



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE EDAFOLOGIA

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS  
PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL  
MULTIFUNCIONALES E INOCULACIÓN DE HONGOS  
MICORRIZICOS ARBUSCULARES EN *Ricinus communis* L.**

**RAÚL FIDEL SÁNCHEZ HERNÁNDEZ**

**T E S I S**  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO**

2015



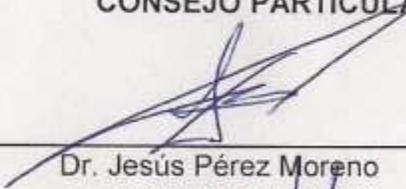
La presente tesis titulada "IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL MULTIFUNCIONALES E INOCULACIÓN DE HONGOS MICORRIZICOS ARBUSCULARES EN *Ricinus communis* L." realizada por el alumno: Raúl Fidel Sánchez Hernández, bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

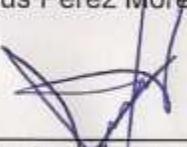
EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR:

CONSEJERO:

  
Dr. Jesús Pérez Moreno

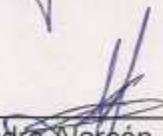
ASESOR:

  
Dr. Juan José Almaraz Suarez

ASESORA:

  
Dra. Ma. Antonieta Goytia Jiménez

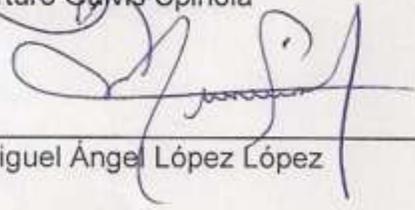
ASESOR:

  
Dr. Alejandro Alarcón

ASESOR:

  
Dr. Arturo Galvis Spinola

ASESOR:

  
Dr. Miguel Ángel López López

Montecillo, Texcoco, Estado de México, junio de 2015

## DEDICATORIA

*A Mis padres.*

*A mis hermanos.*

*A toda mi familia*

*A la Familia Pérez Vega.*

*A mis compañeros y amigos.*

*Y muy en especial a Iktan Alexis, quien siempre será mi motivo de inspiración, para seguir adelante*

## AGRADECIMIENTOS

*A la coordinación de Edafología, en especial al área de microbiología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, y a los profesores que participaron en mi formación.*

*Al comité asesor: Jesús Pérez-Moreno, Juan José Almaraz-Suarez, Alejandro Alarcón, Ma. Antonieta Goytia-Jimenez, Arturo Galvis-Spínola, Miguel Ángel López-López y a la Dra. Irma Diaz-Aguilar por sus aportaciones en el desarrollo de este trabajo.*

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado para mi formación académica.*

*Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por el apoyo otorgado para la realización del presente trabajo.*

*A los que participaron en distintas etapas del proceso: Is, Alex, Cosi, Tino, Cris, Alis, Viky, y los que faltaron han de disculpar mi mala memoria, a todos ustedes*

# IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL MULTIFUNCIONALES E INOCULACIÓN DE HONGOS MICORRIZICOS ARBUSCULARES EN *Ricinus communis* L.

Raúl Fidel Sánchez-Hernández, D. en C.  
Colegio de Postgraduados, 2015.

La higuierilla o ricino (*Ricinus communis* L.), de la familia de las Euphorbiaceae, es una especie polimórfica ampliamente distribuida a nivel mundial y particularmente conocida en México desde épocas prehispánicas por los zapotecos (1578) y mixtecos (1593), donde prospera comúnmente en predios baldíos de las ciudades y poblados, así como a la orilla de las carreteras. La higuierilla resiste condiciones climatológicas extremas, suelos pobres en nutrientes y largas temporadas de escasez hídrica. Adicionalmente, posee una gran variedad de usos, entre los que se destaca la producción de aceite para biocombustibles y productos útiles en la alimentación pecuaria. Sin embargo, su producción sustentable enfrenta el problema de la fertilización química, por tal motivo, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal y hongos endomicorrízicos en la producción de planta de *Ricinus communis* L. Se aislaron, caracterizaron e identificaron bacterias multifuncionales promotoras del crecimiento vegetal; y se determinaron las poblaciones de hongos, bacterias totales y actinomicetos. Adicionalmente, se evaluó el efecto de 2 consorcios de hongos micorrízicos arbusculares en el crecimiento y colonización de plantas de higuierilla. Las cepas multifuncionales se identificaron genéticamente con el gen 16S rDNA, teniendo como resultado la identificación de 7 cepas como: *Arthrobacter koreensis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus simplex*, *Paenibacillus lactis*, *Pseudomonas extremorientalis* y *Raoultella ornithinolytica*. Adicionalmente, se establecieron las relaciones filogenéticas de dichos aislamientos, con base en estas pruebas moleculares. Hasta donde conocemos, se reporta por primera ocasión la capacidad de solubilizar fosfatos y de producir AIA en *Arthrobacter koreensis* y *Bacillus megaterium*. Finalmente, se encontró que *R. communis* es susceptible de infección por hongos micorrízico arbusculares, detectándose la presencia de estructuras intraradicales incluyendo arbuscúlos, vesículas, esporas e hifas. Este trabajo demuestra el potencial biotecnológico de microorganismos rizosféricos en la producción de *R. communis*, con su subsecuente potencial en la producción de biocombustibles.

**Palabras clave:** Higuierilla, *Arthrobacter koreensis*, *Bacillus megaterium*, *Rhizophagus diaphanus*, *Claroideoglossum claroideum*.

## ABSTRACT

### IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PLANT GROWTH PROMOTING MULTIFUNCTIONAL BACTERIA AND INOCULATION WITH ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI IN *Ricinus communis* L.

Raúl Fidel Sánchez-Hernández, D. en C.  
Postgraduate College, 2015.

Castor oil or castor (*Ricinus communis* L.) of the family Euphorbiaceae, is a polymorphic species widely distributed world-wide and particularly known in Mexico since Pre-Hispanic times by Zapotec (1578) and Mixtec (1593) people, where it grows frequently in abandoned places and in cities and towns, as well as in the roadsides. The castor oil resists extreme climatic conditions, nutrient-poor soils and long periods of drought. Additionally, castor has a variety of uses, including oil production for biofuels and useful products for animal feeding. However, their sustainable production faces the problem of chemical fertilization. Therefore, the present work aimed to evaluate the effect of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria and endomycorrhizal fungi in the plant production of *R. communis*. Multifunctional plant growth promoting rhizobacteria were isolated, characterized and identified; and the populations of total fungi, bacteria and actinomycetes. Additionally, the effect of 2 consortia of arbuscular mycorrhizal fungi on the growth and colonization of castor plants was evaluated. The multifunctional strains were genetically identified with the gen 16S rDNA, resulting in the identification of 7 strains as *Arthrobacter koreensis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus simplex*, *Paenibacillus lactis*, *Pseudomonas extremorientalis* and *Raoultella ornithinolytica*. Additionally, the phylogenetic relationships of these isolates based on these molecular tests were established. As far as we know, the ability of *Arthrobacter koreensis* and *Bacillus megaterium* to solubilize phosphates and to produce indol acetic acid, is reported for the first time. Finally, it was found that *R. communis* is susceptible of infection by arbuscular mycorrhizal fungi, producing intraradical structures including arbuscules, vesicles, spores and hyphae. This work demonstrates the biotechnological potential of rhizospheric microorganisms in the production of *R. communis*, with their subsequent potential for biofuel production.

**Keywords:** Castor oil, *Arthrobacter koreensis*, *Bacillus megaterium*, *Rhizophagus diaphanus*, *Claroideoglomus claroideum*.

# CONTENIDO

ABSTRACT.....	vi
ÍNDICE DE CUADROS .....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS .....	x
CAPÍTULO I.....	1
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1. Literatura citada .....	9
CAPÍTULO II.....	18
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS .....	18
2.1. Objetivo general.....	18
2.2. Objetivos particulares .....	18
2.3. Hipótesis particulares .....	18
CAPÍTULO III.....	20
3. BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL MULTIFUNCIONALES ASOCIADAS CON SUELO RIZOSFÉRICO DE <i>Ricinus communis</i> L. UNA ESPECIE CON POTENCIAL BIOENERGÉTICO.....	20
3.1. Introducción.....	20
3.2. Materiales y métodos.....	23
3.2.1. Muestreo de suelo rizosférico .....	23
3.2.2. Aislamiento y selección de aislamientos.....	24
3.2.3. Selección de cepas microbianas.....	25
3.2.4. Selección de las 7 mejores cepas bacterianas multifuncionales .....	26
3.2.5. Identificación de cepas multifuncionales.....	26
3.3. Resultados .....	28
3.4. Discusión.....	38
3.5. Conclusiones.....	47
3.6. Literatura citada .....	48
CAPÍTULO IV .....	64
4. POBLACIONES DE BACTERIAS, HONGOS Y ACTINOMICETOS AISLADAS DE LA RIZOSFERA DE HIGUERILLA .....	64
4.1. Introducción.....	64
4.2. Materiales y Métodos.....	66
4.2.1. Lugar de muestreo de rizósfera de ricino y toma de muestras. ....	66

4.2.2.	Determinación de las propiedades físicas y químicas de suelo de los sitios de muestreo .....	67
4.2.3.	Determinaciones de microorganismos de la rizósfera de ricino.....	67
4.2.4.	Análisis estadístico .....	68
4.3.	Resultados y discusión .....	69
4.4.	Conclusiones.....	79
4.5.	Literatura citada .....	80
CAPÍTULO V	.....	88
5.	COLONIZACIÓN MICORRÍZICA EN HIGUERILLA ( <i>Ricinus communis</i> L.) UNA PLANTA CON POTENCIAL BIOENERGÉTICO .....	88
5.1.	Introducción.....	88
5.2.	Materiales y métodos.....	92
5.2.1.	Inóculos micorrízicos .....	92
5.2.2.	Altura y volumen radical .....	92
5.2.3.	Determinación de peso seco de biomasa aérea y radical.....	93
5.2.4.	Fotosíntesis y resistencia estomática .....	93
5.2.5.	Área foliar .....	93
5.2.6.	Determinación de las propiedades físicas y químicas del sustrato.....	93
5.2.7.	Colonización y dependencia micorrízica.....	94
5.3.	Resultados y discusión .....	95
5.3.1.	Fotosíntesis y resistencia estomática .....	97
5.3.2.	Colonización y dependencia micorrízica.....	102
5.4.	Conclusiones.....	106
5.5.	Literatura citada .....	107
CAPÍTULO VI	.....	114
6.	CONCLUSIONES GENERALES .....	114

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 3.1. Características de los sitios de muestreo de suelo rizosférico de <i>Ricinus communis</i> .....	24
Cuadro 3.2. Características de las 7 cepas multifuncionales seleccionadas y aisladas de rizosfera de <i>Ricinus communis</i> , con atributos benéficos como bacterias promotoras del crecimiento vegetal.....	31
Cuadro 3.3. Caracterización fenotípica de 7 cepas mediante BBL Crystal® y pruebas complementarias para identificación fenotípica.....	35
Cuadro 3.4. Comparación de la identificación fenotípica y genotípica. ....	36
Cuadro 4.1. Características de los sitios de muestreo de suelo rizosférico de <i>Ricinus communis</i> . ....	69
Cuadro 4.2. Análisis químico y físico del suelo de los sitios de procedencia. ....	71
Cuadro 4.3. Población de microorganismos cuantificados de rizósfera de higuera en siete sitios de muestreo. ....	72
Cuadro 4.4. Modelos de regresión múltiple y parámetros independientes, para las poblaciones de microorganismos rizosféricos aislados de <i>R. communis</i> .....	74
Cuadro 5.1. Análisis de las propiedades físicas y químicas del sustrato. ....	96
Cuadro 5.2. Composición de peso seco de la parte aérea y total de higuera ( <i>Ricinus communis</i> ).....	97

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1. Solubilización de fosfatos por 99 rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal aisladas de rizósfera de <i>Ricinus communis</i> de un universo total de cepas, procedente de 7 sitios de muestras. ....	29
Figura 3.2. Producción de ácido indolacético en 93 rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal aisladas de rizosfera de <i>Ricinus communis</i> de un universo total de cepas, procedente de 7 sitios de muestras .....	30
Figura 3.3. Grupos de rizobacterias multifuncionales aisladas de rizosfera de <i>Ricinus communis</i> . ....	32
Figura 3.4. Cepas de rizobacterias multifuncionales con al menos un atributo deseable (a) y al menos dos atributos deseables (b), aisladas de rizosfera de <i>Ricinus communis</i> , en relación a su sitio de origen. ....	34
Figura 3.5. Árbol filogenético de microorganismos asociados al crecimiento vegetal. Se muestra que 3 de las cepas identificadas pertenecen al grupo Gammaproteobacteria, 3 al Bacilli y una al Actinobacteria. ....	37
Figura 4.1. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo de suelo rizosférico de <i>R. communis</i> . ....	70
Figura 4.2. Distribucion no parametrica de los microorganismos rizosfericos, en relacion con las variables de suelo del sitio. ....	77
Figura 5.1. Propagación de planta de higuera. ....	95
Figura 5.2. Inoculación de planta de higuera con hongos micorrizicos arbusculares. ....	95
Figura 5.3. Altura de la planta mostrando diferencias significativas para la prueba LSD. ....	96
Figura 5.4. Fotosíntesis en plantas de higuera, mostrando diferencias significativas para la prueba LSD. ....	98
Figura 5.5. Conductancia estomática en hojas de plantas de higuera, mostrando diferencias significativas para la prueba LSD. ....	99
Figura 5.6. Tasa de transpiración relativa para higuera, mostrando diferencias significativas para la prueba LSD. ....	100
Figura 5.7. Área foliar específica de plantas de higuera, mostrando diferencias significativas para la prueba LSD .....	101
Figura 5.8. Contenido de nitrógeno en hoja de higuera medido en unidades spad, mostrando diferencias significativas para la prueba LSD .....	102
Figura 5.9. Colonización micorrízica de plantas de higuera por hongos micorrizicos arbusculares. ....	103
Figura 5.10. Arbúsculos de hongo formador de micorriza arbuscular ( <i>Glomus</i> sp.), en raíz de <i>Ricinus communis</i> . ....	103
Figura 5.11. Hongos formadores de micorrizas arbusculares ( <i>Glomus</i> sp.) esporas (izquierda) y vesículas (derecha), en raíz de <i>Ricinus communis</i> . ....	104
Figura 5.12. Hifas de hongo formador de micorriza arbuscular ( <i>Glomus</i> sp.), en raíz de <i>Ricinus communis</i> , a) septada y b) cenocítica. ....	104

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

De acuerdo con SEMARNAT (2009) el calentamiento global climático es de origen antropogénico, recientemente etiquetado como una nueva era geológica denominada “antropoceno”, es decir, originada por las emisiones de gases de efecto invernadero derivadas de las actividades humanas a partir de la invención de la agricultura. Se dice que México contribuye con alrededor de 1.5% al problema global, muy por debajo de los grandes emisores históricos: Estados Unidos, Unión Europea y China, que vierten actualmente a la atmósfera más de 17 mil millones de toneladas de CO<sub>2</sub>. Por otro lado, Indonesia y Brasil, sólo por deforestación, emiten anualmente casi 5 mil millones de toneladas, alrededor del 10% del total global; En contraste, los Estados Unidos de América, la Unión Europea, China, India, Reino Unido, Italia, Francia y España, logran captura forestal por alrededor de 530 millones de toneladas de CO<sub>2</sub> (SEMARNAT, 2009). Esto ocurre cuando el dióxido de carbono atmosférico (CO<sub>2</sub>) es absorbido por los árboles mediante la fotosíntesis, y es almacenado en forma de materia orgánica (biomasa-madera). Aproximadamente 42% a 50% de la biomasa de un árbol (materia seca) es carbono. Una tonelada de carbono secuestrado, equivale a 3.5 toneladas aprox. de CO<sub>2</sub> atmosférico. Una tonelada de biomasa con 45% de carbono contiene 450 Kg. de carbono y 1575 Kg. de CO<sub>2</sub>. Según el Banco Mundial se necesitarían 1.5 ha plantadas con árboles en desarrollo en regiones sin forestación para compensar las emisiones de CO<sub>2</sub> de una persona, y 9,000

millones de hectáreas para compensar temporalmente las emisiones de los 6,000 millones de habitantes en el mundo. Sin embargo, esto sería insuficiente, porque la población y las emisiones de CO<sub>2</sub> aumentan diariamente. La liberación del carbono no es el único problema que genera la deforestación, al estar el suelo desnudo se provoca la pérdida de suelo fértil, afectando a las poblaciones de microorganismos que lo habitan y mantienen en condiciones sanas, debido a que el agua y el viento normalmente arrastran la capa superficial de tierra, principalmente producto de malas técnicas de cultivo, sobrepastoreo, quema de vegetación o tala del bosque. El cultivo de tierras en lugares con pendiente aumenta la posibilidad de agotamiento del suelo fértil, ya que es muy fácil el arrastre del mismo. La degradación del suelo reviste gran importancia, porque su regeneración es en extremo lenta. En zonas agrícolas tropicales y templadas, se requiere de un promedio de 500 años para la renovación de 2.5 centímetros de suelo. Es importante destacar que la erosión del suelo, además de afectar y alterar los ecosistemas, afecta seriamente a la gente y a la economía de un lugar. Hay una relación directa entre la disminución de la capacidad productora del suelo y la disminución de los ingresos de la comunidad. Cuando se tala vegetación para despejar tierras o usar leña, la capa fértil del suelo es expuesta a la lluvia y al sol, la corteza del suelo se endurece y se seca, impidiendo la infiltración de más agua. Así comienza el proceso de desertificación, ya que disminuye la filtración acuosa a depósitos subterráneos, y la capa de suelo superficial se erosiona y se convierte en estéril. Las raíces de las plantas y los animales propios de suelo lo hacen más poroso dándole oportunidad al agua para pasar a través de él. La vegetación puede facilitar la infiltración aun en los suelos duros y arcillosos. Una alternativa

que contribuye potencialmente a mitigar parcialmente estos problemas, es el establecimiento de sistemas agroforestales, incluyendo aquellos con higuera o ricino (*Ricinus communis* L.), de la familia de las Euphorbiaceae, cuyo centro de origen se presume en África tropical (Abisinia) y posiblemente de la India. Esta es una especie monoespecífica polimórfica (Manjunath y Sannappa, 2014) ampliamente distribuida en el mundo actual (Marengo *et al.*, 2012) y particularmente conocida en México (Goytia *et al.*, 2010) desde épocas prehispánicas por los zapotecos (1578) y mixtecos (1593), donde nace, crece y se reproduce en todos los predios baldíos de las ciudades y poblados, así como a la orilla de las carreteras (De la Vega, 2006). Gracias al eficiente aprovechamiento de los recursos ambientales (Reveles *et al.*, 2010), dada su capacidad para resistir en condiciones climatológicas extremas, suelos pobres en nutrientes y largas temporadas de escasez hídrica. Se reporta que México cuenta con condiciones agroecológicas propicias para el cultivo de esta especie, con una superficie de 3,940,991 hectáreas y actualmente el interés por su cultivo va en aumento (Córdoba, 2012 y Orihuela, 2011), resaltando sus bondades al implementarse en sistemas agroforestales ya que produce muchos productos y subproductos que pueden ser aprovechables, reduciendo el impacto a zonas naturales, se ha plantado en zonas áridas para control de la erosión del suelo, puede ser usada en cercos vivos, o en terrazas de formación sucesiva (Sánchez-Hernández, 2007), provee de una sombra media, permitiendo el desarrollo de plantaciones de café (Farfán-Valencia y Mestre-Mestre, 2005) o cultivos de cobertera, funciona como repelente de insectos y tuzas, contribuye con la protección del suelo, promueve la incorporación de materia orgánica, evita la erosión y mejora la capacidad de

retención de humedad. Por lo que, una estrategia encaminada al desarrollo de este cultivo como fuente de energía y productos renovables podría permitir: reducir la pobreza creando empleos, en especial para el sector femenino, y creando nuevos productos, como biocombustibles (Reveles-Saucedo *et al.*, 2010; Fernández *et al.*, 2014), alimentos balanceados (Ascheri *et al.*, 2007; Santos, 2009; Neves *et al.*, 2011), medicinas (Yadav y Agarwala, 2011; Nemudzivhadi y Masoko, 2014), anticonceptivo masculino (Nath *et al.*, 2013), insecticidas (Corradine-Mora, *et al.*, 2014), bactericidas (Mathur *et al.*, 2011), nematocidas (Arboleda *et al.*, 2010), lubricantes (Delgado, Aperador y Silva, 2011) y fertilizantes (Edison *et al.*, 2012). De esta manera, el cultivo de higuera puede contribuir a la atenuación de problemas ambientales, como la erosión y la deforestación, además de mejorar microclimas y mitigar los gases de efecto invernadero; incrementar la calidad de vida en el campo; reducir el consumo de leña de especies forestales en zonas rurales; disminuir la vulnerabilidad alimentaria y desarrollar tecnologías descentralizadas en especial de fuentes de energía. (Goytia-Jiménez, 2014, com. pers.).

La microbiota del suelo juega un papel fundamental en la regulación de los ecosistemas terrestres, influyendo en la productividad, diversidad y estructura de las comunidades vegetales. La materia orgánica es descompuesta por la actividad de diferentes especies de bacterias y hongos que liberan los nutrientes al suelo, dejándolos disponibles para que sean nuevamente absorbidos por las plantas. La absorción puede ser directa a través de las raíces o indirecta a través de los microorganismos que forman simbiosis con las raíces (hongos endófitos). Estos

organismos cohabitan con microorganismos patógenos que atacan a las plantas reduciendo su productividad. En consecuencia, la comunidad vegetal se ve sometida a una serie de costos y beneficios que brindan dinamismo y estructura a los ecosistemas terrestres (Martinez y Pugnaire, 2009). El área de influencia de la raíz, conocida como rizósfera, es un área muy abundante en microorganismos debido a la acumulación de compuestos orgánicos que son exudados y depositados por el sistema radical (Brimecombe *et al.*, 2007). Los microorganismos usan y transforman muchos de los productos de la raíz y liberan otros que pueden tener una influencia sobre el sistema radical; algunos habitantes de la rizosfera son saprobios, otros causan daños a la raíz y algunos más se alimentan de otros microorganismos, por lo que las redes de relaciones entre microorganismo-microorganismo, microorganismo-raíz y raíz-raíz suelen ser complejas (Bais *et al.*, 2004; Bais *et al.*, 2006). Entre los diversos microorganismos que viven en la rizosfera, las bacterias que son capaces de promover el crecimiento de las plantas son llamadas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), también se les conoce como rizobacterias. Estas pueden contribuir al crecimiento de las plantas a través de varias vías. Algunas producen hormonas vegetales como auxinas, giberelinas, y citocininas que estimulan directamente el crecimiento de las plantas; en general estas son producidas por las BPCV cuando sus precursores son liberados por la raíz (Bais *et al.*, 2006). A nivel laboratorio la adición de triptofano a cultivos de BPCV puede resultar en la producción de ácido indol acético, por lo que este es un método comúnmente utilizado para identificar cepas que producen auxinas (Dias *et al.*, 2009). Otro grupo de BPCV tiene la capacidad de fijar nitrógeno. La mayoría de los estudios

hechos con bacterias fijadoras de nitrógeno han sido en cereales y pastos, donde el efecto de la inoculación resulta en un incremento en la biomasa e incremento en el número de espigas y granos por espigas, así como plantas más altas e incremento en el tamaño de las hojas (De-Bashan *et al.*, 2007). Algunas BPCV son capaces de solubilizar fosfatos; estas bacterias convierten el fósforo insoluble en formas solubles a través de la liberación de ácidos orgánicos y enzimas fosfatasas (Dias *et al.*, 2009; Hariprasad y Niranjana *et al.*, 2009), Las formas solubles las plantas las pueden tomar por lo que su estado nutrimental se mejora. La identificación de bacterias con capacidad solubilizadora de fosfato es sencilla y usualmente se hace en medios que contienen fosfato insoluble. Las BPCV también pueden promover el crecimiento vegetal indirectamente a través del control de enfermedades de la raíz causadas por bacterias y hongos. Los mecanismos, de control incluyen la producción de compuestos antimicrobianos, competencia por nutrientes y espacio, o bien inducción de resistencia en las plantas (Bais *et al.*, 2006). Las endomicorrizas arbusculares (MA) son asociaciones simbióticas generalmente mutualistas que se establecen entre un selecto grupo de hongos pertenecientes a GLomeromycota y la gran mayoría de las plantas. Aproximadamente 80% de las familias de plantas existentes tienen la potencialidad de formar este tipo de asociación (Cuenca *et al.*, 2007). Actualmente se han documentado los efectos benéficos de las MA, los cuales comprenden la mayor absorción de elementos poco móviles en el suelo como el fósforo, cobre y zinc por parte de las plantas micorrizadas en comparación con las no micorrizadas. Además, gracias al uso más eficiente que hacen las plantas micorrizadas de los nutrientes del suelo, permiten ahorrar fertilizantes químicos y

reducir por consiguiente los problemas de contaminación que el uso excesivo de fertilizantes origina (Alarcón y Ferrera, 2000). Es importante el conocimiento acerca de la biodiversidad y distribución de las micorrizas nativas y el uso de tecnologías de producción que involucren el aprovechamiento del recurso biológico, como estrategia para contribuir al desarrollo de sistemas de producción sostenibles que permitan conservar e incrementar la eficiencia potencial de las micorrizas con el fin de mejorar la calidad nutricional de las especies vegetales (Salamanca, 1999). Por otro lado, en los últimos años han aumentado las investigaciones que buscan definir los factores abióticos y bióticos que condicionan la estructura espacial de las comunidades de hongos micorrizicos arbusculares (HMA). Se ha demostrado que factores abióticos como la humedad, la estructura y composición química del suelo se correlacionan con la distribución espacial de las comunidades de HMA. Sorprendentemente, los últimos estudios parecen indicar que es el nivel de N y no el de P el que más influye en la distribución de los HMA, mientras que cabe pensar que al ser el P la principal contribución a la planta por parte de las micorrizas, es este el que más afecta. Se ha demostrado que existe una correlación negativa entre el N en el suelo y la presencia de HMA, mientras que existe una falta de respuesta de los HMA a la disponibilidad de P. algunos investigadores indican que la adicción de nitrógeno en dosis bajas ( $5$  a  $15 \text{ Kg ha}^{-1}$ ), promueve el desarrollo de los HMA (Alarcón y Ferrera, 2000).

