



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD
BACTERIANA EN LA RIZÓSFERA DE MEZQUITE
AMARGO (*Prosopis articulata* S. Watson) POR LA
INOCULACIÓN CON LA BACTERIA PROMOTORA DEL
CRECIMIENTO EN PLANTAS (PGPB) *Bacillus pumilus*
ES4

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Ecología de Zonas Áridas)

Presenta

Maria Cristina Galaviz Bustamante

La Paz, Baja California Sur, Febrero de 2015

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:00 horas del día 02 del Mes de febrero del 2015, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Cambios en la estructura de la comunidad bacteriana en la rizósfera de mezquite amargo (*Prosopis articulata* S. Watson) por la inoculación con la bacteria promotora del crecimiento en plantas (PGPB) *Bacillus pumilus* ES4"

Presentada por el alumno:

María Cristina Galaviz Bustamante

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Ecología de Zonas Áridas**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA



Dr. Yoav Bashan

DIRECTOR DE TESIS



Dra. Luz Gonzalez de Bashan

CO-TUTOR



Dra. Ann Hirsch

CO-TUTOR



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Comité tutorial

Dr. Yoav Bashan

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste; S.C.

Director de Tesis

Dra. Luz Estela González de Bashan

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste; S.C.

Co-Tutora

Dra. Ann Hirsch

University of California, Los Ángeles

Co-Tutora

Comité revisor de tesis

Dr. Yoav Bashan

Dra. Luz Estela González de Bashan

Dra. Ann Hirsch

Jurado de examen de grado

Dr. Yoav Bashan

Dra. Luz Estela González de Bashan

Dra. Ann Hirsch

Suplente

Dr. Macario Bacilio Jiménez

RESUMEN

Los desiertos cálidos son los ecosistemas más frágiles del planeta tierra, en los que cualquier pérdida o daño a su superficie vegetal contribuye a la degradación del suelo. Una alternativa para revertir los procesos de degradación del suelo es desarrollar programas de restauración de suelos degradados usando plantas nativas y Bacterias Promotoras del Crecimiento en Plantas (PGPB por sus siglas en inglés). Evaluaciones de la interacción planta-microorganismos se han realizado a lo largo de los años y han demostrado ser una herramienta importante para entender cómo las PGPB benefician a plantas nativas del desierto. Sin embargo, en la actualidad, no hay información sobre el efecto que se tiene por la inoculación de estas plantas sobre la comunidad nativa de bacterias de la rizósfera de plantas, dando como resultado un mejor crecimiento de las plantas y el desarrollo de la comunidad bacteriana asociada a la rizósfera. Para lograr elucidar esto se utilizaron técnicas moleculares (Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) - Electroforesis de Geles con Gradiente Desnaturalizante(DGGE), Pirosecuenciación 454 e Hibridación Fluorescente *in situ*(FISH)), para conocer como la inoculación de la rizósfera de mezquite (*Prosopis articulata*), con *Bacillus pumilus* ES4 (bacteria endófito del cardón gigante (*Pachycerus pringlei*)) modifica la estructura de la comunidad bacteriana. Se encontró mediante los análisis de DGGE, que la comunidad nativa si cambia su estructura, debido a la inoculación de *B. pumilus* ES4, lo cual coincide con lo encontrado en los análisis de Pirosecuenciación del 16S rRNA, así mismo se logró ubicar la colonización del inoculante en la raíces de mezquite al utilizar las técnicas de Histología y FISH.

Palabras clave: Rizósfera, PGPB, PCR-DGGE, Pirosecuenciación 454 y FISH.

Abstract

Hot deserts are the most fragile ecosystems of the earth, where any loss or damage to your plant surface contributes to soil degradation. An alternative to reverse soil degradation processes is to develop programs to restore degraded soils using native plants and Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB). Evaluations of plant-microorganism interaction have been done over the years and have proven to be important tool for understanding how PGPB benefit native desert plants. However, at present, no information on the effect it has of the inoculation of these plants on native community of bacteria in the rhizosphere of plants, resulting in improved plant growth and development of the bacterial community associated with the rhizosphere. To achieve elucidate this, molecular techniques were used (Polymerase chain reaction (PCR) - Electrophoresis Gels with Denaturing Gradient (DGGE), Pyrosequencing 454 and Fluorescent in situ Hybridization (FISH)), to meet the objective of this work. The goal was to see how the rhizosphere inoculation mesquite (*Prosopis articulata*) with *Bacillus pumilus* ES4 (endophytic bacteria giant cactus (*Pachycerus pringlei*)) modified the structure of the bacterial community. It was found by the analysis of DGGE, the native community by changed its structure, due to the inoculation of *B. pumilus* ES4, which coincides with the findings in the analysis of pyrosequencing of 16S rRNA, also was able to locate the colonization of inoculant in mesquite roots using Histology and FISH techniques.

Key words: Rhizosphere, PGPB, PCR-DGGE, Pyrosequencing 454 and FISH.

DEDICATORIA

A mi Mamá Guadalupe Bustamante, por ser la mujer que eres siempre, por siempre apoyarme en todas mis decisiones y estar siempre a mi lado, aun en la distancia, Te amo mami!

A mi Papá Germán Galaviz por tu apoyo y estar al tanto en mi camino lejos de casa, Te quiero Papi!

A mi hermano Germán Galaviz por ser mi gordito y siempre demostrarme tu amor, te quiero y te extraño muchísimo todos los días, eres un gran ejemplo de ser humano y mi orgullo, sigue adelante hermano!

A mi hermana Diana Galaviz, por ser mi compañera de juegos desde pequeñas por escucharme y ayudarme cuando lo necesite, por darme una sobrina tan hermosa y ocurrenente, las quiero mucho a las dos!

A mi compañero de vida, Salvador Reyes, gracias por apoyarme en todo momento por ser mi mano derecha cuando lo necesité, por tu amor incondicional y el maravilloso ser humano que me demuestras ser cada día, Te amo muchísimo mi changui!

A Raúl Balam Martínez Pérez amigo, gracias a ti llegue a esta hermosa ciudad y al CIB, por todo tu apoyo siempre, te quiero mucho amigo!

Go to the ends of the earth for you, to make you feel my Love <3

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada:

- Beca No.364014 Para estudios de posgrado nivel maestría (Septiembre 2012-Septiembre 2014)

Al posgrado de CIBNOR por la extensión de beca otorgada después de concluida la beca CONACyT.

Al proyecto UC Mexus 104 C “En busca de las bacterias que viven en la rizósfera de plantas nativas del Desierto de Sonora, con capacidad para restaurar la fertilidad del suelo en tierras degradadas de Baja California” por la financiación de este trabajo.

Al Centro y a los técnicos de los Laboratorios donde desarrolle mi tesis:

- Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
- Laboratorio de Microbiología Ambiental
- Dirección de estudios de posgrado y a la directora Dra. Elisa Serviere.
- Laboratorio de Histología, a la Dra. Carmen Rodríguez y la técnico Eulalia Meza.
- Laboratorio de Genética Molecular, a la técnico Delia Rojas.
- Laboratorio de Biotecnología Vegetal, al técnico Margarito Rodríguez.
- Laboratorio de Ecología Microbiana y Molecular, al técnico Ángel Carrillo.
- Laboratorio de Computo a Horacio Sandoval.

Agradezco enormemente al Doctor Yoav Bashan y a la Doctora Luz de-Bashan por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, por 4 años. Por ser la guía en este trabajo, por ser pacientes y atender cualquier necesidad que se presentase. Y sobre todo por ayudarme a descubrir lo maravilloso que es la ciencia y hasta donde se puede llegar con dedicación y mucho esfuerzo. A la Bashan

Foundation por los aguinaldos otorgados a todos los estudiantes del grupo y por toda la fuente de conocimiento libre que está disponible.

Al grupo de Microbiología Ambiental, al M. en C. Manuel Moreno por todo su apoyo durante mi tiempo en el grupo incluso antes de entrar a la maestría y en los análisis estadísticos de este trabajo, al M. en C. Juan Pablo Hernández por sus consejos y ayuda en técnicas del laboratorio y por siempre ser tan servicial. A la Dra. Blanca Romero López por ser mi mentora en un principio y siempre tener la amabilidad y paciencia para auxiliarme en mis dudas y metidas de pata en el lab, a ustedes muchas gracias.

Agradezco muchísimo a mi co-tutora la Dra. Ann Hirsch por su disposición en ser parte de mi comité y darme sus valiosos comentarios en la realización de mi trabajo de tesis, una gran persona; también quisiera agradecer a la Dra. Maskit por su ayuda en la técnica de pirosecuenciación y análisis de los datos.

A toda mi familia porque a pesar de estar lejos siempre me reciben con una sonrisa en mis regresos a casa, los quiero muchísimo a todos.

Al hombre que me inspira cada día a superarme y ser una mejor persona, por ser mi cómplice y mi compañero en buenos y malos momentos, por regalarme una sonrisa y un abrazo cuando los necesito, por ser mi familia y estar a mi lado en todo este remolino que ha sido la maestría, por tu apoyo en el invernadero y laboratorio, con tu ayuda todo fue más placentero, por eso y mucho más Te amo Salvador Reyes <3!

A Blanquita, por ser ese invaluable ser humano y un ejemplo a seguir para mí, muchas gracias por todas las incontables platicas, risas y demás que compartimos estos 4 años, en los cuales me has enseñado muchísimo no solo en el laboratorio sino también para la vida, también agradezco tu paciencia conmigo y tu cariño, te quiero mucho blanqui.

A mis compañeros de laboratorio: Edgar, Emmanuel, Edisa, Luis, Oskar, Norma Lagunas y a los visitantes de Colombia Luisa, Jairo.

A mis amigos Angélica, Marcelo, Peter, José ángel, Edisa, Cris, Tomas, Victor, Pipina, Quina, Luisito, Liz, Lili, Eli, Hector, Raziel, Cintya y todos los demás de la generación por todos los momentos, fiestas, clases y demás que hemos compartido, mucho éxito para todos!

A mi mejor amiga Alejandra Domínguez porque a pesar de la distancia, siempre estás ahí para escucharme o darme un buen consejo, sabes que eres parte de mi corazón, también gracias por darme una nueva sobrina la hermosa Anette. Te quiero muchísimo amiga hermosa!

A Angélica Sarmiento, por ser tan linda conmigo siempre, aunque me maltrates a veces sé que me quieres muchísimo y yo también, estoy súper feliz de que nuestros caminos se encontraran aquí en la maestría espero nuestra amistad dure por muchos años más, Te quiero mucho!

A la música que me acompaño, relajo e inspiro durante toda la escritura de tesis, Glee, Reincidentes, El Ultimo ke zierre, El noi del sucre, 31 minutos, porque me enseñaron con sus canciones que yo puedo ser quien quiera ser, no importa lo que cueste con esfuerzo, dedicación y disciplina siempre se llega a la meta.

Agradezco también a todos los que permanecen en la lucha en contra de todas las injusticias que atacan a este hermoso país, por I@s que luchan por la paz y el castigo a la impunidad. ¡LA LUCHA SIGUE!

Mi segundo hogar la hermosa Ciudad de La Paz, sus hermosas playas y atardeceres que regala sin cesar, desgraciadamente está dejando de ser tan tranquila como cuando llegue aquí, espero las cosas mejoren por el bien de todos sus habitantes.

CONTENIDO

RESUMEN	i
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Bacterias promotoras de crecimiento en plantas (PGPB).....	3
2.2 El género <i>Bacillus</i>	4
2.2.1 <i>Bacillus pumilus</i> ES4.....	4
2.3 Mezquite (<i>Prosopis articulata</i>).....	5
2.5 Métodos para estudiar la estructuras de las comunidades bacterianas	6
2.5.1 Técnicas de huella digital (Fingerprinting).....	6
2.5.3 Pirosecuenciación 454	7
3. JUSTIFICACIÓN	9
4. HIPÓTESIS	10
5. OBJETIVO GENERAL	10
Objetivos específicos:.....	10
6. MATERIALES Y MÉTODOS	11
6.1 Ubicación del experimento	11
6.2 Colecta y características del suelo	11
6.3 Recolección y Almacenamiento de Semillas de Mezquite.....	12
6.3.1 Desinfección y Germinación	12
6.4 Inoculante	13
6.4.1 Microorganismo	13

6.4.2 Elaboración del Inoculante	13
6.4.3 Deshidratación del inoculante	13
6.5.1 Conteo en placa por unidades formadoras de colonia (UFC)	14
6.6 Siembra de plántulas	14
6.7 Medición de parámetros de la planta de Mezquite	15
6.8 Análisis de cambios en la comunidad bacteriana de la rizósfera de Mezquite amargo	15
6.8.1 Extracción DNA total	15
6.8.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa	16
6.8.3 Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE).....	16
6.9 Pirosecuenciación	17
6.10 Detección y visualización de <i>Bacillus pumillus</i> ES4 en la raíz de Mezquite mediante Hibridación Fluorescente in situ (FISH)	18
6.10.1 Colecta y fijación de la raíz de Mezquite.....	18
6.10.2 Inclusión en Glycol Metacrilato	18
6.10.3 Hibridación Fluorescente <i>in situ</i> (FISH).....	19
7. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	23
8. RESULTADOS.....	24
8.1 Viabilidad del inoculante	24
8.2 Medición de parámetros de la planta de Mezquite	24
8.3 Análisis de los cambios en la comunidad bacteriana de la rizósfera con métodos cultivo independientes	29
8.4 Pirosecuenciación 454.....	33
8.5 Patrón de colonización mediante Hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH).	37
9. DISCUSIÓN	43

10. CONCLUSIONES	48
11. LITERATURA CITADA.....	49
ANEXOS	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Buffer de hibridación 35% y 45%.	21
Tabla II. Buffer de lavado 35% y 45%.	21

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparación de plantas de Mezquite. A) Planta de Mezquite no inoculada, B) Planta inoculada con <i>Azospirillum brasilense</i> , C) Planta inoculada con Mezcla de <i>Bacillus pumillus</i> y <i>Azospirillum brasilense</i> , D) Planta inoculada con <i>Bacillus pumillus</i> ES4.	25
Figura 2. Longitud de raíz en cada tratamiento durante los 3 ciclos de duración del experimento. Las barras representan el error estándar, literales diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas. Nivel de significancia $P<0.05$	26
Figura 3. Peso seco de raíz en cada tratamiento durante los 3 ciclos de duración del experimento. Las barras representan el error estándar literales diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas. Nivel de significancia $P<0.05$	27
Figura 4. Longitud aérea en cada tratamiento durante los 3 ciclos de duración del experimento. Las barras representan el error estándar literales diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas. Nivel de significancia $P<0.05$	28
Figura 5. Peso seco de longitud aérea en cada tratamiento durante los 3 ciclos de duración del experimento. Las barras representan el error estándar literales	

diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas. Nivel de significancia $P < 0.05$	29
Figura 6. A) Gel en gradiente desnaturalizante Ciclo 1 día 10, B) Dendrograma coeficiente de DICE, C) Análisis NMDS en 3D del Ciclo 1 día 10.....	30
Figura 7. A) Gel en gradiente desnaturalizante (DGGE) Ciclo 1 día 30, B) Dendrograma coeficiente de DICE, C) Análisis NMDS en 3D del Ciclo 1 día 30..	31
Figura 8. A) Gel en gradiente desnaturalizante (DGGE) Ciclo 2 día 10, B) Dendrograma coeficiente de DICE, C) Análisis NMDS en 3D del Ciclo 2 día 10..	31
Figura 9. A) Gel en gradiente desnaturalizante (DGGE) Ciclo 2 día 30, B) Dendrograma coeficiente de DICE, C) Análisis NMDS en 3D del Ciclo 2 día 30..	32
Figura 10. A) Gel en gradiente desnaturalizante (DGGE) Ciclo 3 día 10, B) Dendrograma coeficiente de DICE, C) Análisis NMDS en 3D del Ciclo 3 día 10..	32
Figura 11.A) Gel en gradiente desnaturalizante (DGGE) Ciclo 3 día 30, B) Dendrograma coeficiente de DICE, C) Análisis NMDS en 3D del Ciclo 3 día 30..	33
Figura 12. Composición de diferentes <i>Phyla</i> de las secuencias del 16S rRNA de Bacteria del experimento 1. Baja abundancia (secuencias por grupo $\leq 3\%$).	35
Figura 13. Abundancia de Clases bacterianas detectadas por pirosecuenciación del 16S rRNA. Se muestran los porcentajes $\geq 3\%$	36
Figura 14. Composición de la familia <i>Bacilli</i> de las secuencias del 16S rRNA de Bacteria del experimento 1. Baja abundancia (secuencias por grupo $\leq 2\%$).	37
Figura 15. Esferas disueltas de <i>Bacillus pumilus</i> ES4, toma a 100x en microscopio óptico de fluorescencia. A) Filtro FITC, B) Filtro Cy3, C) Imágenes sobrepuestas.	38
Figura 16. Colonización de <i>Bacillus pumilus</i> en la zona de elongación de mezquite, Ciclo 1 día 10. Imágenes al microscopio de fluorescencia. A) Filtro FITC, B) Filtro	

Cy3, C) Imágenes sobrepuestas. Los círculos muestran las zonas donde se observa <i>B. pumilus</i>	39
Figura 17. Colonización de <i>Bacillus pumilus</i> en la zona de elongación de mezquite, Ciclo 2 día 10. Imágenes al microscopio de fluorescencia. A) Filtro FITC, B) Filtro Cy3, C) Imágenes sobrepuesta. Los círculos muestran las zonas donde se observa <i>B. pumilus</i>	40
Figura 18. Colonización de <i>Bacillus pumilus</i> en la zona de elongación cercano a la cofia de mezquite, Ciclo 3 día 10. Imágenes al microscopio de fluorescencia. A) Filtro FITC, B) Filtro Cy3, C) Imágenes sobrepuesta. Los círculos muestran las zonas donde se observa	41
Figura 19. Colonización de bacterias nativas del suelo del desierto. A) Zona de desprendimiento celular hacia la cofia en sonda FITC. B) Zona de desprendimiento celular hacia la cofia en sonda EUB MIX. C) Raíz secundaria sobre zona de elongación de raíz principal con filtro FITC, D) Raíz secundaria sobre zona de elongación de raíz principal con sonda EUBMIX.	42

1. INTRODUCCIÓN

Los desiertos se definen por sus condiciones de aridez, con lluvias desde 0 mm hasta 500 mm al año y temperaturas de más de 50°C y hasta de 0°C. (Noy-Meir 1973). Una consecuencia de esta aridez es que la mayoría de la superficie que ocupa el desierto es monótona, lo que lleva a muchas personas a verlo como un terreno baldío. Por el contrario, los biólogos han visto por mucho tiempo a los desiertos como laboratorios de la naturaleza, en los que la selección natural está expuesta en su forma más extrema, tales como adaptaciones únicas de las plantas y animales a la falta de agua y nutrientes (Ward, 2009),

Así mismo, las evaluaciones de interacción planta-microorganismos que se han realizado a lo largo de los años son una herramienta importante para entender cómo las bacterias promotoras de crecimiento en plantas (PGPB) benefician a las plantas nativas del desierto, las cuales son importantes desde el punto de vista ecológico y económico. Una de esas plantas es el mezquite amargo (*Prosopis articulata*), la cual forma parte de esta investigación, y su asociación con *Bacillus pumilus* ES4 bacteria endófita del cardón gigante (*Pachycerus pringlei*). La importancia ecológica principal del mezquite, es el ser una planta nodriza para cactáceas, particularmente para el cardón gigante (*Pachycerus pringlei*) en sus etapas tempranas de desarrollo (Carrillo-García *et al.*, 2000a), económicamente los productos de mezquite son utilizados como comida humana, medicina tradicional, forraje como combustible y material para construcción (Almanza y Moya, 1986).

