en *Pseudomonas* (Illmer y Shinner, 1992). Los microorganismos pueden relacionarse entre sí, dando lugar, en muchos casos, a interacciones sinérgicas que favorecen la nutrición de la planta e incrementan su producción. Un ejemplo de este sinergismo lo constituye la interacción entre las micorrizas y los microorganismos solubilizadores de fosfato (Toro *et al.*, 1997).

La inoculación de microorganismos solubilizadores de fosfato en suelo ha demostrado el aumento de la solubilización de fosfatos insolubles, resultando en un mayor rendimiento de los cultivos (Sundara *et al.* 2002). Existe una correlación negativa entre el pH y las cantidades de fósforo solubilizado (Asea *et al.* 1988).

Los ácidos orgánicos son constituyentes normales de la mayoría de los suelos agrícolas. Su papel dentro del suelo no ha sido aún bien definido, pero existen numerosas evidencias que indican sus efectos fisiológicos en el crecimiento de las plantas (Illmer y Shinner, 1995; Scheffer y Schachtschabel, 1998; Igual *et al.*, 2001). La concentración de los ácidos orgánicos en la solución del suelo normalmente es baja, variando de 1 a 50 mM (Baziramakenga *et al.*, 1995; Strobel, 2001). Los ácidos orgánicos son importantes en la agricultura, por que forman complejos con metales, solubilizan metales y participan en su transporte (Fuentes-Ramírez *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2003). Ácidos como el oxálico, cítrico, láctico, tartárico y 2-cetoglucónico tienen propiedades quelantes y solubilizadoras sobre los metales (Babu-Khan *et al.*, 1995).

El fenotipo más eficiente de solubilización de fosfato mineral, en bacterias Gram negativas, se ha observado como resultado de la oxidación de la glucosa extracelular a través de la quinoproteína glucosa deshidrogenasa (GDH) y la gluconato deshidrogenasa (GADH) que están orientadas en la cara exterior de la membrana citoplasmática de tal forma que puedan oxidar sustratos en el espacio periplásmico; consecuentemente, los ácidos orgánicos se difunden libremente hacia el exterior de las células y pueden causar la liberación de grandes cantidades de fósforo soluble a partir de fosfatos minerales debido a que se proporcionan protones y aniones de ácidos orgánicos que se unen al metal liberando el fosfato (Pérez *et al.*, 2007).

Algunas cepas de *Bacillus liqueniformis* y *B. amyloliquefaciens* producen mezclas de ácidos láctico, isovalérico, isobutírico y acético. También se ha reportado que las bacterias producen ácido cítrico, oxálico, propiónico, láctico, valérico, succínico y que tales ácidos están involucrados en la solubilización de minerales de calcio en concentraciones más bajas que el ácido glucónico. De acuerdo con Scervino *et al.*, (2010), la calidad del ácido es más importante que la cantidad, es decir, que el tipo de ácidos orgánicos secretados por los microorganismos, es importante en la solubilización de compuestos inorgánicos de fósforo, incrementando así, el potencial solubilizador de fosfato.

En la propuesta de liberación de protones, se propone que son bombeados al medio externo por diversas bombas de membrana asociadas, que establecen diferentes gradientes iónicos para la adquisición de nutrientes (Jones y Gadd, 1990; Sigler y Hofer, 1991; Gadd, 1993). Además, los protones se derivan de ácidos orgánicos producidos que también poseen un anión ácido orgánico que normalmente es capaz de formar un complejo con catión de metal (Burgstaller, y Schinner, 1993; Hughes y Poole, 1991).

3.2.1.3.2 Reacción de óxido- reducción

La oxido-reducción es otro mecanismo microbiano de transformación; el fósforo se encuentra en estados de oxidación que varían del estado de valencia de

la fosfina (-3) al estado oxidado del ortofosfato (+5). Las reacciones oxidación por los microorganismos se lleva a cabo mediante fosfito el cual se oxida en la célula a compuestos orgánicos de fosfato. Las bacterias utilizan preferentemente fosfatos en lugar de fosfito (Alexander, 1994).

3.2.1.3.3 Producción de sideróforos

Dentro del período de 1908-2008 se reportó la capacidad solubilizadora de fosfatos por los ácidos: oxálico, cítrico, butírico, malónico, láctico, succínico, málico, glucónico, acético, glicónico, fumárico, adípico, indolacético y 2-cetoglucónico (Paredes y Espinoza, 2010). La presencia de ácidos orgánicos permiten la acidificación del suelo facilitando la absorción de este elemento, poseen carga negativa formando complejos al quelar los iones metálicos como el Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+3} y Al^{+3} que se encuentran asociados con fosforo insoluble y se transforman en fosforo soluble para la planta. Por reacciones químicas las bacterias son capaces de convertir el fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ en fosfato di y monobásicos asimilables para las plantas (Useche, 2003).

3.2.1.3.4 Reducción de formas minerales de fosfato férrico

En condiciones de anaerobiosis, la producción de sulfuro de Hidrógeno (H_2S) reacciona con el fosfato férrico (FePO_4) y lo precipita como sulfuro de Hierro (FeS) liberando así el fosfato (Figura 2), lo cual es importante debido a que el tipo y posición del ligando, además de la fuerza del ácido determina su eficacia en el proceso de solubilización (Lutz, 1990; Kpombrekou y Tabatabai, 1994).

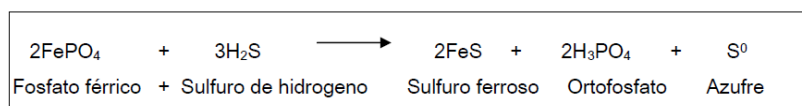


Figura 2. Reducción de formas minerales de fosfato férrico.

3.3 Mecanismos desarrollados por microorganismos solubilizadores de fósforo para promover el crecimiento de plantas

En el suelo se encuentran tanto microorganismos deletéreos como benéficos para las plantas. Los saprófitos benéficos de una amplia diversidad de grupos microbianos, son capaces de promover el crecimiento y la sanidad de las plantas. En estos grupos se encuentran los capaces de metabolizar materia orgánica, las PGPRs (rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal) y los hongos y bacterias antagonistas de patógenos de la raíz. Muchas rizobacterias y rizohongos promueven el crecimiento y desarrollo de las plantas debido, entre otros factores, a la producción de ácidos orgánicos, la solubilización de fosfato, la solubilización de sales insolubles de Zinc, la fijación asimbiótica de nitrógeno, el incremento de la nodulación simbiótica de leguminosas por rizobios que fijan N₂ y a la protección indirecta de la planta contra patógenos, debido a sus efectos antagonistas o a la liberación de antibióticos. Algunos géneros que contienen miembros con estas actividades, incluyen *Streptomyces*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Mortierella*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, entre otros (Hoffland *et al.*, 2004; Ping, 2004).

Generalmente este tipo de microorganismos actúan en tres formas diferentes: sintetizan compuestos particulares para las plantas, facilitan la absorción de ciertos nutrientes del suelo y disminuyen o previenen los problemas de enfermedades en las plantas (Hayat *et al.*, 2010).

Se han propuesto mecanismos directos e indirectos en la promoción del crecimiento y desarrollo de las plantas por parte de los microorganismos. Los mecanismos indirectos sobresalientes incluyen la prevención de efectos deletéreos de organismos fitopatógenos del suelo mediante la producción de sideróforos y la síntesis de antibióticos; y la producción de ácido cianhídrico (HCN) y de enzimas como la quitinasa y la β -1-3 glucanasa, que degradan la pared celular de los hongos. Se denota que en este tipo de mecanismos, aquellos microorganismos capaces de liberar algún metabolito que afecte otros

componentes de la rizosfera, lo que estimula un mejor desarrollo de la planta Kloepper *et al.*, (1991).

Por otro lado, los mecanismos directos incluyen la producción de metabolitos por parte de algunos PGPRs, los cuales estimulan el crecimiento vegetal y ocurren independientemente del resto de la población microbiana del suelo, indiferente del sustrato en que se encuentren. Entre los metabolitos producidos se conocen hormonas como auxinas, citocininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico. Las PGPRs tienen el potencial de contribuir a la promoción del crecimiento de las plantas en forma sostenible. El aislamiento e identificación de estos y otros microorganismos del suelo como algunas especies de *Bacillus* y *Pseudomonas* que combinan la capacidad de fijar nitrógeno con la producción de sustancias capaces de promover el crecimiento en las plantas, podría incrementar significativamente la productividad de muchos cultivos en todo el mundo (Rodríguez y Fraga 1999).

3.3.1 Síntesis de fitohormonas

Las bacterias solubilizadoras de fosfato podrían promover el crecimiento vegetal mediante la secreción de hormonas de plantas, como lo son ácido indol acético y giberelinas (Kloepper, 1988).

Las fitohormonas tienen un rol muy importante como reguladoras del crecimiento y desarrollo de las plantas. De acuerdo a la clasificación convencional, existen cinco grupos de fitohormonas: auxinas, giberelinas, citocinas, etileno y ácido abscísico (Perrig *et al.* 2007). Las fitohormonas contribuyen al funcionamiento de diversos procesos biológicos en las plantas, incluyendo la regulación de la quiescencia y germinación de semillas, la formación de raíces, florecencia y la maduración del fruto. A su vez, incrementan la resistencia de las plantas a factores ambientales y pueden inducir o suprimir la expresión de genes y la síntesis de enzimas, pigmentos y metabolitos (Tsavkelova, *et al.*, 2006).

Un aspecto importante de la interacción planta-bacteria y que está siendo cada vez más estudiada es la producción bacteriana de auxinas, las cuales son responsables de la división, extensión y diferenciación de las células y tejidos de la planta. Este grupo de fitohormonas estimulan la germinación de las semillas y el tubérculo así como la formación de raíces, controlan el proceso de crecimiento vegetativo, el tropismo y a su vez influyen en la fotosíntesis, formación de pigmentos y biosíntesis de metabolitos (Tsavkelova *et al.*, 2006).

3.3.1.1 Producción de Auxinas

Las auxinas son reguladores esenciales del crecimiento y desarrollo vegetal. El ácido indol-3-acético (AIA) es la auxina más estudiada debido a su clara acción en la formación de dominios apicales, diferenciación vascular y en el desarrollo de órganos (Tsavkelova *et al.*, 2006; Blakeslee *et al.*, 2005). Varios géneros bacterianos han sido reportados como productores de AIA, entre los cuales se pueden citar *Azotobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. (Ahmad *et al.*, 2006), *Azospirillum* sp. (Lugtenberg *et al.*, 2002), *Pantoea agglomerans* (Caballero *et al.*, 2007; Fuentes-Ramírez y Caballero-Mellado, 2005).

La síntesis de AIA en rizobacterias, está ligada principalmente a tres rutas metabólicas ampliamente conocidas por tener como precursor al triptófano (Patten & Glick, 2002). La primera ruta es la del ácido indol-3-piruvico (IPyA), presente en plantas y en varios microorganismos como en el caso de *Azospirillum* sp. y *Pseudomonas* sp. (Baca y Elmerich, 2007; El Sorra *et al.*, 2007). En la segunda ruta la formación de la triptamina a partir del triptófano se presenta como una vía alternativa para la producción de AIA. La producción de AIA en algunas cepas fitopatógenas, como *Pseudomonas syringae*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Erwinia herbicola*, presenta en común la síntesis de AIA vía indol-3-acetamida (IAM). Sin embargo, esta ruta metabólica también ha sido estudiada en bacterias simbióticas como *Rhizobium* spp. (Tsavkelova *et al.*, 2006). Baca y Elmerich (2007) sugieren una cuarta ruta metabólica dependiente de triptófano, esta ruta es la del indol-3-acetonitrilo (IAN), que ha sido caracterizada en plantas y bacterias,

en la cual participan activamente enzimas como las nitrilasas encargadas de generar el AIA a partir del indol-3-acetonitrilo. Entre las enzimas involucradas en la ruta del ácido indol-3-pirúvico se encuentran aminotransferasas aromáticas encargadas de convertir al L-Trp en IPyA, estas enzimas están reguladas por los genes AAT1 y AAT2, los cuales presentan su mayor expresión en presencia de altas concentraciones de triptófano (Tsavkelova *et al.*, 2006; Baca y Elmerich, 2007), así mismo, la indolpiruvato descarboxilasa (homotetramero) presenta una importante acción para la obtención del AIA. Esta enzima está regulada por la expresión del gen funcional IDPC, el cual está estrechamente ligado con la presencia del ácido indol-3-pirúvico. En la ruta del IAM la acción secuencial de dos enzimas es evidente, la triptófano 2-monooxigenasa y la indol-3-acetamida hidrolasa, encargadas de catalizar el triptófano hasta ácido-3-indol acético (Inzé *et al.*, 1984; Thomashow *et al.*, 1984; Schröder *et al.*, 1984; Baca y Elmerich, 2007).

La habilidad para sintetizar ácido indol acético (AIA) ha sido detectada en diversos géneros bacterianos rizosféricos tales como: *Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Acetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Xanthomonas* (Tsavkelova *et al.*, 2006), así como algunas especies del género *Streptomyces* (Manulis *et al.*, 1994).

3.3.1.2 Producción de Giberelinas

Las giberelinas son moléculas complejas de di-terpenos tetracarboxílicos (Baca y Elmerich, 2007), capaces de incrementar el crecimiento de los tallos, interrumpir el periodo de latencia de las semillas para germinar, inducir la brotación de yemas, así como, promover el desarrollo de los frutos (floración); a la fecha, se han caracterizado 136 especies químicas de giberelinas (Bottini *et al.*, 2004); varias especies químicas de giberelinas como las GA₁, GA₃ y GA₄ son codificadas por un solo gen, que fue mutado para determinar el efecto en la promoción de la elongación de las raíces en varios cultivos de interés (Bottini *et al.*, 2004). Este tipo de hormonas producidas por microorganismos, se describieron inicialmente en hongos, sin embargo, varios géneros bacterianos,

entre los que se pueden incluir *A. lipoferum* y *A. brasilense*, se han caracterizado por producir giberelinas en un rango de 20 a 400 pg· mL⁻¹, producidos por concentraciones celulares de 10⁸ UFC·mL⁻¹. Otros géneros bacterianos que han sido reportados como productores de giberelinas son *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* y *Bacillus* sp. (Bottini *et al.*, 2004), las cuales son capaces de producir una gran variedad de giberelinas. La biosíntesis de giberelinas está catalizada por tres clases de enzimas entre las que se puede encontrar terpeno ciclasas, la citocromo P450 monooxigenasa y las dioxigenasas, que están involucradas en la síntesis de Ga₁ y Ga₁₂, las cuales son las principales responsables en la elongación de los tejidos (Fukuda *et al.*, 1993).

3.3.2 Uso como agente de biocontrol

Algunas bacterias promueven el crecimiento vegetal de forma indirecta, mediante la restricción o inhibición de crecimiento de patógenos, como resultado de la coevolución (Tilak *et al.*, 2005; Usharani *et al.*, 2013).

El uso de las BSP ofrece una alternativa atractiva para reemplazar los fertilizantes químicos, pesticidas y suplementos; la mayoría de los aislamientos resulta en un incremento significativo del peso de la planta, longitud radicular y producción de materia seca de tallo y raíces (Siddiqui, 2006).

Algunas BSP, especialmente si son inoculadas en semillas, antes de plantarse, son capaces de establecerse en las raíces del cultivo. Sin embargo, también se puede considerar su uso en sistemas de manejo en los que se reduzca las tasas de agroquímicos, por ejemplo, en la práctica de trasplantes, para aumentar la resistencia a nemátodos y otras enfermedades en el campo (Kloepper *et al.*, 2004).

El uso de PGPB es una práctica común en muchas regiones del mundo como agentes biocontroladores, sin embargo la capacidad antagónica demostrada en el laboratorio muchas veces en campo tiene resultados inconsistentes; por lo que es necesario se investigue a fondo el mecanismo de colonización, mecanismo

de acción, formulación y aplicación, que pueda facilitar su desarrollo como promotor o reductor de enfermedades (Chakraborty et al., 2010).

Bacillus subtilis es una bacteria ampliamente usada como agente biocontrol debido a su amplio rango de hospedero, su habilidad para formar endosporas y producir distintos compuestos biológicamente activos (Nagorska et al., 2007).

Por otra parte, Jousset et al., (2009) determinaron que *Acinetobacter calcoaceticus* es antagonista debido a su capacidad de producir sideróforos, dicha capacidad fue observada contra fitopatógenos como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Coletotrichum capsicum* y *Fusarium oxysporum*.

El uso de bacterias solubilizadoras de fosfato que además sean agentes biocontrol, lo han estudiado recientemente algunos autores, como Khan et al., (2007) que utilizaron microorganismos solubilizadores de fósforo para controlar la secadera en tomate producida por *Fusarium oxysporum*, otro trabajo homólogo es el de Akgul y Mirik (2008) donde inocularon BSP en pimiento y observaron una disminución significativa de la presencia del patógeno, *Phytophthora blight*, causante de la enfermedad de tizón en pimientos, comparada con el control.

3.3.2.1 Modo de acción de bacterias antagónicas

Las bacterias tienen la capacidad de adherirse a la superficie radicular (rizoplaneo). Algunas de ellas son más especializadas ya que pueden penetrar el tejido de la raíz (endófitas) y así tener acceso directo a compuestos orgánicos presentes en el apoplasto; desde esta posición privilegiada, la bacteria no tiene que encarar las condiciones ambientales difíciles de la rizosfera (Kanchana et al., 2014).

Las bacterias, además de poseer una gran capacidad colonizadora pueden también sintetizar antibióticos, lo que resulta en una mejor protección a la planta contra patógenos y mayor producción agrícola (Weller, 1988).

Las características deseables en un microorganismo biocontrol son: rápido crecimiento y colonización en distintos ambientes, habilidad para competir con otros microorganismos por nutrientes, capaz de metabolizar distintos sustratos

como nutrientes, sobrevivir bajo estrés, habilidad de sintetizar amplio rango de metabolitos o antibióticos contra diversos patógenos de plantas y finalmente promover el crecimiento vegetal. Es deseable que tengan un largo periodo de almacén, como el caso de *Bacillus* que puede formar esporas, facilitando así su tiempo de anaquel (Paulitz y Bélanger, 2001). Además, la ventaja de utilizar bacterias como agentes biocontrol, es amigable con el ambiente y no genera resistencia en patógenos (Jacobsen *et al.*, 2004).

3.3.2.1.1 Producción de lipopéptidos

Diversas cepas de *Bacillus* tienen la capacidad de sintetizar compuestos de tipo lipopeptídico, los cuales han sido muy estudiados por sus actividades antagónicas hacia patógenos vegetales (Chen *et al.*, 2009; Leclere *et al.*, 2005; Leon *et al.*, 2009). En particular, los lipopéptidos como fengicina, surfactina e iturinas han mostrado su efectividad para suprimir el crecimiento de fitopatógenos (Chen *et al.*, 2009; Ongena *et al.*, 2005; Tsuge *et al.*, 2001). Lipopéptidos de la familia de iturinas, tales como iturina A, presentan actividades antagónicas específicas hacia hongos patógenos, pero no contra bacterias (Maget-Dana y Peypoux, 1994; Ongena *et al.*, 2005). Así mismo, se ha observado que dichos lipopéptidos muestran actividades hemolíticas. Esto último ha sido relevante como un sistema de pre-búsqueda para identificar actividades fungitoxicas (Rojas-Solís, *et al.*, 2013).

Otras especies de *Bacillus*, como *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45, de la cual se ha secuenciado completamente su genoma, revela características interesantes a destacar. Por ejemplo, el 7.5% del total del genoma corresponde a elementos genéticos involucrados en la síntesis de péptidos no ribosomales (Koumoutsi *et al.*, 2004). Además de tener actividades antifúngicas, la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 exhibió promoción de crecimiento vegetal por diversos mecanismos directos, como la producción de fitohormonas (Idris *et al.*, 2002).

3.3.2.1.2 Inducción de mecanismos de resistencia sistémica

Existen géneros bacterianos, como el de *Bacillus*, capaces de inducir resistencia sistémica (ISR), que es un mecanismo por el cual la planta defiende sus sistema y es inducida principalmente por bacterias (principalmente PGPR) para enfrentar una infección (Kloepper, *et al.*, 2004). Algunos autores comparan ISR con Resistencia sistémica adquirida (ASR), que no involucra la presencia de la bacteria. La bacteria puede ser similar fenotípicamente, incluso cuando la inducción de mecanismos y la respuesta de la planta son distintos (Compant *et al.*, 2005). En el caso de *Bacillus* es interesante notar la diversidad de especies que pueden inducir respuesta sistémica en plantas. Algunos ejemplos son: *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. pasteurii*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. mycoides* y *B. sphaericus*, por nombrar algunos (Ryu *et al.*, 2003; Kloepper *et al.*, 2004; Ongena *et al.*, 2007, Rudrappa *et al.*, 2010; Niu *et al.*, 2011). El efecto benéfico de la inducción de esta respuesta en la planta por *Bacillus*, es que protege a la planta de infecciones por varios patógenos ocasionadas por virus, bacterias, nemátodos y hongos (Kloepper *et al.*, 2004). Algunos lipopéptidos como surfactina y fengicina, son producidos por *B. subtilis* pueden también inducir resistencia sistémica en plantas (Ongena *et al.*, 2007). En años recientes, muchos estudios han intentado discernir los mecanismos que inducen resistencia sistémica en plantas, encontrando que compuestos volátiles juegan un papel importante en esa inducción. Algunos ejemplos de especies inductoras de resistencia sistémica a través de emisiones de compuestos volátiles son *B. subtilis* GBO3 y FB17, *B. cereus* AR156 y *B. amyloliquefaciens* IN937 (Ryu *et al.*, 2003; Rudrappa *et al.*, 2010; Niu *et al.*, 2011).

Recientemente, se ha sugerido que *B. subtilis* FB17 produce acetoina (3-hidroxi-2-butanona) que es responsable de desencadenar ISR en plantas de *A. thaliana* (Rudrappa *et al.*, 2010). En cuando al conocimiento que se tiene de la señalización de vías que responden a compuestos volátiles, particularmente de *B. subtilis* GB03, ISR fue inducido mediante vías dependientes de etileno, independientes de ácidos salicílico y jasmónico (Ryu *et al.*, 2004).

Algunos autores proponen que las PGPR pueden exhibir un mecanismo general para desencadenar ISR en plantas a través de vías dependientes de etileno y jasmonato (Pieterse *et al.*, 1998; Compant *et al.*, 2005). ISR es importante en la prevención o reducción de fitopatógenos. Compuestos de lipopéptidos volátiles son responsables en gran parte, de la inducción.

3.4 Uso de bacterias solubilizadoras de fósforo en México

En México se recomienda la utilización de biofertilizantes desde la Cumbre de la Tierra, celebrada en Rio de Janeiro en 1992, es considerado su uso, desde entonces, como biotecnología “apropiable”, que es un término creado para las herramientas biotecnológicas que contribuyen al desarrollo sostenible de un país y que proveen beneficios tangibles a los destinatarios que además son sustentables, culturalmente aceptables y amigables con el ambiente.

Las investigaciones existentes que involucran el aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico de la rizosfera de manglares, incluyen a *A. germinans* y *Laguncularia racemosa*, en el cual, Vázquez *et al.*, (2000) observaron que en cultivo líquido *Bacillus licheniformis* solubilizó 350 mg de fosfato de calcio por litro de suspensión bacteriana, cantidad suficiente para abastecer a una planta pequeña de mangle de su requerimiento diario de fósforo. Experimentos realizados con cultivos mixtos de bacterias han revelado interacciones sinérgicas benéficas entre los componentes del cultivo; por ejemplo, la bacteria fijadora de nitrógeno *Phyllobacterium* sp. aislada de las raíces del mangle, incrementó la fijación de nitrógeno en 200% cuando creció en cultivo mixto con *B. licheniformis*, bacteria solubilizadora de fosfato (Rojas *et al.*, 2001). Así mismo, la solubilización de fosfato por *B. licheniformis* se incrementó cuando creció en cultivo mixto con *Phyllobacterium* sp., la inhibición o promoción de la actividad diazotrófica en bacterias fijadoras de nitrógeno al asociarse con otras bacterias parece ser un fenómeno común (Holguin y Bashan, 1996), lo que sugiere el diseño de inoculantes mixtos basado en una selección de cepas que interactúen sinérgicamente en beneficio de las plantas.

Los primeros biofertilizantes microbianos distribuidos en grandes cantidades en el campo mexicano en grandes cantidades en el campo mexicano fueron los otorgados en el programa Alianza para el campo de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) durante el ciclo agrícola primavera-verano y otoño-invierno de 1999 – 2000. Los microorganismo utilizados fueron *Azospirillum brasilense*, *Glomus intraradices* y *Rhizobium etli*. En total se distribuyó material biológico para biofertilizar 1,882,263 ha en casi todo el país. Desde un principio tuvieron una amplia aceptación por los productores. Se han utilizado en cultivos perennes con diferentes sistemas de manejo debido a sus importantes y múltiples funciones en la agricultura, como en la nutrición de los cultivos, especialmente con nitrógeno-fósforo (Aguirre-Medina *et al*, 2009).

Es importante destacar que con la mayor aplicación de *Azospirillum* en México, en que se cubrieron cerca de dos millones de ha de maíz, se obtuvieron incrementos en producción de 26%, según reportes de Caballero-Mellado *et al*, (2000).

El frijol es el segundo cultivo de importancia en México y el primero en la dieta del segmento de población con menos recursos económicos, debido a su gran importancia, el Centro de Ciencias Genómicas (CCG), basados en estudios de genética y regulación de la fijación de nitrógeno, obtuvieron dos cepas mejoradas de *Rhizobium etli*, que al aplicarse como biofertilizante en frijol, mejoran significativamente su rendimiento y aún mejor, su contenido nutritivo del grano. Una de esas cepas aisladas es la denominada *Rhizobium etli*, aislada en Celaya, Guanajuato, caracterizada y nombrada con el náhuatl para frijol (*etl*) por la Dra. Esperanza Martínez-Romero (Martínez-Romero *et al*, 1998).

En el noroeste mexicano prevalecen condiciones ambientales adversas, incluyendo sequías frecuentes, falta de suficiente irrigación, alta salinidad y erosión del suelo, que pueden disminuir rápidamente la población de cualquier especie bacteriana introducida en el suelo, a menos que se tomen las precauciones necesarias para inoculación, por lo que la agricultura en zonas semiáridas de países en desarrollo es un desafío mayor para la tecnología de inoculación, sin embargo, en este tipo de agricultura las bacterias promotoras de

crecimiento vegetal pueden tener una contribución importante en caso de que puedan desarrollarse inoculantes baratos y de fácil aplicación. Con una instrucción apropiada, el productor de pequeñas parcelas familiares podría aplicar los inoculantes en el tiempo justo y en las dosis exactas (Bashan, 2008).

En México, la mayoría de inoculantes se utilizan en leguminosas y en menor extensión para cereales y forraje; este último recientemente ha ganado importancia en el noreste mexicano (Bashan, 2008).

3.4.1 Biofertilizantes a base de bacterias solubilizadoras de fósforo en México

La interpretación del término biofertilizante es muy amplia, representa desde microorganismos, abonos verdes y estiércoles, hasta extractos de plantas. De manera general, se puede decir que son productos que contienen microorganismos, que al ser inoculados pueden vivir asociados o en simbiosis con las plantas y le ayudan a su nutrición y protección (Vessey, 2003). Estos microorganismos se encuentran de forma natural en el suelo y abarcan diversos grupos; sin embargo, su población es afectada por el manejo de suelo y uso excesivo de agroquímicos (Caballero-Mellado *et al.*, 1992; Grageda-Cabrera *et al.*, 2003). Hay una confusión entre los términos “inoculantes microbianos” (común en la literatura científica), y “biofertilizante” (común en los círculos agrícolas) (Bashan, 2008). El “inoculante microbiano” es una formulación que contiene una o más cepas (o especies) de bacterias benéficas en un acarreador (orgánico, inorgánico o sintético) de fácil uso y económico. El inoculante es el medio de transporte bacteriano desde la fábrica hasta la planta. Los efectos deseados del inoculante en el crecimiento de la planta pueden incluir fijar nitrógeno en leguminosas, actuar como agentes de biocontrol de enfermedades transmitidas en el suelo, mejorar la absorción de nutrientes, solubilizar minerales en el suelo y producir hormonas que mejoren el crecimiento de la planta en general. En algunos países, los procedimientos para registrar un inoculante bacteriano pueden ser largos y costosos (Bashan, 2008).

Por otra parte, el “biofertilizante” es un término equivocado pero ampliamente utilizado, que significa “inoculante bacteriano” y se refiere a preparaciones de microorganismo(s) que pueden ser un sustituto parcial o total para la fertilización química (tales como los inoculantes de rizobia). Sin embargo, en estos fertilizantes no se tiene en cuenta si hay otros efectos bacterianos en el crecimiento de la planta. La razón por la cual se utiliza el término “fertilizante” es que en algunos países esto facilita su registro para uso comercial (Vessey, 2003). Más tarde, Fuentes-Ramírez y Caballero-Mellado (2005) definieron un biofertilizante como “un producto que contiene microorganismos vivos, que ejercen efectos benéficos directos o indirectos sobre el crecimiento y rendimiento de los cultivos a través de diferentes mecanismos”.

Los beneficios que presenta el uso de microorganismos en la agricultura se pueden concretar de la siguiente manera: a) Fitoestimulantes, estimulan la germinación de las semillas y el enraizamiento por la producción de reguladores del crecimiento, vitaminas y otras sustancias; b) Biofertilizantes, incrementan el suministro de los nutrientes por su acción sobre los ciclos biogeoquímicos, tales como la fijación de N₂, la solubilización de elementos minerales o la mineralización de compuestos orgánicos; c) Mejoradores, mejoran la estructura del suelo por su contribución a la formación de agregados estables; d) Agentes de control biológico de patógenos, desarrollan fenómenos de antagonismo microbio-microbio; e) Biorremediadores, eliminan productos xenobióticos tales como pesticidas, herbicidas y fungicidas; y f) Mejoradores ecofisiológicos, incrementan la resistencia al estrés tanto biótico como abiótico (Ahmad *et al.*, 2006).

Durante el siglo pasado, se produjeron formulaciones de acarreadores de turba para rizobia efectivos y aceptados en todo el mundo, sin embargo, su desarrollo ha alcanzado casi su límite. Los acarreadores sintéticos, transferidos de conceptos experimentales a inoculantes comerciales, ofrecen un mayor potencial y flexibilidad para la industria de la inoculación. Si bien es cierto que la industria es aún renuente al desarrollo de este tipo de acarreadores, debido a que en las prácticas agrícolas contemporáneas los inoculantes sintéticos con frecuencia son demasiado costosos para el cultivo objetivo, la biorremediación de contaminantes

podría sostener el desarrollo de tales inoculantes avanzados. Muchos tipos de formas encapsuladas de microorganismos se han desarrollado para su uso en la biorremediación. Muchos proyectos de este tipo son financiados por los gobiernos de países en desarrollo o por grandes industrias contaminantes en países desarrollados, los dos con muchos más recursos que un agricultor individual. A pesar del alto costo, los inoculantes más eficientes indudablemente serán usados en procesos de biorremediación, especialmente en emergencias. Los resultados de estos estudios pueden proporcionar nuevos materiales para inoculación y formulaciones con un reducido costo de desarrollo, para su uso en agricultura (Bashan, 2008).

La agricultura en países en desarrollo es definitivamente la mayor promotora de inoculantes microbianos que sean “ambientalmente amistosos”. No obstante, en México debe ponerse especial atención a las necesidades y restricciones de los pequeños agricultores que necesitan formulaciones de fácil aplicación y económicas. A corto y mediano plazo, la investigación debería enfocarse en el desarrollo de inoculantes sintéticos de mejor calidad y más económicos, sosteniendo al mismo tiempo la producción de inoculantes de turba para la agricultura (Malusá y Vassilev, 2014).

En la actualidad, se ha incrementado la producción nacional de inoculantes (INIFAP) apoyada inicialmente por el gobierno mexicano y ahora por productores o gobiernos estatales, que está disponible a mayor escala para los agricultores a lo largo del país. A pesar de este positivo desarrollo, la aplicación a gran escala de inoculantes microbianos encara serias dificultades en la mayoría de países en desarrollo, incluido México. Las prácticas agrícolas en países en desarrollo o bajo condiciones semiáridas son dos ejemplos en los cuales los inoculantes bacterianos pueden encontrar sus mayores retos (Bashan, 2008).

En países latinoamericanos, existe una amplia gama de factores tanto favorables como desfavorables que influyen en la calidad, producción y distribución de los biofertilizantes. En ocasiones, las empresas no cuentan con almacenes apropiados a gran escala o la estructura necesaria para su transportación. En otros, la tecnología e infraestructura para su producción no está

desarrollada. Es evidente que se necesita un organismo regulatorio que ejerza un fuerte control de los inoculantes presentes en el mercado para evitar que el agricultor adquiera productos de baja calidad (Elliott y Lynch, 1995).

En México, la mayoría de la producción actual de biofertilizantes se realiza por pequeñas empresas, instituciones de educación e investigación y por el INIFAP, apoyada por el gobierno federal y/o por gobiernos estatales. A pesar de este desarrollo, la distribución y aplicación a gran escala ha tenido serias dificultades, principalmente por problemas de promoción y distribución (Bashan, 2008).