El presente trabajo tuvo como objetivo general evaluar el efecto de la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal y hongos endomicorrizicos en la

producción de planta de *Ricinus communis* L., la cual es una especie con potencial de producción de biodiesel. La tesis se encuentra dividida en tres secciones, la primera corresponde a la selección e identificación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal multifuncionales aisladas de rizosfera de higuera, donde se evaluaron en 139 cepas bacterianas, la capacidad de solubilizar fosfatos, producir auxinas, específicamente ácido indolacético (AIA), y crecer en medio libre de nitrógeno. Veintiún de las cepas presentaron la capacidad de solubilizar fosfatos, 24% creció en medio Rennie libre de nitrógeno y 6% produjeron ácido indolacético. 38% de las cepas evaluadas presentaron al menos un atributo benéfico, y 7% presentaron los 3 atributos benéficos evaluados. Las cepas multifuncionales se identificaron genéticamente con el gen 16S rDNA como *Arthrobacter koreensis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus simplex*, *Paenibacillus lactis*, *Pseudomonas extremorientalis* y *Raoultella ornithinolytica*, y las relaciones filogenéticas de dichos aislamientos en base a estas pruebas moleculares fueron establecidas. Hasta donde conocemos, se reporta por primera ocasión la capacidad de solubilizar fosfatos y de producir AIA en *Arthrobacter koreensis* y *Bacillus megaterium*. Se demuestra la existencia de la multifuncionalidad de propiedades benéficas para las plantas, en cepas rizósfericas de *R. communis*. La segunda sección presenta un estudio ecológico de las poblaciones totales de hongos, bacterias y actinomicetos aislados de rizosfera de higuera, proveniente de diferentes sitios de muestreo, donde se muestran diferencias significativas en tres de ellos; San Nicolás Tlaminca, Venta de Carpio y Universidad Autónoma Chapingo, determinadas principalmente por la ubicación geográfica y las características propias del suelo. Y por último, se presenta una evaluación para

determinar si la especie de *Ricinus communis* es susceptible de infección por hongos micorrízico arbusculares, así como su posible efecto en términos de crecimiento y contenido nutrimental, en contraste con plantas no inoculadas, para ello, se probaron dos consorcios de HMA: clave "C-12" (3 especies de *Glomus* sp., *G. mosseae* y 2 especies de *Acaulospora* sp.) y clave "Zac-19" [*Glomus albidum*, *Rhizophagus diaphanus* (antes *Glomus diaphanum*) y *Claroideoglomus claroideum* (antes *Glomus claroideum*)]. Finalmente se discute el potencial de los microorganismos rizosféricos estudiados en la elaboración de bioinoculantes para la producción de *Ricinus communis* y su potencial en la producción de biocombustibles.

### **1.1. Literatura citada**

- Alanís Flores G. J., 1982. El Matorral como recurso pecuario en el noreste de México. Facultad de C. Biológicas UANL
- Alarcon, A. y Ferrera, R. 2000. Biofertilizantes: Importancia y utilización en la agricultura. Agricultura Técnica en México, julio-diciembre, año/vol. 26, numero 002. Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Texcoco, México. Pp. 191-203.
- Arboleda, F.J., O.A. Guzmán Piedrahita, y J.F. Restrepo Henao. 2010. Efecto in vitro de extractos acuosos de higuierilla (*Ricinus communis* Linneo) sobre el nematodo barrenador [*Radopholus similis* (Cobb) Thorne]. Agronomía 18(2):25-36
- Ascheri, J. L.R.; Maciel, F. M.; Machado, O. L. T. 2007. Destoxificação de torta de mamona por extrusão termoplástica: Estudo Preliminar. In: II Congresso da

Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, 2007, Brasília. II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel.

Bais, H.P., Park, S.W., Weir, T.L., Callaway, R.M., y Vivanco, J.M. 2004. How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends in Plant Science* 9(1): 26-32.

Bais, H.P., Weir, T.L., Laura G. Perry, L.G., Gilroy, S., y Vivanco, J.M. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:233-66

Banco Interamericano de desarrollo. 2003 BID: Fortalecimiento de MDL en los sectores forestal y *bioenergía* de Iberoamérica y poblaciones vulnerables en Centroamérica.

[www.catie.ac.cr/BancoMedios/Documentos%20PDF/pages%20from%20informeinterna-3.pdf](http://www.catie.ac.cr/BancoMedios/Documentos%20PDF/pages%20from%20informeinterna-3.pdf) -

Brimecombe, M. J., F. A.A.M. De Leij., and J. M. Lynch. 2007. Rhizodeposition and Microbial Populations. In: Pinton, R., Z, Varanini., P, Nannipieri.(Eds.) *The Rhizosphere. Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface.* Taylor and Francis Group. Pp 73-110.

Camacho Villalobos Alina, 2007. Evaluación de cuatro cultivares de higuierilla (*Ricinus communis* L.) en la selva del Perú en la región Ucayali. Congreso brasileño de energía y ricinoquímica. Doc. PDF. pp. 5. Disponible en Web; <http://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=web&cd=1&sqj=2&ved=0CE0QFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.>

CNPA.embrapa.br%2Fprodutos%2Fmamona%2Fpublicacoes%2Fcbm3%2Ftrabalhos%2FMELHORAMENTO%2520GENETICO%2FMG%252017.pdf&ei=hjKoT4PXJJSm8gSj3YW0Aw&usg=AFQjCNF28SI07ML3r1a7uyQZbxXKzA--Ag

Córdoba-Gaona O.J. 2009. Comportamiento ecofisiológico de variedades de higuierilla (*Ricinus communis* L.) para la producción sostenible de aceite y biodiesel en diferentes agroecosistemas colombianos. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agrarias. Medellín, Colombia.

Corradine-Mora, D., Beltrán-Sastoque, I., Corredor-Páramo, Y. y Moreno-Aguilera, D. 2014. Eficiencia del extracto de *Ricinus communis* para el control del mosquito *Culex*. Revista Científica. 0(19). Disponible en: <http://revistas.udistrital.edu.co/ojs/index.php/revcie/article/view/6496/8030>

Cuenca, G. Cáceres, A. Oirdobro, G. Hasmy, Z. y Urdaneta, C. 2007. Las micorrizas arbusculares como alternativa para una agricultura sustentable en áreas tropicales. Interciencia, enero, año/vol. 32, numero 001. Asociación Interciencia. Caracas, Venezuela, pp. 23-29.

De-Bashan, L.E., G. Holguin, B.R. Glick., and Y, Bashan. 2007. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. In: Ferrara- Cerrato, R. y Alarcón, A. (Eds.) Microbiología agrícola. Editorial Trillas. México, D.F. Pp 170-209.

Delgado, AE., Aperador C, W. y Silva G, JR. 2011. Influencia del porcentaje de mezcla del aceite de higuierilla en la obtención de combustible alternativo para motores diésel. Fac. Ing. Univ. Antioquia N. 58 pp. 46-52.

- Dias, A.C.F., Costa, F.E.C., Andreote, F.D., Lacava, P.T., Teixeira, M.A., Assumpcao, L.C., Araujo, W.L., Azevedo, J.L., Melo, I.S. 2009. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. *World J Microbiol Biotechnol.* 25:189-195.
- Edison, M.; Kabuba, J.; Philiswa, M. and Belaid, M. 2012. Optimization of Process Parameters for Castor Oil Production. *Proceedings of the World Congress on Engineering 2012 Vol. III.* London, United Kingdom. 2012: 1-4
- Farfán-Valencia, F. y Mestre-Mestre, A. 2005. Fertilización de cafetales con sombrero en la zona cafetera norte de Colombia. *Avances Técnicos* No. 331. ISSN: 0120-0178.
- Fernández, Y., Floiran, O., Maurelys, E., Villalobos, M. y García, A. 2014. Construcción de un reactor discontinuo para la obtención de biodiesel a partir del aceite de *Ricinus communis*. *Avances en Ciencias e Ingeniería.* Vol. 5, Nº. 2, págs. 51-61, ISSN-e 0718-8706
- Goytia-Jiménez, M.A., Gallegos-Goytia, C.H. y Nuñez-Colin, CA. 2011. Relación entre las variables climáticas con la morfología y contenido de aceite de semillas de (*Ricinus communis* L.) de Chiapas. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Ambiente.* pp. 8. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0186-32312011000100005&script=sci\\_arttext&tlng=en](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0186-32312011000100005&script=sci_arttext&tlng=en)
- Hariprasad. P. y Niranjana, S.R. 2009. Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato. *Plant Soil* 316:13–24.

- Hernández Guevara Rosalío, 1997. Análisis estructural e importancia económica de *Helietta parvifolia* en dos zonas del norte y sureste del estado de Nuevo León. Tesis de Licenciatura realizada en la Fac. de C. Biológicas U.A.N.L.
- Herrera Baydon M. P., 1997. Potencial forrajero de dos especies del matorral: Tenaza y ébano en la zona mediana espinosa del noroeste de México. Tesis de Licenciatura realizada en la Fac. de C. Biológicas U.A.N.L.
- Lawson H. 1994. Aceites y grasas alimentarios - Tecnología, utilización y nutrición. Zaragoza: Editorial Acribia. 333 pp
- Leal Alvarado Daniel, 2009. Caracterización Morfométrica de cinco ecotipos de higuierilla (*Ricinus communis*) en la ESPOL "Campus Gustavo Galindo. Doc. PDF. Guayaquil – Ecuador. pp. 110. Disponible en web; <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/5245/1/Caracterizaci%C3%B3n%20Morfom%C3%A9rica%20de%20cinco%20ecotipos%20de%20higuerilla%20en%20la%20ESPOL.pdf>
- Manjunath, KG. and Sannappa, B. 2014. Identification of castor (*Ricinus communis* L.) ecotypes through molecular characterization in the selected regions of the western Ghats of Karnataka, India. International Journal of Bioassays. [Online], 3:11: 3492-3498.
- Manzano P. et. al., 2009. Comparación del porcentaje de aceite y del tamaño de seis ecotipos de de higuierilla (*Ricinus communis*) de origen sudamericano. Doc. PDF. FCUC-ESPOL. pp. 6. Disponible en Web; <http://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=web&cd=1&ved=0CEcQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.rte.espol.edu.ec%2Findex>

- .php%2Ftecnologica%2Farticle%2Fdownload%2F66%2F37&ei=rC-  
oT6jtMo6o8QTH7J2YAw&usg=AFQjCNF6sqh2Jj538b3RlnaN9denBvmaKg
- Marengo C. Cruz R.; Viera de Azevedo Carlos A.; Dos Santos B Delfran.; De lira Vanda M y Dos Santos João B. 2012. Estimación de la evapotranspiración del ricino (*Ricinus communis* L.) cv. BRS energía regado con diferentes niveles de agua salina. Revista Agrociencia.
- Martinez, L.B., Pugnaire, F.I. 2009. Interacciones entre las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares y de plantas. Algunos ejemplos en los ecosistemas semiáridos. Ecosistemas 18(2):44-54.
- Mathur, A., Verma, SK., Yousuf, S., Singh, SK., Prasad, GBKS. and Dua, VK. 2011. Antimicrobial potential of roots of *Ricinus communis* against Pathogenic microorganisms. International Journal of Pharma and Bio Sciences. Vol. 2:1. ISSN: 0975-6299.
- Matthys D. 2003. Producing Biodiesel A Simple Affair? A Practical Guide To Read. Before Building Your Plant. Ghent, Bélgica: American Soybean Association. 23 pp
- Nath, S., Choudhurya, MD., Roychoudhurya, S., Talukdara, AD. and Misrob, MM. 2013. Male contraceptive efficacy of *Ricinus communis* L. extract. Journal of Ethnopharmacology. Volume 149, Issue 1, 26, Pages 328–334. doi:10.1016/j.jep.2013.06.044
- Nemudzivhadi, V. and Masoko, P. 2014. Research Article: In Vitro Assessment of Cytotoxicity, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Activities of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) Leaf Extracts. Evidence-Based Complementary

- and Alternative Medicine. Volume 2014, Article ID 625961, 8 pages.  
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/625961>
- Neves S, JC., Marques L, MCM., Ludke, JV., Sousa S, A., Lima O, E. y Tavares-Samay, AMA. 2011. Aproveitamento da Proteína dos Farelos de Mamona Submetidos a Diferentes Processamentos para Frangos de Corte. Revista Científica de Producción Animal, v.13, n.1, p.75-79, DOI: <http://dx.doi.org/10.15528/2176-4158/rcpa.v13n1p75-79>
- Organización de las Naciones Unidas 2007. ONU. La lucha contra el *cambio climático*: las *Naciones Unidas* y el mundo en acción. Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el *Cambio Climático* [www.un.org/spanish/climatechange/](http://www.un.org/spanish/climatechange/) - 54k -
- Orihuela E, R. 2011. Posibilidades de uso de la higuera (*Ricinus communis* L.) en la obtención de celulosa a la sosa, blanqueada para su uso en papel bond. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. 61 p.
- Ortiz-Pérez, Y., Valdés-Zayas, D., Villa-Villa, O., Alvares-Puentes, R. y Torres-García, S. 2012. Aplicación de extractos de hojas de *Ricinus communis* L. en el control de la Broca del cafeto. Centro Agrícola, 39(1):85-90; ISSN: 2072-2001
- Rechy M., Von Roth, 2004. Especies nativas del matorral espinoso del noreste mexicano con posibilidades de aprovechamiento industrial. Maderas y Bosques, otoño, año/ vol. 10, número 002, Instituto de Ecología A.C. Xalapa, México. pp. 45-54

- Rendón C. Natalia Elizabeth, 1999. Producción y exportación de la Higuierilla (*Ricinus communis* L.) a Colombia como Materia Prima para la Elaboración de Biocombustibles. GUAYAQUIL – ECUADOR-ESPOL. Doc. PDF. pp. 199. Disponible en Web; <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/6509>
- Reveles-Saucedo, FO., Rosales-Serna, R., Nava-Berúmen, CA., Delgado-Licón, E., Cuéllar-Robles, El., Carrete-Carreón, FO. y Ríos-Saucedo, JC. 2010. Identificación de especies vegetales con potencial para la producción de biocombustibles líquidos en Durango, México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. Vol.1, Núm.1, p. 45-54.
- Salamanca, C. 1999. Las micorrizas como estrategia de mejoramiento nutricional de pasturas y especies frutales en el Guaviare. CORPOICA-PRONATTA. Villavicencio. Boletín técnico No. 20. 24 p.
- Sánchez-Hernández, R. F., 2007. Conversión del aceite de higuierilla (*Ricinus communis* L.) en biodiésel, mediante el proceso de transesterificación. Tesis, Departamento de Agroecología, Universidad Autónoma Chapingo, México.
- Santos, Dos, SF., Bomfim, MA., Cândido, MJD., Ascheri, JLR., Oliveira, LS., Ferandes, MF., Fonteles, NLDe.O., Mapurunga, PA., Gonçalves, JDeL. 2009. Efeito da torta de mamona extrusada na dieta de cabras leiteiras sobre a produção e a composição físico-química do leite. In: Anais do 4º Simpósio Internacional Sobre Caprinos e Ovinos de Corte. João Pessoa, Brasil.
- Secretaría de Energía 2007. Cambio Climático. SENER en [pnd.calderon.presidencia.gob.mx/pdf/PrimerInformeEjecucion/4\\_6.pdf](http://pnd.calderon.presidencia.gob.mx/pdf/PrimerInformeEjecucion/4_6.pdf) .
- Tomasevic A.V., Marinkovic S.S. 2003. Methanolysis of used frying oils. Fuel. Process Technology 81: 1–6.

Yadav RNS. and Agarwala M. 2011. Phytochemical analysis of some medicinal plants. *Journal of Phytology*, 3(12): 10-14. ISSN: 2075-6240. Available Online: <http://journal-phytology.com/>

## CAPÍTULO II

### 2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

#### 2.1. Objetivo general

Contribuir al conocimiento ecofisiológico y biotecnológico de la relación entre microorganismos rizosféricos y la producción de planta de *Ricinus communis* L., la cual es una especie con gran potencial de producción de biodiesel.

#### 2.2. Objetivos particulares

Aislar, cuantificar y seleccionar bacterias promotoras de crecimiento vegetal de rizósfera de higuera, con los siguientes atributos: solubilizadoras de fosfatos, productoras de fitohormonas o fijadoras de nitrógeno.

Identificar mediante pruebas bioquímicas y técnicas moleculares las bacterias aisladas de la rizosfera de *Ricinus communis* L. con capacidad multifuncional

Determinar las poblaciones totales de unidades formadoras de colonias de bacterias, hongos y actinomicetos, asociados a la rizosfera de higuera, procedente de diversas localidades, incluyendo plantas cultivadas, ruderales y creciendo en traspatio.

Evaluar la susceptibilidad de micorrización de *Ricinus communis* L. por hongos micorrízico arbusculares y su posible efecto en términos de crecimiento y contenido nutricional, respecto a plantas no inoculadas.

#### 2.3. Hipótesis particulares

Existe un número reducido de cepas con capacidad multifuncional de solubilizar fosfato, producir ácido indolacético y crecer en medio libre de nitrógeno, teniendo la gran mayoría capacidades benéficas limitadas o nula.

Con base en la identificación molecular, es posible identificar especies multifuncionales con atributos no reportados previamente.

Plantas de higuierillas cultivadas poseen menores poblaciones totales de microorganismos rizosféricos, comparadas con plantas crecidas en condiciones ruderales.

La planta de higuierilla es susceptible de micorrización por hongos micorrízicos arbusculares.

## CAPÍTULO III

### 3. BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL MULTIFUNCIONALES ASOCIADAS CON SUELO RIZOSFÉRICO DE *Ricinus communis* L. UNA ESPECIE CON POTENCIAL BIOENERGÉTICO

#### 3.1. Introducción

Actualmente, el uso excesivo de combustibles fósiles, y su potencial agotamiento a futuro, ha promovido la búsqueda y uso de fuentes alternativas de energía procedentes de recursos renovables (Mukhopadhyay *et al.*, 2011). Por esta razón, los gobiernos de las economías industrializadas han emitido normativas para el impulso de utilización de biocombustibles, primero de manera voluntaria y posteriormente obligatoria, en mezclas con los combustibles fósiles (gasolinas y diésel) cuyas proporciones han sido establecidas en calendarios inaplazables (Demodaram y Hegde, 2010, FAO, 2008). En Europa se busca tener una participación de 10% de energías renovables en el sector transporte para el año 2020 (Jull *et al.*, 2007); mientras que en Estados Unidos la meta es introducir 36 mil millones de galones de biocombustibles para el año 2022 (Directive, 2009). Adicionalmente, en la actualidad se buscan alternativas que reduzcan el conflicto entre la producción de alimentos y de energía, cuando se utilizan cultivos de alimentos para la generación de biocombustibles (ISA, 2007).

La higuera o ricino (*Ricinus communis* L.), es una planta herbácea de porte arbustivo, ligeramente leñosa, con tallos y ramas huecas por dentro, de color verde claro a azul grisáceo, en ocasiones rojiza (Cassman y Liska, 2007), cultivada en más de 30 países; siendo India, China y Brasil sus principales productores (Anjani y Raof, 2014). Su

producción puede efectuarse mediante monocultivo o como parte de sistemas agroforestales (Rodríguez-Hernández, 2014). En México su cultivo se efectúa desde épocas prehispánicas, previas al siglo XVI, por los grupos étnicos zapotecos (Jiménez-Moreno, 2012) y mixtecos (Alvarado, 1593). El aceite de higuierilla ha sido utilizado en la medicina tradicional, industria química y farmacéutica, y actualmente en la producción de biodiesel y bioturbosina. *R. communis* es considerado como un cultivo con potencial bioenergético debido a las características excepcionales de su aceite, el cual está compuesto en 90% de un único ácido graso (ácido ricinoleico) que contiene un radical hidroxilo que lo hace soluble en alcohol a baja temperatura, muy viscoso (Soares-Severino y de Souza-Gondim, 2005). Por estas propiedades se ha considerado que el biodiesel producido a partir del aceite de ricino pueda reemplazar al diésel para su uso en motores (Pabón, 2010).

Debido al impacto negativo sobre el medio ambiente y al alto precio en el mercado internacional que tienen los fertilizantes y pesticidas químicos, existe en agricultura una urgente necesidad en la generación y uso de biofertilizantes, basados en microorganismos benéficos, para mejorar los rendimientos (Sánchez-Hernández, 2007). El incremento en la superficie cultivada de *Ricinus communis* en muchos países, como medida preventiva para garantizar la seguridad energética, hace imprescindible la generación de alternativas de fertilización sustentables (Sánchez-Hernández, 2007). En el suelo existe una notable población microbiana benéfica para los cultivos, dentro de la que se incluyen las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), en las cuales se han demostrado diversas propiedades benéficas dentro de las cuales se incluyen principalmente: i) la fijación de N atmosférico (Bais *et al.*, 2006), ii) la solubilización de fosfatos (SF), al convertir el fósforo insoluble en formas solubles a través de la liberación de ácidos orgánicos y enzimas fosfatasas (Rodríguez y Fraga, 1999, Dias *et al.*, 2009); y iii) la promoción de crecimiento y desarrollo vegetal mediante la producción de

fitohormonas, como AIA (Grageda-Cabrera, 2012, Rives, Acebo y Hernández, 2007). Todas estas funciones son de enorme importancia en las actividades agrícolas ya que aumentan la productividad de los cultivos al disminuir el uso de fertilizantes químicos. Por esta razón, las BPCV pueden ser utilizadas como biofertilizantes, benéficos para la agricultura, los cuales además incorporan poblaciones microbianas que restauran la rizosfera deteriorada por el manejo agrícola convencional (Welbaum *et al.*, 2004). A pesar de que el estudio de las propiedades benéficas de las BPCV ha sido estudiado ampliamente, el estudio de la multifuncionalidad de propiedades benéficas simultáneas en aislamientos bacterianos rizosféricos ha recibido escasa atención a pesar de su enorme importancia para la producción de biofertilizantes, útiles en la producción agrícola sustentable al reducir los costos de producción y el impacto ambiental por el uso de fertilizantes químicos, nitrogenados y fosfatados. Adicionalmente, las BPCV asociadas a la rizósfera de *Ricinus communis*, y el estudio de sus propiedades benéficas, en términos generales han recibido escasa atención a pesar del gran potencial que presentan como una alternativa a la fertilización química, de este importante cultivo productor de biodiesel. En este trabajo se estudió la multifuncionalidad, es decir la capacidad de un microorganismo de poseer simultáneamente más de una función específica, de aislamientos rizosféricos de *Ricinus communis* procedentes de 7 localidades. Los atributos estudiados en 139 aislamientos fueron: capacidad de solubilización de fosfatos, de producción de AIA y de crecimiento en medio libre de N. Posteriormente, se realizó la identificación genética de las bacterias multifuncionales, con el gen 16S rDNA y se establecieron las relaciones filogenéticas de las bacterias identificadas.

## **3.2. Materiales y métodos**

### **3.2.1. Muestreo de suelo rizosférico**

Se recolectaron muestras de suelo rizosférico de *Ricinus communis* L. en 7 sitios, ubicados en 2 regiones de México, del centro y sureste del país. En estas regiones la higuera crece de forma silvestre, y en un caso se muestreo un cultivo de *R. communis*. Los sitios poseen condiciones de suelo, clima y altitud distintas (Cuadro 3.1). Las muestras de rizósfera fueron recolectadas de 3 puntos en los primeros 30 cm de profundidad, a 0.5 m de distancia de la base del tronco de las plantas. En total se muestreó 1 kg de suelo, originado por una muestra compuesta de los 3 puntos recolectados. Estas muestras se colocaron en bolsas de plástico, las cuales se transportaron en una hielera al laboratorio para los análisis respectivos. La recolecta se realizó a finales de la época de lluvias (junio-octubre de 2011) y cada una se analizó por triplicado.

**Cuadro 3.1. Características de los sitios de muestreo de suelo rizosférico de *Ricinus communis*.**

Muestra	Localidad	Ecosistema	Longitud N	Latitud W	Altitud (msnm)
1	San Bernardino, Texcoco, Estado de México.	Silvestre	19°28.76´	98°53.40´	2257
2	Venta de Carpio, Ecatepec, Estado de México.	Silvestre	19°37.20´	98°59.38´	2229
3	San Nicolás Tlaminca, Texcoco, Estado de México.	Silvestre	19°29.16´	98°48.46´	2348
4	San Felipe, Texcoco, Estado de México.	Silvestre	19°30.36´	98°53.69´	2217
5	Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México.	Cultivada	19°29.50´	98°52.96´	2253
6	Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México.	Silvestre	19°27.81´	98°54.28´	2200
7	Santa Catarina Estetla, Santa María Peñoles, Oaxaca.	Traspatio	17°0.69´	97°8.29´	2100

N: norte; W: oeste; y msnm: metros sobre el nivel del mar.