En trabajos anteriores del Grupo de Microbiología Ambiental del CIBNOR, se han desarrollado tecnologías para la reforestación de suelos desérticos erosionados, incluyendo el uso de PGPB que normalmente se usan en la agricultura y bacterias nativas aisladas del desierto de Sonora.

Sin embargo, en la actualidad, es escasa la información sobre el efecto que se tiene por la inoculación de estas plantas sobre la comunidad nativa de bacterias de la rizósfera y de cómo se obtiene una mejora en el crecimiento de las plantas y el

desarrollo de la comunidad asociado a la rizósfera. Por lo que el objetivo de esta investigación fue ver cómo cambia la estructura de la comunidad nativa de bacterias, al ser inoculado *B. pumilus* ES4 en la rizósfera de mezquite y conocer si el cambio en la estructura es positivo para el establecimiento y desarrollo de mezquite y así puedan ser utilizados tanto mezquite como *B. pumilus* ES4, como una alternativa en la reforestación de los suelos erosionados del sur del Desierto Sonorense.

2. ANTECEDENTES

2.1 Bacterias promotoras de crecimiento en plantas (PGPB)

Entre los microorganismos que habitan el suelo, las bacterias son el grupo más abundante. Se sabe que las bacterias son las más abundantes (alrededor de 10^8 a 10^9 células por gramo de suelo) y que el número de células bacterianas cultivables en el suelo, es por lo general sólo alrededor de 1% del número total de células bacterianas presentes (Schoenborn *et al.*, 2004). Sin embargo, en los suelos de ambientes desérticos cálidos, que están sometidos a un constante estrés por falta de nutrientes y agua, entre otros, el número de bacterias cultivables puede ser tan bajo como 10^4 células por gramo de suelo (Timmusk *et al.*, 2011).

Las Bacterias promotoras del crecimiento en plantas (PGPB por sus siglas en inglés) pueden promover el crecimiento vegetal directamente, ya sea por la adquisición de recursos y la facilitación o modulación en los niveles de hormonas vegetales, las cuales son importantes para su crecimiento y desarrollo o indirectamente por la disminución de diversos agentes patógenos en la planta es decir, actuando como control biológico (Glick, 1995).

Para ejercer efectos favorables al desarrollo de la planta, estas bacterias deben ser capaz de colonizar las raíces y tener la capacidad de mantenerse por un período adecuado en la rizósfera. Se han reconocido diversos modos directos de acción de las PGPB según la especie e inclusive la cepa, encontrándose que en algunas bacterias pueden actuar más de un mecanismo (Bashan y de-Bashan, 2004).

Entre las bacterias que tienen la capacidad de promover el crecimiento se encuentran aquellas que son de vida libre en el suelo y pueden formar relaciones simbióticas con plantas específicas, (Ejemplo *Rhizobium* spp. y *Frankia* spp.), bacterias endófitas que pueden colonizar la planta o una parte de los tejidos interiores, esto tiene lugar en la rizósfera definida como la zona de suelo adyacente a la raíz; y que es influenciada por las raíces (Bolton, *et al.*, 1992), rizoplano,

superficie de la raíz que puede ser colonizada por microorganismos (Giri *et al.*, 2005).

2.2 El género *Bacillus*

Las bacterias del género *Bacillus* son anaerobias, aerobias o facultativas y formadoras de endoesporas. Son bacterias Gram-positivas con forma de vara; en algunas especies se pueden convertir en Gram-negativas cuando etapas avanzadas de su ciclo de vida. Las numerosas especies del género presentan una amplia gama de capacidades fisiológicas que les permiten vivir en cualquier entorno natural. Su método de supervivencia son las esporas que son resistentes al calor, el frío, la radiación, la desecación, y desinfectantes (Turnbull y Kramer, 1996).

También cuentan con una amplia habilidad fisiológica con respecto al calor, pH y salinidad. Gracias a esto son encontradas en un amplia gama de hábitats; solo pocas especies son patogénicas para vertebrados o invertebrados (Holt, 1994).

2.2.1 *Bacillus pumilus* ES4

Bacillus pumilus ES4 (FJ032017) es una bacteria endófito del cardón gigante (*Pachycereus pringlei*) (Puente *et al.*, 2004a) de la cual se ha comprobado su efecto como promotora del crecimiento vegetal, así como ser una bacteria que puede evitar los efectos que son perjudiciales, como organismos patógenos o facilitar la absorción de nutrientes para las plantas que se encuentran en el medio ambiente (Kloepper y Metting, 1992).

En estudios que han utilizado a *B. pumilus* ES4 y su efecto como promotora del crecimiento en plantas, se encontró que tiene la capacidad de degradar varios tipos de rocas y permitir que las cactáceas se establezcan sobre las rocas (Puente *et al.*, 2004a), además ha sido utilizada en estudios de recuperación de suelos contaminados con desechos de minas, ayudando del establecimiento de la planta *Atriplex lentiformis* en el desierto de Sonora (de-Bashan *et al.*, 2010a).

2.3 Mezquite (*Prosopis articulata*)

Prosopis es un género de leguminosa extremadamente diverso, que comprende 44 especies de arbustos y árboles de regiones semiáridas principalmente en México, Chile, Argentina, Perú y el suroeste de Estados Unidos. El mezquite es una planta con múltiples usos en los lugares en los que se desarrolla, algunos de ellos y como fuentes de forraje, madera que es usada como combustible (Felker y Guevara, 2003). Desde el punto de vista ecológico, las diversas especies de mezquite son reconocidas por su contribución de nitrógeno al suelo, a través de la fijación biológica de nitrógeno que realiza en simbiosis con bacterias del género *Rhizobium*, además de su importancia para la conservación de suelos y la acumulación de hojarasca (Felker y Bandurski, 1979), así como su papel como planta nodriza del cardón gigante (*Pachycereus pringlei*) (Carrillo-García *et al.*, 2000a).

2.4 Inoculantes microbianos

Un inoculante microbiano es una formulación que contiene una o más cepas bacterianas beneficiosas, en un material de soporte fácil de usar y económico, ya sea orgánico, inorgánico, o sintetizado a partir de moléculas definidas. El inoculante es el medio de transporte bacteriano desde la fábrica hasta el suelo, plata o semilla. Los efectos deseados del inoculante en el crecimiento de la planta pueden incluir la fijación de nitrógeno en las leguminosas, control biológico (principalmente) de las enfermedades transmitidas por el suelo, la mejora de la absorción de minerales del suelo y mejora en los efectos nutricionales, así como la síntesis de hormonas para el desarrollo vegetal (Bashan, 1998), también son usados para la biodegradación de compuestos xenobióticos o desechos de la industria minera (van Elsas y Heijnen 1990; de-Bashan *et al.*, 2010). Un punto clave para el éxito del inoculante es que este tenga una cantidad mínima de células por planta que es 10^6 y 10^7 y por lo menos de uno a dos años a temperatura ambiente, para que se considere rentable.

Los inoculantes microbianos se han introducido en los suelos como suspensiones líquidas o adsorbidos por diferentes vehículos como son *Pit moss*, carbón de leña,

vermiculita entre otras materias particuladas orgánicas, así como en distintas matrices naturales tal es el caso del alginato, la agarosa y la carragenina; esto debido a que estas matrices pueden contener a los microorganismos en una forma utilizable y optimizar la eficacia, estabilidad, seguridad y facilidad de aplicación (Rhodes, 1993).

Siendo el alginato uno de los utilizados en preparaciones de inoculantes como matriz de transporte, debido principalmente a su naturaleza no tóxica, su biodegradabilidad, y su lenta liberación de microorganismos en el suelo (Bashan, 1986; Bashan y Holguin, 1998), lo cual es de suma importancia ya que eso facilita su aplicación en los suelos para propósitos agronómicos o programas de reforestación.

Por último el inoculante debe tener suficiente tiempo de vida útil (la viabilidad de la bacteria debe de ser al menos de 1×10^6 UFC), por lo menos de uno a dos años a temperatura ambiente, para que se considere rentable su elaboración (Bashan *et al.*, 2002; de-Bashan *et al.*, 2010).

2.5 Métodos para estudiar la estructuras de las comunidades bacterianas

2.5.1 Técnicas de huella digital (Fingerprinting)

Las técnicas de huella digital son clasificadas como cultivo independientes, por lo que pueden superar los problemas asociados con el cultivo selectivo y aislamiento de bacterias a partir de muestras naturales (Amann *et al.*, 1995).

Las técnicas de “huella digital” más utilizadas para comparar la comunidad microbiana son las de geles en gradiente desnaturalizante (DGGE), geles en gradiente de temperatura (TGGE) y el polimorfismo de conformación de cadena simple (SSCP). El más establecido como herramienta molecular es el DGGE se ha utilizado ampliamente para determinar riqueza de especies y la estructura de la comunidad microbiana en distintos ambientes (Campbell *et al.*, 2009; Head *et al.*, 1998; Muyzer y Smalla, 1998; Ferris *et al.*, 1996; Boon *et al.*, 2002).

La técnica DGGE, se basa en una electroforesis que permite la separación de fragmentos de un producto de PCR, del mismo tamaño pero con diferente secuencia de nucleótidos. Para ello, un gradiente lineal creciente de agentes químicos desnaturizantes del ADN (una mezcla de urea y formamida) se incorpora a lo largo de un gel de poliacrilamida. Durante la electroforesis, se mantiene una temperatura constante de 50-65 °C y los fragmentos de ADN de doble cadena migran por el gel hasta encontrar una determinada concentración de urea y formamida (concentración desnaturizante) a la cual las cadenas se separan localmente y el desplazamiento de las moléculas disminuye o se interrumpe. La concentración desnaturizante a la cual las cadenas se separan depende de la secuencia de nucleótidos, es decir, del contenido de dobles o triples puentes de hidrogeno dependiendo de si son pares de bases adenina-timina o citosina-guanina fragmentos de ADN con secuencias nucleotídicas diferentes tendrán diferentes posiciones en el gel (Myers *et al.*, 1987; Muyzer y Smalla, 1998; Muyzer *et al.*, 1993; Ferris *et al.*, 1996),

Las ventajas de esos métodos es que son relativamente baratos, reproducibles y adecuados para una alta cantidad de muestras y tienen la habilidad del seguimiento de los cambios en las comunidades microbianas. A través del análisis similitud para confirmar las diferencias significativas entre los tratamientos en la estructura de la comunidad microbiana cuando hay suficientes repeticiones (>3) (Muyzer, 1999). La información taxonómica para las bandas de interés o significativas puede ser adquirida por clonación y secuenciación (Ferris *et al.*, 1996).

2.5.3 Pirosecuenciación 454

El rápido desarrollo de las tecnologías de secuenciación ha hecho posible generar una gran cantidad de secuencias a un precio accesible. Más de un millón de secuencias de alta calidad con un promedio de 400 pb se pueden generar en una hora. La pirosecuenciación de amplicones de genes de 16S rRNA se ha convertido

en un método muy popular para estudiar las comunidades microbianas del suelo- (Campbell *et al.*, 2010).

Por lo que, el advenimiento de tecnologías de secuenciación de próxima generación es más avanzado en el campo de la identificación microbiana, lo ha llevado la superación de las limitaciones en ambas técnicas tradicionales y secuenciación de Sanger, esta es capaz de inspeccionar las muestras en una profundidad mucho mayor antes (Huber *et al.*, 2007). Esta técnica, permite la identificación de organismos raros y no cultivables, así como la secuenciación de los ecosistemas microbianos (Sogin *et al.*, 2006; Edwards *et al.*, 2006; Tringe *et al.*, 2005). Se puede aplicar aún más a los estudios de identificación microbiana mediante secuenciación a gran escala de 16S rDNA.

El DNA problema es amplificado utilizando PCR y los productos son procesados y secuenciados usando los métodos de secuenciación de próxima generación. La pirosecuenciación 454 es utilizada en vez de usar metagenómica debido a que solo amplifica ADN de interés, esto aumenta enormemente la cantidad de datos pertinentes devueltos, en comparación con la secuenciación metagenómica, dando como resultado una profundidad mucho mayor de información. En la secuencia multiplex, cada muestra se le da una identificación única llamada etiqueta, por lo general se une al extremo 5 'del ADN. El ADN de cada muestra se agrupa y se secuencia, lo que resulta en una gran cantidad de secuencias de datos de múltiples muestras. Las secuencias pueden entonces ser asignadas a las muestras originales de acuerdo con las etiquetas de identificación únicas (Breakwell *et al.*, 2014).

3. JUSTIFICACIÓN

La desertificación es uno de los problemas ambientales más serios que enfrentan las latitudes medias continentales y es una preocupación en muchas partes del mundo (Nicholson, 1978).

Los cambios producidos en los desiertos debido a diversas actividades humanas han llevado en gran escala a la erosión del suelo del desierto. Una de las ciencias que trata estas de problemáticas, es una rama de la Microbiología, llamada Microbiología Ambiental la cual es la encargada de estudiar la diversidad y función de los microorganismos en su entorno, lo que resulta ser un beneficio para el medio ambiente y la sociedad.

En el grupo de Microbiología Ambiental de CIBNOR se ha estudiado ampliamente el uso de microorganismos para mejorar el crecimiento de plantas en entornos desfavorables. Uno de estos microorganismos, son las bacterias promotoras del crecimiento en plantas (PGPB por sus siglas en inglés) las cuales realizan una serie de funciones vitales para la planta como, mejorar la nutrición de las plantas y la disponibilidad de agua, la síntesis de hormonas, la mineralización de nutrientes ligados orgánicamente, también son usadas como biocontrol contra agentes patógenos y la fijación de nitrógeno atmosférico, además de la simbiosis con plantas.

Esta investigación pretende contribuir al conocimiento para recuperar el suelo erosionado del desierto en Baja California Sur, por lo que se inoculo el suelo con *Bacillus pumilus* ES4 (bacteria endófito del cardón gigante) para conocer el efecto que se tiene en su comunidad nativa de bacterias y con ello poder implementar programas de reforestación, utilizando plantas nativas como el mezquite amargo.

4. HIPÓTESIS

Si se sabe que la inoculación con *Bacillus pumilus* ES4 tiene un efecto benéfico en las plantas desérticas como mezquite amargo (*Prosopis articulata*) y cardón gigante (*Pachycereus pringlei*), entonces se espera que la inoculación con esta PGPB tenga un efecto en la estructura de la comunidad bacteriana de la rizósfera del mezquite amargo.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar, los cambios en la estructura de la comunidad bacteriana de la rizósfera de Mezquite amargo (*Prosopis articulata*) como resultado de la inoculación con la PGPB *Bacillus pumilus* ES4.

Objetivos específicos:

- Determinar los cambios de la comunidad bacteriana en la rizósfera de plantas inoculadas con *Bacillus pumillus* ES4.
- Visualizar el patrón de colonización de *Bacillus pumillus* ES4 en la raíz de mezquite amargo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Ubicación del experimento

El experimento se estableció en un invernadero del CIBNOR (24° 8' 7" N, 110° 25' 35" O), bajo condiciones semicontroladas, donde la temperatura promedio es de ~ 35 °C y la intensidad luminosa es de ~100 $\mu\text{mol fotones m}^2 \text{s}^{-1}$.

Se realizó un experimento con dos repeticiones. La duración de cada experimento fue de 90 días y estuvo compuesto por 3 ciclos de 30 días cada uno, considerando como un ciclo a la acción de agregar esferas y planta en el día 1 de cada ciclo y retirar las plantas al día 30 para análisis, utilizando para el próximo ciclo el mismo suelo del ciclo anterior. El primer experimento se realizó entre los meses de Diciembre a Marzo y el segundo experimento se tuvo lugar durante los meses de Julio y Septiembre. Cada experimento estuvo conformado por 1 tratamiento y 3 controles (cada tratamiento se identificó con una clave):

- 1) Suelo rizosférico de Mezquite amargo inoculado con *Bacillus pumilus* ES4 (Bpum)
- 2) *Bacillus pumilus* ES4 inoculado en el suelo directamente, sin planta (BPA)
- 3) Suelo rizosférico de Mezquite amargo sin inoculante (PA)
- 4) Suelo inicial sin inoculante ni planta (SA)

6.2 Colecta y características del suelo

El suelo utilizado fue yermosol haplico aluvial, con las siguientes características: muy bajo contenido de carbono total (400 mg/kg^{-1}) en su mayoría es carbono inorgánico, bajo contenido de nitrógeno (20 mg/kg^{-1}) y una baja población microbiana (Bashan *et al.*, 2000). Este fue colectado de una localidad a 15 km de La Paz Baja California Sur, México (24°07'36"N, 110°25'48"W) llamada El Comitán. El clima en esa zona es árido con una precipitación promedio anual de 180mm, principalmente después de verano. La temperatura promedio oscila entre 18 y 30°C,

pero durante la mitad del verano la temperatura frecuentemente excede los 40°C (Carrillo-Garcia *et al.*, 2000b). La colecta del suelo se realizó en un área de muestra de 3 m² y se retiró suelo a una profundidad no mayor de 30 cm. Posteriormente el suelo fue tamizado (>2mm) para obtener partículas menores a 2mm y 120 g de suelo fueron colocados en macetas cónicas de 150 g.