En el Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (ICUAP), se formuló un biofertilizante a base de *Chromobacterium violaceum* y *Acinetobacter calcoaceticus*, que son BSP, denominado BIOfosfoBUAP, el cual posee bacterias que producen fosfatasa y ácidos orgánicos para liberar el fósforo, además de fitohormonas; en el 2010 Moisés Carcaño Montiel, su creador, indicó que el producto está dentro del “Proyecto Estratégico de Bioeconomía. Promoción y Transferencia de Tecnología para el uso de Biofertilizantes (Carcaño-Montiel, *et al.*, 2010).

Un grupo de investigadores que se ha interesado recientemente por la formulación de biofertilizantes a base de bacterias solubilizadoras de fósforo, el Colegio de Posgraduados (COLPOS, Tabasco), se evaluó el efecto del biofertilizante en el crecimiento de *Musa paradisiaca* AAA Simmonds y *Citrus aurantium* L. (Rivera-Cruz, *et al.*, 2008 y 2010, respectivamente). Estos investigadores estudiaron la efectividad y dosis eficiente de biofertilizantes hechos a base de sustratos orgánicos como cáscara de naranja, cachaza y estiércol de pollo, utilizados para inocular cultivos de interés agrícola, en los que observaron promoción de crecimiento de las plantas, las propiedades químicas del suelo y las densidades bacterianas del suelo.

En la literatura es común encontrar sólo aquellos reportes exitosos del uso de inoculantes. Por consiguiente, es difícil identificar los factores involucrados con la poca o nula respuesta de los cultivos. La aplicación eficaz de inoculantes a base de *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* (Sessitsch *et al.*, 2002);

Azospirillum (Caballero-Mellado *et al.*, 1992; Okon y Labandera-González, 1994); *Azotobacter* (Lakshmanan, 2000; Somers *et al.*, 2004), *Pseudomonas* (Gravel *et al.*, 2007), microorganismos solubilizadores de fosfato (Lugtenberg y Kamilova, 2009) y *Trichoderma* (Gravel *et al.*, 2007), para mejorar la nutrición de las plantas y la producción agrícola está bien documentada.

La cantidad de bacterias solubilizadoras de fosfato presentes en los suelos no es suficiente para garantizar una buena concentración de fosfato disponible para las plantas que allí se encuentren. Por esta razón, al inocular plantas con bacterias con capacidad fosfato en el suelo; además estas cepas son capaces de producir sustancias promotoras de crecimiento vegetal (Glick, 1995).

3.5 Uso de solubilizadoras de fósforo en algodón

El cultivo del algodón es típico de las zonas cálidas, en donde destaca Baja California. A nivel mundial, México se coloca en el 3er. lugar en condiciones agroecológicas idóneas en diversas regiones del país con un excelente rendimiento para la siembra de algodón, según el Comité Nacional Sistema Producto Algodón, A.C, quienes además proyectan que el año 2016 se espera la creación de 43,000 empleos, un ingreso adicional al PIB del sector primario sea de \$15,400 millones de pesos, que México sea autosuficiente en fibra de algodón, convirtiéndose en exportador de producto terminado al 2020 (SAGARPA, 2011).

Una de las limitantes en el cultivo es el suministro adecuado de fósforo a la planta ya que la presencia de suelos alcalinos, favorecen que este elemento tiende a ser inmovilizado, constituyéndose en un elemento poco móvil hacia la planta (Amezquita, 1992). En este sentido, el uso de microorganismos solubilizadores de fósforo, puede mejorar la producción y calidad de fibra, resultado de una mejor absorción de fósforo (Kumar *et al.*, 2014; Qureshi, *et al.*, 2012; Akhtar *et al.*, 2010; Egamberdiyeva *et al.*, 2004). Sin embargo, todos estos trabajos previos fueron realizados en Asia; por lo que resulta muy atractiva la búsqueda y posterior aplicación de BSP en México. En especial en suelos de regiones áridas que pese a los factores ambientales adversos, son altamente

productivos, como es el noreste de la República Mexicana, donde se encuentra el valle de Mexicali, que es uno de los mayores productores de algodón a nivel nacional. En esta región los suelos son altamente salinos, por lo que resulta más atractiva la búsqueda de bacterias nativas solubilizadoras de fósforo, para aprovechar las reservas naturales de fósforo. Estos organismos además deberán tener capacidad de potenciar el crecimiento vegetal, así como carácter antagónico, que provoque una disminución del uso de fertilizantes químicos y lograr el fortalecimiento de la práctica de una agricultura más amigable con el ambiente.

4. JUSTIFICACIÓN

En condiciones naturales, se ha demostrado que la relación microorganismo-planta ha contribuido al mantenimiento, funcionamiento y estabilidad de los ecosistemas. Sin embargo en la práctica agrícola, ésta relación de interdependencia ha sido menospreciada y poco estudiada, se interrumpió una simbiosis que evolucionó con las plantas, desde que se inició la colonización de la tierra. Como respuesta a la problemática ambiental generada por el uso indiscriminado de fertilizantes de síntesis química y a las inadecuadas prácticas adoptadas; se está trabajando en encontrar soluciones. Actualmente se llevan a cabo investigaciones para la formulación y producción de soluciones biológicas de fertilización que permitan un desarrollo óptimo de las plantas con una adecuada nutrición. Esta búsqueda se enfoca en potencializar la capacidad promotora de los microorganismos asociados a los cultivos, por medio de inoculantes, que utilizan microorganismos promotores de crecimiento. El uso de bacterias solubilizadoras de fosfato como microorganismos benéficos en biofertilizantes ha sido ampliamente referenciado por distintos investigadores. Con ellos se logra incrementar la concentración de fósforo disponible para la planta y disminuir el uso de fertilizantes químicos a base de fósforo. A nivel de campo, los productores han implementado el uso de productos biológicos a base de bacterias fosfato solubilizadoras en sus ciclos normales de producción. Con todo esto, es necesario destacar la importancia de un estudio que se dirija específicamente a este grupo bacteriano en su hábitat natural, como lo es el valle de Mexicali, estudiar su potencial solubilizador, carácter antagónico y capacidad de síntesis de fitohormonas *in vitro* para reunir la información necesaria para llevar a cabo inoculación microbiológica a plantas de interés agrícola.

5. HIPÓTESIS

La formulación de un inoculante a base de bacterias solubilizadoras de fósforo nativas del valle de Mexicali, que sean capaces de estimular el desarrollo fisiológico y sanidad del cultivo de algodón como resultado de un incremento de fitohormonas y presencia de genes relacionados con la antibiosis.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo General

- Aislar y caracterizar bacterias provenientes de la rizosfera de mezquite (*Prosopis glandulosa* Torr.) del Valle de Mexicali, para evaluar su capacidad de solubilización de fósforo en el cultivo de algodón.

6.2 Objetivos específicos

- Identificar molecularmente los aislados bacterianos procedentes de la rizosfera de mezquite mediante la amplificación de la región 16S ribosomal.
- Identificar los parámetros óptimos de crecimiento, producción de biopelícula y tolerancia a diferentes concentraciones de salinidad de los aislados bacterianos procedentes de la rizosfera de mezquite.
- Identificar la capacidad antagónica y los genes relacionados con la antibiosis de los aislados bacterianos procedentes de la rizosfera de mezquite.
- Evaluar la capacidad de solubilización de fósforo de aislamientos bacterianos procedentes de la rizosfera de mezquite en medios específicos y selectivos.
- Determinar la capacidad de producción de AG₃ (giberelina) y ácido indol-3-acético (auxina) de los aislados bacterianos procedentes de la rizosfera de mezquite, mediante pruebas bioquímicas.
- Evaluar el efecto de la inoculación de los aislados bacterianos procedentes de la rizosfera de mezquite en parámetros de germinación en semillas de plantas de interés agrícola.

-
- Evaluar los cambios en crecimiento y producción de fitohormonas (auxinas y giberelinas) en plantas de pepino previamente inoculados con los aislados bacterianos procedentes de la rizosfera de mezquite.
 - Evaluar el efecto de la inoculación de los aislados bacterianos procedentes de la rizosfera de mezquite en la producción de fitohormonas, fenoles y flavonoides, capacidad antioxidante, crecimiento y eficiencia fotosintética en el cultivo de algodón en condiciones de campo.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Aislamiento de microorganismos

El aislamiento de las bacterias solubilizadoras de fosfato se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California, donde se desarrolló el resto del proyecto.

7.1.1 Recolección de muestras

Las bacterias empleadas en este trabajo de investigación fueron aisladas a partir de muestras de suelo rizosférico de árboles de mezquite ubicados en el Valle de Mexicali, en el Ejido Nuevo León, de zonas no cultivadas (32°24'34 N / 115°11'16 O). La recolección de muestras se realizó al azar, de una profundidad de 10-15 cm, tomadas por triplicado, con un peso de 100 g aproximadamente (Figura 3). Las muestras se conservaron en bolsas polietileno a temperatura ambiente, hasta su análisis, que no excedió un tiempo máximo de 12 horas.



Figura 3. Proceso de recolección de muestras de suelo. a) Recolección de muestras de suelo rizosférico (15 cm de profundidad), b) muestras en bolsas de polietileno transportadas al laboratorio. c) muestras de 1 g de rizosfera tamizadas.

7.1.2 Aislamiento e identificación de BSF

Para el aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfatos inorgánicos se utilizó el medio Sundara, Rao y Sinha (1963). De cada muestra se tamizaron 10 g de suelo rizosférico, los cuales fueron diluidos en 9 mL de agua destilada estéril,

dilución 10^{-1} , se mezclaron con vortex durante 2 minutos y se realizaron diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-5} de suelo. A partir de cada dilución se sembró 0.1 mL de cada dilución en placas de medio sólido Pikovskaya (Anexo 1). Las cajas de Petri fueron incubadas a 30°C entre 5-7 días, se seleccionaron las colonias bacterianas que crecieron acidificando el medio de cultivo y que formaran halos de hidrólisis. El criterio para seleccionar las cepas solubilizadoras de fosfato, se llevó a cabo evaluando el halo de solubilización de zonas de aclaramiento (Valero, 2003) (Figura 4).

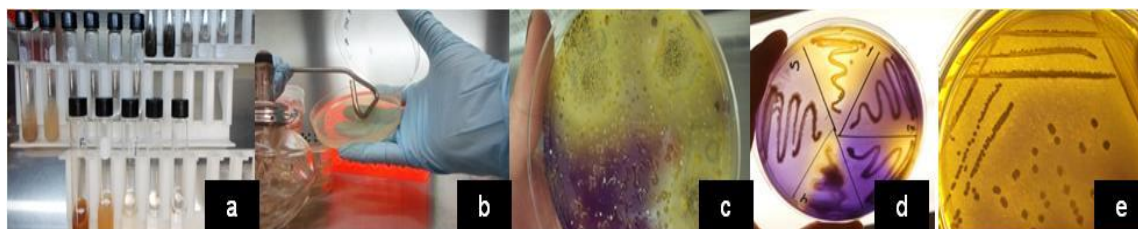


Figura 4. Proceso de aislamiento de BSF. a) Diluciones decimales de muestras de suelo en agua destilada. b) Extendido en placa de la dilución 10^{-5} . c) Crecimiento en medio Pikovskaya de flora nativa luego de 48 h de incubación a $30^{\circ}\text{C} \pm 2$. d) Selección de cepas solubilizadoras y e) aislamiento de BSF en Pikovskaya a las 72 h de incubación.

7.1.3 Aislamiento e identificación de bacterias con actividad antagónica

Durante la identificación de cepas solubilizadoras de fosfato, se identificaron colonias con capacidad antagónica frente a la flora nativa (Figura 5), por lo que se aislaron en placas de medio sólido nutritivo (Anexo 2) para su posterior análisis.

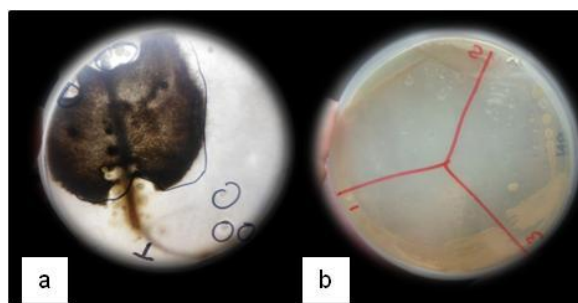


Figura 5. Identificación de cepas bacterianas con capacidad antagónica frente a fitopatógenos, en medio APD. a) Identificación de colonias bacterianas que inhiben crecimiento fúngico. b) Aislamiento de 3 cepas bacterianas.

7.2 Identificación molecular de microorganismos

A partir de una colonia aislada de bacterias, que se cultivó en tubo con caldo nutritivo, se obtuvo material genético por medio de la técnica descrita por Méndez-Trujillo (2013) de cada una de las cepas aisladas, posteriormente se amplificó el gen 16S ribosomal con los iniciadores universales denominados 27F y 495R (Anexo 7); cada amplificación se llevó a cabo en un termociclador MultiGene de Labnet, el programa de PCR se realizó como sigue: iniciación a 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 54°C por 40 s y extensión a 72°C por 3 min. Extensión final a 72°C por 7 min. Después de cada reacción, 5 µL del producto de PCR fue analizado en gel de agarosa 1%, conteniendo 1 µg·mL⁻¹ de bromuro de etidio y fotografiado con un fotodocumentador transiluminador.

Posteriormente se purificaron los productos de PCR con Quick PCR Purification de Invitrogen™, y los productos se enviaron a secuenciar. Las secuencias obtenidas que se compararon con la base de datos del Genbank mediante el algoritmo de BLAST.

7.3 Caracterización bioquímica de BSF

7.3.1 Acidificación de medio

A partir de colonias previamente aisladas, se colocaron preinóculos en caldo nutritivo, en matraces Erlenmeyer con capacidad de 500 mL. Se colocaron 200 mL de caldo nutritivo, inoculados con las cepas solubilizadoras de fósforo, a una concentración de 3x10⁹ UFC·mL⁻¹, utilizando como control un matraz inoculado con agua estéril, durante 3 días se incubaron a 26°C a 120 rpm. Se realizaron lecturas a las 0, 6, 12, 24, 48 y 72 h de haberse iniciado el ensayo. En cada medición se tomó una alícuota de 7 mL para centrifugar a 10,000 rpm durante 10 min y con un electrodo HI 9813-5 de HANNA instruments® se

realizaron las mediciones en los sobrenadantes. Cada medición se realizó por triplicado.

7.3.1.1 Pruebas cualitativas de solubilización

El índice de solubilización de fosfato se ensayó en medio Pikovskaya sólido, mediante la inoculación de BSF en medio PK sólido, a partir de un inóculo ajustado a 3×10^9 UFC·mL⁻¹. Tras la incubación a 30 ± 2 °C, durante 7 días se midió periódicamente el diámetro del halo alrededor de la colonia, para obtener el índice de solubilización (IS), mediante la fórmula propuesta por Kumar y Narula, (1999): $IS = (\text{Diámetro colonia} + \text{Diámetro de halo}) / \text{Diámetro de colonia}$; así como también la capacidad e inicio de solubilización (Anexo 13) según lo descrito por Kundu et al., (2008) y Dos Santos Hara y De Oliveira, (2005), respectivamente.

7.3.1.2 Prueba cuantitativa de solubilización

Las bacterias capaces de solubilizar el fosfato tricálcico en medio sólido, se analizaron, con kit de BioAssay Systems, QuantiChrom® Phosphate Assay Kit (DIPI-500), el cual mide el ion fosfato directamente de las muestras, mediante el método colorimétrico que emplea verde malaquita y molibdato, que forman un complejo coloreado estable, específicamente con fosfato inorgánico. La intensidad del color se midió a 620 nm, el dato fue directamente proporcional a la concentración de fosfato en la muestra. La lectura de muestras se realizó en un espectrofotómetro Biomate 3 de Thermo Scientific®.

7.3.2 Tolerancia a medio salino

Como parte de la caracterización bioquímica de las BSF se consideró importante conocer la capacidad de crecimiento en un medio nutritivo con 4 concentraciones distintas de NaCl, que fueron: 0.01, 0.1, 0.5 y 1 M. El proceso

consistió en inocular matraces con cada una de las cepas solubilizadora de fósforo, y se realizaron lecturas a los 0,3, 6, 12, 24, 48 y 72 h, después de la inoculación, como control se uso medio inoculado con agua destilada. Los datos reportados son promedios de tres réplicas en términos de D.O. (600 nm) y UFC·mL⁻¹.

7.3.3 Formación de biopelícula

Se analizó la capacidad de formación de biopelícula de las cepas solubilizadoras de fósforo aisladas, a través del método descrito por Arruebarrena Di Palma *et al.*, (2012); se obtuvieron las lecturas de D.O de los cultivos y se tiñeron las biopelículas formadas con cristal violeta para medir absorbancia de las muestras. Los datos fueron normalizados usando la siguiente fórmula: Biopelícula normalizada = D.O. crecimiento / D.O. Cristal violeta.

7.3.4 Cuantificación de producción de fitohormonas

7.3.4.1 Cuantificación de ácido indol-3- acético (AIA)

La detección cuantitativa del análisis de ácido indol-3 acético se llevó a cabo con el método sugerido por Gordan y Weber (1951), con algunas modificaciones que propusieron Brick *et al.*, (1991). Se inocularon 3x10⁹ UFC·mL⁻¹ en 10 mL de caldo nutritivo suplementado con L-triptófano (100 µg·mL⁻¹), contenido en tubos de vidrio, protegidos de la luz, incubados a 120 rpm a 26°C durante 24 h, transcurrido el periodo de incubación, se tomó una alícuota de 2 mL para cosechar las células por centrifugación (10,000 rpm) durante 10 min, a 1 mL de sobrenadante se la adicionó 1 mL de reactivo de Salkowski (Anexo 4), la reacción se incubó a 28°C durante 1 h en oscuridad. La concentración de AIA se determinó con espectrofotómetro Biomate 3 de Thermo Scientific (λ540 nm), comparado una curva estándar (Anexo 5).

7.3.4.2 Detección de Giberelina-3 (AG₃)

Se realizó la cuantificación de la giberelina-3, bajo el esquema de trabajo de Holbrook *et al.* (1981) con algunas modificaciones. En matraces Erlenmeyer con capacidad de 125 mL se inocularon 3×10^9 UFC·mL⁻¹ de BSF, incubados en 25 mL de caldo nutritivo a 26°C durante 24 h a 120 rpm. A continuación se cosecharon las células y se tomaron 15 mL de sobrenadante, se agregaron 2 mL de reactivo de Zinc-acetato (Anexo 6). Transcurridos 2 minutos, se adicionaron 2 mL de ferrocianido de potasio (Anexo 6). La mezcla se centrifugó a 2000 rpm durante 15 minutos. Se tomaron 5 mL del sobrenadante, se adicionaron 5 mL de HCl 30%. Se incubó a 26°C durante 75 min y se realizaron lecturas en el espectrofotómetro Biomate 3 de Thermo Scientific® ($\lambda 254$ nm), a partir de un blanco de HCl 5%, los resultados se calcularon a partir de una curva de concentraciones conocidas (Anexo 6).

7.4 Determinación de carácter antagónico contra fitopatógenos

7.4.1 Cultivos duales

A partir de aislados bacterianos, denominados como B1, B2 y B3, que presentaron una inhibición de microorganismos, se procedió a evaluar su capacidad antagónica mediante la técnica de cultivo dual. Las cepas aisladas se confrontaron con hongos fitopatógenos nativos de la zona de estudio. El proceso consistió en colocar al hongo fitopatógeno al centro de la caja Petri con agar papa dextrosa (Anexo 3) y se procedió a investigar en 4 modelos de crecimiento la capacidad de inhibición de crecimiento (Anexo 6), mediante el registro del diámetro de crecimiento de ambos microorganismos. Esta actividad se realizó diariamente hasta el noveno día. El porcentaje de inhibición de crecimiento (%IC), de cada aislado se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\%IC = ((\text{Diámetro Control} - \text{Diámetro tratamiento}) / \text{Diámetro Control}) \bullet 100$$

7.4.2 Análisis morfológico de fitopatógeno en contacto con bacterias antagónicas

La microscopía de fuerza atómica (MFA) desarrollada en este trabajo fue realizada en la Facultad de Ingeniería de la UABC-Mexicali, con el objetivo de observar cambios morfológicos en el fitopatógeno, luego de ser expuesto al contacto directo con *Bacillus*. A partir de inóculos ajustados (10^9 bacteria/espora), se crecieron en cámara húmeda (Anexo 9) diseñada para poner en contacto ambos microorganismos y obtener alícuota que pueda ser observada en microscopio de fuerza atómica, de acuerdo a la metodología descrita por Slimene *et al.*, (2012) para de esta manera poder evaluar el efecto en la morfología del hongo fitopatógeno.

7.4.3 Identificación de genes lipopeptídicos

A partir de DNA total de cada cepa bacteriana antagonista (B1, B2 y B3), se realizó PCR bajo el siguiente esquema: iniciación a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 58°C por 30 s y extensión a 72°C por 1 min. Extensión final a 72°C por 7 min, utilizando los oligonucleótidos indicados para identificar los genes polipeptídicos de subtilisina, subtilosina e iturina (Anexo 7). Después de cada reacción, 5 μ L del producto de PCR fueron analizados en gel de agarosa 1%, conteniendo 1 μ g·mL⁻¹ de bromuro de etidio y fotografiado con un fotodocumentador transiluminador. Los productos de PCR se purificaron y secuenciaron por Life Technologies Corporation® (California, USA). Las secuencias obtenidas en este trabajo se analizaron en el algoritmo de BLAST para su comparación en la base de datos de secuencias nucleotídicas de la NCBI, para encontrar homología con genes previamente reportados.

7.5 Efecto de cepas solubilizadoras de fósforo en la germinación de semillas

El efecto de las BSF, sobre el crecimiento vegetal se determinó en distintas semillas, mediante el siguiente proceso: a partir de un inóculo ajustado (Anexo 8), se inocularon 25 mL de caldo nutritivo adicionado de sacarosa al 10% (adherente), contenidos en matraces con capacidad de 125 mL, para el control, se empleó caldo nutritivo estéril sin la adición de microorganismos; se les adicionó las semillas (previamente desinfectadas con hipoclorito de Sodio al 5% y enjuagadas con agua destilada estéril), los matraces se incubaron a temperatura ambiente en agitador a 100 rpm durante 8 horas y al término del periodo de incubación, se decantó el medio y las semillas se colocaron en cajas Petri con papel absorbente estériles, que se dejaron secar por 12 h (Figura 6), transcurrido el tiempo, las semillas inoculadas fueron sometidas a la técnica de Recuento de Unidades de Colonia (Anexo 10), para verificar la presencia bacteriana.



7.5.1 Parámetros fisiológicos en plántulas inoculadas con BSF

Los experimentos que se realizaron en plántulas siempre partieron de la inoculación de semillas (Anexo 8), teniendo como control un tratamiento sin la presencia de microorganismos. Cada tratamiento tuvo 10 réplicas. Para el análisis de germinación, la unidad experimental consistió de 10 semillas tratadas colocadas en una caja de Petri estéril que contenía papel filtro y 5 mL de agua estéril. Se incubaron a 30°C durante el periodo en días que cada experimento indica (dependiendo del tipo de semilla) y se midieron longitud radicular apical, número de raíces secundarias, arquitectura radicular, peso fresco y peso seco. Para la evaluación de la promoción de crecimiento, se consideró como unidad experimental vasos de unicel con peat-moss estéril, con y sin semillas inoculadas. Cada tratamiento consistió de 10 réplicas. El periodo total de tiempo de incubación fue de 28 días, los datos fueron recabados a los 14 y 28 días de crecimiento. Los parámetros de crecimiento que se registraron fueron: longitud de tallo, arquitectura radicular, área foliar, cuantificación de AG₃, AIA, flavonoides, fenoles totales y antioxidantes.

7.5.2 Plántulas de algodón tratadas con bacterias antagónicas expuestas posteriormente a fitopatógeno

Se investigó la capacidad de las cepas con carácter antagónico de prevenir o disminuir el daño ocasionado por la presencia de *F. solani* hb. El análisis se inició con la inoculación de semillas de algodón con las bacterias antagónicas, se utilizó como control semillas sin la adición de bacterias; se sembraron en macetas conteniendo sustrato estéril *peat moss*. A los 14 días de la inoculación, se agregó una suspensión del fitopatógeno, cada tratamiento constó de 3 réplicas de 10 semillas cada una. El periodo total de incubación fue de 28 días (contados a partir del día de la siembra), los parámetros fisiológicos que se contemplaron fueron: longitud radicular y de tallo, arquitectura radicular, porcentaje de daño radicular,

puntos de infección, área foliar; las variable bioquímicas tomadas en cuenta fueron: AIA, AG₃ antioxidantes, flavonoides y fenoles.

Se evaluó la patogenicidad observada (Venturini *et al.*, 2013) en términos de porcentaje de germinación, colonización de semilla, descomposición de radícula, índice de severidad de enfermedad, índice de infección, así como también la cuantificación de AIA, AG₃, flavonoides, fenoles totales y antioxidantes (Anexo 13). En el Anexo 11 se observan las fórmulas empleadas para calcular cada parámetro fisiológico mencionado.

A continuación se muestran los tratamientos que comprendidos en este experimento, así como sus respectivas nomenclaturas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Nomenclatura de tratamientos en plántulas de algodón inoculadas con bacterias antagónicas expuestas posteriormente a *Fusarium*.

Tratamiento	Composición de inóculo
B1	<i>B. subtilis</i> 1
B2	<i>B. subtilis</i> 2
B3	<i>B. subtilis</i> 3
Control	Agua estéril
Mix	<i>B. subtilis</i> 1, 2 y 3
B1+Fshb	<i>B. subtilis</i> 1+ <i>F. solani</i> hb
B2+Fshb	<i>B. Subtilis</i> 2+ <i>F. solani</i> hb
B3+Fshb	<i>B. subtilis</i> 2+ <i>F. solani</i> hb
Control+Fshb	<i>F. solani</i> hb
Mix+Fshb	<i>B. subtilis</i> 1, 2 y 3 + <i>F. solani</i> hb

7.5.3 Aplicación de BSF en campo

Se inocularon semillas de algodón de DELTAPINE[®], con inóculo ajustado (Anexo 8) de la cepa solubilizadora de fosfato denominada *Acinetobacter calcoaceticus* ICABa02 (KJ190163.1), contenida en medio de cultivo adicionado de adherente, con un recuento de 3×10^9 UFC·mL⁻¹. Se inocularon las semillas y fueron sembradas con maquinaria (Figura 7). Semillas no tratadas fueron consideradas como control. Las coordenadas de la ubicación del terreno son: 32°63'43 / 114°96'66 en el Ejido Vicente Guerrero, Mexicali, Baja California. En la figura 8 se observa la ubicación geográfica de la parcela donde se desarrolló el trabajo en campo, que comprendió una extensión total de 7.4 ha. Las variables medidas durante la aplicación en campo se presentan en el Cuadro 2, así como también la calendarización que se programó para el análisis del proyecto.



Figura 7. Inoculación de semillas a nivel de campo. De izquierda a derecha: inóculo bacteriano, semilla empleada, inoculación en un mezclador y visita a campo.



Figura 8. Ubicación geográfica de la parcela donde se desarrolló el trabajo en campo. La zona roja indica el área total del cultivo.

Cuadro 2. Calendario de actividades en la inoculación en campo.

Fecha	Días desde la siembra	Estado fenológico**	Observaciones
9-03-2014	0	9	Inoculación de semillas
27-03-2014	18	10	Muestreo *
30-04-2014	52	19	Recuento UFC · g ⁻¹
04-05-2014	56	32	Inoculación en agua de riego
04-06-2014	81	51	Recuento UFC · g ⁻¹
29-07-2014	136	72	Muestreo *
15-09-2014	184	87	Muestreo *
24-09-2014	193	89	1 semana antes de agregar defoliante. Fotografías finales (Figura 34). Recuento UFC · g ⁻¹

*Medición de parámetros fisiológicos y bioquímicos de plántulas de algodón

**Codificación BBCH (Hack *et al.*, 1992) de los estadios fenológicos de desarrollo del algodón.

7.6 Diseño Experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar con al menos 3 repeticiones en cada medición, el número de variables varió de acuerdo al tipo de experimento. Se realizó análisis de varianza y prueba de Tukey ($P \leq 0.05$), mediante el programa STATISTICA versión 8.0.

La topología de los árboles filogenéticos se obtuvo mediante el análisis de secuencia, realizado con el método de distancia o *neighbor-Joining* (Allendorf, 2011), en el programa MEGA versión 6.0.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Aislamiento de microorganismos

8.1.1 Identificación molecular de BSF

Los resultados de la secuenciación del gen 16S (Figura 9), mostraron que las cepas con capacidad solubilizadora de fósforo, presentaron alta homología con el género *Acinetobacter*, las cuales fueron depositadas en la base de datos del GeneBank, con nomenclaturas y números de acceso presentados en el Cuadro 3. Dicha homología se confirmó con el árbol filogenético en donde se observa que existe una clara diferencia genotípica entre las 4 cepas.

El hallazgo de cepas bacterianas solubilizadoras de Fósforo que pertenezcan al género *Acinetobacter*, no es novedoso ya que en trabajos previamente reportados, como el de Ogut *et al.*, (2010) se realizó la búsqueda de bacterias solubilizadoras de fósforo en suelos de Turquía, describiendo una colección de 21 aislamientos, de los cuales 7 se identificaron como *Acinetobacter* sp. Sin embargo, es poco común a comparación de otros géneros, como *Pseudomonas* y *Bacillus* (Illmer y Schinner, 1992). Incluso, en estudios anteriores como los de Rodríguez y Fraga, (1999) y Vázquez *et al.*, (2000), el género no figura, probablemente por los tipos de suelo con los que se había trabajado.

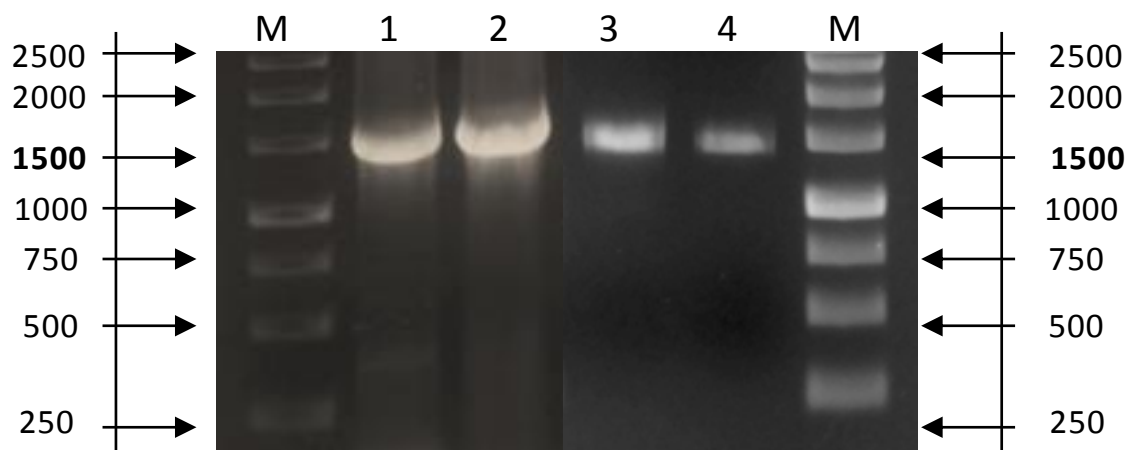


Figura 9. Amplificación de 16S ribosomal de cepas con solubilizadoras de Fósforo. Abreviaturas: Marcador molecular (M), ICA01 (1), ICA02Ba (2), ICA03Bs (3) e ICA04Ma (4).

Cuadro 3. Identificación de cepas solubilizadoras de Fósforo.

