

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD DEPARTAMENTO DE
SISTEMAS BIOLÓGICOS**

LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

REPORTE DE SERVICIO SOCIAL

"Caracterización de actividades PGPR de bacterias rizosféricas aisladas de
Neobuxbaumia polylopha, provenientes del semidesierto de Querétaro"

Proyecto genérico: "Ecología microbiana de procesos biotecnológicos y ambientales:
un enfoque molecular"

ALUMNO

Diego Barajas Rodríguez

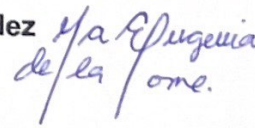
Matrícula: 2192037748

ASESORES

ASESOR INTERNO: Dr. Hugo César Ramírez Saad
Nº económico 8642



ASESORA EXTERNA: Dra. María Eugenia de la Torre Hernández
Nº identificador 900031



**LUGAR DE REALIZACIÓN: LABORATORIO DE ECOLOGÍA MOLECULAR,
EDIFICIO N-105**

Contenido

1. RESUMEN.....	3
2. INTRODUCCIÓN	3
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	4
4. OBJETIVO GENERAL.....	4
5. OBJETIVOS PARTICULARES	5
6. MARCO TEÓRICO	5
6.1. Zonas áridas y semiáridas (ZAS).....	5
6.2. Familia <i>Cactaceae</i>	6
6.3. <i>Neobuxbaumia polylopha</i> (Órgano dorado).....	6
6.4. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR).....	6
6.5. Usos y aplicaciones de PGPR	7
6.6. Actividades PGPR	8
6.6.1. Solubilización de fosfatos.....	9
6.6.2. Producción de fitohormonas	10
6.6.3. Biocontrol contra hongos fitopatógenos	11
7. METODOLOGÍA.....	12
7.1. Recuperación y reactivación de cepas crio-preservadas.....	12
7.2. Cuantificación de indoles	12
7.3. Prueba semicuantitativa de solubilización de fosfato	13
7.4. Biocontrol vs el hongo fitopatógeno <i>F. solani</i>	14
8. DISCUSIÓN Y RESULTADOS	15
8.1. Recuperación y reactivación de cepas crio-preservadas.....	17
8.2. Cuantificación de indoles	19
8.3. Prueba semi-cualitativa de solubilización de fosfato	24
8.4. Biocontrol vs el hongo fitopatógeno <i>F. solani</i>	29
9. CONCLUSIONES	34
10. ANEXOS.....	35
11. BIBLIOGRAFÍA.....	48

1. RESUMEN

México es un país con una amplia extensión de zonas áridas y semiáridas (ZAS) que cada vez se encuentran en aumento, una zona árida importante por su biodiversidad es el semidesierto de Querétaro, en donde se encuentran una gran cantidad de especies vegetales endémicas como la cactácea *Neobuxbaumia polylopha*, que actualmente se encuentra en situación vulnerable. Este estudio se enfocó en la recuperación de cepas bacterianas aisladas de la rizosfera de *N. polylopha* y la caracterización de sus actividades PGPR, en las que se incluyeron la solubilización de fosfatos inorgánicos, producción de indoles en presencia de triptófano e inhibición del crecimiento del hongo fitopatógeno *Fusarium solani*. La metodología incluyó la recuperación de cepas criopreservadas en glicerol 50%, cuantificación de indoles por métodos espectrofotométricos, pruebas semicualitativas de solubilización de fosfatos inorgánicos, y evaluación del biocontrol contra el hongo fitopatógeno *Fusarium solani*. Se recuperaron 45 cepas, de las cuales 7 fueron clasificadas como altas productoras de indoles (71.6 - 87 µg/mL), 17 como productoras intermedias (36.03 - 69 µg/mL), y 21 como bajas productoras (0.27 - 31.47 µg/mL). Además, el 58% de las cepas exhibieron actividad solubilizadora de fosfato, mientras que el 82% mostraron capacidad de biocontrol sobre *F. solani*, con porcentajes de inhibición de hasta 52.5%.

2. INTRODUCCIÓN

México tiene una notoria diversidad ambiental y se encuentra entre los cinco primeros países a nivel mundial en términos de riqueza biológica (López-Barrera, 2017). De los ecosistemas que destacan en el país son las zonas áridas y semiáridas (ZAS) que abarcan alrededor de 57 millones de hectáreas, y su extensión tiende al aumento debido a la creciente desertificación que sufre el planeta por la degradación de suelos, principalmente debida a actividades humanas como la tala forestal no sustentable y las prácticas agrícolas poco controladas (CONAZA, 2019).

En las ZAS podemos encontrar a la familia *Cactaceae*, conformada por plantas endémicas del continente americano, encontrándose una gran diversidad de ellas en el territorio mexicano (Miguel-Talonia, 2014). La UICN (2022) evaluó casi en su totalidad a esta familia vegetal, analizando la situación de alrededor de 1500 especies, de las cuales el 31% se encuentran amenazadas de alguna forma. Entre las especies vulnerables está *Neobuxbaumia polylopha*, comúnmente llamada órgano dorado, endémica del semidesierto de Querétaro, la cual se encuentra en riesgo debido a su colecta ilegal.

En la región del suelo que rodea las raíces de las plantas, conocida como rizosfera, se encuentra una abundante población de microorganismos, como bacterias, capaces de

establecer relaciones mutualistas con plantas a las que se asocian, favoreciendo el crecimiento vegetal mediante diversos mecanismos como la síntesis de nutrientes esenciales, la solubilización de elementos del entorno, además de servir como protección contra organismos fitopatógenos (Beneduzi, 2012). A este importante grupo se le conoce como bacterias rizosféricas promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés).

Previamente, en el laboratorio de Ecología Molecular del Departamento de Sistemas Biológicos de la UAM Xochimilco, se hizo la caracterización taxonómica de diversas bacterias aisladas de la rizosfera de *Neobuxbaumia polylopha*. El objetivo de esta investigación fue caracterizar algunas de las actividades PGPR que desarrollan las bacterias de esta colección.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Una de las zonas de mayor diversidad de cactáceas en México se encuentra en el desierto Chihuahuense, que abarca del norte al centro del país (Goettsch, 2018); esta última región es conocida como semidesierto queretano. Ahí los cactus son amenazados por diversos peligros derivados de actividades humanas, degradando y/o destruyendo la biodiversidad existente. De todas las especies de cactus que se encuentran amenazadas, el 47% de ellas se ven directamente afectadas por la recolección de plantas vivas y semillas ya sea para el comercio hortícola, o bien para ser depositadas en colecciones ornamentales privadas (Goettsch, 2015). El órgano dorado, *Neobuxbaumia polylopha*, no es la excepción y está clasificado desde 2012 como vulnerable, presentando un hábitat fragmentado, degradado, reducido a solamente alrededor de 6 mil km² (UICN, 2022).

Por otro lado, la asociación mutualista entre bacterias rizosféricas promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) y plantas, les podría conferir ventajas a éstas para la adaptación a los ambientes hostiles de las ZAS. Sin embargo, el conocimiento sobre las actividades PGPR de las bacterias asociadas a *Neobuxbaumia polylopha* es limitado. Por lo anterior, en el presente trabajo se caracterizaron algunas de las actividades PGPR como, la producción de indoles, solubilización de fosfato inorgánico e inhibición de crecimiento de hongos fitopatógenos, propias de una colección de bacterias aisladas previamente de *N. polylopha* nativas del semidesierto de Querétaro. Esto podría proporcionar una base sólida para desarrollar estrategias de conservación para la protección de cactáceas vulnerables o en peligro de extinción.

4. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar bacterias rizosféricas aisladas de *Neobuxbaumia polylopha* y evaluar su capacidad como bacterias promotoras del crecimiento vegetal in vitro

5. OBJETIVOS PARTICULARES

- 5.1. Recuperar y reactivar cepas bacterianas criopreservadas aisladas de la rizosfera de *Neobuxbaumia polylopha*.
- 5.2. Cuantificar la producción de ácido indolacético de las cepas recuperadas.
- 5.3. Realizar un análisis cualitativo de la capacidad para solubilizar fosfatos en las cepas recuperadas.
- 5.4. Evaluar la eficacia de las cepas recuperadas como agentes de biocontrol en contra el hongo fitopatógeno *Fusarium solani*.

6. MARCO TEÓRICO

6.1. Zonas áridas y semiáridas (ZAS)

Las zonas áridas y semiáridas (ZAS) son unidades geográficas definidas por su poca vegetación y la escasez extrema de agua (debido a precipitaciones irregulares y largos periodos de sequía), con temperaturas que fluctúan mucho entre el día y la noche. De acuerdo con Cervantes (2002) el 54% del territorio nacional está compuesto por ZAS, por su parte, SEMARNAT (2019) reportó un porcentaje similar de 54.3% con información recopilada en 2013. Sin embargo, CONAZA (2019) menciona que la superficie de las ZAS se acerca al 60% de la República Mexicana. Las regiones más extensas de zonas áridas se encuentran en los desiertos sonorense y chihuahuense, este último se expande desde el sur de Estados Unidos hasta las regiones norte y centro de México, en esta última fracción se conoce como semidesierto queretano (Fig.1), el cual es un núcleo de diversidad y endemismo biológico (Salinas, 2019).

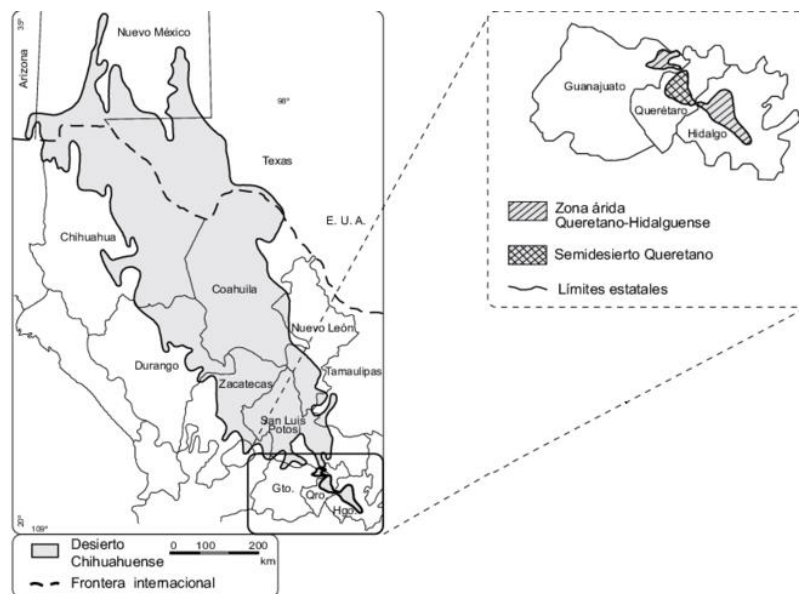


Figura 1: Ubicación geográfica de semidesierto queretano (Hernández-Magaña et al., 2012).

6.2. Familia Cactaceae

Es la población vegetal más abundante y característica de las ZAS. La cantidad de especies pertenecientes a ella varía según el autor que lo reporta, pero va de 1600 (Wallace, 2002) a 3500 (Schafer, 2023), de las cuales aproximadamente el 45% se distribuyen en México (Navarro Carvajal, 2007). Son consideradas xerofíticas, presentando características como alta resistencia a la sequía y al calor como consecuencia de su adaptación a las condiciones áridas de su hábitat natural (Carpena et al., 2023).

6.3. *Neobuxbaumia polylopha* (Órgano dorado)

Es una especie endémica del semidesierto de Querétaro, aunque también puede ser encontrada en regiones de Hidalgo, San Luis Potosí y Guanajuato (Guzmán, 2003). Se trata de un cactus columnar que se puede encontrar con forma de tallo simple o con mínimas ramificaciones, con un gran potencial de crecimiento de hasta 20 metros de alto. El tallo es su rasgo más distintivo y puede alcanzar un diámetro de entre 30 y 35 cm. Las areolas son redondas y de color amarillento-dorado, dispuestas a lo largo del tallo y con lana blanca amarillenta característica que las recubre, protege y ayuda a la retención de humedad. El color dorado la hace una planta llamativa, por lo que es muy utilizada como planta ornamental (Guzmán, 2003).

De acuerdo con el Red List de UICN (2022), se encuentra en un estado vulnerable (VU) correspondiendo al criterio B1ab(iii), lo que significa que su área de distribución abarca alrededor de 6000 km², caracterizándose por una fragmentación severa y una disminución continua en el tamaño y calidad de su hábitat. Sin embargo, la información fue recabada en 2009 y en el Red List de UICN (2022) no se actualizó, por lo que las cifras actuales pueden ser aún más críticas.

6.4. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR)

La rizosfera es la zona de suelo que rodea directamente el sistema de raíces de las plantas y es un espacio que alberga una comunidad diversa de microorganismos (Suryatmana, 2022). En ese nicho se ubican las rizobacterias, un grupo de bacterias capaces de colonizar el entorno y contribuir al bienestar de las plantas, mejorando el crecimiento vegetal y la absorción de nutrientes, además de aliviar el efecto de la sequía, fijar nitrógeno atmosférico y solubilizar fósforo, potasio, hierro y zinc presentes en el suelo (de-Bashan, 2007). Su influencia no se limita a la nutrición puesto que también pueden sintetizar moléculas que funcionan como fitohormonas, contribuir a la eliminación de

radicales de oxígeno mediante enzimas antioxidantes, así como controlar el crecimiento de algunos microorganismos fitopatógenos (Ahemad, 2014).

Dweipayan (2016) clasifica los mecanismos PGPR en directos e indirectos. Los primeros afectan el metabolismo dentro de la planta, influyendo sobre el equilibrio de los reguladores del crecimiento y mejorando la capacidad adaptativa vegetal. En contraste, los mecanismos indirectos requieren la activación de procesos metabólicos defensivos de la planta en respuesta a señales enviadas por las PGPR. Dos mecanismos importantes en este grupo son la inducción de resistencia a patógenos y la protección contra condiciones ambientales adversas.

A medida que los enfoques biotecnológicos ganan terreno en la búsqueda de soluciones agrícolas sostenibles, las rizobacterias emergen como actores clave en el sistema integrado de manejo de nutrientes de las plantas (Ahemad, 2004).

6.5. Usos y aplicaciones de PGPR

De acuerdo con Bhattacharyya, et al. (2012) la relación entre las PGPR y sus hospederos puede clasificarse en dos niveles de complejidad, rizosférico y endofítico. En el nivel rizosférico, las PGPR colonizan la porción de suelo directamente en contacto con el sistema radicular de las plantas (rizosfera), la superficie de las raíces e incluso los espacios intercelulares superficiales de las mismas, influyendo sobre las propiedades fisicoquímicas del suelo. A nivel endofítico, las PGPR residen dentro de los espacios apoplásticos de las plantas hospederas, lo que puede afectar significativamente su desarrollo.

McCully (2001) menciona que, una de las principales aplicaciones de las PGPR en el campo es su utilización como biofertilizantes, puesto que son elaborados a partir de microorganismos vivos y representan una herramienta fundamental en la promoción del crecimiento vegetal. Es importante distinguir el término “biofertilizante” de otros métodos de fertilización, como el abono o los fertilizantes químicos. Algunas especies de PGPR actúan como biofertilizantes y biopesticidas, promoviendo tanto el crecimiento de las plantas como su resistencia a enfermedades.

La aplicación de cepas PGPR en la agricultura tiene el potencial para aumentar la producción de alimentos a nivel mundial y mejorar la calidad ambiental. De acuerdo con Backer et al. (2018) la inoculación de especies de PGPR puede mejorar atributos de crecimiento como el área foliar, el contenido de clorofila y la biomasa total de las plantas. Además, se ha observado un aumento en la resistencia a enfermedades en plantas inoculadas con este tipo de bacterias. Estudios como el de Wang et al. (2024) han demostrado que algunas cepas de PGPR presentan resistencia frente a enfermedades comúnmente causadas por fitopatógenos, especialmente hongos como el que provoca

la antracnosis (enfermedad que genera lesiones en diversas partes de las plantas). Diferentes cepas de *Pseudomonas* sp. han mostrado capacidad de inhibir varias especies del hongo fitopatógeno *Fusarium* (Jian et al., 2024). No obstante, en algunos casos, las enfermedades pueden ser causadas no solo por hongos fitopatógenos, sino también en conjunto con poblaciones bacterianas antagonistas, como las de la familia *Xanthomonadaceae*, que en conjunto con el hongo fitopatógeno *Verticillium* contribuyen a la enfermedad de replantación del manzano (Qiao et al., 2024).

La utilización de cepas PGPR de los géneros *Agrobacterium*, *Bacillus* o *Pseudomonas*, puede inducir la formación de raíces mediante la producción de auxinas, la inhibición de la síntesis de etileno o la mineralización de nutrientes. Estos microorganismos tienen el potencial de alterar diversas vías hormonales en las plantas, lo que se traduce en un aumento en la tasa de elongación de las raíces laterales, conduciendo a una mayor ramificación del sistema radicular y contribuyendo así a un mejor desarrollo de las plantas (Esitken et al., 2003).

6.6. Actividades PGPR

Es aceptado que los microorganismos presentes en el suelo tienen una variedad de efectos beneficiosos que mejoran significativamente el crecimiento de las plantas a través de diferentes mecanismos (Fig. 2) y con resultados diversos (Tabassum et al., 2017; Agrawal et al., 2018).