6.3 Recolección y Almacenamiento de Semillas de Mezquite

Se recolectaron las vainas de Mezquite durante los meses de Julio y Agosto del 2012; únicamente se tomaron las que aún permanecían unidas al árbol y se evitó recoger las que ya estaban en el suelo, para prevenir que presentaran infección por insectos o estuvieran dañadas. Las vainas fueron colocadas en bolsas de plástico y llevadas al laboratorio, donde se extrajeron y seleccionaron manualmente. Finalmente se colocaron en un recipiente de vidrio con silica gel y se almacenaron a 4°C para su posterior uso.

6.3.1 Desinfección y Germinación

Se tomaron 150 semillas las cuales fueron desinfectadas bajo agitación constante con aproximadamente 100 ml de Tween 20 (Polietileno-sorbitán-monolaurato,) (Sigma-Aldrich, Buchs, Suiza) al 2% durante 10 minutos, se decantó el tween 20 y se adicionó hipoclorito de sodio al 4% y se agitó nuevamente, durante 5 minutos, al término se decantó nuevamente y se procedió a realizar 5 lavados con agua destilada estéril con duración de 1 minuto cada uno, hasta asegurarse que el olor a hipoclorito se había eliminado, posteriormente las semillas se embebieron en 200 ml de agua destilada estéril en agitación constante por 7 horas. Para su germinación, las semillas se colocaron en cajas Petri que contenían en su interior papel toalla húmedo, posteriormente se cubrieron con papel aluminio para finalmente colocarse en una incubadora (Fisher Scientific) a 35 °C en oscuridad. Para estimular su germinación se mantuvieron en esta fase durante 3 días. Este procedimiento se realizó al comienzo de cada ciclo en el experimento, bajo las mismas condiciones.

6.4 Inoculante

6.4.1 Microorganismo

Se obtuvo un preinóculo en medio TYG (**ANEXO 1**) de *Bacillus pumilus* ES4 a 35°C en agitación a 120 rpm por 24 horas, posteriormente se transfirieron 5 ml de preinóculo a 50 ml de medio TYG en matraces Erlenmeyer y se incubaron a 35 °C a 120 rpm durante 16-18 horas. Para verificar su pureza y morfología, se realizó una siembra del cultivo en cajas Petri con agar nutritivo por estría cruzada las cuales fueron puestas a incubar a 35°C.

6.4.2 Elaboración del Inoculante

La elaboración del inoculante se realizó siguiendo la técnica descrita por de-Bashan *et al* (2008), la cual consiste en la preparación de una solución de alginato de sodio al 2% mezclada con una solución concentrada de bacterias, esta solución pasa por una manguera MasterFlex de No. 18 y una aguja B-D (Becton Dickinson &Co.) con un diámetro de 21 G x 32 mm (0.080 mm x 1 ¼”) que es impulsada por una bomba peristáltica MasterFlex (Mod. No. 7523-30. Barnant Co, Barrington U.S.A.), al salir de la aguja la gota de alginato caía sobre una solución en agitación de CaCl₂ al 2%, para que por intercambio iónico las esferas se endurecieran (tamaño de esferas 2-3 mm de diametro) y dentro de ellas quedaron embebidas las bacterias.

Debido a que durante el procedimiento anterior el número de bacterias disminuye, el inoculante se dejó en crecimiento secundario en medio TYG para *Bacillus pumilus* 35°C por ~16 h a 120 rpm. Concluido este tiempo se procedió a decantar el medio y dar 3 lavados a las esferas con solución salina estéril al 0.85%.

6.4.3 Deshidratación del inoculante

Para el manejo y conservación más eficiente del inoculante, se deshidrató en una campana de flujo laminar. Las esferas se pusieron en una charola de metal estéril, colocándose en una capa sencilla completamente uniforme para obtener un secado

exitoso individual de las esferas. Se dejaron en las charolas por ~24 h a 30°C. Una vez completada la deshidratación, las esferas secas se almacenaron herméticamente en pequeños frascos de 5 ml.

6.5 Viabilidad del inoculante

6.5.1 Conteo en placa por unidades formadoras de colonia (UFC)

Se pesaron 100 mg de esferas deshidratadas, en un tubo Corning de 50 ml (Sigma-Aldrich, Buchs, Suiza), se adicionaron 30 ml de buffer de citratos (Citrato de Sodio 55mM, EDTA anhidra 30 mM y NaCl 150 mM, pH 8) y se pusieron en agitación constante por 1 h, hasta que las esferas estuvieran completamente disueltas. Posteriormente se procedió a centrifugar por 10 minutos a 12800 G, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 1 ml de solución salina estéril al 0.85% para realizar las diluciones seriadas correspondientes, de 1×10^{-1} hasta 1×10^{-8} . El factor de dilución utilizado fue de 1:1. Se tomaron 100 μ l de las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y se sembraron por extensión en placa en agar nutritivo al 2% por triplicado y se incubaron a 35°C por 72 h. El conteo de las cajas se realizó en un cuenta colonias (Quebec Darkfield Manual Colony Counter) y se utilizó la siguiente fórmula para obtener el número total de colonias:

UFC/ml o UFC/gr = No. de colonias por placa X (Factor de dilución) X (ml de muestra sembrada)

6.6 Siembra de plántulas

Para el proceso de siembra, fue colocada una plántula de 72 horas después de su germinación, en las macetas conteniendo 120 g de suelo. En cada maceta se formó una cavidad en el suelo se colocó la plántula y se agregaron 0.2 g de esferas deshidratadas, después se rellenó cuidadosamente el hoyo con tierra. La cantidad de 0.2 g de inoculante que corresponde aproximadamente a 1.6×10^8 UFC/g, de acuerdo a los conteos en placa por UFC. Al finalizar esta etapa, las plántulas sembradas en las macetas fueron regadas con 40 ml de agua destilada cada 3 días

de acuerdo a la capacidad de campo del suelo previamente establecido por Trejo *et al.* (2012). Este proceso se repitió en cada ciclo, en total por experimento fueron tres ciclos de 30 días cada uno.

6.7 Medición de parámetros de la planta de Mezquite

Las mediciones de longitud de la parte aérea y raíz y el peso seco se realizaron al final de cada ciclo, es decir cada 30 días. La metodología consistió en medir desde el vástago de la planta hasta la parte inferior del tallo con una regla en centímetro, de la misma forma para la raíz principal, desde la parte inferior del tallo hasta la cofia. se midieron 10 réplicas por tratamiento. Después de 30 días, la parte aérea y la raíz fueron almacenadas en bolsas de papel estraza y se colocaron en un horno a 65 °C durante 48 horas, para posteriormente medir el peso seco con el empleo de una balanza analítica (OHAUS PIONEER).

6.8 Análisis de cambios en la comunidad bacteriana de la rizósfera de Mezquite amargo

6.8.1 Extracción DNA total

Aproximadamente 3 g de rizósfera libre de raíces fueron colectado en tubos de 2ml (Neptune, San Diego, CA) y fueron almacenados a -80°C hasta su análisis. Se sabe que al almacenarlos a bajas temperaturas de congelación no afecta en el análisis de la comunidad bacteriana por PCR-DGGE (Campbell *et al.*, 2009).

La extracción de ADN de suelo se realizó con 0.6 g de cada replica experimental, fueron tomadas 3 réplicas por tratamiento y se siguió el método descrito por Lopez *et al.*, (2013). Se usó el kit (Fast Dna Spin for soil MpBio Santa Ana, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para eliminar los ácidos húmicos, unidos a la matriz de ADN se hizo un lavado con una dilución al 20% de una solución saturada de 5.5 M de Tiocianato de guanidinio (Fluka Sigma-Aldrich, Buchs, Suiza). El ADN fue eluido en 50 µl de Buffer TE 1X pH 8. El ADN total fue visualizado en un gel de agarosa al 1 % a 100V en TBE 1X, las muestras fueron mezcladas con *Sybr Gold*

(Life technologies, USA) para su visualización. Posteriormente el ADN fue cuantificado en un Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) donde se obtuvo la concentración de ácidos Nucleicos.

6.8.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa

El ADN extraído de las muestras de rizósfera de mezquite fue utilizado para amplificar por PCR la región V5-V8 del gen 16S rRNA. Se utilizaron iniciadores específicos para el dominio bacteria F984GC (5' GC-AACGCGAAGAACCTTAC- 3') y R1378 (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-'3) (Heuer *et al.*, 1997) y el DNA fue ecualizado a 5 ng de templado por producto de PCR. La PCR fue llevada a cabo en el termociclador (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) utilizando el siguiente programa: desnaturalización inicial 5 min a 95°C, extensión 1) 95 °C 5 min, 2) 94°C 1 min, 3) 55°C 1 min, 4) 72°C 30 Seg, elongación final 5) 72° C 7 min por 30 ciclos.

Los Productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1.5 %cargando en cada pozo 4µl de muestra y 2µl de SYBR GOLD, así mismo cada gel tenía una escalera de peso molecular 100 bp DNA ladder (Invitrogen, Life technologies, USA) para confirmar el tamaño de los fragmentos esperados y además confirmar que la electroforesis procedió de manera correcta, las condiciones de electroforesis fueron 100 V por 70 min.

Posteriormente, se fotodocumentaron con ayuda del sistema Bio-Rad Gel Doc XR+.

6.8.3 Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE)

Los productos de PCR fueron separados en geles con gradiente desnaturalizante (DGGE), como describen Lopez *et al.*,(2013). Se analizaron solamente tres réplicas para cada tratamiento debido a la limitación técnica de los geles de DGGE. Los geles se hicieron al 6% de acrilamida con la proporción 45%-65% de Urea-Formamida (**ANEXO 2**) fueron desnaturalizados en el sistema D-Code Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) de la siguiente manera: se cargaron 10 µl (~1000 ng de ácidos nucleicos) de producto de PCR más

10 µl de buffer de carga con una pre-corrída de 10 minutos a 50 V para introducir los productos a la matriz desnaturante, posteriormente se ajustaron las condiciones de corrída en 900 minutos a 75 V; concluido el tiempo de electroforesis se tiñeron los geles con 10 µl de SYBR Green en TAE 1x durante 40 minutos en la oscuridad.

La documentación de los geles se llevó a cabo en el fotodocumentador Bio-Rad Gel Doc XR+ System y los patrones de bandas fueron analizados con el software Quantity One 4.6.7 (Bio-Rad Laboratories), para calcular los coeficientes de correlación de Dice y generar dendrogramas por el método de UPGMA (Unweighted Pair-group method using arithmetic averages).

6.9 Pirosecuenciación

La pirosecuenciación se realizó como un servicio externo llevado a cabo por MR DNA (Molecular Research LP. Shallowater, TX) mediante el proceso bTEFAP, a partir de una muestra compuesta de los 3 ciclos del experimento 1 y se realizó de la siguiente manera: los primers 454-16S universales de Eubacteria, fueron sometidos a un solo paso de 30 ciclos de PCR el kit HotStarTaq Plus Master Mix (Qiagen, Valencia, CA), bajo las siguientes condiciones: 94°C por 3 minutos, seguido por 28 ciclos de 94°C por 30 segundos; 53°C por 40 segundos y 72°C por 1 minuto; después de esto un paso de elongación final a 72°C por 5 minutos. Tras la PCR, todos los productos de cada amplicon diferente se mezclaron en concentraciones iguales y se purificaron perlas de Agencourt Ampure (Agencourt Bioscience Corporation, MA, USA). Las muestras se procesaron en un secuenciador Roche 454 FLX Titanium, todos los instrumentos y reactivos fueron utilizados bajo las recomendaciones del fabricante.

6.10 Detección y visualización de *Bacillus pumillus* ES4 en la raíz de Mezquite mediante Hibridación Fluorescente in situ (FISH)

6.10.1 Colecta y fijación de la raíz de Mezquite

Después de 10 días, las raíces de mezquite fueron colectadas retirando cuidadosamente la planta de la maceta. Se utilizó solución salina 0.85% estéril para retirar la tierra adherida a las raíces. Posteriormente se separó la parte aérea de la raíz; debido a que cada parte se utilizaría para posteriores evaluaciones.

Se cortaron aproximadamente 2-3 cm de la raíz principal y de sus raíces secundarias (en caso de que la planta las haya desarrollado) con una navaja estéril y se colocaron en un microtubo de 2 ml conteniendo paraformaldehído al 4% y se mantuvo a 4°C por toda la noche.

Al día siguiente se lavaron las raíces con solución salina 0.85% para retirar el exceso de paraformaldehído, una vez enjuagadas se colocaron en tubos eppendorf con 2ml de etanol al 96% y se conservaron a - 20°C hasta su análisis.

6.10.2 Inclusión en Glycol Metacrilato

Para una exitosa hibridación y visualización es necesario hacer cortes histológicos de las raíces. Para esto se realizó un recambio del alcohol al 96% en el que se encontraban las raíces y se dejaron en refrigeración a 4°C por un hora, seguido de 3 deshidrataciones con alcohol etílico al 99.99% durante 1 hora a 4°C; para cada recambio se retiró el alcohol con ayuda de una pipeta Pasteur.

Posteriormente, se utilizó el kit de inclusión en resina (Technovit 9100, Hatfield, USA). En la preparación de la primera solución de infiltración se siguieron las recomendaciones del fabricante (Electron Microscopy Sciences, USA), donde se tomaron 100 ml Technovit 8100 basic solution + 0.6 g de Technovit hardener I (Solución de infiltración I), los dos se mezclaron en un recipiente ámbar con un

agitador magnético hasta que la solución se homogenizó, se tapó y se guardó a 4°C para ser utilizada posteriormente.

Una vez que las raíces fueron deshidratadas con alcohol etílico al 99.99%, se realizó una deshidratación con acetona a 4°C por 1 hora. Este paso es crítico por lo que hay que ser muy cuidadoso con el tiempo para evitar así la deformación del tejido. Al concluir el tiempo de deshidratación con acetona, se retiró con una pipeta Pasteur y se procedió a agregar 1 ml de solución de infiltración I; de esta solución se realizaron 3 recambios cada 3 horas y el último se dejó durante toda la noche a 4°C.

Posteriormente, en una superficie estéril se colocaron las raíces de mezquite infiltradas y se cortaron con una navaja estéril las zonas seleccionadas (Raíz principal, cofia, raíces secundarias y pelos radicales).

Para la polimerización de la resina se preparó la solución endurecedora II (solución polimerizante) la cual tiene un tiempo de polimerización de 10-15 minutos. Los cortes de raíces se colocaron en moldes de histoforma y fueron sujetadas con una base, la cual se llenó completamente con la solución endurecedora. Los moldes se almacenaron por toda la noche a 4°C en un contenedor hermético. Al siguiente día las raíces se extrajeron del molde de histoforma y fueron almacenadas hasta su corte en el micrótomo.

Las raíces se colocaron en un micrótomo (Leica RM 2255, Biosystems) y se rebajaron con la navaja con el tamaño de 5 μ , hasta llegar a la zona de interés. En donde los cortes tuvieron un grosor de 2 μ . Los cortes se colocaron en un baño maría con agua a temperatura ambiente, con la finalidad de que el plástico se extendiera y pudiera ser colocado en un portaobjetos. Posteriormente, los portaobjetos se dejaron secando durante toda la noche.

6.10.3 Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH)

La detección de *Bacillus pumilus* ES4 en cortes histológicos de raíz, se llevó a cabo mediante la técnica de Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH por sus siglas en

inglés) (Rothballer *et al.*, 2003). El protocolo utilizado fue el que se describe a continuación.

Deshidratación: Los cortes se deshidrataron en 3 concentraciones de alcohol 50%, 80% y 96% durante 3 minutos en cada uno de ellos, adicionalmente se adicionó lisozima 10 mg/ml (Sigma Aldrich, Buchs, Suiza) y se incubaron por 30 minutos a 37°C. Una vez pasado el tiempo de incubación se retiró el exceso de lisozima con una micropipeta y se procedió a deshidratar nuevamente en las concentraciones de alcohol mencionadas anteriormente.

Hibridación: Se agregaron 2 sondas distintas a las muestras, una es una mezcla de sondas la cual abarca el dominio bacteria EUB 338 I, II y III (5'/5Cy3/GCT GCC TCC CGT AGG AGT- 3'), (5'/5Cy3/ GCA GCC ACC CGT AGG TGT-3'),(5'/Cy3/GCT GCC ACC CGT AGG TGT/ 3') (llamada en adelante EUBMIX), además, la sonda FITCBPUM (5'-/56-FAM/CTC TCG CAC TTG TTC TTC CC-3') la cual es específica para la especie *Bacillus pumilus*. Se agregaron 9 µl sonda EUB MIX + 18 µl de FITCBPUM con 40 ml de buffer de hibridación (Tabla I) para el cual se utilizó una astringencia del 45% para las plantas inoculadas y del 35 % para las plantas no inoculadas, la diferencia entre las astringencias es debido a que se necesita hacer más permeable la pared de las bacterias Gram+.

La mezcla de buffer y sonda fue colocada uniformemente en las laminillas donde estaban las muestras, después fueron introducidas en un tubo Corning de 50 ml el cual contenía un papel humedecido con el resto de buffer de hibridación, esto para mantener un ambiente húmedo y asegurar así la hibridación de la sonda. Una vez colocado de esa manera se incubaron en el horno de hibridación a 46 °C por 2 horas.