Nombre de aislamiento	Homología (%)	Clave de acceso
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ICA01	99	KJ190162.1
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ICA02Ba	99	KJ190163.1
<i>Acinetobacter</i> sp ICA03Bs	99	KJ190164.1
<i>Acinetobacter</i> sp ICA04Ma.	99	KJ190165.1

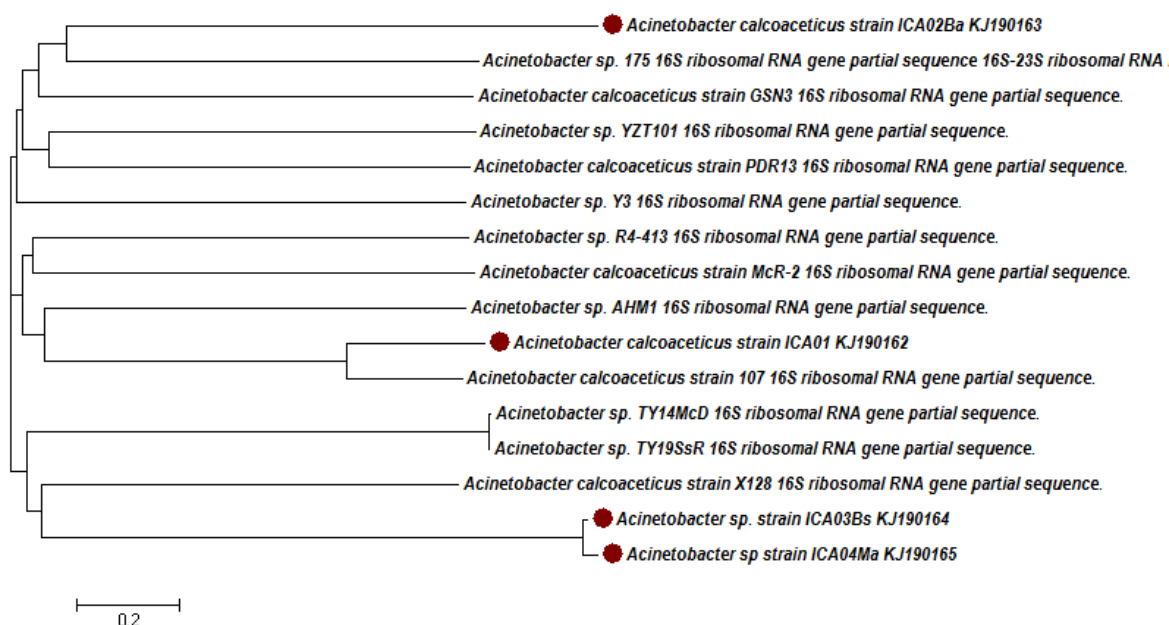


Figura 10. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen 16S ribosomal, de las bacterias solubilizadoras de fósforo aisladas, construido utilizando el método *neighbor-joining*. Se indican porcentajes de con un valor de *bootstrap* de 1000, aparecen solamente valores mayores a 90%. Se observa la relación cercana entre las 4 cepas y sus semejantes más cercanos dentro del género *Acinetobacter*.

8.1.2 Identificación molecular de bacterias con carácter antagonista

Durante el desarrollo del trabajo se identificaron 3 cepas bacterianas que mostraron capacidad antagónica, las cepas se denominaron B1, B2 y B3, a partir de la obtención de las secuencias obtenidas de la amplificación del gen 16S ribosomal (Figura 11), se observó una homología del 99% con *Bacillus subtilis*; dicho resultado es congruente con lo postulado por Sivasakthi *et al.*, (2013) que

indicaron que *Bacillus* es el género más abundante de la rizosfera y se ubica en la vecindad inmediata de las raíces de las plantas, además, ha sido descrito ampliamente la capacidad que posee el género como agente biocontrol y biofertilizante (García *et al.*, 2004; Amer y Utkhede, 2007; Hafeez *et al.*, 2006; Hamid y Ahmaj, 2010). Sin embargo, los trabajos reportados de *Bacillus* como solubilizador que a la vez sea agente biocontrol, son escasos, como ejemplo está el de Tejera-Hernández *et al.*, (2013) donde aislaron 58 cepas identificadas como *Bacillus* solubilizadores de fosfatos asociados al cultivo del arroz, obtenidos de suelos de Cuba, sin que hayan presentado capacidad antagonica a la vez.

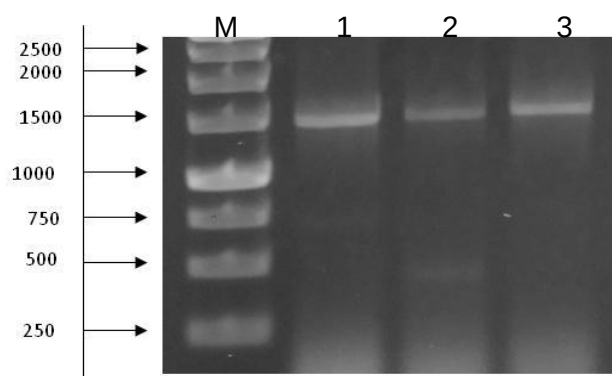


Figura 11. Amplificación de 16S ribosomal de cepas con carácter antagonista. Abreviaturas: Marcador molecular (M), B1 (1), B2 (2) y B3 (3).

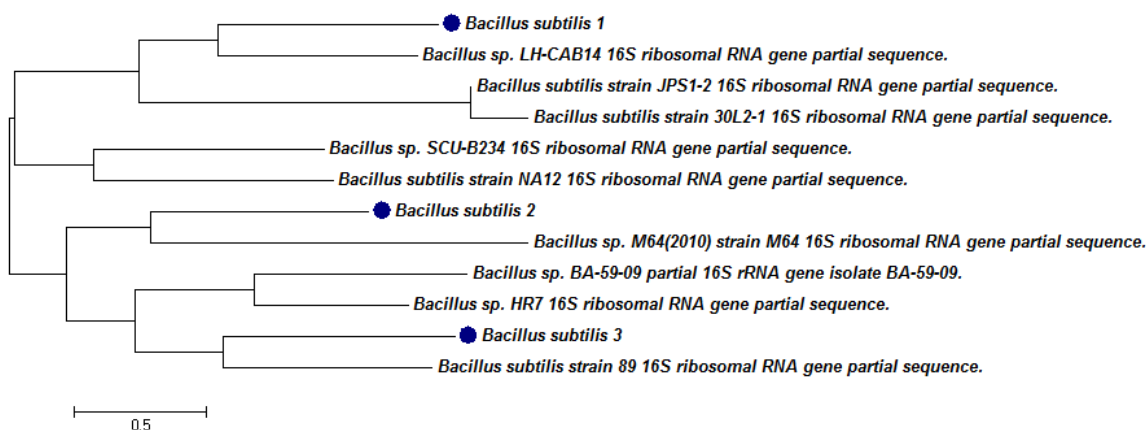


Figura 12. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen 16S ribosomal, de las bacterias antagonicas aisladas, construido utilizando el método *neighbor-joining*. Se indican porcentajes de con un valor de *bootstrap* de 1000, aparecen solamente valores mayores a 90%. Se observa la relación cercana entre las 4 cepas y sus semejantes más cercanos dentro del género *Bacillus*.

8.1.3 Identificación molecular de hongo aislado de plantas de algodón

Durante la experimentación en campo, se identificaron algunas plantas de algodón enfermas (secas), en algunas áreas bien definidas de la plantación, por lo que al analizarlas se identificó la presencia de un fitopatógeno, que al analizarlo molecularmente, mediante la amplificación de la región ITS (Figura 13), se obtuvo una homología del 99% con *Fusarium solani*. Desde años atrás, es bien sabido que *F. solani* es uno de los microorganismos que contribuyen al complejo de enfermedades de plantas de algodón (Davis *et al.*, 1981). Sin embargo, en los trabajos publicados se ha dado poca énfasis a su importancia como patógeno, debido a que se considera que *F. oxysporum* es el mayor agente causal del marchitamiento, ya que su frecuencia de aparición es mayor al de *solani*, que solo se ha encontrado afectando el cultivo en el mes de agosto (Abd-Elsalam *et al.*, 2006); Empero los aislados de *F. solani* siempre se han identificado como mayormente virulentos comparados con otras especies (Colyer, 1988).

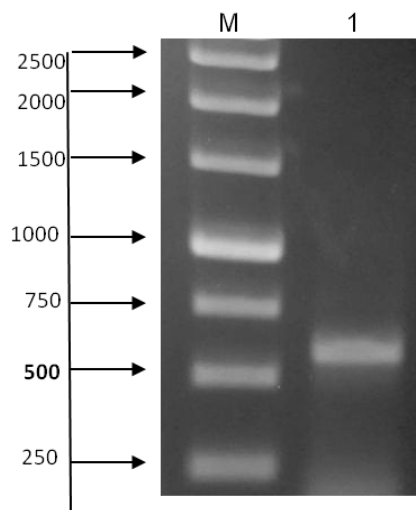


Figura 13. Amplificación de región ITS de hongo aislado en plantas de algodón. Abreviaturas: Marcador molecular (M) y *Fusarium solani* (1).

8.2 Caracterización bioquímica de bacterias solubilizadoras de fósforo

El criterio para hacer la selección de bacterias solubilizadoras de Fósforo, se llevó a cabo evaluando la presencia de zonas de aclaramiento y acidificación

por parte de las colonias aisladas en medio Pikovskaya sólido (Beltrán *et al.*, 2005) (Figura 14). Fueron descartadas del estudio todas aquellas bacterias que no lograran acidificar el medio de crecimiento ni formar el halo de aclaramiento en un periodo máximo de 3 días a 30°C y que éste tuviera un diámetro mayor a 5 mm. Los aislamientos fueron codificados de acuerdo a una numeración interna que indicaba la zona y el número de muestra de suelo aislada.

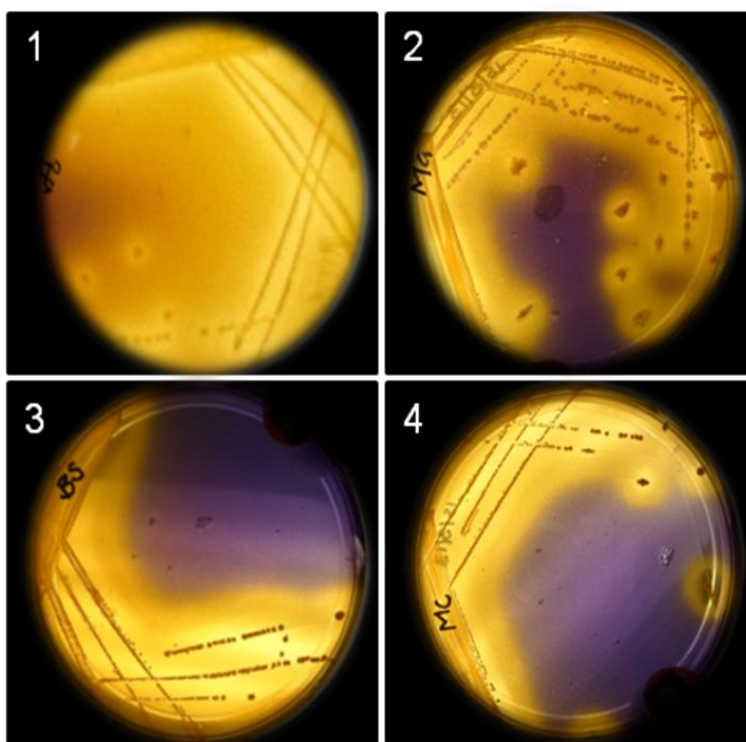


Figura 14. Aislamiento de BSF cultivadas en medio Pikovskaya, en un periodo de incubación de 72 h a 30°C. *Acinetobacter calcoaceticus* ICA01 (1), *Acinetobacter calcoaceticus* ICA02Ba (2), *Acinetobacter* sp ICA03Bs (3) y *Acinetobacter* sp ICA04Ma (4).

8.2.1 Curva de crecimiento

Para el desarrollo de los experimentos es necesario el contar con una población metabólicamente similar de cada cepa aislada. De tal forma que el conocer su comportamiento en su crecimiento a través del tiempo nos permite seleccionar el tiempo en la fase exponencial en donde todas cepas comparten la misma densidad poblacional. En este sentido los resultados del crecimiento

microbiano medido por los cambios en la densidad óptica (600nm) y UFC·mL⁻¹ mostraron que la fase exponencial de óptima en donde las cuatro cepas presentaban un crecimiento similar (3×10^9 UFC·mL⁻¹) sin cambios significativos fue a las 12h (Figura 15 a, b). Es importante indicar que la cepa ICA-01, fue la que presentó un mayor crecimiento significativo a partir de las 48 h ($P \leq 0.05$), hasta el final del experimento con respecto a las otras cepas evaluadas.

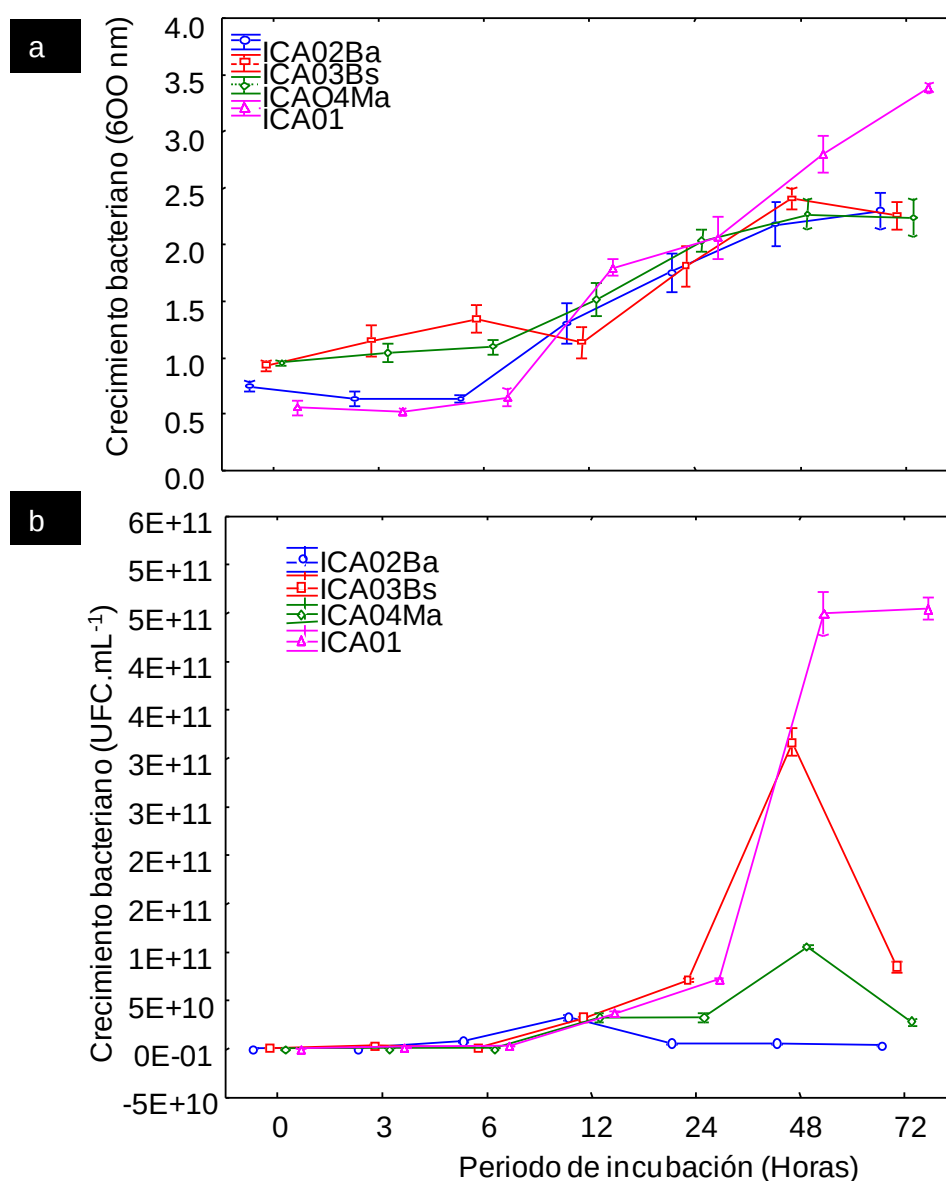


Figura 15. Cinéticas de crecimiento de BSF aisladas. Determinación de crecimiento bacteriano en términos de densidad óptica (a) y recuento de UFC·mL⁻¹ (b).

8.2.2 Índice de solubilización

Una vez que se conoció la curva de crecimiento de las bacterias, se adicionó un inóculo ajustado en cajas Petri con Pikovskaya para poder determinar el índice de solubilización (Figura 16) que fue observado durante 1, 3 y 7 días.

Los datos obtenidos de índice de solubilización (Cuadro 4) se obtuvieron a partir del cálculo realizado con la fórmula detallada en el apartado 7.3.1.1. Donde se puede apreciar que el IS se va incrementando conforme pasa el tiempo de incubación, lo que indica que al séptimo día las bacterias continuaron solubilizando el fósforo insoluble del medio de cultivo. Los resultados también mostraron que la cepa ICA01 presentó cambios significativos en el IS ($P \leq 0.05$), con respecto a las otras cepas evaluadas desde inicio y hasta el final del experimento. En el caso de las cepas ICA02Ba e ICA03Bs, los valores de IS, no mostraron cambios significativos al inicio del experimento ($P \geq 0.05$). Sin embargo, al final del experimento la cepa ICA02Ba fue la que presentó un valor significativamente mayor de IS con respecto a la cepa ICA03Bs e ICA04Ma. En contraste, la cepa ICA04Ma, fue la que presentó cambios menores en los valores de IS con respecto a las otras cepas evaluadas. En estudios similares realizados en suelos alcalinos de Lucknow, India, en *P. fluorescens* (Nautiyal, 1999), se han obtenido valores de IS menores que los observados en el presente trabajo. Por otra parte, IS que alcanzaron las 4 BSF al tercer día, es igual al de las cepas aisladas por Alam *et al.*, (2002), al séptimo día, lo que indica un potencial solubilizador mayor y más eficiente. Según la escala de clasificación de Otalora (2003) (Anexo 14), las cepas aisladas en este trabajo poseen una capacidad de solubilización media y un inicio de solubilización precoz. Cabe señalar que Ogut *et al.*, 2010 observaron que las cepas de *Acinetobacter* podían mantener la capacidad solubilizadora a pesar de hacer hasta 6 cultivos consecutivos, lo cual es consistente con las cepas aisladas en este trabajo; es decir, que no perdieron su fenotipo solubilizador.

Cuadro 4. Índice de solubilización de las BSF en diferentes días de incubación

Periodo de incubación (Días)	Tratamientos			
	ICA02Ba	ICA03Bs	ICA04Ma	ICA01
1	2.57 ^a	2.56 ^a	2.47 ^b	2.76 ^c
3	3.49 ^a	3.61 ^b	3.02 ^c	3.58 ^d
7	3.91 ^a	3.85 ^b	3.40 ^b	4.38 ^d

Resultados son expresados como medias de valores de cinco experimentos. Valores con la misma letra dentro de cada línea son iguales de acuerdo a prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

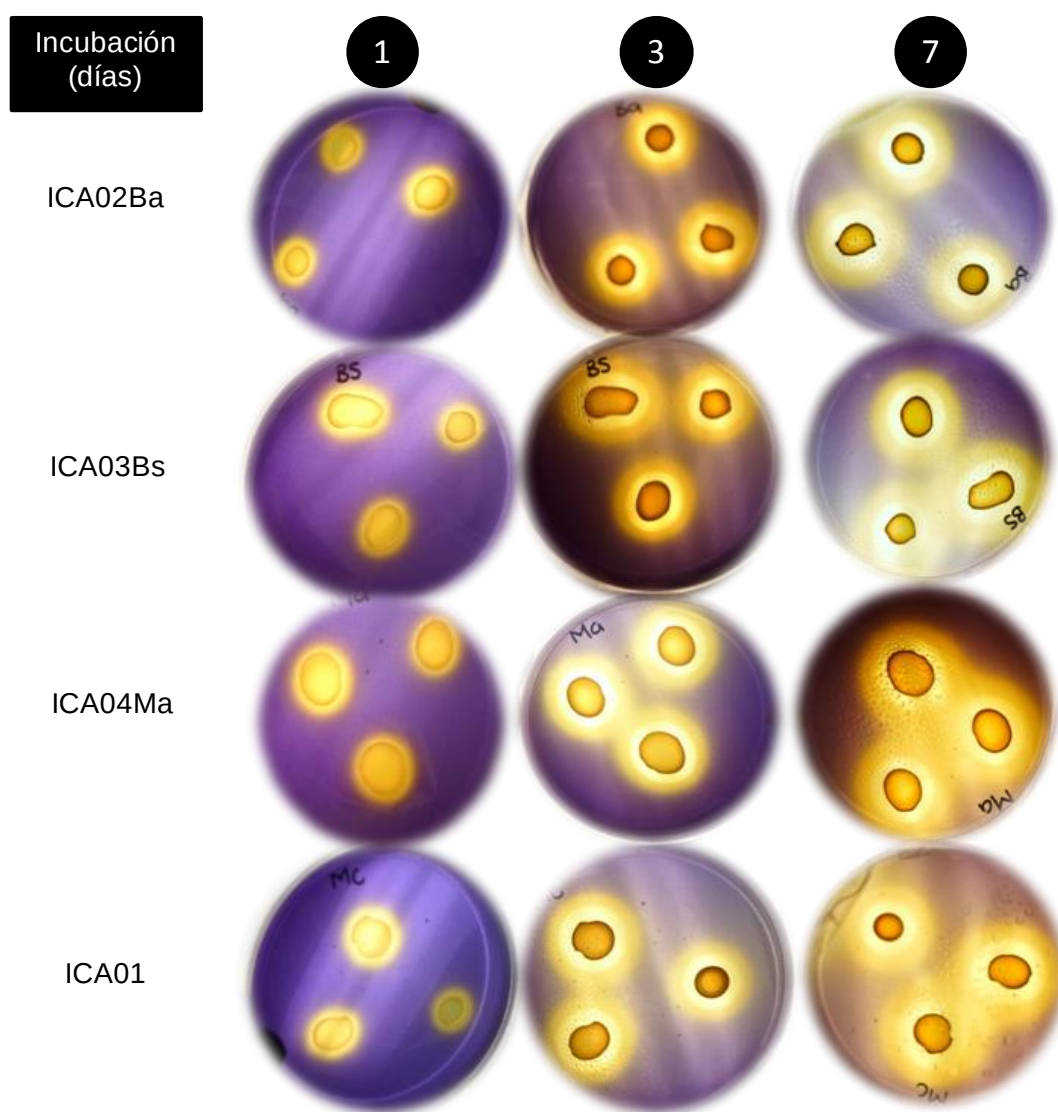


Figura 16. Índice de solubilización de BSF en medio Pikovskaya.

8.2.3 Acidificación de medio

La solubilización de fosfatos, se ha visto frecuentemente atribuida a la producción de ácidos orgánicos (Chung *et al.*, 2005; Peix *et al.*, 2004; Sundara *et al.*, 2002), por lo que la investigación de qué tan capaces son las cepas aisladas de acidificar el medio en el que se encuentran, resulta interesante. En el presente estudio los resultados mostraron que todas las cepas afectaron los valores del pH de manera significativa ($P \leq 0.05$) con respecto al control desde las primeras horas de exposición (Figura 17). Siendo a las 24 horas en donde se observó que todas las cepas ocasionaron un descenso significativo de los valores de pH de 7 a 5.5 con respecto al control (pH 7). No obstante, a las 48 y 72 h, las cepas ICA01, ICA02Ba e ICA03Bs presentaron un incremento en sus valores de pH. No así con la cepa ICA04Ma que una disminución de los valores de pH de forma significativa ($P \leq 0.05$) con respecto a las otras cepas a partir de las 24 h y hasta el final del experimento. Resultados similares fueron obtenidos por Fernández *et al.*, (2005) quienes estudiaron bacterias aisladas de distintas ciudades de Argentina, indicando la competitividad que tiene el género *Acinetobacter* comparado con otros géneros.

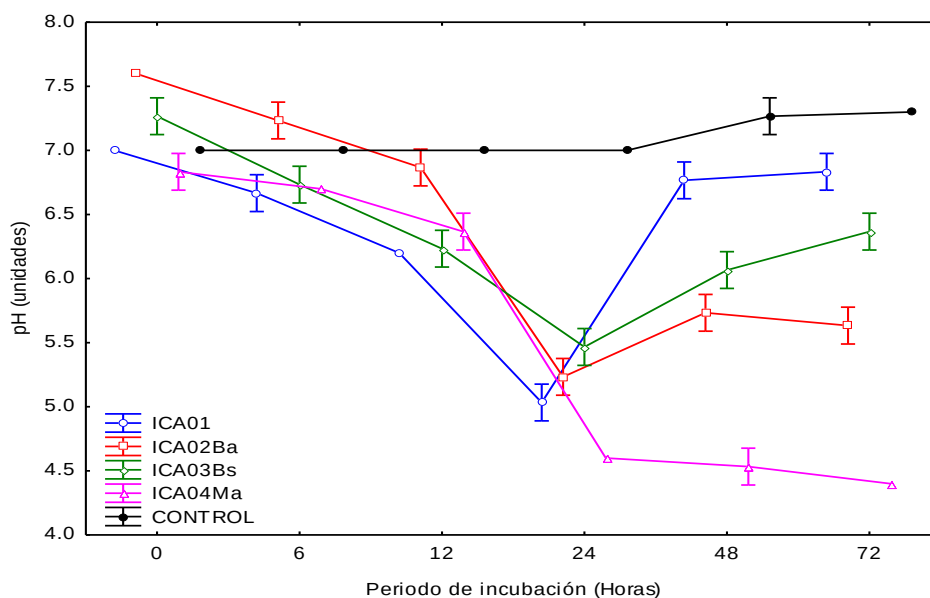


Figura 17. Variación de pH del medio de cultivo líquido inoculado con BSF y control sin inóculo.

8.2.4 Cuantificación de fósforo soluble

La capacidad de solubilización de fósforo soluble en medio líquido, se realizó por triplicado luego de un periodo de incubación máximo de 72 h de crecimiento. Se consideró como control la misma reacción sin adición de inóculo. Los resultados indicaron que todas las cepas evaluadas presentaron la capacidad de solubilizar el fósforo durante el periodo de incubación (Figura 18). Siendo las cepas ICA03Bs e ICA04Ma, las que mostraron los valores más altos solubilización de fósforo ($P \leq 0.05$) con respecto a las otras cepas evaluadas. Es importante señalar que las 4 cepas aisladas, son capaces de al incrementar significativamente, los valores de fósforo soluble con respecto al control. No obstante, la cepa ICA04Ma fue la que mostró un descenso estadísticamente significativo del pH y el mayor valor en la solubilización de fósforo (Figuras 17 y 18, respectivamente); lo que es congruente con lo reportado por Hinsinger, 2001, que a mayor capacidad de acidificación del medio, mayor solubilización de fósforo. Resultados similares de fósforo soluble fueron detectados por Becerra *et al.*, (2011) en bacterias procedentes de suelos ácidos de Colombia.

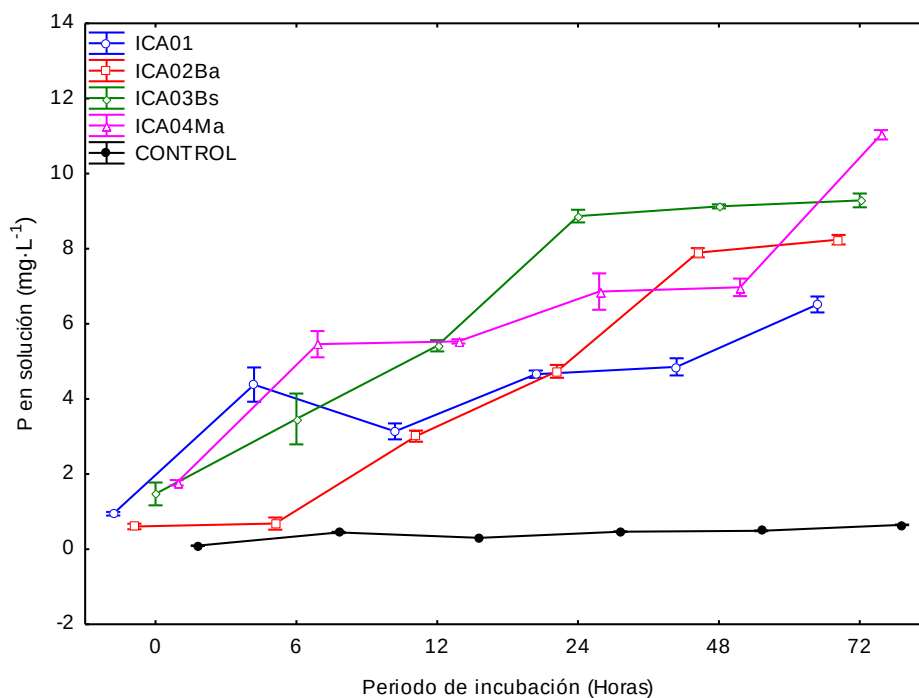


Figura 18. Cuantificación de fósforo soluble en medio líquido por las BSF aisladas.

8.2.5 Tolerancia a medio salino

La tolerancia a la salinidad es de interés especial en BSF provenientes de zonas semi áridas, por lo que las cepas aisladas en este trabajo fueron examinadas para analizar la tolerancia a medio salino en medio de cultivo líquido a 4 concentraciones de NaCl (0.01, 0.1, 0.5 y 1 M) que se mantuvieron en agitación constante de 100 rpm, durante 72 horas, se tomaron muestras para lecturas, en 4 intervalos de tiempo. Los datos obtenidos muestran que el crecimiento de todas las cepas (Figura 19), se incrementó exponencialmente hasta las 24 horas de crecimiento, en las 4 concentraciones de sal, con diferencias significativas entre ellas ($P \leq 0.05$). Posteriormente, decae la D.O. en las 4 cepas, a excepción de la concentración 1 M de ICA04Ma que continua en aumento la densidad poblacional desde el inicio hasta el último muestreo.

En términos de $\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$, los datos de D.O. no mostraron el crecimiento exponencial que se vio en la densidad óptica, por el contrario, se mantuvieron bajos los recuentos, desde el inicio y hasta las 48 h, específicamente en ICA01 e ICA02Ba no presentaron diferencia significativa entre las 4 concentraciones de NaCl evaluadas ($P \leq 0.05$).

Sin embargo, para el ultimo muestreo la concentración que mostró tener un efecto sobre el crecimiento bacteriano, fue la concentración 0.1 M de NaCl. Cabe señalar que durante las mediciones, algunas cepas mostraron alta capacidad de aglomeración, por lo que a través del tiempo que iba disminuyendo la D.O, sin que necesariamente las $\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ también lo hicieran; dicho fenómeno ha sido ampliamente descrito por Klebensberger *et al.*, (2007), donde postularon que las células bacterianas tienen una capacidad importante de agregación celular frente a ambientes hostiles.

Los resultados obtenidos son congruentes con lo que tradicionalmente se ha creído acerca de que los suelos salinos ejercen una especie de selección natural, haciendo a los microorganismos tolerantes a la salinidad (Hua *et al.*, 1982; Douka *et al.*, 1978); se sabe también que las bacterias que sobreviven a ambientes salinos pueden colonizar exitosamente plantas que crecen bajo las

mismas condiciones (Saleena *et al.*, 2001); los resultados de este trabajo confirman que el hábitat natural de las cepas ejerce una presión en la selección para la tolerancia a la salinidad.

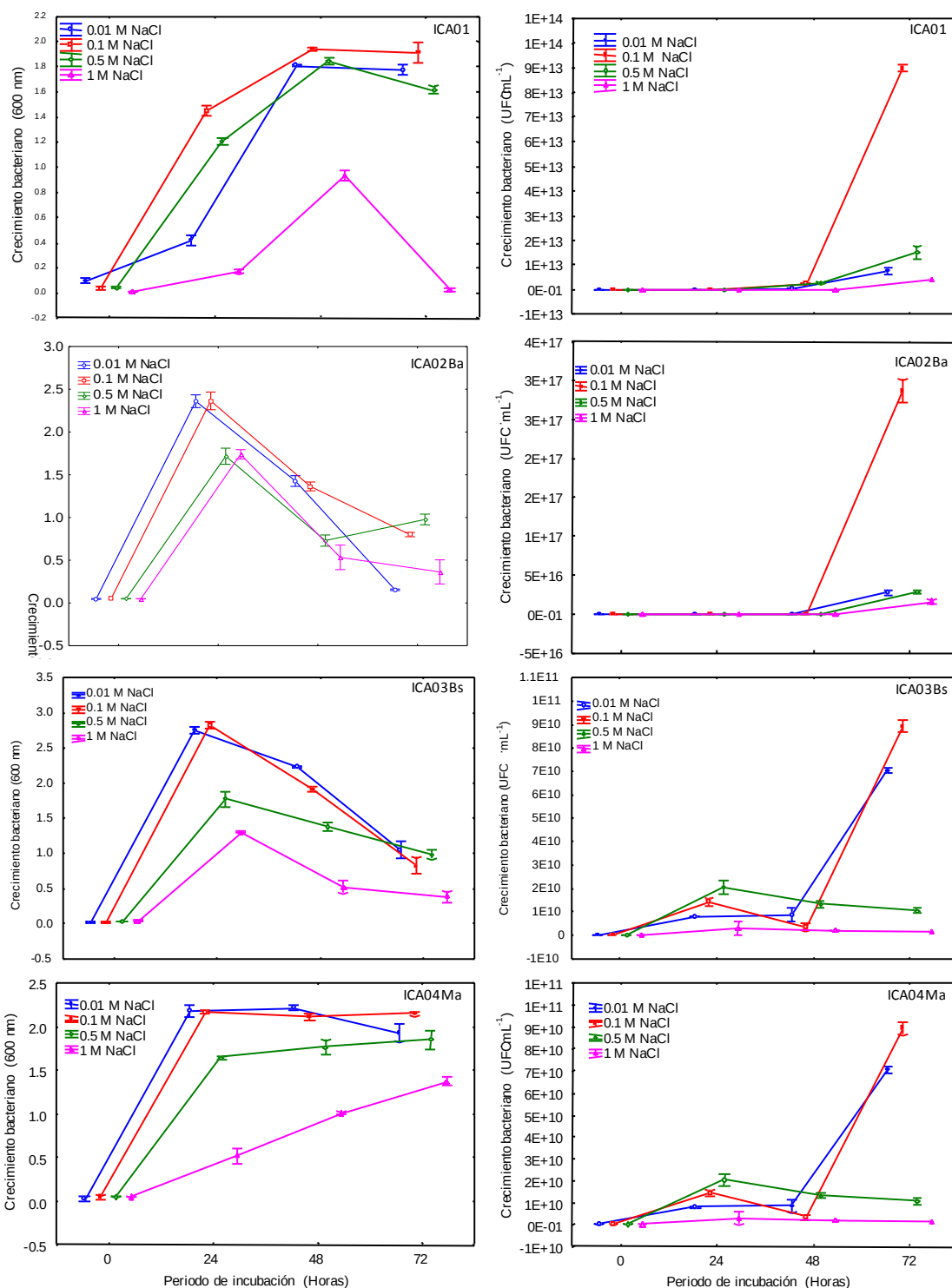


Figura 19. Efecto de 4 concentraciones diferentes de NaCl, a 4 intervalos de tiempo en el crecimiento de 4 BSF cultivadas en medio líquido. A la izquierda se muestra crecimiento bacteriano en términos de D.O. y a la derecha en UFC·mL⁻¹. Todos los puntos son promedios de tres réplicas y las barras verticales indican desviación estándar.