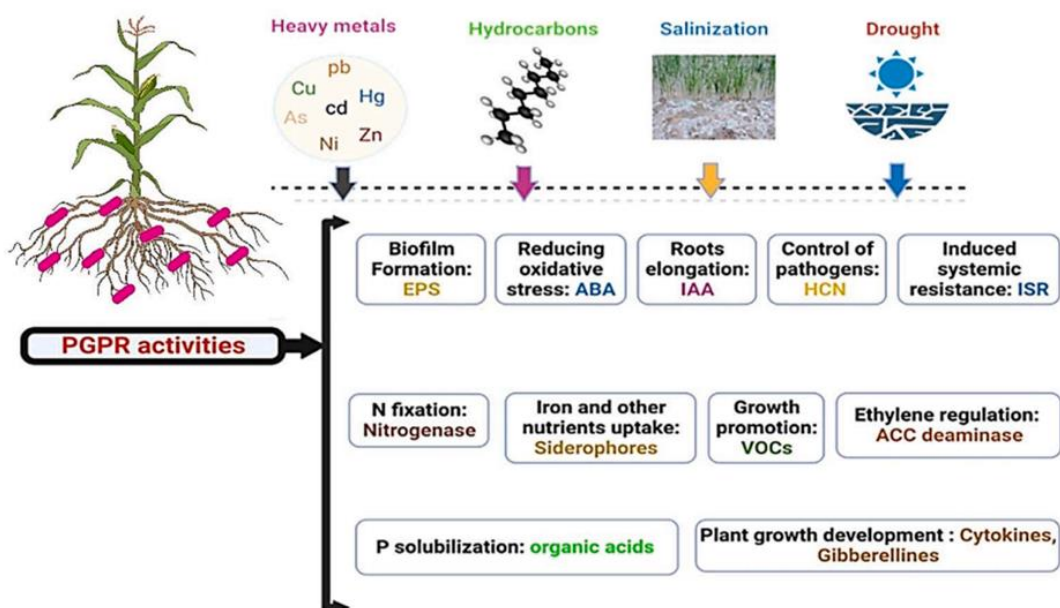


Figura 2: Red de interacciones funcionales de las PGPR que apoya a la salud y el rendimiento de las plantas en respuesta a factores de estrés ambiental y amenazas abióticas (Khoso et al, 2023).

6.6.1. Solubilización de fosfatos

Alori et al. (2017) explican que el fósforo es un elemento esencial para el desarrollo de las plantas se encuentra en ellas en aproximadamente 0.2% de su peso seco, mientras que en el suelo el promedio de disponibilidad es de 0.05%, existiendo tanto en formas inorgánicas como orgánicas. Sin embargo, las raíces enfrentan dificultades para absorber cualquiera de estas formas, ya que solo entre el 0.1 y el 5% de ellas son solubles. De acuerdo con Jindo et al. (2023) los microorganismos PGPR desempeñan un papel crucial en la solubilización y mineralización del fósforo (Fig. 3). Estos microorganismos llevan a cabo funciones como la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, como el ácido glucónico, lo que reduce el pH del suelo y hace que el fósforo inorgánico sea soluble. También producen sustancias quelantes de los cationes unidos al fosfato, lo que, a su vez, facilita la absorción de los iones mono y dibásicos por parte de las plantas.

Por otro lado, Dhole et al. (2023) mencionan que ciertas PGPR producen enzimas fosfatasas y fitasas, que catalizan la hidrólisis de ésteres de ácido fosfórico, permitiendo la mineralización del fósforo orgánico. Cuando los microorganismos solubilizadores de fosfato hacen accesible suficiente fósforo para las plantas, se reduce la necesidad de utilizar fertilizantes químicos. Es importante destacar que existen diversas cepas de PGPR capaces de solubilizar formas insolubles de fosfato, la mayoría de ellas pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Rhizobium* (Muresu et al., 2008).

Investigaciones como la de Tang et al. (2020) han demostrado que la utilización de PGPR con alta capacidad de solubilización de fósforo puede mejorar significativamente el crecimiento de las plantas y aumentar el rendimiento de los cultivos. Este impacto positivo se evidencia no solo en las raíces, que están intrínsecamente vinculadas con las bacterias, sino también en otros componentes de la planta, como las hojas.

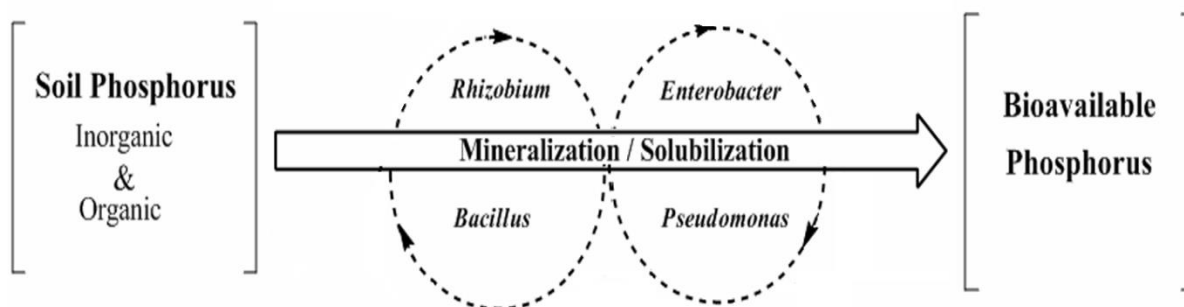


Figura 3: Representación esquemática de la mineralización y solubilización de fósforo en el suelo por rizobacterias (Khan et al., 2009).

6.6.2. Producción de fitohormonas

El término hormona deriva del concepto de hormona mamífera que viene del griego ímpetus y es utilizado en fisiología animal para mensajeros químicos. De acuerdo con el Comité de la Sociedad Americana de Fito-fisiólogos, una fitohormona es aquella molécula reguladora producida por la planta que, en bajas concentraciones, permite regular procesos fisiológicos de las mismas, y se transporta dentro de la planta del sitio de producción al sitio de acción (Ueda, 2016).

Wang et al. (2024) mencionan que las fitohormonas juegan un rol importante en el control del crecimiento y del desarrollo de las plantas a muy bajas concentraciones. Existen 7 tipos principales de sustancias endógenas (fitohormonas) involucradas en el crecimiento de las plantas: auxinas, giberelinas, citoquinas, ácido abscísico, etileno, brasinoesteroides, ácido jasmónico, y sus derivados, además de ser importantes para la regulación de la senescencia y la respuesta de defensa contra agentes patógenos.

6.6.2.1. Ácido indol-3-acético

El ácido indolacético (IAA) es una molécula crucial en el desarrollo vegetal y su síntesis es fundamental para la interacción PGPR-planta. Más del 80% de las bacterias asociadas a la rizosfera tienen la capacidad de producir IAA, incluyendo especies como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus* (Bag et al. 2022).

El IAA actúa como una molécula señalizadora que facilita las interacciones entre bacterias y plantas, promoviendo así el crecimiento y desarrollo vegetal (Wagi & Ahmed, 2019). Las plantas pueden producir IAA tanto por síntesis *de novo* como por la secreción de IAA a partir de conjugados de IAA, con aminoácidos, mioinositol o glucosa (Mano, 2012).

Existen dos principales rutas de biosíntesis de IAA, una dependiente y otra independiente de triptófano. La producción de IAA en el suelo varía según la fertilidad y el contenido de materia orgánica, siendo las rizobacterias un factor importante en esta síntesis. La presencia de L-triptófano, el cual es un aminoácido que sirve como precursor fisiológico de las auxinas, es encontrado en la microflora de la rizosfera como parte de sus exudados de raíces, lo que puede mejorar la biosíntesis de auxinas en la rizosfera. Es muy probable que estas moléculas de origen microbiano en la rizosfera generen una respuesta fisiológica en la planta hospedera (Abdelwahed et al, 2023).

6.6.3. Biocontrol contra hongos fitopatógenos

De acuerdo con Santos et al. (2024) los agentes de control biológico (ACB), se trata de microorganismos vivos, extractos o compuestos derivados de estos, que se emplean para combatir plagas y enfermedades que afectan la producción agrícola. Es importante destacar que estos agentes representan una alternativa sostenible y respetuosa con el medio ambiente para el control de plagas y enfermedades en la agricultura.

Las PGPR pueden actuar como ACBs suprimiendo el crecimiento de microorganismos fitopatógenos de diversas maneras. Estas bacterias compiten por nutrientes y espacio con los fitopatógenos, limitan el suministro de hierro disponible mediante la producción de sideróforos, enzimas líticas y por mecanismos de antibiosis (Y. Jing et al., 2007) Un ejemplo de ello es *Pseudomonas fluorescens*, reconocida por su actividad antagonista de amplio espectro contra diferentes fitopatógenos (Bakker et al., 2017)

Un estudio hecho por Santos et al. (2024) demostró cómo algunas cepas de *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. pueden suprimir el crecimiento de hongos fitopatógenos como *Alternaria* sp., *Fusarium* sp. *Botrytis* sp. y *Stemphylium* sp. La aplicación de *Pseudomonas aeruginosa* y *Paecilomyces Lilacinus* con la siembra de la planta medicinal *Launaeae Nudicaulis* muestra promesas en el control eficaz de hongos que infectan las raíces de *Vigna radiata* comúnmente conocido como frijol mungo (Mansoor, et al., 2007). La actividad de biocontrol que ejercen las PGPR se atribuye principalmente a la competencia por nutrientes, la exclusión de nichos y la producción de metabolitos antifúngicos. Muchas PGPR producen metabolitos antifúngicos, como fenazinas, pirrolnitrina, diacetilfloroglucinol, pioluteorina, viscosinamida y tensina (Tarana et al., 2024).

6.6.3.1. *Fusarium* spp.

De acuerdo con Martínez-Garnica (2014) *Fusarium* es un género de hongos fitopatógenos devastadores, conocido por su capacidad para infectar una amplia variedad de cultivos; de los cuales existen muchas cepas y subtipos que muestran una gran variabilidad genética, patogénica y morfológica. En particular, el género *Fusarium* comprende hongos que se transmiten por el suelo causando marchitez, mancha foliar, cancro del cuello y muerte regresiva de las plantas. Sin embargo, diversas especies cuentan con capacidad toxigénica, produciendo micotoxinas, las cuales son compuestos químicos diversos que pueden inducir algún tipo de daño a las personas o animales que los consumen (Rangel-Muñoz, 2023). De acuerdo con Tang (2024), las especies más patógenas para las raíces de plantas como *Camellia sinensis* son *Fusarium oxysporum* y *F. solani*, en las cuales infectan el tallo y causan grietas, descamación de la corteza, crecimiento de moho blanco y eventual muerte de las ramas. En México, la alta frecuencia de *Fusarium* puede ser atribuida al reúso de semillas, la cual es una práctica habitual entre granjeros (Ruiz-Nieto, 2024).

7. METODOLOGÍA

7.1. Recuperación y reactivación de cepas crio-preservadas

- 7.1.1. Retirar y descongelar cultivos crio-preservados del ultracongelador
- 7.1.2. Tomar alícuotas de 50 – 100 µL de las cepas crio-preservadas en glicerol 50% para inocular 5 mL de medio TY (Anexo I)
- 7.1.3. Incubar durante 24 horas a 30 - 32°C con agitación orbital constante de 220 rpm o hasta que se observe turbidez en los tubos
- 7.1.4. Rotular tubos criogénicos con nombre de cepa y fecha de realización
- 7.1.5. Tomar un volumen de cada cultivo y su equivalente de glicerol al 50%
- 7.1.6. Hacer los gliceroles por duplicado
- 7.1.7. Guardar tubos criogénicos en una caja y guardar en el ultracongelador a - 80°C
- 7.1.8. Inocular cajas de medio sólido TY con una asada de cada una de las cepas crio-preservadas
- 7.1.9. Incubar durante 24 horas a 30 - 32°C o hasta que se observen el crecimiento de colonias
- 7.1.10. Hacer frotis con las colonias cultivadas para teñir con Gram las cepas recuperadas
- 7.1.11. Analizar microscópicamente las muestras y comparar los resultados con los resultados obtenidos con la caracterización inicial de las cepas (antes de la crio-preservación) para determinar el éxito de la recuperación

7.2. Cuantificación de indoles

- 7.2.1. Tomar alícuotas de 50 – 100 μ L de los gliceroles para inocular 5 mL de medio TY.
- 7.2.2. Incubar durante 24 horas a 32°C con agitación orbital constante de 220 rpm o hasta que se vea turbidez en los tubos.
- 7.2.3. Lavar células con NaCl 0.9% estéril.
- 7.2.4. Preparar e inocular medio líquido Burk 1 (Anexo I) con las suspensiones bacterianas previamente preparadas.
- 7.2.5. Incubar durante 5 días a 28°C con agitación orbital constante de 220 rpm
- 7.2.6. Ajustar las suspensiones bacterianas a una densidad óptica (DO) de 0.6 a 600nm
- 7.2.7. Preparar medio Burk 2 (Anexo I) suplementado con triptófano e inocularlo con los inóculos ajustados.
- 7.2.8. Incubar en oscuridad durante 6 días a 28°C y 220 rpm
- 7.2.9. Centrifugar 2 mL a 8'000 rpm por 2 minutos
- 7.2.10. Tomar 1 mL de sobrenadante y agregar 1 mL de reactivo de Salkowski
- 7.2.11. Hacer un blanco para el espectrofotómetro con 1 mL de etanol 96% y 1 mL del reactivo de Salkowski
- 7.2.12. Incubar en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos
- 7.2.13. Leer en espectrofotómetro a longitud de onda de 530nm
- 7.2.14. Hacer una curva patrón de ácido indolacético (Anexo II)
- 7.2.15. Interpolar absorbancias obtenidas con curva patrón, consiguiendo la concentración de producción
- 7.2.16. Clasificar a las cepas por niveles de producción:
 - 7.2.16.1. Baja (de 1 a 35 μ g/mL)
 - 7.2.16.2. Media (de 36 a 70 μ g/mL)
 - 7.2.16.3. Alta (>70 μ g/mL)

7.3. Prueba semicuantitativa de solubilización de fosfato

- 7.3.1. Preparar e inocular medio sólido NBRIP (Anexo I) con cada suspensión bacteriana
- 7.3.2. Dividir cajas en 3 partes iguales e inocular en medio de cada tercio de la caja correspondiente con 20 μ L de cada suspensión
- 7.3.3. Incubar las cajas de 3 a 5 días a 28°C
- 7.3.4. Medir el tamaño de las colonias y de halos de solubilización a las 72 y 120 h de incubación.
- 7.3.5. Clasificar a las bacterias como “solubilizadoras tempranas” (formación del halo a las 72 h), “solubilizadoras tardías” (formación del halo a las 120 h) y “no solubilizadoras” (no formaron halo)

7.3.6. Calcular índice de solubilización utilizando:

7.3.6.1. La fórmula:

$$IS = \frac{\text{Diámetro del halo (mm)}}{\text{Diámetro de la colonia (mm)}}$$

7.3.7. Clasificarlas por capacidad de solubilización

7.4. Biocontrol vs el hongo fitopatógeno *F. solani*

7.4.1. Preparar medio PDA (Anexo I) y sembrar en el centro de las placas con 20 µL de suspensión de esporas del hongo fitopatógeno [2.1×10^7 esporas/mL] (Anexo III)

7.4.2. Incubar durante 24 horas a temperatura ambiente

7.4.3. Sembrar en ellas por estría 20 µL de las cepas bacterianas recuperadas utilizando suspensiones ajustadas (DO 0.6 a 600nm) a 2.5 cm de distancia del centro de la caja (hacerlo por triplicado)

7.4.4. Incubar cajas durante 7 días o hasta que el hongo haya crecido hasta el extremo opuesto de la caja en el cual se sembró con la cepa bacteriana

7.4.5. Calcular porcentaje de inhibición (%I) midiendo la distancia entre el crecimiento del hongo al centro de la caja y la estría bacteriana (a), así como la distancia entre el hongo al centro de la caja y el extremo donde no hay crecimiento bacteriano (b) (Anexo IV)

7.4.5.1. Utilizar la fórmula:

$$\%I = \left(1 - \left(\frac{a}{b}\right)\right) \times 100$$

8. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

En el laboratorio de Ecología Molecular de la UAM Xochimilco se contaba con una colección original de 37 cepas bacterianas criopreservadas, aisladas de la rizosfera de la cactácea *Neobuxbaumia polylopha*, nativa del semidesierto queretano; fueron identificadas taxonómicamente a través de la secuenciación Sanger del gen 16S rRNA, asignándolas a los géneros *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Lelliottia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Serratia*.

Al hacer el proceso de recuperación de dichas bacterias se obtuvieron finalmente 45 cepas bacterianas capaces de realizar actividades promotoras del crecimiento vegetal como solubilizar fosfatos, producir indoles y ejercer biocontrol sobre el hongo fitopatógeno *Fusarium solani*. Los resultados obtenidos respecto a las pruebas hechas a las diferentes cepas recuperadas se enlistan en la Tabla 1.