### 3.2.2. Aislamiento y selección de aislamientos

En laboratorio se removieron las raíces de *Ricinus communis* para obtener el suelo rizosférico adherido a éstas. Se tomó una muestra de 10 g de suelo, así obtenido y se diluyó en 90 mL de agua destilada estéril, se agitó a 45xg durante 20 min. Se realizaron diluciones seriadas 1:10 y se inocularon 0.1 mL en medios de cultivo semiespecíficos. Para bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF), se utilizó el medio sólido Pikovskaya (De Basham *et al.*, 2007) y las placas se incubaron por 120 h a 28 °C. Para bacterias productoras de AIA se utilizó el medio sólido Luria-Bertani (Sigma, St. Louis, E.E.U.U.) y las placas se incubaron a 28 °C durante 48 h, además se les colocó una membrana de nitrocelulosa, la cual fue colocada en contacto directo con el reactivo de Salkowski en caja de Petri a temperatura ambiente. Para bacterias potencialmente fijadoras de N

asimbióticas se utilizó el medio sólido de Rennie (Hariprasad y Niranjana, 2009), y las placas fueron, incubadas a 28 °C durante 96 h; y se procedió a la selección y purificación de las cepas con mejor crecimiento. En total se seleccionaron, purificaron y propagaron 139 cepas para las evaluaciones de la siguiente fase.

### **3.2.3. Selección de cepas microbianas**

#### **3.2.3.1. Determinación de la solubilización de fosfatos**

Las cepas seleccionadas se sembraron en medio líquido Pikovskaya y se incubaron a 28°C por 72 h. Después de la incubación las muestras fueron transferidas a tubos para microcentrífuga y se centrifugaron a 2739×g durante 15 min, del sobrenadante obtenido de cada muestra se tomaron alícuotas de 200 µl y se transfirieron a celdas para espectrofotometría, se adicionaron 100 µl de solución de vanadato ( $\text{NH}_4\text{VO}_3$  0.25% en 35%  $\text{HNO}_3$ ) y 100 µl de solución de molibdato ( $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24}$  en 5% en agua); se dejó reaccionar durante 5 min hasta que se desarrolló un color rojizo en las muestras. Transcurrido el tiempo las muestras se leyeron en el espectrofotómetro (Biotek, model Synergy 2) a 420 nm y se corrigieron las lecturas con los blancos. Se calculó la cantidad de *p*-nitrofenol contenido con el uso de una curva patrón de calibración ( $y=172.93x - 6.2025$ ,  $R^2=0.9952$ ) que se construyó con cantidades de *p*-nitrofenol.

#### **3.2.3.2. Producción de auxinas**

La producción de auxinas fue evaluada mediante la cuantificación de la producción de AIA por las cepas bacterianas, siguiendo la metodología de Bric *et al.* (1948). Las cepas evaluadas se sembraron en 30 mL de caldo Luria-Bertani (Sigma, St. Louis, E.E.U.U.) (1 L de agua con: 10 g Triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl, y 1 g de Triptófano) y se incubaron a 28 °C durante 48 h. Una vez crecidas las cepas bacterianas, la suspensión bacteriana se depositó en tubos para centrifuga de 50 mL, se centrifugaron a

3144xg por 15 min, para separar el Pellet del sobrenadante. Por triplicado, se tomaron 150 µL del sobrenadante y el blanco (solo el medio líquido Luria-Bertani), se depositaron en microceldas para espectrofotómetro, se adicionaron 100 µL del reactivo Salkowski (63 mL de agua destilada, 35 mL de ácido perclórico, y 2 mL de FeCl 0.5 M). La reacción se incubó a temperatura ambiente y en obscuridad durante 30 min, el cambio de coloración rosa indicó la producción de índoles (AIA). La intensidad luminosa se leyó en un espectrofotómetro de luz UV (Biotek, modelo Synergy 2) a una longitud de onda de 530 nm. Se hicieron correcciones de los resultados con las lecturas del blanco y se calculó la concentración de AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) en función de la ecuación ( $Y=65.77X+1.6785$ ,  $R^2 = 0.9943$ ) con la que se generó la curva de calibración.

#### **3.2.3.3. Crecimiento de cepas en medio libre de nitrógeno**

Para la selección de cepas potencialmente fijadoras de N, éstas se sembraron en placas con medio de cultivo Rennie libre de N, y se evaluó la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano, lo cual generó una respuesta cualitativa.

#### **3.2.4. Selección de las 7 mejores cepas bacterianas multifuncionales**

Se realizó la selección de las mejores cepas multifuncionales mediante un índice que se generó para este propósito. Se consideró el valor mayor de producción de AIA, ponderado al 40%, más el valor más alto de la SF ponderado al 40%, y se consideró un 20% más, si la cepa fue capaz de crecer en el medio sin fuente nitrógeno.

#### **3.2.5. Identificación de cepas multifuncionales**

Se realizó la siembra de las 7 cepas con mejor índice de multifuncionalidad en medio Gelosa Nutritiva (Bioxon, BD, Mexico) para generar biomasa y determinar la viabilidad y pureza de las cepas. Se utilizó la plataforma de identificación BBL Crystal<sup>®</sup> (BD, Mexico)

mediante el uso de los paneles de identificación para bacterias Gram Negativas y Gram Positivas, se llenaron los paneles con una suspensión bacteriana ajustada a  $1 \times 10^7$  UFC/mL; se utilizaron otras pruebas complementarias para la identificación como: indol, catalasa, tinción de Gram, y OF (Hugh-Leifson) suplementado con glucosa al 0.1%. Se incubaron los paneles a 37 °C por 24 h. Se obtuvieron las lecturas en el lector de placas BBL Crystal® (BD, Mexico) y los resultados se interpretaron en el Software CRYSTAL MIND® (BD, Mexico), se emplearon las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 para la validación del sistema.

#### **3.2.5.1. Identificación de genética de las cepas multifuncionales**

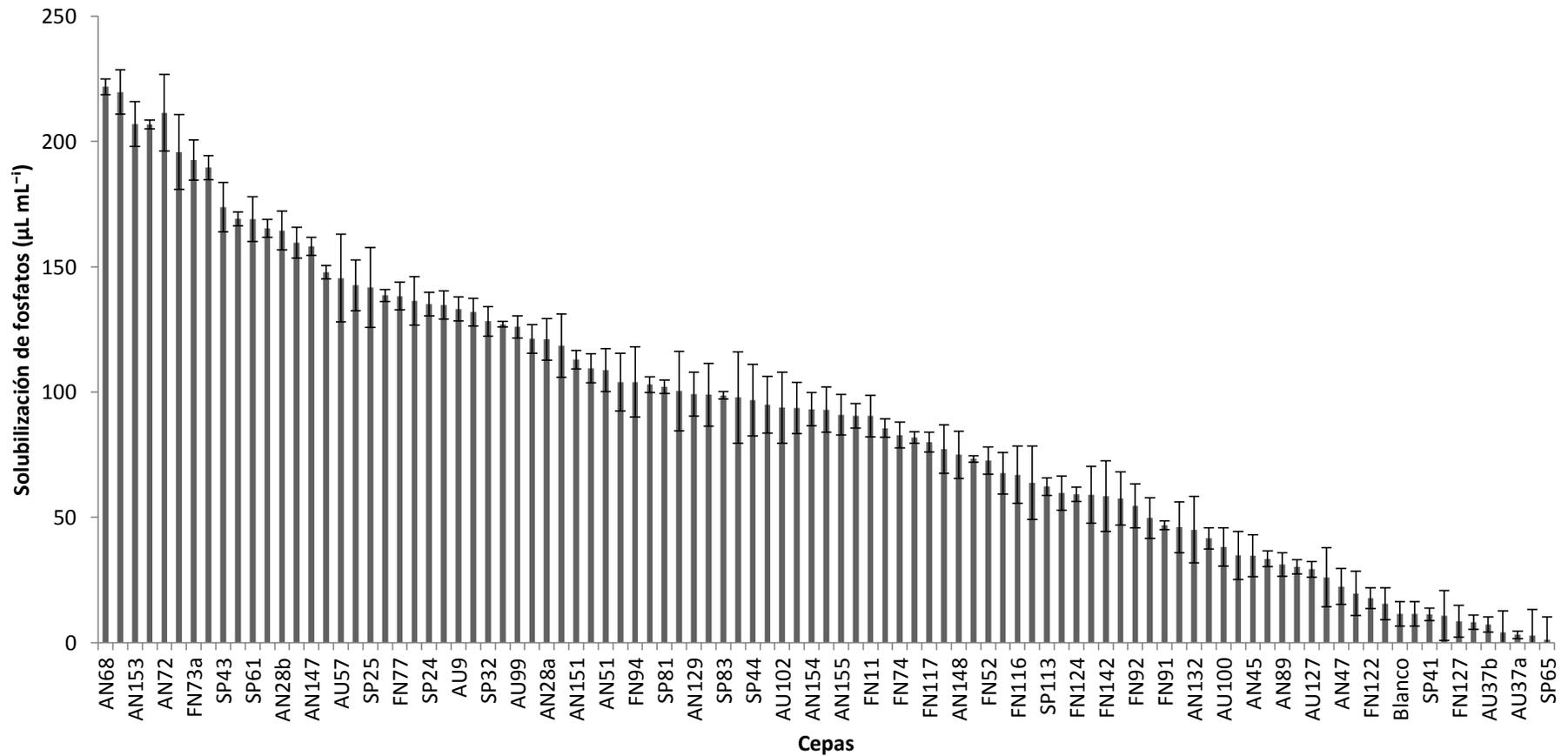
Se identificaron las 7 cepas con mayor índice de multifuncionalidad. Se realizó la extracción del material genético de biomasa de las cepas con el sistema comercial EZ-10 Spin® Column Bacterial DNA mini-preps kit (Bio Basic Inc., Canada), se verificó la integridad y concentración de las muestras de DNA. Se realizó la amplificación de un fragmento de  $\approx 500$  pb del gen 16S rDNA correspondiente a las regiones hipervariables V1 a V3 que permiten realizar la asignación de identidad de manera confiable hasta nivel de género y especie. Las secuencias fueron editadas con el programa BioEdit versión 7.0.9.0 (Hall, 1999) y Seaview versión 4.0 (Tamura *et al.* 2013) y la construcción de los árboles filogenéticos se hizo con el programa MEGA versión 6.0 (Tamura *et al.* 2013), con las secuencias se realizó un análisis en la plataforma BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para la búsqueda de genes homólogos con porcentajes de identidad mayores a 97% para nivel de especie, 95-96% para nivel de género y porcentajes de cobertura mayores a 85%, con base a los criterios de Rosselló-Mora y Aman (2001). Se realizó una reconstrucción filogenética con el programa MEGA 6 (Tamura *et al.* 2013) con minerías de secuencias de las bases de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) obtenidas del análisis MegaBLAT (Morgulis *et al.*

2008) con la finalidad de corroborar la identidad mediante la concordancia de la topología y la identidad del BLAST para cada una de las secuencias analizadas. Se construyó un árbol filogenético con las secuencias de las cepas multifuncionales con una minería de secuencias de bacterias promotoras de crecimiento vegetal con las que se construyó el alineamiento múltiple. Se utilizó el método de Neighbor-Joining, el modelo sustitución de Tamura-Nei y 10 000 bootstrap de repeticiones. Se realizó un alineamiento múltiple con ClustalX versión 2.0 (Larkin *et al.* 2007) y se construyó el árbol filogenético con el programa MEGA6 (Tamura *et al.* 2013).

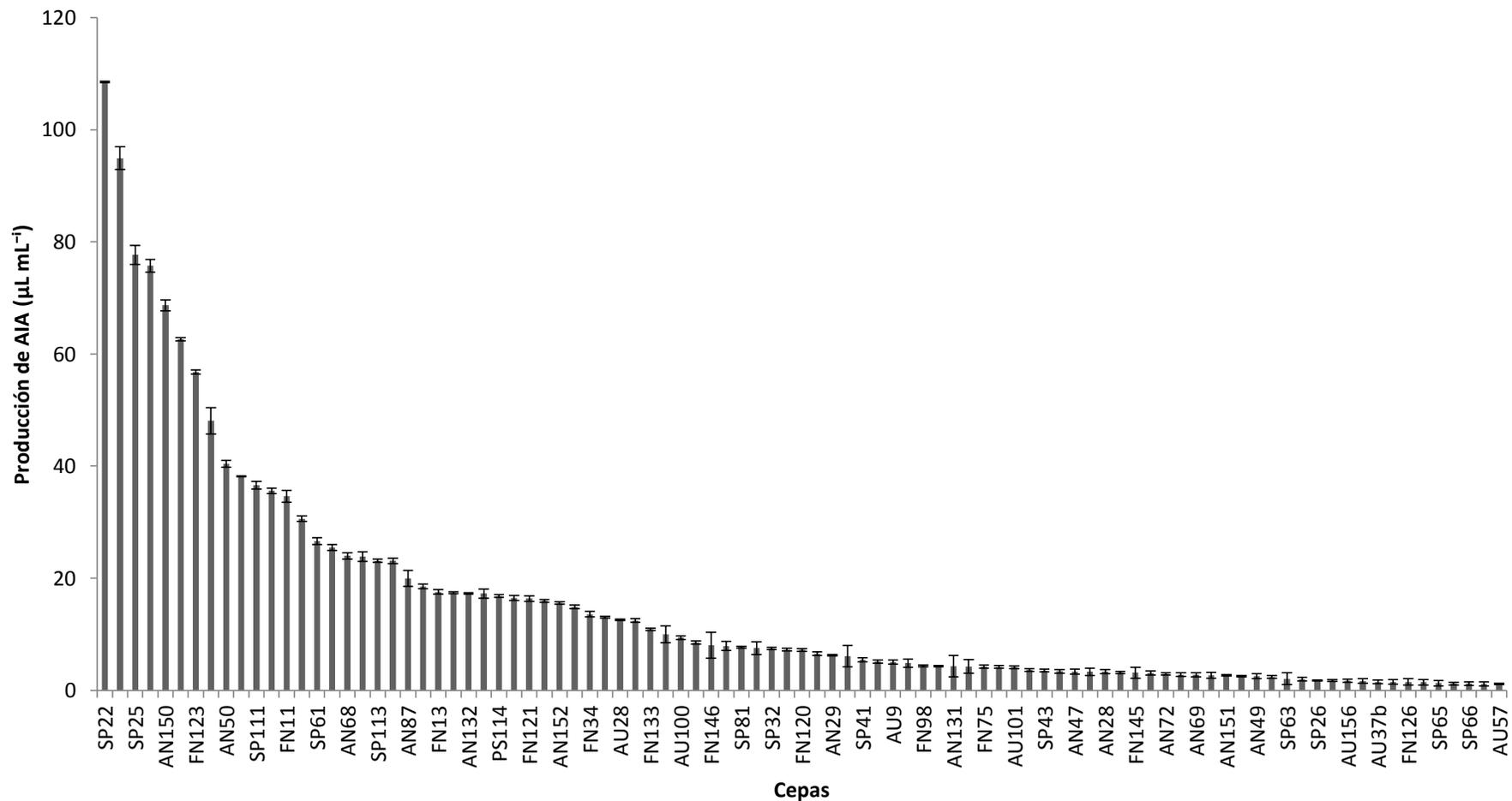
### **3.3. Resultados**

De las 139 cepas bacterianas, provenientes de los 7 sitios de muestreo, con mejor crecimiento, 71% fueron capaces de solubilizar  $100 \mu\text{L mL}^{-1}$  de fosfatos o cantidades mayores, 29% solubilizaron menos de  $100 \mu\text{L mL}^{-1}$  y el restante 10% no se detectó capacidad de SF (Figura 1). Seis cepas, las cuales representaron 4.5% (AN68, AN69, AN153, FN13, AN72 y FN121) solubilizaron más de  $195 \mu\text{L mL}^{-1}$  (Figura 3.1). El gráfico de distribución de las cepas productoras de AIA generó una curva logarítmica. Como consecuencia, solo 5% del total de las cepas aisladas produjeron más de  $50 \mu\text{L mL}^{-1}$  de AIA (SP22, SP83, SP25, FN144, AN150, AN128 y FN123) (Figura 3.2), el restante 95% produjo una cantidad menor de AIA.

Del total de las cepas evaluadas, se seleccionaron las 7 que presentaron las mejores características de acuerdo al índice de multifuncionalidad que se generó para este propósito, descrito en materiales y métodos. La cepa que presentó una mayor producción de AIA fue la SP22 (Clave GenBank KP715106) con  $108.5 \mu\text{L mL}^{-1}$ ; sin embargo, esta cepa fue la que menos fosfato solubilizó ( $90.47 \mu\text{L mL}^{-1}$ ). La cepa AN68 (Clave GenBank KP715108) no creció en medio Rennie libre de nitrógeno y presentó una concentración de  $23.99 \mu\text{L mL}^{-1}$  de AIA, solubilizó  $221.83 \mu\text{L mL}^{-1}$  de fosfato (Cuadro 3.2).



**Figura 3.1. Solubilización de fosfatos por 99 rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal aisladas de rizósfera de *Ricinus communis* de un universo total de cepas, procedente de 7 sitios de muestras. Las claves de las cepas corresponden a los medios de cultivo en los que fueron aisladas SP (Pikovskaya), AN (Agar nutritivo), FN (Rennie), AU (Luria-Bertani), seguido del número consecutivo de aislamiento.**



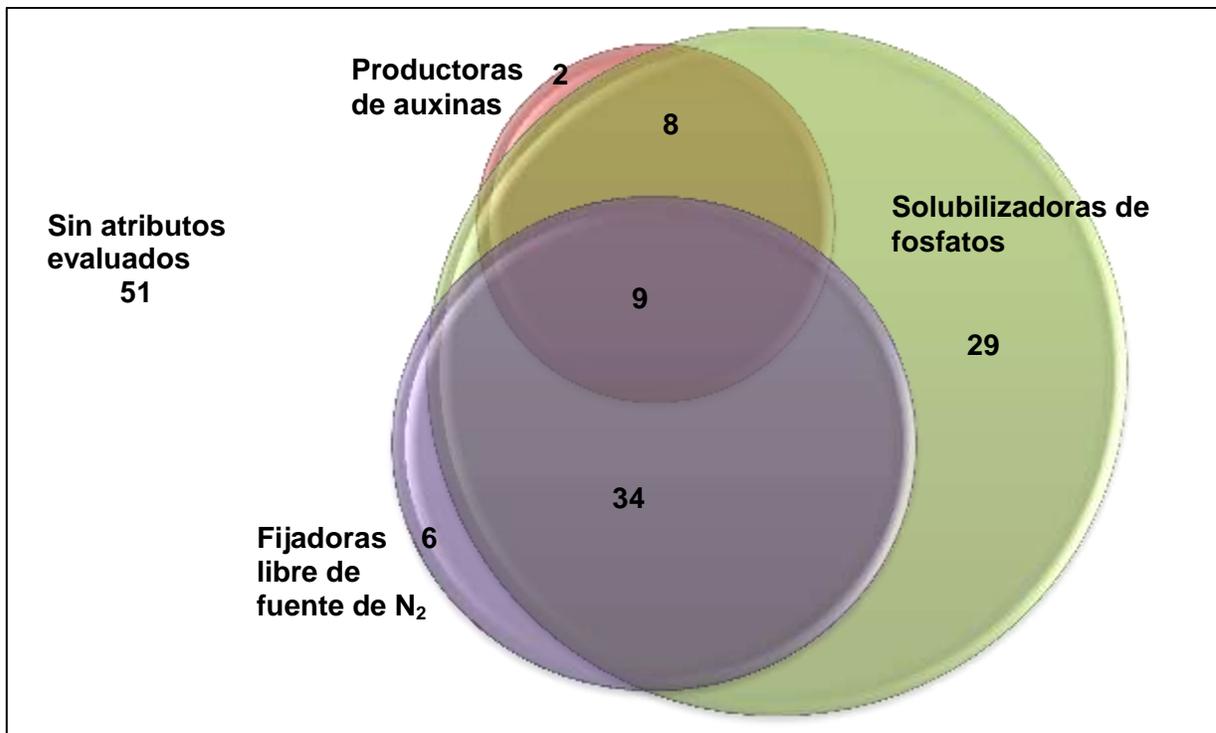
**Figura 3.2. Producción de ácido indolacético en 93 rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal aisladas de rizosfera de *Ricinus communis* de un universo total de cepas, procedente de 7 sitios de muestras. Las claves de las cepas corresponden a los medios de cultivo en los que fueron aisladas SP (Pikovskaya), AN (Agar nutritivo), FN (Rennie), AU (Luria-Bertani), seguido del número consecutivo de aislamiento.**

**Cuadro 3.2. Características de las 7 cepas multifuncionales seleccionadas y aisladas de rizosfera de *Ricinus communis*, con atributos benéficos como bacterias promotoras del crecimiento vegetal.**

Clave/Cepa	Número de accesión GenBank	Producción de AIA ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ )	Solubilización de fosfatos ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ )	Crecimiento en medio Rennie*	Índice de multifuncionalidad (%) <sup>¶</sup>
SP22	KP715106	108.50	90.47	+	76.31
SP25	KP715111	77.67	141.77	+	74.20
FN144	KP715107	75.74	102.97	+	66.49
AN68	KP715108	23.99	221.83	-	48.85
AN153	KP715109	1.19	206.96	+	57.76
FN121	KP715110	16.38	195.84	+	61.35
SP24	KP715112	48.08	135.08	+	62.08

AIA= Ácido indolacético; \*Este medio es libre de nitrógeno; <sup>¶</sup> Ver sección de materiales y métodos para la estimación de este índice; Las claves de las cepas corresponden a los medios de cultivo en los que fueron aisladas SP (Pikovskaya), AN (Agar nutritivo), FN (Rennie), seguido del número consecutivo de aislamiento.

De acuerdo a los resultados obtenidos, las pruebas de multifuncionalidad indicaron que en la rizosfera de las plantas de *Ricinus communis*, en su entorno natural, existen bacterias con una tendencia multifuncional, para la de producir AIA, solubilización de fosfato, crecimiento en ambientes con muy bajos o nulos niveles de nitrógeno. 38% de las bacterias aisladas presentó al menos un atributo benéfico, con respecto a aquellas cepas que no presentan ningún atributo (37%). 21% de las 139 cepas aisladas solubilizó fosfato, mientras que 24% creció en medio Rennie libre de nitrógeno y sólo 6% produjo AIA. Además, 7% presentó los 3 atributos analizados en este trabajo: producción de AIA, solubilización de fosfato y capacidad de crecer en medio libre de fuente de nitrógeno (Figura 3.3).



**Figura 3.3. Grupos de rizobacterias multifuncionales aisladas de rizosfera de *Ricinus communis*.**

En el sitio cultivado (sitio 5) se obtuvo la mayor cantidad de cepas sin atributos benéficos (15 cepas) (Figura 3.4a), En contraste, se encontró que en el sitio de muestro 6 presentó el mayor número de cepas multifuncionales (17) con al menos un atributo benéfico, este suelo provino de la rizosfera de higuera silvestre. En la figura 3.4b, se observa que en los sitios de muestro 3 y 1 se obtuvieron 11 y 10 cepas de bacterias con al menos dos atributos benéficos respectivamente. Y en el sitio 4 se encontraron 17 cepas aisladas con uno o ningún atributo. De las 139 cepas evaluadas se obtuvieron 52 sin atributos benéficos (37%), 34 con al menos un atributo (24%), 44 (32%) con al menos dos atributos y solo 9 cepas (7%) con 3 atributos benéficos. A partir de los resultados encontrados en cuanto a las cepas de bacterias con al menos un atributo benéfico, de acuerdo al índice de multifuncionalidad descrito en materiales y métodos, se seleccionaron las 7 mejores

cepas. A estas bacterias se les realizaron diferentes pruebas para conocer sus características fenotípicas. Se encontró que todas las cepas son bacilos (4 cepas Gram negativo y 3 Gram positivo) (Cuadro 3.3). Adicionalmente se efectuó una identificación genotípica para lo cual se ampliaron los fragmento del gen 16S rDNA de las 7 cepas y se asignaron identidades hasta nivel de especie (Cuadro 3.4). Con las secuencias se construyó un árbol filogenético para determinar la relación que presentan los microorganismos identificados, encontrando 3 cepas pertenecientes al grupo Gammaproteobacteria, 3 al grupo Bacilli y una al grupo Actinobacteria (Figura 3.5).