8.2.6 Formación de biopelícula

Se investigó la producción de biopelícula de las cepas solubilizadoras de fósforo, se midió dicha producción a partir de un cultivo estático de cada bacteria a las 48 h de incubación, teñido con cristal violeta (Figura 20a), se obtuvieron los datos de DO con y sin tinción para obtener el dato denominado biopelícula normalizada (Figura 20b). Parámetro que relaciona el crecimiento bacteriano y la formación de biopelícula. La capacidad de formación de biopelícula mostró cambios estadísticamente significativos entre las 4 cepas estudiadas (Figura 20 a, b). En donde ICA03Bs, presentó un incremento significativo ($P \leq 0.05$) con respecto a los valores de las cepas ICA02Bs e ICA04Bs (Figura 20 b). En la misma figura 20 b, se puede observar que la cepa ICA01 fue la que mostró el menor incremento con respecto a las otras cepas evaluadas ($P \leq 0.05$). No obstante, estos datos evidenciaron la capacidad de formación de biopelícula de las 4 BSF; lo cual es importante a nivel de colonización de raíces de plantas, ya que mediante ésta red de exopolisacáridos, las bacterias podrían ejercer una mejor colonización y con ello una mayor formación y elongación de raíces (Assmus *et al.*, 1995).

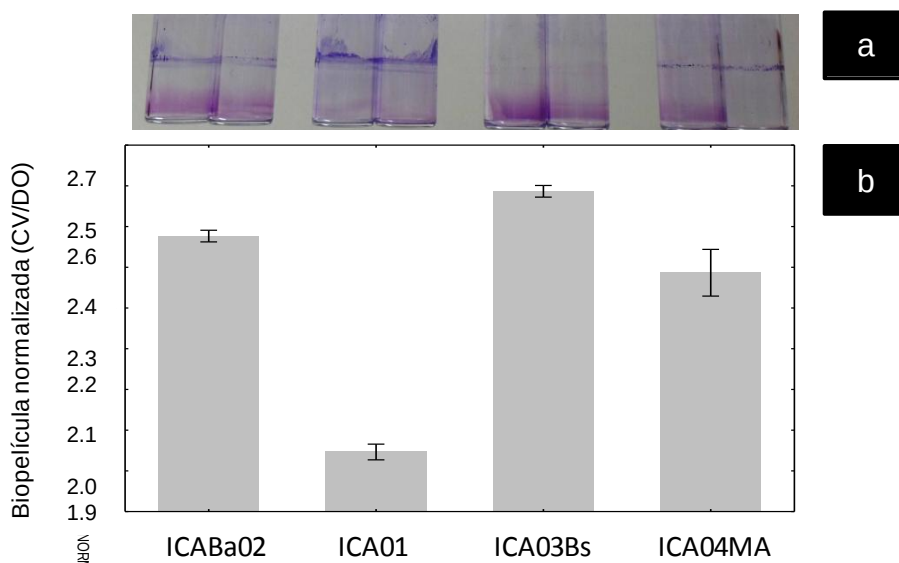


Figura 20. Formación de biopelícula por las BSF aisladas, a las 48h de crecimiento estático. Cada barra representa el promedio de 9 mediciones con su desviación estándar. a) Tubos conteniendo biopelícula teñida. b) Gráfica de la cuantificación de biopelícula normalizada (DO de tinción de biopelícula/DO de crecimiento bacteriano).

8.2.7 Cuantificación de fitohormonas

8.2.7.1 Cuantificación de ácido indol 3-acético (AIA)

A partir de cultivos bacterianos, se cuantificó la presencia de AIA, las concentraciones fueron calculadas luego de realizar mediciones de concentraciones conocidas (curva patrón) Anexo 5.

Los resultados mostraron que las 4 cepas solubilizadoras de fósforo, son capaces de sintetizar AIA (Figura 21 a, b). No obstante, fue la cepa ICA02Ba la que presento la mayor capacidad de producción de AIA ($46 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) con respecto a las otras cepas evaluadas ($P \geq 0.05$). Las otras cepas aunque mostraron la presencia de un incremento en la concentración de AIA fueron muy similares entre ellas ya que no hubo diferencia significativa entre ambas (Figura 21b). La presencia de compuestos con el grupo funcional indol, los cuales son la estructura química base de la ruta de biosíntesis del ácido indol-3-acético. Se ha observado que en rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal varias rutas de biosíntesis de AIA se han descrito dependiendo de los metabolitos intermedios (Spaepen *et al.*, 2007), la promoción de crecimiento es resultado indirecto de la estimulación de la vía de las auxinas propiciada por la presencia de bacterias (Vacheron *et al.*, 2013).

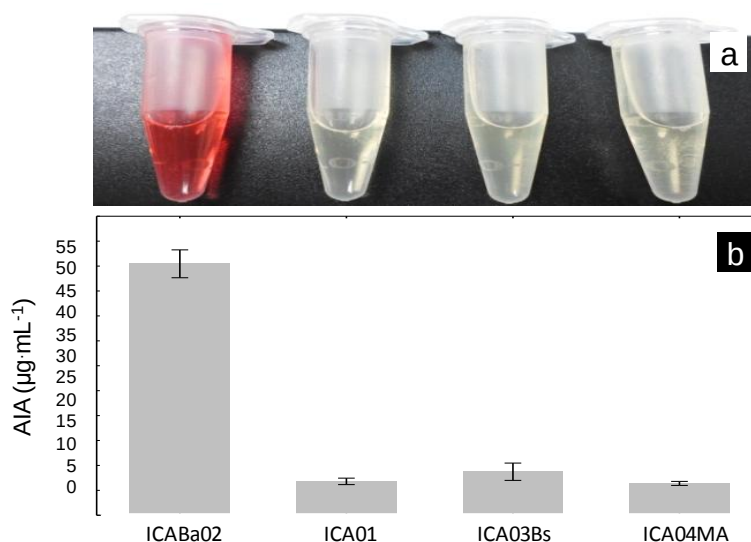


Figura 21. Cuantificación de AIA detectadas en sobrenadantes bacterianos. a) Reacción colorimétrica de la bacteria con el reactivo de Salkowski. b) Valores detectados por cada aislado bacteriano.

8.2.7.2 Cuantificación de giberelina-3 (AG₃)

Se cuantificó la producción de AG₃ en las 4 cepas solubilizadoras de fósforo, por medio de la técnica colorimétrica de Holbrook *et al.*, (1981) (Figura 20). Los resultados obtenidos, indican que la bacteria que mayormente produjo la fitohormona fue ICA02Ba (4.3 mg·mL⁻¹), seguida de ICA04Ma e ICA01, entre las cuales no hubo diferencia significativa ($P \leq 0.05$) y por ultimo ICA03Bs con la menor producción de GA₃ (Figura 20b). Es importante la investigación de la síntesis de fitohormonas, en bacterias, debido a la importancia fisiológica que tienen, dicha producción ha sido confirmada en numerosos géneros bacterianos (Thuler *et al.*, 2003; Bottini *et al.*, 2004). La presencia de AIA y AG₃ en *A. calcoaceticus* sugiere la existencia de rutas de biosíntesis, similar a los observado por Uma Maheswari *et al.*, (2013), donde reportaron la producción de AG, AIA y citocininas por bacterias endófitas.

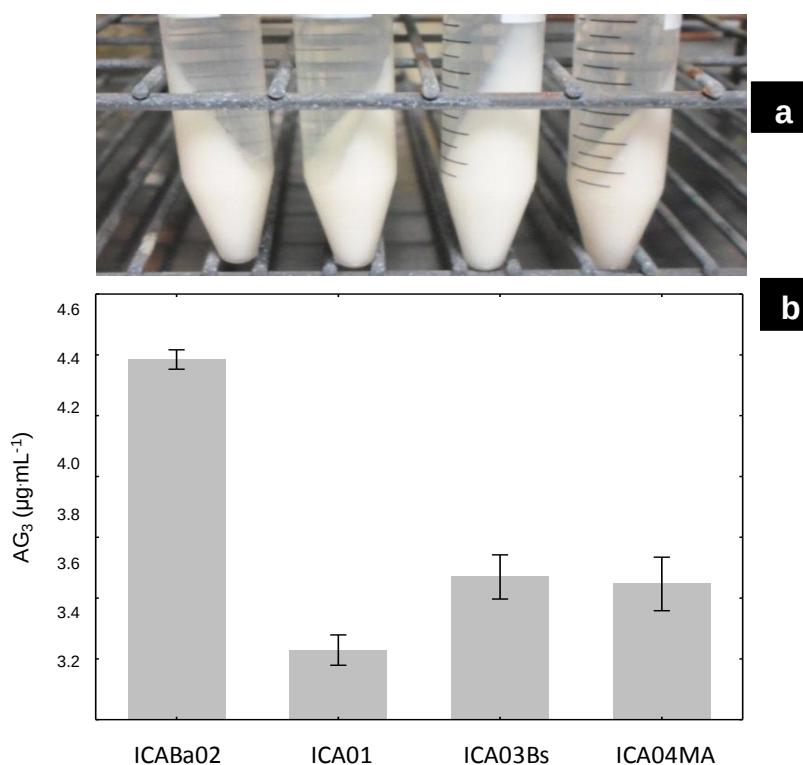


Figura 22. Cuantificación de AG₃ detectadas en sobrenadantes de BSF. a) Acción del HCl luego de su adición, durante el proceso de detección de giberelinas. b) Representación gráfica de valores detectados de AG₃ por cada BSF.

8.2.8 Efecto en germinación de semillas

Para poner en evidencia el efecto de la producción detectada de fitohormonas, se evaluó el efecto de las bacterias solubilizadoras de fósforo sobre la germinación de semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), chile (*Capsicum annuum* L.) y pepino (*Cucumis sativus* L.), observadas durante un periodo de incubación realizada en cajas Petri, que funcionaron como cámaras húmedas para cada tratamiento (Figura 23 y Cuadro 5). Los resultados mostraron que en el caso de semillas de tomate y chile, hay diferencias significativas de longitud radicular entre los tratamientos y el control ($P \geq 0.05$) (Cuadro 5 y Figura 24), En pepino, los tratamientos de ICA03Bs e ICA04Ma no superaron la longitud del control, caso contrario, el tratamiento con la cepa ICA02Ba, quien sobresalió con un 115% más que el control (Cuadro 5).

Al comparar los efectos de las bacterias en cada tipo de semilla, permite crear la hipótesis, de que la capacidad de promoción de crecimiento, dependerá del tipo de bacterias y semillas con el que se trabaje, ya que dentro de los factores que contribuyen a la complejidad de la respuesta de la planta a la inoculación, se encuentra la variedad de la planta, ya que cada una responde de forma distinta a la inoculación (Bashan *et al.*, 1996). Los resultados del presente trabajo son similares a los observados por Díaz-Vargas, *et al.*, (2001) donde se evaluó el efecto de 30 cepas bacterianas en la germinación de lechuga (*Lactuca sativa* L. var. Longifolia), en el que encontraron diferencias significativas entre los efectos de los tratamientos que fueron desde cepas que tuvieron mismo efecto que el testigo, hasta un 300% de aumento en volumen radical observada en otras cepas. Otro caso de los efectos que pueden variar dependiendo de la semilla hospedante, es el de la cepa bacteriana R1B (aff. *Beijeriencikia*) que mostró efectividad en la promoción de crecimiento en lechuga y capulín (Díaz, 1998; Manjarrez *et al.*, 1998), pero cuando fue aplicada a aguacate no mostró efecto positivo significativo, por el contrario, el diámetro de tallo y volumen radical fueron significativamente menores al obtenidos en plantas control (Reyes *et al.*, 1999).

Las diferencias entre las semillas empleadas y las cepas inoculadas son congruentes con la premisa de que muchas bacterias promotoras de crecimiento vegetal pueden generar modificaciones a la composición química y por lo tanto, propiedades estructurales de las paredes celulares en raíces (El Zemrany *et al.* 2006; Zhang *et al.*, 2007). Los resultados sugieren que las bacterias aisladas tienen el potencial para emplearse en la producción de plántulas de interés hortícola.

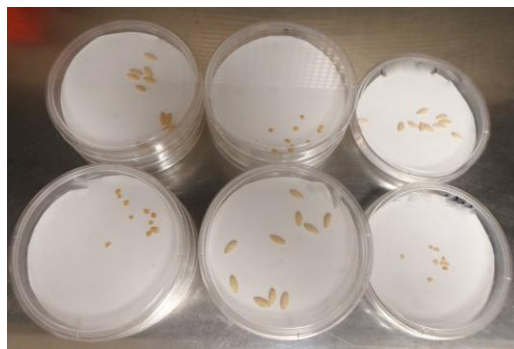


Figura 23. Cajas Petri empleadas como cámaras húmedas durante experimentos de germinación.

Cuadro 5. Longitud de radícula (mm) de semillas de tomate, pepino y chile.

Tratamientos	Periodo de incubación (Días)		
	10	10	24
	Tomate	Pepino	Chile
Control	86.5 ^a	167 ^a	34 ^a
ICA02Ba	97 ^b	192 ^b	80 ^b
ICA03Bs	102 ^c	170 ^a	99 ^c
ICA04Ma	109 ^d	149 ^a	77 ^d
ICA01	102 ^c	186 ^c	88 ^e

Resultados son expresados como medias de valores de 30 repeticiones. Valores con la misma letra dentro de cada columna son iguales de acuerdo a prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

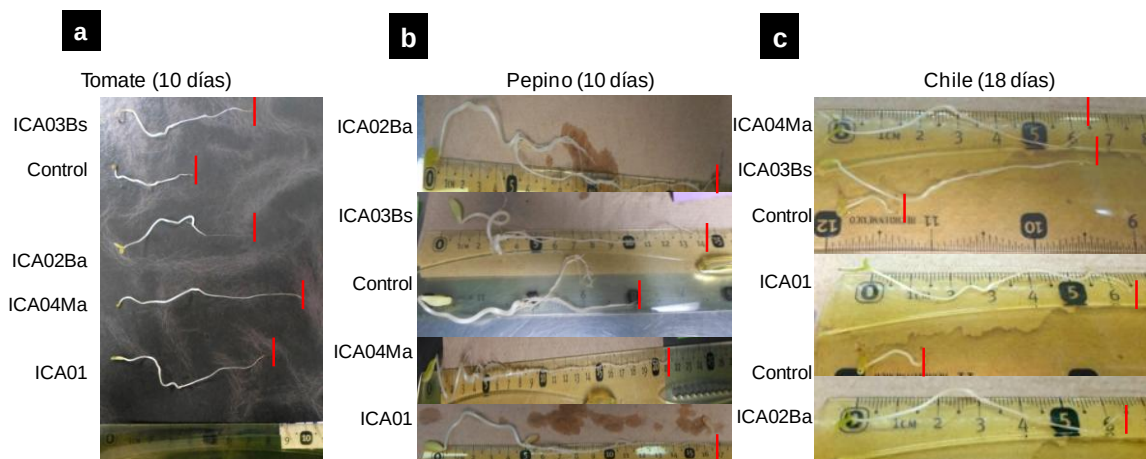


Figura 24. Longitud radicular de semillas inoculadas con BSF. a) y b) Radículas de tomate y pepino, respectivamente, a los 10 días de incubación. c) Radículas de chile observadas a los 18 días. Las líneas rojas indican el límite de crecimiento de cada radícula. La escala observada indica cm.

8.2.9 Efecto en promoción de crecimiento en plántulas de pepino por BSF

De las cuatro cepas aisladas solubilizadoras de fósforo, se eligieron 2 para inocularse en semillas de pepino, en base a lo observado durante la caracterización de las bacterias y la evaluación del efecto en longitud radicular. Se consideraron los siguientes tratamientos: Ba (inoculado con la cepa ICA02Ba), Bs (inoculado con la cepa (ICA03Bs), Ba:Bs (inoculado con cepas ICA02Ba e ICA03Bs 1:1) y Control (sin inocular). Se registraron los datos de longitud radicular, altura y diámetro de tallo y pesos fresco y seco, a los 28 días de crecimiento (Cuadro 6). Los resultados fueron congruentes con lo observado en el apartado anterior, es decir, el tratamiento que contenía ICABa02, sobresalió en los parámetros medidos, mientras que Bs no tuvo una diferencia significativa con el control.

Es interesante lo visto en Ba:Bs que presentó iguales o mayores mediciones en cada variable, comparado con el control y los tratamientos con una sola cepa, lo que indica la importancia de la experimentación con inoculantes combinados (más de una sola cepa de bacterias solubilizadoras de fósforo). Resultados similares han sido descritos en donde indican que la co-inoculación

con microorganismos favorece un mejor desarrollo de la planta, resultado de un efecto sinérgico (Belimov *et al.*, 1995; Zaidi *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2006).

Cuadro 6. Crecimiento en plántulas de pepino inoculadas con dos cepas de BSF los 28 días de inoculación.

Tratamientos	Longitud radicular	Altura de tallo	Diámetro de tallo	Peso fresco	Peso seco
	(cm)	(mm)		(g)	
Control	50 ^a	73 ^a	1.96 ^a	0.92 ^a	0.05 ^a
Ba	50 ^a	88.57 ^b	1.89 ^a	1.04 ^b	0.06 ^a
Bs	51.7 ^a	90 ^b	2.05 ^a	0.93 ^a	0.05 ^a
Ba:Bs	55 ^b	92.50 ^b	2.34 ^b	1.06 ^b	0.07 ^b

Resultados son expresados como medias de 21 muestras. Valores con la misma letra dentro de cada columna son iguales de acuerdo a prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

8.2.9.1 Efecto en promoción de crecimiento en plántulas de pepino por 3 dosis de una BSF

De acuerdo a los resultados del apartado anterior, donde se observó la capacidad de la cepa ICA02Ba por promover crecimiento vegetal en pepino, se propuso investigar el efecto de tres dosis crecientes de la cepa ICA02Ba, denominadas α , β y γ (1×10^3 , 1×10^9 y 1×10^{12} , respectivamente) e inoculadas a semillas de pepino, como control se plantaron semillas sin inocular. En trabajos previos se ha visto que los casos exitosos de promoción de crecimiento mediado por microorganismos, tiene que ver con el nivel óptimo de células en el inoculante (Okon y Labandera-González, 1994). Existe antecedente de la inoculación de pepino con BSF con resultados favorecedores (Pérez-Rosales, 2012), sin embargo, resulta interesante saber qué sucede cuando se aplican distintas dosis de BSF a las semillas de pepino (Cuadro 7), lo que llevó a este trabajo a medir parámetros fisiológicos (altura de tallo, área foliar, longitud radicular y datos de

germinación) y bioquímicos (AG₃ y AIA en hoja, tallo y raíz) medidos a los 30 días de incubación.

En los resultados se observaron variables medidas en los tratamientos que no presentan diferencia significativa con el control ($P \leq 0.05$), entre los cuales están: altura, peso fresco, peso seco y GA₃ en raíz; lo que puede ser indicativo de que se requieran dosis continuas de inóculo para que se conserve el efecto promotor de crecimiento mediado por los microorganismos, como lo ha sugerido (Jurkevitch *et al.*, 1992) que señalaron que la composición y tamaño de la población microbiana, influye directamente en la nutrición de las plantas. En tanto a al incremento de las concentraciones de hormonas detectadas, en tres secciones de la planta, se cuantificó mayor cantidad de GA₃ en hoja y raíz, y de AIA sucedió en tallo y raíz, comparadas con el control ($P \leq 0.05$).

Cuadro 7. Parámetros fisiológicos, microbiológicos y bioquímicos medidos a los 30 días de incubación de plántulas inoculadas con 3 dosis de la cepa ICA02Ba.

Variables medidas		Tratamientos			
		Control	α	β	γ
Altura		39.50 ^a	39.50 ^a	40.33 ^a	43.83 ^a
Longitud radicular	(mm)	56.33 ^a	52.67 ^b	47.00 ^c	58.33 ^d
Diámetro de Tallo		5.00 ^a	6.00 ^b	5.67 ^c	6.33 ^c
Área foliar	cm ²	3852.06 ^a	4780.30 ^a	3666.81 ^a	5317.35 ^b
Peso Fresco	g	7.09 ^a	7.02 ^a	6.68 ^a	6.43 ^a
Peso Seco		0.35 ^a	0.38 ^a	0.40 ^a	0.49 ^a
Recuento bacteriano	UFC·g ⁻¹	0 ^a	9.33E+05 ^b	4.67E+05 ^c	3.00E+05 ^d
Hojas verdaderas	Número	3.50 ^a	5.50 ^b	5.00 ^b	5.67 ^b
GA ₃ Hoja		1.74 ^a	2.15 ^b	1.92 ^b	2.17 ^c
GA ₃ Tallo		1.11 ^a	0.83 ^b	1.07 ^a	0.74 ^c
GA ₃ Raíz	µg·mL ⁻¹	0.48 ^a	0.66 ^a	0.57 ^a	0.76 ^a
AIA Hoja		11.88 ^a	4.50 ^b	9.63 ^c	5.96 ^d
AIA Tallo		7.17 ^a	5.48 ^b	9.04 ^b	8.27 ^a
AIA Raíz		7.95 ^a	3.37 ^b	9.20 ^c	4.52 ^d

Control (Control negativo): sin inóculo bacteriano

Resultados son expresados como medias de 30 muestras. Valores con la misma letra dentro de cada línea son iguales de acuerdo a prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

8.3 Evaluación de cepas de *Bacillus*

8.3.1 Carácter antagónico frente a fitopatógenos

En el presente estudio, se evaluó la capacidad de las cepas de *Bacillus* aisladas, para inhibir el crecimiento de fitopatógenos en cajas Petri con el método de cultivo dual y algunas variantes que se diseñaron en este trabajo (Anexo 7), con el objetivo de identificar el mecanismo (s) que poseen las bacterias para inhibir el crecimiento de hongos patógenos. Los fitopatógenos empleados en este trabajo fueron 5 especies pertenecientes al género de *Fusarium*: *nygamai*, *oxysporum*, *equiseti*, *solani* y *solani* hb éste último fue aislado e identificado en este trabajo (descrito en apartado 8.1.3). Durante un periodo de 9 días se incubaron los cultivos duales a 30°C y se obtuvieron los porcentajes de inhibición de crecimiento (Figuras 25-28).

Los resultados del presente trabajo mostraron que cuando se realizaron cultivos duales en el modelo *cuadro* (empleando cultivo bacteriano total), en todos los casos, hubo una disminución de crecimiento del patógeno, que va desde el 10-80% a comparación del control (hongo sin presencia de bacteria), las 3 cepas de *Bacillus* resultaron ser más eficientes ante *F. oxysporum*, donde alcanzó su máximo de inhibición del 70% desde los tres días de incubación (Cuadro 8 y Figura 25). Lo que indicó que las cepas de *Bacillus* son capaces de disminuir el crecimiento del fitopatógeno, incluso desde los primeros 3 días de incubación, el efecto se conservó y aumentó al periodo final de incubación que fue de 9 días.

Éste modelo permitió generar la hipótesis de que el mecanismo por el cual la bacteria inhibe el crecimiento del fitopatógeno requiere de la presencia de células bacterianas vivas; lo cual es importante para conocer la forma se requiere tener a *Bacillus* en la rizosfera.

Cuadro 8. Porcentaje de inhibición de crecimiento de 5 especies de *Fusarium* provocado por 3 cepas de *B. subtilis*, observados a 3, 6 y 9 días de incubación, en el modelo *cuadro*.

Fitopatógeno	<i>B. subtilis</i> 1			<i>B. subtilis</i> 2			<i>B. subtilis</i> 3		
	3	6	9	3	6	9	3	6	9
<i>F. nygamai</i>	49.34 ^a	50.00 ^a	39.76 ^a	55.92 ^a	83.00 ^a	83.00 ^a	40.79 ^a	53.61 ^a	54.82 ^a
<i>F. equiseti</i>	13.33 ^b	63.70 ^b	65.66 ^b	33.33 ^b	26.03 ^b	0.00 ^b	31.67 ^b	67.81 ^b	71.08 ^b
<i>F. solani</i>	31.25 ^c	43.66 ^c	27.70 ^c	29.69 ^b	51.41 ^c	48.80 ^c	25.00 ^c	42.25 ^c	21.08 ^c
<i>F. oxysporum</i>	67.65 ^d	70.48 ^b	65.06 ^b	71.32 ^c	71.08 ^d	66.87 ^d	73.53 ^d	72.29 ^d	71.69 ^b
<i>F. solani</i> hb	13.11 ^b	44.53 ^a	13.86 ^d	11.48 ^d	44.53 ^e	0.00 ^e	22.95 ^e	53.13 ^a	46.99 ^d

Resultados son expresados como medias de 30 muestras. Valores con la misma letra dentro de cada columna son iguales de acuerdo a prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

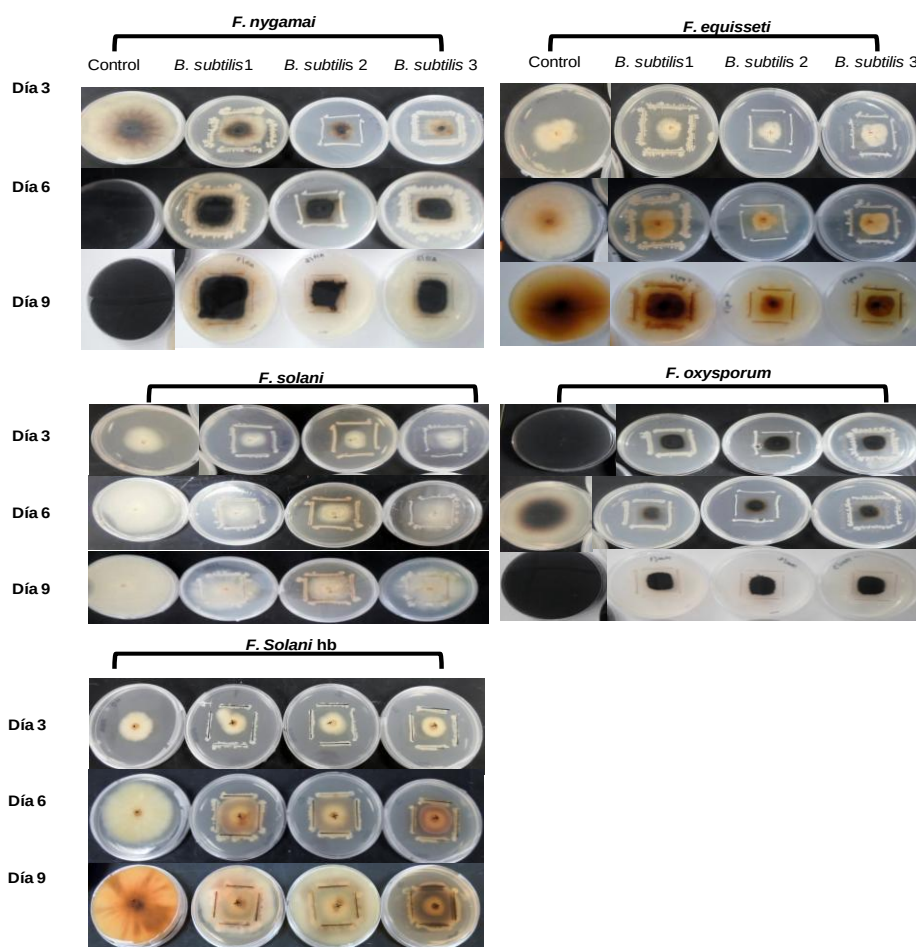


Figura 25. Crecimientos duales de 3 cepas de *B. subtilis* aisladas en este trabajo (antagonistas) y 5 de *Fusarium* (patógeno) en el modelo *cuadro*. Control: sin inóculo bacteriano

En el modelo *confrontación* (Cuadro 9 y Figura 26), se observó que todas las cepas de *B. subtilis* aisladas presentaron, una inhibición del crecimiento solo contra *F. equiseti*, en el que inhibió desde un 20 a un 45% comparado con el control. Lo que nos dice que las bacterias probadas sintetizan ciertos compuestos volátiles que disminuyen el crecimiento del patógeno. Sin embargo, el cultivo dual de *B. subtilis* 3 con *F. oxysporum*, se observó un biocontrol negativo del 84%, lo que indica que *Bacillus subtilis* 3 de posee compuestos volátiles que aceleran el crecimiento del patógeno, como lo han sugerido Kloepper, (2004) y Gutierrez-Luna *et al.*, (2010), de acuerdo a sus investigaciones realizadas con cepas de *Bacillus*.

Cuadro 9. Porcentaje de inhibición de crecimiento de 5 especies de *Fusarium* provocado por 3 cepas de *B. subtilis*, observados a 3, 6 y 9 días de incubación, en el modelo *confrontación*.

Fitopatógeno	<i>B. subtilis</i> 1			<i>B. subtilis</i> 2			<i>B. subtilis</i> 3		
	3	6	9	3	6	9	3	6	9
<i>F. nygamai</i>	-5.26 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	1.32 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	-5.26 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
<i>F. equiseti</i>	33.33 ^b	45.21 ^b	18.07 ^b	20.00 ^b	31.51 ^b	42.08 ^b	45.00 ^b	52.74 ^b	33.73 ^b
<i>F. solani</i>	0.00 ^c	15.49 ^b	0.00 ^a	-3.13 ^c	5.63 ^c	0.00 ^a	-6.25 ^c	9.15 ^c	0.00 ^a
<i>F. oxysporum</i>	11.76 ^d	0.00 ^a	0.00 ^a	4.41 ^d	0.00 ^a	21.69 ^c	8.82 ^d	0.00 ^a	-84.44 ^c
<i>F. solani</i> hb	4.92 ^e	4.69 ^c	0.00 ^a	1.64 ^c	3.91 ^d	0.00 ^a	8.20 ^d	7.81 ^d	0.00 ^a

Resultados son expresados como medias de 30 muestras. Valores con la misma letra dentro de cada columna son iguales de acuerdo a prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

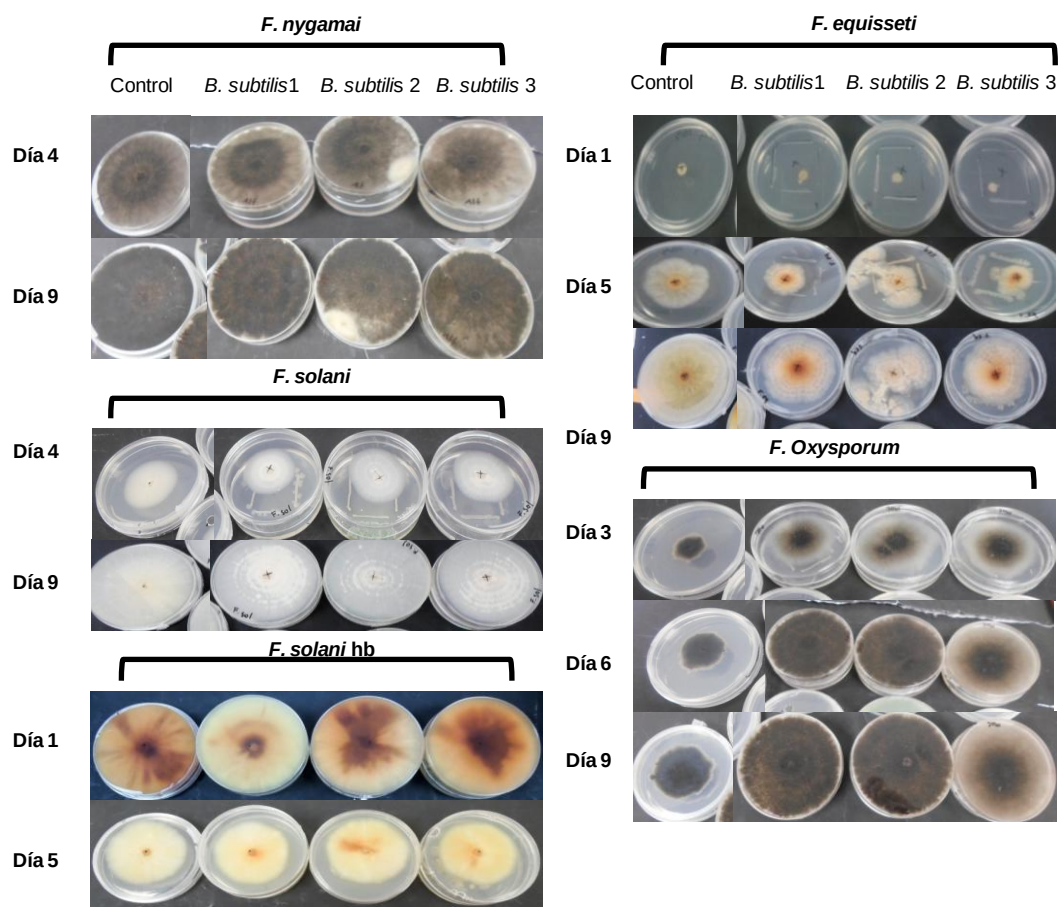


Figura 26. Crecimientos duales de 3 cepas de *B. subtilis* aisladas en este trabajo (antagonistas) y 5 de *Fusarium* (patógeno) en el modelo *cuadro*. Control: sin inóculo bacteriano

Por otra parte, para conocer si los metabolitos secundarios generalmente lipopéptidos con actividad antibiótica son excretados o si se requiere a la célula bacteriana viva para su producción. Por lo consiguiente se realizó un cultivo dual denominado *pozos*, lisis celular (Cuadro 10 y Figura 27).