Nombre de la cepa	Identificación por secuencia 16S rRNA	% de identidad	Acceso Gen Bank
Np 2 I	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	MK070018
Np 2 II	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	MK070018
Np 2 III	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	MK070018
Np 3	<i>Pseudomonas moraviensis</i>	99	MK070019
Np 4	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	MK070020
Np 6 II	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	MK070022
Np 6 III a	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	MK070022
Np 6 III ba	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	MK070022
Np 6 III bb	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	MK070022
Np 7 I	<i>Klebsiella michiganensis</i>	90	MK070023
Np 7 III	<i>Klebsiella michiganensis</i>	90	MK070023
Np 8	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	MK070024
Np 10 II	<i>Enterobacter</i> sp.	100	MK070026

Np 11 II	<i>Paenibacillus catalpae</i>	99	MK070027
Np 12 I	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	MK070028
Np 12 II	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	MK070028
Np 12 III	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	MK070028
Np 13 I	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99	MK070029
Np 13 II	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99	MK070029
Np 14	<i>Bacillus</i> sp.	100	MK070030
Np 15 I	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	100	MK070031
Np 15 II a	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	100	MK070031
Np 15 II b	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	100	MK070031
Np 15 III	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	100	MK070031
Np 16 I	<i>Rhizobium</i> sp.	99	MK070032
Np 17 I	<i>Klebsiella oxytoca</i>	99	MK070033
Np 17 II	<i>Klebsiella oxytoca</i>	99	MK070033
Np 18 II a	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	99	MK070034
Np 18 II b	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	99	MK070034
Np 19	<i>Arthrobacter defluvii</i>	90	MK070035
Np 21 I	<i>Pseudomonas koreensis</i>	99	MK070037
Np 21 II a	<i>Pseudomonas koreensis</i>	99	MK070037
Np 21 II ba	<i>Pseudomonas koreensis</i>	99	MK070037
Np 21 II bb	<i>Pseudomonas koreensis</i>	99	MK070037

Np 22	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	MK070038
Np 23 II	<i>Enterobacter</i> sp.	99	MK070039
Np 24 I	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	100	MK070040
Np 24 II	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	100	MK070040
Np 24 III	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	100	MK070040
Np 24 IV	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	100	MK070040
Np 24 V	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	100	MK070040
Np 25 I	<i>Lelliotia amnigena</i>	99	MK070041
Np 25 II	<i>Lelliotia amnigena</i>	99	MK070041
Np 26 I	<i>Serratia</i> sp.	99	MK070042
Np 26 II	<i>Serratia</i> sp.	99	MK070042

En diversos artículos se señala individuos de los géneros bacterianos *Pseudomonas*, *Enterobacter* o *Bacillus* como responsables de gran parte de las actividades promotoras del crecimiento vegetal (Tabassum et al., 2017; Abdelwahed et al., 2023; Ahemad et al., 2014; Al-Fadhal et al., 2019; Backer et al., 2018; Cochard et al., 2022; Dhole et al., 2023; Habibi et al., 2019); la colección estudiada en este trabajo está constituida en un 48% por representantes del género *Pseudomonas*.

8.1. Recuperación y reactivación de cepas crio-preservadas

Durante la reactivación de las 37 cepas crio-preservadas se observaron más de un morfotipo en los cultivos sólidos de las cepas Np 6III, Np 15II, Np 18II y Np 21II, por lo que se aislaron nuevamente, resultando en la recuperación de 45 cepas en total. Se hizo tinción de Gram para la caracterización celular de las cepas recuperadas, de las cuales fueron 40 Gram negativas (89%) y 5 Gram positivas (11%).

De estas 45 cepas, las denominadas como 7 I, 7 III y 19 tuvieron una identificación taxonómica ambigua al presentar porcentajes de similitud del 90% en la secuencia del gen 16S rRNA con *Klebsiella michiganensis*, Np 7 I y Np 7 III, y con *Arthrobacter defluvii*, Np 19. Se requiere que el porcentaje de similitud sea >97% para tener una identificación

precisa a nivel de género y >99% para identificar a nivel de especie (Drancourt et al., 2004).

De igual forma, nueve de las cepas recuperadas mostraron características celulares que no correspondían con las identificaciones taxonómicas basadas en la secuenciación del gen 16S rRNA:

- La cepa 2I identificada por secuencia como *Pseudomonas* sp., por tinción se observó como bacilo Gram positivo, siendo que las especies del género de *Pseudomonas* son Gram negativas (Prasad et al., 2018).
- La cepa 11 II, caracterizada por secuencia como *Paenibacillus catalpae* (bacilos rectos Gram positivos), fue identificada por tinción como bacilo Gram negativo (Zhang et al., 2013). La diferencia entre la identificación se puede observar en la Figura 4.
- Para las cepas 15 I, 15 IIa y 15 IIb, identificadas por secuencia como *Lysinibacillus fusiformis* especie que se caracteriza por ser un bacilo Gram positivo, fueron identificadas por tinción como bacilos y cocobacilos Gram negativos (Sari et al., 2019; Jinka, 2020).
- De la cepa 24 se tenían cinco aislados: I, II, III, IV y V, identificados por secuencia como *Arthrobacter nicotinovorans*, para las cepas II, III, IV y V su identificación por tinción fue de bacilos Gram negativos, por lo que solo 24 I se parece a esta especie, descrita como cocobacilos Gram positivos (Kodama et al., 1992).

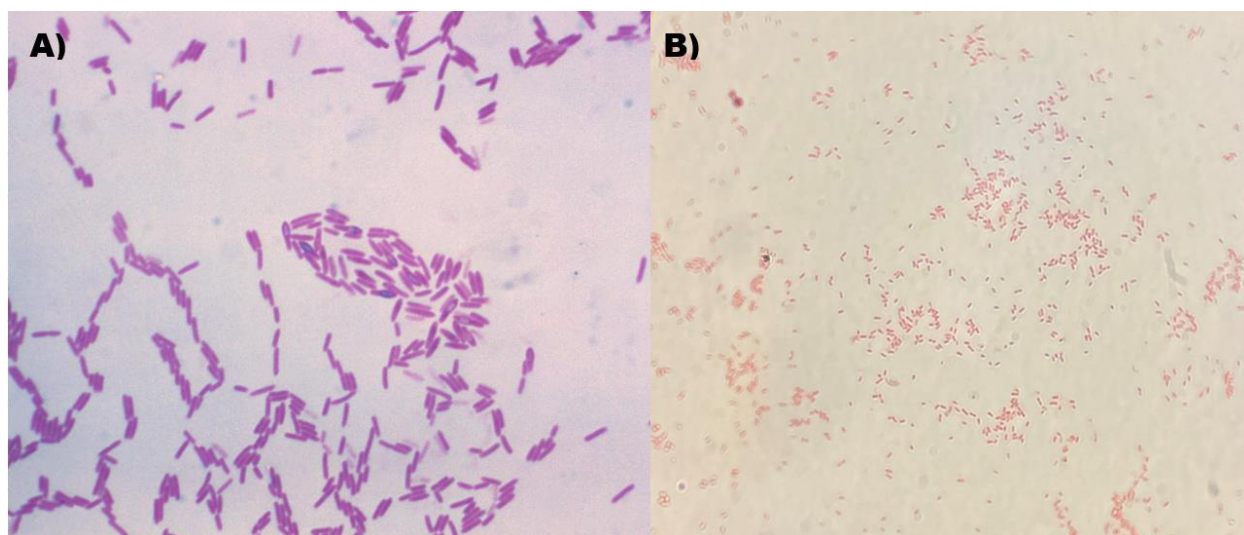


Figura 4: Morfología celular de *Paenibacillus catalpae*. A) *Paenibacillus catalpae* teñida de Gram positivo (Podstawka, s.f.). B) Cepa 11 II teñida de Gram negativo identificada como *Paenibacillus catalpae*.

El análisis de los resultados se hizo por cada actividad y por cada género bacteriano presente en la colección de cepas recuperadas, esto para poder hacer un análisis estadístico entre cepas del mismo género y determinar diferencias o similitudes estadísticas.

8.2. Cuantificación de indoles

La capacidad de producción de indoles de las cepas en estudio se detalla en la Tabla 1, donde puede verse que las concentraciones producidas por las diversas cepas fueron variadas. Se establecieron 3 categorías de producción: baja, media y alta. Diecinueve de las 45 cepas estudiadas tuvieron una producción baja de indoles (de 1 a 35 µg/mL); 17, una producción media (de 36 a 70 µg/mL) y 7, una producción alta (>70 µg/mL). Dos cepas (2 I y 13 I) que tuvieron una producción menor a 1 µg/mL, por lo que quedaron fuera de nuestra clasificación.

El método espectrofotométrico es el más común para detectar la presencia de indoles, dentro de los cuales el IAA es de particular interés; se basa en la reacción del cloruro férrico con una fracción de indoles en un ambiente ácido, desarrollando un color entre anaranjado y rosa. La limitante de esta técnica es que el reactivo de Salkowski no es específico para IAA y reacciona igualmente con otros indoles. (Goswami, et al. 2015).

8.2.1. *Pseudomonas* spp.

En general, se observó una producción variada de indoles entre las diferentes cepas del género *Pseudomonas* (Figura 5). Se obtuvieron valores que van desde 0.27 µg/mL, valor que está por debajo de la clasificación de productoras bajas de indoles (1 a 35 µg/mL), hasta 84.2 µg/mL producidos por la cepa 22. Estos resultados reflejan una amplia variabilidad en la capacidad de producción de indoles dentro de este género bacteriano.

Cuatro cepas fueron identificadas como *Pseudomonas koreensis* (21 I, 21 IIa, 21 IIba y 21 IIbb) y tuvieron una producción de indoles de 40.5, 61.7, 17.4 y 52.7 µg/mL, respectivamente. De acuerdo con estos resultados, tres cepas son productoras medias y una es una baja productora de indoles. Según lo reportado por Srivastava et al. (2019) y Bejaoui et al. (2024), *Pseudomonas* son buenas productoras de indoles, obteniendo en este estudio resultados consistentes con lo esperado.

Las cepas 18 IIa y 18 IIb fueron identificadas como *Pseudomonas brassicacearum*. La producción de indoles de estas cepas fue de 37.5 y 50.1 µg/mL, respectivamente, lo que las clasifica como productoras medias de indoles. Según D. Jing et al. (2023), una cepa de *P. brassicacearum* denominada X123 presentó una alta producción de indoles. Comparativamente, los resultados obtenidos en este estudio no alcanzaron niveles tan altos como los reportados por Jing (217.56 µg/mL). Sin embargo, es importante señalar que el método utilizado para la cuantificación de indoles en el estudio mencionado difiere del método empleado en este trabajo, por lo que no es posible hacer una comparación directa de los resultados.

Las cepas 13 I y 13 II, clasificadas como *Pseudomonas fluorescens*, mostraron una producción de indoles notoriamente diferente entre sí: 0.27 y 83.4 µg/mL, respectivamente. Según lo reportado por Chen et al. (2017), se esperaba una producción

de indoles de entre 15 a 50 $\mu\text{g/mL}$ por parte de *P. fluorescens*. La producción de indoles de la cepa 13 I fue menor que el rango esperado, mientras que la producción de la cepa 13 II fue mayor. Estas diferencias pueden deberse a factores genéticos específicos que influyan en la capacidad de producción de indoles en diferentes cepas de *P. fluorescens*.

La cepa 3, identificada como *Pseudomonas moraviensis*, tuvo una producción de 55.3 $\mu\text{g/mL}$ de indoles, lo que la clasifica como una productora media. Esta producción es mayor que la previamente reportada por Cochard et al. (2022) de 11.38 $\mu\text{g/mL}$. La capacidad de la cepa 3 para producir niveles más altos de IAA podría deberse a variaciones en las condiciones experimentales o a diferencias genéticas entre las cepas estudiadas. Este hallazgo sugiere que *P. moraviensis* tiene un potencial significativo para aplicaciones en promoción del crecimiento vegetal, aunque se requieren estudios adicionales para entender mejor los factores que influyen en la producción de indoles.

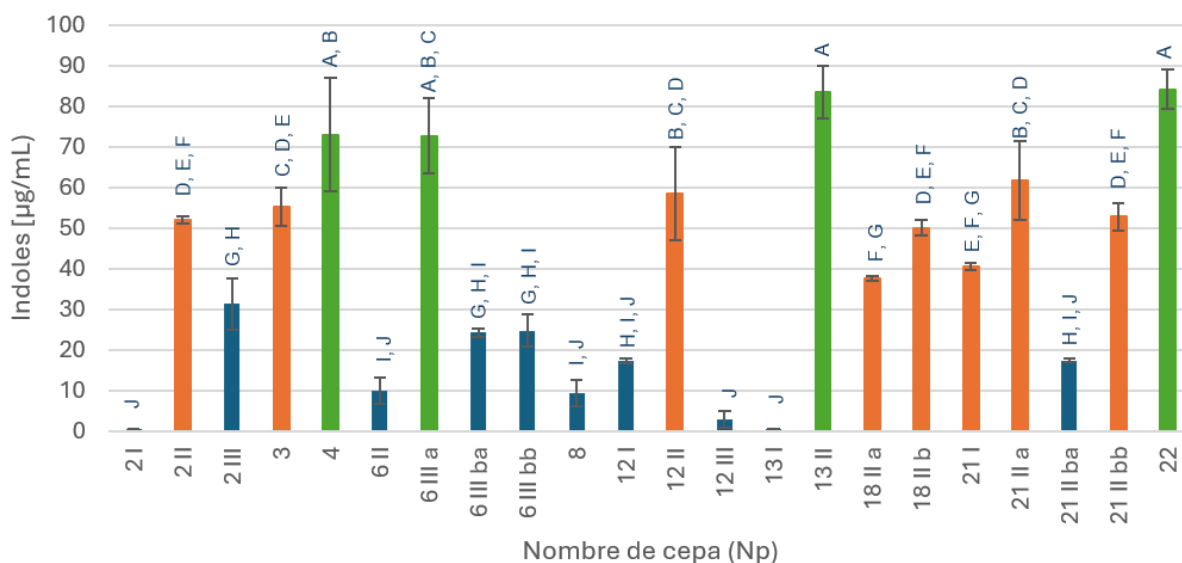


Figura 5: Producción de indoles por las bacterias del género *Pseudomonas* presentes en la colección en estudio. Se probaron 22 cepas distintas de *Pseudomonas*. Obteniendo diferentes niveles de producción que se clasificaron en 3 grupos: **producción baja** (de 1 a 35 $\mu\text{g/mL}$; azul), **producción media** (de 36 a 70 $\mu\text{g/mL}$; naranja), **producción alta** (>70 $\mu\text{g/mL}$; verde). Las diferentes letras sobre las barras significan diferencias estadísticamente significativas según las pruebas ANOVA y Tukey – Kramer ($\alpha = 0.05$).

8.2.2. *Arthrobacter* sp.

Las cepas 24 I, II, III, IV y V fueron identificadas como *Arthrobacter nicotinovorans* (Figura 6). Sin embargo, como se mencionó previamente, morfológicamente sólo la cepa 24 I corresponde con la identificación morfológica. En cuanto a la producción de indoles, 24 II y 24 V fueron clasificadas como altas productoras (71.6 y 77.5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente), mientras que 24 I, 24 III y 24 IV fueron bajas productoras (2.5, 6.3 y 5.8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) como se muestra en la Figura 6. De acuerdo con Sun et al. (2024),

Arthrobacter sp. es un buen productor de ácido indolacético (IAA), por lo que los resultados de 24 I, III y IV esperaban ser mayores. Es necesario realizar pruebas precisas de identificación taxonómica para determinar el género y especie de 24 II y 24 V dado su potencial como PGPR.

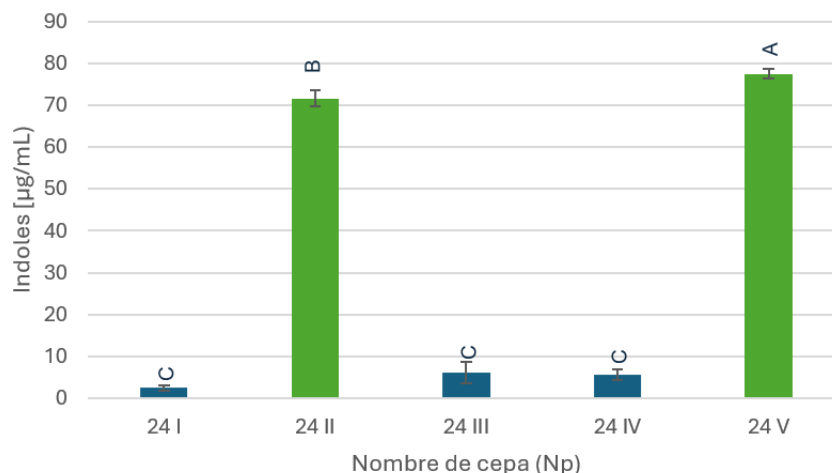


Figura 6: Producción de indoles por las bacterias del género *Arthrobacter* presentes en la colección en estudio. Se probaron a las cepas cultivadas en medio Burk. Obteniendo diferentes niveles de producción que se clasificaron en 3 grupos: producción baja (de 1 a 35 µg/mL; azul), producción media (de 36 a 70 µg/mL; naranja), producción alta (>70 µg/mL; verde). Las diferentes letras sobre las barras significan diferencias estadísticamente significativas según las pruebas ANOVA y Tukey – Kramer ($\alpha = 0.05$).

8.2.3. *Lysinibacillus* sp.

Las cepas 15 I, 15 II a, 15 II b y 15 III, identificadas como *Lysinibacillus fusiformis*, presentaron una producción de indoles de 36, 15.5, 43.7 y 41.7 µg/mL, respectivamente (Figura 7). Según estos valores, tres cepas pueden considerarse productoras medias de indoles y una como productora baja, como se muestra en la Figura 7. De acuerdo con la bibliografía consultada, se ha reportado que esta especie tiene una capacidad para la producción de IAA de entre 32 y 70 µg/mL. Los resultados obtenidos no son particularmente altos, pero reflejan la capacidad de estas cepas para producir indoles dentro del rango reportado en algunos estudios con excepción de la cepa 15 II a (Imran et al., 2023; Rafique et al., 2017).