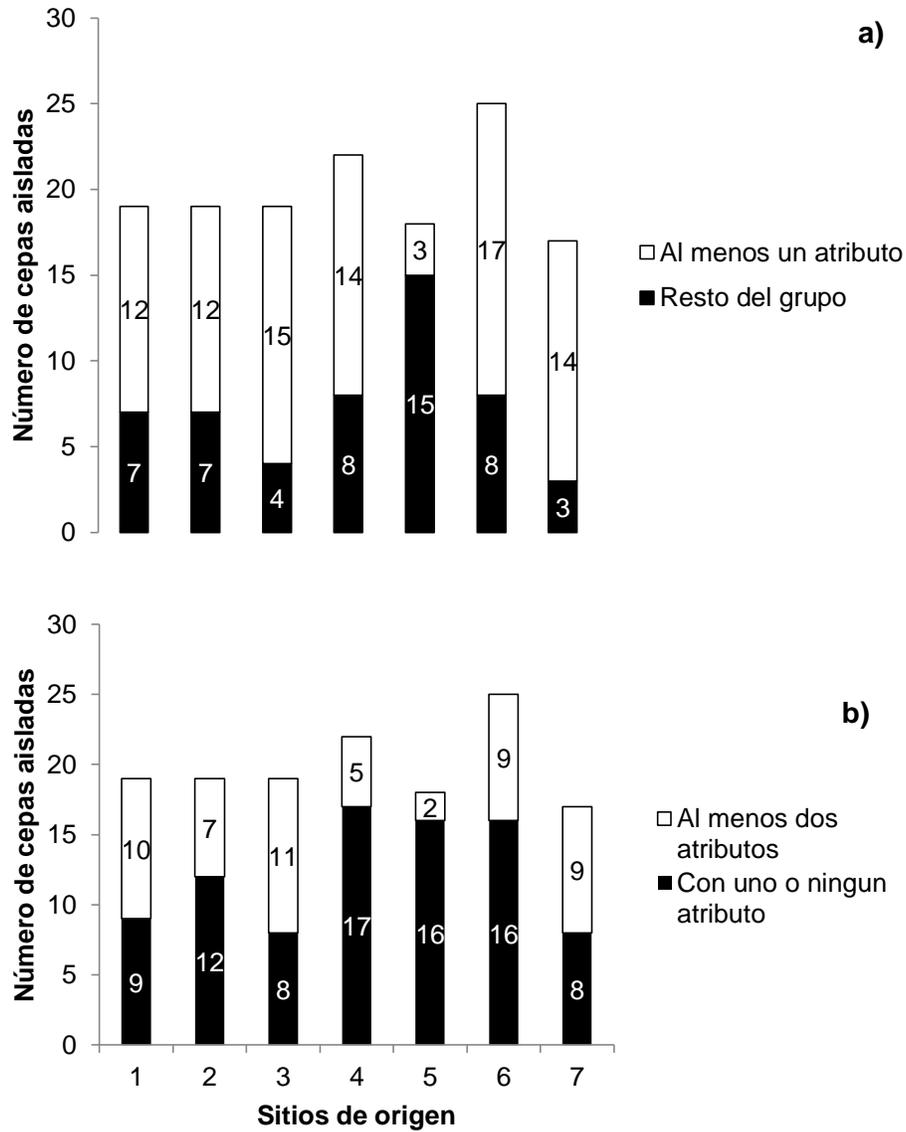


Figura 3.4. Cepas de rizobacterias multifuncionales con al menos un atributo deseable (a) y al menos dos atributos deseables (b), aisladas de rizosfera de *Ricinus communis*, en relación a su sitio de origen. Los números de los sitios de origen son los descritos en el Cuadro 1. Los números dentro de las barras representan el número de cepas en cada sitio de muestreo.

**Cuadro 3.3. Caracterización fenotípica de 7 cepas mediante BBL Crystal® y pruebas complementarias para identificación fenotípica.**

CLAVE¶	OXI	CAT	INDOL	O/F	O/F ACEITE	GRAM	FORMA	PANEL	ACCESO	Identidad fenotípica	Factor de confidencia
SP22	-	+	-	K	K	+	bacilo	GP	008	<i>Corynebacterium bovis</i>	0.9368
SP25	-	-	-	A 3/4	A 3/4	-	bacilo	ENF	024	<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.9783
FN144	-	+	-	K	K	+	bacilo	GP	013	<i>Bacillus megaterium</i>	0.9999
AN68	-	+	-	K	K	+	bacilo	GP	010	<i>Corynebacterium sp.</i>	0.9134
AN153	+	+	-	K	K	-	bacilo	ENF	026	<i>Bacillus circulans</i>	0.9999
FN121	+	+	-	K	K	-	bacilo	ENF	025	Misceláneos Gram negativos/ <i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.6817/ 0.2857
SP24	-	-	-	A 3/4	A 3/4	-	bacilo	ENF	023	<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.9783
E.c.	+	+	+	A+G	A+G	-	bacilo	ENF	027	<i>Escherichia coli</i>	0.9825
S.a.	-	+	-	K	A sup	+	coco	GP	014	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.9999

Claves: E.c.= *Escherichia coli* ATCC 25922; S.a.= *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; O/F= Medio OF; O/F ACEITE= Medio OF en anaerobiosis; K= medio sin cambio; A= Generación de ácido a partir de glucosa; A+G= ácido más gas; GP= Panel Gram positivos; ENF= Panel Entéricos No Fermentadores; esp= esporulado; sup= parte superior del medio en el tubo. ¶ver pie de Figura 1.

**Cuadro 3.4. Comparación de la identificación fenotípica y genotípica.**

Isolation code¶	Phenotypic identification	16S rDNA identification			
		Genetic identity	Coverage (%)	Identity (%)	ΔE
SP22	<i>Corynebacterium bovis</i>	<i>Arthrobacter koreensis</i>	100	100	0.0
SP25	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	100	100	0.0
FN144	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	100	100	0.0
AN68	<i>Corynebacterium sp.</i>	<i>Bacillus simplex</i>	100	100	0.0
AN153	<i>Bacillus circulans</i>	<i>Paenibacillus lactis</i>	100	99	0.0
FN121	Miscelaneos Gram <i>negativos/Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	100	100	0.0
SP24	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	100	99	0.0

Claves: sp.= especie; ΔE= valor de expectación (<math>1 \times 10^{-3}</math>). ¶ver pie de Figura 1.

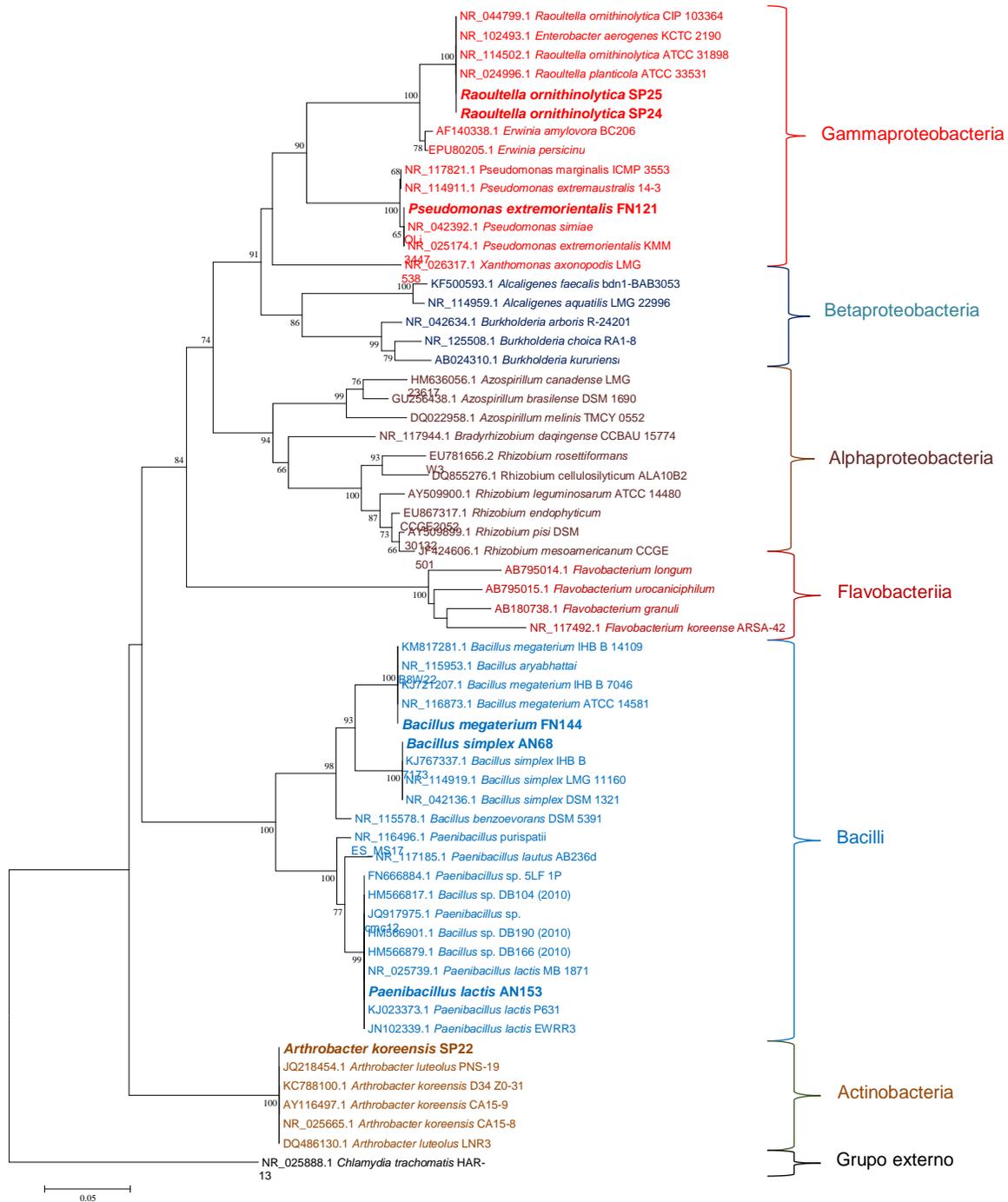


Figura 3.5. Árbol filogenético de microorganismos asociados al crecimiento vegetal. Se muestra que 3 de las cepas identificadas pertenecen al grupo Gammaproteobacteria, 3 al Bacilli y una al Actinobacteria. Se realizó una minería de secuencias de bacterias promotoras de crecimiento vegetal con las que se construyó el alineamiento múltiple. Se utilizó el método de Neighbor-Joining, el modelo sustitución de Tamura-Nei y 10 000 bootstrap de repeticiones.

### 3.4. Discusión

En el presente trabajo se detectaron bacterias multifuncionales con tres propiedades benéficas:

i) solubilización de fosfatos; ii) producción de AIA; y iii) crecimiento en medio libre de N.

Asimismo, se detectó que la proporción de cepas con las tres características presentes simultáneamente, fue relativamente baja, 7% del total de las 139 cepas bacterianas evaluadas.

Varios procesos importantes relacionados con la fisiología vegetal están asociados al P, por

ejemplo el P incide en la fijación biológica de N, en la calidad y el rendimiento de los cultivos, y

en la resistencia a las enfermedades por parte de las especies vegetales. Sin embargo, es el

elemento de menor disponibilidad en el suelo, debido a su inmovilización y a la fijación en

complejos minerales insolubles, lo que trae como consecuencia una disminución de hasta 75%

del fósforo disponible en el suelo. Ciertos grupos bacterianos tienen la capacidad de efectuar

solubilización de fosfatos, a partir de compuestos orgánicos mediante un proceso catalizado por

enzimas y P inorgánico, a través de la producción de ácidos orgánicos (Rennie, 1980). La

liberación de ácidos orgánicos por las bacterias provoca una disminución del pH en el medio, lo

que facilita la liberación de fósforo inmovilizado, mediante la sustitución y excreción de H<sup>+</sup> o la

liberación de iones Ca<sup>2+</sup> (Bric, Bostock y Silverstone, 1991). Otro mecanismo está relacionado

con la formación de complejos estables que permiten la liberación de los grupos fosfatados, que

se forman debido a la alta afinidad que tienen los aniones carboxílicos de los ácidos orgánicos

liberados por las bacterias, por Ca, F y Al presentes en los compuestos con grupos fosfatos

minerales (Khan, 2009). Las BSF presentes en los suelos pueden ser aerobias y anaerobias, y

constituir del 1 al 50% de la biomasa bacteriana presente en la rizosfera (Khan, 2007). Se ha

demostrado que no todas las bacterias que forman halos de solubilización en medios sólidos,

tienen capacidad de solubilizar fosfatos, por esta razón en el presente trabajo se empleó una

metodología más precisa de cuantificación de fosfatos solubilizados. Bashan *et al.* (2013),

señalaron que para comprobar que un microorganismo solubiliza fosfato, después de la

determinación de la formación de halo en medio sólido con fuentes de fósforo orgánico e

inorgánico, se debe cuantificar el fósforo soluble en medio líquido. En este trabajo se encontró que de las 139 cepas seleccionadas, 21% presentó la capacidad de solubilizar fosfato; sin embargo, faltaría exponer este grupo de bacterias a condiciones de campo para comprobar su verdadera capacidad en estas condiciones.

La producción de fitohormonas por parte de las bacterias y su impacto en la morfogénesis de la raíz, podrían explicar en gran parte los efectos positivos de las bacterias productoras de auxinas en el crecimiento vegetal; Al incrementar el número de pelos radicales y raíces laterales, que permiten una mayor absorción de agua y nutrientes por la planta (Khan, 2007) y un mayor intercambio con el ambiente de la rizosfera, originando incrementos en el rendimiento del cultivo. La fitoestimulación está dada particularmente por la compleja y balanceada red de hormonas de plantas o compuestos similares, que influyen directamente en el crecimiento o estimulan la formación de raíces. Por ejemplo, muchas especies de *Azospirillum* producen auxinas, citoquininas y giberelinas (Demodaram y Hegde, 2010) que estimulan el desarrollo del sistema radical, lo que provoca incrementos en los rendimientos agrícolas (Bashan, 2013).

La producción bacteriana de AIA fue estudiada no solo por su efecto fisiológico en las plantas, sino también por la función que pueda desempeñar esta fitohormona en la interacción planta-microorganismo. De las 139 cepas aisladas de la rizosfera de *Ricinus communis* L. solo el 6% presentó la capacidad de producir AIA. La cepa SP22 proveniente de las plantas cultivadas, fue la que mayor producción de AIA tuvo con  $108.50 \mu\text{L mL}^{-1}$  y la cepa AN153 aislada de San Nicolás Tlaminca la de menor producción con  $1.19 \mu\text{L mL}^{-1}$ .

El N es un elemento limitante para la productividad vegetal por su escasez en los suelos, además de que su disponibilidad es limitada (Anjani *et al.* 2014); Los inoculantes microbianos a base de bacterias diazotróficas, constituyen una alternativa eficaz al uso de fertilizantes químicos nitrogenados (Soares-Severino y de Sousa-Gondim, 2005, Pabón, 2010). Estas

bacterias tienen la capacidad de fijar el N atmosférico y hacerlo disponible para los cultivos. Los beneficios del uso de estos microorganismos se han observado en hortalizas, granos y especies forestales (Acebo-Guerrero, 2011); además, la presencia de estas bacterias favorece el desarrollo de microorganismos que tienen la capacidad de producir vitaminas y fitohormonas; como el AIA, ácido giberélico y citoquininas; que influyen directamente en el desarrollo vegetal (García de Salamone, 2010). En el presente estudio este parámetro se determinó de forma cualitativa, encontrándose que del total de las bacterias aisladas de la rizosfera de *R. communis*, 37% posee la capacidad de crecer en un medio libre de nitrógeno, sin embargo, se necesitan pruebas adicionales para determinar si estas cepas bacterianas tienen la capacidad para utilizar el nitrógeno atmosférico, en condiciones más realistas.

Actualmente existe una gran cantidad de bacterias identificadas como BPCV, probadas a nivel laboratorio, aunque el estudio de la multifuncionalidad, y la abundancia de esta característica, ha recibido escasa atención en términos generales.

A partir de los resultados de multifuncionalidad, las 7 mejores cepas fueron identificadas fenotípicamente y genotípicamente, encontrándose que pertenecen a 5 géneros y 6 especies diferentes de bacterias; a continuación se muestran sus características más sobresalientes:

El phylum Actinobacteria está integrado por un conjunto de organismos filogenéticamente diversos, en los cuales se han estudiado principalmente sus propiedades para causar enfermedades en plantas y animales, su capacidad productora de compuestos antimicrobianos y anticancerígenos, y su habilidad para degradar compuestos recalcitrantes en los suelos. Dentro de las actinobacterias, en el presente trabajo se identificó molecularmente *Arthrobacter koreensis* en la cual se detectaron las 3 características benéficas evaluadas. El género *Arthrobacter* es un grupo de bacterias aeróbicas, Gram-positivas, corineformes, positivas a la catalasa, con L-lysina como ácido diamino en sus paredes celulares y con ácidos celulares grasos ramificados. Especies de este género han sido reportadas de suelos de diversos ambientes a nivel mundial, principalmente de ambientes contaminados con materiales

radioactivos y químicos industriales, incluyendo aislamientos con propiedades de degradación de hidrocarburos en suelos contaminados. Recientemente, han sido localizadas abundantemente en suelos de la Antártida. A la fecha se conocen 82 especies con nombres válidos publicados. *A. koreensis* fue originalmente descrita de suelos de Daejeon, Korea y se ha detectado que esta especie es dominante en la comunidad de estructura microbiana en suelos contaminados con arsénico en Tailandia. Previamente, no se había reportado la capacidad de solubilizar fosfatos y producir ácido indolacético para dicha especie bacteriana. *Arthrobacter*, es un grupo de bacterias Gram-positivas, omnipresentes en los suelos prístinos y contaminados (Jerke *et al.* 2008), que poseen una amplia gama de funciones fisiológicas, que incluyen la resistencia a la desecación y la radiación ionizante (Crocker *et al.* 2000), resistencia a metales pesados (Waasbergen *et al.* 2000, Fredrickson *et al.* 2008), elementos radioactivos (Carvajal, Katsenovich y Lagos, 2012), contaminantes orgánicos y plaguicidas (Sajjaphan *et al.*, 2004, Overhage *et al.* 2005, Ferreira *et al.* 2008), eliminan dietilcetona (Costa, Quínelas y Tavares, 2012), y producen adenosina desaminasa, este último es importante para obtener compuestos farmacológicamente activos, tales como un agente anti-leucémica, un inhibidor del virus de la Hepatitis B y un inhibidor de VIH (Médici, Lewkowicz e Iribarren, 2008). *Arthrobacter koreensis*, es una bacteria aerobia capaz de crecer en suelos alcalinos, en un intervalo de pH de 7 a 12. Son bacilos capaces de degradar hexaclorociclohexano plaguicida organoclorado ( $\gamma$ -HCH, lindano) y sus isómeros no insecticidas  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\delta$ -, los cuales, generan graves problemas ambientales y de salud, aunque su uso ha sido restringido o prohibido totalmente (De Paolis *et al.*, 2013).

*Raoultella ornithinolytica* es un bacilo Gram-negativo, aerobio, inmóvil y encapsulado; sus colonias son redondas, lisas y de color amarillo. Es productora de histamina y ha sido aislada en ambientes acuáticos, plantas, termitas, insectos y suelos (Mayea *et al.*, 1998). Da resultados positivos a las pruebas de reducción de nitrato, producción de catalasa, indol, fosfatasa alcalina y asimilación de glucosa. Su crecimiento óptimo se da a un pH de 7.0-8.0, pero pueden tolerar

pH de 6.0 a 12.0, por lo que se consideran bacterias alcalinotolerantes. Es una bacteria predominante en diferentes tipos de suelos y se consideran bacterias mesófilas (Rodelas *et al.*, 2001).

*Raoultella* pertenece a Enterobacteriaceae, que se conforma por un grupo de bacterias quimioorganotrofas, anaerobias facultativas, que tienen metabolismo de tipo respiratorio y fermentativo, metabólicamente versátiles, con capacidad de crecer en medios mínimos y pueden utilizar una amplia gama de fuentes de carbono (Don, 2005); algunos de sus miembros tienen la capacidad para producir H<sub>2</sub> a partir de diferentes fuentes de energía; como azúcares: (xilosa, arabinosa y celobiosa); este producto de su metabolismo puede emplearse como una fuente de energía renovable a partir de la fermentación de biomasa (Marone *et al.*, 2012). Degrada plaguicidas organofosforados como el dimetoato (Liang *et al.*, 2009), fenol (Li *et al.*, 2009), ácido benzoico (Iwanade *et al.*, 2005; Jang, Hirai and Shoda, 2006) y verde de malaquita (Mei, Hong and Li, 2010). Produce fitasa, la cual al ser adicionada a los alimentos balanceados para animales monogástricos, reduce el nivel de contaminación de fósforo en los suelos, por excreciones, en las zonas de producción animal intensiva, al ser capaces de iniciar la liberación por etapas de P a partir de fitato la principal forma de almacenamiento de fosfato en semillas y polen (Konietzny and Greiner, 2004), degrada y crece en medios con hormonas esteroides sexuales, como única fuente de carbono y energía (Ji *et al.*, 2007). Es útil para la producción de biodiesel, por ejemplo, la cepa *Raoultella planticola* 232-2 es capaz de catabolizar eficientemente una mezcla de aceites vegetales, manteca de cerdo y sebo de bovino para la producción de este combustible alternativo (Sugimori, Watanabe and Utsue, 2013). Es una BPCV multifuncional, que produce AIA y solubiliza fosfato, lo que concuerda con Sajidan *et al.* Se dice que las cepas bacterianas rizosféricas de *Bacillus simplex* pueden modular tanto la promoción del crecimiento vegetal y la arquitectura del sistema radical por la emisión diferencial de compuestos orgánicos volátiles (Gutiérrez-Luna *et al.*, 2010) así como por la producción de IAA, que van desde 4,3 (*Bacillus* sp RC23) a 7,2  $\mu\text{L mL}^{-1}$  (*Bacillus simplex* RC19) reportado por

Erturk *et al.* (2010), la cual está por debajo de los niveles obtenidos en este trabajo ( $23.99 \mu\text{L mL}^{-1}$ ); además en este grupo se ha reportado previamente que la estimulación de enraizamiento y crecimiento de las raíces por las PGPR puede ser correlacionada con la producción de AIA por las bacterias (Schwartz *et al.*, 2013). *Bacillus simplex* ha sido reportado como un agente de control biológico potencial en contra de la pudrición blanda causada por *Pectobacterium* y *Dickeya* spp. (Krzyzanowska *et al.*, 2012), *Phytophthora erythroseptica*, el agente causante de la podredumbre rosa en la papa (Schisler *et al.* 2014) y actividad anti-fúngica contra *Fusarium* spp. (Schwartz *et al.*, 2013). La solubilización de fosfato coincide con lo reportado por Schwartz *et al.* (2013) y la producción de AIA reportada por Hassen and Labuschagne, (2010). También se menciona que este posee capacidad de generar la enzima ACC desaminasa (Rashid, Charles y Glick, 2012), que reduce el  $\text{Fe}^{3+}$  (dos Reis *et al.*, 2014), además de biodegradar hidrocarburos (García-Echauri *et al.*, 2011), estimular el crecimiento de las plantas y aumentar las concentraciones de macro y micronutrientes (Timmusk *et al.*, 1999; Cakmakçi *et al.*, 2012). Sin embargo, nuestros aislamientos de *B. simplex* no tuvieron la capacidad de crecer en medio libre de N, al contrario de lo reportado por Ertuk *et al.* (2012).

*Bacillus megaterium* es una bacteria Gram-positiva formadora de esporas que se encuentra principalmente en el suelo, de donde se puede transmitir a las plantas comestibles. No es una bacteria altamente resistente al calor, crece a temperaturas de entre  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Presenta un comportamiento similar a *Bacillus cereus*, por lo que se considera una cepa patógena al encontrarse en algunos alimentos, como la leche. Sin embargo, puede ser destruida por métodos simples como la pasteurización, por lo que se considera oportunista (Hanak *et al.*, 2014). Normalmente forman pares o cadenas unidas entre sí por paredes de polisacáridos. Es una bacteria endófito y se considera un agente potencial para el control de enfermedades fúngicas en plantas (Suvendu *et al.*, 2014). Algunas cepas tienen la capacidad de fijar N atmosférico (Das *et al.*, 2014). Tiene importancia industrial ya que *B. megaterium* produce amidasa de penicilina que se utiliza para producir penicilina sintética, vitamina B12, fungicidas y

antivirales (Adeleke y Dames, 2013). Este microorganismo es importante por su potencial para producir PHB, que es un polímero resistente producto de la asimilación del carbono (a partir de glucosa o almidón) y que es empleado por la bacteria como una forma de almacenamiento de energía para ser metabolizado cuando otras fuentes comunes de energía no están disponibles (Latif *et al.*, 2013). Previamente otras especies benéficas han sido utilizadas en la producción de *R. communis*. Por ejemplo, *Bacillus subtilis* mostró tener capacidad para inhibir el crecimiento de *Fusarium equiseti*, como resultado de la síntesis de compuestos como surfactina, iturina y fengicinas; que se utilizan para el control de enfermedades de las plantas, esta actividad despierta el interés para continuar utilizándola en diferentes campos de la investigación, bajo condiciones controladas como en control biológico, contra patógenos vegetales, como biofertilizante o promotor de crecimiento vegetal en diferentes cultivos.