Los resultados mostraron que la cepa 1 fue capaz de inhibir el crecimiento fúngico, contra los 5 patógenos a los tres y seis días. No obstante su efecto presento variaciones y únicamente mostró un efecto significativo de inhibición con *F.oxisporum* al final del experimento ($P \leq 0.05$). En el caso de las cepas 2 y 3, no se observó una inhibición significativa del crecimiento de los fitopatógenos evaluados ($P \geq 0.05$) al final del experimento. Lo que indicó que solamente la cepa 1, tuvo la capacidad de inhibir el crecimiento de los hongos, mediante la sola presencia del

metabolito, y no así de las cepas 2 y 3, que al parecer requieren la presencia de la célula bacteriana para ejercer una inhibición de crecimiento sobre el patógeno. Otros investigadores han observado la capacidad de *Bacillus subtilis* de síntesis de compuestos biológicamente activos con amplio espectro contra patógenos, así como también otros *Bacillus* con potencial para emplearse como agentes biocontrol (Nagorska *et al.*, 2007).

Cuadro 10. Porcentaje de inhibición de crecimiento de 5 especies de *Fusarium* provocado por 3 cepas de *B. subtilis*, observados a 3, 6 y 9 días de incubación, en el modelo pozos.

Fitopatógeno	<i>B. subtilis</i> 1			<i>B. subtilis</i> 2			<i>B. subtilis</i> 3		
	3	6	9	3	6	9	3	6	9
<i>F. nygamai</i>	34.21 ^a	21.69 ^a	0.00 ^a	34.21 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	34.21 ^a	27.71 ^a	0.00 ^a
<i>F. equiseti</i>	23.33 ^b	31.51 ^b	0.00 ^a	16.67 ^b	10.96 ^b	0.00 ^a	26.67 ^b	24.66 ^b	0.00 ^a
<i>F. solani</i>	-9.38 ^c	8.45 ^c	0.00 ^a	-9.38 ^c	8.45 ^c	0.00 ^a	-9.38 ^c	8.45 ^c	0.00 ^a
<i>F. oxysporum</i>	67.65 ^d	57.83 ^d	45.78 ^b	63.24 ^d	63.86 ^d	0.00 ^a	61.76 ^d	55.42 ^d	-33.33 ^b
<i>F. solani</i> hb	-3.28 ^e	-1.56 ^e	0.00 ^a	0.00 ^e	-1.56 ^e	0.00 ^a	-3.28 ^e	2.34 ^e	0.00 ^a

Resultados son expresados como medias de 30 muestras. Valores con la misma letra dentro de cada columna son iguales de acuerdo a prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

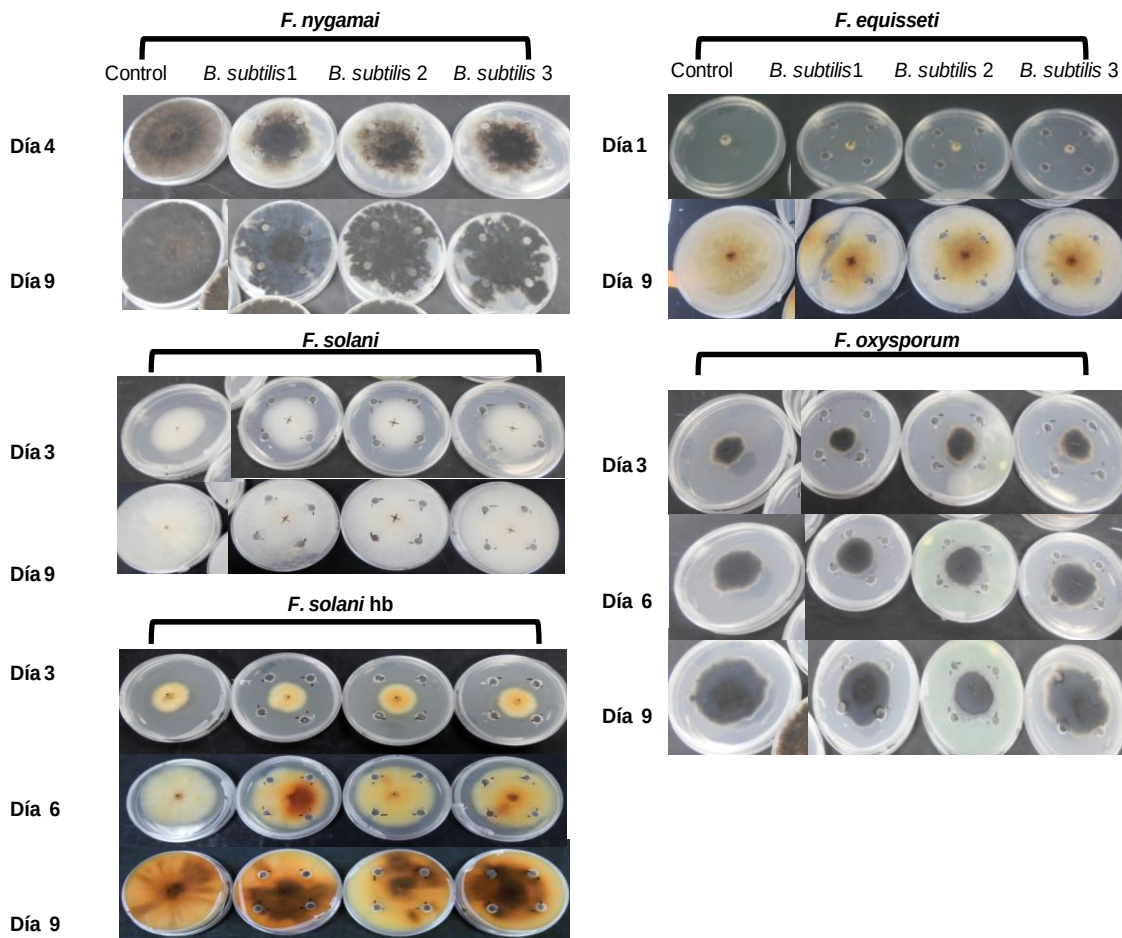


Figura 27. Crecimientos duales de 3 cepas de *B. subtilis* aisladas en este trabajo (antagonistas) y 5 de *Fusarium* (patógeno) en el modelo pozos. Control: sin inóculo bacteriano

En el cuadro 11 y figura 28 se observan los resultados obtenidos en el modelo *papel* (uso del sobrenadante) donde se probó la capacidad de inhibición de crecimiento del filtrado de cultivos bacterianos de las cepas de *B. subtilis* contra los patógenos. Los datos muestran que a los 9 días de incubación, la cepa 2 fue capaz de inhibir a *F. nygamai* y *F. solani* hb, en un 55 y 45%, respectivamente. Por su parte las cepas 1 y 3 solamente inhiben el crecimiento de *F. solani* hb en un 40 y 45%, respectivamente al final del experimento. Lo que indica que los sobrenadantes de las 3 cepas de *Bacillus* son efectivos para inhibir el crecimiento de los fitopatógenos, lo que se traduce en considerar la presencia de compuestos

antifúngicos en las cepas que son capaces de afectar a *F. solani* hb. Existen diversos estudios que se han enfocado a estudiar los compuestos que pudieran secretar las bacterias, que afectan la pared celular de fitopatógenos. Se han observado compuestos extracelulares como quitinasa y laminarinasa, capaces de lisar micelio de *F. solani* (Gaur *et al*; 2004), lo que podría explicar, la acción de las 3 bacterias de este trabajo contra la cepa de *F. solani* hb.

Cuadro 11. Porcentaje de inhibición de crecimiento de 5 especies de *Fusarium* provocado por 3 cepas de *B. subtilis*, observados a 3, 6 y 9 días de incubación, en el modelo *papel*.

Fitopatógeno	<i>B. subtilis</i> 1			<i>B. subtilis</i> 2			<i>B. subtilis</i> 3		
	3	6	9	3	6	9	3	6	9
<i>F. nygamai</i>	5.92 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	5.26 ^a	53.61 ^a	54.82 ^a	-3.29 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
<i>F. equiseti</i>	20.00 ^b	-6.16 ^b	0.00 ^a	1.67 ^a	-9.59 ^b	0.00 ^b	5.00 ^b	-9.59 ^b	0.00 ^a
<i>F. solani</i>	6.25 ^a	2.82 ^c	0.00 ^a	-4.69 ^b	-1.41 ^c	0.00 ^b	-3.13 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
<i>F. oxysporum</i>	13.24 ^c	0.00 ^d	0.00 ^a	5.88 ^a	0.00 ^d	0.00 ^b	5.15 ^b	0.00 ^a	0.00 ^a
<i>F. solani</i> hb	24.59 ^d	57.03 ^e	43.98 ^b	0.00 ^c	52.34 ^a	42.77 ^c	19.67 ^c	50.78 ^c	45.78 ^b

Resultados son expresados como medias de 30 muestras. Valores con la misma letra dentro de cada columna son iguales de acuerdo a prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

En general, se puede decir que de acuerdo a los resultados observados en los 4 modelos de antagonismo observados, las 3 cepas de *Bacillus* presentaron un buen desempeño en las pruebas antagónicas in vitro, resultado esperado ya que las especies del género *Bacillus* han sido reportadas como efectivos biocontroladores de múltiples fitopatógenos por su capacidad de producir varios antibióticos de amplio espectro, característica que ha permitido utilizarlos como fungicidas comerciales (Martin y Travers, 1989; Meadows *et al.* 1992; Bernal *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2006).

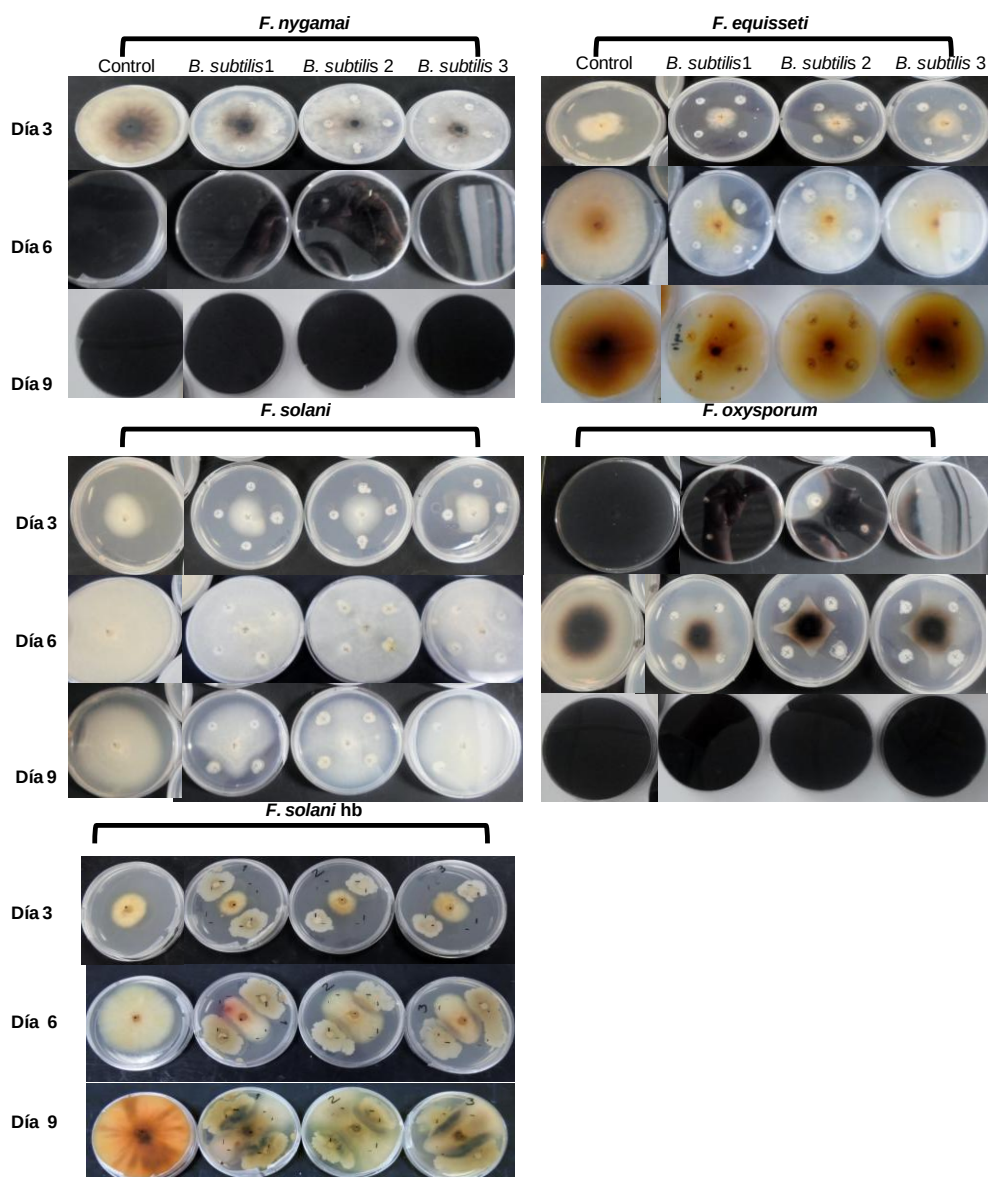


Figura 28. Crecimientos duales de 3 cepas de *B. subtilis* aisladas en este trabajo (antagonistas) y 5 de *Fusarium* (patógeno) en el modelo *papel*. Control: sin inóculo bacteriano

8.3.2 Amplificación de genes lipopeptídicos

Una vez observado el efecto *in vitro* de las *B. subtilis* aisladas, se realizó la búsqueda de 3 genes (*sboA*, *ituA* y *qk*) que codifican para los antibióticos subtilosina, iturina y subtilisina, respectivamente. A excepción de la cepa 2, donde solo se observaron los genes *sboA* y *qk*. En la figura 29 se observa la

amplificación de dichos genes en las cepas de *Bacillus* 1, 2 y 3. Se decidió realizar la búsqueda de este tipo de antibióticos debido a su importancia biotecnológica, por ejemplo, se sabe que los lipopéptidos de la familia de iturinas, como la iturina A presentan actividades antagónicas específicas hacia hongos patógenos, pero no contra bacterias (Maget-Dana y Peypoux, 1994; Ongena y Jacques 2005). Así mismo, se ha observado que los lipopéptidos muestran actividades hemolíticas, lo cual es relevante como un sistema de pre-búsqueda para identificar actividades fungitoxicas.

En el apartado anterior, se observó que las cepas de *Bacillus* 1 y 3 poseen un desempeño positivo de inhibición contra *Fusarium*, probablemente por la capacidad que tienen de secretar antibióticos lipopéptidos como la Iturina, cuyo mecanismo de acción va dirigida sobre la permeabilidad de la membrana y la composición lipídica de la célula fúngica, de tal forma que inhibe el crecimiento micelial y la esporulación del hongo (Gong *et al.*, 2006; Duitman *et al.*, 1999; Romero *et al.*, 2007). La cepa *B. subtilis* 2, no produjo iturina, sin embargo, al igual que las cepas 1 y 3, posee los genes que codifican para subtilisina y subtilosina (*qk* y *sboA*, respectivamente), las cuales al tener capacidad proteasa y bacteriocina, respectivamente, inducen a la permeabilidad del citoplasma de las células que conforman las hifas, también inhibe la germinación de conidios, así como la formación del micelio vegetativo del hongo (Bapat y Shah, 2000).

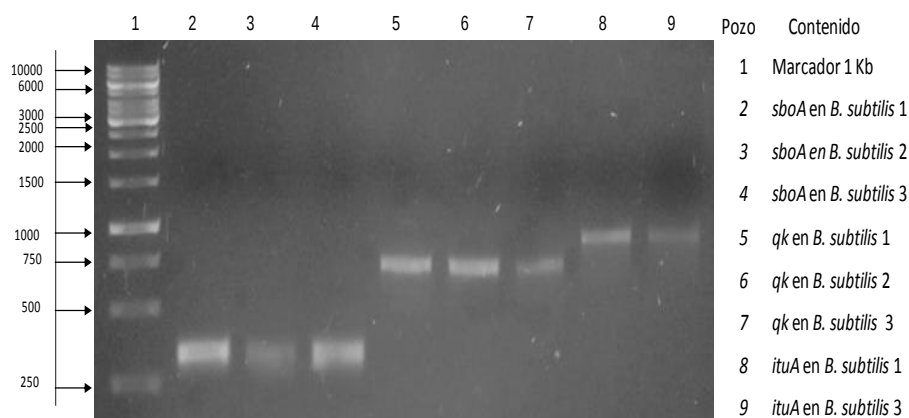


Figura 29. Amplificación de genes codificadores de antibióticos polipeptídicos en bacterias antagónicas. Abreviaturas: Marcador molecular (M), *sboA* (2, 3 y 4), *qk* (5, 6 y 7) e *ituA* (8 y 9).

8.3.3 Cuantificación de fitohormonas

Se determinó la producción de fitohormonas por parte de las cepas de *Bacillus subtilis* aisladas en este trabajo, se obtuvieron datos que comprueban la producción de AIA y AG₃ que se muestran en el Cuadro 12. En los resultados obtenidos se observó que *B. subtilis* 3 produjo de manera significativa el doble en cantidad de AIA, comparada con las otras dos bacterias ($P \leq 0.05$). Resultados similares han sido previamente reportados por Idriss *et al.*, (2002), quienes detectaron altos niveles de AIA en filtrados de cultivos celulares de cepas de *B. amyloliquefaciens* y *subtilis*. Además, cabe señalar que existen trabajos previos de cepas de *Bacillus* que promueven el crecimiento de plantas por la acumulación de hormonas como AIA y AG₃ (Archipova *et al.*, 2005). Entre los mecanismos de promoción de crecimiento vegetal que tienen las bacterias, se encuentra la habilidad de producir fitohormonas, antagonismos frente a fitopatógenos (Lugtenberg y Kamilova, 2009); además se sugiere que las bacterias promotoras del crecimiento vegetal pueden prevenir los efectos deletéreos del estrés ocasionado por el ambiente (Paul y Nair, 2008); por lo cual resultó interesante la investigación de cepas de *Bacillus* que poseían estas capacidades.

Debido a que las 3 cepas solubilizadoras de fósforo también son productoras de AIA y AG₃, es importante resaltar la importancia que tienen las bacterias cuando son capaces de sintetizar fitohormonas, debido a que como se sabe, las plantas las requieren en todo momento para regular su crecimiento y desarrollo a nivel celular, en tejidos y órganos, es decir, en toda la planta (Dobbelaere *et al.*: 2003). Dichos compuestos son activos en las plantas y están extremadamente regulados, por lo tanto se han investigado profundamente y se sabe que numerosas bacterias asociadas a plantas son capaces de sintetizarlas, por lo que se cree que esta capacidad bacteriana surgió desde el inicio de la interacción bacteria-planta, para reforzar tal teoría, existen estudios de las diferencias del comportamiento de aislados bacterianos en relación a la proximidad de plantas, en donde se observó que la efectividad de las bacterias para producir fitohormonas es directamente proporcional a su cercanía con el

tejido vegetal en el suelo de donde fueron aisladas (Fuentes-Ramírez y Caballero-Mellado, 2005).

Cuadro 12. Cuantificación de AIA y AG₃ producidos por cepas de *B. subtilis*.

CEPAS	AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	AG ₃
<i>B. subtilis</i> 1	0.52 ^a	1.63 ^a
<i>B. subtilis</i> 2	0.71 ^b	1.96 ^b
<i>B. subtilis</i> 3	1.64 ^c	1.66 ^a

Los resultados son expresados como medias de valores de cinco experimentos. Valores con la misma letra dentro de cada columna son iguales de acuerdo a prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

8.3.4 Análisis morfológico por microscopía de fuerza atómica de la interacción *Bacillus-Fusarium*

Existen pocos estudios que involucren, la evaluación de los cambios en el proceso de interacción bacteria-hongo, a nivel morfológico, específicamente en la topografía de los cambios estructurales de la pared celular del hongo patógeno al interactuar con *B. subtilis*. El análisis por microscopía de fuerza atómica permitió registrar el efecto de la acción antagónica sobre la topografía de la pared celular del hongo. En donde los cambios fueron la presencia de cambios en la longitud y alturas (máxima y mínima) de la superficie del hongo (Cuadro 13). La presencia de las cepas B 1 y B2 aunque se observó un cambio en las variables evaluadas estas no fueron significativas ($P \geq 0.05$), para la presencia de una plasmólisis celular (Cuadro 13 y Figura 30). En contraste la cepa B3 presentó cambios en la longitud y altura, que consistieron en una disminución significativa de la longitud y altura mínima ($P \leq 0.05$), con un incremento marcado en la altura máxima comparado con las otras cepas. Resultado posible del efecto biológico de B3 sobre la pared celular del hongo, que causó una plasmólisis celular. Similares resultados han sido observado por Etchegaray *et al.* (2008), quienes encontraron

que *B. subtilis* puede generar un daño a nivel de membrana con la formación de canales transmembranales que genera lisis celular.

Por otra parte, en la cepa B3 la presencia de los lipopéptidos como iturina podría desorganizar la membrana citoplasmática del hongo y así inducir una liberación de iones vitales como K^+ y el desequilibrio osmótico interno (Hsieh *et al.*, 2008). Son varios los trabajos que han investigado las propiedades antimicrobianas de *Bacillus* en relación a la producción de lipopéptidos debido a su capacidad antifúngica exhibida (Hsieh *et al.*, 2008; Ahmad *et al.* 2008; Zhao *et al.*, 2010; Glick 1995;). Con los resultados *in vitro* y microscópicos en este trabajo, se puede fundamentar el uso de *Bacillus* como agente biocontrol; además las cepas de *Bacillus* son el biocontrol más efectivo de múltiples enfermedades de plantas debido a su larga vida de anaquel (Lee *et al.*, 2006)

Cuadro 13. Valores de longitud, alturas máxima y mínima de estructuras fúngicas observadas con MFA. Cada barra representa el promedio de 3 mediciones

Tratamientos	Longitud (μm)	Altura (μm)	
		Máxima	Mínima
Control	18.3 ^a	1156.7 ^a	823.0 ^a
<i>F. solani</i> hb + <i>B. subtilis</i> 1	15.7 ^b	2032.7 ^b	650.0 ^b
<i>F. solani</i> hb -<i>B. subtilis</i> 2	16.3 ^b	1512.7 ^c	949.3 ^a
<i>F. solani</i> hb -<i>B. subtilis</i> 3	11.0 ^c	1236.3 ^a	210.3 ^c

Los resultados son expresados como medias de valores de 3 mediciones. Valores con la misma letra dentro de cada columna son iguales de acuerdo a prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

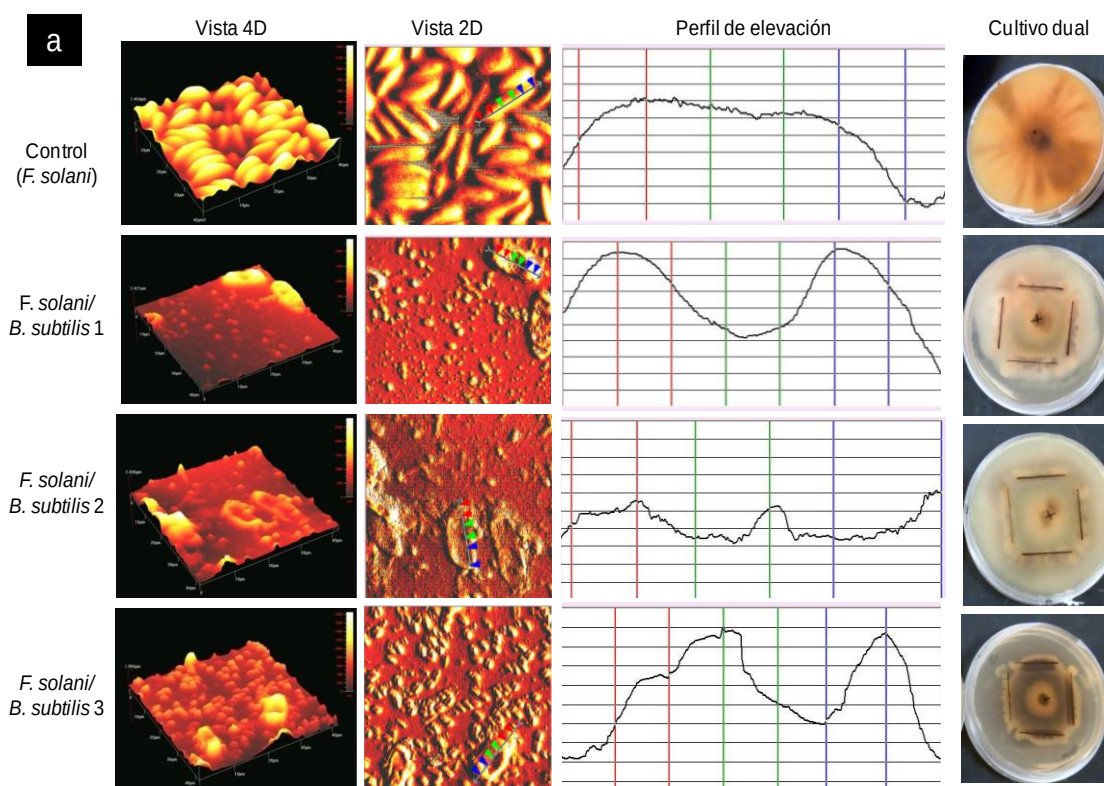


Figura 30. Cambios en la morfología de *F. solani* hb observados a las 48 h de interacción con 3 cepas de *B. subtilis*. a: Imágenes obtenidas con software de MFA y fotografías de cultivos duales en modelo *cuadro* a los 9 días de incubación a 30°C, se sentaron a una concentración de 10^6 conidios mL^{-1} (extremo derecho). Las flechas rojas, verdes y azules de las imágenes de vista 2D, corresponden a los puntos esquematizados en el perfil de elevación.

8.3.5 Valoración de plántulas de algodón tratadas con *Bacillus* ante la presencia de *Fusarium*

Estudios previos han revelado que existen bacterias promotoras de crecimiento vegetal, capaces de producir ácido giberélico o de controlar los niveles de la hormona en plantas (Richardson *et al.*, 2009; Dodd *et al.*, 2010). Los resultados observados en este trabajo indican que la presencia de *Bacillus* provoca un efecto de protección a la planta contra el patógeno, como se puede apreciar en el Cuadro 14. El tratamiento control+Fshb, registró un daño radicular del 57.9%, que comparado con el tratamiento Mix+Fshb, disminuyó significativamente ($P \leq 0.05$) a un 15.7%, así como una reducción significativa ($P \leq 0.05$) en la longitud de radícula necrosada en los tratamientos Mix+Fshb y

B1+Fshb, comparados con Control+Fshb (Cuadro 14 y Figura 28). Dichos resultados son congruentes con el estudio realizado por Corrales *et al.*, (2011), en el cual aislaron cuatro *Bacillus* sp, que presentaron efecto biocontrolador bajo condiciones de invernadero sobre *Fusarium* sp, en romero, al disminuir la severidad de la marchitez vascular por debajo del 50%.

En cuanto a la presencia del efecto de las cepas de *B. subtilis* sobre el área foliar, los resultados mostraron que B3+Fshb presentó mayor área foliar (11.42 cm^2), comparada con Control+Fshb (4.17 cm^2). Por su parte, los tratamientos B3 ($13 \pm 1 \text{ cm}$) y Mix ($11 \pm 1.73 \text{ cm}$) causaron cambios significativos en longitud de tallo comparado con el control ($8.67 \pm 0.58 \text{ cm}$). Caso contrario en el tratamiento B1, se observó un efecto negativo significativo ($P \leq 0.05$), en la longitud del tallo con respecto al control (Cuadro 14). Lo observado en éste experimento, valida los resultados obtenidos *in vitro* y lo señalado en la literatura acerca de las bacterias, demostrando así, que el empleo de *Bacillus subtilis*, puede ser una alternativa eficiente para el manejo de *Fusarium solani*, para futuros trabajos, se recomienda evaluar en fase de campo las tres cepas de *Bacillus*, aislados en este trabajo con el fin de comprobar su efecto biocontrolador.

En cuanto a los cambios en la concentración de fitohormonas (AIA y AG₃) en las plántulas de algodón, se observó que los tratamientos que poseen las 3 cepas de *B. subtilis*, son mayores al control, de forma significativa ($P \leq 0.05$). Lo que indica que la presencia de los *Bacillus*, puede influenciar los niveles de éstas hormonas en la planta. Lo que pudiera desencadenar en un mecanismo de promoción de crecimiento de las bacterias que se le conoce como método directo de promoción de crecimiento. El cual la bacteria puede influir positivamente en el crecimiento de la planta por medio de la síntesis y excreción de sustancias fitoestimuladoras (Ahmad *et al.*, 2008). Las bacterias del género *Bacillus* sintetizan una gran diversidad de hormonas como auxinas (Idris *et al.*, 2002) y se ha observado efecto positivo en germinación de semillas de maíz y curvatura de coleóptilo (Ambreen y Shahida, 2010).

Por otra parte, el efecto promotor de crecimiento observado en los tratamiento infectados con *F. solani* hb, previamente tratados con *Bacillus* 3 y Mix,

siempre resultaron ser significativamente mayores ($P \geq 0.05$) que el control (Control+Fshb), En tanto al daño observado en los mismos tratamientos, siempre fue menor ($P \leq 0.05$) al registrado en el Control+Fshb (Cuadro 14). Lo anterior indica un efecto estimulador de crecimiento indirecto, por parte de *Bacillus*, (de forma particular y sinérgica), de acuerdo con Glick (1995) y Ahmad *et al.*, (2008), los métodos indirectos son aquellos donde la bacteria sintetiza antibióticos u otros compuestos que tienen un efecto inhibitorio sobre organismos fitopatógenos. Por lo descrito anteriormente, se puede decir que las cepas de *Bacillus* poseen la capacidad de promoción de crecimiento mediante mecanismos directos e indirectos.

Las cuantificaciones de antioxidantes, flavonoides y fenoles (Cuadro 15) en cada uno de los tratamientos, presentaron diferencias significativas ($P \geq 0.05$) comparadas con ambos controles (Control y Control+Fshb), lo que se traduce en el papel que pueden tener las bacterias promotoras de crecimiento vegetal en la promoción de crecimiento de las plantas y el desarrollo de resistencia contra agentes patógenos, conocida como resistencia sistémica inducida (ISR) (Kloepper *et al.*, 1980; Kloepper *et al.*, 2004; Haynes y Swift, 1990; Jain *et al.*, 2013). Por lo que las bacterias podrían ayudar a la planta en condiciones de estrés, mediante la producción de osmoprotectores, mediante el mecanismo conocido como tolerancia sistémica inducida (IST) (Choudhary, 2012).

Cuadro 14. Datos fisiológicos medidos en las plántulas de algodón pretratadas con *Bacillus* y expuestas posteriormente a *F. solani* hb.

Tratamientos	Radícula	Tallo (cm)	Radícula necrosada	Área foliar (cm ²)	Raíces Secundarias	Puntos de infección	Daño radicular (%)
Control	29 ^a	8.67 ^a	0 ^a	10.77 ^a	38.67 ^a	0 ^a	0 ^a
B1	22 ^b	7.67 ^a	0 ^a	9.07 ^b	15 ^b	0 ^a	0 ^a
B2	14.67 ^c	8 ^a	0 ^a	7.20 ^c	20 ^c	0 ^a	0 ^a
B3	25.33 ^d	13 ^b	0 ^a	8.90 ^b	25 ^d	0 ^a	0 ^a
Mix	23.33 ^e	11 ^b	0 ^a	13.47 ^c	29.67 ^e	0 ^a	0 ^a
Control + Fshb	8.33 ^f	9.33 ^a	12.67 ^b	4.70 ^d	13 ^f	7.67 ^b	57.94 ^b
B1+Fshb	11.33 ^g	9 ^a	3.67 ^c	9.53 ^e	8.33 ^g	2.83 ^c	25.08 ^c
B2+Fshb	8.33 ^f	9 ^a	9.67 ^d	6.43 ^f	19 ^c	6.67 ^b	38.14 ^d
B3+Fshb	9.67 ^f	8.67 ^a	15.33 ^e	11.43 ^g	21.33 ^c	3.00 ^c	53.09 ^b
Mix + Fshb	11.67 ^g	10.67 ^b	3.67 ^c	9.13 ^b	29.67 ^e	3.67 ^c	15.74 ^e

Resultados son expresados como medias de 21 muestras. Valores con la misma letra dentro de cada columna son iguales de acuerdo a prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Cuadro 15. Datos bioquímicos medidos en las plántulas de algodón pretratadas con *Bacillus* y expuestas posteriormente a *F. solani* hb.