Tabla I. Buffer de hibridación 35% y 45%.

% Formamida	35%	45%
5M NaCl	360 μ l	360 μ l
1 M Tris-HCL	40 μ l	40 μ l
Formamida	700 μ l	900 μ l
SDS 10%	2 μ l	2 μ l
ddH ₂ O	900 μ l	700 μ l

Lavado: Se prepararon 50 ml de buffer de lavado (Tabla II) por cada laminilla. Este fue calentado previamente en un baño María a 48 °C (-). Después de las 2 horas de hibridación, las láminas se colocaron en el buffer por 15 minutos, finalizado este tiempo, se realizó un shock térmico a las muestras al introducirlas por 5 segundos en ddH₂O a 4°C para detener la hibridación posteriormente fueron colocadas en la oscuridad a secar.

Una vez secas, las láminas fueron almacenadas a 4°C en una caja porta laminillas hasta su visualización, se debe considerar que la visualización no debe de pasar de 1 semana esto debido a que la fluorescencia de la sonda pierde su intensidad.

Tabla II. Buffer de lavado 35% y 45%.

Formamida	35%	45%
5M NaCl	700 μ l	700 μ l
1 M Tris-HCL	1ml	1 ml
0.5 M EDTA pH 8.0	500 μ l	500 μ l
SDS 10%	50 μ l	50 μ l
ddH ₂ O	A 50 ml	A 50 ml

Visualización: Las muestras fueron observadas en el microscopio óptico de epifluorescencia (OLYMPUS BX41) en el cual se utilizaron los filtros Cy3 (560 nm) para el dominio bacteria y FITC (480 nm) en la visualización de *Bacillus pumilus* ES4. El montaje de la muestra consistió en poner una gota del aceite protector de fluorescencia Citiflour antifadent AF-1 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) y sobre el un cubreobjetos de 1.5 mm, la muestra se deja reposar por 3 minutos para seguido verse al microscopio en la oscuridad.

Primeramente se realizó un barrido de toda la raíz para poder ubicar zonas de interés. Una vez realizado esto, se capturaron imágenes con la cámara digital integrada al microscopio (Evolution VF) y fueron analizadas con la ayuda del software (Image Pro Plus 6.3.1.542). Las imágenes que se guardaron fueron con los dos filtros antes mencionados (Cy3 y FITC), desde una magnificación de 20X hasta 100X según fuera conveniente. Una vez que se tenían las dos una verde y la otra roja correspondiente a cada filtro, las imágenes se superponían para que dieran como resultado un color amarillo dorado y con esto comprobar que las bacterias emiten fluorescencia en los dos filtros.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Cada tratamiento tuvo 20 réplicas, considerando una réplica cada maceta conteniendo una plántula. En la determinación de cada parámetro de crecimiento (longitud de raíz, longitud de parte aérea, peso seco de raíz y peso seco de la parte aérea) de la planta, se hizo una t-student y la significancia se fijó en $P < 0.05$, este análisis se realizó con la ayuda del software STATISTICA ver. 10 (StatSoft, Tulsa, OK). Para la realización de las gráficas se utilizó el programa SIGMA PLOT 12.0. Así mismo en los resultados se presenta el promedio \pm error estándar.

Para analizar el efecto del inoculante en la comunidad bacteriana se realizó un análisis multivariado de los perfiles obtenidos a partir de geles de DGGE por medio de un análisis de similitud utilizando el coeficiente de Dice y se obtuvo un dendrograma por el método de promedio aritmético de grupos de pares de bandas correspondientes no ponderados (UPGMA), donde la semejanza varía de 0 a 1, donde 1 indica 100% de similitud. Las imágenes de los geles de DGGE fueron analizados para generar un perfil densitométrico de las bandas estos resultados se evaluaron con el software Quantity One 4.6.7 (Bio-Rad Laboratories).

Asimismo para observar las similitud entre los perfiles de DGGE en un diagrama de ordenación se realizó un análisis multivariado de Kruska'l Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS por sus siglas en inglés) con el software STATISTICA ver. 10 (StatSoft, Tulsa, OK).

Para el análisis de las secuencias de pirosecuenciación se utilizó el software MR DNA, en el cual se eliminaron las quimeras y secuencias Singleton.

8. RESULTADOS

8.1 Viabilidad del inoculante

Después de realizar el conteo por medio de unidades formadoras de colonias (UFC) se obtuvo una concentración bacteriana de 2.3×10^8 mg/ml. Al inicio de cada ciclo se verificó que el nuevo inoculante tuviera una viabilidad semejante.

8.2 Medición de parámetros de la planta de Mezquite

En la Figura 1, se observan las diferencias que existen sobre las plantas: "A" (PA) es una planta de mezquite no inoculada, la cual desarrollo una raíz muy larga pero a su vez sumamente delgada sin ramificaciones secundarias muy notables, además de sus cotiledones en color amarillo, lo cual es una señal de estrés, por falta de agua en la planta; por otro lado, "D" es la planta que fue inoculada con *B. pumilus* ES4; como se observa, su raíz es mucho más corta pero con raíces secundarias desarrolladas, además de que la raíz principal tenía una apariencia más gruesa. Sus cotiledones y parte aérea son de color verde, sin mostrar una señal de estrés visible, a diferencia de PA. Las plantas correspondientes a las letras "B" y "C" no fueron consideradas para este estudio, pero de igual forma se pusieron como controles positivos, "B" fue inoculada con *Azospirillum brasilense Cd* y la planta "C" con la mezcla de *Azospirillum brasilense Cd* y *Bacillus pumilus* ES4.



Figura 1. Comparación de plantas de Mezquite. A) Planta de Mezquite no inoculada, B) Planta inoculada con *Azospirillum brasilense*, C) Planta inoculada con Mezcla de *Bacillus pumillus* y *Azospirillum brasilense*, D) Planta inoculada con *Bacillus pumillus* ES4.

Los resultados obtenidos en longitud de la raíz mostraron que existen diferencias significativas con una $P=0.0318$, entre los dos tratamientos donde, el tratamiento de PA resulta ser mayor en longitud de raíz, en comparación de la planta inoculada con la PGPB, como se puede observar en la Figura 2.

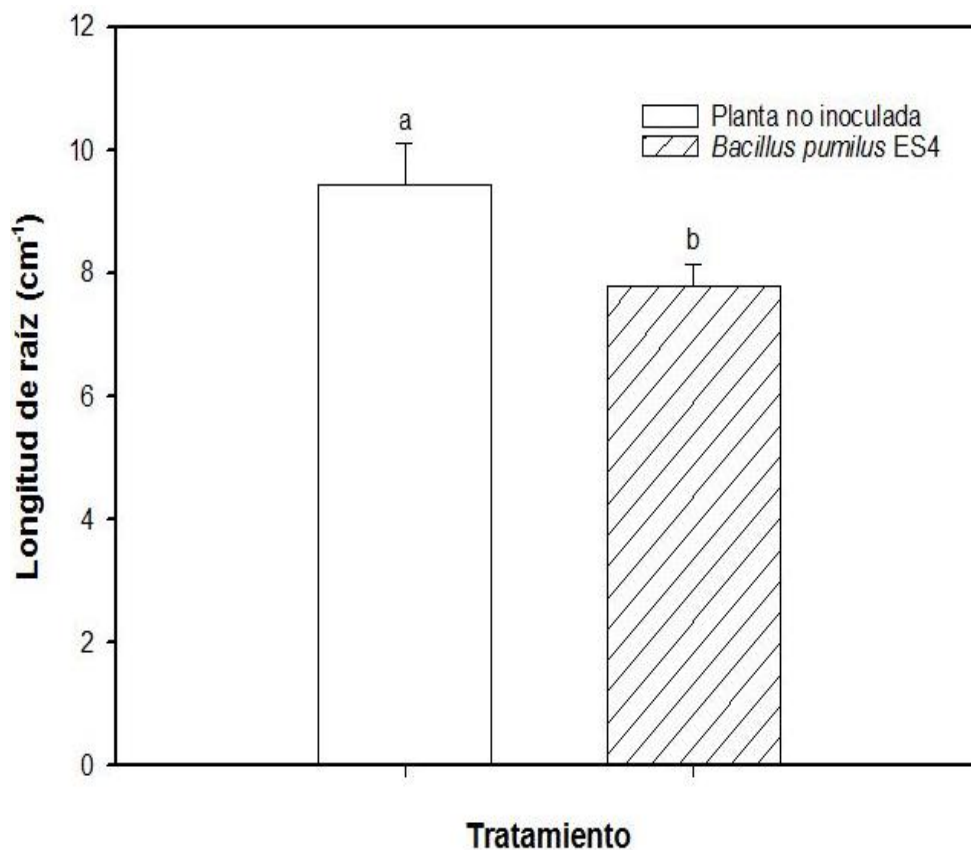


Figura 2. Longitud de raíz en cada tratamiento durante los 3 ciclos de duración del experimento. Las barras representan el error estándar, literales diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas. Nivel de significancia $P < 0.05$.

Peso seco de raíz es el siguiente parámetro a analizar, el cual mostró diferencias significativas entre los dos grupos con una significancia de $P = 0.000001$, donde la biomasa más alta fue de 0.032 g el tratamiento de Bpum, contra 0.015 g del tratamiento PA (Figura 3). Esto debido a lo mencionado previamente sobre el grosor de la raíz inoculada.

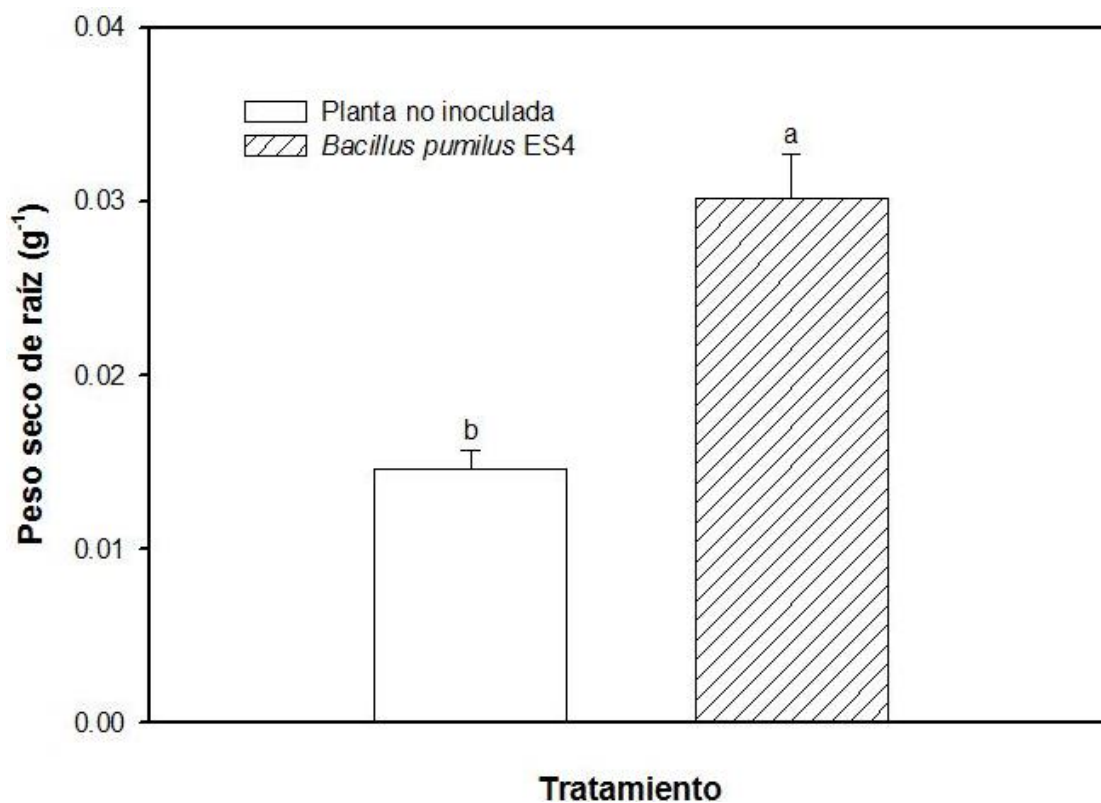


Figura 3. Peso seco de raíz en cada tratamiento durante los 3 ciclos de duración del experimento. Las barras representan el error estándar literales diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas. Nivel de significancia $P < 0.05$

La longitud aérea de la planta no mostró diferencias entre tratamientos $P = 0.0843$ y su altura máxima fue de 10.5 cm para PA y 10 cm para BPUM (Figura 4).

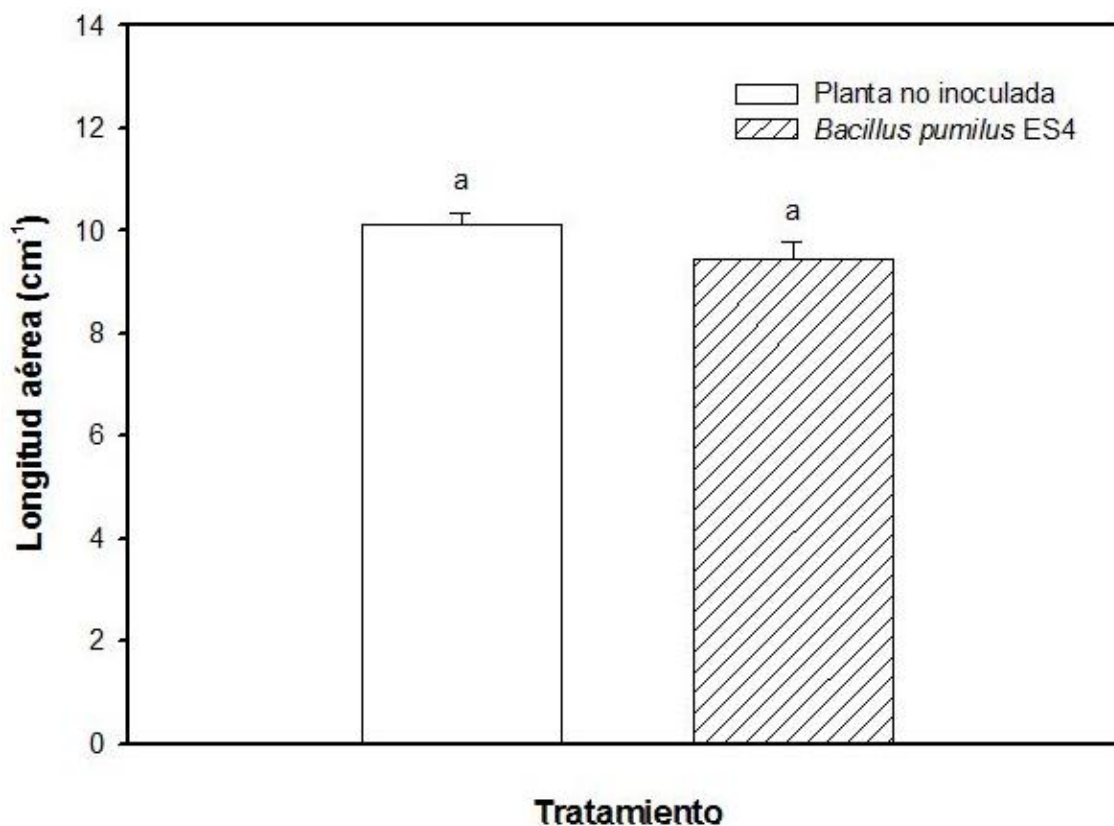


Figura 4. Longitud aérea en cada tratamiento durante los 3 ciclos de duración del experimento. Las barras representan el error estándar literales diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas. Nivel de significancia $P < 0.05$.

El último parámetro medido fue el de peso seco de la parte aérea de la raíz (Figura 5), donde se encontraron diferencias significativas entre los dos tratamientos con una $P=0.0034$ y una biomasa máxima de 0.08 g de la planta inoculada, frente a 0.05 g del control no inoculado.

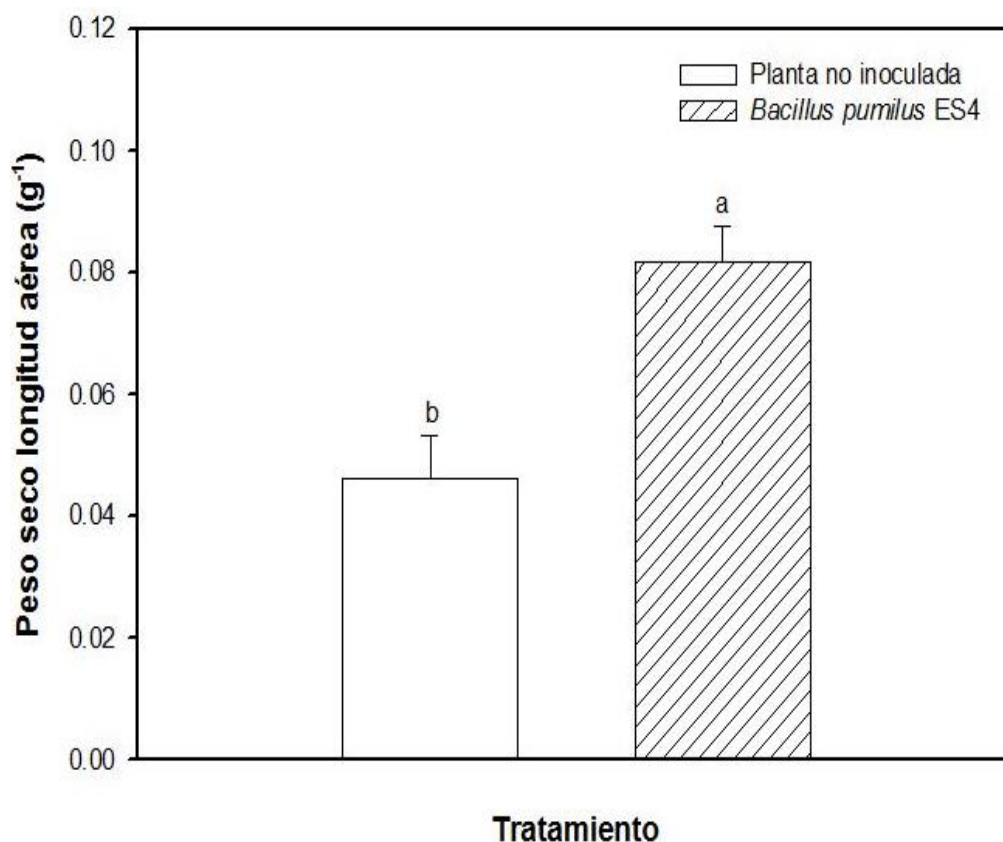


Figura 5. Peso seco de longitud aérea en cada tratamiento durante los 3 ciclos de duración del experimento. Las barras representan el error estándar literales diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas. Nivel de significancia $P < 0.05$.