*Paenibacillus lactis* son bacilos rectos con extremos redondeados, móviles, Gram-negativos. Las endosporas son elipsoidales o cilíndricas. Las colonias son redondas, ligeramente convexas, color crema y opacas. Con bordes transparentes, difusos; la superficie presenta una textura parecida al cascarón de huevo. Son bacterias aerobias, que crecen en un intervalo de temperatura entre 30 a 40 °C. Se desarrollan satisfactoriamente a pH 7.0, pero se pueden encontrar en pH de entre 10.5 y 11.0. Se han asociado a la rizosfera de diferentes plantas y presenta la capacidad de fijar N (Angelopoulou *et al.*, 2014). *Paenibacillus* spp., es clasificado como RPCV por producir citoquinina (Timmusk *et al.*, 1999), péptidos antibióticos (Budi *et al.*, 1999) y flavonoides (Selim *et al.*, 2005). También produce IAA y solubiliza fósforo, tal como lo reportado por Ma *et al.*, (2011) para *Paenibacillus* sp ASR6, pero contrario a lo reportado por Beatty *et al.*, (2002), en cuanto a la solubilización de fósforo. Estimula el crecimiento micelial de *Kalaharituber pfeilii* (Hennings) Trappe y Kagan-Zur (antes *Terfezia pfeilii*), por lo que también se considera como una bacteria que ayuda a la micorrización (Martin *et al.*, 2003), en otro trabajo se reportó la presencia de genes NOD en la asociación simbiótica única de *Paenibacillus* spp. en nódulos de *Trifolium pratense* (Suvendu *et al.*, 2013); además, tiene la

capacidad de crecer en medio libre de fuente de nitrógeno y presenta actividad antagonista frente a muchos hongos fitopatógenos (Schhwyn y Neilands, 1987), así como un amplio espectro de actividad bactericida en bacterias gram-positivas y gram-negativas (Jin *et al.*, 2014), al mismo tiempo que estimula la colonización de la raíz por los hongos formadores de micorrizas arbusculares (Jordan y Wagschal, 2010; Jin *et al.*, 2014; Zhanga *et al.*, 2014). *Paenibacillus*, se considera como un grupo formador de endosporas, que le permiten resistir la desecación, el calor, la irradiación UV, solventes orgánicos y puede prosperar en suelos agrícolas, por lo que es muy adecuado para aplicaciones de control biológico (Jordan y Wagschal, 2010; Jin *et al.*, 2014; Zhanga *et al.*, 2014). Es un agente útil en la biorremediación de suelos contaminados, ya que degrada diferentes compuestos como albendazol (Zhang *et al.*, 2014), ftalato de dibutilo (DBP) (Jin *et al.*, 2014), xilano (Jordan y Wagschal, 2010; Jin *et al.*, 2014; Zhanga *et al.*, 2014), di-*n*-butil ftalato (Kambourova *et al.*, 2007), quitina (Itoh *et al.*, 2014; Meena *et al.*, 2014), celulosa (Chua *et al.*, 2014); además de presentar actividad amilolítica (Kambourova *et al.*, 2007) y tolerancia a arsénico (Suvendu *et al.*, 2014), por lo que tiene un alto valor de aplicación potencial en las industrias de fármacos, alimentos, energía, papel, celulosa y de biocombustibles (Kambourova *et al.*, 2007).

*Pseudomonas extremorientalis* es una bacteria Gram negativa, aerobia, formadora de esporas, con el fenotipo típico de *Pseudomonas fluorescens*. Son bacilos de entre 0.8 -1.0  $\mu\text{m}$  con un diámetro de entre 2.0-3.5  $\mu\text{m}$  que presentan un flagelo polar. Forma colonias redondas, convexas de tamaño regular. Crecen en un intervalo de temperatura de 14-35 °C, con un crecimiento óptimo a 25 °C y a un pH de 7.0, tiene metabolismo quimiorganotrofo (Spanggord *et al.*, 1991). *Pseudomonas* spp., posee la capacidad de degradar estireno (Liang *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2007), 2,4-dinitrotolueno (DNT) (Spanggord *et al.*, 1991), atrazina (Mandelbaum, Allan y Wackett, 1995), quinolina (Bai *et al.*, 2010), fenol (Aneez Ahamad y Mohammad Kunhi, 2011), verde malaquita (MG) (Du *et al.*, 2011; Jung *et al.*, 2013), nicotina (Zhong *et al.*, 2010), dibenzofurano (Kumar *et al.*, 2011), paratión-metilo (PM) (Zhang *et al.*, 2012), y simazina [2-

cloro-4,6-bis(etilamina)-s-triazina] utilizada en todo el mundo para el control de malezas de hoja ancha (Morgante *et al.*, 2010); compuestos clorados como el ácido dicloroacético, éster heptadecilo, formando compuestos más simples como 4-isopropil-benzaldehído (Tanay *et al.*, 2012). *Pseudomonas* spp., produce la enzima reductasa de cobre, clave en la biorremediación de suelos contaminados con Cu (Andreazza *et al.*, 2011), *Pseudomonas* spp M174. UW4 convierte indol-3-acetonitrilo para producir AIA (Duca, Rose y Glick , 2014). También *Pseudomonas* spp. HYS produce L-3,4-Dihidroxifenilalanina (L-DOPA) que es la droga más potente que se usa para el tratamiento del párkinson (Patil *et al.*, 2013), así como, *Pseudomonas* sp 2B, produce un tipo de biosurfactante glucolípido que reduce la tensión superficial y emulsiona diferentes hidrocarburos (Aparna, Srinikethan y Smitha, 2012). *Pseudomonas* sp como muchas otras RPCV produce 2,4-diacetilfloroglucinol (2,4-DAPG), un policétido producido por bacterias que muestran amplio espectro antiviral, antifúngico, antibacteriano, antitumorales y propiedades fitotóxicas, útil para el control de la marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*, una enfermedad importante en cultivos como el tomate (*Lycopersicon esculentum*), la papa (*Solanum tuberosum*), el chile (*Capsicum annuum*), el tabaco (*Nicotiana tabacum*), la berenjena (*Solanum melongena*) y el pimiento (*Capsicum annuum*) (Srinivasamurthy, Singh y Rai, 2014). Antagónica a *Radopholus similis* (Araujo *et al.*, 2010) y *Flavobacterium psychrophilum* en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss* modelo) (Korkea-aho *et al.* 2011). Es capaz de utilizar el compuesto de la planta 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) como única fuente de nitrógeno, ya que posee la enzima ACC desaminasa (Yu *et al.*, 2014) Tiene capacidad de nodulación en algarrobo negro (*Robinia pseudoacacia*) (Shiraishi, Matsushita y Hougetsu, 2010). *Pseudomonas extremorientalis* FN121 mostró producción de AIA lo que concuerda con reportes previos (Suvendu *et al.*, 2014; Szilagyi-Zecchin *et al.*, 2014), solubiliza fosfatos que concuerda con Giles *et al.*, (2013) y Achari *et al.* (2014), además, tiene la capacidad de crecer en medio libre de nitrógeno (LaPatra, Fehring y Cain, 2014);

La sustentabilidad de los sistemas agrícolas a largo plazo debe fomentar el uso y manejo eficiente de los recursos naturales de los agroecosistemas. Los microorganismos benéficos son un componente vital de los sistemas que tienden a la sustentabilidad; además de reducir los costos de producción y el impacto ambiental de la fertilización química. Los microorganismos con múltiples funciones, es decir, aquellos que sean capaces de solubilizar el fósforo para hacerlo disponible a las plantas, y que además de producir fitohormonas y fijen N atmosférico, tienen un amplio potencial para ser usados como bioinoculantes en sistemas de producción agrícola.

### **3.5. Conclusiones**

Se detectó que existe multifuncionalidad, es decir capacidad simultánea de solubilizar fosfatos, producir AIA y crecer en medio libre de fuente de N, en una proporción relativamente reducida, 7%, del total de las 139 cepas bacterianas aisladas de rizosfera de *R. communis* evaluadas. Dentro de los sitios de muestro, las bacterias aisladas del área cultivada, fueron las que presentaron menor número de cepas con atributos benéficos. En 37% de las cepas evaluadas no se registró ninguna característica benéfica y 63% presentaron al menos 1 atributo benéfico. Las cepas con capacidad de solubilizar fosfatos y producir AIA, constituyeron 58% y 14%, respectivamente. Se obtuvieron 7 cepas con capacidad de producir más de 50 mg L<sup>-1</sup> de AIA. Se reporta por primera ocasión la capacidad de solubilizar fosfatos y producir AIA en *Arthrobacter koreensis* y *Bacillus megaterium*. Adicionalmente, el presente trabajo contribuye al conocimiento de los microorganismos potencialmente útiles, principalmente *Bacillus megaterium*, en la producción de bioinoculantes útiles para el cultivo de higuera, reduciendo sus costos económicos y ambientales; y de esta forma contribuir a la producción sustentable de biocombustibles.

### 3.6. Literatura citada

- Acebo-Guerrero Y, H.-R. A.-R.-L. Perspectivas del uso de bacterias rizosfericas en el control de *Pyricularia grisea* (CookeSacc.) en el cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.). Rev. Colom Biotecnol. 2011; 1(13): 16-22.
- Achari GA, Ramesh R. Diversity, Biocontrol, and Plant Growth Promoting Abilities of Xylem Residing Bacteria from Solanaceous Crops. International Journal of Microbiology. 2014; 1-14.
- Adeleke R, Dames JF. *Kalaharituber pfeilii* and associated bacterial interactions. South African Journal of Botany. 2014; 90:68–73.
- Andreazza R, Okeke BC, Pieniz S, Brandelli A, Lambais MR, Camargo FAO. Bioreduction of Cu(II) by Cell-Free Copper Reductase from a Copper Resistant *Pseudomonas* sp. NA. Biological Trace Element Research. 2011; 143 (2): 1182-1192.
- Aneez Ahamad PY, Mohammad Kunhi AA. Enhanced degradation of phenol by *Pseudomonas* sp. CP4 entrapped in agar and calcium alginate beads in batch and continuous processes. Biodegradation. 2011; 22(2): 253-265.
- Angelopoulou DJ, Naska EJ, Paplomatas EJ, Tjamos SE. Biological control agents (BCAs) of *Verticillium* wilt: influence of application rates and delivery method on plant protection, triggering of host defence mechanisms and rhizosphere populations of BCAs. Plant Pathology. 2014; 63(5): 1062-1069
- Anjani K, Raof MA, Desai AG. Evaluation of world castor (*Ricinus communis* L.) germoplasm for resistance to Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *ricini*). Eur J Plant Pathol. 2014;139: 567-578.

- Aparna A, Srinikethan G, Smitha H. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2012; 95: 23–29.
- Araujo KS, Peixoto CC, da Silva ACM, Cardoso KGV, da Silva HAS, Trindade AV. Avaliação e identificação de *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp. dois isolados de rizobactérias antagônicas a *Radopholus similis*. Jornada científica-Embrapa Mandioca e Fruticultura. 2010.
- Bai Y, Sun Q, Zhao C, Wen D, Tang X. Quinoline biodegradation and its nitrogen transformation pathway by a *Pseudomonas* sp. strain *Biodegradation* 2010; 21(3): 335-344.
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms, *Annual Review of Plant Biology*. 2006; 57: 233-266.
- Bashan Y, K. A.-B. A proposal for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth. *Biol Fertil Soil*. 2013; 1(49): 1-2.
- Beatty PH, Jensen SE. *Paenibacillus polymyxa* produces fusaricidin-type antifungal antibiotics active against *Leptosphaeria maculans*, the causative agent of blackleg disease of canola. *Canadian Journal Microbiology*. 2002; 48(2):159-69.
- Bric JM, Bostock RM, Silverstone SE. Rapid in situ assay for Indoleacetic Acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*. 1991; 57(2): 535–538.
- Budi SW, van Tuinen D, Martinotti G, Gianinazzi S. Isolation from the Sorghum bicolor Mycorrhizosphere of a Bacterium Compatible with Arbuscular Mycorrhiza

- Development and Antagonistic towards Soilborne Fungal Pathogens. *Applied Environmental Microbiology*. 1999; 65(11) 5148-5150.
- Çakmakçı R, Ertürk Y, Dönmez MF, Erat M, Kutlu M, Sekban R, Haznedar A. The effect of N<sub>2</sub>-fixing and P-solubilizing bacteria on Turkish tea clone Muradiye 10 growth, yield and nutrient uptake. *Tarım BilimLeri Araştırma Dergisi*. 2012; 5(2): 176-181.
- Carvajal DA, Katsenovich YP, Lagos LE. The effects of aqueous bicarbonate and calcium ions on uranium biosorption by *Arthrobacter* G975 strain. *Chemical Geology*. 2012; 330–331: 51–59.
- Cassman KG, Liska AJ. Food and fuel for all: realistic or foolish? *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 2007; 1:18-23.
- Chua P, Yoo H-S, Gan HM, Lee S-M. Draft genome sequences of two cellulolytic *Paenibacillus* sp. strains, MAEPY1 and MAEPY2, from Malaysian landfill leachate. *Genome Announc.* 2014; 2(1):e00065-14.
- Costa F, Quintelas C, Tavares T. Kinetics of biodegradation of diethylketone by *Arthrobacter viscosus*. *Biodegradation*. 2012; 23(1): 81-92.
- Crocker FH, Fredrickson JK, White DC, Ringelberg DB, Balkwill DL. Phylogenetic and physiological diversity of *Arthrobacter* strains isolated from unconsolidated subsurface sediments. *Microbiology*. 2000; 146: 1295-1310
- Das S, Jean JS, Kar S, Chou ML, Chen CY. Screening of plant growth-promoting traits in arsenic-resistant bacteria isolated from agricultural soil and their potential implication for arsenic bioremediation. *Journal of Hazardous Materials*. 2014; 27:112-120.

- De Paolis MR, Lippi D, Guerriero E, Polcaro CM, Donati E. Biodegradation of  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane by *Arthrobacter fluorescens* and *Arthrobacter giacomelloi*. Appl Biochem Biotechnol. 2013; 170(3): 514-24.
- De-Bashan LE, Holguin G, Glick BR, Bashan Y. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. En: Ferrera-Cerrato R, Alarcón A. Editores. Microbiología agrícola. México, D.F. Editorial Trillas.. Paginas: 2007; 170-209.
- Demodaram T, Hegde DM. Oilseeds situation: A statical compedium. Hyderebad: Directorate of Oilseeds Research. 2010.
- Dias ACF, Costa FEC, Adreote FD, Lacava PT, Teixeira MA, Assumpção LC, Araújo WL, Azevedo JL, Melo S. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2009; 25 (2): 189-195.
- Directive 2009/2B8/EC of the European Parliament and of the council of 23 april 2009. Official Journal of the European Union. 2009.
- Don JB. Manual de Bergey de bacteriologia sistematica, Springer 2a ed., 2005.
- dos Reis KC, Silva CF, Duarte WF, Schwan RF. Bioaccumulation of Fe<sup>3+</sup> by bacteria isolated from soil and fermented foods for use in bioremediation processes. African Journal of Microbiology Research. 2014; 8(26): 2513-2521.
- Du LN, Wang S, Li G, Wang B, Jia XM, Zhao YH, Chen YL. Biodegradation of malachite green by *Pseudomonas* sp. strain DY1 under aerobic condition: characteristics, degradation products, enzyme analysis and phytotoxicity. Ecotoxicology. 2011; 20 (2): 438-446.

- Duca D, Rose DR, Glick BR. Characterization of a nitrilase and a nitrile hydratase from *Pseudomonas* sp. UW4 that converts indole-3-acetonitrile to produce indole-3-acetic acid. *Applied and Environmental Microbiology*. 2014; 80 (15): 4640-4649.
- Erturk Y, Ercisli S, Cakmakci R. Yield and growth response of strawberry to plant growth-promoting rhizobacteria inoculation. *Journal of Plant Nutrition*. 2012; 35(6): 817-826.
- Erturk Y, Ercisli S, Haznedar A, Cakmakci R. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on rooting and root growth of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) stem cuttings. *Biological Research*. 2010; vol.43. n.1. paginas:. 91-98.
- FAO. El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Biocombustibles: perspectivas, riesgos y oportunidades. Roma. 2008.
- Ferreira MIM, Marchesi JR, Janssen DB. Degradation of 4-fluorophenol by *Arthrobacter* sp. strain IF1. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008.
- Fredrickson JK, Li SMW, Gaidamakova E, Matrosova V, Zhai M, Sulloway HM, Scholten JC, Brown MG, Balkwill DL, and Daly MJ. Protein Oxidation: Key to Bacterial Desiccation Resistance? 2008. *The ISME Journal* 2(4):393-403.
- García de Salamone IE, S. L. Field response of rice paddy crop to inoculation with *Azospirillum*: physiology of rhizosphere bacterial communities and genetic diversity of endophytic bacteria in different parts of the plants. *Plant and Soil*. 2010; 1-2 (336): 351-362.
- García-Echauri SA, Gidekel M, Gutiérrez-Moraga A, Santos L, De León-Rodríguez A. Isolation and phylogenetic classification of culturable psychrophilic prokaryotes from the Collins glacier in the Antarctica. *Folia Microbiologica*. 2011; 56(3): 209-214.

Giles CD, Hsu PC, Richardson AE, Hurst MRH, Hill JE. Plant assimilation of phosphorus from an insoluble organic form is improved by addition of an organic anion producing *Pseudomonas* sp. *Soil Biology & Biochemistry*. 2013; 68: 263-269.

Grageda-Cabrera OA, D.-F. A.-C.-N. Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 2012; 3(6): 1261-1247.

Gutierrez-Luna FM, Lopez-Bucio J, Altamirano-Hernandez J, Valencia-Castro E, Reyes de la Cruz H, Macias-Rodriguez L. Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. *Symbiosis*. 2010; 51(1): 75-83.

Hall TA Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 1999; 41: 95-8.

Hanak AM, Nagler M, Weinmaier T, Sun X, Fagner L, Schwab C, Rattei T, Ulrich K, Ewald D, Engel M, Schloter M, Bittner R, Schleper C, Weckwerth W. Draft genome sequence of the growth-promoting endophyte *Paenibacillus* sp. P22 isolated from *Populus*. *Genome Announc*. 2014; 2(2):e00276-14.

Hariprasad P, Niranjana SR. 2009. Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato. *Plant and Soil*. 2009; 316 (1-2): 13-24.

Hassen AI, Labuschagne N. Root colonization and growth enhancement in wheat and tomato by rhizobacteria isolated from the rhizoplane of grasses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2010; 26(10):1837-1846.

ISA. Energy Independence & Security Act. USA Public Law 110-140 December 19. 2007. Cassman KG, Liska AJ. Food and fuel for all: realistic or foolish? *Biofuels, Bioprod. Bioref*. 2007; 1:18-23.

- Itoh T, Sugimoto I, Hibi T, Suzuki F, Matsuo K, Fujii Y, Taketo A, Kimoto H. Overexpression, purification, and characterization of *Paenibacillus* cell surface-expressed chitinase ChiW with two catalytic domains. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2014; 78(4): 624-634.
- Iwanade A, Jang JH, Hirai M, Shoda M. Enhancement of Styrene Removal by *Pseudomonas* sp. SR-5 in Mixed Culture with a Benzoic Acid-Degrading Bacterium in Biofilter. *Environmental Technology*. 2005; 26(8): 941-950.
- Jang JH, Hirai M, Shoda M. Enhancement of styrene removal efficiency in biofilter by mixed cultures of *Pseudomonas* sp. SR-5. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2006; 102(1): 53–59.
- Jerke K, Nakatsu CH, Beasley F, Konopka A. Comparative analysis of eight *Arthrobacter* plasmids. *Plasmid*. 2008; 59(2):73–85.
- Ji S, Lui Z, Ren H. Isolation and characterization of a bacterial strain that efficiently degrades sex steroid hormones. *Frontiers of Environmental Science & Engineering in China*. 2007; 1(3): 325-328.
- Jimenez-Moreno W. Vocabulario en lengua zapoteca, hecho y recopilado por el Muy Reverendo Padre Fray Juan de Cordoba, de la orden de los Predicadores, que reside en esta Nueva España. 2012. Con licencia. Impreso, por Pedro Charre, y Antonio Ricardo. En México 1578. Fray Juan de Córdoba (Edición Facsimilar) INAH SEP. México. 1942. 1ª. Reimpresión 2012.
- Jin L, Sun X, Zhang X, Guo Y, Shi H. Co-Metabolic Biodegradation of DBP by *Paenibacillus* sp. S-3 and H-2. *Current Microbiology*. 2014; 68 (6): 708-716.

- Jin L, Zhang X, Sun X, Shi H, Li T. Isolation and identification of *Paenibacillus* sp. FM-6, involved in the biotransformation of albendazole. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2014; 30(10): 2747-2754
- Jin L, ZhongYong Y, Shi H, YuanMing G, JingJiao B, Yin Z, Jian Z. Identification of a dibutyl phthalate (DBP)-degrading strain S-3 and preliminary studies on the metabolic pathway. *Journal of Agricultural Biotechnology*. 2014; 22(1): 101-108.
- Jordan DB, Wagschal K. Properties and applications of microbial  $\beta$ -D-xylosidases featuring the catalytically efficient enzyme from *Selenomonas ruminantium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010; 86 (6): 1647-1658.
- Jull C, Carmona RP, Mosoti V, Vapnek J. Recent trends in the law and policy of bioenergy production, promotion and use. FAO. 2007.
- Jung J, Seo H, Lee SH, Jeon CO, Park W. The effect of toxic malachite green on the bacterial community in Antarctic soil and the physiology of malachite green-degrading *Pseudomonas* sp. MGO. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013; 97 (10): 4511-4521.
- Kambourova M, Mandeva R, Fiume I, Maurelli L, Rossi M, Morana A. Hydrolysis of xylan at high temperature by co-action of the xylanase from *Anoxybacillus flavithermus* BC and the  $\beta$ -xylosidase/ $\alpha$ -arabinosidase from *Sulfolobus solfataricus* O $\alpha$ . *Journal of Applied Microbiology*. 2007; 102 (6): 1586–1593.
- Khan AA, J. G. Phosphorus Solubilizing Bacteria: occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production. *J Agric Biol SCI*. 2009; 1 (1): 48-58.
- Khan MS, Z. A. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agricultura. A review. *Agron Sustain Dev*. 2007; 27: 29-43.

Konietzny U, Greiner R. Bacterial phytase: potential application, in vivo function and regulation of its synthesis. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2004; 35 (1-2): 12-18.

Korkea-aho TL, Heikkinen J, Thompson KD, von Wright A, Austin B. *Pseudomonas* sp. M174 inhibits the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Applied Microbiology*. 2011; 111 (2): 266–277.

Krzyzanowska DM, Potrykus M, Golanowska M, Polonis K, Gwizdek-Wisniewska A, Lojkowska E, Jafra S. Rhizosphere bacteria as potential biocontrol agents against soft rot caused by various *Pectobacterium* and *Dickeya* spp. strains. *Journal of Plant Pathology*. 2012; 94(2): 367-378.

Kumar JP, Kohli S, Gopal M, Shekhar TI. Isolation and characterization of alkalotolerant *Pseudomonas* sp. strain ISTDF1 for degradation of dibenzofuran. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2011; 38 (4): 503-511.

LaPatra SE, Fehring TR, Cain KD. A probiotic *Enterobacter* sp. provides significant protection against *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after injection by two different routes. *Aquaculture*. 2014; 433: 361-366.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, López R, Thompson JD, Gibson FJ and Higgins DG. Clustal W and clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007; 23: 2947-48.

Latif S, Khan SU, Naveed M, MustafaG, Bashir T, Mumtaz AS. The diversity of Rhizobia, *Sinorhizobia* and novel non-Rhizobial *Paenibacillus* nodulating wild herbaceous legumes. *Archives of Microbiology*. 2013; 195(9): 647-653.

Li J, Bai T, Rao J, Song C. Isolation and Degrading Characteristics of a Phenol-degrading Bacterial Strain with High Efficiency. *Microbiology*. 2007.

- Liang Y, Zeng F, Qiu G, Lu X, Liu X, Gao H. Co-metabolic degradation of dimethoate by *Raoultella* sp. X1. *Biodegradation*. 2009; 20(3): 363-373.
- Ma Y, Prasad MNV, Rajkumar M, Freitas, H. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnology Advances*. 2011; 29: 248-258.
- Mandelbaum RT, Allan DL, Wackett LP. Isolation and Characterization of a *Pseudomonas* sp. That Mineralizes the s-Triazine Herbicide Atrazine. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995; 61(4):1451-1457.
- Marone A, Massini G, Patriarca C, Signorini A, Varrone C, Izzo G. Hydrogen production from vegetable waste by bioaugmentation of indigenous fermentative communities. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2012; 37 (7): 5612–5622.
- Martin NI, Hu H, Moake MM, Churey JJ, Whittal R, Worobo RW, Vederas JC. Isolation, Structural Characterization, and Properties of Mattacin (Polymyxin M), a Cyclic Peptide Antibiotic Produced by *Paenibacillus kobensis* M. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278: 13124-13132.
- Mayea S, Carone M, Novo R, Boado, I, Silveira E, Soria M, Morales Y, Valiño A. *Microbiología Agropecuaria*. Tomo II. Ed. Félix Varela. La Habana. 1998; 156-178.
- Médici R, Lewkowicz E, Iribarren AM. *Arthrobacter oxydans* as a biocatalyst for purine deamination. *FEMS Microbiology Letters*. 2008; 289(1): 20-26.
- Meena S, Gothwal RK, Saxena J, Mohan MK, Ghosh P. Chitinase production by a newly isolated thermotolerant *Paenibacillus* sp. BISR-047. *Annals of Microbiology*. 2014; 64(2): 787-797.
- Mei H, Hong Q, Li S. Isolation, Identification and Characterization of a Malachite Green-degrading Bacterium. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*. 2010.