Tratamientos	AIA	AG ₃	Antioxidantes	Flavonoides	Fenoles
	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$			$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	
Control	5.39 ^a	1.26 ^a	1.10 ^a	4.39 ^a	1.56 ^a
B1	9.78 ^b	1.07 ^b	0.93 ^b	2.45 ^b	1.48 ^b
B2	6.12 ^b	2.53 ^c	1.41 ^c	3.19 ^c	1.69 ^c
B3	14.65 ^c	1.73 ^d	1.21 ^d	1.95 ^d	1.51 ^d
Mix	6.83 ^d	0.83 ^e	1.15 ^e	0.49 ^e	1.41 ^e
Control + Fshb	5.39 ^a	1.41 ^f	1.32 ^f	3.03 ^c	1.92 ^f
B1+Fshb	6.09 ^b	1.24 ^g	1.03 ^g	0.86 ^f	1.34 ^g
B2+Fshb	7.41 ^e	1.58 ^h	1.20 ^h	1.62 ^g	1.79 ^h
B3+Fshb	6.55 ^b	2.12 ⁱ	1.06 ⁱ	2.05 ^d	1.50 ^d
Mix + Fshb	5.43 ^d	1.94 ^j	1.11 ^j	2.18 ^h	1.59 ⁱ

Resultados son expresados como medias de 21 muestras. Valores con la misma letra dentro de cada columna son iguales de acuerdo a prueba de Tukey ($P\leq 0.05$).

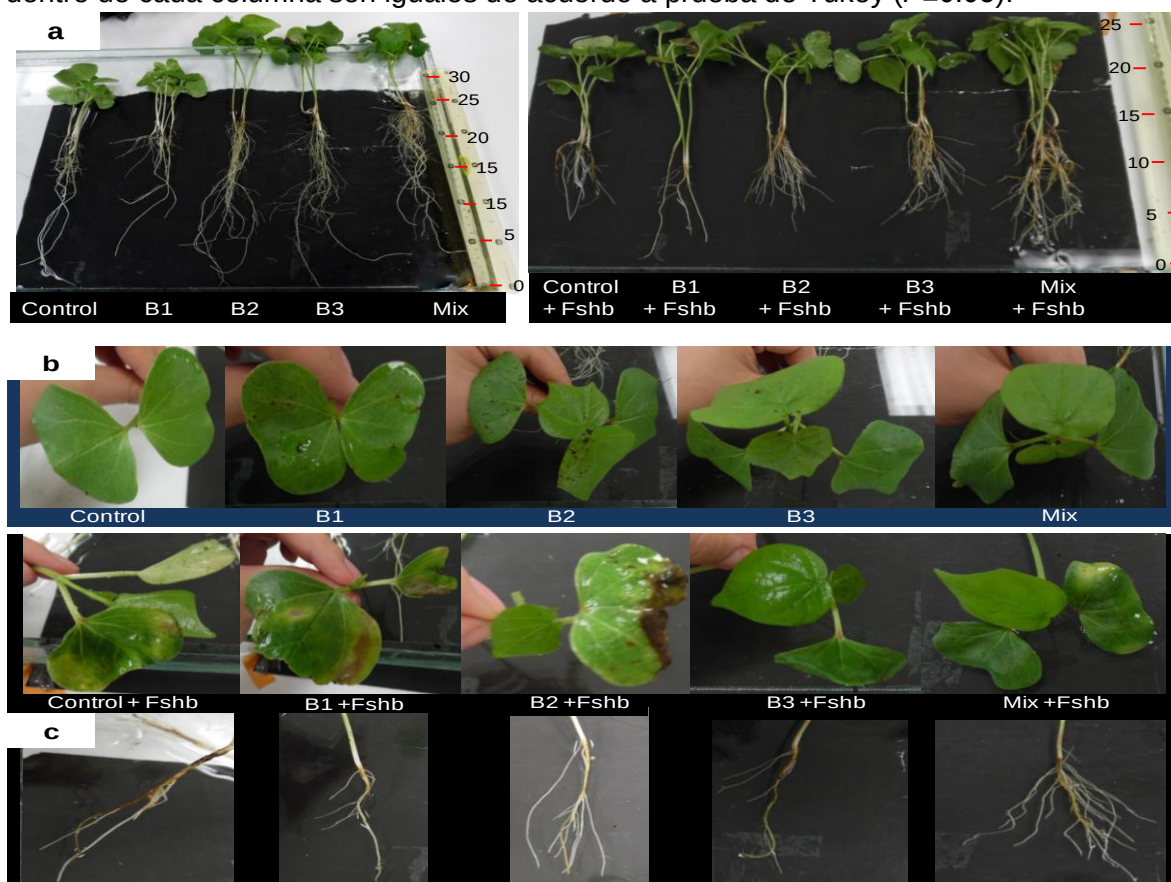


Figura 31. Plántulas de algodón a los 28 días de crecimiento pretratadas con *Bacillus* y expuestas posteriormente a *F. solani* hb. Plántulas completas (a), daño a nivel de foliar de los 10 tratamientos (b) y daño radicular en tratamientos que fueron expuestos al patógeno (c).

8.4 Inoculación de algodón con cepa *A. calcoaceticus* ICA02Ba a nivel de campo

Se obtuvieron resultados de 3 muestreos de cada tratamiento establecido en la parcela experimental (Figura 32 y 33), en tres fechas distintas (Cuadros 16, 17 y 18, respectivamente). En el primer muestreo se observaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre ICA02Ba y el control, en todos los parámetros medidos, a excepción del número de raíces secundarias que no presentó cambios significativos (Cuadro 16).

En cuanto a los parámetros que indican mayor crecimiento vegetal, como longitud radicular y alturas aérea y total fueron mayores significativamente ($P \leq 0.05$) en el tratamiento, comparados con el control. Lo cual indica que a ésta primera fecha de muestreo, la BSF ejerció una influencia positiva sobre el crecimiento de las plántulas inoculadas. Los resultados presentados son similares a los obtenidos por Fallik *et al.*, (1994); Del Gallo y Fendrik, (1994); Levanony y Bashan, (1989), en los que se muestran efectos positivos de la inoculación a nivel de campo, en parámetros de elongación de raíz y tallo.

Cuadro 16. Resultados obtenidos en primer muestreo (18 días desde la inoculación) de experimento en campo.

Variables		Tratamientos	
		Control	ICA02Ba
Altura aérea		25 ^a	36.50 ^b
Longitud radicular	cm	23.33 ^a	30.17 ^b
Altura total		48.33 ^a	66.67 ^b
Peso fresco		0.31 ^a	0.13 ^b
Peso seco	g	0.11 ^a	0.07 ^b
Raíces secundarias		13.67 ^a	15 ^a

Resultados son expresados como medias de 63 muestras. Valores con la misma letra dentro de cada línea son iguales de acuerdo a prueba de Tukey ($P \leq 0.05$)

A los 136 días después de la inoculación (segundo muestreo), los resultados indicaron un efecto similar sin cambios significativos en los parámetros de crecimiento entre las plantas inoculadas y control (Cuadro 17). No obstante, en los parámetros bioquímicos como AG₃ y AIA, existió un efecto significativo del

microorganismo en la planta inoculada, permitiendo un mayor incremento en estas variables con respecto al control (Cuadro 17). Lo cual resulta interesante, puesto que las fitohormonas en tejido vegetal se presentan significativamente en mayor cantidad en el tratamiento comparado con el control, lo que podría indicar la permanencia de la cepa en la rizosfera. En contraste, los valores de fenoles, y antioxidantes, disminuyeron en las plantas inoculadas de manera significativa ($P \leq 0.05$) con respecto al control (Cuadro 17). Por último los valores de flavonoides no presento cambio alguno entre planta inoculada y control.

Cuadro 17. Resultados obtenidos en segundo muestreo (136 días desde la inoculación) de experimento en campo.

Variables		Tratamientos	
		Control	ICA02Ba
Altura aérea		99.05 ^a	103.57 ^a
Longitud radicular	cm	30 ^a	31.81 ^a
Altura total		130 ^a	135.38 ^a
Peso fresco		392.62 ^a	474.76 ^a
Peso de bellotas	g	17.14 ^a	16.67 ^a
Ramificaciones		15.33 ^a	17.24 ^a
Bellotas		11.43 ^a	12.76 ^a
Raíces secundarias		18 ^a	16.90 ^a
AG ₃	μg·mL ⁻¹	2.06 ^a	2.86 ^b
AIA		6.45 ^a	15.92 ^b
Flavonoides		71.07 ^a	73.29 ^a
Fenoles	mg·mL ⁻¹	16.66 ^a	7.45 ^b
Antioxidantes		9.22 ^a	3.40 ^b

Resultados son expresados como medias de 63 muestras. Valores con la misma letra dentro de cada línea son iguales de acuerdo a prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

En el tercer muestreo (Cuadro 18), los resultados indicaron que la inoculación de la cepa ICA02Ba, afecto significativamente ($P \leq 0.05$), el peso fresco y ramificaciones de las plantas comparadas con el control. Lo anterior indica que la biomasa de la planta fue mayor a comparación del control, lo que pudiera deberse a la inoculación con BSF, lograda mediante la interacción bacteria-planta. Los resultados anteriores son congruentes con lo observado por Qureshi *et al.*, (2012), Gyaneshwar *et al.*, 2002; El-Komy, 2005, en los cuales

observaron un incremento de parámetros fisiológicos de plantas de algodón inoculadas a nivel de campo con bacterias solubilizadoras de fósforo, a distintos intervalos de tiempo. Dichos resultados fueron atribuidos a la colonización bacteriana de la rizosfera, mejora en la disponibilidad de nutrientes y biosíntesis de fitohormonas, como lo han reportado otros investigadores (Patten y Glick, 2002; Kamilova *et al.*, 2006; Rai, 2006; Idris *et al.*, 2007).

En contraste, los parámetros bioquímicos como antioxidantes, fenoles y flavonoides fueron significativamente menores ($P \leq 0.05$), con respecto al grupo de plantas control. Se esperaba que dichos parámetros obtuvieran un valor mayor significativo, con respecto al control. Puesto que las bacterias promotoras de crecimiento vegetal, son capaces de desencadenar resistencia sistémica inducida (ISR) (Corné *et al.*, 2014; De Vleeschauwer y Höfte, 2009). Sin embargo, los resultados del presente trabajo, son congruentes con lo observado sorprendentemente, durante la colonización de raíces de *Arabidopsis thaliana* por rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal, en el cual no mostró aumento de la producción de compuestos bioactivos (fenoles, antioxidantes y flavonoides) en el tejido vegetal, incluso, no se incrementó la expresión de genes encargados de la codificación de dichos compuestos. Lo que sugirió que ISR está basado en la sensibilidad de éste tipo de compuestos bioactivos, más no necesariamente con un incremento de su biosíntesis (Van Wees *et al.*, 1999; Pieterse *et al.*, 2000).

En las demás variables fisiológicas no se observaron diferencias significativas entre tratamiento y control (Cuadro 18). Lo cual pudo deberse a la dosis empleada durante la inoculación. Tema que previamente fue abordado ampliamente en una revisión de trabajos de promoción de crecimiento en plantas por bacterias rizosféricas, realizadas en suelos de Baja California Sur, publicada por Holguin *et al.*, (2003), donde sugieren que la dosis del inoculo posee gran importancia en la obtención de resultados exitosos, tras la inoculación en plantas, a nivel de campo.

Cuadro 18. Resultados obtenidos en tercer muestreo (184 días desde la inoculación) de experimento en campo.

Variables		Tratamientos	
		Control	ICA02Ba
Altura aérea		124.1 ^a	140.50 ^b
Longitud radicular	cm	28.9 ^a	29.40 ^a
Altura total		153 ^a	169.9 ^a
Peso fresco	g	253.5 ^a	547 ^b
Peso de bellotas		15.74 ^a	15.75 ^a
Flores		1.6 ^a	2.4 ^a
Ramificaciones		24.1 ^a	16.8 ^b
Bellotas		7.8 ^a	9.40 ^a
Raíces secundarias		14.1 ^a	16.2 ^a
Giberelinas	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	4.78 ^a	3.53 ^a
Auxinas		6.72 ^a	6.04 ^a
Flavonoides		25.25 ^a	24.06 ^b
Fenoles	$\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	9.09 ^a	7.8 ^b
Antioxidantes		8.84 ^a	5.52 ^b

Resultados son expresados como medias de 63 muestras. Valores con la misma letra dentro de cada línea son iguales de acuerdo a prueba de Tukey ($P \leq 0.05$)

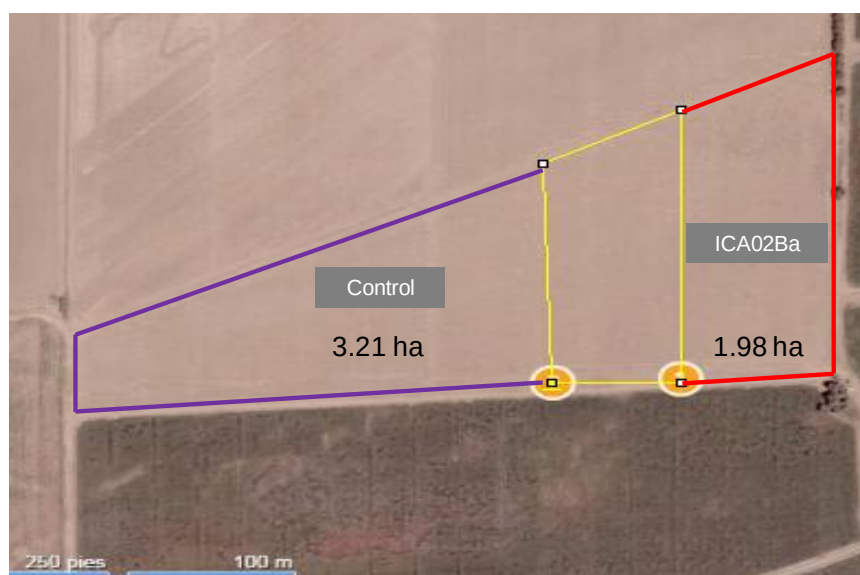


Figura 32. Ubicación y extensión de tratamientos sobre área de parcela empleada.

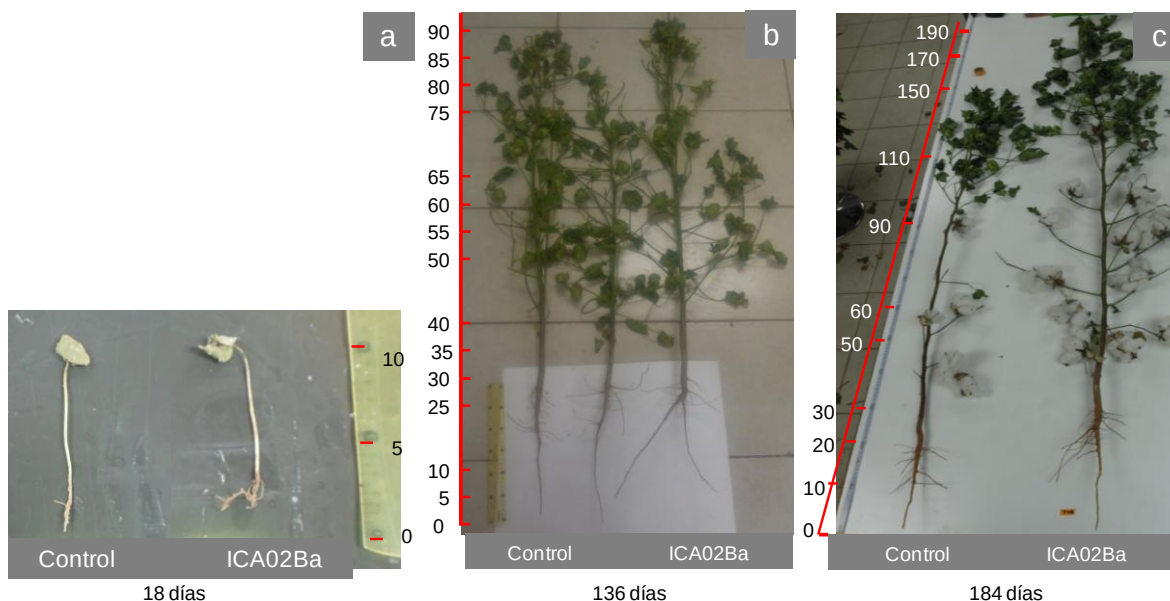


Figura 33. Plantas de algodón inoculadas y sin inocular (control) del experimento en campo. a) Plantas a los 18 días desde la inoculación, b) Plantas a los 136 días desde la inoculación y c) Plantas 184 días desde la inoculación. La escala de longitud empleada está en cm.

Finalmente, los resultados indicaron que el empleo de un inoculante basado en *Acinetobacter calcoaceticus* ICA02Ba, aislada de la rizosfera de mezquite, capaz de inducir cambios a nivel fisiológico y bioquímicos que se refleja en su crecimiento (Figura 34). Existe la hipótesis de que el incremento de captación de nutrientes es una consecuencia del aumento de la superficie radicular por las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (Mantelin y Touraine, 2004). Sin embargo, los transportadores de iones están bajo control de procesos de regulación que ajustan su actividad a la demanda nutricional de la planta (Imsande y Touraine, 1994; Lappartient y Touraine, 1996; Lappartient *et al.*, 1999; Nazoa *et al.*, 2003), así que las regulaciones del desarrollo radicular y actividades de transporte de iones son coordinadas de manera antagonista para mantener una tasa constante de adquisición de nutrientes (Touraine, 2004); de tal forma que las bacterias promotoras de crecimiento vegetal como *Acinetobacter calcoaceticus* ICA02Ba, podrían interferir en las vías de señalización del desarrollo y nutrición vegetal para provocar incremento en tasa de adquisición de nutrientes y promoción de crecimiento vegetal. Aunado a lo anterior, las bacterias promotoras

de crecimiento vegetal pueden directamente incrementar el suministro de nutrientes en la rizosfera y/o estimular los sistemas de transporte de iones en raíces. Por lo anterior es necesario continuar con la evaluación en campo de inoculantes formulados para confirmar los resultados obtenidos usando diferentes dosis. Esto nos dará la oportunidad de poder profundizar en el conocimiento de la producción microbiana en fermentadores de mayor escala, así como en las diferentes alternativas de formulación.



Figura 34. Crecimiento del cultivo a los 193 días desde la siembra.

9. CONCLUSIONES

La investigación de las bacterias aisladas, así como la continuidad de proyectos de aislamiento de cepas nuevas nativas del Valle de Mexicali, es importante para seguir analizando su aplicación en ensayos a nivel de campo que puedan ser repetidos de manera subsecuente y hasta permanente. Por otra parte, todos los conocimientos que se generen de una mayor experimentación con bacterias nativas permitirán avanzar en el estudio de las mismas, como potenciales herramientas de inoculación de los suelos deficientes de fósforo o con problemas de presencia de fitopatógenos.

En el presente trabajo se aislaron 7 cepas bacterianas, 4 solubilizadoras de fósforo y 3 antagonicas, se identificaron molecularmente dentro de los géneros de *Acinetobacter* y *Bacillus*, respectivamente. Se caracterizaron a partir de su cinética de crecimiento, se la concentración a trabajar en las pruebas posteriores (3×10^9 UFC·mL⁻¹). De acuerdo con estos análisis, se determinó que las bacterias solubilizadoras de fósforo son capaces de producir biopelícula *in vitro* y muestran tolerancia a medio salino hasta una concentración de 1 M de NaCl, en un periodo de 72 h. Se sugiere que la capacidad solubilizadora de *Acinetobacter*, confirmada de forma cualitativa y cuantitativa, está relacionada con su capacidad de acidificación de medio, mediada posiblemente por ácidos orgánicos. *Acinetobacter* posee capacidad de promoción de crecimiento, observada en ensayos de germinación de semillas de pepino, tomate y chile. Se recomienda que el inóculo bacteriano sea compuesto por al menos 2 cepas distintas que actúen de forma sinérgica.

En cuanto a las 3 cepas de *Bacillus subtilis* que muestran capacidad antagonica contra 5 cepas de *Fusarium*, se observa mayor efecto inhibitorio cuando se cultivan en el modelo *cuadro*, es decir, empleando cultivos bacterianos totales, sin embargo, cada cepa posee distintos mecanismos para actuar contra *Fusarium*. La hipótesis de que *Bacillus* produce antibióticos se comprobó, mediante la amplificación de 3 genes (*sboA*, *qk* e *ituA*), que codifican antibióticos lipopeptídicos. Además, las 3 cepas antagonicas son capaces de provocar

cambios morfológicos en conidios de *F. solani* hb, observados en el espectro de topología por MFA. De acuerdo a los resultados en plantas de pepino inoculadas con *B. subtilis* e infectadas con *F. solani* hb, se puede reducir el daño por el fitopatógeno.

En todos los aislados bacterianos se detectaron distintas concentraciones de AIA y AG₃. Se sugiere que la promoción de crecimiento vegetal observada en los ensayos con plántulas, son detonados por la presencia de éstos reguladores de crecimiento secretados por las bacterias.

Por último, ICA02Ba es capaz de aumentar significativamente la biomasa de plantas de algodón a nivel de campo.

11. LITERATURA CITADA

- Abd-Elsalam K. A., Abdel-Mongy Asran-Amal, Moawad R. Omar, Aly A. Aly. 2006. Frequency and diversity of *Fusarium* spp. colonizing roots of Egyptian cottons. Archives of Phytopathology and Plant Protection. 39:165-177.
- Acosta, E. 2000. Uso potencial de los suelos para la producción del algodón en los municipios de Cabuyaro (Meta) y Villanueva (Casanare). En memorias: Aportes tecnológicos a la producción Competitiva y sostenible del algodón en los Llanos orientales de Colombia. Seminario estratégico.
- Agrios G. N. 2005. Plant Pathology. Amsterdam: Academic 4:635
- Aguirre-Medina, J. F., Irizar-Garza, M. B., Durán-Prado, A, Grajeda-Cabrera, O. A., Peña del Río, M.A., Loredó-Osti, C., Gutiérrez-Baeza, A. 2009. Los biofertilizantes microbianos: alternativa para la agricultura en México. INIFAP Folleto Técnico Num. 5
- Ahmad A. K., G. Jilani, M. S. Akhtar, S. M. Saqlan Naqvi, M. Rasheed. 2009. Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production. J. Agric. Biol. Sci. 1:48-58.
- Ahmad F., Ahmad, I., Khan, M.S. 2008. Screening of Free-Living Rhizospheric Bacteria for Their Multiple Plant Growth Promoting Activities, Microbiological Research. 163:173-181.
- Akgül D.S., Mirik M. 2008. Biocontrol of *Phytophthora capsici* on pepper plants by *Bacillus megaterium* strains. Journal of Plant Pathology. 90:29–34.
- Akhtar, J., Saqib, Z. A., Sarfraz, M., Saleem, I., Hao, M. A. 2010. Evaluating salt tolerant cotton genotypes at different levels of NaCl stress in solution and soil culture. Pak. J. Bot. 42:2857-2866.
- Alam S., S. Khalil, N. Ayub, M. Rashid. 2002. *In vitro* Solubilization of Inorganic Phosphate by Phosphate Solubilizing Microorganisms (PSM) from Maize Rhizosphere. International journal of agriculture & biology. 4:454–458.
- Alexander M. 1980. Effects of acidity on microorganisms and microbial processes in soils. En: Hutchinson T.C. Havas M. (eds). Effects of acid precipitation on terrestrial ecosystems. Plenum Press, New York. 363-374.
- Alexander M. 1994. Biodegradation and Bioremediation, Academic Press, San Diego. 139.
- Allendorf F. W. 2011. Conservation and the genetics of populations. Eds. Allendorf y Luikart. 2:1-240.
- Ambreen A., Shahida H. 2010. Auxin-producing *Bacillus* sp.: Auxin quantification and effect on the growth of *Solanum tuberosum*. Pure and Applied Chemistry. 82:313-319.
- Amer A. G. Utkhede R.S. 2007. Development of formulation of biological agents for management of root rot of lettuce and cucumber. Canada. J Micribiol. 46:809-816.

Amezquita E. 1992. Procesos físicos de degradación de suelos en Colombia. Actualidades ICA. 6-8.

Andrews G. F. 1990. Large-scale bioprocessing of solids. Biotechnol. Prog. 6: 225-230.

Arkhipova T. N., Veselov S U, Melentiev A I, Martynenko E V, Kudoyarova G R. 2005. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. Plant and Soil 272:201-209.

Arruebarrena Di Palma, A. C. M. Pereyra, L. Moreno Ramírez, M. L. Xiqui Vázquez, B. E. Baca, M. A. Pereyra, L. Lamattina³, C. M. Creus. 2012. Denitrification-derived nitric oxide modulates biofilm formation in *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol Lett . 1-9.

Arshad M., Frankenberger W. T. 1991. Microbial production of plant hormones. Plant Soil. 133:1-8.

Asea P.E.A, Kucey R. M. N., Stewart J. W. B. 1988. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. Soil Biol Biochem 20:459-464.

Assmus B, Hutzler P, Kirchhof G, Amann R, Lawrence JR, Hartmann. 1995. A: In situ localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled rRNA targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. Appl Environ Microbiol, 61:1013-1019

Atlas R. M. Bartha R. 1997. Microbial Ecology: Fundamentals and Applications: Benjamin Cummings. 533 p.

Babenko Y. S., G. Tyrygina E. F. Grigoryev L. M. Dolgikh, T. I. Borisova. 1984. Biological activity and physiologo-biochemical properties of bacteria dissolving phosphates. Microbiologya. 53:533-539.

Babu-Khan S., Yeo C., Martin W. L., Duron M. R., Rogers R y Goldstein A. 1995. Cloning of a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 972–978.

Baca B. E., Elmerich C. 2007. Microbial production of plant hormones. En: Elmerich C, Newton WE, editores. Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.113-143.

Bajpai P. D., Sundara Rao W. V. B. 1971. Phosphate solubilizing bacteria. Soil. Sci. Plant Nutr. 17:46-53.

Banerjee S., Palit R., Sengupta C., Standing D. 2010. Stress induced phosphate solubilization by *Arthrobacter* sp. and *Bacillus* sp. Isolated from tomato rhizosphere. Australian Journal of crop science. 6:378-383.

Banik S. Dey B. K. 1982. Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing microorganisms. Plant and Soil. 69:353-364.

Bapat S., Shah A. K. 2000. Biological control of fusarial wilt of pigeon pea by *Bacillus brevis*. Can J Microbiol. 46:125-132.

Barber, S. A., 1984. Soil Nutrient Bioavailability: A Mechanistic Approach. John Wiley, New York.

Barea J. M, Azcón R, Azcón-Aguilar C. 2005. Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. In: Buscot F, Varma S. Eds. Micro-organisms in soils: roles in genesis and functions. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag. 195-212.

Bashan Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. Biotechnology Advances. 4: 729-770.

Bashan Y. 2008. La biofertilización como tecnología sostenible. Prólogo. El uso de inoculantes microbianos como una importante contribución al futuro de la agricultura mexicana. Eds. Plaza y Valdés. 1:17-25.

Bashan, Y., Levanony, H. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. Canadian Journal of Microbiology. 36:591-608.

Bashan Y., Levanony H., Ferrera-Cerrato R. 1996. Interacciones entre plantas y microorganismos beneficios: II bacterias asociativas de la rizosfera. Terra. 1:159-183.

Bashan, Y. y Holguin, G. 1994. Root-to Root travel of the beneficial bacterium. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 60. No. 6: 2120-2131

Baziramakenga R., Leroux, G. D., Simard R. R. 1995. Effects of benzoic and cinnamic acids on membrane permeability of soybean roots. J. Chem. Ecol. 21:1271-1285.

Beever R. E., D. J. Burns. 1980. Phosphorus uptake, storage and utilization by fungi. Adv. Bot. Res. 8: 127-219.

Belimov A. A., A. P. Kojemiakov C. V. Chuvarliyeva. 1995. Interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate-solubilizing bacteria Plant Soil. 173:29-37.

Bernal G., Illanes A., Ciampi L. 2002. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp., with antibiotic activity against plant pathogenic agents. EJB Electronic J Biotechnol.15:7-8.

Blakeslee J.J., Peer W. A., Murphy A. S. 2005. Auxin transport. Curr Opin Plant Biol. 8: 494–500.

Bobadilla C., Rincón S. 2008. Aislamiento y producción de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza. Tesis. Colombia.

Boddey R.M., J.C. Polidoro, A. S. Resende, B.J.R. Alves, S. Urquiaga. 2001. Use of the ¹⁵N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N₂fixation to sugar cane and other grasses. Aust J Plant Physiol. 28:889–895.

Bogino P. C., M. M. Oliva, F. G. Sorroche, W. Giordano. 2013. The Role of Bacterial Biofilms and Surface Components in Plant-Bacterial Associations. *Int. J. Mol. Sci.* 14:15838-15859.

Bohórquez W. 1999. Efecto de un biofertilizante de *Azotobacter chroococcum* y bacterias fosfato solubilizadoras (BFS) en un cultivo de tomillo (*Thimus vulgaris* L). Tesis. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia, 107.

Bottini R. Cassán, F. Piccoli, P. 2004. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65: 497–503

Burgstaller W. y F. Schinner, 1993. Leaching of metals with fungi. *J. Biotechnol.* 27: 91-116.

Caballero-Mellado J., E. Von Scheven-Cordero, G. R. González-Cu, J. F. Aguirre. 2000. *Azospirillum* inoculation and its agronomic application in Mexico. Fourth European Nitrogen Fixation Conference. Sevilla, Spain. 45.

Caballero-Mellado J., Onofre-Lemus J., Estrada-de los Santos P., Martínez-Aguilar L. 2007. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Appl Environ Microbiol.* 73:5308–5319.

Cadena Torres J., Prieto, Bernardo; Pedroza Sierra, J. Tapia, J. Jaime. 2009. Recomendaciones técnicas para la recolección mecánica y otras labores del cultivo del algodón en el departamento de Córdoba. Córdoba, Colombia. Corpoica. 32.

Carcaño-Montiel M. 2010. Microorganismos benéficos y efectivos para la agricultura mexicana. 4º. Simposium de Química ambiental. RN-ICA. 17-23.

Chaiharn M. Lumyong S. 2009. Phosphate solubilization potential and stress tolerance of rhizobacteria from rice soil in Northern Thailand. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25:305-314.

Chakraborty A. P., Chakraborty, B. N., Chakraborty, U. 2010. Protection of tea plants against pest and pathogen through combined application of pesticide and plant growth promoting rhizobacterium. *Journal of Mycology and Plant Pathology.* 40: 519-531.

Chandra A., Anand A., Dubey A. 2007. Effect of salicylic acid on morphological and biochemical attributes in cowpea. *J. Environ. Biol.* 28:193-196.

Charana, W. B., Yoon, M. H. 2013. Phosphate solubilizing bacteria: Assessment of their effect on growth promotion and phosphorous uptake of mung bean (*Vigna radiata* [L.] R. Wilczek). *Chil. J. Agr. Res.* 73:275-281.

Chen, Y. P., P. D. Rekha, A. B. Arunshen, W. A. Lai, C. C. Young. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl. Soil Ecol.* 34:33-41.

Chin-A-Woeng T. F.C, Bloemberg G. V, Mulders I. H. M, Dekkers L. C, Lugtenberg B. J. J. 2000. Root colonization is essential for biocontrol of tomato foot and root rot by the phenazine-1- carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391. Mol. Plant-Microbe Interact. 13:1340–45

Choudhary, D.K., 2012. Microbial rescue to plant under habitat-imposed abiotic and biotic stresses. Appl. Microbiol. Biotechnol. 96:1137-1155.

Chung, H., Park, M., Madhaiyan, M., Seshadri, S., Song, J., Cho, H., Sa, T. 2005. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. Soil Biology and Biochemistry 37:1970–1974.

Colyer P. D. 1988. Frequency and pathogenicity of *Fusarium* spp. associated with seedling diseases of cotton in Louisiana. Plant. Dis. 72:400-402.

Compant S., Duffy B, Nowak J., Clément C., Barka E. A. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. Applied and Environmental Microbiology. 71:4951-4959.

Cooper R. 1959. Bacterial fertilizers in Soviet Union. Soils Fert. 22:327-333.

Corrales L. C., L. C. Sánchez, J. Cuervo P., D. B. L. González, M. Guevara. 2010. Evaluación del efecto biocontrolador de *Bacillus* sp., frente a *Fusarium* sp., bajo condiciones de invernadero en *Rosmarinus officinalis* L. En ciencias biomédicas. 63 – 75.