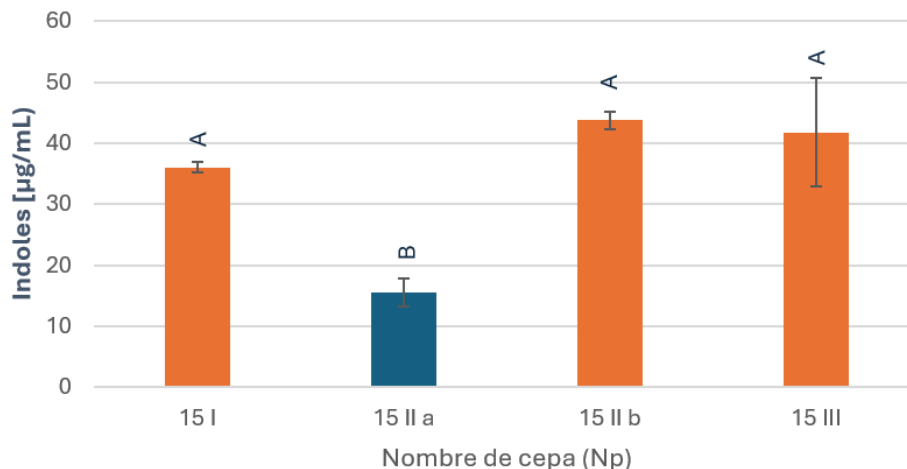


Figura 7: producción de indoles por las bacterias de la especie *Lysinibacillus fusiformis*. Se probaron 4 cepas de esta especie. Obteniendo diferentes niveles de producción que se clasificaron en 3 grupos: producción baja (de 1 a 35 µg/mL; azul), producción media (de 36 a 70 µg/mL; naranja), producción alta (>70 µg/mL; verde). Las diferentes letras sobre las barras significan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de t de student ($\alpha = 0.05$).

8.2.4. Géneros varios

Esta clasificación por géneros varios se hizo para agrupar a las cepas que contaban con pocos ejemplares de su género o especie y poder así hacer un análisis estadístico con ellas (Figura 8).

Las cepas 10 II y 23 II, identificadas como *Enterobacter* spp., tuvieron una producción baja de indoles de 2.9 y 4.3µg/mL, lo cual no concuerda con lo reportado por Ghosh et al. (2015), quienes mencionan que *Enterobacter* spp. son altos productores de IAA (77 a 155µg/mL). Sin embargo, el género de *Enterobacter* es bastante amplio y es probable que la diferencia se deba a diferencias genéticas entre las cepas estudiadas.

La cepa 11 II, identificada como *Paenibacillus catalpae*, tuvo una producción media de indoles de 46.9µg/mL. Aunque este nivel es medio, se esperaba una producción mayor ya que Shokri et al. (2010) y Sun et al. (2022) identificaron a *Paenibacillus* spp. como alto productor de IAA, sin embargo, los rangos reportados de producción de IAA en estos artículos son de 4 a 12.5µg/mL lo cual no concuerda con la clasificación que nosotros utilizamos, es posible que la diferencia se deba a variaciones en los métodos utilizados, lo que dificulta la comparación directa. Además, hay poca información específica sobre *P. catalpae*, por lo que las referencias disponibles se refieren al género en *Paenibacillus* sp. como género.

La cepa 14, identificada como *Bacillus* sp., produjo 36.1µg/mL de indoles, lo que se considera una producción media. Wagi y Ahmed (2019) mencionan que, como género son altos productores de IAA alrededor de 36µg/mL, no obstante, el método y la

clasificación de producción utilizada es diferente a los usados en este estudio, por lo que las diferencias en los métodos de medición limitan una comparación directa.

La cepa 16 I, identificada como *Rhizobium* sp., tuvo una producción de indoles de 84.2 µg/mL, siendo la cepa con la segunda mayor capacidad de producción en la colección estudiada. Wulandari et al. (2024) señalan que la producción de IAA por *Rhizobium* puede variar de 2.81 a 17.72 µg/mL, sin embargo, los métodos y clasificaciones utilizadas no son idénticos por lo que una comparación directa no es posible. No obstante, Ghosh et al. (2013) indicaron que suelen ser altos productores de IAA en un rango de 110 a 145 µg/mL, por lo que los resultados obtenidos son diferentes con lo esperado.

Las cepas 17 I y 17 II, identificadas como *Klebsiella oxytoca*, produjeron 16.6 y 9.1 µg/mL de indoles, respectivamente, clasificándose como de baja producción. Según Patel et al. (2024), *K. oxytoca* posee características PGPR destacadas, incluyendo la producción de IAA de alrededor de 1100 µg/mL, por lo que los resultados obtenidos no son los esperados.

Las cepas 25 I y 25 II, identificadas como *Lelliottia amnigena*, mostraron una producción de indoles de 2 y 84.4 µg/mL, respectivamente, siendo una de las productoras más bajas y otra de las más altas en esta investigación. Tatung & Deb (2024) reportaron una producción muy alta de IAA de 150 µg/mL en un estudio con un método de cuantificación similar al utilizado en este trabajo de investigación, lo que no se observó en ninguna de las cepas analizadas.

Las cepas 26 I y 26 II, identificadas como *Serratia* sp., produjeron 44.6 y 71 µg/mL de indoles, respectivamente. Martínez et al. (2018) mencionan que la producción de IAA por *Serratia* sp. podría encontrarse en un rango de 10 a 81 µg/mL, cuantificados con un método similar al que utilizamos, lo que sitúa a estas cepas dentro del rango esperado.

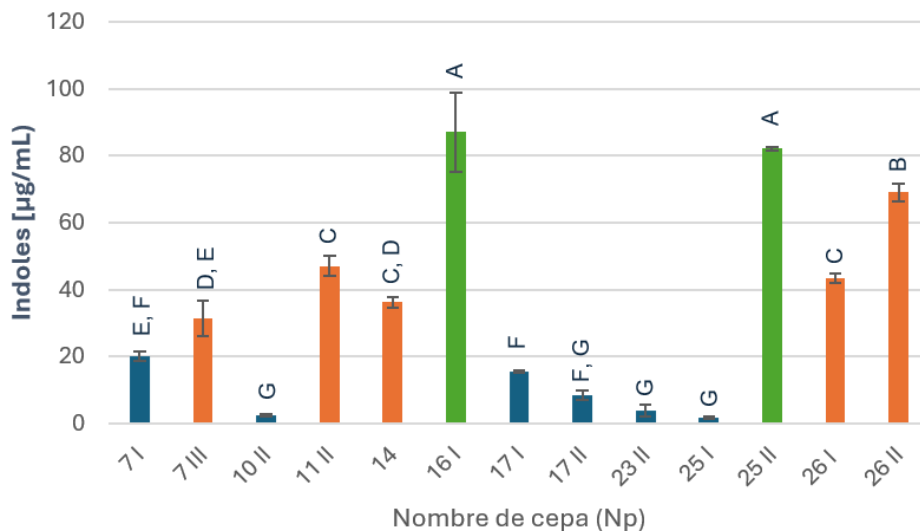


Figura 8: Producción de indoles por las bacterias de géneros varios presentes en la colección en estudio. Se probaron las cepas cultivadas en medio Burk. Obteniendo diferentes niveles de producción que se clasificaron en 3 grupos: **producción baja** (de 1 a 35 µg/mL; azul), **producción media** (de 36 a 70 µg/mL; naranja), **producción alta** (>70 µg/mL; verde); las diferentes letras sobre las barras significan diferencias estadísticamente significativas según las pruebas ANOVA y Tukey-Kramer ($\alpha = 0.05$).

8.3. Prueba semi-cualitativa de solubilización de fosfato

En la prueba semi-cualitativa de solubilización de fosfato de las cepas recuperadas, pudimos observar que 26 de las 45 cepas fueron solubilizadoras de fosfato inorgánico, presentando un halo de solubilización en el agar, con el cual se calculó el índice y la capacidad de solubilización de cada cepa. Veintitrés de ellas tuvieron una capacidad baja (IC $2 >$), 3 una capacidad media (IC >2 y $4 >$) y no hubo ninguna que la pudiéramos clasificar como alta solubilizadora (IC >4). Otro parámetro evaluado para las solubilizadoras de fosfatos fue el tiempo en el que lo hicieron, 11 cepas lo hicieron de forma temprana (formaron halo a las 72 h) y 15 cepas lo hicieron de forma tardía (formaron halo a las 120 h). Sin embargo, hubo 2 cepas que crecieron en el medio, pero no presentaron halo de solubilización, indicando que tienen la capacidad de utilizar los fosfatos para su crecimiento, aunque no necesariamente los solubilizan.

8.3.1. *Pseudomonas* sp.

De manera general, se observó una solubilización variada de fosfatos entre las diferentes cepas del género *Pseudomonas*. Se obtuvieron valores que van desde un índice de 0, cepas consideradas como no solubilizadoras, hasta un índice de solubilización de 2.2 clasificadas como solubilizadoras medias (Figura 10).

Las cepas 21 I, 21 IIa, 21 IIba y 21 IIbb, identificadas como *Pseudomonas koreensis* tuvieron un índice de solubilización de 1, 1.6, 1.6 y 1.8, respectivamente; se sabe que *P.*

koreensis son solubilizadoras de fosfatos, sin embargo, no se menciona la cantidad solubilizada, pero, por técnicas moleculares, se han identificado genes relacionados con esta actividad (Crovadore et al., 2020).

Las cepas 18 IIa y 18 IIb identificadas como *Pseudomonas brassicacearum* tuvieron un índice de solubilización de 2.1 y 2.2 respectivamente, siendo los índices más altos encontrados en toda la colección de bacterias utilizada; la prueba de la cepa 18 IIa se puede observar en la Figura 9. Según Nelkner et al. (2019) reportaron la presencia de genes relacionados con la solubilización de fosfato, sugiriendo que *P. brassicacearum* es capaz de solubilizar fósforo, que, aunque no se observaron niveles tan altos de solubilización en las cepas estudiadas, en la categorización utilizada se consideran como solubilizadoras medias. Sin embargo, en el reporte de Habibi et al. (2019) en el que analizaron 4 cepas de *P. brassicacearum* no se encontró ningún tipo de solubilización de fosfatos.

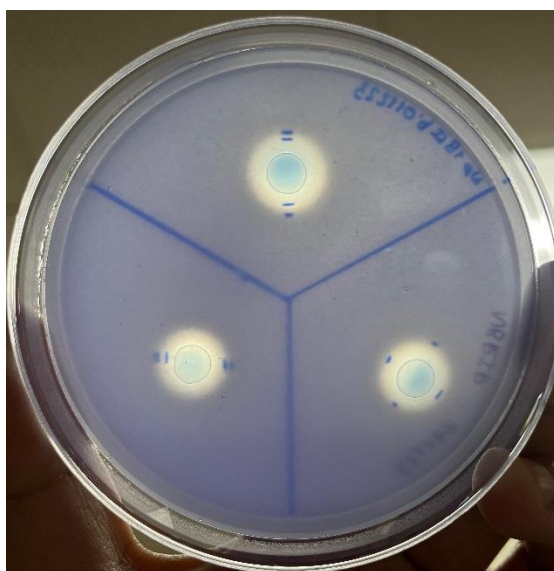


Figura 9: Solubilización de fosfato en medio NBRIP por la cepa 18 II a identificada como *Pseudomonas brassicacearum* con un índice de solubilización de 2.1, clasificada como solubilizadora media.

Las cepas 13 I y 13 II (*Pseudomonas fluorescens*) presentaron un índice de solubilización de 1 y 0, por lo que, 13 I se clasifica como solubilizadora baja y 13 II como no solubilizadora, de acuerdo con Barin et al. (2022), Una cepa de *P. fluorescens* aislada de suelos áridos en Irán, la cual tiene un origen similar al de las cepas utilizadas en este estudio aisladas de suelos semiáridos, presentó una alta solubilización de fosfatos inorgánicos de 1684.4 mg/kg.

La cepa 3 (*Pseudomonas moraviensis*) no fue capaz de solubilizar fosfatos en las condiciones en las que evaluamos esta actividad. De acuerdo con Ait-Ouakrim et al. (2023), una cepa de *P. moraviensis* presentó un amplio espectro de solubilización de

fosfatos que varía entre 5.34 a 227 μ g/mL dependiendo de la forma en que se encuentre el fosfato a solubilizar.

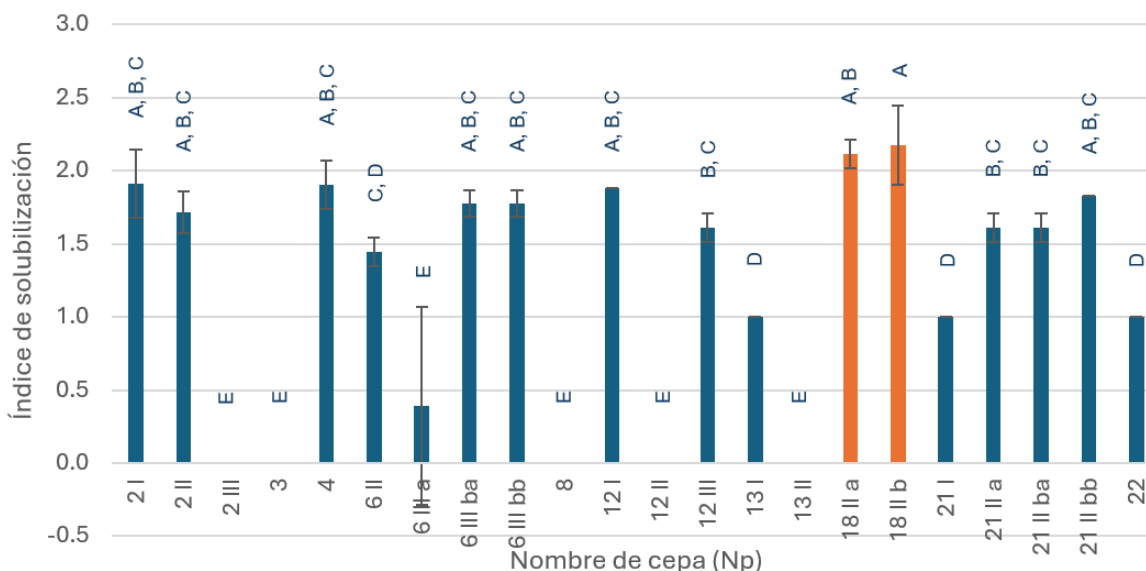


Figura 10: Capacidad de solubilización de fosfato de cepas de *Pseudomonas* sp. Se obtuvieron diferentes índices de solubilización y se clasificaron en **baja** (IC >2; azul), **media** (IC >2 y 4; naranja) y **alta** (IC >4; verde); las diferentes letras sobre las barras significan diferencias estadísticamente significativas según las pruebas ANOVA y Tukey-Kramer ($\alpha = 0.05$).

8.3.2. *Arthrobacter* sp.

Las cepas de 24 I y 24 IV, identificadas como *Arthrobacter nicotinovorans* presentaron índices de solubilización de fosfatos bajos o inexistentes (Figura 11). El mayor índice de solubilización fue observado en la cepa 24 V, con un valor de 1.6. Por lo que, estos resultados no fueron los esperados ya que, según Benmrid et al. (2024), *Arthrobacter* presenta una alta solubilización de fosfatos de alrededor de 80 a 100 mg/L, sin embargo, la información existente de dicha especie es muy limitada, por lo que no existen suficientes estudios para hacer una comparación directa con las cepas de este estudio.

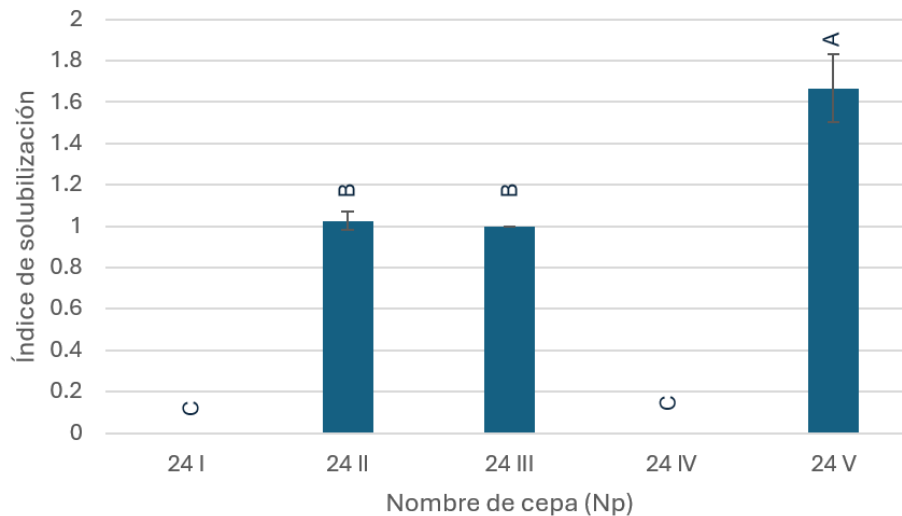


Figura 11: Capacidad de solubilización de fosfato de cepas de *Arthrobacter* sp. Se obtuvieron diferentes índices de solubilización y se clasificaron en **baja** (IC >2; azul), **media** (IC >2 y 4; naranja) y **alta** (IC >4; verde); las diferentes letras sobre las barras significan diferencias estadísticamente significativas según las pruebas ANOVA y Tukey-Kramer ($\alpha = 0.05$).

8.3.3. Varios

Esta clasificación por géneros varios se hizo para agrupar a las cepas que contaban con pocos ejemplares de su género o especie y poder así hacer un análisis estadístico con ellas (Figura 13).