8.3 Análisis de los cambios en la comunidad bacteriana de la rizósfera con métodos cultivo independientes

Los resultados obtenidos en esta parte de resultados, son un conjunto en cadena los cuales inician con la extracción de ADN total, seguido de la amplificación por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y finalmente la desnaturalización de los fragmentos en Geles con gradiente desnaturalizante (DGGE). Los resultados se dividen en los días 10 y 30 de los ciclos 1, 2 y 3, respectivamente.

Los resultados de los análisis de geles, tanto en los dendrogramas de similitud, como en los análisis de ordenación, para todos los ciclos y todos los días muestran un patrón similar: hay dos grupos distintivos, por un lado los tratamientos que

contienen *Bacillus pumilus* ES4 (sea en planta inoculada o en suelo inoculado sin planta) y por otro los tratamientos control no inoculados (Figuras 6, 7, 8, 9, 10, 11), por otro lado, el porcentaje de similitud entre los grupos de tratamientos inoculados de todos los ciclos, llego a ser en todas las réplicas de mínimo 80%, lo mismo ocurrió entre las réplicas de los tratamientos no inoculados.

Haciendo un análisis más detallado de los resultados, en los ciclos en general, la réplica 3 de SA, se comportó de manera diferente, formando un grupo aparte de los demás tratamientos, esto se atribuye a la técnica de DGGE debido a que era cagada en uno de los últimos carriles, donde sufría una deformación. Por otro lado, solo en la Figura 7 la cual muestra el ciclo 1 día 30, los controles donde no se inoculo *Bacillus pumillus*, (PA y SA) se mantuvieron dentro del mismo grupo pero sus réplicas mezcladas entre ellas.

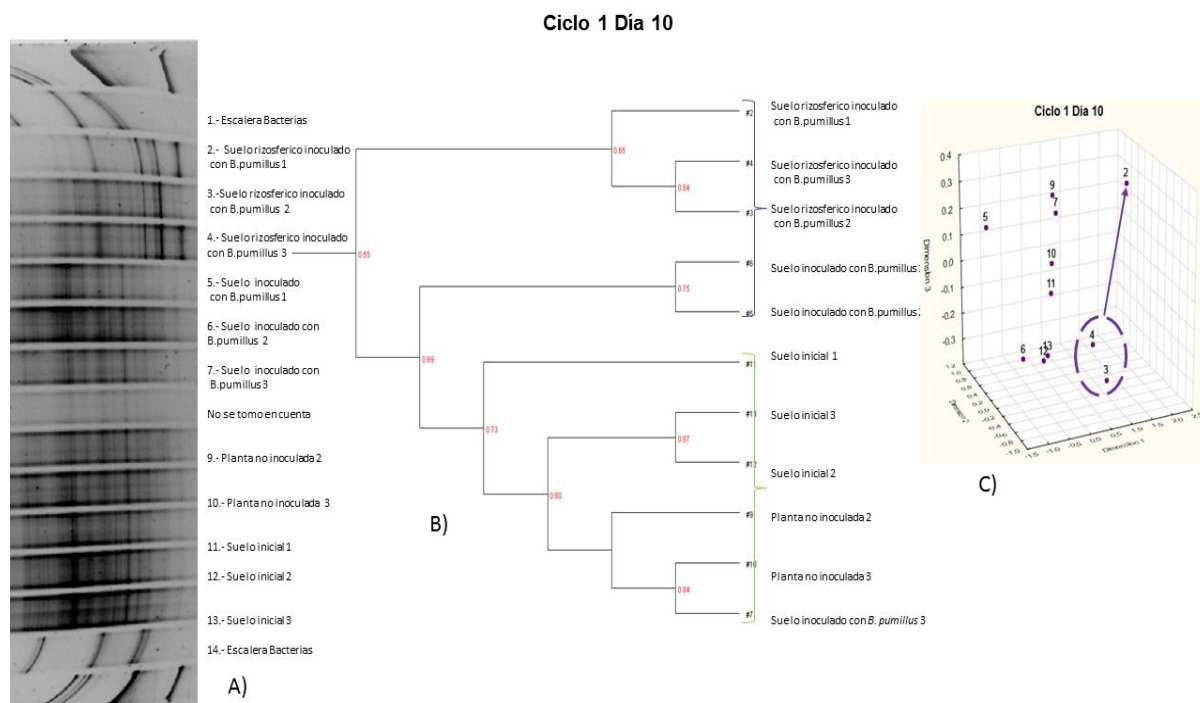


Figura 6. A) Gel en gradiente desnaturalizante Ciclo 1 día 10, B) Dendrograma coeficiente de DICE, C) Análisis NMDS en 3D del Ciclo 1 día 10.

Ciclo 1 Día 30

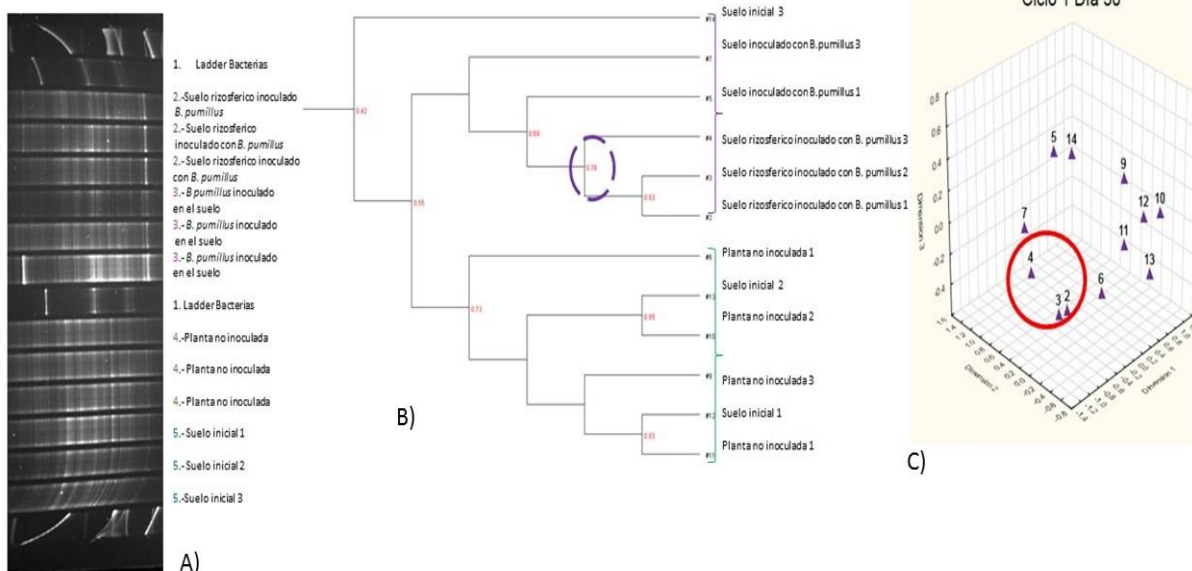


Figura 7. A) Gel en gradiente desnaturalizante (DGGE) Ciclo 1 día 30, B) Dendrograma coeficiente de DICE, C) Análisis NMDS en 3D del Ciclo 1 día 30.

Ciclo 2 Día 10

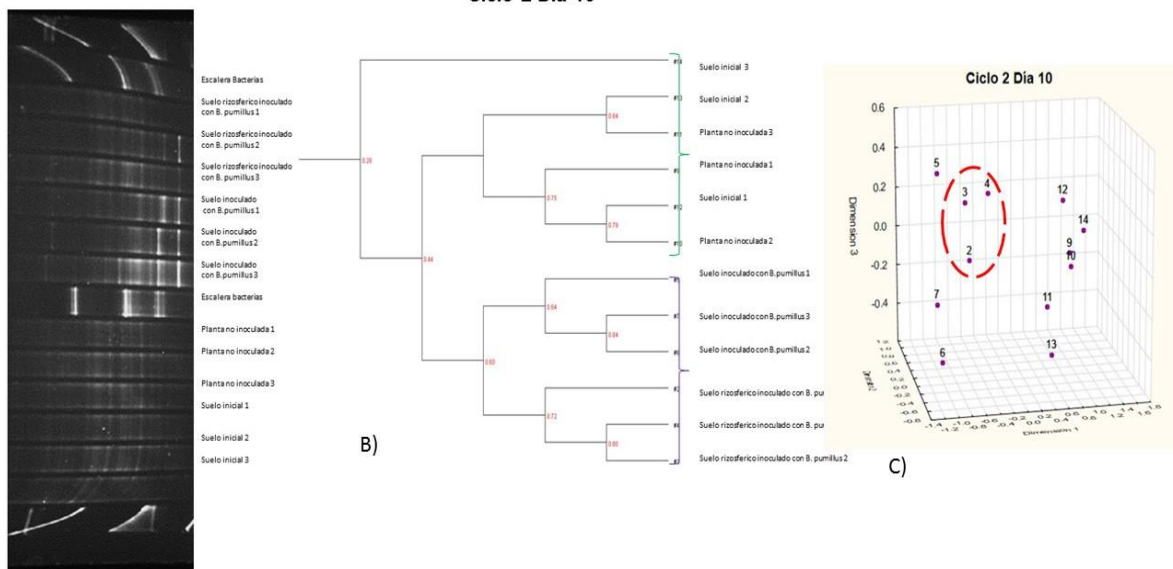


Figura 8. A) Gel en gradiente desnaturalizante (DGGE) Ciclo 2 día 10, B) Dendrograma coeficiente de DICE, C) Análisis NMDS en 3D del Ciclo 2 día 10.

Ciclo 2 día 30

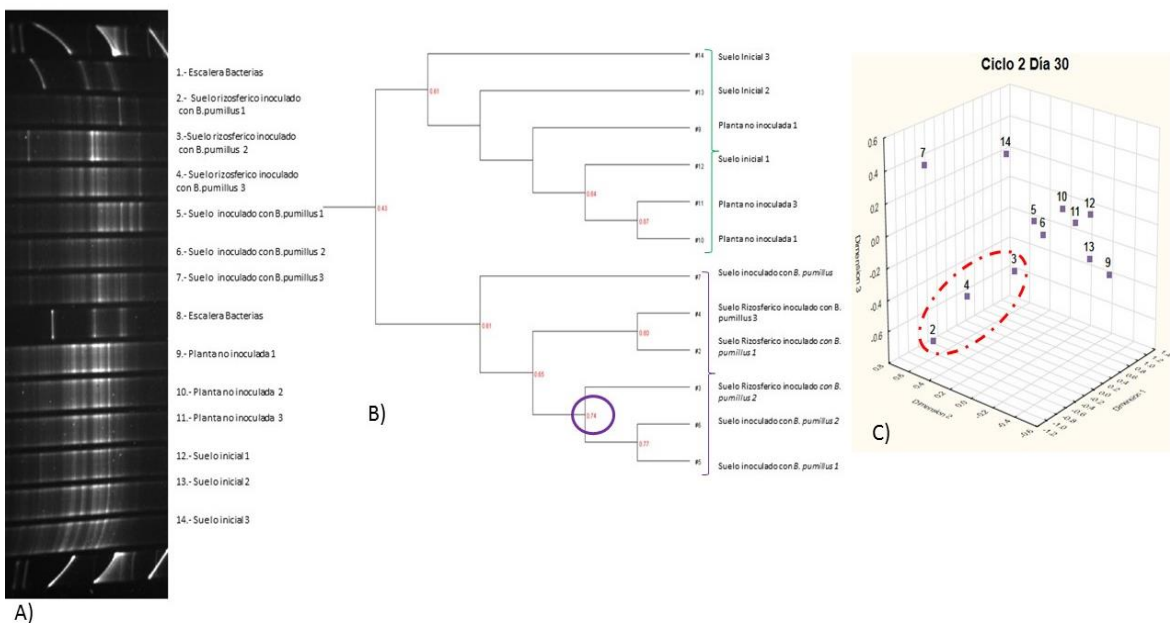


Figura 9. A) Gel en gradiente desnaturalizante (DGGE) Ciclo 2 día 30, B) Dendrograma coeficiente de DICE, C) Análisis NMDS en 3D del Ciclo 2 día 30.

Ciclo 3 día 10

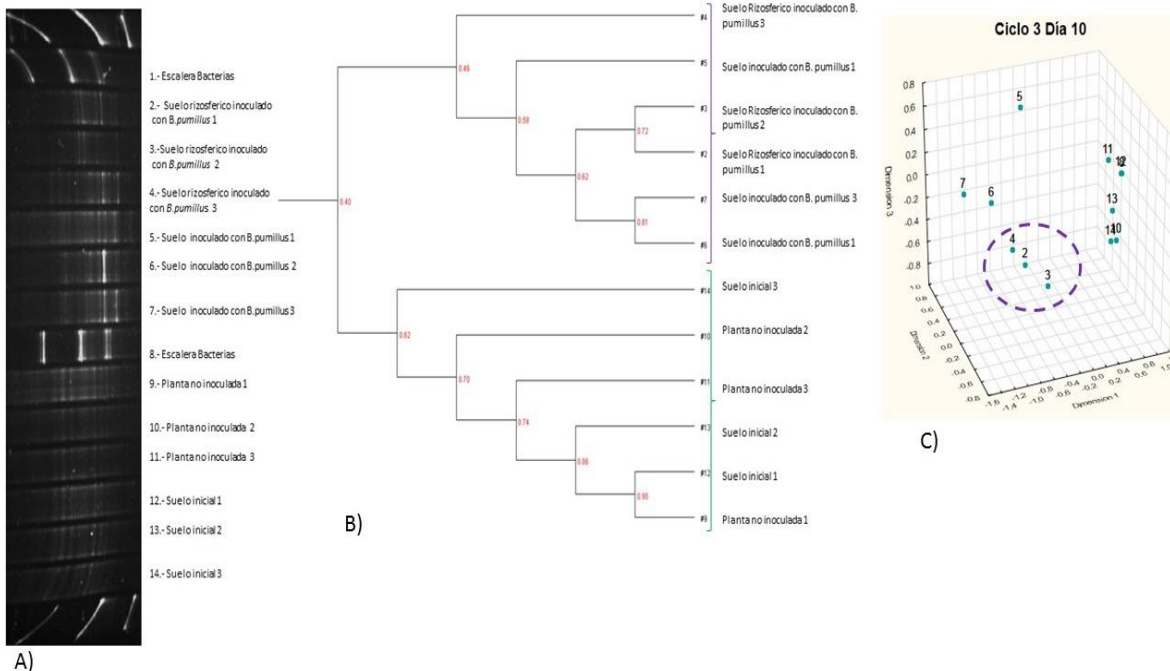


Figura 10. A) Gel en gradiente desnaturalizante (DGGE) Ciclo 3 día 10, B) Dendrograma coeficiente de DICE, C) Análisis NMDS en 3D del Ciclo 3 día 10.

Ciclo 3 día 30

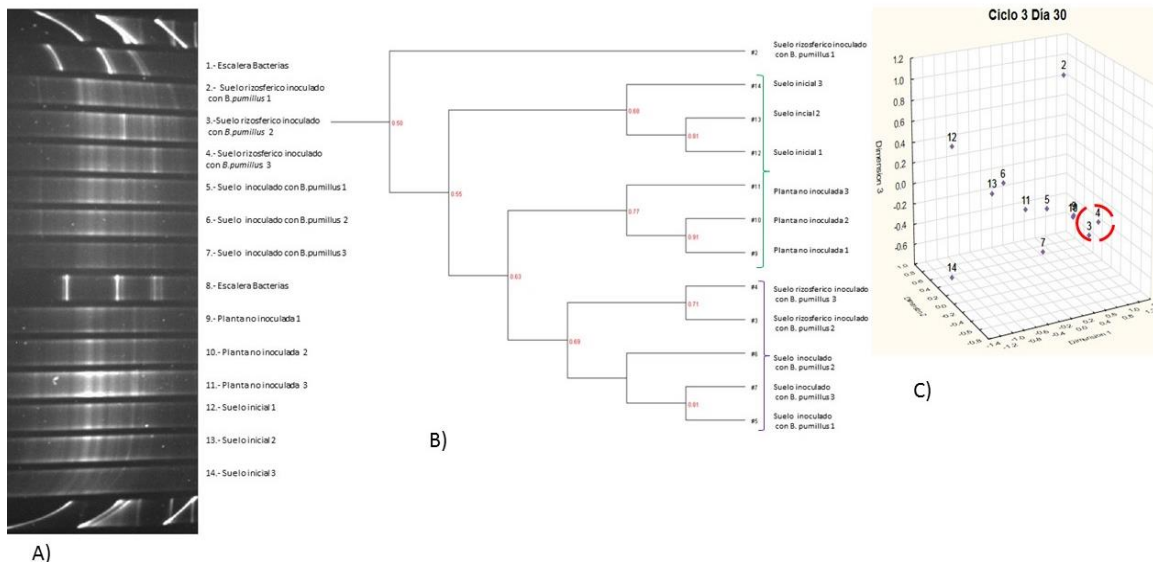


Figura 11.A) Gel en gradiente desnaturalizante (DGGE) Ciclo 3 día 30, B) Dendrograma coeficiente de DICE, C) Análisis NMDS en 3D del Ciclo 3 día 30.

Los resultados de los análisis realizados para el segundo experimento son similares a los presentados, y solo confirman el patrón ya descrito.