- Morgante V, López-López A, Flores C, González M, González B, Vázquez M, Roselló-Mora R, Seeger M. Bioaugmentation with *Pseudomonas* sp. strain MHP41 promotes simazine attenuation and bacterial community changes in agricultural soils. *FEMS Microbiol Ecol.* 2010; 71: 114-126.
- Morgulis A, Aoulouris G, Raytselis Y, Madden TL, Agarwala R and Schäffer AA. Database indexing for production megablast searches. *Bioinformatics*; 2008; 15: 1757-64.
- Mukhopadhyay M, Kuila A, Tuli DK, Banerjee R. Enzymatic depolymerization of *Ricinus communis*, a potential lignocellulosic for improved saccharification. *Biomass and Bioenergy.* 2011; 35.(8): 3584-3591.
- Overhage J, Sielker S, Homburg S, Parschat K, Fetzner S. Identification of large linear plasmids in *Arthrobacter* spp. encoding the degradation of quinaldine to anthranilate. *Microbiology.* 2005; 151 (2): 491-500.
- Pabón G.G. Estudio de las características botánicas y etnobotánicas de higuerilla (*Ricinus communis* L.). *Cultivos energéticos alternativos.* Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 2010; 9-23.
- Patil SA, Surwase SN, Jadhav SB, Jadhav JP. Optimization of medium using response surface methodology for l-DOPA production by *Pseudomonas* sp. SSA. *Biochemical Engineering Journal.* 2013; 74:36-45.
- Pikovskaya RI. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. 1948; 1-217: 362-370.
- Rashid S, Charles TC, Glick BR. Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Applied Soil Ecology.* 2012; 61: 217–224.

- Rennie R.J. N isotope dilution as a measure of dinitrogen fixation by *Azospirillum brasilense* associated with maize. *Canadian Journal of Botany*. 1980; 58 (1): 21-24.
- Rives N, Acebo Y, Hernández A. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Perspectivas de su uso en Cuba. Cultivos Tropicales*. 2007; 28 (2): 29-38.
- Rodelas B, Salmerón V, Martínez-Toledo MV, Pozo C, González-López J. Interacción *Rhizobium-Azospirillum* y *Rhizobium-Azotobacter*. Efecto sobre el crecimiento, nodulación y fijación simbiótica de N<sub>2</sub> en *Vicia faba* (L.). grupo de Microbiología Ambiental. Departamento de Microbiología (Facultad de Farmacia) e Instituto del Agua, Universidad de Granada. España. 2001. 29(2):165-169.
- Rodríguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*. 1999; 17: 319–339. Rodríguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*. 1999; 17: 319–339.
- Rodríguez-Hernández R, Z. C. Competitividad de la Higuera (*Ricinus communis*) para biocombustible en relación a los cultivos actuales en el Edo. de Oaxaca, México. *Sexta Época*. 2013; 32(17): 306-318.
- Rossello-Mora R and Amann R The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev*. 2001; 25: 39-67.
- Sajidan A, Farouk A, Greiner R, Jungblut P, Müller EC, Borriss R. Molecular and physiological characterisation of a 3-phytase from soil bacterium *Klebsiella* sp. ASR1. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004; 65(1): 110-118.

- Sajjaphan K, Shapir N, Wackett LP, Palmer M, Blackmon B, Tomkins J, Sadowsky M. *Arthrobacter aurescens* TC1 Atrazine Catabolism Genes *trzN*, *atzB*, and *atzC* Are Linked on a 160-Kilobase Region and Are Functional in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004; 70 (7): 4402-4407.
- Sánchez-Hernández RF. Conversión del aceite de higuera (*Ricinus communis* L.) en biodiésel, mediante el proceso de transesterificación. México: Departamento de Agroecología, Universidad Autónoma Chapingo. 2007.
- Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*. 1987; 160 (1): 47-58.
- Schisler DA, Slininger PJ, Adiyaman T. Use of novel strains for biological control of pink rot infections in potato tubers. The United States Of America, As Represented By The Secretary Of Agriculture. 2014.
- Schwartz AR, Ortiz I, Maymon M, Herbold CW, Fujishige NA, Vijanderan JA, Villella W, Hanamoto K, Diener A, Sanders ER, DeMason DA, Hirsch AM. *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*. 2013; 3 (4):595-620.
- Selim S, Negrel J, Govaerts C, Gianinazzi S, van Tuinen D. Isolation and Partial Characterization of Antagonistic Peptides Produced by *Paenibacillus* sp. Strain B2 Isolated from the *Sorghum* Mycorrhizosphere. *Applied Environmental Microbiology*. 2005; 71(11): 6501-6507.
- Shiraishi A, Matsushita N, Hougetsu T. Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. *Systematic and Applied Microbiology*. 2010; 33 (5): 269-274.

- Soares-Severino L., de Souza-Gondim TM. Curso sobre cultivo de Higuierilla. Embrapa-Brasil. 2005.
- Spanggard RJ, Spain JC, Nishino SF, Mortelmans KE. Biodegradation of 2,4-dinitrotoluene by a *Pseudomonas* sp. Applied and Environmental Microbiology. 1991; 57 (11): 3200-3205.
- Srinivasamurthy R, Singh JP, Rai AK. Biological Control of Bacterial Wilt Disease-Causing Pathogens: A Sustainable Approach for Increasing Crop Production. Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security. 2014; 383-397.
- Sugimori D, Watanabe M, Utsue T. Isolation and lipid degradation profile of *Raoultella planticola* strain 232-2 capable of efficiently catabolizing edible oils under acidic conditions. Applied Microbiology and Biotechnology. 2013; 97(2): 871-880.
- Suwendu D, Jiin-Shuh J, Sandeep K, Chia-Chuan L. Changes in Bacterial Community Structure and Abundance in Agricultural Soils under Varying Levels of Arsenic Contamination. Geomicrobiology Journal. 2013; 30(7): 635-644.
- Suwendu D, Jiin-Shuh J, Sandeep K, Mon-Lin C, Chien-Yen C. Screening of plant growth-promoting traits in arsenic-resistant bacteria isolated from agricultural soil and their potential implication for arsenic bioremediation. Journal of Hazardous Materials. 2014; 272: 112–120.
- Suwendu D, Jiin-Shuh J, Sandeep K, Mon-Lin C, Chien-Yen C. Screening of plant growth-promoting traits in arsenic-resistant bacteria isolated from agricultural soil and their potential implication for arsenic bioremediation. Journal of Hazardous Materials. 2014; 272: 112-120.

- Szilagyi-Zecchin VJ, Ikeda AG, Hungria M, Adamoski D, Kava-Cordeiro V, Glienke C, Galli-Terasawa LV. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. *AMB Express*. 2014; 4: 26.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2013; 2725-2729.
- Tanay DM, Budhraj V, Mishra M, Shekhar TI. Toxicological evaluation of paper mill sewage sediment treated by indigenous dibenzofuran-degrading *Pseudomonas* sp. *Bioresource Technology*. 2012; 110: 71–78.
- Timmusk S, Nicander B, Granhall U, Tillberg U. Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. *Soil Biology and Biochemistry*. 1999; 31(13): 1847-1852.
- Timmusk S, Nicander B, Granhall U, Tillberg U. Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. *Soil Biology and Biochemistry*. 1999; 31(13): 1847
- Vocabulario en lengua misteca. Hecho por los padres de la orden de predicadores, que residen en ella, y últimamente recopilado, y acabado por el padre Fray Francisco de Alvarado, Vicario de Tamazulapa, de la misma orden. En México con licencia, de la casa de Pedro de Balli. 1593.
- Waasbergen LG, Balkwill DL, Crocker FH, Bjornstad BN, Miller RV. Genetic Diversity among *Arthrobacter* Species Collected across a Heterogeneous Series of Terrestrial Deep-Subsurface Sediments as Determined on the Basis of 16S rRNA and recA Gene Sequences. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000; 66 (8): 3454-3463.

- Welbaum, G, Sturz, A. V, Dong, Z, Nowak, J. Fertilizing soil microorganisms to improve productivity of agroecosystems. *Crit. Rev. Plant Sci.* 2004; 23:175-193.
- Yu X, Chen M, Jiang Z, Hu Y, Xie Z. The two-component regulators GacS and GacA positively regulate a nonfluorescent siderophore through the Gac/Rsm signaling cascade in high-siderophore-yielding *Pseudomonas* sp. HYS. *Journal of Bacteriology.* 2014; 196 (18): 3259-3270.
- Zhang S, Sun W, Xu L, Zheng X, Chu X, Tian J, Wu N, Fan Y. Identification of the para-nitrophenol catabolic pathway, and characterization of three enzymes involved in the hydroquinone pathway, in *Pseudomonas* sp. 1-7. *BMC Microbiology.* 2012; 12:27.
- Zhang S, Wang H, Shi P, Xu B, Bai Y, Luo H, Yao B. Cloning, expression, and characterization of thermostable  $\beta$ -xylosidase from thermoacidophilic *Alicyclobacillus* sp. A4. *Process Biochemistry.* 2014; 49:1422-1428.
- Zhang S, Wang H, Shi P, Xu B, Bai Y, Luo H, Yao B. Cloning, expression, and characterization of a thermostable  $\beta$ -xylosidase from thermoacidophilic *Alicyclobacillus* sp. A4. *Process Biochemistry.* 2014; 49: 1422- 1428.
- Zhong W, Zhu C, Shu M, Sun K, Zhao L, Wang C, Ye Z, Chen J. Degradation of nicotine in tobacco waste extract by newly isolated *Pseudomonas* sp. ZUTSKD. *Bioresource Technology.* 2010; 101 (18): 6935–6941.

## CAPÍTULO IV

### 4. POBLACIONES DE BACTERIAS, HONGOS Y ACTINOMICETOS AISLADAS DE LA RIZOSFERA DE HIGUERILLA

#### 4.1. Introducción

La producción de biocombustibles a partir de cultivos oleaginosos como la higuera (*Ricinus communis* L.) dependen de las condiciones del suelo como un recurso viviente, dinámico y no renovable, cuya condición y funcionamiento es vital para la producción y el mantenimiento de la calidad ambiental local, regional y global. Sin embargo, el suelo es un recurso que cada vez es más pobre en nutrientes y una de las alternativas es tratar de restaurar su fertilidad mediante técnicas amigables con el ambiente, como puede ser la adición de biofertilizantes, acordes con cada cultivo. Los microorganismos promotores del crecimiento vegetal desempeñan un papel clave en la toma de nutrientes, la tolerancia a estrés ambiental y, en general, el mantenimiento de la salud radical, favoreciendo así el aumento del rendimiento de los cultivos (Rives, Acebo y Hernández, 2007). Además de ser considerados como indicadores de la calidad del suelo (Nieto y García, 2010), por ser un reflejo de condiciones fisicoquímicas óptimas para el desarrollo de los procesos metabólicos de microorganismos (bacterias, hongos y actinomicetos) que actúan sobre sustratos orgánicos y cultivos asociados, importantes en el desarrollo y funcionamiento de los ecosistemas y su fertilidad, pues interviene tanto en el establecimiento de los ciclos biogeoquímicos, como en la formación de la estructura de los suelos (Ramos-Vásquez y Zúñiga-Dávila, 2008).

La distribución de los microorganismos en el suelo están relacionados con el contenido de nutrientes, oxígeno (Rivera-Cruz *et al.*, 2002), pH (Fierer y Jackson, 2006) e influenciados por los factores ecológicos (Burns *et al.*, 2015). El crecimiento microbiano más importante tiene lugar

en la superficie de las partículas del suelo, principalmente en la zona conocida como rizósfera (región del suelo alrededor de la raíz de la planta influenciada por su metabolismo) (Aciego, 1998; Contreras, 2005). Se estima que en un gramo de suelo en buen estado se pueden encontrar hasta 600 millones de bacterias, correspondiente entre 15 y 20 mil especies (Contreras, 2005). Constituyendo la mayor proporción de su biodiversidad (Gans *et al.*, 2005; Fulthorpe *et al.*, 2008). De estos microorganismos solo cerca de 0.1% se ha podido sembrar en cultivos bajo condiciones controladas (Barrios, 2007). De los microorganismos aislados se encuentran bacterias que tienen mecanismos como la movilización de algunos nutrientes facilitando la entrada de N, P, K ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y  $\text{K}^+$ ) y microelementos en la planta (Dobbelaere *et al.*, 2003).

Además, muchas de las plantas exudan sustancias que pueden fomentar la presencia de rizobacterias benéficas (Ehrenfeld *et al.*, 2005; Hardoim *et al.*, 2008; Berg and Smalla, 2009; Compant *et al.*, 2010). Por ejemplo, *Arabidopsis thaliana* exuda ácido málico en presencia de un patógeno y este atrae a *Bacillus subtilis*, que protege la raíz del ataque del patógeno (Rudrappa *et al.*, 2008). También se menciona que los actinomicetos tienen la capacidad de inhibir algunos patógenos (Tokala *et al.*, 2002; Márquez *et al.*, 2003), sin embargo, estas interacciones entre plantas y microorganismos, todavía no son muy conocidas, debido a que en la actualidad no se conocen muchos mecanismos de estas simbiosis (Trivedi *et al.*, 2005).

La mayoría de los microorganismos se encuentran interactuando en la rizosfera, donde el ambiente es distinto del resto de la zona edáfica (Díaz-Vargas *et al.*, 2001), interactuando con la planta en continuo estrés ocasionado por distintos factores del sitio (pH, temperatura, salinidad, humedad, entre otros) (Banerjee *et al.*, 2010; Calvo y Zuñiga, 2010; Garrido *et al.*, 2010). Uno de los fenómenos importantes que se produce en la rizósfera es la presencia de una gran variedad de sustancias orgánicas, como aminoácidos, ácidos orgánicos, carbohidratos, derivados de ácidos nucleicos, factores de crecimiento y enzimas que, directa o indirectamente, tienen influencia positiva o negativa sobre los microorganismos que ahí habitan (Díaz-Vargas *et*

*al.*, 2001). Llegan a conformar hasta 40% de los fotosintatos de la planta (Nelson, 2004), lo cual cambia la composición del suelo en la vecindad de la raíz, creando un medio selectivo para la existencia de grandes poblaciones microbianas heterótrofas, que establecen diferentes interacciones con la planta, tanto positivas (promotoras del crecimiento vegetal), negativas (patogénicas), como neutrales (Whipps, 2001; Schoebitz, 2006). Algunas bacterias pueden tener la capacidad de solubilizar fosfatos (Chen *et al.*, 2005; Chatli *et al.*, 2008; Cordero *et al.*, 2008), producir AIA (Vessey, 2003) o el control de organismos patógenos (Larrea, 2001), éstas pueden ser sujetas de estudio y desarrollo como bioinoculantes para su uso en pro de una agricultura sustentable (Chen *et al.*, 2005; Córdoba-Bautista *et al.*, 2009). El objetivo del presente trabajo fue cuantificar las poblaciones de hongos, bacterianas totales y actinomicetos aislados de la rizósfera de ricino, de siete sitios de muestreo, incluyendo plantas cultivadas y otras creciendo en áreas ruderales o de traspatio, y correlacionarlas con las características físicas, químicas y biológicas de los suelos.

## **4.2. Materiales y Métodos**

### **4.2.1. Lugar de muestreo de rizósfera de ricino y toma de muestras.**

Se recolectaron muestras de suelo rizosférico de Higuierilla (*Ricinus communis* L.) en 7 sitios, ubicados en 2 regiones de México, del centro y sureste del país. La primera corresponde a localidades de Texcoco, Estado de México y la segunda se ubica en la localidad de Santa Catarina Estetla, municipio de Santa María Peñoles, Oaxaca. Los sitios poseen condiciones de suelo, clima y altitud distintas. De la región Texcoco se muestrearon seis sitios georeferenciados con GPS digital (Garmin Modelo 60cx), cinco en áreas ruderales donde se encuentra el ricino de forma silvestre y uno en el campo de cultivo con ricino perteneciente a la Universidad Autónoma Chapingo. En la región correspondiente a Oaxaca se realizó un muestreo de una higuierilla presente en un traspatio. Las muestras de rizósfera fueron recolectadas de 3 puntos en los primeros 30 cm de profundidad, a 0.5 m de distancia de la base

del tronco de las plantas. En total se muestreó 1 kg de suelo, originado por una muestra compuesta de los 3 puntos recolectados. Estas muestras se colocaron en bolsas de plástico, las cuales se transportaron en una hielera al laboratorio para los análisis respectivos. La recolecta se realizó a finales de la época de lluvias (junio-octubre de 2011) y cada una se analizó por triplicado.

#### **4.2.2. Determinación de las propiedades físicas y químicas de suelo de los sitios de muestreo**

Las muestras se enviaron al laboratorio de suelo y agua de la Universidad Autónoma Chapingo, para su análisis, donde fueron secadas a temperatura ambiente a la sombra y se molieron con mazo de madera; las muestras orgánicas se fragmentaron con rodillos de madera y se tamizaron en malla 10 (2 mm). Las rutinas analíticas para determinar pH, conductividad eléctrica (CE), materia orgánica (MO), nitrógeno total (N<sub>total</sub>), nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), hierro (Fe), arena, limo, arcilla y textura, son las indicadas en la NOM-021-RECNAT-2000 (DOF, 2002).

#### **4.2.3. Determinaciones de microorganismos de la rizósfera de ricino**

Se pesaron 10 g de suelo de cada muestra, se colocó en una botella de vidrio estéril con 90 mL de agua, agitándose 20 min de manera vigorosa (dilución  $10^{-1}$ ) y se llevó a cabo diluciones decimales seriadas en agua destilada estéril. Para el recuento de bacterias totales (AN), se utilizó el medio de cultivo agar nutritivo donde se incubaron las placas durante 48 h a 28 °C. Para hongos totales (PDA) se utilizó el medio de cultivo Potato Dextrose Agar con rosa de bengala y estreptomycin (33  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y la incubación se realizó durante 144 h a 28 °C. Pikovskaya (para solubilizadoras de fosfatos) (SP), las placas se incubaron 120 h a 28 °C. Para el caso de actinomicetos (ACT) el medio fue CZAPECK, incubado a 28 °C durante 168 h. Medio de Rennie para fijadores de nitrógeno asimbióticos (FN) incubado a 28 °C durante 96 h.

#### 4.2.4. Análisis estadístico

Se cuantificó el número de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco (UFC g<sup>-1</sup> de ss). Se realizó el análisis estadístico G.L.M. mediante la comparación de medias de Tukey con un  $\alpha=0.05$ , y se correlacionó las características físicas y químicas del suelo con las poblaciones de microorganismos rizosféricos, los cuales fueron analizados para determinar el tipo (positivo o negativo) y la magnitud de los efectos de las variables independientes sobre las dependientes (AN, FN, SP, PDA y ACT). Las relaciones entre las variables independientes y dependientes se definen mediante la generación de modelos de regresión múltiple de la forma: Variable dependiente= f(variable independiente). Los modelos de predicción de los efectos de cada uno de los factores del sitio sobre el número de UFC de microorganismos rizosféricos se obtuvieron mediante el procedimiento stepwise del sistema SAS 9.0 (Statistical Analysis System). Este procedimiento selecciona aquellas variables independientes que son significativos a un nivel de confianza especificado y elimina los que no lo son.

Adicionalmente, se realizó un análisis multidimensional no paramétrico (nonmetric multidimensional scaling, NMS) con el paquete estadístico R versión 3.1.3. (R Development Core Team, 2015), y las librerías Ecodist versión 1.2.9. (Goslee y Urbano, 2015) y Vegan versión 2.2.1 (Oksanen *et al.*, 2010). El NMS es un método de ordenación que ha demostrado ser muy adecuado para el análisis de datos de comunidades (McCune and Grace, 2002), ya que, es un método de ordenación sin restricciones que busca en forma iterativa la mejor manera de representar los datos del sitio, en un reducido número de dimensiones, de modo que las distancias en el diagrama de ordenación reflejen las similitudes o diferencias en la estructura de las comunidades de los sitios estudiados, el proceso de iteración se detiene cuando se minimiza la relación, que se mide por un valor de estrés (menor de 20%) (McCune and Grace 2002). Para el análisis de distancias se utilizó el procedimiento de Sorensen (Bray-Curtis) con 9999 permutaciones. El NMS se considera mejor que muchas otras técnicas de ordenación, ya que no asume una relación lineal entre las variables (Clarke, 1993). Se usó el procedimiento de

respuesta múltiple por permutaciones (MRPP) con el paquete PC-ORD versión 5 (McCune y Medford 2006), para comparar las distancias en el espacio de coordinación entre los puntos correspondientes a los diferentes sitios de muestreo, con el fin de demostrar si algunos sitios de interés serían diferentes estadísticamente. Se realizó la comparación por pares entre los sitios definidos a priori, para probar la hipótesis nula *i.e.* no existe diferencia entre sitios. Este procedimiento es muy útil, ya que ninguna hipótesis debe cumplirse, como la normalidad multivariable o la homogeneidad de varianzas. En adición, el valor T en MRPP indica la separación entre los sitios, un mayor valor indica una separación más fuerte, mientras que el valor A indica la homogeneidad dentro del sitio en comparación con la expectativa al azar (McCune y Grace, 2002). Por último, se realizaron correcciones en base al ajuste propuesto por Holm para determinar la tasa de error del valor de p (Legendre and Legendre, 2012).

### 4.3. Resultados y discusión

Una vez ubicados los puntos de muestreo se georeferenciaron (Figura 4.1) y se registró la altitud del sitio, como se muestra en el **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

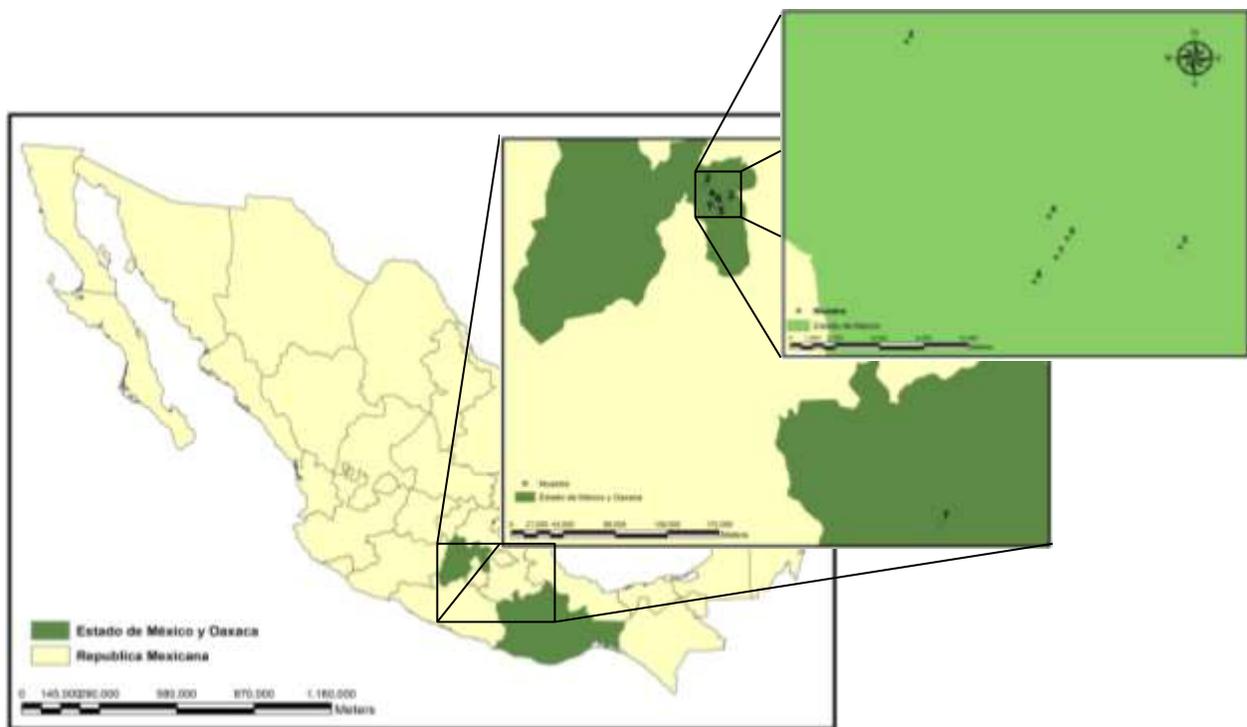
**Cuadro 4.1. Características de los sitios de muestreo de suelo rizosférico de *Ricinus communis*.**

Muestra	Localidad	Ecosistema	Longitud N	Latitud W	Altitud (msnm)
1	San Bernardino, Texcoco, Estado de México.	Silvestre	19°28.76´	98°53.40´	2257
2	Venta de Carpio, Ecatepec, Estado de México.	Silvestre	19°37.20´	98°59.38´	2229
3	San Nicolás Tlaminca, Texcoco, Estado de México.	Silvestre	19°29.16´	98°48.46´	2348
4	San Felipe, Texcoco, Estado de México.	Silvestre	19°30.36´	98°53.69´	2217
5	Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México.	Cultivada	19°29.50´	98°52.96´	2253
6	Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco,	Silvestre	19°27.81´	98°54.28´	2200

	Estado de México.				
7	Santa Catarina Estetla, Santa María Peñoles, Oaxaca.	Traspatio	17°0.69′	97°8.29′	2100

N: norte; W: oeste; y msnm: metros sobre el nivel del mar.

Los resultados de laboratorio de las características físicas y químicas del suelo de los sitios de muestreo se presentan en el Cuadro 4.3. Después de realizar la siembra en placa y el conteo de UFC g<sup>-1</sup> de suelo seco, se transformó a log 10 para facilitar su manejo estadístico (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).