Las cepas 10 II y 23 II (*Enterobacter* sp.) presentaron una nula capacidad de solubilización, lo cual también contrasta con la bibliografía existente. Park et al. (2011) encontraron que *Enterobacter* sp. puede solubilizar fosfatos bajando el pH de 7 a 3.8 en condiciones in vitro, principalmente a través de la producción de ácidos orgánicos. En este estudio, aunque la cepa 10 II provocó un cambio de pH en el medio evaluado a partir de la coloración rojiza que desarrollaron las colonias, indicando un cambio de pH de neutro a ácido, no se apreció un halo de solubilización medible (Figura 12). Esto sugiere que la producción de ácidos orgánicos por parte de la cepa 10 II es baja, suficiente para tornar el color de las colonias bacterianas a una tonalidad asociada con un pH ácido en el medio utilizado, pero insuficiente para generar un halo de solubilización visible.



Figura 12: *Enterobacter* sp. cepa 10 II, mostrando baja capacidad de solubilización de fosfatos.

La cepa 11 II (*Paenibacillus catalpae*) tuvo un índice de solubilización bajo de 1.83. De acuerdo con Brito et al. (2020) el género de *Paenibacillus* solubiliza fosfatos, sin embargo, otros autores como Petrovic et al. (2023) mencionan que *Paenibacillus* no los solubiliza, por lo que esta diferencia puede deberse a las diferentes características metabólicas de diferentes especies dentro del género de *Paenibacillus*.

Las cepas 17 I y 17 II, identificadas como *Klebsiella oxytoca*, presentaron índices de solubilización de fosfatos de 2 y 1, respectivamente, considerados como de solubilización media y baja. Según Patel et al. (2024) y Faskhutdinova et al. (2024), *Klebsiella oxytoca* es conocida por su alta capacidad de solubilización de fosfatos al utilizar el medio NBRIP; Patel reportó una solubilización de alrededor de 900µg/mL de fosfatos, mientras que Faskhutdinova reportó un índice de solubilización de 1.95.

Las cepas 25 I y 25 II, identificadas como *Lelliottia amnigena*, tuvieron índices de solubilización de fosfatos de 0 y 1.7, respectivamente. Por su parte, Bódalo et al., (2023) reportaron que, mientras algunas cepas de *L. amnigena* son altas solubilizadoras de fosfatos, otras no lo son, lo que permite sustentar los resultados obtenidos.

Las cepas 26 I y 26 II, identificadas como *Serratia* sp., presentaron índices de solubilización de fosfatos de 1.8 y 0, respectivamente. De acuerdo con Ludueña et al. (2016), el género *Serratia* tiene una alta capacidad de solubilización de fosfatos en medio NBRIP. El índice de la cepa 26 I fue de 1.8 siendo de los más altos de la investigación, a pesar de entrar en la clasificación de bajo solubilizador.

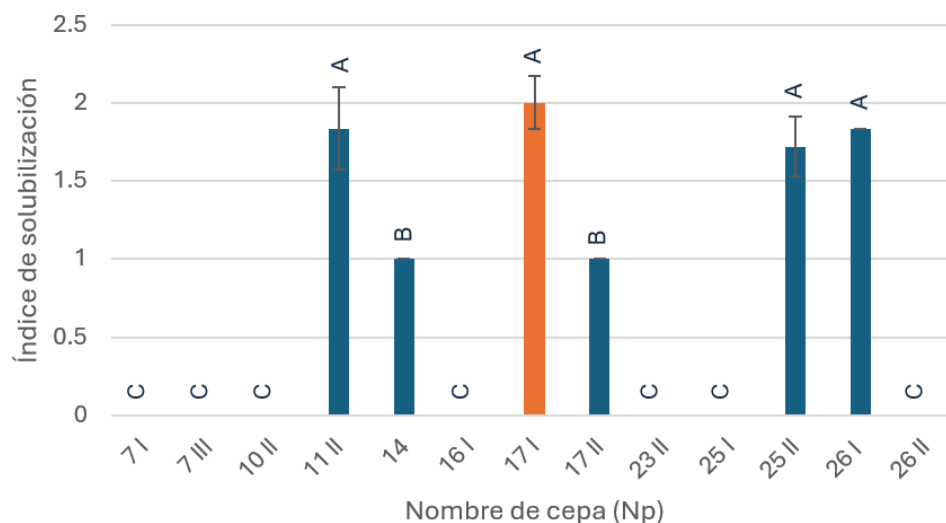


Figura 13: Capacidad de solubilización de fosfato de cepas de diferentes géneros bacterianos. Se obtuvieron diferentes índices de solubilización y se clasificaron en **baja** (IC >2; azul), **media** (IC >2 y <4; naranja) y **alta** (IC >4; verde); las diferentes letras sobre las barras significan diferencias estadísticamente significativas según las pruebas ANOVA y Tukey-Kramer ($\alpha = 0.05$).

8.4. Biocontrol vs el hongo fitopatógeno *F. solani*

Se evaluó la capacidad de limitar el crecimiento del hongo fitopatógeno *Fusarium solani* a partir del porcentaje de inhibición obtenido del crecimiento dual de las cepas bacterianas recuperadas en función del crecimiento de *F. solani*. 37 cepas de las 45 cepas estudiadas presentaron algún porcentaje de inhibición: 30 presentaron menos del 30% de inhibición, 4 estuvieron en un rango entre 30 y 40% y 3 tuvieron porcentajes mayores a 40%.

La cepa que presentó el mayor porcentaje de inhibición fue la cepa 8, clasificada previamente como *Pseudomonas* sp. con un 52.5% de inhibición de crecimiento de *F. solani*, seguida de la cepa 23 II clasificada como *Enterobacter* sp., la cual presentó un 50% de inhibición.

8.4.1. *Pseudomonas* sp.

De manera general, se observó una inhibición del crecimiento de *F. solani* variada entre las diferentes cepas del género *Pseudomonas*. Se obtuvieron valores que van de un porcentaje de inhibición de 0, a valores de 52.5% (Figura 14).

Como se mencionó previamente, 4 de las cepas en estudio fueron identificadas como *Pseudomonas koreensis* (21 I, 21 II A, 21 II BA y 21 II BB); fueron capaces de inhibir el crecimiento de *Fusarium solani* en 3.3, 11.7, 8.3 y 27.5%, por lo que fue relativamente baja su capacidad de inhibición. De acuerdo con Rafikova et al. (2016), *P. koreensis* puede inhibir el crecimiento de diferentes especies de *Fusarium*, y puede inhibir *F. solani* en alrededor de 77.5%

Las cepas 18 II a y 18 II b identificadas como *Pseudomonas brassicacearum* provocaron un porcentaje de inhibición de *Fusarium solani* de 32.5 y 15% respectivamente. De acuerdo con Yang (2019), *P. brassicacearum* presenta alta actividad antifúngica contra *Fusarium oxysporum*. Por otro lado, Belimov et al. (2007), sugieren que se trata de potenciales agentes de biocontrol, pero también pueden ser patógenos de algunas plantas como al tomate.

Las cepas 13 I y 13 II identificadas como *Pseudomonas fluorescens*, presentaron un porcentaje de inhibición de 13.6 y 0%, respectivamente. De acuerdo con David, et al. (2018) algunas cepas de *P. fluorescens* producen algunos antibióticos (pirrolnitrina o fenazina), HCN o sideróforos inhibiendo el crecimiento de hongos fitopatógenos del género *Fusarium*, sin embargo, sus resultados no mostraron una alta inhibición del crecimiento de *Fusarium solani*. De acuerdo con Al-Fadhal et al. (2019) algunas cepas de *P. fluorescens* aisladas de granjas desérticas en Iraq, inhibieron el crecimiento de *F. solani* en un 100%, aunque utilizaron un método diferente al del presente estudio, los porcentajes de inhibición fueron muy bajos, esperando que fueran mayores.

La cepa 3, identificada como *Pseudomonas moraviensis* presentó un porcentaje de inhibición de 15%, de acuerdo con Ramlawi et al. (2021) presentaron 2 cepas con potencial para inhibir el crecimiento de *Fusarium sambucinum* en un 45 a 50%, datos que respalda Hamane et al. (2023) cepas que presentaron un porcentaje de inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum* de 23 a 40%.

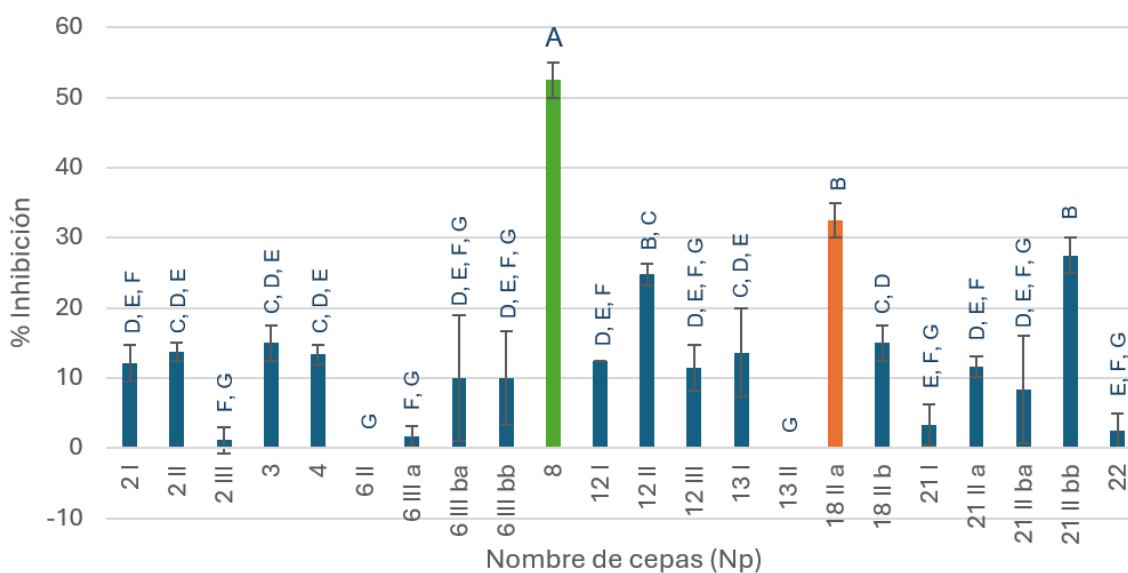


Figura 14: Inhibición del crecimiento de *Fusarium solani* por cepas de *Pseudomonas*. Se obtuvieron diferentes porcentajes de inhibición del crecimiento, y se clasificaron en baja (<30; azul), media (>30 y <40; naranja) y alta (>40; verde); las diferentes letras sobre las barras significan diferencias estadísticamente significativas según las pruebas ANOVA y Tukey-Kramer ($\alpha = 0.05$).

8.4.2. *Arthrobacter* sp.

Las cepas 24 I, II, III, IV y V tuvieron una baja inhibición del crecimiento de *F. solani* (Figura 15), siendo la cepa 24 II la que mostró el mayor índice con un porcentaje de 35.8. En general, los resultados no fueron los esperados ya que Thion et al. (2012) reportaron que el género *Arthrobacter* actúa como agente de biocontrol contra *F. solani*.

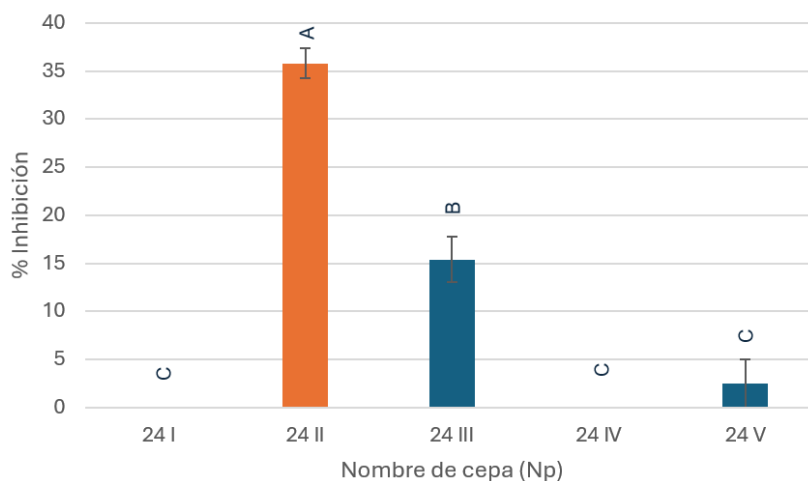


Figura 15: Inhibición del crecimiento de *Fusarium solani* por cepas de *Arthrobacter*. Se obtuvieron diferentes porcentajes de inhibición y se clasificaron en baja (<30; azul), media (>30 y <40; naranja) y alta (>40; verde); las diferentes letras sobre las barras significan diferencias estadísticamente significativas según las pruebas ANOVA y Tukey-Kramer ($\alpha = 0.05$).

8.4.3. *Lysinibacillus fusiformis*

Las cepas 15 I, 15 II a, 15 II b y 15 III, identificadas como *Lysinibacillus fusiformis*, mostraron un porcentaje de inhibición del crecimiento de *Fusarium solani* de 2, 17.5, 20.8 y 27.5%, respectivamente (Figura 16). En la literatura consultada no se encontraron referencias sobre pruebas de biocontrol de *Lysinibacillus fusiformis* sobre *Fusarium solani*. Por lo que no existe información suficiente para comparar los resultados.

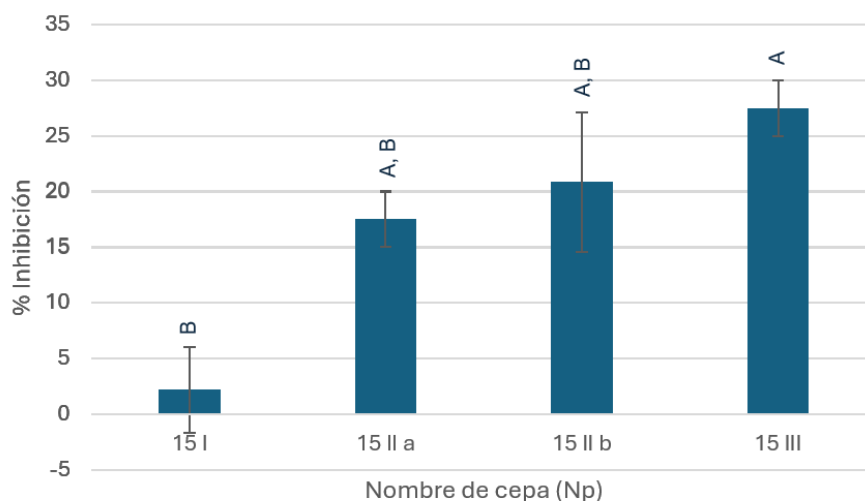


Figura 16: Inhibición del crecimiento de *Fusarium solani* por cepas de *Lysinibacillus fusiformis*. Se obtuvieron diferentes porcentajes de inhibición y se clasificaron en **baja** (<30; azul), **media** (>30 y <40; naranja) y **alta** (>40; verde); las diferentes letras sobre las barras significan diferencias estadísticamente significativas según las pruebas de Wilcoxon y Kruskal Wallis ($\alpha = 0.05$).

8.4.4. Varios

Esta clasificación por géneros varios se hizo para agrupar a las cepas que contaban con pocos ejemplares de su género o especie y poder así hacer un análisis estadístico con ellas (Figura 18).

Las cepas 10 II y 23 II presentaron un porcentaje de inhibición del 32.5 y 50% (Figura 17) contra *F. solani*, lo cual es consistente con lo reportado por Al-Mughrabi (2010). Este autor menciona que el género *Enterobacter* presenta inhibición de diferentes tipos de *Fusarium* y puede ayudar a remediar algunas enfermedades causadas por este género de hongos fitopatógenos.

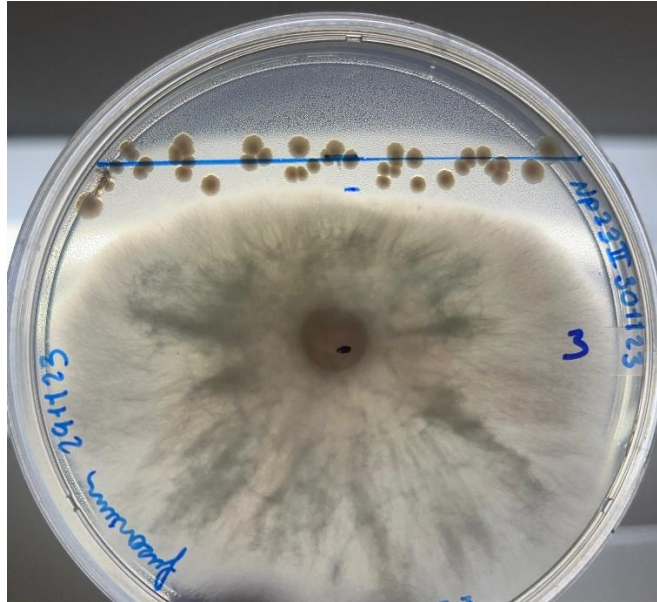


Figura 17: Inhibición de crecimiento de cepa 23 II (*Enterobacter* sp.) contra *Fusarium solani* con un porcentaje de 50%.

La cepa 11 II, identificada como *Paenibacillus catalpae*, mostró un porcentaje de inhibición de crecimiento contra *Fusarium solani* del 15%, lo cual entra dentro de lo esperado, ya que, según Petrovic et al. (2023), *Paenibacillus* ha demostrado una capacidad de inhibición del crecimiento de *F. solani* de 5 a 50%.

Las cepas 26 I y 26 II, identificadas como *Serratia* sp., presentaron porcentajes de inhibición contra *F. solani* de 11.76 y 35%, respectivamente. De acuerdo con Banerjee et al. (2020), *Serratia* sp. inhibe el crecimiento de *F. solani* mediante la producción de sideróforos y HCN. Por lo tanto, las cepas se presentan como buenos candidatos para evaluar la producción de estos compuestos.