Das D. P., Das J., Parida, K. M. 2003. Physicochemical characterization and adsorption behaviour of calcined Zn/Al hydrotalcite-like compound (HTlc) towards removal of fluoride from aqueous solution. J. Colloid Interface Sci. 261: 213–220.

Datta M. Banish S. Dupta R.K. 1982. Studies on the efficacy of a phytohormones producing phosphate solubilizing *Bacillus firmus* in augmenting paddy yield in acid soils of Nagaland. Plant Soil. 69:365-373.

Davis, R. G., Bird, L. S., Chambers, A. Y., Garber, R. H., Howell, C. R., Minton, E. B., Sterne, R. and Johnson, L. F. 1981. Seedling disease complex. In: Compendium of cotton diseases, ed. by G. M. Watkins, Amer. Phytopath. Soc., St. Paul, USA. 13-19.

De Vleesschauwer D, Höfte M. 2009. Rhizobacteria-induced systemic resistance. Adv. Bot. Res. 51:223–81

Del Gallo M. y I. Fendrik. 1994. The rhizosphere and *Azospirillum*. *Azospirillum*/plant roots associations. Y. Okon (Ed.) CRC Press, Boca Ratón. 57-75.

Díaz Vargas. 1998. P. R. Ferrera-Cerrato, J.J. Almaraz-Suárez y G. Alcántar González. 2001. Inoculation of Plant Growth-promoting Bacteria in Lettuce. Terra 19: 227-335.

Domínguez R., M. C. del Campillo, F. Peña, A. Delgado. 2001. Effect of soil properties and reclamation practices on phosphorus dynamics in reclaimed calcareous marsh soils from the Guadalquivir Valley, S. W. Spain. Arid Land Res. Manage. 15:203-221.

Dobbelaere S., Croonenborghs A., Thys, A., Ptacek D., Vanderleyden J., Dutto P., Labandera-Gonzalez, C., Caballero-Mellado, J., Aguirre, J.F., Kapulnik Y., Brener, S., Burdman S., Kadouri D., Sarig S., Okon Y. 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. Aust. J. Plant Physiol. 28:871-879.

Dodd, J. C., I. Arias, I. Koomen D. S. Hayman. 1990. The management of populations of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in acid-infertile soils of a savanna ecosystem. Plant and Soil. 122:229-240.

Douka, C. E., Apostalakis, C. G. And Skarloy, V. D. 1978. Studies of *Rhizobium meliloti* isolated from salt-affected soil. Annals Appl. Biol. 88: 457–460

Duitman E., Hamoen L, Rembold M., Venema G, Seitz H, Saenger W. 1999. The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: A multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. Proc Natl Acad Sci U S A. 96:13294-13299.

Duxbury J. M. 1994. The significance of agricultural sources of greenhouse gases. Fertilizer research. 38:151-163.

Egamberdiyeva D. y G. Höflich. 2004. Effect of plant growth-promoting bacteria on growth and nutrient uptake of cotton and pea in a semi-arid region of Uzbekistan. Journal of Arid Environments 56: 293–301.

Elliott, L. F., Lynch, J. M. 1995. The international workshop on establishment of microbial inoculants in soils: Cooperative research project on biological resource management of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Am. J. Alt. Agric. 10:50-73.

El-Komy H. M. A. 2005. Coimmobilization of *Azospirillum lipoferum* and *Bacillus megaterium* for Successful Phosphorus and Nitrogen Nutrition of Wheat Plants. Food Technol. Biotechnol. 43:19–27.

El Sorra E., Idris D. J, Iglesias M. T., Rainer B. 2007. Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. Mol Plant Microbe Interact. 6:619-626.

El Zemrany H., Cortet, J., Lutz, M. P., Chabert, A., Baudoin, E., Haurat, J. 2006. Field survival of the phytostimulator *Azospirillum lipoferum* CRT1 and functional impact on maize crop, biodegradation of crop residues, and soil faunal indicators in a context of decreasing nitrogen fertilisation. Soil Biol. Biochem. 38:1712–1726.

Escobedo-Salas M., U. Nava-Camberos, M. Ramírez-Delgado, J. Héctor Esparza-Martínez, M. Sepúlveda-Bojorquez. 2004. Fenología, rendimiento, calidad de fibra y efectividad para el control de plagas de variedades transgénicas de algodónero, en la comarca lagunera. Revista Chapingo Serie Zonas Áridas. 3:115-121.

Etchegaray A., de Castro Bueno, C., Soares de Melo, I., Mui Tsai, S., de Fátima Fiore, M., Silva-Stenico, M.E., Beraldo de Moraes, L.A., Teschke, O. 2008. Effect of a highly

concentrated lipopeptide extract of *Bacillus subtilis* on fungal and bacterial cells. Arch. Microbiol. 190:611-622.

Fallik E., S. Sarig y Y. Okon. 1994. Morphology and physiology of plant roots associated with *Azospirillum*. *Azospirillum/plant roots associations*. Y. Okon (Ed.) CRC Press, Boca Ratón. 77-85.

Fuentes-Ramírez L. E, Caballero-Mellado J. 2005. Bacterial fertilizers. En: Siddiqui ZA, editor. PGPR: biocontrol and biofertilization. Dordrecht, Springer. 143-172.

Fuentes-Ramírez L. E., Caballero-Mellado, J., Sepúlveda, J., Martínez-Romero E. 1999. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. FEMS Microbiology Ecology. 29:117-128.

Gadd G.M. 1993. Interactions of fungi with toxic metals. New Phytologists, 24:25-60.

García J. A. L., Probanza A., Ramos B, Palomino MR, Manero FJG. 2004. Effect of inoculation of *Bacillus licheniformis* on tomato and pepper. Agronomie for sustainable development. 24:169-176.

Gayoso, J., D. Alarcón, R. Sagardía, R. Muñoz. 2000. Revisión bibliográfica. Programa de conservación de suelos. Mininco.

Gerretsen F. C. 1948. The influence of microorganisms on the phosphate intake by the plant. Plant Soil 1:51-81.

Giaconi M. V, M. Escaff. 1993. Cultivo de hortalizas. Santiago de Chile. Editorial Universitaria. 328.

Glick B. R. 2005. Modulation of Plant Ethylene Levels by the Bacterial Enzyme ACC Deaminase. FEMS Microbiology Letters. 251: 1-7

Goldstein A.H. 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspectives and future prospects. Am. J. Altern. Agricult. 1: 57–65.

Goldstein A. H. 1995. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by Gram-negative bacteria. Biol. Agri. Hort. 12:185-193.

Goldstein A. H. 2007. Future trends in research on microbial phosphate solubilization: one hundred years of insolubility. In: Velázquez, E., Rodríguez- Barrueco, C. (Eds.), First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 91–96.

Goldstein A. H., Lester, T., Brown, J. 2003. Research on the metabolic engineering of the direct oxidation pathway for extraction of phosphate from ore has generated preliminary evidence for PQQ biosynthesis in *Escherichia coli* as well as a possible role for the highly conserved region of quinoprotein dehydrogenases. Biochim. Biophys. Acta. 1647:266–271.

Gong M., Wang JD, Zhang J, Yang H., Lu XF, Pei Y. 2006. Study of the Antifungal Ability of *Bacillus subtilis* Strain PY-1 in *Vitro* and Identification of its Antifungal Substance (Iturin A). *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 38:233-240.

Gordon S. A., Weber R. P. 1951. Colorimetric stimulation of indoleacetic acid. *Physiol. Lancaster*. 26:192.

Gravel V., H. Antoun, R.J. Tweddell. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of Indole Acetic Acid (IAA). *Soil Biol. Biochem.*, 39: 1968-1977.

Guang-Can T, Shu-tun T, Miao-Ying C, Guang-hui. 2008. Phosphate solubilizing and mineralizing abilities of bacteria isolated from soils. *Pedosphere*. 18:515-523.

Gutiérrez-Luna F. M., López-Bucio J., Altamirano-Hernández J., Valencia-Cantero E., Reyes de la Cruz H, Macías-Rodríguez L. 2010. Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. *Symbiosis*. 51:75-83.

Gyaneshwar P., G. N. Kumar, L. J. Parekh, P. S. Poole. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil*. 245:83-93.

Hafeez F.Y., Yasmin S, Ariani D. Mehbood-ur-Rahman Z, Malik K.A. 2006. Plant growth promoting bacteria as biofertilizer. *Agron. Sustain. Dev*. 26:143-150.

Halder A. K., Mishra, A. K., Bhattacharya, P., Chakrabarthy, P. K., 1990. Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *J. Gen. Appl. Microbiol*. 36: 81–92.

Hamid A., Ahmaj G. 2010. The effect of seed inoculation (*Pseudomonas putida*+*Bacillus lentus*) and different levels of fertilizer on yield and yield components o wheat (*Triticum aestivum* L.) activities world academy of science. *Eng. Technol*. 68.

Han H., S. Supanjani, K.D. Lee. 2006. Effect of co-inoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber. *Plant Soil Environ*. 3: 130–136.

Hayat R., Ali S., Amara U., Khalid R., Ahmed I. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann Microbiol*. 4:579-598.

Haynes, R.J., Swift, R.S., 1990. Stability of soil aggregates in relation to organic constituents and soil water content. *J. Soil Sci*. 41:73-83

Hinsinger P. 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant Soil*. 237: 173–195.

Hoffland E. 1992. Quantitative evaluation of the role of organic acid exudation in the mobilization of rock phosphate by rape. *Plant and Soil*. 2:279-289

Hoffland E., Kuyper T.W., Wallander H., Haselwandter K. 2004. The role of fungi in weathering. *Front Ecol Environ*. 2: 258-264.

Holford I. C. R. 1997. Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. Aust. J. Soil. Res. 35: 227–239

Holguin G, Bashan Y. 1996. Nitrogen-fixation by *Azospirillum brasilense* Cd is promoted when co-cultured with a mangrove rhizosphere bacterium *Staphylococcus* sp. Soil Biol Biochem. 28:1651-1660.

Holguin G., Y. Bashan, E. Puente, A. Carrillo, G. Bethlenfalvay, A. Rojas, P. Vázquez, G. Toledo, M. B. Jiménez, B. R. Glick, L. de Bashan, V. Lebsky, M. Moreno y J. P. Hernández. 2003. Promoción del crecimiento en plantas por bacterias de la rizosfera. Agricultura Técnica en México. 29:201-211.

Hopkins C. G., Whiting A. L. 1916. Soil bacteria and phosphates. III. Agric Exp Stn Bull. 190:395–406.

Hsieh F.C., Lin, T.C., Meng, M., Kao, S.S., 2008. Comparing methods for identifying *Bacillus* strains capable of producing the antifungal lipopeptide Iturin A. Curr. Microbiol. 56.

Hua S. S. T., Tsai, V., Lichens, G. M. Noma, A. T., 1982. Accumulation of amino acid in *Rhizobium* spp. WR 10001 in response to sodium chloride. Appl. Environ. Microbiol. 44: 135–140.

Idris E. E., E. J. Iglesias, M. Talon, R. Borriss. 2007. Tryptophan dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. Molecular Plant-Microbe Interactions. 20:619–626

Idris E. E. S, Makarewicz O, Farouk A, Rosner K, Greiner R, Bochow H, Richter T, Borriss R. 2002. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 45 contributes to its plant-growthpromoting effect. Microbiology 148:2097–2109.

Igual J. M., Valverde, A., Cervantes, E., Velázquez, E., 2001. Phosphate solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. Agronomie. 21: 561–568.

Illmer P., y Schinner F. 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest Soil Biology and Biochemistry. 24:389–95.

Illmer P. y Schinner, F. 1995. Solubilization of Inorganic Calcium Phosphates-Solubilization Mechanisms. Soil Biology and Biochemistry. 27:257-263.

Imsande J., y Touraine, B.1994. N demand and the regulation of nitrate uptake. PlantPhysiol. 105: 3–7.

Inzé D., Follin A, Van Lijsebettens M, Simoens C., Genetello C., Van Montagu M., Schell J. 1984. Genetic analysis of the individual T-DNA genes of *Agrobacterium tumefaciens*: further evidence that two genes are involved in indole-3-acetic acid synthesis. Mol Gen Genet. 194: 265–274.

Jain, S., Vaishnav, A., Kasotia, A., Kumari, S., Gaur, R.K., Choudhary, D.K., 2013. Bacteria induced systemic resistance and growth promotion in Glycine max L. Merrill upon challenge inoculation with *Fusarium oxysporum*. Proc. Natl. Acad. Sci. India, Sect. B Biol. Sci. 83, 561-567.

Jones J. W., G. Hoogenboom, C. H. Porter, K. J. Boote, W. D. Batchelor, L. A. Hunt, P. W. Wilkens, U. Singh, A. J. Gijsman, and J. T. Ritchie. 2003. The DSSAT cropping system model. Eur. J. Agron. 18: 235-265.

Jones R. P., G. M. Gadd. 1990. Ionic nutrition of yeast physiological mechanisms involved and implications for biotechnology. Enzyme Microbial Technol. 12:1-17.

Jousset A., Rall B., Kalinkat G., Scheu S., Brose U. 2009. Extracellular toxin production by soil bacteria cause a shift from a type III to type IV functional response by microfaunal predators. The 39th. Annual Meeting of the ecological. Society of Germany, Austria and Switzerland.

Jurkevitch E., Y Hadar, Y. Chen. 1992. Utilization of the siderophores fob and pseudobactin by rhizosphere microorganisms of cotton plants. J. Plant. Nutr. 15:2183-2192.

Kamilova F., L. V. Kravchenko, A. I. Shaposhnikov, T. Azarova, N. Makarova, B. Lugtenberg. 2006. Organic acids, sugars, and L-tryptophan in exudates of vegetables growing on stone wool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. Molecular Plant-Microbe Interactions. 19:250–256.

Kanchana D., M. Jayanthi, G. Usharani, P. Saranraj D. Sujitha. 2014. Interaction effect of combined inoculation of PGPR on growth and yield parameters of Chili var K1 (*Capsicum annuum* L.). International Journal of Microbiological Research. 3: 144 - 151.

Kang S. C., C. G. Hat, T. G. Lee, D. K. Maheshwari. 2002. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a soil-inhabiting fungus *Fomitopsis* sp. PS 102. Curr. Sci. 82:439-442.

Klebensberger J, Lautenschlager K, Bressler D, Wingender J. Philipp B. 2007. Detergent-induced cell aggregation in subpopulations of *Pseudomonas aeruginosa* as a pre-adaptive survival strategy. Environmental Microbiology. 9:2247-2259.

Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M., Schroth, M.N., 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. Nature. 286:885-886.

Kloepper J. W., Lifshitz K, Schroth MN. 1988. *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. ISI Atlas Sci Anim Plant Sci. 1:60–4.

Kloepper J. W., Ryu C-M, Zhang S. A. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. Phytopathology. 94:1259–1266.

Kloepper J.W., Zablotowicz R.M., Tipping E.M., Lifshitz R. 1991. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers, 315-326 p. *En: Keister D.L y Cregan P.B. (Eds). The rhizosphere and plant growth. The Netherlands.*

Kpombrekou, K. M. A. Tabatabai. 1994. Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks. *Soil Sci.* 158:442-453.

Kucey R. M. N., Janzen H. H., Leggett M. E. 1989. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. *Adv. Agron.* 42:199-228.

Kumar A., Maurya B.R. Raghuwanshi R. 2014. Isolation and characterization of PGPR and their effect on growth, yield and nutrient content in wheat (*Triticum aestivum* L.) *Biocata Agric. Biotechnol.* 3:121-128.

Kundu B. S., Gaur A. C. 1980. Establishment of nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria in rhizosphere and their effect on yield and nutrient uptake of wheat crop. *Plant Soil.* 57:223-230.

Lappartient A. G., y Touraine, B. 1996. Demand-driven control of root ATP sulfurylase activity and SO₄²⁻-uptake in intact canola (the role of phloem-translocated glu- tathione). *PlantPhysiol.* 111: 147– 157.

Lappartient A. G., Vidmar, J. J., Leustek, T., Glass, A. D., Touraine, B. 1999. Inter-organ signaling in plants: regulation of ATP sulfurylase and sulfate transporter genes expression in roots mediated by phloem- translocated compound. *Plant J.* 18:89–95.

Leclere V., Marti R, Bechet M., Fickers P., Jacques P. 2006. The lipopeptides mycosubtilin and surfactin enhance spreading of *Bacillus subtilis* strains by their surface-active properties. *Arch Microbiol.* 186:475-483.

Lee J. P., Lee, S. W., Kim, C.S., Son, J. H., Song, J. H., Lee, K. Y., Kim, H. J., Jung, S.J., Moon, B. J., 2006. Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* from the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biol. Control* 37: 329-337.

Lemanceau P. 1992. Beneficial effects of rhizobacteria on plants: eg *Pseudomonas* spp . *fluorescent* . *agronomy.* 12: 413-437.

León M., Yaryura P. M. Montecchia M. S., Hernández A. I. Correa O. S. Pucheu N. L. Kerber N. L. García A. F. 2009. Antifungal activity of selected indigenous *Pseudomonas* and *Bacillus* from the soybean rhizosphere. *International Journal of Microbiology.* 57:20-49

Liu T. S., Lee LY, Tai C.Y., Hung C.H., Chang Y. S., Wolfram J. H, Rogers R, Goldstein A. H. 1992. Cloning of an *Erwinia herbicola* gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli* HB101: Nucleotide sequence and probable involvement in biosynthesis of the coenzyme pyrroloquinoline quinone. *J. Bacteriol.* 174:5814–5819.

López Falcón R. 2002. Degradación del suelo. Causas, Procesos, evaluación e investigación. CIDIAT. ISBN: 980-6483-10-3.

Lugtenberg B. J., Kamilova F. 2009. Plant growth promoting rhizobacteria. *Ann Rev. Microbiol.* 63: 541-556.

Lutz H. 1990. Geomicrobiology. Marcel Dekker Publisher, New York, USA. 768.

-
- Maget-Dana R, Peypoux F. 1994. Iturins, a special class of poreforming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology* 87:151–174.
- Malusá E. N. Vassilev, 2014. A contribution to set a legal framework for biofertilisers. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Manjarrez M. J., Alarcón A. Ferrera-Cerrato. 1998. Evaluación de levaduras y rizobacterias promotoras del crecimiento en capulín (*Prunus serótina* var. capuli). En *Memorias XVII Congreso de Fitogenética*. 82.
- Mantelin S., y Touraine, B. 2004. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *J. Exp. Bot.* 55: 27–34.
- Manulis S, Valinsky L, Lichter A, Gabriel D. W. 1994. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* with DNA primers and probes identified by random amplified polymorphic DNA analysis. *Appl Environ Microbiol* 60:4094–4099.
- Martin P., Travers S. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl Environ Microbiol*;55:2437-2442.
- Martínez-Romero E., Hernández-Lucas, I., Peña-Cabriaes, J. J. J. Z. Castellanos. 1998. Symbiotic performance of some modified *Rhizobium etli* strains in assays with *Phaseolus vulgaris* beans that have a high capacity to fix N₂. *Plant Soil*, 204:89-94.
- Meadows M., Ellis D, Butt Joe, Jarrett P, Burges H. 1992. Distribution, frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in animal feed mill. *Appl Environ Microbiol.* 58:1344-1350.
- Mendez-Trujillo V., L. Moreno-Ramírez, M. Carrillo-Beltran, D. González-Mendoza. 2013. Fast Protocol for DNA Isolation of DNA from Bacterial Isolated from a Hyper-arid Environment. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 4-7.
- Menkina R. A. 1963. Bacterial fertilizers and their importance for agricultural plants. *Microbiología*. 33:352-358.
- Nagorska K, Bikowski M., Obuchowski M. 2007. Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. *Acta Biochimica Polonica*. 54:495–508.
- Nautiyal C. S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.*170:265-270.
- Nazoa P., Vidmar, J. J., Tranbarger, T. J., Mouline, K., Damiani, I., Tillard, P. 2003. Regulation of the nitrate transporter gene *AtNRT2.1* in *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate, aminoacids and developmental stage. *Plant Mol. Biol.* 52: 689– 703.
- Niu D. D., Liu, H. X., Jiang, C. H., Wang, Y. P., Wang, Q. Y., Jin, H.L., Guo, J.H. 2011. The plant Growth-promoting *Rhizobacterium Bacillus cereus* AR156 Induces Systemic Resistance in *Arabidopsis thaliana* by Simultaneously Activating Salicylate- and Jasmonate/ethylene-dependent Signaling Pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24:533-542.

Patriquin, D. G., J. Döberner y D. K. Jain. 1983. Site and processes of association between diazotrophs and grasses. *Can. J. Microbiol.* 29:900-915.

Ogut M, Er F, Kandemir N. 2010. Phosphate solubilization potentials of soil *Acinetobacter* strains. *Biol Fertil Soils.* 46:707–715.

Ohtake H., H. Wu, K. Imazu, Y. Anbe, J. Kato, A. Kuroda. 1996. Bacterial phosphonate degradation, phosphite oxidation and polyphosphate accumulation. *Resour. Conserv. Recy.* 18:125-134.

Okon Y., Labandera-González, C. A. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* 26: 1591-1601.

Ongena M., Jaques, P., Touré, Y., Destain, J., Jabrane, A., Thonart, P. 2005. Involvement of Fengycin-type Lipopeptides in the Multifaceted Biocontrol Potential of *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 69: 29-38.

Ongena M, Jourdan E., Adam A., Paquot M, Brans A., Joris B., Arpigny J. L, Thonart T. 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology.* 9:1084-1090.

Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura (FAO). 2013. Situación alimentaria mundial. Nota informativa de la FAO.

Otalora, J., M. Patiño, M. Martínez, A. Pedroza. 2003. Estandarización de prueba para la detección de fosfatasa producida por bacterias solubilizadoras de fosfatos. Tesis. Programa de Microbiología Industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.

Pandey A., Trivedi P., Kumar B, Palni L. M. S. 2006. Characteristics of a phosphate solubilizing and antagonistic strain of *Pseudomonas putida* (B0) isolated from a sub-alpine location in the Indian central Himalaya. *Curr Microbiol.* 53:102–107.

Paredes M., Espinosa V. D. 2012 Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fósforo: una revisión crítica. *Terra Latinoamerica.* 1-28.

Patten C., Glick B. 2002 .Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. *Applied and Environmental Microbiology.* 3795-3801.

Paul D., Nair, S. 2008. Stress adaptations in plant growth promoting rhizobacterium (PGPR) with increasing salinity in the coastal agricultural soils. *J. Basic Microbiol.* 48:378-384.

Paulitz T. C., Bélanger, R. R. 2001. Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology.* 39:103–133.

Plazas E. C. Mejoramiento de un medio de cultivo para la producción de un inoculante con base en bacterias fósforo solubilizadoras. [Tesis]. Colombia. 2007.

Pradhan, N., L. B. Sukla. 2005. Solubilization of inorganic phosphate by fungi isolated from agriculture soil. *African J. Biotechnol.* 5:850-854.

Peix A., Rivas, R., Santa-Regina, I., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., Rodríguez-Barrueco, C., Velázquez, E., 2004. *Pseudomonas lutea* sp. nov., a novel phosphate-solubilizing bacterium isolated from the rhizosphere of grasses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54:847–850.

Pérez Rosales E. 2012. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal en pepino (*Cucumis sativus* L.). Tesis. Colegio de Postgraduados.

Pérez E., M. Sulbaran, M. M. Ball, L. A. Yarzabal. 2007. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan región. *Soil Biology & Biochemistry* 39:2905–2914.

Perrig D., Boiero, L., Masciarelli, O., Penna, C., Cassán F. Luna V. 2007. Plant growth promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and their implications for inoculant formulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 75: 1143-1150.

Perveen S., M. S. Khan A. Zaidi. 2002. Effect of rhizospheric microorganisms on growth and yield of green gram (*Phaseolus radiatus*). *Ind. J. Agric. Sci.* 72:421-423.

Pieterse C. M. J., Van Pelt J. A., Ton J, Parchmann S, Mueller M. J. 2000. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 57:123–34

Pieterse CMJ, van Wees S. C. M., van Pelt JA, Knoester M., Laan R., Gerrits H., Weisbeek PJ, van Loon LC. 1998. A novel signalling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 10:1571–1580.

Pikovskaya R.I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*. 17:362-370.

Plazas E. C. 2007. Mejoramiento de un medio de cultivo para la producción de un inoculante con base en bacterias fosfato solubilizadoras. [Tesis].Colombia.

Ping L. 2004. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Plant Sci* 9: 263-266.

Ponmurugan P., C. Gopi. 2006. *In vitro* production of growth regulators and phosphatase activity by phosphate solubilizing bacteria. *African Journal of Biotechnology*. 4: 348-350.

Pradhan N., L. B. Sukla. 2005. Solubilization of inorganic phosphate by fungi isolated from agriculture soil. *African J. Biotechnol.* 5:850-854.

Puente M. E., Bashan Y., Li C. Y., Lebsky V.K. 2004. Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. I. Root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biology* 6: 629-642.

Qureshi M. A. Z., A. Ahmad, N. Akhtar, A. Iqbal, F. Mujeeb, M. A. Shakir. 2012. Role of phosphate solubilizing bacteria (PSB) in enhancing P Availability and promoting cotton growth. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 22: 204-210.

Rai M. K. 2006. *Handbook of microbial biofertilizers*. Food products Press, an imprint of The Haworth Press, Inc, Binghamton, New York.

Reyes A. J. C. Ferrera-Cerrato, R. Cortés F. J. I Alarcón A. 1999. Efecto de la endomicorriza arbuscular, bacterias y vermicomposta en portainjertos de aguacate en vivero. En *Memorias IV Congreso mundial del Aguacate*, Uruapan, Mich., Mex. 216-217.

Richardson A. E. 1994. Soil microorganisms and phosphorous availability. In *Soil Biota: Management in Sustainable Farming Systems*. Eds. CE Pankhurst, BM Doube VVSR Gupta. 1:50–62.

Richardson A. E., Baréa, J. M., Mc Neill, A. M., Prigent-Combaret, C. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil*. 321:305–339

Rivera-Cruz M. C, Trujillo N.A., Cordova B.G., Kohler J, Caravaca F, Roldán A. 2008. Poultry manure and banana waste are effective biofertilizer carrier for promoting plant growth and soil sustainable in banana crops. *Soil Biology & Biochemistry*.12:3092-3095.

Rivera-Cruz M. C, Trujillo-Narcía A, Alejo P.D.E. 2010. Los biofertilizantes integrados con bacterias fijadoras de N, solubilizadoras de P y sustratos orgánicos en el crecimiento de naranjo agrio *Citrus aurantium* L. *Interciencia*. 2: 113-119.

Rodríguez, H. y Fraga R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17: 319–339.

Rojas A, Holguin G, Glick B.R., Bashan Y. 2001. Synergism between *Phyllobacterium* sp. (N₂ -fixer) and *Bacillus licheniformis* (P -solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol* 35:181-187.

Rojas-Solís D., M. Contreras-Pérez, G. Santoyo. 2013. Mecanismos de estimulación del crecimiento vegetal en bacterias del género *Bacillus*. *Biológicas*. 15: 36-41.

Romero D, Vicente A, Rakotoaly R, Dufour S, Veening J, Arrebola E. 2007. The Iturin and Fengycin Families of Lipopeptides Are Key Factors in Antagonism of *Bacillus subtilis* Toward *Podosphaera fusca*. *Mol Plant Microbe Interact*. 20:430-440.

Rosales Robles, E. y R. Sánchez de la Cruz. 2011. Manejo del crecimiento del algodón en el norte de Tamaulipas. *INIFAP*. 51: 1-40.

Rudrappa T., Biedrzycki M. L., Kunjeti S. G., Donofrio N. M., Czymmek KJ, Paré PW, Bais H. P. 2010. The rhizobacterial elicitor acetoin induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Communicative & Integrative Biology*. 3:130-138.

Ryu C. M., Farag M. A., Hu CH, Reddy MS, Wei HX, Paré P. W., Kloepper J. W. 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 100:4927-4932.

Ryu C. M., Murphy J. F., Mysore K. S., Kloepper J. W. 2004. Plant growthpromoting rhizobacteria systemically protect *Arabidopsis thaliana* against Cucumber mosaic virus by a salicylic acid and NPR1-independent and jasmonic acid-dependent signaling pathway. Plant Journal. 39:381-392.

Saber K., Nahla L. D., Chedly A. 2005. Effect of P on nodule formation and N fixation in bean. Agron Sustain Dev. 25:389-393.

SAGARPA. 2010. Guía para producir algodón en el Valle de Mexicali, B.C., y de San Luis Río Colorado, Son. 1:4-32.

SAGARPA. 2011. Preparan plan para detonar producción de algodón en México. Coordinación General de Comunicación Social. 434:11-13.

SAGARPA. 2014. Proyecciones para el Sector Agropecuario de México. Boletín. 37-38.

Sagoe C. I., T. Ando, K. Kouno T. Nagaoka. 1998. Relative importance of protons and solution calcium concentration in phosphate rock dissolution by organic acids. Soil Sci. Plant. Nutr. 44:617-625.

Sahu S. N., B. B. Jana. 2000. Enhancement of the fertilizer value of rock phosphate engineered through phosphate-solubilizing bacteria. Ecological Engineering. 15: 27–39.

Saleena L. M., Loganathan, P., Rangarajan, S. Nair, S., 2001. Genetic diversity and relationship between *Bradyrhizobium* strains isolated from black gram and cowpea. Biol. Fertil. Soils. 34: 276–281.

Scervino J.M., Mesa M. P., Mônica I. D., Recchi M, Moreno N. S, Godeas 2010. A. Soil fungal isolates produce different organic acid patterns involved in phosphate salts solubilization. Biol Fertil Soils. 46: 755–763.

Scheffer F., Schachtschabel, P. 1989. Soil Science. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart.

Schröder G, Waffenschmidt S, Weiler E.W., Schröder J. 1984. The T-region of Ti plasmids codes for an enzyme synthesizing indole-3- acetic acid. Eur J Biochem. 138:387-391.

Sessitsch A, Reiter B, Pfeifer U & Wilhelm E. 2002. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. FEMS Microbiol Ecol. 39: 23–32.

Siddiqui Z. A. 2006. PGPR: Prospective biocontrol agents of plant pathogens. In: Z.A. Siddiqui (ed). PGPR: Biocontrol and Biocontrol. Springer, Netherlands. 1:112–142.

Sigler, K. y Hofer M., 1991. Mechanisms of acid extrusion in yeast. Biochem. Biophys. Acta. 1017:375-391.

-
- Singh, C. P., A. Amberger. 1998. Organic acids and phosphorus solubilization in straw composted with rock phosphate. *Bioresource Technology*. 63: 13-16.
- Singh S, Kapoor K. K. 1994. Solubilization of insoluble phosphates by bacteria isolated from different sources. *Env. Ecol*. 12: 51-55.
- Sivasakthi S., Kanchana D., Usharani G., Saranraj P. 2013. Production of plant growth promoting substance by *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* isolated from paddy rizosphere soil of Cuddalore district, Tamil Nadu, India. *Int. J. Micobiol. Res.* 4:227-233.
- Sivasakthi S., Kanchana D., Usharani G., Saranraj P. 2014. Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR) *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. *African J. of Agricultural Research*. 16: 1265-1277.
- Slimene I. B., O. Tabbene, N. D., P. Cosette, J. M. Schmitter, T. Jouenne, M. C. Urdaci, F. Limam. 2012. Putative use of a *Bacillus subtilis* L194 strain for biocontrol of *Phoma medicaginis* in *Medicago truncatula* seedlings. *Research in Microbiology* 163: 388-397
- Smith S. E., D. J. Read 1997. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, San Diego,
- Son H. J, G. T. Park, M. S. Cha, M.S. Heo. 2006. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt- and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. 2:204–210.
- Spaepen S., Vanderleyden, J., Remans R. 2007. Indole- 3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* 31: 425– 448.
- Sperber J. I. 1957. The incidence of apatite solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Aust. J. Agric. Res.* 9:778–781.
- Stevenson F.J. 1967. Organic acids in soil. In: MC Laren, A. D., Peterson, G.H. (Ed.). *Soil biochemistry*. New York: Marcel Decker. 119-146.
- Strobel G. A., Dirksie E., Sears J., Markworth C. 2001. Volatile antimicrobials from *Muscodora albus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology*. 147: 2943–2950.
- Subba-Rao N. S.; Bajpai, P. D. 1965. Fungi on the surface of legume root nodules and phosphate solubilization. *Cellular and molecular life sciences* 21:386-387.
- Sudhansu S. P. 1998. Interactions of an acid tolerant strain of phosphate solubilizing bacteria with a few acid tolerant crops. *Plant and Soil* 2:169-177.
- Sundara B., Natarajan, V., Hari, K. 2002. Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. *Field Crops Research* 77: 43–49.
- Sundara R. y M. Sinha. 1963. Organisms phosphate solubilizers in soil. *Soil Sci. Plant Nutr.* 9:45-49.

Tarafdar J. C., Claassen N. 1988. Organic Phosphorus compounds as a phosphorus source for higher plants through the activity of phosphatases produced by plant roots and microorganisms. *Biology and Fertility of soils*. 5:308-312.