8.4 Pirosecuenciación 454

Para conocer los *Phyla* nativos, y saber si estos eran los que se veían beneficiados o perjudicados al introducir un inoculante bacteriano, se utilizó la técnica de secuenciación paralela 454. Para llevar a cabo los análisis de esta técnica se tomaron muestras de todos los ciclos analizados y se hizo una muestra compuesta de suelo. En Figura 12 se presenta la distribución de los principales *Phyla* de acuerdo a la distribución de sus OTUS y los que fueron $\leq 3\%$ están contenidos en baja abundancia. En el tratamiento de suelo rizosférico inoculado con *B. pumilus* ES4 (BPUM) se encontraron 3970 OTUS seguido, en número por el tratamiento de suelo rizosférico de mezquite (PA) con 3568 OTUS, el control del suelo inicial (SA) con 2709 OTUS y por último el tratamiento de suelo inoculado con *B. pumilus* ES4 (BPA) con un total de 1723 OTUS.

Dentro del análisis específico de *Phyla* presente en la Figura 12, se puede observar que en el tratamiento de BPUM el *Phylum Proteobacteria* se vio favorecido con respecto a SA, llegó a tener la distribución del 70%, lo cual quiere decir que este aumento un 50%, debido a que al inicio solo se contaba con un 32% de *Proteobacterias*. Asimismo se puede observar la disminución del *Phylum Actinobacteria*, al estar presente el mezquite y la bacteria los OTUS de este *Phylum* se ven disminuidos casi en su totalidad disminuyendo de un 45% a un 3%. De manera similar, en los controles PA y BPA la cantidad de *Actinobacterias* se vio disminuida, quedando con un 15 y 16% respectivamente.

Otro caso muy interesante es el del *Phylum Firmicutes*, el cual a pesar de ser adicionado al suelo (*Bacillus pumilus* pertenece a este filo) se ve disminuido un 60% BPUM lo mismo sucede en el tratamiento BPA donde la población cae hasta un 5%.

Un *Phylum* que solo aparece en los tratamientos que tienen *Bacillus pumilus* o planta (BPUM, BPA y PA) es el de *Acidobacteria* con un 5%, el de mayor distribución en el tratamiento PA.

Bacteroidetes es un *Phylum* que de igual forma aumenta en los tratamientos con planta y bacteria, debido a que en el suelo inicial su presencia era de tan solo del 3% hasta llegar a un 17% en el tratamiento BPUM.

El *Phylum Gemmatinomatetes* solo se vio representado en los tratamientos BPUM y SA, donde tras la inoculación aumento un 2% en el tratamiento BPUM.

Un *Phylum* que solo se mostró en el tratamiento BPA fue Tm7 (candidate división) con un 12% de la distribución total de OTUS.

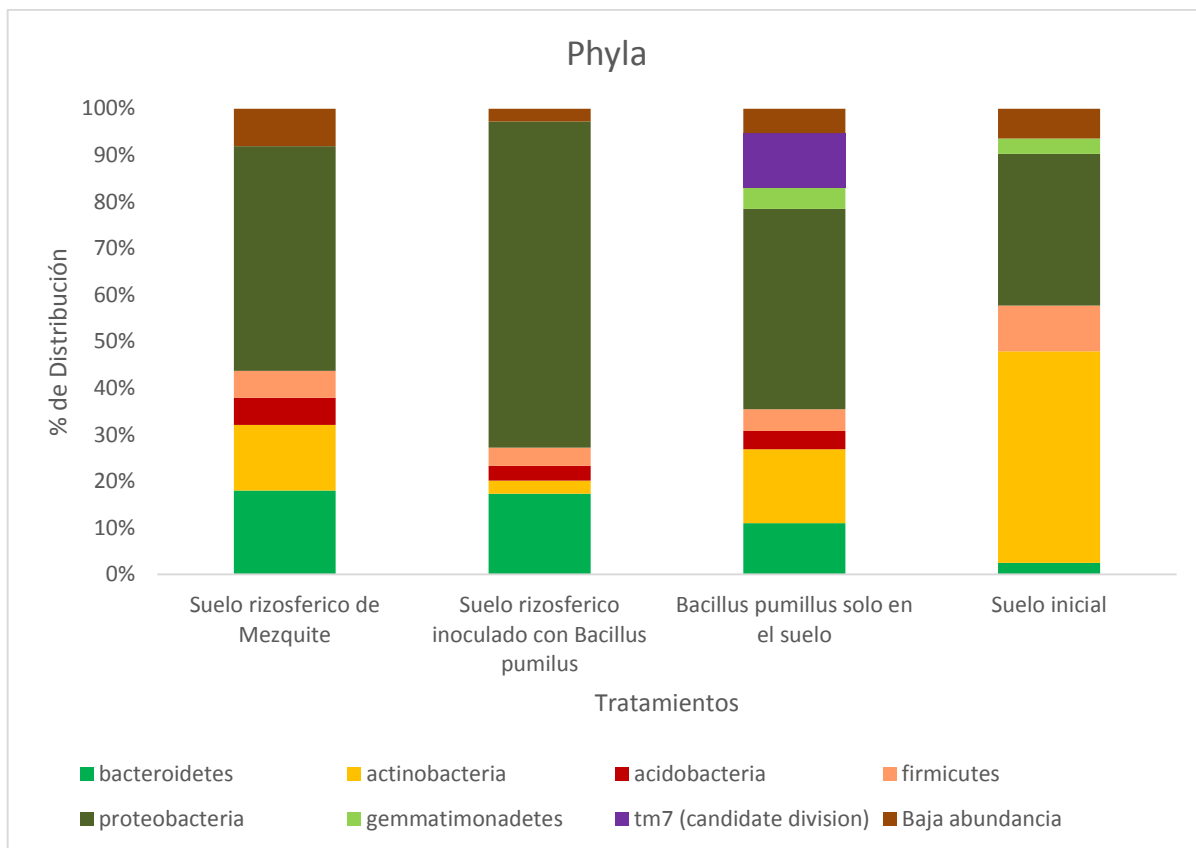


Figura 12. Composición de diferentes *Phyla* de las secuencias del 16S rRNA de Bacteria del experimento 1. Baja abundancia (secuencias por grupo $\leq 3\%$).

En la Figura 13 se representan las Clases presentes. La clase *Bacilli* aparece en todas las columnas y no tiene una variación muy grande en el porcentaje entre los tratamientos.

Asimismo, podemos observar que las clases *Alphaproteobacteria* y *Betaproteobacteria* aumentaron con respecto al control SA donde solo se encontraban un 17% y 5% respectivamente; el aumento es mayor en el tratamiento BPUM donde *Alphaproteobacteria* llega a 31% y *Betaproteobacteria* alcanza un 18%. Caso contrario y como fue descrito anteriormente, las *Actinobacterias* se ven reducidas abruptamente al introducir al suelo Mezquite y bacteria.

De igual forma podemos observar que la variedad de OTUS inicial es tan solo de 6 mayores al 3%, donde el tratamiento BPA presento mayor variedad de OTUS que fueron 10, seguido por los OTUS que conforman el tratamiento PA que son 9 y finalmente se tiene el tratamiento de BPUM donde su riqueza de OTUS es de 8.

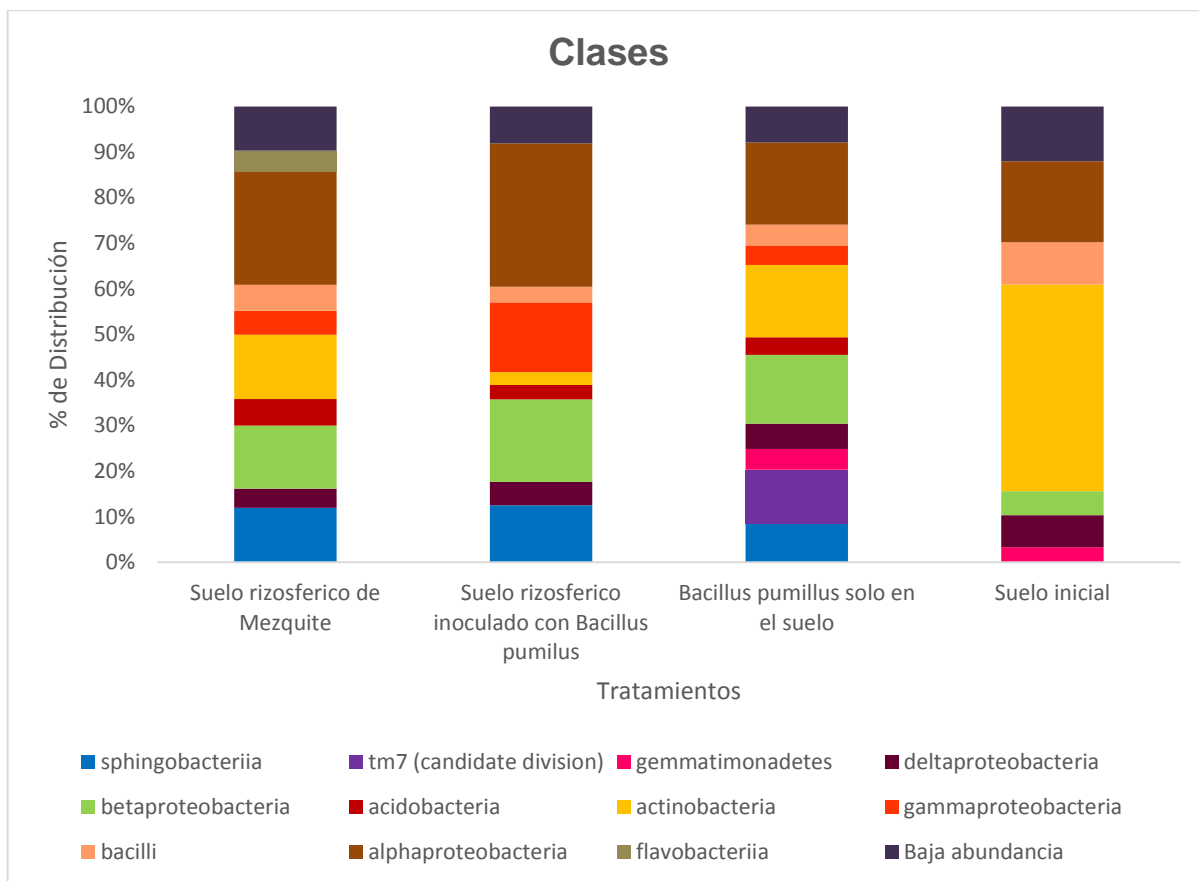


Figura 13. Abundancia de Clases bacterianas detectadas por pirosecuenciación del 16S rRNA. Se muestran los porcentajes $\geq 3\%$.

Por otro lado se encontraron 61 Órdenes y 5 Órdenes no determinados. Debido a que *Bacillus pumilus* ES4 hace parte de la Clase *Bacilli*, se hizo un análisis específico de esta (Figura 14). Se observa que los porcentajes de riqueza de OTUS son dominados en todos los tratamientos por las familias *Bacillaceae* y *Paenibacillaceae*.

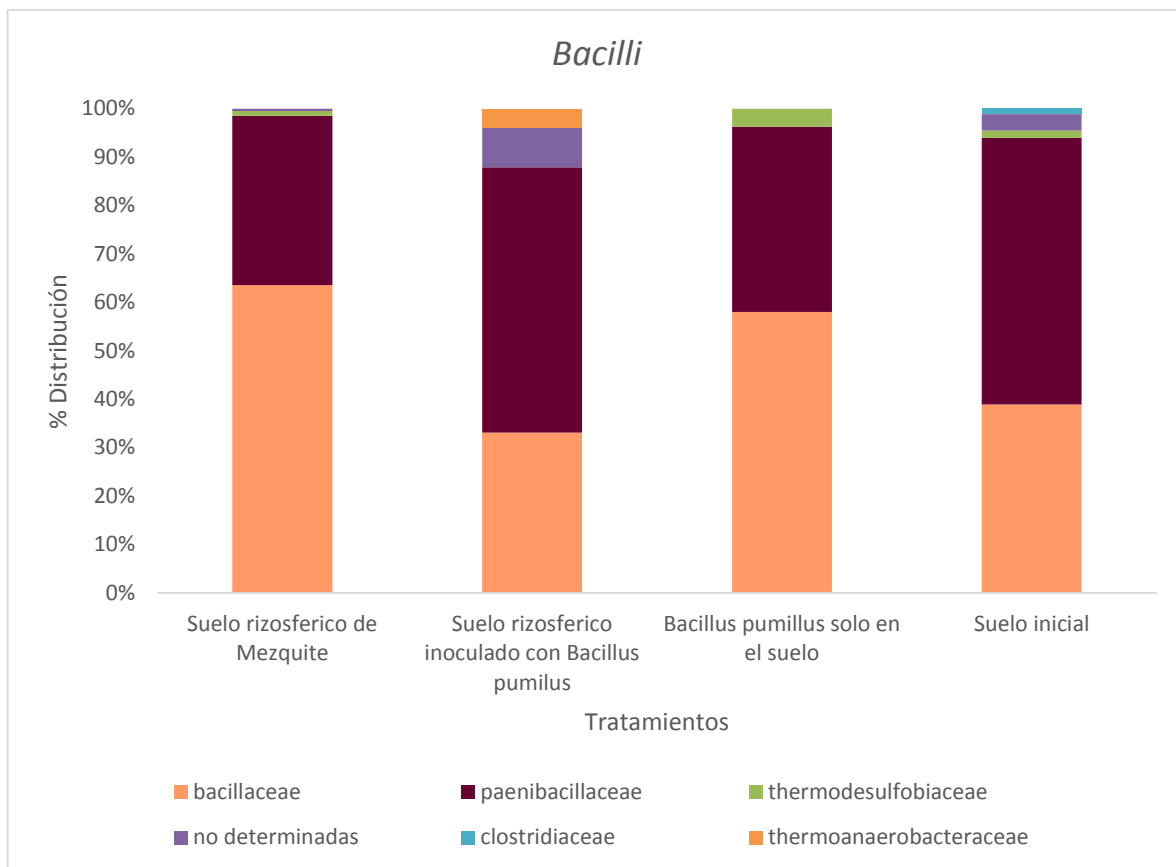


Figura 14. Composición de la familia *Bacilli* de las secuencias del 16S rRNA de Bacteria del experimento 1. Baja abundancia (secuencias por grupo $\leq 2\%$).

8.5 Patrón de colonización mediante Hibridación fluorescente *in situ* (FISH).

Para demostrar el patrón de colonización fue necesario utilizar el conjunto de las técnicas de inclusión en resina y cortes histológicos, así como la hibridación fluorescente *in situ*. Con la información que se obtuvo con el conjunto de estas técnicas, se describió un posible patrón de colonización por parte de *Bacillus pumilus* ES4, así mismo se utilizaron las imágenes más representativas para describir el patrón de colonización.

En la Figura 13 se muestran esferas del inoculante utilizado para inocular las plantas y el suelo durante el experimento. En la Figura 15 A) se observan las bacterias con sonda específica BPUMFITC, en la Figura 15 B) se observan las bacterias hibridadas

con la sonda EUBMIX. Esta hibridación permite confirmar que pertenecen al dominio bacteria. Por último, la imagen en amarillo-dorado (Figura 15C) es la suma de las dos imágenes sobrepuestas, lo cual es una última confirmación de que la hibridación se llevó a cabo exitosamente. Este paso se llevó a cabo para tener la certeza de que el inoculante estaba hibridando correctamente.

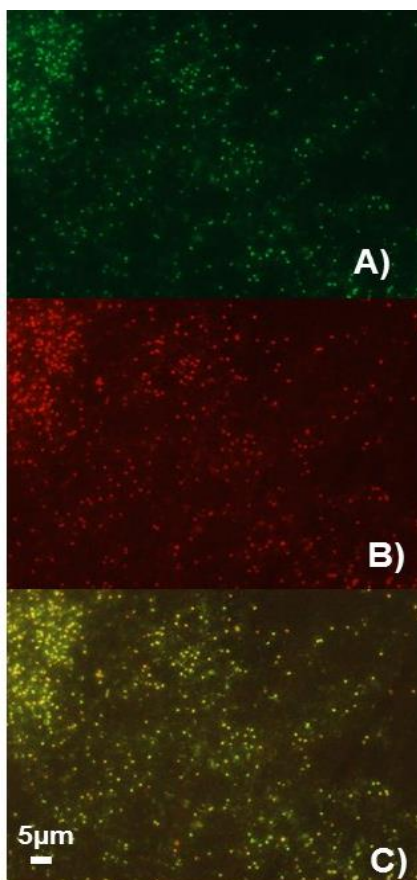


Figura 15. Esferas disueltas de *Bacillus pumilus* ES4, toma a 100x en microscopio óptico de fluorescencia. A) Filtro FITC, B) Filtro Cy3, C) Imágenes sobrepuestas.

En la Figura 16 se pueden observar, la colonización en la zona de elongación hacia la zona apical y agrupaciones de bacterias con un mucigel el cual dificulta la entrada de la sonda BPUMFITC y reduce considerablemente su fluorescencia.