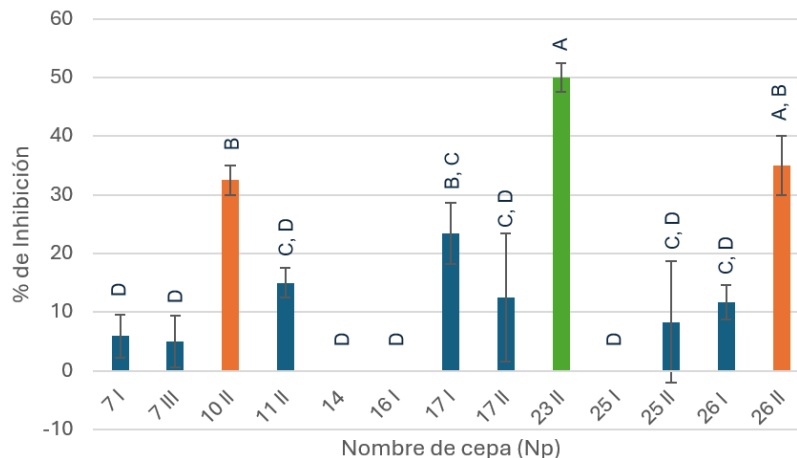


Figura 18: Inhibición del crecimiento de *Fusarium solani* por cepas de diferentes géneros bacterianos. Se obtuvieron diferentes porcentajes de inhibición y se clasificaron en baja (<30; azul), media (>30 y <40; naranja) y alta (>40; verde); las diferentes letras sobre las barras significan diferencias estadísticamente significativas según las pruebas ANOVA y Tukey-Kramer ($\alpha = 0.05$).

9. CONCLUSIONES

Se recuperaron 45 cepas bacterianas a partir de la colección inicial de 36. Las 9 cepas recuperadas adicionalmente necesitan una identificación taxonómica precisa.

Las 45 cepas fueron productoras de indoles: 7 se clasificaron como productoras altas (71.6 - 87 μ g/mL); 17 como productoras intermedias (36.03 - 69 μ g/mL); y 21 como bajas productoras (0.27 – 31.47 μ g/mL).

El 58% de las cepas (26 de las 45) se clasificaron como solubilizadoras de fosfato inorgánico; no hubo ninguna alta solubilizadora (IC >4), 3 de ellas fueron solubilizadoras medias (IC >2 y 4>) y 23 solubilizadoras bajas (IC 2>). De las 26 cepas identificadas como solubilizadoras de fosfato, 11 fueron capaces de solubilizarlo de manera temprana (formaron halo de solubilización a las 72h) y 15 fueron solubilizadoras tardías (formaron halo de solubilización a las 120h).

Hubo 37 cepas (82%) ejercieron biocontrol sobre *Fusarium solani*; 2 tuvieron porcentajes de inhibición del crecimiento fúngico entre 50 y 52.5%, 5 tuvieron entre 32.5 y 39.17% y 30 tuvieron porcentajes de 1.1 a 27.5.

10. ANEXOS

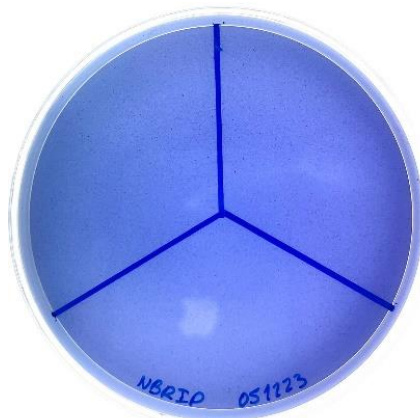
ANEXO I - Medios de cultivo y soluciones

a) Medio NBRIP para solubilizadores de fosfato inorgánico (Nautiyal, 1999)

Tabla 2: Composición del medio sólido	
Reactivo	Concentración (g/L)
Glucosa	10
MgCl ₂	5
MgSO ₄	0.35
KCl	0.2
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5
Agar bacteriológico	1.2%
Solución de azul de bromofenol	0.025
H ₂ O	cpb 1L

Preparación:

1. Pesar todos los reactivos en una balanza analítica.
2. Disolver los reactivos en agua desionizada con un agitador magnético y una parrilla de agitación, con excepción del fosfato tricálcico y el agar bacteriológico.
3. Ajustar el pH de la solución a 7 con soluciones de ácido clorhídrico 1M o hidróxido de potasio 1N.
4. Disolver el reactivo Ca₃ (PO₄)₂ en la solución con el pH ajustado.
5. Poner el agar en un frasco de vidrio y verter la solución preparada previamente; y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 120°C y 15 psi.
6. Encender campana de flujo laminar y limpiarla con etanol 70%.
7. Atemperar el medio y verter 25 mL medio en cajas Petri, procurando que la superficie de las cajas quede totalmente horizontal.
8. Etiquetar cada caja con el nombre del medio y la fecha de su elaboración.
9. Dividir cajas Petri en 3 secciones del mismo tamaño, como se muestra en la siguiente imagen



10. Dejar las cajas cerradas a temperatura ambiente sobre la mesa de trabajo durante 24 horas, para confirmar su esterilidad.

b) Medio PDA (Agar Papa-Dextrosa)

Tabla 3: Composición del medio PDA*	
Reactivo	Concentración (g/L)
Almidón de papa (infusión de papa sólidos)	4.0
Dextrosa	20.0
Agar	15.0

*Composición de reactivo comercial

Preparación:

1. Pesar 39 g de la preparación comercial del medio deshidratado para 1 L de medio.
2. Disolver en agua desionizada con un agitador magnético lentamente en una parrilla de agitación
3. Verter el medio en frascos de vidrio y esterilizar en autoclave a 120 °C y 15 psi por 15 minutos
4. Atemperar el medio y verter 30 mL en cajas Petri dentro de la campana de flujo laminar.
5. Esperar a que las placas se solidifiquen y etiquetar cada caja con el nombre del medio y el día de su preparación.
6. Dejar las cajas cerradas a temperatura ambiente por 24 horas para confirmar su esterilidad.

c) Medio líquido Triptona-Levadura (TY) (Aguirre-Garrido, 2009)

Tabla 4: Composición de medio TY líquido	
Reactivo	Concentración (g/L)
Triptona	5
Extracto de levadura	3
CaCl ₂	1

Método de preparación:

1. Pesar cada uno de los reactivos y disolverlos en agua desionizada con un agitador magnético, una vez que estén todos disueltos, aforar el volumen final.
2. Poner 5 mL de medio en tubos de ensayo con tapa rosca y esterilizar a 120 °C y 15 psi en autoclave por 15 minutos.
3. Atemperar el medio antes de usarlo.

d) Medio de cultivo y soluciones para la producción y cuantificación de indoles
(Park et al., 2005)

1. Burk 1

Preparar las siguientes soluciones con agua desionizada y esterilizar por separado a 15 psi y 120 °C por 15 minutos

1.1 Glucosa 15 g/L

1.2 Solución de Fosfatos 10X

KH ₂ PO ₄	4.1g
K ₂ HPO ₄	5.2g
H ₂ O	Cpb 1L

1.3 Solución de Cloruros 10X

NaCl	0.5g
CaCl ₂	2g
(NH ₄) Cl	1g
H ₂ O	Cpb 1L

1.4 Solución de Sulfatos 20x

MgSO ₄	2
FeSO ₄	0.1
H ₂ O	Cpb 1L

Composición final del medio

Tabla 5: Volúmenes utilizados para formular el medio Burk 1	
Solución	mL/L
1	666.67
2	100
3	100
4	50
H ₂ O	83.3

2. Medio Burk 2

Preparar las mismas soluciones descritas en el numeral anterior (1. “Medio Burk 1”), a excepción e la solución Cloruros 10X (1.3) que, para este medio, se compone exclusivamente de NaCl y CaCl₂, 0.5 y 2 g/L, respectivamente.

3. Solución saturada de triptófano

- 3.1. Pesar 11.4µg de triptófano por cada mililitro de solución que se vaya a preparar y disolverlo en agua desionizada con agitación y en ausencia de luz.
- 3.2. Esterilizar la solución por filtración en membranas (MILLEX GS filter unit, 0.22µm)
- 3.3. Guardar la solución en un frasco ámbar estéril, y mantener en refrigeración

4. Solución de cloruro férrico 0.5M

- 4.1. Pesar 1.35 g de cloruro férrico y disolverlos en 10 mL de agua desionizada.

5. Reactivo de Salkowski

Tabla 10: Composición de Reactivo de Salkowski	
Reactivo	Volumen (mL)
H ₂ O	606.25
H ₂ SO ₄	375
FeCl ₃ (0.5 M)	18.75

Es necesario agregar los reactivos en el orden en que están listados.

6. Solución stock de ácido indolacético (IAA)

6.1. Preparar una solución de ácido indolacético a 100µg/mL, disolver en etanol.

6.2. Almacenar en refrigeración (4°C) dentro de un frasco ámbar.

ANEXO II - Curva de patrón de IAA

Agregar volúmenes crecientes de la solución stock de IAA [100µg/µL] y volúmenes decrecientes de etanol para obtener diferentes concentraciones de IAA en cada tubo, como se indica en la Tabla 11. Agregar 1 mL de reactivo de Salkowski (Anexo I, d5) a cada tubo e incubar por 30 min en ausencia de luz (Figura 21). Leer en espectrofotómetro a 530nm. Graficar los puntos de la curva con la concentración teórica de IAA y las absorbancias obtenidas (Figura 20).

Tabla 11: Soluciones para la curva patrón de IAA		
Concentración final IAA (µg/µL)	Volumen stock (µL)	Volumen EtOH (µL)
0	0	1000
2	20	980
4	40	960
6	60	940
8	80	920
10	100	900
15	150	850
20	200	800
30	300	700
40	400	600
50	500	500
60	600	400
80	800	200
100	1000	0

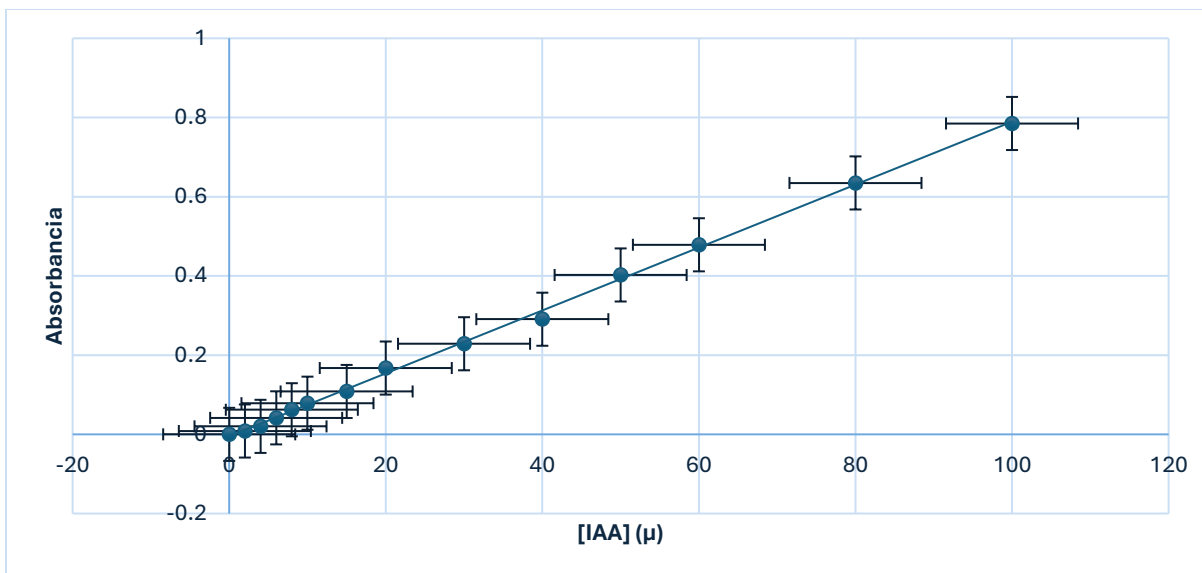


Figura 20: Curva patrón de IAA. Los valores presentados corresponden al promedio de 10 repeticiones independientes; las barras de error indican la desviación estándar.



Figura 21: Coloración obtenida para la construcción de la curva patrón de IAA. La etiqueta en cada tubo corresponde a la concentración teórica de IAA.

ANEXO III – Suspensión de esporas de hongos fitopatógenos

1. Preparar placas de medio PDA (Anexo I, b) y sembrar en el centro de ellas 20µL de una suspensión de esporas preservada en glicerol al 50%.
2. Sellar las cajas con Parafilm e incubarlas entre 28 y 30°C hasta que se observe crecimiento del micelio
3. Cuando el micelio haya cubierto la superficie de las placas, agregar a cada caja 7.5 mL de NaCl 0.9% estéril y 10 perlas de vidrio también estériles; mantener en agitación horizontal constante entre 2.5 y 3 horas.
 - a. En caso de que la solución de NaCl 0.9% se absorba en el medio PDA, agregar 5 mL de solución y continuar con la agitación.
4. Una vez levantado el micelio de la superficie de las cajas, extraer todo el volumen posible de la suspensión de esporas obtenida y transferirla a tubos de ensayo con tapa rosca, estériles.
5. Para cuantificar las esporas presentes en la suspensión recién obtenida, poner 10 µL de ella en una cámara de Neubauer y hacer la observación correspondiente al microscopio.
6. Contar las esporas en las 4 áreas de cuadrícula de mayor tamaño en la cámara y utilizar la siguiente fórmula para determinar el número de esporas por mL que tiene la suspensión recién obtenida:

$$\frac{\# \text{ esporas}}{\text{mL}} = \frac{(\# \text{ esporas contadas}) \times (\text{factor de conversión de volumen})}{\text{Áreas contadas (mm}^2\text{)} \times (\text{Factor de dilución})}$$

- a. Cada área cuenta con 16 celdas (4x4) lo que equivale a un total de 4 mm² de áreas contadas.
- b. Si hay más de 45 esporas por celda, es necesario hacer una dilución con NaCl 0.9% y considerar en la formula el factor de dilución.

ANEXO IV - Representación esquemática del cultivo dual de una cepa bacteriana + *Fusarium solani* para evaluar el potencial de biocontrol de la colección de bacterias en estudio

Para la prueba de biocontrol contra *F. solani* es necesario hacer un cultivo dual con la cepa bacteriana que se vaya a probar, sembrada por estría en uno de los extremos de la caja, y el hongo fitopatógeno sembrado en el centro de la caja (Figura 22), para después medir el crecimiento del hongo hacia el lado en donde se sembró la cepa bacteriana y hacia donde no, obteniendo así un porcentaje de inhibición del crecimiento.

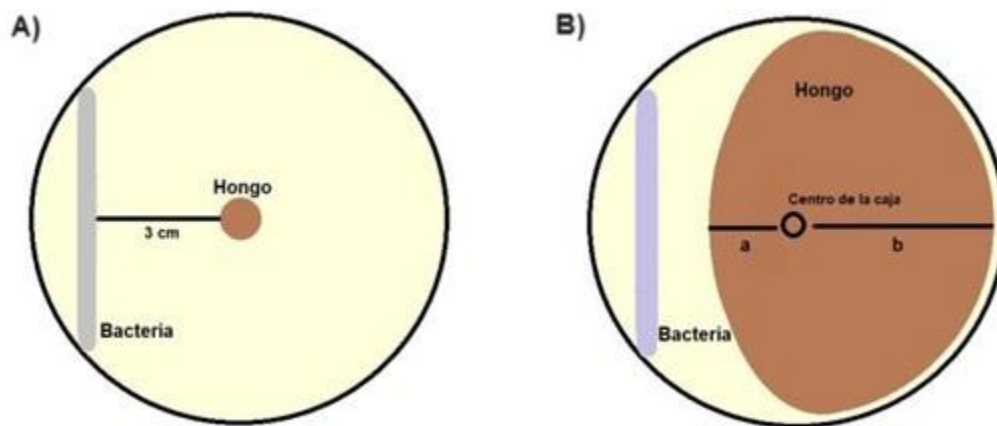


Figura 22: Representación esquemática del cultivo de un hongo y una bacteria para evaluar su relación antagonista. A) Siembra simultánea del hongo y la bacteria en estudio. B) Interacción antagonista esperada entre el hongo y la bacteria; a y b son las distancias medidas para calcular el porcentaje de inhibición (Salinas, 2019).