**Figura 4.1. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo de suelo rizosférico de *R. communis*.**

**Cuadro 4.2. Análisis químico y físico del suelo de los sitios de procedencia.**

Procedencia	pH	CE	MO	Ntotal	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Arena	Limo	Arcilla	Textura
		dSm <sup>-1</sup>	%								mgKg <sup>-1</sup>			
1	7.05	0.36	1.48	0.07	13	19.24	734	1471	515	13.77	63.6	19.3	0.36	Franco arenoso
2	8.1	0.88	2.15	0.11	10.4	21.47	1760	6954	1062	10.6	61.6	25.3	0.88	Franco arenoso
3	7.7	0.8	5.38	0.27	10.4	112.9	1780	3888	474	31.3	69.6	21.3	0.8	Franco arenoso
4	8.39	0.68	1.75	0.09	15.6	56.59	1810	2491	673	23.48	53.6	25.3	0.68	Franco arcilloso arenoso
5	7.4	0.4	1.88	0.09	15.6	9.76	326	2599	1051	21.35	23.6	31.3	0.4	Arcilla
6	8.25	0.74	1.88	0.09	15.6	22.56	446	4961	976	13.78	65.6	21.3	0.74	Franco arenoso
7	7.87	0.56	6.72	0.34	13	223.03	838	6115	680	60.16	35.6	23.3	0.56	Arcilla

Respecto al análisis estadístico GLM se encontró que no hay diferencias significativas para las poblaciones de bacterias totales en agar nutritivo (AN), coincidiendo con lo reportado por Stres, *et al.* (2013). Sin embargo, hubo diferencias significativas con un  $\alpha=0.05$ , para el resto de las poblaciones, como se muestra en el Cuadro 4.3.

**Cuadro 4.3. Población de microorganismos cuantificados de rizósfera de higuera en siete sitios de muestreo.**

Muestra	Bacterias totales (AN)	Bacterias con crecimiento en medio libre de nitrógeno (FN)	Bacterias solubilizadoras de fosfatos (SP)	Hongos totales (PDA)	Actinomicetos (ACT)
	Log UFC	Log UFC	Log UFC	Log UFC	Log UFC
1	6.3965 a <sup>1,2</sup>	6.4855 ba	4.552 a	3.3823 a	4.5745 b
2	6.1700 a	6.0715 bc	2.806 ba	3.1254 a	4.7518 ba
3	6.5058 a	6.5357 a	4.517 a	3.9087 a	5.9046 a
4	5.8399 a	6.2512 bac	2.790 ba	3.6957 a	4.7016 ba
5	6.0554 a	6.5128 ba	4.494 a	0.8874 b	4.2608 b
6	5.8108 a	6.3184 bac	2.435 ba	4.5514 a	4.8015 ba
7	6.1152 a	5.9702 c	0.000 b	3.8430 a	3.8319 b

UFC: Unidades formadoras de colonia. <sup>1</sup>Cada valor en el cuadro es la media de 3 repeticiones. <sup>2</sup>Valores medios con letras iguales no son estadísticamente diferentes ( $p=0.05$ ).

Al cuantificar las poblaciones cultivables de microorganismos de la rizosfera de higuera de los siete sitios de muestreo, se encontró que las bacterias fueron más numerosas que las demás poblaciones, en particular las de hongos, como lo reportan Peña y Reyes (2007). Sánchez-Gómez (2013) menciona que las mayores poblaciones de bacterias, se encuentran en pH cercano a la neutralidad, y Torres y Lizarazo (2006) lo relaciona con la

mayor cantidad de materia orgánica, contrario a lo encontrado en el presente estudio para ambos casos.

Las bacterias fijadoras libres de nitrógeno presentaron los promedios más altos como lo reportado por Beltrán-Pineda y Lizarazo-Forero (2013). García, Jaramillo y Carrillo (2011) reportan que la cantidad de Bacterias Fijadoras libres de nitrógeno son directamente proporcionales a las poblaciones de bacterias solubilizadoras de fosfatos, y Chen *et al.* (2005) menciona que las poblaciones están inversamente relacionadas con el pH, contrario a lo encontrado en este trabajo para ambos casos.

En Santa Catarina Estetla no se presentaron poblaciones de solubilizadoras de fosfatos, coincidiendo con los contenidos más altos de fosforo y materia orgánica, como lo reportado por Kim, *et al.* (2011) y contrario a lo encontrado por Beltrán-Pineda (2014).

Los actinomicetos se presentaron en mayor cantidad que los hongos, coincidiendo con lo encontrado por Escobar-Escobar, Mora-Delgado y Romero-Jola (2009). Se dice que su presencia responde a la fertilidad del suelo, contrario a lo encontrado en este trabajo donde el sitio San Nicolás Tlaminca tiene la mayor población pero no es el de mayor fertilidad.

La menor cantidad de hongos se presentó en el sitio 5 con mayor perturbación (cultivo de higuera), coincidiendo con lo reportado por Moratto *et al.* (2005) para el cultivo de papa.

Posteriormente se realizó un análisis de correlaciones de Pearson entre el análisis físico y químico del suelo (Cuadro 4.2) y las poblaciones de microorganismos (Cuadro 4.3) de las cuales las más representativas para bacterias totales fue: la concentración de magnesio (Mg) y nitrógeno (N), coincidiendo con Cenciani *et al.* (2009) en este último; Bacterias fijadoras libres de nitrógeno: la concentración de calcio (Ca); Bacterias solubilizadoras de fosforo: el pH fue determinante; Hongos totales: el pH, la concentración de potasio (K), el

porcentaje de arena, materia orgánica (MO), y la concentración de nitrógeno total (Ntotal); Actinomicetos: el pH, la concentración de N y Mg, la conductividad eléctrica (CE) y el porcentaje de arena (Cuadro 4.4).

**Cuadro 4.4. Modelos de regresión múltiple y parámetros independientes, para las poblaciones de microorganismos rizosféricos aislados de *R. communis*.**

No. Modelo	Modelo/variable independiente	Significancia estadística	R <sup>2</sup> parcial
Modelo 1	AN = 6555002 -2306.91913Mg -218251N	0.0031	0.29
	Magnesio	0.0418	0.20
	Nitrógeno	0.1448	0.09
Modelo 2	FN = 3847174 -373.08198Ca	<.0001	0.38
	Calcio	0.0029	0.38
Modelo 3	SP = 255926 -300669pH	0.0022	0.36
	pH	0.0042	0.36
Modelo 4	PDA = 24320pH -199989 +114510MO -	<.0001	0.88
	2231346Nt -12.09900K +423.01602A		
	pH	0.0654	0.17
	Potasio	0.0059	0.29
	Arena	<.0001	0.35
	Materia orgánica	0.0768	0.04
	Nitrógeno total	0.0595	0.03
Modelo 5	ACT = 7292811 -1351172pH +140904N -	<.0001	0.85
	1032.27507Mg +4687109CE -11193A		
	Nitrógeno	0.0045	0.35
	Magnesio	0.1423	0.07
	Conductividad eléctrica	0.0696	0.10
	pH	0.0041	0.21
	Arena	0.0015	0.12

Dónde: AN: bacterias totales, FN: bacterias fijadoras libres de nitrógeno, SP: bacterias solubilizadoras de fosforo, PDA: hongos totales, ACT: actinomicetos, CE: conductividad eléctrica (dSm<sup>-1</sup>), MO: materia orgánica (%), Nt: nitrógeno total en el suelo (%), N: concentración de nitrógeno en el suelo (mgKg<sup>-1</sup>), K: concentración de potasio en el suelo (mgKg<sup>-1</sup>), Ca: concentración de calcio en el suelo (mgKg<sup>-1</sup>), Mg: concentración de magnesio en el suelo (mgKg<sup>-1</sup>), A: arena (%)

Los modelos de regresión indican las propiedades del suelo del sitio que se correlacionan más estrechamente con el número de UFC de bacterias totales (AN,  $\alpha = 0,0031$ ,  $R^2 =$

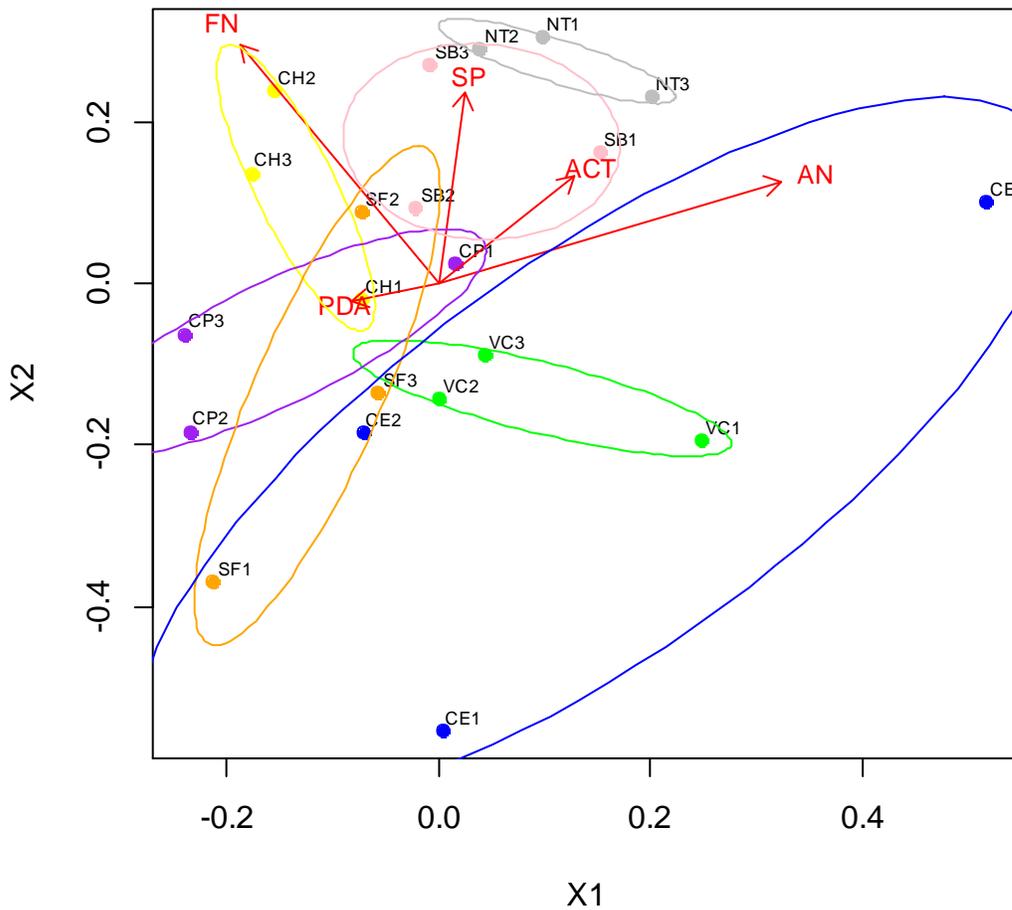
0.29), fijadoras libres de nitrógeno (FN,  $\alpha = <.0001$ ,  $R^2 = 0.38$ ), solubilizadoras de fosfatos (SP,  $\alpha = 0,0022$ ,  $R^2 = 0.35$ ), hongos totales (PDA,  $\alpha = <.0001$ ,  $R^2 = 0.88$ ) y actinomicetos (ACT,  $\alpha = <.0001$ ,  $R^2 = 0.85$ ). Las variables independientes restantes fueron eliminadas por el procedimiento STEPWISE, cuando no se cumplió su nivel de significancia para la entrada en el modelo (0.15).

Se encontró una alta correlación entre las variables físicas y químicas de los suelos y las poblaciones rizosféricas, tal como lo reporta Hoppe *et al.* (2015). Existe una alta correlación entre las poblaciones de microorganismos y el pH, ya que este parámetro explica parcialmente tres de los cinco modelos, concordando con lo reportado por Fierer and Jackson (2006), Griffiths *et al.* (2011) y Clavijo *et al.* (2012). Calvo, Meneses y Zuñiga, (2008) mencionan que el porcentaje de materia orgánica está directamente relacionado con la mayor diversidad de microorganismos, contrario a lo reportado por Beltrán-Pineda (2014), sin embargo, en el presente estudio no fue determinante en la cantidad de bacterias en general, ni actinomicetos, solo parcialmente para hongos totales, pero con un porcentaje muy bajo.

Frossard *et al.* (2013) reportan que el nitrógeno y el fósforo son determinantes en las poblaciones de bacterias y hongos, contrario a lo encontrado en el presente estudio.

Mediante el análisis multidimensional no paramétrico se obtuvo una ordenación (Figura 4.2) donde se observa que la población de bacterias totales tiene mayor presencia en los sitios: San Nicolás Tlaminca, San Bernardino, Venta de Carpio y Santa Catarina Estetla (donde solo una de las repeticiones es la que influye), y en menor relación los sitios San Felipe, Colegio de Postgraduados y Chapingo. La población de bacterias diazotróficas o fijadoras libres de nitrógeno, está asociada principalmente con los sitios: San Nicolás

Tlaminca, Chapingo, San Bernardino y en menor proporción Colegio de Postgraduados. En el caso de las bacterias solubilizadoras de fosfatos los sitios con mayores poblaciones fueron: San Bernardino, San Nicolás Tlaminca y Chapingo. Las poblaciones de hongos totales están distribuidas en mayor cantidad en: Colegio de Postgraduados, Santa Catarina Estetla y San Nicolás Tlaminca; este último sitio a pesar de tener una gran cantidad de hongos totales, está más influenciado por las poblaciones de bacterias. Por último, el mayor número de unidades formadoras de colonias de actinomicetos se encuentran en los sitios: San Nicolás Tlaminca, Venta de Carpio y San Bernardino.



**Figura 4.2. Distribución no paramétrica de los microorganismos rizosféricos, en relación con las variables de suelo del sitio. Varianza explicada por los ejes: X1 = 44.5% y X2 = 52.3%. Estrés= 8.51%.**

Dónde: Las flechas representan la desviación estándar a lo largo de ambos ejes. AN: bacterias totales, FN: bacterias fijadoras libres de nitrógeno, SP: bacterias solubilizadoras de fosforo, PDA: hongos totales, ACT: actinomicetos. Elipses con 95% de confianza corresponden a los sitios de origen: SBn: San Bernardino, VCn: Venta de Carpio, NTn: San Nicolás Tlaminca, SFn: San Felipe, CHn: Chapingo, CPn: Colegio de Postgraduados, CEn: Santa Catarina Estetla, n: número de repetición (1 a 3).

San Nicolás Tlaminca es el sitio con más diversidad en comparación con los demás, y su ordenación está determinada principalmente por las poblaciones bacterianas, dejando los hongos en segundo término, a pesar de ser uno de los sitios con mayor cantidad.

Sivila de Cary y Angulo (2006), Ayres, *et al.* (2008), Ayres, *et al.* (2010) y O'Neill, *et al.* (2013) reportan que las poblaciones de bacterias varían de acuerdo con el grado de perturbación del suelo, concordando con lo encontrado para el sitio de San Nicolás Tlaminca, siendo éste el menos perturbado antropocéntricamente.

La comparación de medias mediante el MRPP se realizó únicamente en los sitios Venta de Carpio, San Nicolás Tlaminca y Universidad Autónoma Chapingo, por ser los sitios más contrastantes en base a su ubicación y características microbiológicas, ya que el primero y segundo son sitios ruderales a diferente altitud y el tercero es una plantación de higuera. El sitio Venta de Carpio difiere significativamente de los sitios San Nicolás Tlaminca ( $A= 0.5226$ ,  $p= 0.0218$ ), la tasa de error del sitio, utilizando la corrección de Holm fue  $p=0.0656$ ; y del sitio Universidad Autónoma Chapingo ( $A= 0.3113$ ,  $p= 0.0272$ ), al corregir la tasa de error se tuvo  $p= 0.0656$ . Para los sitios San Nicolás Tlaminca y Universidad Autónoma Chapingo se tuvieron diferencias significativas ( $A= 0.3613$ ,  $p= 0.0233$ ) al corregir el error se obtuvo  $p= 0.0656$ . De acuerdo a los valores de  $p$ , los tres sitios fueron estadísticamente diferentes con un  $\alpha= 0.10$ .

Como mencionaron Hannam, Quideau y Kishchuk (2007), el contenido de materia orgánica explica porque no variaron significativamente las poblaciones de bacterias totales, bacterias solubilizadoras de fosfatos y actinomicetos en los sitios Venta de Carpio y San Nicolás Tlaminca. La ubicación topográfica según lo reportado por Swallow *et al.* (2009) y Singh *et al.* (2014) incide en las poblaciones bacterianas de los sitios, principalmente en San Nicolás Tlaminca siendo el de mayor altura. De acuerdo con los

datos encontrados, estos sitios son muy diferentes entre sí, por la diversidad microbiana y las características propias del sitio.

#### **4.4. Conclusiones**

El sitio con mayor diversidad biológica es San Nicolás Tlaminca, con los niveles más altos de UFC de bacterias totales, fijadoras libres de nitrógeno y actinomicetos, y en segundo lugar para solubilizadoras de fosfatos y hongos totales. Siendo el sitio con menor perturbación antropocéntrica. El sitio con menor cantidad de hongos totales, corresponde al área cultivada con *R. communis* en la Universidad Autónoma Chapingo, y el sitio Santa Catarina Estetla con nula población de bacterias solubilizadoras de fosfatos. Se encontró el pH y el N como las principales características que explican la cantidad de UFC de microorganismos rizosféricos, con los sitios de muestreo estudiados. La ordenación en dos dimensiones nos explica el 96.8% de la variabilidad entre sitios, en base a las poblaciones de microorganismos rizosféricos. Existen diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha= 0.10$ ) para los sitios: Venta de Carpio, San Nicolás Tlaminca y Universidad Autónoma Chapingo. Se encontraron bajas poblaciones de microorganismos rizosféricos en el sitio cultivado con higuera de la Universidad Autónoma Chapingo, presumiblemente por el alto grado de perturbación del suelo, ya que es un área donde se utilizan gran cantidad de agroquímicos. Existe un gran potencial en el aprovechamiento de BPCV, para la producción de higuera destinada para biocombustibles. Así como, hongos y actinomicetos, que pueden ser susceptibles de aprovechamiento como biofertilizantes. Sin embargo, falta mucho por conocer sobre la dinámica de sus asociaciones.

#### 4.5. Literatura citada

- Aciego, J. 1998. Rhizosphere effect of corn crop on some microbial populations and chemical properties of a tropical soil. *Venesuelos*. 6(1 y 2).
- Ayres E, Nkem JN, Wall DH, Adams BJ, Barnett JE, Broos EJ, Parsons AN, Powers LE, Simmons BL, Virginia RA. 2008. Effects on human trampling on populations of soil fauna in the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Conserv Biol* 22:1544–1551
- Ayres E, Nkem JN, Wall DH, Adams BJ, Barnett JE, Simmons BL, Virginia RA, Fountain AG. 2010. Experimentally increased snow accumulation alters soil moisture and animal community structure in a polar desert. *Polar Biol* 33:897–907
- Banerjee S, Palit R, Sengupta C, and Standing D. 2010. Stress induced phosphate solubilization by *Arthrobacter* sp. and *Bacillus* sp. isolated from tomato rhizosphere. *Australian Journal of Crop Science*. 4(6):378-383
- Barrios, E. 2007. Soil biota, ecosystem services and land productivity. *Ecological Economics*. 64:269-285.
- Beltrán-Pineda ME. y Lizarazo-Forero LM. 2013. Grupos funcionales de microorganismos en suelos de páramo peerturbados por incendios forestales. *Revista de Ciencias*. 17(2).
- Beltrán-Pineda, ME. 2014. Comparative study of total microbial populations and solubilizers of phosphate in soils of paramo cultivated with potato (*solanum tuberosum*) in Ventaquemada – Boyacá Investigación, Innovación e Ingeniería. No. 2, Mzo.–Ago.
- Berg G, Smalla K. 2009. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *Fems Microbiology Ecology*, 68: 1-13.

- Burns JH., Anacker BL., Strauss SY. and Burke DJ. 2015. Soil microbial community variation correlates most strongly with plant species identity, followed by soil chemistry, spatial location and plant genus. Oxford University Press.
- Calvo P. y Zuñiga D. 2010. Caracterización de *Bacillus spp.* aislados de la rizósfera de papa. *Ecología Aplicada*, 9(1): 31-39.
- Calvo, P., Meneses, I. y Zuñiga, D. 2008. Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. *Ecología aplicada* 7(1,2): 141-148.
- Cenciani K, Rodrigues L, M., Cerri C.C., Carvalho BA, L. and Feigl B.J. 2009. Bacteria diversity and microbial biomass in forest, pasture and fallow soils in the southwestern Amazon Basin. *R. Bras. Ci. Solo*, 33: 907-916.
- Chatli A.S., Beri V. & Sidhu B.S. 2008. Isolation and characterisation of phosphate solubilizing microorganisms from the cold desert habitat of *Salix alba* Linn. in trans Himalayan region of Himachal Pradesh. *Indian Journal of Microbiology*. 48: 267-273
- Chen Y.P., Rekha P.D., Arun A.B., Shen F.T., Lai W.-A. and Young C.C. 2005. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology* 34: 33–41.
- Clarke, K.R., 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology* 18: 117–143.
- Clavijo C., Chipana V., Centeno C., Zúñiga D. y Guillén C. 2012. Isolation, characterization and identification of diazotrophic bacteria in the rhizosphere of *Olea europea* “olive” crop in Tacna Peru. *Ecología Aplicada*, 11(2): 89-102

- Compant S, Clement C, Sessitsch A. 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology & Biochemistry*, 42: 669-678.
- Cordero E, J., Ortega-Rodés P. y Ortega, E. 2008. Plant inoculation whit *Pantoea* sp., phosphate solubilising-bacteria increases P concentration in leaf tissues. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 10(1): 11-121.
- Córdova-Bautista, Y., Rivera-Cruz, MC., Ferrera-Cerrato, R., Obrador-Olán, JJ. y Córdova-Ávalos V. 2009. Detección de bacterias benéficas en suelo con banano (Musa AAA Simmonds) cultivar 'Gran enano' y su potencial para integrar un biofertilizante, *Universidad y Ciencia, Tropico Húmedo.* 25(3): 253-265.
- Díaz-Vargas, P.; Ferrera-Cerrato, R.; Almaraz-Suárez, J.J. y Alcántar González, G. 2001. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. *Terra* 19(4): 327-335.
- Dobbelaere, S., J. Vanderleyden and Y. Okon, 2003. Plant growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit. Rev. Plant Sci.* 22: 107-149.
- DOF. 2002. Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. México DF. 74 pp.
- Ehrenfeld JG, Ravit B, Elgersma K. 2005. Feedback in the plant-soil system. *Annual Review of Environmental Resources*, 30: 75–115.
- Fierer N. and Jackson RB. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 626-631.

- Fierer, N. and Jackson, R.B. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *PNAS*. 103(3): 626-631.
- Frossard, A., Gerull, L., Mutz, M. and Gessner, M.O. 2013. Litter supply as driver of microbial activity and community structure on decomposing leaves: a test in experimental streams *Appl. Environ. Microbiol.* doi:10.1128/AEM.00747-13
- Fulthorpe, R.R., Roesch, L.F.W., Riva, A., and Triplett, E.W. 2008. Distantly sampled soils carry few species in common. *ISME J* 2: 901–910.
- Gans, J., Wolinsky, M. and Dunbar, J. 2005. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science* 309: 1387–1390
- García, F., Jaramillo, S. y Carrillo, A. 2011. Organic mineral fertilizer effects on the vertex Unhaplustalf microbial populations. *Cultura Científica*, JCD.
- Garrido , M.F., Cárdenas, D.M., Bonilla, R.R. y Baldani, V. L. 2010. Effect of the edaphoclimatic factors and pasture species on the diversity of diazotrophic bacteria. *Pastos y Forrajes*. 33(49).
- Goslee, S. and Urbano, D. 2015. Package *ecodist*: Dissimilarity-based functions for ecological analysis. *Psicometría Environmetrics Environmetrics*.
- Griffiths RI., Thomson BC., James P., Bell T., Bailey M. and Whiteley AS. 2011. The bacterial biogeography of British soils. *Environmental Microbiology*. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02480.x
- Hannam, K. D., Quideau, S. A., & Kishchuk, B. E. 2007. The microbial communities of aspen and spruce forest floors are resistant to changes in litter inputs and microclimate. *Applied soil ecology*, 35(3): 635-647.
- Hardoim PR, van Overbeek LS, van Elsas JD. 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, 16: 463-471.

- Hoppe B., Krüger D., Kahl T., Arnstadt T., Buscot F., Bauhus J. and Wubet T. 2015. A pyrosequencing insight into sprawling bacterial diversity and community dynamics in decaying deadwood logs of *Fagus sylvatica* and *Picea abies*. *Scientific Reports*. 5: 9456. DOI: 10.1038/srep09456
- Kim, Y., Kim, I., Moon, E., Park, J., Kim, S., Lim, J., Park, B. y Lee, E. 2011. High abundance and role of antifungal bacteria in compost-treated soils in a wildfire area. *Microb Ecol* 62: 725–737.
- Larrea O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*. 62: 96-100.
- Legendre, P. and L. Legendre. 2012. *Developments in Environmental Modelling, Numerical ecology*, 3rd English edition Vol. 24.
- Márquez, M., Martínez, M. & Franco, M., 2003.- Aislamiento de *Trichoderma sp.* y actinomicetes a partir de suelos de clavel (*Dianthus caryophyllus*) y evaluación de su capacidad antagónica *in vitro* sobre *Fusarium oxysporum*. *Revista Agronomía Colombiana*, XIX (1-2): 81-88.
- McCune, B. & Medford, M. J. 2006. *P cord Software: Multivariate Analysis of Ecological Data*, Version 5. MjM Software, Gleneden Beach, OR.
- McCune, B., Grace, J.G., 2002. *Analysis of ecological communities*. MJM Software Design, Gleneden Beach, OR 283 pp.
- Moratto, C., 1, Martínez, L.J., Valencia, H.3 y Sánchez, J. 2005. The effect of land use on phosphate solubilising fungi and diazotrophic bacteria on the bleak uplands of páramo of Guerrero, Cundinamarca department. *Agronomía Colombiana* 23(2): 299-309.