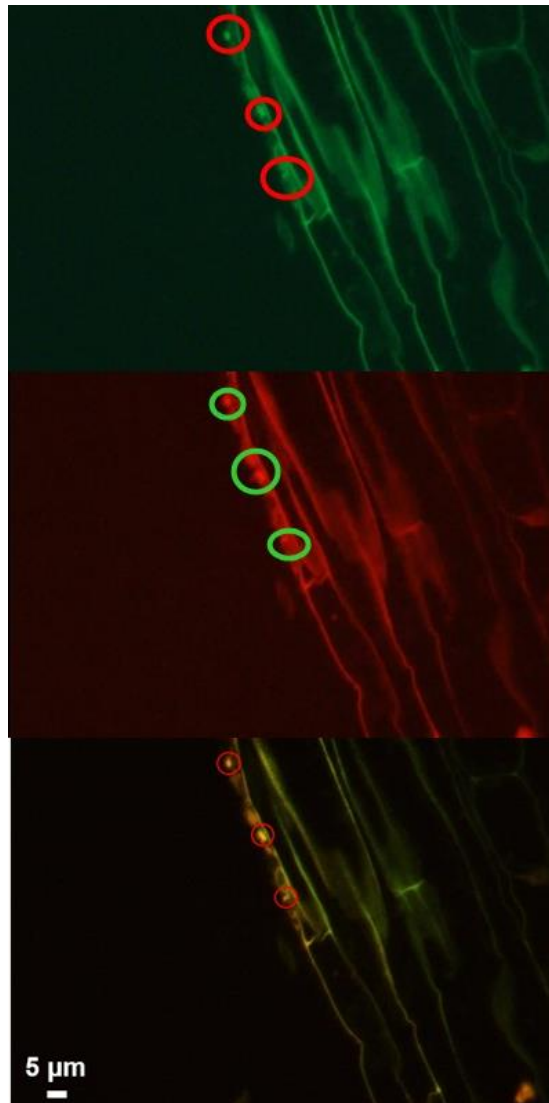


Figura 16. Colonización de *Bacillus pumilus* en la zona de elongación de mezquite, Ciclo 1 día 10. Imágenes al microscopio de fluorescencia. A) Filtro FITC, B) Filtro Cy3, C) Imágenes sobrepuestas. Los círculos muestran las zonas donde se observa *B. pumilus*.

La Figura 17, muestra raíces del ciclo 2 día 10. Se observan un conjunto en aglomerados de mucigel en la zona de elongación de la raíz hacia la zona apical, en estos dos ciclos se ha repetido el patrón observado anteriormente.

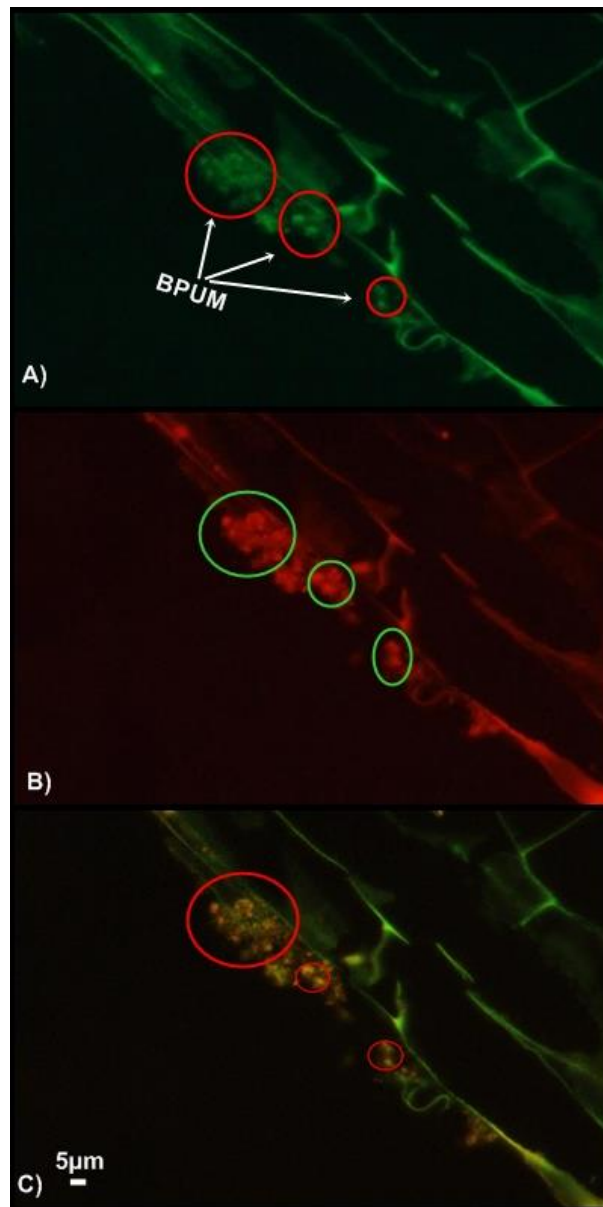


Figura 17. Colonización de *Bacillus pumilus* en la zona de elongación de mezquite, Ciclo 2 día 10. Imágenes al microscopio de fluorescencia. A) Filtro FITC, B) Filtro Cy3, C) Imágenes sobrepuesta. Los círculos muestran las zonas donde se observa *B. pumilus*.

En la figura 18 está representada la colonización de *Bacillus pumilus* ES4 en una zona de división celular cercano a la zona de la cofia, esto se puede deducir debido a la conformación en la que se encuentra y se puede apreciar el tejido vegetal en su estructura.

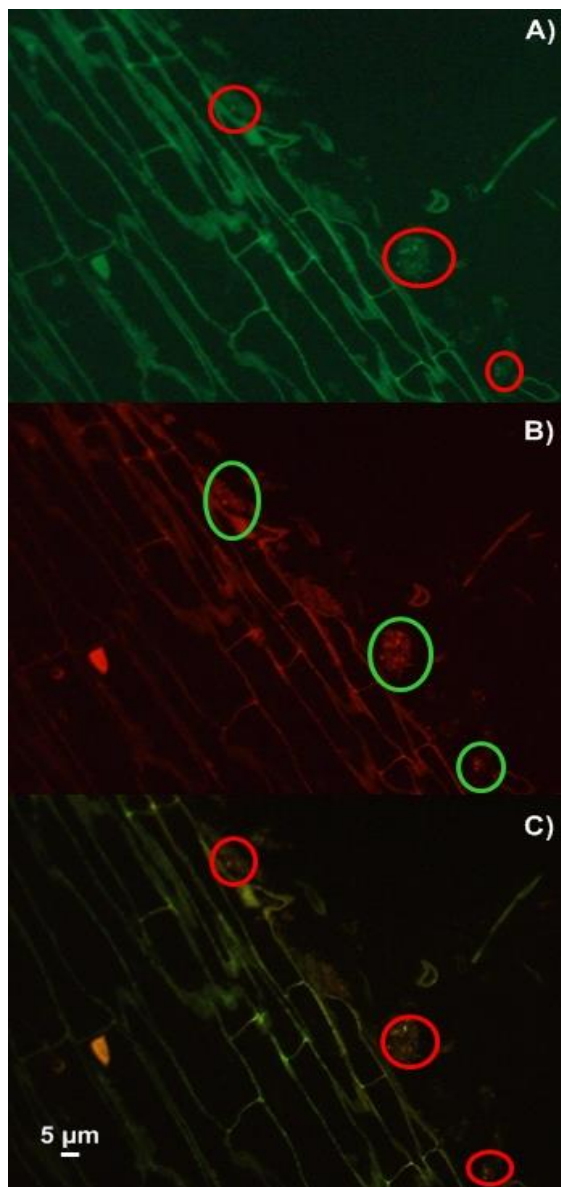


Figura 18. Colonización de *Bacillus pumilus* en la zona de elongación cercano a la cofia de mezquite, Ciclo 3 día 10. Imágenes al microscopio de fluorescencia. A) Filtro FITC, B) Filtro Cy3, C) Imágenes sobrepuesta. Los círculos muestran las zonas donde se observa

La Figura 19 muestra raíces del tratamiento de planta no inoculada (Figura 19). En la Figura 19 A), se puede ver en verde una zona de desprendimiento celular y en Figura 19 B), se observa en toda la zona de desprendimiento una colonización masiva de bacterias (no *Bacillus pumilus*) en el rizoplano de mezquite. De la misma manera, en la Figura 19C), se muestra la evidencia de colonización de rizobacterias diferentes a *Bacillus pumilus* sobre la raíz secundaria.

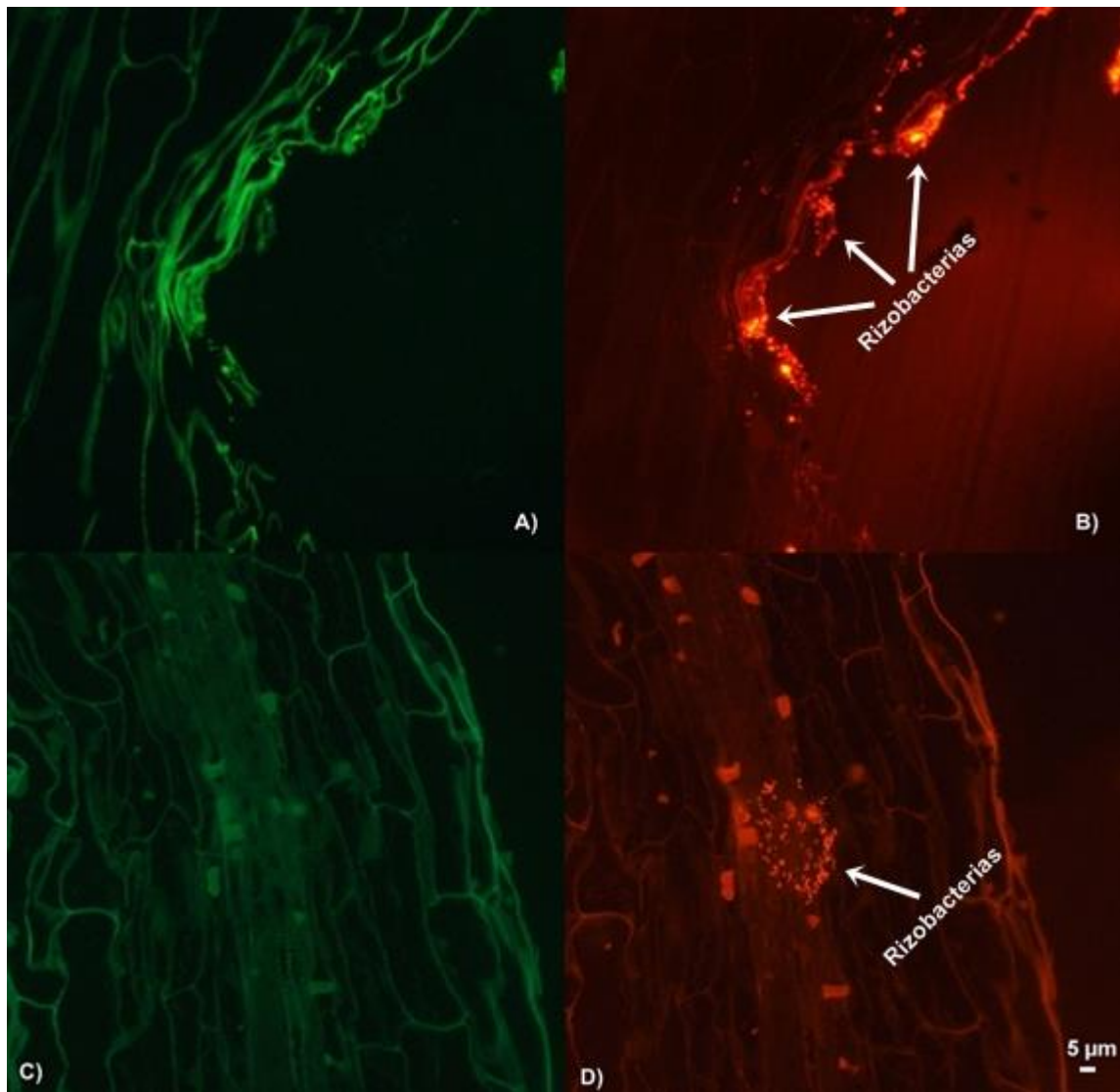


Figura 19. Colonización de bacterias nativas del suelo del desierto. A) Zona de desprendimiento celular hacia la cofia en sonda FITC. B) Zona de desprendimiento celular hacia la cofia en sonda EUB MIX. C) Raíz secundaria sobre zona de elongación de raíz principal con filtro FITC, D) Raíz secundaria sobre zona de elongación de raíz principal con sonda EUBMIX.

9. DISCUSIÓN

La interrelación planta-suelo es un tema de interés en la ecología y la agricultura cómo es de nuestro conocimiento los microorganismos en la rizósfera de plantas dominan los ciclos de los nutrientes en los sistemas suelo-planta. Los microorganismos de la rizósfera incrementan la habilidad de las plantas para adquirir nutrientes del suelo ya sea incrementando la extensión de su sistema radicular, o en la solubilización de macronutrientes como son fosforo o azufre (Smith y Read, 1997), de igual forma las bacterias que se asocian con las raíces de las plantas y tienen un efecto positivo en ellas son llamadas PGPB (Schwartz *et al.*, 2013); teniendo en cuenta que para este estudio se utilizó la PGPB *Bacillus pumilus* ES4 se pudieron observar las diferencias entre las plantas inoculadas con BPUM contra las que solo estaban en el suelo inicial el cual solo contenía la comunidad nativa de bacterias. El efecto de la inoculación se vio en el incremento de su biomasa, tanto en peso seco de raíz como en peso seco de la parte aérea, coincidiendo con lo que mencionan Bashan y Dubrovsky (1996) que el aumento de la biomasa vegetal en toda la planta es un efecto común de las PGPB. Por otro lado, la longitud de raíz mostró lo contrario, las raíces no inoculadas fueron más largas; no obstante, el que las plantas inoculadas no hayan elongado mas su raíz principal es debido a que uno de los efectos causados por las PGPB es la modificación de la estructura de la raíz, induciendo una reducción del crecimiento de la raíz principal y favoreciendo el crecimiento y desarrollo de las raíces secundarias y pelos radicales (Vacheron *et al.*, 2013).

Tomando en cuenta que el objetivo de este trabajo fue analizar cómo cambia la comunidad bacteriana del suelo, debido a la inoculación de *B. pumilus* ES4, los resultados muestran que la comunidad cambia con respecto al tratamiento sin inoculación (SA), y los cambios en la estructura de la comunidad que pueden ser atribuidos exclusivamente a *Bacillus pumilus* ES4, ya que los cambios en la

estructura se ven aun en ausencia de mezquite, lo cual refuta a estudios previos los cuales reportan que no existe diferencia o solo una mínima diferencia entre el suelo rizosférico y la mayoría del suelo (Normander y Prosser, 2000) Por otro lado los resultados concuerdan con lo reportado por de-Bashan *et al.*, (2010a) y López *et al.*, (2013) quienes observan un cambio en la estructura de la comunidad bacteriana por la adición de un inoculante, clasificándolo como beneficioso para las plantas, debido a los parámetros de crecimiento y biomasa que las plantas desarrollaron, cuando las PGPB utilizadas estuvieron presentes en la rizósfera de las plantas.

Con el análisis de la estructura de la comunidad bacteriana utilizando el coeficiente de similitud de Dice, pudimos observar que tan parecidos eran los tratamientos. Sin embargo, con los análisis de pirosecuenciación, se logró identificar quienes participaban en este cambio en la estructura de la comunidad, como está conformada y como cambia por efecto del inoculante *B. pumilus* ES4 en el suelo. Un total de 11970 OTUS fueron obtenidos, donde, el tratamiento BPUM es el que obtuvo un mayor número OTUS con 3970 en contra de 2709 encontrados en SA, con esto podemos notar en primera instancia que el cambio en la estructura es genuino y es atribuido al inoculante, el incremento de riqueza de OTUS después de la inoculación puede deberse al incremento en el contenido de materia orgánica (Trejo *et al.*, 2012).

Los *Phyla* más representativos fueron *Proteobacterias*, *Firmicutes*, *Actinobacterias*, *Gemmatinomadetes*, *Bacteroidetes*, Tm7 (candidate división) y *Acidobacterias*; concordando con lo reportado por Lundwing y Klenk (2001). Los *Phyla* más abundantes en el suelo son todos los mencionados anteriormente: No es claro a que corresponde el *Phyla* TM7 (candidate división), puede ser nuevo *Phylum* aún no es descrito completamente.

En la distribución de OTUS el *Phylum* que se vio favorecido en gran medida en el tratamiento BPUM con respecto a SA es *Proteobacteria*, las cuales desplazaron la presencia del *Phylum Actinobacteria*, de ser el OTU dominante en el suelo inicial

quedo solo con porcentaje de OTUS del 3%, esto puede ser debido a que la presencia constante de agua (esto, está asociado al riego que se le daba a la planta) en los suelos no es favorable para el crecimiento de actinomicetos, mientras que los suelos del desierto y de las zonas áridas y semiáridas sustentan poblaciones considerables, probablemente debido a la resistencia de las esporas a la desecación (Varma y Buscot, 2005), por esa razón se encuentran en su gran mayoría en el suelo inicial. En los demás controles PA y BPA se observó un decremento en *Actinobacterias* y un aumento en el *Phylum Proteobacteria*.

El *Phylum Firmicutes*, al cual pertenece *B. pumilus*, representa una pequeña cantidad de OTUS dentro del porcentaje el 9% en SA, un 4% en el tratamiento BPUM y en los demás controles permaneció constante en 5%; sin embargo, es posible que este *Phylum* este sub-representado debido a que son bacterias Gram positivas y la lisis de su pared y esporas es muy complicada y en ocasiones no es exitosa; por lo que hasta que la evidencia para un sesgo esté disponible, los miembros de este *Phylum* deben ser considerados como componentes relativamente menores de las comunidades de bacterias del suelo (Janssen, 2006).

Un caso interesante es el del *Phylum Acidobacteria*, el cual solo aparece en los tratamientos BPUM, BPA y PA. La diversidad filogenética, ubicuidad y abundancia de este grupo, en particular en los hábitats del suelo, sugieren un papel ecológico importante y amplia versatilidad metabólica. Sin embargo, la información genética y fisiológica sobre *Acidobacteria* es escasa (Quaiser *et al.*, 2003, Barns *et al.*, 2007).

En términos de Clases, en el tratamiento BPUM se presentan las Clases alpha, beta, gamma y delta *Proteobacteria* en forma homogénea, mientras que en el tratamiento SA solo aparecen las clases alpha, beta y gamma en forma muy irregular, esto coincide con lo reportado en la literatura donde la clase *Alphaproteobacteria* es el grupo más grande y diverso del dominio bacteria, y algunos dentro de esta clase son los encargados de la fijación de nitrógeno, así mismo es llamada la más abundante en el suelo (Janssen, 2006, Madigan y Martinco, 2005).