ANEXO V – Caracterización morfológica colonial de las cepas bacterianas recuperadas

ID	Cepa	Forma	Tamaño	Superficie	Elevación	Borde	Color	Opacidad	Consistencia
<i>Pseudomonas</i> sp.	2 i	Circular	Chicas	Lisa	Plana	Continúo	Crema	Traslúcidas	Viscosa
	2 ii	Circular	Medianas	Granulosa	Cóncava	Continuó	Crema-amarillento	Traslúcido	Viscosa
	2iii	Irregular	Grandes	Rugosa	Plana	Ondulado	Crema-amarillento	Opacas	Dura
<i>Pseudomonas moraviensis</i>	3	Circular	Medianas	Lisa	Convexa	Continuo	Crema	Nuevas-traslúcidas viejas-opacas	Viscosa
<i>Pseudomonas</i> sp.	4	Circular	Medianas	Lisa	Convexa	Continuo	Crema	Nuevas-traslúcidas viejas-opacas	Viscosa
<i>Pseudomonas</i> sp.	6 ii	Circular	Medianas	Lisa	Convexa	Continuo	Crema-amarillento	Traslúcido	Viscoso
	6 iii a	Circular	Chicas	Lisa	Convexa	Continuo	Crema	Opacas	Viscosas
	6 iii ba	-	-	-	-	-	-	-	-
	6 iii bb	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella michiganensis</i>	7 i	Circular	Medianas-grandes	Lisa	Convexa	Continuo	Blancas	Opacas	Viscosas
	7 iii	Circular	Medianas	Lisa	Convexa	Continuo	Blancas con el centro ligeramente más oscuro	Opacas	Viscoso

<i>Pseudomonas</i> sp.	8	Circular	Chicas-medianas	Lisa	Convexa	Continuo	Amarillentas	Oacas	Gelatinosas
<i>Enterobacter</i> sp.	10 ii	Circular	Chicas	Lisa	Plana	Continuo	Amarillentas rosas	Opacas	Gelatinosas
<i>Paenibacillus catalpae</i>	11 ii	Circular	Chicas	Ondulada	Umbonada	Continuo	Crema	Traslúcidas	Gelatinoso
<i>Pseudomonas</i> sp.	12 i	Circular	Chicas	Rugosa	Plana	Continuo	Crema-amarillento	Traslúcidas	Gelatinoso
	12 ii	Circular	Chicas-medianas	Granulosa	Plana	Continuo	Crema	Traslúcidas	Gelatinoso
	12 iii	Circular	Chicas	Rugosa	Umbonada & convexas	Continuo	Crema	Traslúcidas	Gelatinoso
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	13 i	Circular	Medianas	Lisa	Convexa	Continuo	Crema	Opacas-traslúcidas	Viscoso
	13 ii	Irregular	Medianas-grandes	Rugosa	Plana	Continuo	Blancas	Opacas	Gelatinoso
<i>Bacillus</i> sp.	14	Irregular	Grandes	Rugosa	Plana	Ligeramente ondulado	Crema	Opacas	Gelatinoso
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	15 i	Circular-fusiforme	Chicas	Lisa	Convexa	Continuo	Crema-amarillento	Opacas	Viscosa
	15 ii a	Circular	Chicas	Lisa	Plana	Continua	Crema	Traslúcidas	Viscosa
	15 ii b	Irregular	Medianas-grandes	Rugosa	Plana	Lobulado	Blancas	Opacas	Dura
	15 iii	Circular	Medianas	Rugosa	Umbonada	Continuo	Crema	Opacas	Gelatinoso
<i>Rhizobium</i> sp.	16 i	Circular	Chicas-medianas	Lisa	Umbonada	Continuo	Crema	Traslúcidas	Gelatinoso

<i>Klebsiella oxytoca</i>	17 i	Puntiforme	Chicas	Lisa	Plana	Continuo	Crema	Traslúcidas	Viscosa
	17 ii	Circular	Medianas	Lisa	Convexa	Continuo	Crema	Opacas	Viscosa
<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	18 ii a	Circular	Medianas	Lisa	Plana	Ondulado	Blancas	Opacas	Viscoso
	18 ii b	Circular	Chicas	Lisa	Plana	Continuo	Amarillentas	Opacas-traslúcidas	Gelatinoso
<i>Arthrobacter defluvii</i>	19	Irregular	Grandes	Lisa	Plana	Lobulado	Blancas	Opacas	Gelatinoso-duro
<i>Pseudomonas koreensis</i>	21 i	Circular	Chicas	Lisa	Convexa	Continuo	Crema	Traslúcidas	Viscosa
	21 ii a	Circular	Medianas	Lisa	Convexa	Continuo	Crema	Opacas	Viscosa
	21 ii ba	-	-	-	-	-	-	-	-
	21 ii bb	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas sp.</i>	22	Circular	Chicas	Lisa	Umbonada	Continuo	Crema	Traslúcidas	Viscosas
<i>Enterobacter sp.</i>	23 ii	Circular	Chicas	Lisa	Convexa	Continuo	Crema	Opacas	Viscosas
<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	24 i	Circular	Chicas	Granuloso	Convexa	Continuo	Amarillentas	Opacas	Gelatinosas
	24 ii	Circular	Chicas	Lisa	Convexa	Continua	Blancas	Opacas	Viscosa
	24 iii	Circular	Chicas	Granulosa	Convexa	Continua	Crema	Opacas-traslúcidas	Viscosas
	24 iv	Circular	Chicas	Lisa	Convexa	Continuo	Crema	Opacas	Viscosas
	24 v	Circular	Chicas	Lisa	Convexa	Continúa	Amarillentas	Opacas	Gelatinoso
<i>Lelliottia amnigena</i>	25 i	Circular	Chicas	Granulosa	Plana	Continuo	Blancas	Traslúcidas	Gelatinoso

	25 ii	Circular	Chicas	Lisa	Convexa	Continua	Crema	Opacas	Viscosa
<i>Serratia</i> sp.	26 i	Circular	Chicas	Lisa	Convexa	Continuo	Crema	Opacas- traslúcidas	Viscosa
	26 ii	Circular	Chicas	Lisa	Convexa	Continuo	Crema	Opacas- traslúcidas	Viscosa

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelwahed, S., Cherif, H., Bejaoui, B., Saadouli, I., Hajji, T., Ben Halim, N., Ouertani, A., Ouzari, I., Cherif, A., Mnif, W., Mosbah, A., & Masmoudi, A. S. (2023). Microassay validation for bacterial IAA estimation as a new fine-tuned PGPR screening assay. *Main Group Chemistry*, 22(1), 143–154. <https://doi.org/10.3233/MGC-210124>
- Agrawal, R., Verma, A., & Satlewal, A. (2018). Bioprospecting PGPR Microflora by Novel Immunobased Techniques. En Elsevier eBooks (pp. 465-478). <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63987-5.00024-4>
- Aguirre-Garrido, J. F., Montiel-Lugo, D., Hernández-Rodríguez, C., Torres-Cortes, G., Millán, V., Toro, N., Martínez-Abarca, F., & Ramírez-Saad, H. C. (2012). Bacterial community structure in the rhizosphere of three cactus species from semi-arid highlands in central Mexico. *Antonie van Leeuwenhoek*, 101(4), 891–904. <https://doi.org/10.1007/s10482-012-9705-3>
- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 26(1), 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- Ait-Ouakrim, E. H., Chakhchar, A., Modafar, C. E., Douira, A., Amir, S., Ibnsouda-Koraichi, S., Belkadi, B., & Filali-Maltouf, A. (2023). Assessment of Potent Phosphate-Solubilizing Bacteria Isolated from the Olive Tree Rhizosphere Grown on Phosphate Sludge and Their Effect on Common Bean Growth. *Geomicrobiology Journal*, 40(6), 605-617. <https://doi.org/10.1080/01490451.2023.2218839>
- Alori, E. T., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. *Frontiers In Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>
- Al-Fadhal, F. A., Al-Abedy, A. N., & Alkhafije, D. A. (2019). Isolation and molecular identification of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani* isolated from cucumber (*Cucumis sativus* L.) and their control feasibility by *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. *Egyptian Journal Of Biological Pest Control*, 29(1). <https://doi.org/10.1186/s41938-019-0145-5>
- Al-Mughrabi, K. I. (2010). Biological control of *Fusarium* dry rot and other potato tuber diseases using *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter cloacae*. *Biological Control*, 53(3), 280-284. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.01.010>
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J. R., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., & Smith, D. L. (2018). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of

- Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Frontiers In Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>
- Bag, S., Mondal, A., & Banik, A. (2022). Exploring tea (*Camellia sinensis*) microbiome: Insights into the functional characteristics and their impact on tea growth promotion. *Microbiological Research*, 254, 126890. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126890>
- Bakker, P. A. H. M., Pieterse, C. M. J., & Van Loon, L. C. (2017). Induced Systemic Resistance by Fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 97(2), 239-243. <https://doi.org/10.1094/phyto-97-2-0239>
- Banerjee, S., Singh, S., Pandey, S., Bhandari, M. S., Pandey, A., & Giri, K. (2020). Biocontrol potential of *Pseudomonas azotoformans*, *Serratia marcescens* and *Trichoderma virens* against *Fusarium* wilt of *Dalbergia sissoo*. *Forest Pathology*, 50(2). <https://doi.org/10.1111/efp.12581>
- Barin, M., Asadzadeh, F., Hosseini, M., Hammer, E. C., Vetukuri, R. R., & Vahedi, R. (2022). Optimization of Biofertilizer Formulation for Phosphorus Solubilizing by *Pseudomonas fluorescens* Ur21 via Response Surface Methodology. *Processes*, 10(4), 650. <https://doi.org/10.3390/pr10040650>
- Belimov, A., Dodd, I., Safronova, V., Hontzeas, N., & Davies, W. (2007). *Pseudomonas brassicacearum* strain Am3 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase can show both pathogenic and growth-promoting properties in its interaction with tomato. *Journal Of Experimental Botany*, 58(6), 1485-1495. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm010>
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and molecular biology*, 35(4 (suppl)), 1044–1051. <https://doi.org/10.1590/s1415-47572012000600020>
- Benmrid, B., Ghoulam, C., Ammar, I., Nkir, D., Saidi, R., Staropoli, A., Iacomino, G., ELhajjami, E., Cheto, S., Geistlinger, J., Idbella, M., & Bargaz, A. (2024). Drought-tolerant rhizobacteria with predicted functional traits enhanced wheat growth and P uptake under moderate drought and low P-availability. *Microbiological Research*, 285, 127795. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2024.127795>
- Bejaoui, B., Cherif, H., Mahjoubi, M., Amara, Y., Souissi, Y., Riahi, L., Hidri, Y., Riva, V., Mosbah, A., Neifar, M., Borin, S., & Cherif, A. (2024). Biofertilizer development for wheat growth improvement under drought stress and treated wastewater irrigation. *Euro-Mediterranean Journal For Environmental Integration*. <https://doi.org/10.1007/s41207-024-00579-z>

- Bhattacharyya, P.N., Jha, D.K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol* 28, 1327–1350 (2012). <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>
- Brito, L. F., López, M. G., Straube, L., Passaglia, L. M. P., & Wendisch, V. F. (2020). Inorganic Phosphate Solubilization by Rhizosphere Bacterium *Paenibacillus sonchi*: Gene Expression and Physiological Functions. *Frontiers In Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.588605>
- Bódalo, A., Borrego, R., Garrido, C., Bolivar-Anillo, H. J., Cantoral, J. M., Vela-Delgado, M. D., González-Rodríguez, V. E., & Carbú, M. (2023). In Vitro Studies of Endophytic Bacteria Isolated from Ginger (*Zingiber officinale*) as Potential Plant-Growth-Promoting and Biocontrol Agents against *Botrytis cinerea* and *Colletotrichum acutatum*. *Plants*, 12(23), 4032. <https://doi.org/10.3390/plants12234032>
- Carpena, M., Cassani, L., Gomez-Zavaglia, A., Garcia-Perez, P., Seyyedi-Mansour, S., Cao, H., Simal-Gandara, J., & Prieto, M. (2023). Application of fermentation for the valorization of residues from Cactaceae family. *Food Chemistry*, 410, 135369. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135369>
- Cervantes, M. (2002) Plantas de importancia económica en las zonas áridas y semiáridas de México. *Temas selectos de geografía de México*.
- Chávez-Ambriz, L. A., Hernández-Morales, A., Cabrera-Luna, J. A., Luna-Martínez, L., & Pacheco-Aguilar, J. R. (2016). Aislados de *Bacillus* provenientes de la rizósfera de cactus incrementan la germinación y la floración en *Mammillaria* spp. (Cactaceae). *Revista Argentina de Microbiología*, 48(4), 333–341.
- Chen, B., Luo, S., Wu, Y., Ye, J., Wang, Q., Xu, X., Pan, F., Khan, K. Y., Feng, Y., & Yang, X. (2017). The Effects of the Endophytic Bacterium *Pseudomonas fluorescens* Sasm05 and IAA on the Plant Growth and Cadmium Uptake of *Sedum alfredii* Hance. *Frontiers In Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02538>
- Cochard, B., Giroud, B., Crovadore, J., Chablais, R., Arminjon, L., & Lefort, F. (2022). Endophytic PGPR from Tomato Roots: Isolation, In Vitro Characterization and In Vivo Evaluation of Treated Tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.). *Microorganisms*, 10(4), 765. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040765>
- CONAZA (2019). Disponible en línea en: <https://www.gob.mx/conaza/prensa/priorizaran-atencion-a-comunidades-de-extrema-marginacion-de-las-zonas-aridas-y-en-proceso-de-desertificacion-198461> (consultado el 16 de agosto de 2023).
- Crovadore, J., Cochard, B., Chablais, R., Haenzi, M., Raffini, F., & Lefort, F. (2020). Draft Genome Sequences of *Pseudomonas koreensis* Strain UASWS1668, *Bacillus*

megaterium Strain UASWS1667, and Paenibacillus sp. Strain UASWS1643, Considered Potential Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Microbiology Resource Announcements, 9(33). <https://doi.org/10.1128/mra.00768-20>

David, B. V., Chandrasehar, G., & Selvam, P. N. (2018). *Pseudomonas fluorescens*: A Plant-Growth-Promoting Rhizobacterium (PGPR) With Potential Role in Biocontrol of Pests of Crops. En Elsevier eBooks (pp. 221-243). <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63987-5.00010-4>

de la Torre-Hernández ME, Salinas-Virgen LI, Aguirre-Garrido JF, Fernández- González AJ, Martínez-Abarca F, Montiel-Lugo D and Ramírez-Saad HC (2020) Composition, Structure, and PGPR Traits of the Rhizospheric Bacterial Communities Associated With Wild and Cultivated *Echinocactus platyacanthus* and *Neobuxbaumia polylopha*. Front. Microbiol. 11:1424. doi: 10.3389/fmicb.2020.01424

de-Bashan, L. E., Holguin, G., Glick, B. R., Bashan, Y., Ferrera-Cerrato, R., and Alarcón, R. (2007). “Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales,” in Microbiología Agrícola: Hongos, Bacterias, Micro y Macrofauna, Control Biológico, Planta-Microorganismo. Editorial Trillas, Ciudad de México, México. pp. 170-224

Dhole, A., Shelat, H. N., Patel, H. K., & Jhala, Y. K. (2023). Evaluation of the Co-inoculation Effect of Rhizobium and Plant Growth Promoting Non-rhizobial Endophytes on *Vigna radiata*. Current Microbiology, 80(5). <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03266-4>

Drancourt, M., Berger, P., & Raoult, D. (2004). Systematic 16S rRNA gene sequencing of atypical clinical isolates identified 27 new bacterial species associated with humans. Journal of clinical microbiology, 42(5), 2197–2202. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2197-2202.2004>

Dweipayan Goswami, Janki N. Thakker y Pinakin C. Dhandhukia | Manuel Tejada Moral (Editor revisor) (2016) Retratando la mecánica de las rizobacterias del crecimiento vegetal (PGPR): una revisión, Cogent Food & Agriculture, 2:1, DOI: 10.1080/23311932.2015.1127500

Esitken A, Karlidag H, Ercisli S, Turan M, Sahin F (2003) The effect of spraying a growth promoting bacterium on the yield, growth and nutrient element composition of leaves of apricot (*Prunus armeniaca* L. cv. Hacıhaliloglu). Aust J Agric Res 54(4):377–380

Faskhutdinova, E., Fotina, N., Neverova, O., Golubtsova, Y., Mudgal, G., Asyakina, L., & Aksenova, L. (2024). Extremophilic bacteria as biofertilizer for agricultural wheat.

Foods And Raw Materials, 12(2), 348-360. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2024-2-613>

- Ghosh, P. K., Saha, P., Mayilraj, S., & Maiti, T. K. (2013). Role of IAA metabolizing enzymes on production of IAA in root, nodule of *Cajanus cajan* and its PGP *Rhizobium* sp. *Biocatalysis And Agricultural Biotechnology*, 2(3), 234-239. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.04.002>
- Ghosh, P. K., Sen, S. K., & Maiti, T. K. (2015). Production and metabolism of IAA by *Enterobacter* spp. (Gammaproteobacteria) isolated from root nodules of a legume *Abrus precatorius* L. *Biocatalysis And Agricultural Biotechnology*, 4(3), 296-303. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.04.002>
- Goettsch, B., Durán, A. P., & Gaston, K. J. (2018). Global Gap analysis of cactus species and priority sites for their conservation. *Conservation Biology*, 33(2), 369-376. <https://doi.org/10.1111/cobi.13196>
- Goettsch, B., Hilton-Taylor, C., Cruz-Piñón, G. et al. High proportion of cactus species threatened with extinction. *Nature Plants* 1, 15142 (2015). <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.142>
- Guzmán Ulises Arias S. & Dávila Aranda Patricia D. (2003). Catálogo de cactáceas mexicanas (1a ed.). UNAM: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Retrieved August 15, 2023 from <http://books.google.com/books?id=Hs9gAAAAMAAJ>.
- Habibi, S., Djedidi, S., Ohkama-Ohtsu, N., Sarhadi, W. A., Kojima, K., Rallos, R. V., Ramirez, M. D. A., Yamaya, H., Sekimoto, H., & Yokoyama, T. (2019). Isolation and Screening of Indigenous Plant Growth-promoting Rhizobacteria from Different Rice Cultivars in Afghanistan Soils. *Microbes And Environments*, 34(4), 347-355. <https://doi.org/10.1264/jsme2.me18168>
- Hamane, S., Yemlahi, A. E., Zerrouk, M. H., Galiou, O. E., Laglaoui, A., Bakkali, M., & Arakrak, A. (2023). Promoting the growth of *Sulla flexuosa* L. by endophytic root nodule bacteria authors and affiliations. *World Journal Of Microbiology And Biotechnology*, 39(9). <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03699-w>
- Hernández-Magaña, Rafael & Hernández-Oria, José & Chávez, Ruth. (2012). Datos para la conservación florística en función de la amplitud geográfica de las especies en el Semidesierto Queretano, México. *Acta botánica mexicana*. 105-140. 10.21829/abm99.2012.22.
- Imran, M., Mpovo, C. L., Khan, M. A., Shaffique, S., Ninson, D., Bilal, S., Khan, M., Kwon, E., Kang, S., Yun, B., & Lee, I. (2023). Synergistic Effect of Melatonin and *Lysinibacillus fusiformis* L. (PLT16) to Mitigate Drought Stress via Regulation of

Hormonal, Antioxidants System, and Physio-Molecular Responses in Soybean Plants. *International Journal Of Molecular Sciences*, 24(10), 8489. <https://doi.org/10.3390/ijms24108489>

IUCN (International Union for Conservation of Nature). 2022. The IUCN red list of threatened species. Version 2022-2. IUCN, Gland, Switzerland. Available from www.iucnredlist.org. (consultado 6 de septiembre 2023).