Thomashow L. S., Reeves S., Thomashow M. F. 1984. Crown gall oncogenesis, evidence that a T-DNA gene from the *Agrobacterium* Ti plasmid pTiA6 encodes an enzyme that catalyzes synthesis of indoleacetic acid. *Proc Natl Acad Sci USA*. 81:5071-5075.

Thuler D., S. Floh, E.I. Handro, W. Barbosa, H.R. 2003. Plant growth regulators and amino acids released by *Azospirillum* sp. in chemically defined media. *Lett. Appl. Microbiol.* 37: 174–178.

Tilak K, Ranganayaki N, Pal K, De R, Saxena A, Shekhar Nautiyal C, Mittal S, Tripathi A, Johri B. 2005. Diversity of plant growth and soil health-supporting bacteria. *Curr Sci*.1:136–150

Tisdale S. L. y W. L. Nelson. 1975. *Soil Fertility and fertilizers*. MacMillan. New York.

Toro M., Azcón, R., J. M. Barea. 1997. Improvement of Arbuscular Mycorrhizal development by inoculation with Phosphate Solubilizing Rhizobacteria to benefit rock phosphate bioavailability (32P) and nutrient cycling. *Applied and Environmental Microbiology*. 11:4.408-4.412.

Touraine B. 2004. Nitrate uptake by roots transporter and root development, in *Nitrogen Acquisition and Assimilation in Higher Plants*. L. J. De Kokandl. Stulen Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.1–34.

Tsavkelova E.A., Klimova, S.Y., Cherdyntseva, T.A., Netrusov, A.I. 2006. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Appl. Biochem. Micro.* 42:117–126.

Tsuge K, Akiyama T, Shoda M. J. 2001. Cloning, sequencing, and characterization of the iturin A operon. *Journal of Bacteriology*. 183:6265-6273

Uma Maheswari, T. Anbukkarasi, K. Hemalatha, T. Chendrayan, K. 2013. Studies on phytohormones producing ability of indigenous endophytic bacteria isolated from tropical legume crops. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 2:127-136

Urbanek A. 1987. Technical report concerning phosphate fertilizers production from Tachira State rocks phosphate in Venezuela. Warsaw technical Univ. Varsobia. Polonia.

Useche Y., Valencia H., Pérez H. 2003. Caracterización de bacterias y hongos solubilizadores de fosfato bajo tres usos de suelo en el sur del trapecio amazónico. Tesis. Universidad Nacional de Colombia. 157.

Usharani G., D. Kanchana, M. Jayanthi, P. Saranraj D. Sujitha. 2013. Evaluation of certain resistance inducing chemicals against Sheath blight incidence in Paddy (*Oryza sativa* L.). *International Journal of Microbiological Research*. 3: 333 - 335.

Vacheron J., G. Desbrosses, M.L. Bouffaud, B. Touraine, Y Moëgne-Loccoz, D. Muller, L. Legendre, F. Wisniewski-Dyé, C. Prigent-Combaret. 2013. Plantgrowth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in plant science*. 4:1-19.

Valero N. 2003. Potencial biofertilizante de bacterias diazotróficas y solubilizadoras de fosfatos asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.) Tesis. Universidad Nacional de Colombia.

Van Wees SCM, Lujendijk M, Smoorenburg I, Van Loon L. C, Pieterse C. M. J. 1999. Rhizobacteriamediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. *Plant Mol. Biol.* 41:537-49.

Vázquez P., Holguín, G., Puente, M. E., López-Cortes, A. Bashan, Y. 2000. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biol. Fert. Soils* 30: 460-468.

Venturini G., G. Assante, S. L. Toffolatti, A. Vercesi. 2013. Pathogenicity variation in *Fusarium verticillioides* populations isolated from maize in northern Italy. *Mycoscience*. 54:285-290.

Vessey J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*. 255: 571-586.

Voinnet O. 2005. RNA silencing compared with innate immunity. *Nature Rev Gen* 6:206-220.

Walpol B. C., Yoon M. H. 2012. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria and their co-inoculation efficiency on tomato plant growth and phosphorous uptake. *African Journal of Microbiology Research*. 7:266-275.

Wan J. H. C., M. H. Wong. 2004. Effects of earthworm activity and P-solubilizing bacteria on P availability in soil. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 167: 209-213.

Wdowiak K. Pamies M. E; Loizaga U. 2012. Evaluación y valoración económica de pérdidas por cosecha mecánica en el cultivo de algodón. XIII Reunión Anual De La Asociación Argentina De Economía Agraria. Corrientes; Argentina. 133-134.

Weller D. M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. 26: 379-407.

Zaidi A. 1999. Synergistic interactions of nitrogen fixing microorganisms with phosphate mobilizing microorganisms. Tesis, Aligarh Muslim University, Aligarh, India.

Zaidi A., M. S. Khan, M. Amil. 2003. Interactive effect of rhizotrophic microorganisms on yield and nutrient uptake of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Eur. J. Agron.* 19:15-21.

Zhang H., Kim M. S., Krishna-machari V., Payton P., Sun Y., Grimson, M. 2007. Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta* 226:839–851.

Zhao Z., Wang Q., Wang K., Kemp B., Liu C., Gu Y., 2010. Study of antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components. *Bioresour. Technol.* 101:292-297.

12. ANEXOS

Anexo 1. Composición del medio Pikovskaya sólido (Pikovskaya, 1948)

Reactivo	Cantidad
Glucosa	10 g
Cloruro de Potasio	0.26 g
Extracto de levadura	0.5 g
Cloruro de Sodio	0.2 g
Sulfato de Magnesio heptahidratado	0.1 g
Sulfato de Amonio	0.5 g
Sulfato de Manganeso tetrahidratado	0.002 g
Sulfato de Hierro	0.05 g
Fosfato de Calcio	5 g
Púrpura de Bromocresol	0.1 g
Agar bacteriológico	15 g
Agua	1 L

Mezclar todos los componentes, ajustar pH a 7.2 y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

Anexo 2. Composición de Medio Nutritivo sólido

Reactivo	Cantidad
Peptona de carne	5 g
Extracto de carne	3 g
Agar bacteriológico	23 g
Agua	1 L

Mezclar todos los componentes, ajustar pH a 7.2 y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

Anexo 3. Composición de Medio Papa Dextrosa sólido

Reactivo	Cantidad
Medio deshidratado Agar Dextrosa y papa de BD Bioxon®	39 g
Agua	1 L

Mezclar los componentes, hervir durante un minuto y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

Anexo 4. Composición de Medio Kirk líquido (Kirk *et al.*, 1986)

Fosfato de Potasio monobásico	2 g
Sulfato de Magnesio heptahidratado	0.5 g
Cloruro de Calcio	0.1
Nitrato de Amonio	2 g
Glucosa	10 g

Mezclar todos los componentes, ajustar pH a 7.2 y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos

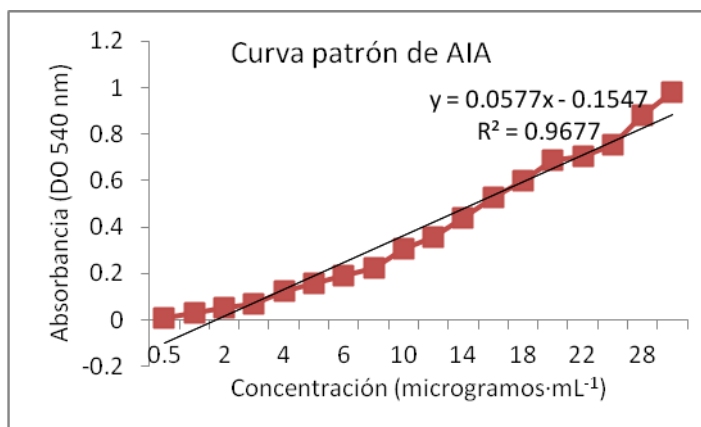
Anexo 5. Curva de calibración de ácido indol acético

Reactivo de Salkowski. 0.5 M Cloruro de Hierro III y 7.5 M ácido sulfúrico.

Nota: Manipular cuidadosamente al agregar el ácido sulfúrico en el agua porque es una reacción altamente exotérmica.

Preparar solución estándar de $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de ácido indol acético (Tokio Chemical Industry®) disuelto en metanol. Realizar los ajustes necesarios para obtener: 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 25, 28, 30 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

0.5 mL de cada concentración, se mezclan con 0.5 mL de reactivo de Salkowski, se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos, en oscuridad y se leen a 540 nm.



Concentración ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	DO (540nm)	Concentración ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	DO (540nm)
0.5	0.009	12	0.354
1	0.031	14	0.44
2	0.055	16	0.526
3	0.069	18	0.601
4	0.122	20	0.688
5	0.155	22	0.704
6	0.189	25	0.752
8	0.223	28	0.881
10	0.304	30	0.981

Anexo 6. Curva de calibración de Giberelinas

Reactivo de Zinc-acetato.

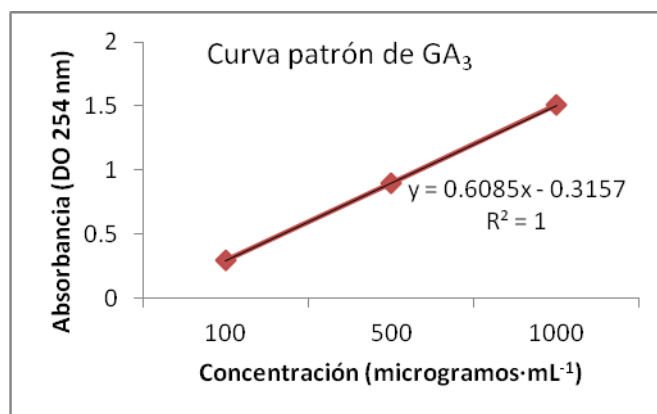
Acetato de Zinc	21.9 g
Ácido acético glacial	1 mL
Agua	Aforar a 100mL

Ferrocianido de Potasio (10.6%)

Ferrocianido de Potasio	5.3 g
Agua	Aforar a 50 mL

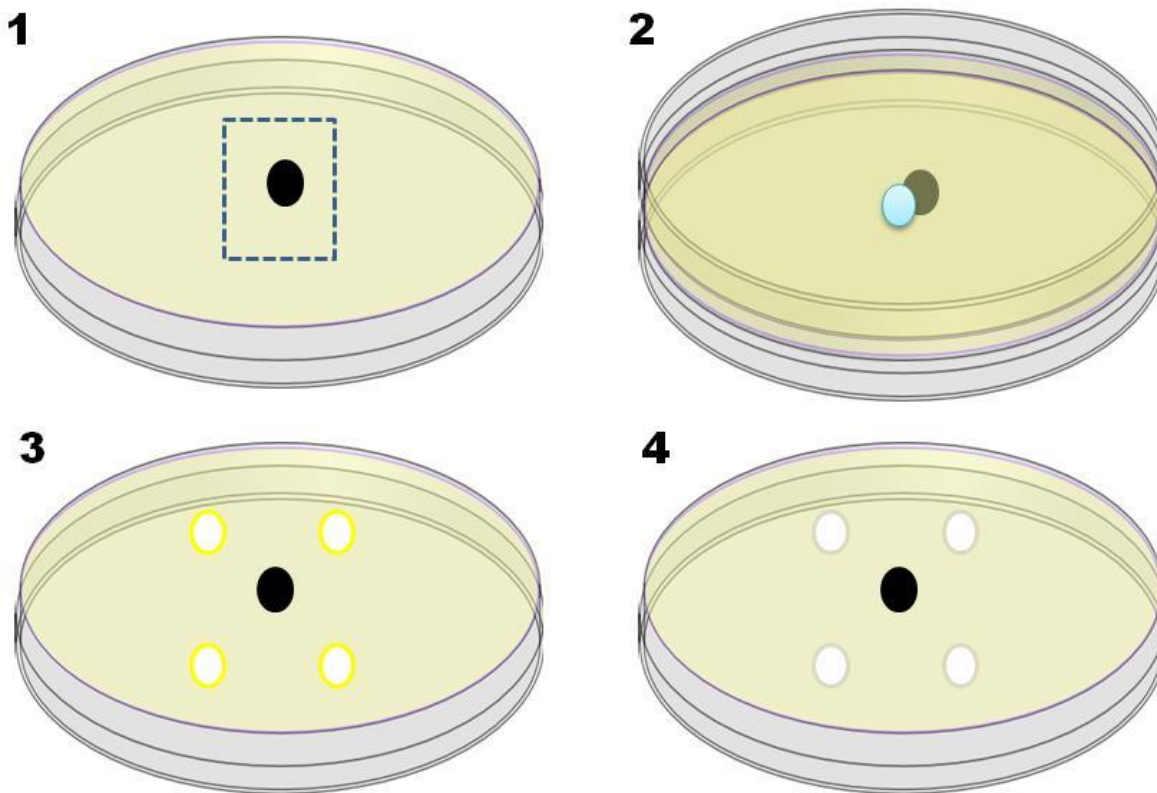
Se preparan concentraciones conocidas de ácido giberelico (Spectrum[®]), a partir de una solución stock de $0.01 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ y se leen a 254 nm.

Concentración	DO
100	0.294
500	0.899
1000	1.511



Anexo 7. Modelos de cultivos duales (Capacidad bacteriana antagónica)

1. Modelo *Cuadro*. Disco de crecimiento de fitopatógeno, bordeado por crecimiento líquido de bacteria antagónica.
2. Modelo *confrontación*. Dos bases de cajas Petri, cada una conteniendo un disco ya sea de bacteria antagónica u hongo fitopatógeno, pegadas con cinta adhesiva para mantenerse unidas
3. Modelo *Papel*. Al centro de una caja Petri se ubica el fitopatógeno y en 4 puntos equidistantes se colocan discos de papel filtro humedecido con sobrenadante filtrado de cultivo bacteriano antagonista.
4. Modelo *Pozos*. Al centro de una caja Petri se ubica el fitopatógeno y en 4 puntos equidistantes, se perfora el agar para formar *pozos*, que serán llenados con concentración conocida de cepa bacteriana antagonista.

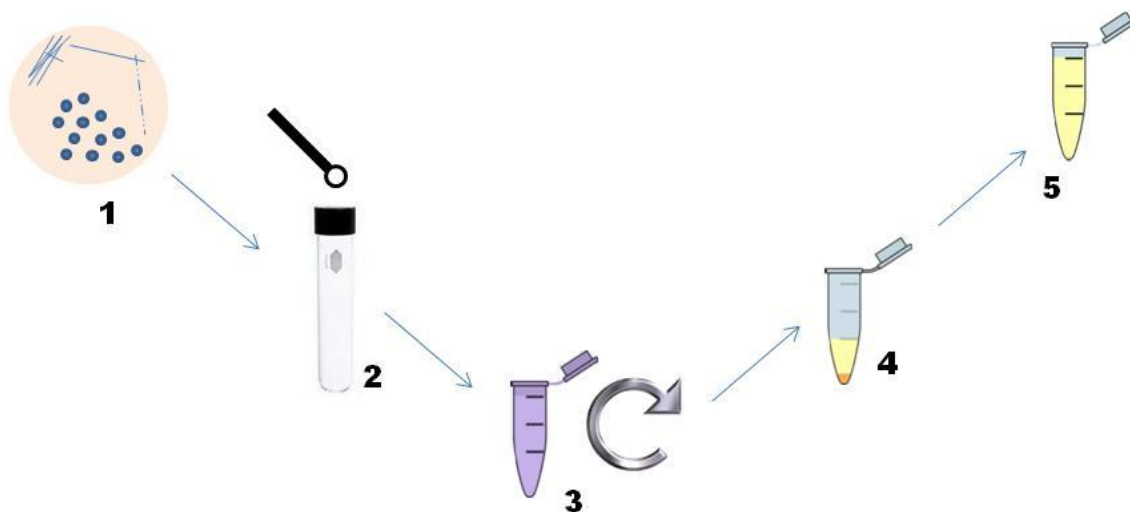


Anexo 8. Oligonucleótidos empleados en el trabajo

Iniciador	Secuencia (5′ - 3′)	Amplicón (pb)	Gen	Referencia
27F	GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1400	16S	Lane <i>et al.</i> , 1991
495R	CTACGGCTACCTTGTTAACGA			
ITS 5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	650	Región ITS	White <i>et al.</i> , 1990
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC			
Qk1F	CTTAAACGTCAGAGGCGGAG	704	Subtilisina	Cao <i>et al.</i> , 2012
Qk1R	ATTGTGCAGCTGCTTGTACG			
Sbo1F	TCGGTTTGTAAGCTTCAACTGC	334	Subtilosina	
Sbo1R	GTCCACTAGACAAGCGGCTC			
ituA1F	TGCCAGACAGTATGAGGCAG	885	Iturina	
ituA1R	CATGCCGTATCCACTGTGAC			

Anexo 9. Ajuste de inóculo

Técnica empleada para iniciar experimentos con una concentración deseada de microorganismos.



1 Cultivo de aislamiento fresco

2 Crecimiento de colonia /disco en medio de cultivo líquido (preinóculo)

3 Después del periodo de incubación, tomar 1 mL para leer D.O. y otro más para centrifugar a 10,000 rpm a 4°C

4 Decantar y resuspender en el volumen indicado* a las células en agua DEPC

5 Obtención de inóculo ajustado

* Volumen de resuspensión = D.O. leída/ D.O. esperada

Anexo 10. Cámara húmeda diseñada para observar morfología fúngica por Microscopía de fuerza atómica.

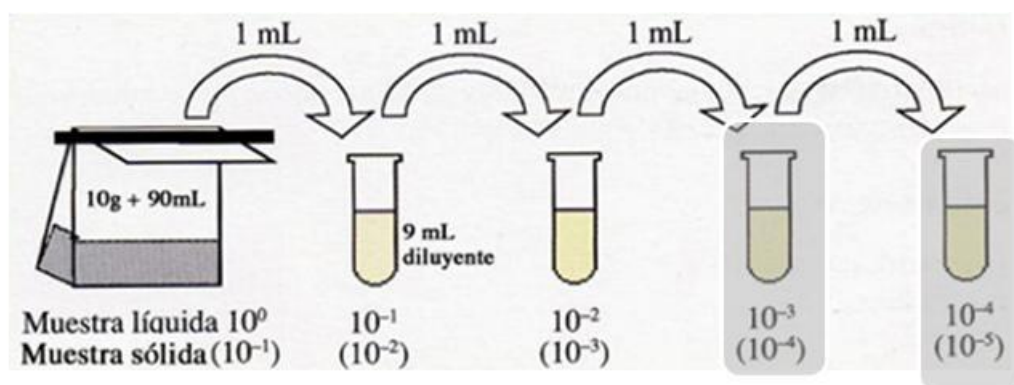


Después de 48 h de contacto a $30^{\circ}\text{C} \pm 2$, se separan ambas porciones de agar y se les adiciona, a cada una, 10 μL de agua destilada estéril, se extiende y resuspende por toda la superficie del agar y se colocan ambas alicuotas en un portaobjetos, se fija con calor la muestra y se observa al microscopio de fuerza atómica.

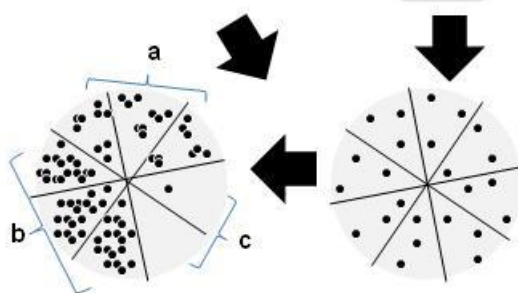


Anexo 11. Recuento de Unidades de Colonia (RUFC)

Ésta técnica es útil para obtener recuento de Unidades formadoras de colonia, a partir de muestras líquidas o sólidas, es decir, a partir de 1 mL o un gramo de muestra a analizar.



- a. Dilución indicada de RUFC (3-30 colonias por gota)
- b. Dilución saturada
- c. Dilución insuficiente para RUFC



Caja Petri con medio nutritivo sólido con replicas de gotas con distintas diluciones decimales de crecimiento de microorganismos.

Anexo 12. Fórmulas empleadas para calcular parámetros fisiológicos

Parámetros de germinación (Yuan-Yuan *et. al.* 2010)

Vigor de Germinación= (Número de semillas germinadas al 1 er. o 7mo. día/total de semillas) *100

Velocidad de germinación= Número de semillas germinadas al 1er. o 18vo.día/total de semillas) *100

Índice de germinación=Número de semillas germinadas al (1ro. o 18vo. día)/días de incubación

Índice de vigor= Índice de germinación* total de peso seco

Evaluación de patogenicidad (Venturini *et al.*, 2013)

Porcentaje de germinación= Se considera germinada ≤ 3 mm de longitud radicular.

Colonización de semilla

Escala 0-4

0= No cubrió el micelio la semilla, o está bien desarrollado el coleóptilo /raíz. Muestra señales de decaimiento insignificantes.

1= $\leq 25\%$ de superficie de la semilla está cubierta con micelio, área de coleóptilo muestra decaimiento.

2= $>25-50\%$ de la superficie de la semilla está cubierta por micelio o el coleóptilo /raíz muestran señales de decaimiento.

3= $>50-75\%$ de la superficie de la semilla está cubierta por micelio o el coleóptilo /raíz muestran señales de decaimiento.

4= $>75\%$ de la superficie de la semilla están cubiertos de micelio y la raíz está cubierta por micelio y muestra señal d descomposición.

Porcentaje de descomposición de radícula

Se obtiene considerando la longitud total de la radícula como el 0% de daño, al obtener la longitud de radícula dañada, se obtiene el porcentaje de descomposición por comparación de ambos datos.

Anexo 13. Técnicas de cuantificación de Auxinas, giberelinas, antioxidantes, fenoles totales y Flavonoides en tejido vegetal

Cuantificación de Auxinas

Se parte de un gramo de muestra de tejido vegetal fresco macerado en 10 mL de agua estéril y triptófano ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), incubados a temperatura ambiente, por 24 h a 120 rpm en agitador, protegidos de luz, al término de la incubación, centrifugar a 10,000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, se prepara reacción 1:1 de extracto y reactivo de Salkowski (Anexo 5). Se incuba por 30 minutos a temperatura ambiente y se lee absorbancia a 540 nm, los resultados se calcularon a partir de una curva de concentraciones conocidas (Anexo 6).

Cuantificación de giberelinas

Se parte de un gramo de muestra de tejido vegetal fresco macerado en 10 mL de agua estéril incubado a 26°C durante 24 h a 120 rpm, se toman 15 mL de sobrenadante, se agregan 2 mL de reactivo de Zinc-acetato (Anexo 6). Transcurridos 2 minutos, se adicionaron 2 mL de ferrocianido de Potasio (Anexo 6), se centrifuga la mezcla a 2000 rpm durante 15 minutos, a 5 mL del sobrenadante se adicionaron 5 mL de HCl 30%, se incubó a 26°C durante 75 min y se realizan lecturas en el espectrofotómetro Biomate 3 de Thermo Scientific® ($\lambda 254 \text{ nm}$), a partir de un blanco de HCl 5%, los resultados se calcularon a partir de una curva de concentraciones conocidas (Anexo 6).

Cuantificación de antioxidantes

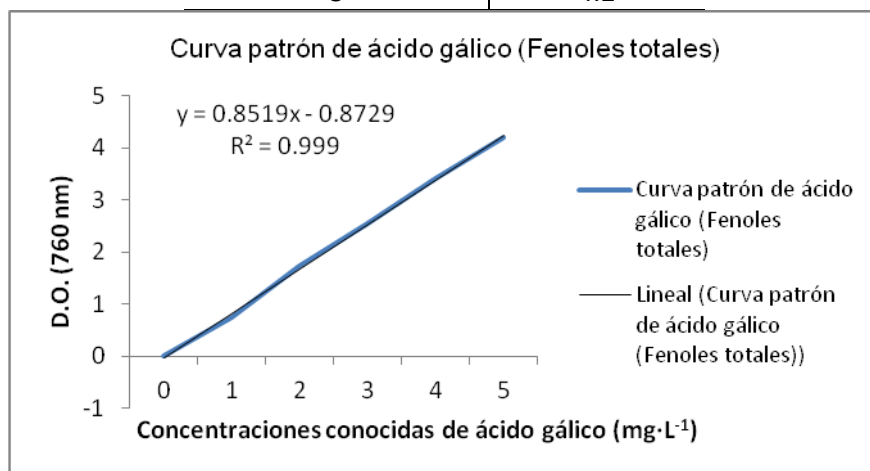
Se requiere 0.2 g de muestra vegetal fresca, en oscuridad se macera con etanol al 80%, se incuba durante 10 min a -20°C. Centrifugar a 14,000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente. 100 μL d extracto se mezcla con 1 mL de solución de AN ($0.6\text{M H}_2\text{SO}_4$, $28\text{mM H}_3\text{PO}_4$, $4 \text{ mM } (\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$). Incubar a 95°C por 90 minutos, dejar enfriar y leer absorbancia a 695 nm.

Cuantificación de fenoles totales (Cicco *et al.*, 2009)

Se parte de 0.2 g de tejido vegetal macerado con 3 mL de etanol al 80%, en oscuridad, centrifugar a 14,000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente, adicionar a 150 μL de sobrenadante, 750 μL de FC 10% (Folin-Coicalteu) , reposar por 15 minutos, añadir 430 μL de Na_2CO_3 1N, Reposar 30 min y leer absorbancia a 760 nm.

Se realizó curva de calibración con ácido gálico, como se muestra a continuación.

Concentración (mg·L ⁻¹)	D.O. (760 nm)
0	0
1	0.746
2	1.736
3	2.56
4	3.41
5	4.2

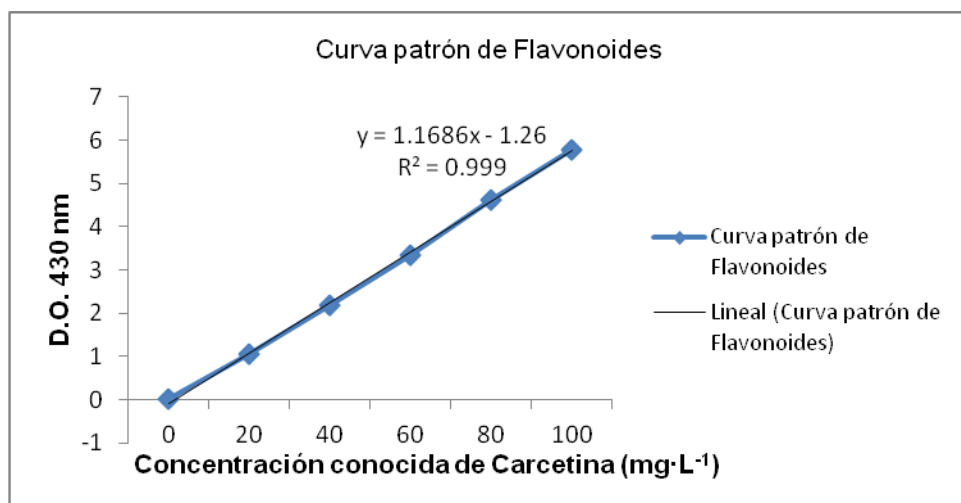


Cuantificación de Flavonoides (Quettier-Deleu *et. al.*, 2000)

Método de cloruro de Aluminio, se parte de 1 mL de extracto de tejido vegetal fresco (0.2 g) con etanol al 80%, se mezcla con AlCl_3 (2%), incubar a temperatura ambiente por 15 minutos. Se lee absorbancia a 430 nm.

Se realizó curva de calibración con distintas concentraciones de carcetina, a continuación se muestran los datos obtenidos en la lectura espectrofotométrica:

Concentración (mg·L ⁻¹)	D.O. (430 nm)
0	0
20	1.04
40	2.17
60	3.35
80	4.63
100	5.79



Anexo 14. Cuadro de apoyo de evaluación cualitativa de solubilización

Obtenida de Otalora *et al.*, (2003)

ÍNDICE DE SOLUBILIZACIÓN		
CAPACIDAD DE SOLUBILIZACIÓN		
BAJA (IS<2)	MEDIA (2≤IS<4)	ALTA (IS>4)
SEGÚN INICIO DE SOLUBILIZACIÓN		
PRECOCES (Antes del tercer día)	TARDÍOS (A partir del tercer día)	NO SOLUBILIZADORES (Sin solubilización visible luego 12° día de evaluación)

Anexo 15. Depósito de secuencias en la base de datos del Genbank correspondientes a los genes 16s ribosomal de las BSF

← → ↻ www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=Moreno-Ramírez

NCBI Resources [x] How To [x]

Nucleotide [Nucleotide] [Create alert] [Advanced]

Species
Bacteria (4)
Customize ...

Molecule types
genomic DNA/RNA (4)
Customize ...

Source databases
INSDC (GenBank) (4)
Customize ...

Sequence length
Custom range...

Release date
Custom range...

Revision date
Custom range...

[Clear all](#)

[Show additional filters](#)

Display Settings: ▼ Summary, Sorted by Default order Send to: ▼

Items: 4

- ☐ [Acinetobacter calcoaceticus strain ICA01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence](#)
1. 590 bp linear DNA
Accession: KJ190162.1 GI: 588266045
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)
- ☐ [Acinetobacter sp. ICA04Ma 16S ribosomal RNA gene, partial sequence](#)
2. 1,093 bp linear DNA
Accession: KJ190165.1 GI: 588266048
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)
- ☐ [Acinetobacter sp. ICA03Bs 16S ribosomal RNA gene, partial sequence](#)
3. 1,037 bp linear DNA
Accession: KJ190164.1 GI: 588266047
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)
- ☐ [Acinetobacter calcoaceticus strain ICA02Ba 16S ribosomal RNA gene, partial sequence](#)
4. 1,074 bp linear DNA
Accession: KJ190163.1 GI: 588266046
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

Anexo 16. Artículos de divulgación científica publicados, originados del presente trabajo.



Molecular identification of phosphate-solubilizing native bacteria isolated from the rhizosphere of *Prosopis glandulosa* in Mexicali valley

L. Moreno-Ramírez, D. González-Mendoza, C. Cecena-Duran and
O. Grimaldo-Juarez

Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Baja California,
Baja California, México

Corresponding author: D. González-Mendoza
E-mail: danasaf@gmail.com

Genet. Mol. Res. 14 (1): 2793-2798 (2015)
Received February 28, 2014
Accepted July 14, 2014
Published March 31, 2015
DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2015.March.31.9>

ABSTRACT. One of the main limitations in intensive crop production in Northwestern Mexico is the dependence on the use of phosphate fertilizer. In this study, we isolated indigenous microorganisms with phosphate solubilization capacities from mesquite (*Prosopis glandulosa*) present in the Mexicali valley. In total, 4 bacteria were isolated from the rhizosphere of mesquite, including ICA01, ICA02Ba, ICA03Bs, and ICA04Ma. The bacterial isolates were identified based on their phenotypic and 16S rRNA gene sequencing data to be *Acinetobacter calcoaceticus*. The results showed that ICA01 was the most efficient in solubilizing phosphate, followed by ICA02Ba and ICA03Bs, while ICA04Ma showed the lowest phosphate-solubilizing activity. The pH value of the culture medium decreased with bacterial growth, suggesting that these strains produce organic acids that solubilize phosphorus. These results will be useful for biotechnological studies and *A. calcoaceticus* may be

Phytohormones Production and Phosphate Solubilization Capacities of *Acinetobacter* sp., Strains Isolation from Mexicali Valley

Lizbeth Moreno-Ramirez¹, Daniel Gonzalez-Mendoza¹,
Federico Gutierrez-Miceli, Monica Aviles-Marin¹,
Carlos Cecena- Duran¹ and Onecimo Grimaldo-Juarez¹

¹Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Baja California (ICA-UABC),
Carretera a Delta s/n Ejido Nuevo León, 21705, Baja California, México

²Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, División de Estudios de Posgrado
e Investigación, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México

(Received: 02 May 2014; accepted: 24 June 2014)

Studies about indigenous microorganism's diversity in extreme environments in *Baja California*, mainly Mexicali valley are scarce. Therefore, in the present study the objective was investigated the phytohormones production and phosphate solubilization capacities of four *Acinetobacter* strain, *ICA01*, *ICA02Ba*, *ICA03Bs* and *ICA04Ma*, isolated from *Prosopis glandulosa* rhizosphere) in Mexicali valley. The result showed that the maximum P solubilization was recorded by the *ICA04Ma* (11.03 mg/L) with a maximum drop in the pH to 4.3. Followed by the *ICA03Bs* (9.28 mg/L), *ICA02Ba* (8.24 mg/L) and *ICA01* (6.5 mg/L) with a maximum drop in the pH to 6.3, 5.7 and 6.7, respectively. On the other hand, the IAA production was significantly higher (Pd<0.05) in *A. calcoaceticus* *ICA02Ba* (46 µg/mL) compared with the others strains that no showed changes significant. The production of gibberelins by *A. calcoaceticus* strains in liquid medium showed that *ICA02Ba* produced significantly amount of GA₃ (4.3 mgL⁻¹), followed by the *ICA04Ma* (3.2 mgL⁻¹), *ICA01* (3.6 mgL⁻¹mg/L) and *ICA03Bs* Mc strains (3.6 mgL⁻¹) after 72 h of incubation. Finally, *A. calcoaceticus* strains could be used for further field trials to improve agricultural productivity under arid conditions.

Key words: Mexicali valley, Mesquite, Microorganism, Phytohormones, Phosphorus.