Por otra parte, la clase *Bacilli*, a la cual pertenece la especie *B. pumillus* ES4, está representada por un 3% del total de OTUS en el tratamiento BPUM y es inferior en comparación con el SA, sin embargo, la riqueza de OTUS en este nivel taxonómico es más diverso y heterogéneo que en el SA, por lo que es presuntivo que suceda una disminución en su presencia

Dentro de la Clase *Bacilli*, las familias dominantes fueron *Bacillaceae* y *Paenibacillaceae* en todos los tratamientos; sin embargo en el tratamiento BPUM se encuentran familias que no son visibles en los demás tratamientos como lo son *Thermoanaerobacteraceae* con un porcentaje que fue de 4%, esta familia se distingue por ser anaerobia, Gram +, formadora de esporas y heterótrofas (Stackebrandt, 2014), así mismo se obtuvo un porcentaje del 8% de OTUS no determinados. La familia *Paenibacillaceae*, está presente en mayor porcentaje en el tratamiento BPUM y no se observa ningún cambio con respecto al suelo inicial, pero si una disminución para la familia *Bacillaceae*, sin embargo, en el tratamiento BPUM, otros OTUS aparecieron en contraste con el SA. Se han nombrado a los miembros del genero *Bacillus* y *Clostridium*, como miembros comunes de la comunidad bacteriana del suelo (Felske *et al.*, 2000), por lo que la presencia del inoculante en la rizósfera de mezquite provoca un cambio incluso dentro de su misma familia, estimulando el crecimiento de otras familias. Por otro lado, es importante no perder de vista, los factores fisicoquímicos (pH, temperatura, elementos químicos como boro, fosforo), así como el genotipo de la planta , tipo de suelo y la morfología de la raíz, los cuales pueden estar afectando a la comunidad bacteriana (Lauber *et al.*, 2009; Chodak *et al.*, 2013, Preem *et al.*, 2012, Dalmastri *et al.*, 1999; Reis *et al.*, 2001; Marschner *et al.*, 2004).

Un parámetro importante a determinar cuándo se inoculan plantas con PGPBs es que la bacteria colonice efectivamente la raíz de la planta (Lugtenberg y Kamilova, 2009) y los resultados obtenidos mediante la técnica FISH, revelaron el patrón de colonización *B. pumilus* en el rizoplano de mezquite durante sus primeros 10 días de inoculación en el suelo. De esta manera, se observan congregaciones de

bacterias dentro de matrices de exopolisacáridos (mucigel) visibles en las microscopias fluorescentes. Estudios de colonización en raíces de remolacha reportan que la fluorescencia se disminuye debido a que las PGPB se agregan en microcolonias y crean un mucigel (Lübeck *et al.*, 2000). Trejo *et al.* (2012) menciona que *Azospirillum brasilense* (una reconocida PGPB) coloniza la zona apical y las zonas de elongación de las raíces de sorgo, para *B. pumilus*, los resultados obtenidos en este trabajo, sugieren una colonización similar, concentrándose principalmente hacia la zona apical y en donde existen zonas de división celular cercanos a la coifa. De manera contraria, las rizobacterias nativas colonizan en gran medida toda la zona de elongación de la planta, no se observaron en matrices de exopolisacáridos como la PGPB en cuestión (Figura 18) por lo que es posible que debido a que no forman un mucigel como las PGPB son más fácilmente visibles. Durante este trabajo, se optimizaron la visualización y mapeo de las raíces, debido a la implementación de la técnica de inclusión en resina y cortes histológicos, lo cual disminuyó sustancialmente la autofluorescencia que emiten las raíces de mezquite y se logró una ubicación más certera de las bacterias en el rizoplaneo. No hay reportes en literatura de que este procedimiento se haya realizado previamente en raíces, por lo que resulta ser novedoso y muy útil para ayudar a explicar más claramente el fenómeno de colonización de los inoculantes y las rizobacterias, por lo que este trabajo propone la técnica de histología en conjunto con la de Hibridación Fluorescente *in situ*, con los ajustes pertinentes para cada tipo de raíz a analizar.

10. CONCLUSIONES

- La PGPB *Bacillus pumilus* ES4 aumentó la biomasa de la raíz y parte aérea del mezquite, además de evitar que manifestara un tipo de estrés visible, durante su desarrollo.
- Los resultados comprueban la Hipótesis planteada, de que la inoculación con *B. pumilus* ES4 afecta a estructura de la comunidad bacteriana en un suelo de baja fertilidad.
- Los OTUS que se obtuvieron en la técnica de pirosecuenciación, confirman lo obtenido en los análisis de DGGE, donde se muestra un cambio en la comunidad bacteriana con respecto al suelo inicial, en los tratamientos inoculados con *Bacillus pumilus* ES4.
- El patrón de colonización de *B. pumilus* ES4 se observó hacia la zona apical de la raíz y en la zona de división celular y forman una cantidad capa densa de mucigel.
- La técnica de histología y FISH fue fundamental, para poder ubicar al inoculante en la raíz en el microscopio de epifluorescencia.

Perspectivas

- Para tener conocimiento en su totalidad o muy cercana a ella, se deben considerar los factores bióticos y abióticos, que están involucrados en el ecosistema estudiado.
- El asociar el análisis de como las comunidades de los otros dos dominios, *Arquea* y *Eukarya*, se ven modificadas en su estructura, daría una aproximación muy real y complementaria lo observado en las comunidades bacterianas.
- El mejoramiento en la implementación de las técnicas de histología y FISH, podrán ofrecer una búsqueda más expansiva del inoculante en la raíz.
- El aislamiento de otros microorganismos nativos del desierto que puedan promover el crecimiento, en los suelos degradados del desierto.

11. LITERATURA CITADA

- Almanza, S.G., Moya, E.G. 1986. The uses of mesquite (*Prosopis spp.*) in the highlands of San Luis Potosi, Mexico. *Forest Ecol Manag.* 16(1-4): 49–56.
- Amann, R.L., Ludwig, W., Schleifer, K.H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.* 59(1): 143–169.
- Barns, S.M., Cain, E.C., Sommerville, L., Kuske, C.R. 2007. *Acidobacteria phylum* sequences in uranium-contaminated subsurface sediments greatly expand the known diversity within the phylum. *Appl Environ Microbiol* 73(9): 3113–3116.
- Bashan, Y. 1986. Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth. *Appl Environ Microbiol* 51(5): 1089–1098.
- Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotech Adv.* 16(4): 729–770.
- Bashan, Y., Davis, E.A., Carrillo-García, A., Linderman, R.G. 2000. Assessment of VA mycorrhizal inoculum potential in relation to the establishment of cactus seedlings under mesquite nurse-trees in the Sonoran Desert. *Appl Soil Ecol.* 14(2): 165–175.
- Bashan, Y., De-Bashan, L. 2004. *Encyclopedia of Soils in the Environment.* Elsevier.
- Bashan, Y., Dubrovsky, J. 1996. *Azospirillum spp.* participation in dry matter partitioning in grasses at the whole plant level. *Biol Fert Soils.* 23(4): 435–440.
- Bashan, Y., Hernández J.P., Leyva, L.A., Bacilio M. 2002. Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biol Fert Soils.* 35(5): 359–368.

- Bashan, Y., Holguin, G. 1998. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biol Biochem.* 30(8-9): 1225–1228.
- Bolton, H. Jr., Fredrickson, J. K., Elliot, L. 1992. *Microbial ecology of the rhizosphere.* Marcel Dekker Inc.
- Boon, N., Windt, W., Verstraete, W., Top, E. M. 2002. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS Microbiol Ecol.* 39(2): 101–12.
- Breakwell, K., Tetu, S.G., Elbourne, L.D. 2014. Next generation barcode tagged sequencing for monitoring microbial community dynamics. *Methods Mol Biol.* 1096: 101–10.
- Campbell, B.J., Polson, S.W., Hanson, T.E., Mack, M.C., Schuur, E.A. 2010. The effect of nutrient deposition on bacterial communities in Arctic tundra soil. *Eviron Microbiol.* 12(7): 1842–54.
- Campbell, J.H., Clark, J.S., Zak, J.C. 2009. PCR-DGGE comparison of bacterial community structure in fresh and archived soils sampled along a Chihuahuan Desert elevational gradient. *Microb Ecol.* 57(2): 261–6.
- Carrillo-Garcia, Á., Bashan, Y., Bethlenfalvay, G.J. 2000(a). Resource-island soils and the survival of the giant cactus, cardon, of Baja California Sur. *Plant Soil.* 218(1-2): 207–214.
- Carrillo-Garcia, Á., Bashan, Y., Rivera, E.D., Bethlenfalvay, G.J. 2000(b). Effects of Resource-Island Soils, Competition, and Inoculation with *Azospirillum* on Survival and Growth of *Pachycereus pringlei*, the Giant Cactus of the Sonoran Desert. *Restoration Ecol.* 8(1): 65–73.

- Chodak, M., Gołębiewskib, M., Morawska-Płoskonkac, J., Kudukc, K., Niklińskac, M. 2013. Diversity of microorganisms from forest soils differently polluted with heavy metals. *Appl Soil Ecol.* 64: 7–14.
- de-Bashan, L.E., Hernandez, J.P., Bashan, Y., Maier, R.M. 2010(a). *Bacillus pumilus* ES4: candidate plant growth-promoting bacterium to enhance establishment of plants in mine tailings. *Environ Exper Bot.* 69(3): 343–352.
- de-Bashan, L.E., Hernandez, J.P., Nelson, K.N., Bashan, Y., Maier, R.M. 2010(b). Growth of quailbush in acidic, metalliferous desert mine tailings: effect of *Azospirillum brasilense* Sp6 on biomass production and rhizosphere community structure. *Microb Ecol.* 60(4): 915–27.
- Edwards, R.A., Rodriguez-Brito, B., Wegley, L., Haynes, M., Breitbart, M., Peterson, D.M., Saar, M.O., Alexander, S., Alexander, E.C.Jr., Rohwer, F. 2006. Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology. *BMC genomics.* 7: 57.
- Felker, P., Bandurski, R.S. 1979. Uses and potential uses of leguminous trees for minimal energy input agriculture. *Econ Bot.* 33(2): 172–184.
- Felker, P., Guevara, J.C. 2003. Potential of commercial hardwood forestry plantations in arid lands—an economic analyses of *Prosopis* lumber production in Argentina and the United States. *Forest Ecol Manag.* 186(1-3): 271–286.
- Felske, A., Wolterink, A., Van Lis, R., De Vos, W.M., Akkermans, A.D. 2000. Response of a soil bacterial community to grassland succession as monitored by 16S rRNA levels of the predominant ribotypes. *Appl Environ Microbiol* 66(9): 3998–4003.

- Ferris, M., Muyzer, G., Ward, D. 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl Environ Microbiol* 62(2): 340–346.
- Giri, B., Giang, P.H., Kumari, R., Prasad, R., Sachdev, M., Garg, A.P., Oelmüller, R., Varma, A. 2005. Mycorrhizosphere: Strategies and Functions. In A. Varma & F. Buscot, eds. *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions Soil Biology*. Springer, Berlin, Heidelberg. 213–252p.
- Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol*. 41(2): 109–117.
- Head, I.M., Saunders, J.R., Pickup, R.W. 1998. Microbial Evolution, Diversity, and Ecology: A Decade of Ribosomal RNA Analysis of Uncultivated Microorganisms. *Microb Ecol*. 35(1): 1–21.
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., Wellington, E.M. 1997. Analysis of *actinomycete* communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl Environ Microbiol* 63(8): 3233–3241.
- Holt, J.G. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology* 9th Ed. Williams & Wilkins. Baltimore, USA:
- Huber, J.A., Welch, D.B., Morrison, H.G., Huse, S.M., Neal, P.R., Butterfield, D.A., Sogin, M.L. 2007. Microbial population structures in the deep marine biosphere. *Science*. 318(5847): 97–100.
- Janssen, P.H. 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 72(3): 1719–28.

- Kloepper, J., Metting, F.J. 1992. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. En: Metting B (ed) Soil microbial technologies. Marcel Dekker. New York, USA, 255–274p.
- Lauber, C.L., Hamady, M., Knight, R., Fierer, N. 2009. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl Environ Microbiol* 75(15): 5111–5120.
- Lopez, B.R., Bashan, Y., Trejo, A., de-Bashan, L.E. 2013. Amendment of degraded desert soil with wastewater debris containing immobilized *Chlorella sorokiniana* and *Azospirillum brasilense* significantly modifies soil bacterial community structure, diversity, and richness. *Biol Fert Soils*. 49(8): 1053–1063.
- Lübeck, P., Hansen, M., Sørensen, J. 2000. Simultaneous detection of the establishment of seed-inoculated *Pseudomonas fluorescens* strain DR54 and native soil bacteria on sugar beet root surfaces using fluorescence antibody and in situ hybridization techniques. *FEMS Microbiol Ecol*. 33(1): 11–19.
- Ludwig, W., Klenk, H.-P. 2001. Overview: A Phylogenetic Backbone and Taxonomic Framework for Prokaryotic Systematics. In D. Boone, R. Castenholz, & G. Garrity, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer. 8 th Ed. New York, USA. 49–65p.
- Lugtenberg, B., Kamilova, F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol*. 63(1): 541–556.
- Muyzer, G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr Opin Microbiol*. 2(3): 317–22.

- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59(3): 695–700.
- Muyzer, G., Smalla, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *A Van Leeuw J Microb* 73(1): 127–141.
- Myers, R.M., Maniatis, T., Lerman, L.S. 1987. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* 155: 501–27.
- Nicholson, S.E. 1978. Climatic variations in the Sahel and other African regions during the past five centuries. *J Arid Environ.* 3–24.
- Normander, B., Prosser, J.I. 2000. Bacterial Origin and Community Composition in the Barley Phytosphere as a Function of Habitat and Presowing Conditions. *Appl Environ Microbiol* 66(10): 4372–4377.
- Noy-Meir, I. 1973. Desert Ecosystems: Environment and Producers. *Annu Rev Ecol Syst.* 4(1): 25–51.
- Puente, M.E., Bashan, Y., Li, C.Y., Lebsky, V.K. 2004. Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. I. Root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biol.* 6(5): 629–42.
- Rhodes, D. 1993. Formulation of biological control agents. In D. Rhodes, (ed). *Exploitation of Microorganisms.* Springer. 411–439p.

- Rothballer, M., Schmid, M., Hartmann, A. 2003. In situ Localization and PGPR-Effect of *Azospirillum brasilense* Strains Colonizing Roots of Different Wheat Varieties. *Symbiosis*. 34(3): 261–279.
- Schoenborn, L., Yates, P.S., Grinton, B.E., Hugenholtz P., Janssen, P.H. 2004. Liquid serial dilution is inferior to solid media for isolation of cultures representative of the phylum-level diversity of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 70(7): 4363–6.
- Schwartz, A., Ortiz, I., Maymon, M., Herbold, C.W., Fujishige, N.A., Vijanderan, J.A., Villeda, W., Hanamoto, K., Diener, A., Sanders, E.R., DeMason, D.A., Hirsch, A.M. 2013. *Bacillus simplex*—A Little Known PGPB with Anti-Fungal Activity—Alters Pea Legume Root Architecture and Nodule Morphology When Coinoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Agronomy*. 3(4): 595–620.
- Smith, S.E., Read, D.J. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. 2nd Ed. Academic Press. San Diego, USA. 33-80p.
- Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Welch, D.M., Huse, S.M., Neal, P.R., Arrieta, J.M., Herndi, G.J. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103(32): 12115–20.
- Stackebrandt, E. 2014. The Family Thermoanaerobacteraceae. En: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F.(eds). *The Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg. Springer. 413–419p.
- Timmusk, S., Paalme, V., Pavlicek, T., Bergquist, J., Vangala, A., Danilas, T., Nevo, E. 2011. Bacterial distribution in the rhizosphere of wild barley under contrasting microclimates. *PLoS one*. 6(3): 17968.

- Trejo, A., de-Bashan, L.E., Hartmann, A., Hernandez, J.P., Rothballer, M., Schmid, M., Bashan, Y. 2012. Recycling waste debris of immobilized microalgae and plant growth-promoting bacteria from wastewater treatment as a resource to improve fertility of eroded desert soil. *Environ Exper Bot*, 75: 65–73.
- Tringe, S.G., von Mering, C., Kobayashi, A., Salamov, A.A., Chen, K., Chang, H.W., Podar, M., Short, J.M., Mathur, E.J., Detter, J.C., Bork, P., Hugenholtz, P., Rubin, E.M. 2005. Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*. 308(5721): 554–7.
- Turnbull, P.C., Kramer, J.M. 1996. *Bacillus*. En: P. Murray, P., Baron, E. (eds.) *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press. Washington, D.C. 349p.
- Vacheron, J. et al., 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in plant Science*, 4: 356.
- Van Elsas, J.D., Heijnen, C.E. 1990. Methods for the introduction of bacteria into soil: A review. *Biol Fert Soils*. 10(2): 127–133.
- Varma, A. & Buscot, F. eds., 2005. *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*, Berlin, Heidelberg: Springer.
- Ward, D., 2009. *The Biology of Deserts* 1st Ed. Oxford University Press.

ANEXOS

Anexo 1. Medio de crecimiento masivo TYG

Reactivos	g/L
NaCl ₂	1.2
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.25
K ₂ HPO ₄	0.13
CaCl ₂	0.22
K ₂ SO ₄	0.17
NH ₄ Cl	1
Na ₂ SO ₄	2.4
NaHCO ₃	0.5
Na ₂ CO ₃	0.09
Fe(III)EDTA	0.07
Triptona	5
Gluconato	5
Extracto de levadura	5

Esterilizar por 15 minutos a 121 °C ,1 atm y ajustar pH a 7.

Anexo 2. Soluciones Desnaturalizantes, DGGE

Reactivos	0%	45%	65%
TAE (50X)	1 ml	1 ml	1 ml
Poliacrilamida (40%; 37.5:1)	7.5 ml	7.5 ml	7.5 ml
Formamida desionizada	0 ml	9 ml	13 ml
Urea	0 g	9.45 g	13.65 g
Agua Desionizada	A 50 ml	A 50 ml	A 50 ml