Jian, Q., Zhang, T., Wang, Y., Guan, L., Li, L., Wu, L., Chen, S., He, Y., Huang, H., Tian, S., Tang, H., & Lu, L. (2024). Biocontrol potential of plant growth-promoting rhizobacteria against plant disease and insect pest. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 117(1). <https://doi.org/10.1007/s10482-024-01975-9>

Jindo, K., Audette, Y., Olivares, F.L. et al. Biotic and abiotic effects of soil organic matter on the phytoavailable phosphorus in soils: a review. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 10, 29 (2023). <https://doi.org/10.1186/s40538-023-00401-y>

Jing, D., Liu, B., Ma, H., Liu, F., Liu, X., & Ren, L. (2023). Effects of Inoculation with Different Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on the Eco-Physiological and Stomatal Characteristics of Walnut Seedlings under Drought Stress. *Agronomy*, 13(6), 1486. <https://doi.org/10.3390/agronomy13061486>

Jing, Y., He, Z., & Yang, X. (2007). Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Journal Of Zhejiang University. Science B*, 8(3), 192-207. <https://doi.org/10.1631/jzus.2007.b0192>

Jinka, J. (2020). Morphological and biological characterization of *Lysinibacillus fusiformis* L52 isolated from dairy industry wastes. *International Journal of Scientific & Technology Research*, Volume 9, Issue 01.

Khan, AA., Jilani, G., Akhtar, MS., Saqlan, SM., Rasheed, M. (2009). Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production. *J. AGRIC. BIOL. SCI.* 1(1):48-58.

Khoso, M. A., Wagan, S., Álam, I., Hussain, A., Gao, X., Saha, S., Poudel, T. R., Manghwar, H., & Liu, F. (2024). Impact of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on plant nutrition and root characteristics: Current perspective. *Plant Stress*, 11, 100341. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100341>

Kodama, Y., Yamamoto, H., Amano, N., & Amachi, T. (1992). Reclassification of Two Strains of *Arthrobacter oxydans* and Proposal of *Arthrobacter nicotinovorans* sp. nov. *International Journal Of Systematic Bacteriology*, 42(2), 234-239. <https://doi.org/10.1099/00207713-42-2-234>

- López-Barrera F, Martínez-Garza C, Ceccon E. Ecología de la restauración en México: estado actual y perspectivas. *Revista Mexicana De Biodiversidad*. 2017;88:97-112. doi: 10.1016/j.rmb.2017.10.001
- Ludueña, L. M., Anzuay, M. S., Angelini, J. G., Barros, G., Luna, M. F., Del Pilar Monge, M., Fabra, A., & Taurian, T. (2016). Role of bacterial pyrroloquinoline quinone in phosphate solubilizing ability and in plant growth promotion on strain *Serratia* sp. S119. *Symbiosis*, 72(1), 31-43. <https://doi.org/10.1007/s13199-016-0434-7>
- Mano, Y., & Nemoto, K. (2012). The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany*, 63(8), 2853–2872. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers091>
- Mansoor, F. A. R. R. U. K. H., Sultana, V., & Ehteshamul-Haque, S. (2007). Enhancement of biocontrol potential of *Pseudomonas aeruginosa* and *Paecilomyces lilacinus* against root rot of mungbean by a medicinal plant *Launaea nudicaulis* L. *Pakistan journal of Botany*, 39(6), 2113-2119.
- Margulies JD, Moorman FR, Goettsch B, Axmacher JC, Hinsley A. Prevalence and perspectives of illegal trade in cacti and succulent plants in the collector community. *Conservation Biology*. 2023;37(3). doi:10.1111/cobi.14030
- Martínez, O. A., Encina, C., Tomckowiack, C., Droppelmann, F., Jara, R., Maldonado, C., Muñoz, O., García-Fraile, P., & Rivas, R. (2018). *Serratia* strains isolated from the rhizosphere of raulí (*Nothofagus alpina*) in volcanic soils harbour PGPR mechanisms and promote raulí plantlet growth. *Journal Of Soil Science And Plant Nutrition*, ahead, 0. <https://doi.org/10.4067/s0718-95162018005002302>
- M. Martínez-Garnica, F- Nieto Muñoz, S. Hernández-Delgado y N. Mayek-Pérez (2014). Pathogenic and genetic characterization of Mexican isolates of *Fusarium solani* f. sp. *Phaseoli* (Burk.) Snyder. & Hans. Centro de Biotecnología Genómica.
- McCully ME (2001) Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. *Aust J Plant Physiol* 28:983–990
- Miguel-Talonia C, Téllez-Valdés O, Murguía-Romero M. Las cactáceas del valle de Tehuacán-Cuicatlán, México: estimación de la calidad del muestreo. *Revista Mexicana De Biodiversidad*. 2014;85(2):436-444. doi:10.7550/rmb.31390
- Muresu, R., Polone, E., Sulas, L., Baldan, B., Tondello, A., Delogu, G., Cappuccinelli, P. A., Alberghini, S., Benhizia, Y., Benhizia, H., Benguedouar, A., Mori, B., Calamassi, R., Dazzo, F. B., & Squartini, A. (2008). Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. *FEMS Microbiology Ecology/FEMS Microbiology, Ecology*, 63(3), 383-400. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00424.x>

- Nautiyal, C. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1), 265-270. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>
- Navarro Carvajal, MC; Castillo Campohermoso, AD. (2007) Estado actual de la población de *Mammillaria hamata* en Los Ángeles Tetela, Puebla, México. *Cactáceas y succulentas mexicanas*, 68-78.
- Nelkner, J., Tejerizo, G. T., Hassa, J., Lin, T. W., Witte, J., Verwaaijen, B., Winkler, A., Bunk, B., Spröer, C., Overmann, J., Grosch, R., Pühler, A., & Schlüter, A. (2019). Genetic Potential of the Biocontrol Agent *Pseudomonas brassicacearum* (Formerly *P. trivialis*) 3Re2-7 Unraveled by Genome Sequencing and Mining, Comparative Genomics and Transcriptomics. *Genes*, 10(8), 601. <https://doi.org/10.3390/genes10080601>
- Park, J. H., Bolan, N., Megharaj, M., & Naidu, R. (2011). Concomitant rock phosphate dissolution and lead immobilization by phosphate solubilizing bacteria (*Enterobacter* sp.). *Journal Of Environmental Management*, 92(4), 1115-1120. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.11.031>
- Park, M., Kim, C., Yang, J., Lee, H., Shin, W., Kim, S., & Sa, T. (2005). Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiological research*, 160(2), 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.10.003>
- Patel, K., Kapadia, C., Patel, N., Patel, D., Parmar, P. R., Datta, R., Alharbi, S. A., & Ansari, M. J. (2024). Effect of supplementing Sulphur-oxidizing bacteria with different Sulphur sources on the growth and development of chickpea (*Cicer arietinum*). *Plant Stress*, 12, 100433. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2024.100433>
- Petrović, M., Janakiev, T., Grbić, M. L., Unković, N., Stević, T., Vukićević, S., & Dimkić, I. (2023). Insights into Endophytic and Rhizospheric Bacteria of Five Sugar Beet Hybrids in Terms of Their Diversity, Plant-Growth Promoting, and Biocontrol Properties. *Microbial Ecology*, 87(1). <https://doi.org/10.1007/s00248-023-02329-0>
- Pillet, M., Goettsch, B., Merow, C. et al. Elevated extinction risk of cacti under climate change. *Nat. Plants* 8, 366–372 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41477-022-01130-0>
- Podstawka, A. (s. f.). *Paenibacillus catalpae* D75 | Type strain | DSM 24714, CGMCC 1.10784 | BacDiveID:23182. © Adam Podstawka. <https://bacdive.dsmz.de/strain/23182>

- Prasad, R., Gill, S. S., Tuteja, N. (2018). New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. Crop Improvement Through Microbial Biotechnology. En Elsevier eBooks. <https://doi.org/10.1016/C2016-0-04330-9>
- Qiao, R., Xu, M., Jiang, J., Song, Z., Wang, M., Yang, L., Guo, H., & Mao, Z. (2024). Plant growth promotion and biocontrol properties of a synthetic community in the control of apple disease. BMC Plant Biology, 24(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05253-8>
- Rafique, M., Sultan, T., Ortas, I., & Chaudhary, H. J. (2017). Enhancement of maize plant growth with inoculation of phosphate-solubilizing bacteria and biochar amendment in soil. Soil Science & Plant Nutrition, 63(5), 460-469. <https://doi.org/10.1080/00380768.2017.1373599>
- Ramlawi, S., Chiu, J. O., Cloutier, A., & Avis, T. J. (2021). Suppression of Fusarium dry rot of potato using beneficial bacterial treatments. Journal Of Plant Pathology, 103(1), 269-281. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00731-y>
- Rangel-Munoz, E. J., Cruz-Vazquez, C., Medina-Esparza, L., Vitela-Mendoza, I., & Valdivia-Flores, A. G. (2023). Presence of the toxigenic fungi Aspergillus spp. and Fusarium spp. in Musca domestica L. (Diptera: Muscidae) collected from dairy farms. Journal of Dairy Science, 106(8), 5468–5473. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-23053>
- Rostami, M., Karegar, A., & Taghavi, S. M. (2021). Biocontrol potential of bacterial isolates from vermicompost and earthworm against the root-knot nematode Meloidogyne javanica infecting tomato plants. Egyptian Journal Of Biological Pest Control, 31(1). <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00383-9>
- Ruiz-Nieto, J. E., Arias-Figueroa, D. M., Mireles-Arriaga, A. I., & Hernández-Ruíz, J. (2024). IN VITRO INHIBITION OF Fusarium spp. ISOLATED FROM BEAN CROP USING Argemone ochroleuca EXTRACT. BIOAGRO, 36(2), 245–250. <https://doi.org/10.51372/bioagro362.12>
- Salinas Virgen, L. (2019) Identificación y caracterización de la actividad PGPR de bacterias rizosféricas y endófitas aisladas de Echinocactus platyacanthus (biznaga dulce) creciendo en condiciones silvestres y de invernadero en el semidesierto queretano. Tesis para Maestría en Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.
- Santos, A. M., Soares, A., Luz, J., Cordeiro, C., Silva, M. S., Dias, T., Melo, J., Cruz, C., & Carvalho, L. (2024). Microbial Interactions as a Sustainable Tool for Enhancing PGPR Antagonism against Phytopathogenic Fungi. Sustainability, 16(5), 2006. <https://doi.org/10.3390/su16052006>

- Sari IP., Simarani K. (2019). Comparative static and shaking culture of metabolite derived from methyl red degradation by *Lysinibacillus fusiformis* strain W1B6. *R. Soc.open sci.* 6: 190152.<http://dx.doi.org/10.1098/rsos.190152>
- Schafer, E. D. (2023). *Cacti and succulents*. Salem Press Encyclopedia of Science.
- Semarnat. Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Compendio de Estadísticas Ambientales. Indicadores Clave y de Desempeño Ambiental. Edición 2012. México. 2013.
- Semarnat. Informe de la Situación del Medio Ambiente en México, edición 2018. Semarnat. México. 2019
- Shokri, D., & Emtiazi, G. (2010). Indole-3-Acetic Acid (IAA) Production in Symbiotic and Non-Symbiotic Nitrogen-Fixing Bacteria and its Optimization by Taguchi Design. *Current Microbiology*, 61(3), 217-225. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9600-y>
- Somers, E., Vanderleyden, J., & Srinivasan, M. (2004). Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Critical reviews in microbiology*, 30(4), 205-240.
- Srivastava, A. K., Saxena, P., Sharma, A., Srivastava, R., Jamali, H., Bharati, A. P., Yadav, J., Srivastava, A. K., Kumar, M., Chakdar, H., Kashyap, P. L., & Saxena, A. K. (2019). Draft genome sequence of a cold-adapted phosphorous-solubilizing *Pseudomonas koreensis* P2 isolated from Sela Lake, India. *3 Biotech*, 9(7). <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1784-7>
- Sun, H., Zhang, J., Liu, W., E, W., Wang, X., Li, H., Cui, Y., Zhao, D., Liu, K., Du, B., Ding, Y., & Wang, C. (2022). Identification and combinatorial engineering of indole-3-acetic acid synthetic pathways in *Paenibacillus polymyxa*. *Biotechnology For Biofuels And Bioproducts*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-022-02181-3>
- Sun, W., Shahrajabian, M. H., & Soleymani, A. (2024). The Roles of Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR)-Based Biostimulants for Agricultural Production Systems. *Plants*, 13(5), 613. <https://doi.org/10.3390/plants13050613>
- Suryatmana, P., Setiawati, M. R., Herdiyantoro, D., Fitriatin, B. N., & Kamaluddin, N. N. (2022). Characterization and Potential of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Isolates Capacity Correlating with Their Hydrocarbon Biodegradation Capability. *Agrivita: Journal of Agricultural Science*, 44(3), 559–574. <https://doi.uam.elogim.com/10.17503/agrivita.v4i10.3773>
- Tabassum, B., Khan, A., Tariq, M., Ramzan, M., Khan, M. S. I., Shahid, N., & Aaliya, K. (2017). Bottlenecks in commercialisation and future prospects of PGPR. *Applied Soil Ecology*, 121, 102-117. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.09.030>

- Tang, A., Haruna, A. O., Majid, N. M. A., & Jalloh, M. B. (2020). Potential PGPR Properties of Cellulolytic, Nitrogen-Fixing, Phosphate-Solubilizing Bacteria in Rehabilitated Tropical Forest Soil. *Microorganisms*, 8(3), 442. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030442>
- Tang, Z., Zhu, J., Song, Q. et al. Identification and pathogenicity of *Fusarium* spp. associated with tea wilt in Zhejiang Province, China. *BMC Microbiol* 24, 38 (2024). <https://doi.org/10.1186/s12866-023-03174-4>
- Tarana A, Bhavishya AD, Lekhana SM, et al. Extraction and Profiling of Antifungal Compounds Produced by *Azotobacter* Species. *J Pure Appl Microbiol*. 2024;18(1):269-279. doi: 10.22207/JPAM.18.1.11
- Tatung, M., & Deb, C. R. (2024). Screening and characterization of heavy metal tolerant rhizobacteria from wild *Musa* rhizosphere from coal mining area of Changki, Nagaland, India and assessment of their growth promoting potential under Cd/Cu contaminated conditions. *South African Journal Of Botany*, 165, 217-227. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.12.039>
- Thion, C., Cébron, A., Beguiristain, T., & Leyval, C. (2012). PAH biotransformation and sorption by *Fusarium solani* and *Arthrobacter oxydans* isolated from a polluted soil in axenic cultures and mixed co-cultures. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 68, 28-35. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.10.012>
- Ueda, J., Saniewski, M., Miyamoto, K. (2016). Auxin, One Major Plant Hormone, in Soil. In: Szajdak, L. (eds) *Bioactive Compounds in Agricultural Soils*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43107-9_8
- Wagi, S., & Ahmed, A. (2019). *Bacillus* spp.: potent microfactories of bacterial IAA. *PeerJ*, 7, e7258. <https://doi.org/10.7717/peerj.7258>
- Wallace, R., Gibson, A. (2002) *Evolution and Systematics*. en P. S. Nobel (Ed.), *Cacti: Biology and Uses*. Editorial University of California Press.
- Wang, M., Li, J., Li, T., Kang, S., Jiang, S., Huang, J., & Tang, H. (2024). Light Supplementation in Pitaya Orchards Induces Pitaya Flowering in Winter by Promoting Phytohormone Biosynthesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(9), 4794. <https://doi.org/10.3390/ijms25094794>
- Wang, G., Yao, Y., Xu, H., Xiang, K., Zhang, M., Zhang, J., Zhang, R., & Chen, X. (2024). Transcription combined metabolic analysis reveals the mechanism of potassium phosphate enhances resistance to walnut anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). *Postharvest Biology And Technology*, 218, 113165. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2024.113165>

- Wulandari, D., Baskoro, K., Mahmuudah, Y., Kusmiyati, F., Pratiwi, A. R., & Budiharjo, A. (2024). Bioprospecting of Rhizobia as Plant Growth Promoting Rhizobacteria Potential from Root Nodules of Groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Trends In Sciences*, 21(7), 7651. <https://doi.org/10.48048/tis.2024.7651>
- Yang, W. (2019). Components of rhizospheric bacterial communities of barley and their potential for plant growth promotion and biocontrol of Fusarium wilt of watermelon. *Brazilian Journal Of Microbiology*, 50(3), 749-757. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00089-z>
- Zhang, J., Wang, Z., Yu, H., & Ma, Y. (2013). *Paenibacillus catalpae* sp. nov., isolated from the rhizosphere soil of *Catalpa speciosa*. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 63(Pt_5), 1776-1781. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.040659-0>