- Nelson, L. M. 2004. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Prospects for new inoculants. Crop Management, Plant Management Network.
- Nieto, P. y García, D. 2010. Bacterias diazotroficas y solubilizadoras de fósforo aisladas de las especies forestales altoandinas colombianas *Weinmannia tomentosa* y *Escallonia myrtilloides*. *Rev. Intropica*.5: 63-76.
- O'Neill T, Balks M, Stevenson B, López-Martínez J. and Aislabie J. 2013. Pip Rhodes The short-term effects of surface soil disturbance on soil bacterial community structure at an experimental site near Scott Base, Antarctica. *Polar Biol*
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Wagner, H., 2010. vegan: Community Ecology Package. R package, 20.
- Peña, H.B. and Reyes, I. 2007. Nitrogen fixing bacteria and phosphate solubilizers isolated in lettuce (*Lactuca sativa* L.) and evaluated as plant growth promoters. *Interciencia*. 32(8).
- R Development Core Team, 2015. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- Ramos-Vásquez, E. and Zúñiga-Dávila, D. 2008. Soil microbial activity in response to different conditions of moisture, temperature or pH. . *Ecología Aplicada*, 7(1,2): 123-130.
- Rivera-Cruz, M.C., R. Ferrera-Cerrato., V. Volke-Haller., L. Fernández-Linares., y R. Rodríguez Vázquez. 2002. Poblaciones microbianas en perfiles de suelos afectados por hidrocarburos del petróleo en el estado de Tabasco, México. *Agrociencia* 36(2):146-160.

- Rives, N.; Acebo, Y. y Hernández, A. 2007. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Perspectivas de uso en Cuba. Reseña Bibliográfica. Cultivos Tropicales. 28(2): 29-38.
- Rudrappa T, Czymmek KJ, Pare PW, Bais HP. 2008. Root-Secreted Malic Acid Recruits Beneficial Soil Bacteria. *Plant Physiology*, 148: 1547-1556.
- Sánchez-Gómez, T.M. 2009. Microbial characterization of the composting process from sugar waste. *Agronomía Tropical*. 59(3): 309-316.
- Schoebitz C., M. I. 2006. Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de *Lolium perenne* L. de suelo volcánico (modelo género *Azospirillum* spp.). Valdivia-Chile. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Agronomía
- Singh, D., Lee-Cruz, L., Kim, W. S., Kerfahi, D., Chun, J. H., & Adams, J. M. 2014. Strong elevational trends in soil bacterial community composition on Mt. Halla, South Korea. *Soil Biology and Biochemistry*, 68, 140-149.
- Sivila de Cary, R. & Angulo, W. 2006. Fallow effect on soil microbial population (Patarani – Bolivian central Altiplano). *Ecología en Bolivia*. 41(3): 103-115.
- Stres B, Sul WJ, Murovec B, Tiedje JM. 2013. Recently Deglaciaded High-Altitude Soils of the Himalaya: Diverse Environments, Heterogenous Bacterial Communities and Long-Range Dust Inputs from the Upper Troposphere. *PLoS ONE* 8(9).
- Swallow, M., Quideau, S. A., MacKenzie, M. D., & Kishchuk, B. E. 2009. Microbial community structure and function: the effect of silvicultural burning and topographic variability in northern Alberta. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(4): 770-777.

- Tokala, K., Strap, C. & Jung, D., 2002. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 2161-2171.
- Torres, M.V. y Lizarazo, L.M. 2006. Evaluación de grupos funcionales (ciclo del C, N, P) y actividad de la fosfatasa ácida en dos suelos agrícolas del departamento de Boyacá (Colombia). *Agronomía Colombiana*. 24(2): 317-325.
- Trivedi, P., A. Pandey, and L. M. S. Paln. 2005. Carrier-based preparations of plant growth-promoting bacterial inoculants suitable for use in cooler regions. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 21: 941-945.
- Vessey J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*. 255: 571-586.
- Whipps, J. M. 2001. Microbial Interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*. 52: 487-511.

## CAPÍTULO V

### 5. COLONIZACIÓN MICORRÍZICA EN HIGUERILLA (*Ricinus communis* L.) UNA PLANTA CON POTENCIAL BIOENERGÉTICO

#### 5.1. Introducción.

Entre los organismos que habitan en el suelo cabe destacar por su función ecológica los hongos micorrízicos arbusculares (HMA). La micorriza es una simbiosis entre un hongos del grupo de los Glomeromycota y las raíces de las planta (Sousa *et al.*, 2010b). Los HMA se encuentran ampliamente extendidos por toda la superficie terrestre y establecen simbiosis con, al menos, 80% de las plantas vasculares, favorecen el crecimiento y adquisición de nutrientes de la mayoría de las plantas de interés económico (Carneiro *et al.*, 2008). Los HMA se caracterizan porque sus hifas penetran en las células de las raíces formando estructuras de almacenamiento (vesículas) y de intercambio bidireccional de nutrientes y carbono (arbúsculos) (Martínez y Pugnaire, 2009). Estos son simbiontes obligados, mientras que las plantas presentan distintos grados de dependencia a la micorrización.

Las micorrizas arbusculares son un importante factor biológico dentro de la estructura y funcionamiento de los suelos, e inciden sobre el comportamiento ecológico, productividad y composición de comunidades vegetales naturales, así como de cultivos agrícolas y plantaciones forestales (Pérez y Fuentes, 2009). Recientemente el origen edáfico, desde el punto de vista de la fertilidad, de estos

hongos mutualistas se considera determinante como mecanismo de adaptación de sus plantas hospederas, factor de suma importancia a considerar en el momento de su utilización en la agricultura, restauración de suelos y en la fijación de carbono. (Johnson *et al.*, 2010). Actualmente, la comunidad de HMA ha sido propuesta como potencial indicador biológico de la calidad de los suelos (Flores, 2010), ya que existe una relación muy estrecha entre la calidad microbiológica del suelo y el medio ambiente (Silveira y Freitas, 2007).

Una micorriza es esencial para uno o los dos simbioses implicados, cuya función principal es el intercambio de nutrientes, agua y azúcares (Smith y Read 2008). Están presentes en las comunidades terrestres de una forma casi universal. Por lo cual algunos autores proponen que las raíces evolucionaron en las primeras plantas primitivas para albergar estos hongos (Read 1994; Brundrett 2002). La micorriza se considera como una extensión de la raíz y como el componente más importante para la absorción de nutrientes. El micelio extraradical tiene la característica de conectar a varias plantas, incluso, permite la formación de una red subterránea de transporte entre diferentes plantas de la comunidad vegetal, que ayuda a minimizar las pérdidas de nutrientes del ecosistema (Simard *et al.* 2002).

La mayoría de los microorganismos se encuentran interactuando en la rizosfera, donde el ambiente es distinto del resto de la zona edáfica. Uno de los fenómenos importantes que se produce en la rizósfera es la presencia de una gran variedad

de sustancias orgánicas, como aminoácidos, ácidos orgánicos, carbohidratos, derivados de ácidos nucleídos, factores de crecimiento y enzimas que, directa o indirectamente, tienen influencia positiva o negativa sobre los microorganismos que ahí habitan (Díaz-Vargas, *et al.*, 2001; Whipps, 2001; Franco-Correa, 2009; Rives, Acebo y Hernández, 2007). Los exudados radicales, pueden conformar hasta 40% de los fotosintatos de la planta (Nelson, 2004),

La micorriza arbuscular es la más común, se presenta en 80% de las especies vegetales, en la mayoría de las angiospermas (plantas con flores), en *pteridofitas* (helechos, *lycopodios*, etc.), en algunas gimnospermas y en rizoides de musgos y *Anthoceros*. Se le conoce también como endomicorriza debido a que el hongo se desarrolla en el interior de la raíz de la planta hospedera y forma estructuras intracelularmente (Reyes, 2002).

Las micorrizas aumentan la absorción de fósforo, zinc, magnesio, potasio, nitrógeno, azufre, calcio, cobre, molibdeno y boro en las plantas, incluso a partir de partículas sólidas inorgánicas en suelos muy pobres (Kikvidze *et al.*, 2010), aumentando hasta en un 700% el área de absorción (Minhoni y Auler, 2003). Debido a estas condiciones, las plantas asociadas con micorrizas a menudo son más competitivas (Pautasso, 2010) y toleran mejor el estrés hídrico, las altas temperaturas, la acidez y condiciones de suelos tóxicos, y proveen protección contra patógenos de la raíz (Mello *et al.*, 2006; Meir *et al.*, 2010), estimulando los mecanismos de defensa bioquímica (Hernández y Chailloux. 2004; Zambrano y

Díaz, 2009). La presencia de HMA disminuye la peroxidación de lípidos, aumentan las relaciones  $K^+ : Na^+$  y relaciones  $Ca^{2+} : Na^+$ , e incrementan la producción de glicina, betaína y prolina (Harris-Valle, *et al.*, 2009).

La higuera (*Ricinus communis* L.) es una oleaginosa de gran importancia económica y social, cuyo aceite es materia prima para biocombustibles, diversos productos industriales, farmacéuticos, cosméticos y aeronáuticos (Freire, 2001). La higuera es una planta de elevada complejidad morfológica y fisiológica, su crecimiento es diferenciado en cada rama, con ramas de varias edades fisiológicas, desarrollo Heteroblastico, metabolismo fotosintético  $C_3$ , ineficiente, con baja tasa fotosintética entre 18 y 27 mg  $CO_2/dm^2/h$  y elevada tasa de fotorrespiración (Beltrao *et al.*, 2002).

Rajkumar y Freitas (2008) mencionaron que *Ricinus communis* es un cultivo con múltiples usos no alimentarios y es excelente en la rotación de cultivos. Además, gracias a su fácil crecimiento vegetativo en diferentes climas y el uso de su biomasa en la industria de los biocombustibles puede utilizarse como bioremediador de suelos contaminados con metales pesados (principalmente Zn) para hacerlos más productivos, con plantas inoculadas con *Pseudomonas sp.* (PsM6 y PjM15).

Hoy en día la producción de semilla de higuera es una actividad que puede generar numerosos empleos debido a la extracción del aceite (Freire *et al.*, 2006) útil para la producción de biodiesel, como una alternativa productiva para regiones

semiáridas o templadas (Azevedo y Lima, 2001), ya que su balance energético según Urquiaga *et al.* (2004) y Almeida *et al.*, (2004) es menor a 3 el cual puede ser mejorado, a través de la selección de variedades de alto rendimiento y la sustitución o reducción de la fertilización química con el uso abonos verdes, rotación de cultivos, sistemas agroforestales y bioinoculantes a base de HMA y bacterias promotoras del crecimiento vegetal. El objetivo del trabajo presentado en el presente capítulo fue seleccionar el mejor consorcio de hongos endomicorrizicos compatible con higuierilla.

## **5.2. Materiales y métodos**

### **5.2.1. Inóculos micorrízicos**

Se utilizó semilla de higuierilla "B39" proveniente de la colección de germoplasma de la Universidad Autónoma Chapingo. Los consorcios de hongos endomicorrízicos arbusculares (HMA) Consorcio "C-12" (3 *Glomus sp*, *G. mosseae*, *Acaulospora leavis* y *A. denticulata*) y "Zac-19" (*Glomus albidum*, *Rhizophagus diaphanus* (antes *Glomus diaphanum*) y *Claroideoglomus claroideum* (antes *Glomus claroideum*)) procedentes de la colección microbiana del Colegio de Posgraduados. Inoculándose tres semillas por bolsa con 10g de inoculo.

### **5.2.2. Altura y volumen radical**

Se midió en centímetros (cm) la altura de la planta desde la base de la raíz al ápice superior, antes de ser extraída de la maceta. Para medir el volumen radical, primero se lavaron las raíces para quitarles las partículas del suelo adheridas y

fueron introducidas en una probeta de 100 mL conteniendo una cantidad de agua conocida, tomándose como el volumen de la raíz al volumen desplazado (cm<sup>3</sup>).

### **5.2.3. Determinación de peso seco de biomasa aérea y radical**

Se determinó el peso seco de la parte aérea y radical, secando la planta en estufa a 80 C hasta obtener peso constante. Posteriormente se pesó el material en una balanza analítica.

### **5.2.4. Fotosíntesis y resistencia estomática**

Se estimó con un analizador de gases infrarrojo (IRGA) portátil modelo LI-6200 (LI-COR Inc.) en la tercera y cuarta hoja expuesta de una planta de cada tratamiento y de cada repetición. Sin desprender la hoja de la planta, se realizó la determinación con el IRGA (Long, 1981).

### **5.2.5. Área foliar**

El área foliar se cuantificó utilizándose un integrador de área modelo LI-3000 marca LICOR, Inc. a los 90 días después de la siembra.

### **5.2.6. Determinación de las propiedades físicas y químicas del sustrato**

Las muestras se enviaron al laboratorio de suelo y agua de la Universidad Autónoma Chapingo, para su análisis, donde fueron secadas a temperatura ambiente a la sombra y se molieron con mazo de madera; las muestras orgánicas se fragmentaron con rodillos de madera y se tamizaron en malla 10 (2 mm). Las rutinas analíticas para determinar pH, conductividad eléctrica (CE), materia

orgánica (MO), nitrógeno total (N<sub>total</sub>), nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), hierro (Fe), arena, limo, arcilla y textura, son las indicadas en la NOM-021-RECNAT-2000 (DOF, 2002).

#### **5.2.7. Colonización y dependencia micorrízica**

Se estimó la colonización micorrízica de acuerdo con la metodología de Phillips y Hayman, (1970). Las raíces fueron observadas a 400x en un microscopio Olympus BH-2, cuantificándose al menos 150 intersecciones por preparado.

Para estimar la dependencia micorrízica se utilizó la fórmula:  $DM = [(materia\ seca\ de\ planta\ micorrizada) - (materia\ seca\ de\ planta\ no\ micorrizada) / materia\ seca\ de\ planta\ micorrizada] \times 100$ . >75% = dependencia excesiva; 50%-75%= dependencia alta; 25%-50%= dependencia moderada; <25% dependencia marginal; no responde a inoculación (Machineski, Balota y Souza, 2011).

Se estableció el experimento en un diseño completamente al azar, con cinco tratamientos; C-12 (10g/planta), Zac-19 (10g/pl), Comb (mezcla 5g/pl de C-12 y Zac.19), Fert (fertilizado, 1g/pl, de triple 16 de liberación lenta) y Test (testigo absoluto), con nueve repeticiones, utilizándose como sustrato una mezcla de arena, tezontle y composta (Relación 1:1:1). Se realizó análisis estadístico (LSD), al 5% de probabilidad en paquete SAS 9.0, para todas las variables.

### 5.3. Resultados y discusión

Se propagó la planta de higuera (Figura 5.1) y se inoculó de acuerdo a cada uno de los tratamientos (Figura 5.2).



Figura 5.1. Propagación de planta de higuera.



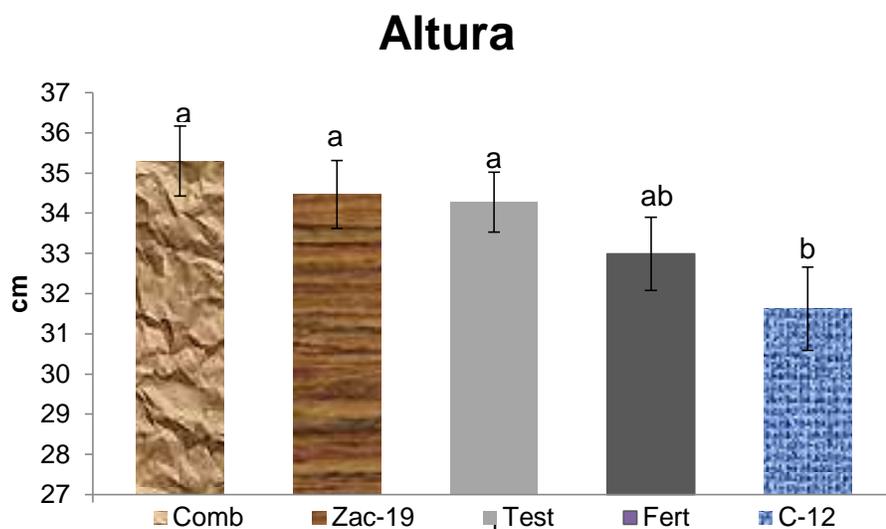
Figura 5.2. Inoculación de planta de higuera con hongos micorrizicos arbusculares.

Los resultados del análisis de laboratorio de las características físicas y químicas del sustrato se presentan en el Cuadro 5.1.

**Cuadro 5.1. Análisis de las propiedades físicas y químicas del sustrato.**

pH	MO	Ntotal	N	P	K	Ca	Mg	Fe	CE	Arena	Limo	Arcilla	Textura
	-----%-----		-----mgKg-1-----						dSm	-----%-----			
	-				--				-1		-		
7.62	10.76	0.54	109.1	1148.56	660	6629	2915	36.88	4.22	83.6	11.3	4.22	Arena francoso

El crecimiento de las plantas se favoreció con una buena nutrición del suelo, como lo comprobó previamente, Severino *et al.* (2008) en sus ensayos con higuera, concordando con los resultados obtenidos en altura (Figura 5.33) y peso seco de la parte aérea y total (Cuadro 5.22), los cuales, mostraron diferencias significativas.



**Figura 5.3. Altura de la planta mostrando diferencias significativas para la prueba LSD, valores con la misma letra no difieren entre sí, al 5% de probabilidad.**

**Cuadro 5.2. Composición de peso seco de la parte aérea y total de higuierilla (*Ricinus communis*).**

Tratamiento	Tallo	Hoja	Raíz	Parte aérea	Total
Comb	1.8660 a	2.5191 a	1.3704 a	4.3851 a	5.7555 a
Test	1.6762 ab	2.4279 ab	1.0273 a	4.1041 ab	5.1314 ab
Zac-19	1.5453 ab	2.2455 ab	1.1998 a	3.7909 ab	4.9907 ab
Fert	1.4863 b	2.2414 ab	1.2052 a	3.7276 ab	4.9328 ab
C-12	1.3920 b	2.0835 b	1.2039 a	3.4754 b	4.6793 b

Medias seguidas de la misma letra, no difieren entre sí para la prueba de LSD al 5% de probabilidad. Tratamientos: C-12 (3 *Glomus sp*, *G. mosseae*, *Acaulospora leavis* y *A. denticulata*), Zac-19 (*Glomus albidum*, *G. diaphanum* y *G. claroideum*), Comb (mezcla C-12 y Zac.19), Fert (fertilizado) y Test (testigo absoluto).

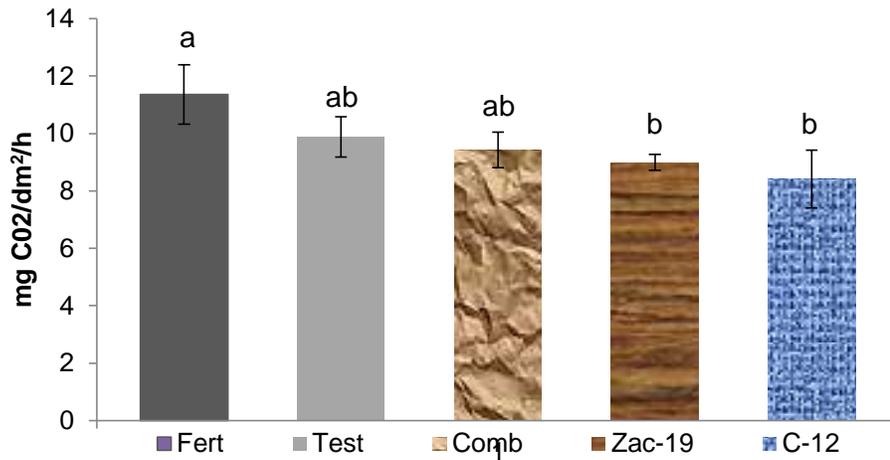
Las plantas producen tres tipos de raíces: magnolioides (gruesas, sin pelos radicales), intermedias, y graminoides (finas y con abundantes pelos radicales). Se dice, que raíces gruesas con pocos o sin pelos radicales, indican una alta

respuesta micorrízica, teoría apoyada por algunos estudios (Brundrett, 2002; Montilla *et al.*, 2002; Jakobsen *et al.*, 2005), lo que explica porque la higuera no mostró una respuesta micorrízica evidente, ya que esta presenta en su etapa inicial raíces gramíneas, contrario a lo que concluyó Flores (2010) con base en sus especies estudiadas, que la respuesta micorrízica es directamente proporcional al porcentaje de sus pelos radicales.

### **5.3.1. Fotosíntesis y resistencia estomática**

Se estimó la fotosíntesis con el IRGA portátil difiriendo en las unidades con Beltrao *et al.*, (2002) con 8-12 y 18-27 mg CO<sub>2</sub>/dm<sup>2</sup>/h respectivamente, concordando en que es baja la tasa fotosintética (Figura 5.4) y elevada tasa de fotorrespiración.

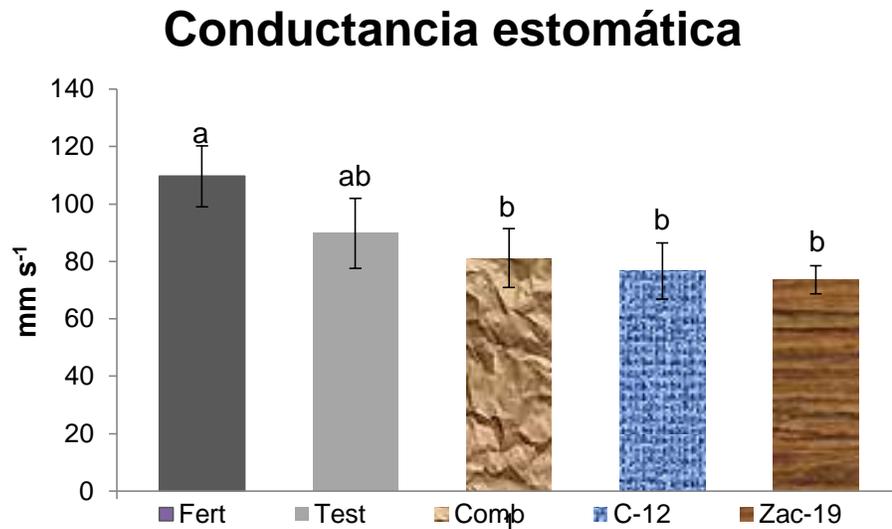
## Fotosíntesis



**Figura 5.4. Fotosíntesis en plantas de higuera, mostrando diferencias significativas para la prueba LSD, valores con la misma letra no difieren entre sí, al 5% de probabilidad.**

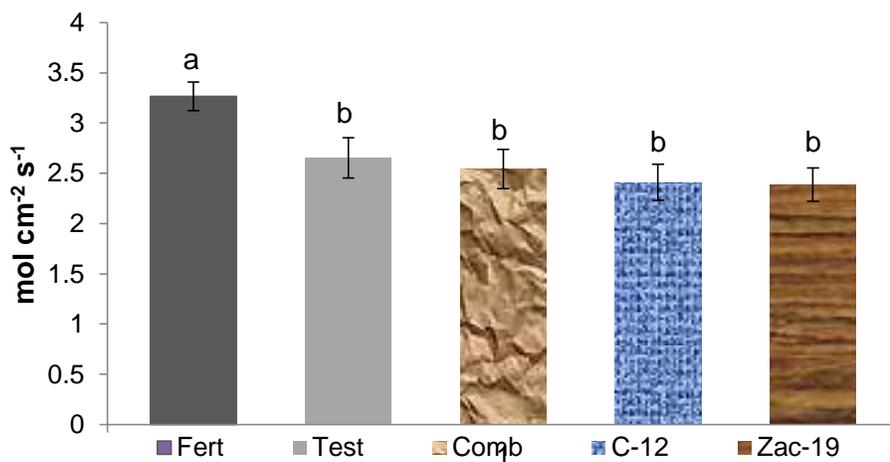
La micorrización favorece el desarrollo de las plantas, pues se incrementa la provisión de los recursos, lo que se refleja en una mayor eficiencia fotosintética y una menor incidencia de organismos patógenos. Además, los HMA modifican las relaciones hídricas de las plantas mediante diferentes mecanismos, los cuales incluyen un incremento en la superficie de contacto de raíces micorrizadas, regulación estomática y una menor resistencia en el transporte del agua y los solutos, mejorando su movilidad en el hospedero. Todo esto se refleja en un incremento en la conductividad hidráulica (Pimienta-Barrios, 2009), elasticidad de las hojas, cambios en el potencial agua y turgencia de hojas, variaciones en la tasa de transpiración (Covacevich y Echeverría, 2010). Siendo los tratamientos Fert y Test los más ineficientes en el aprovechamiento de agua, dada a su baja

resistencia estomática (Figura 5.5) y alta tasa de transpiración relativa expresada en  $\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$  de vapor de agua (Figura 5.6).



**Figura 5.5. Conductancia estomática en hojas de plantas de higuera, mostrando diferencias significativas para la prueba LSD, valores con la misma letra no difieren entre sí, al 5% de probabilidad.**

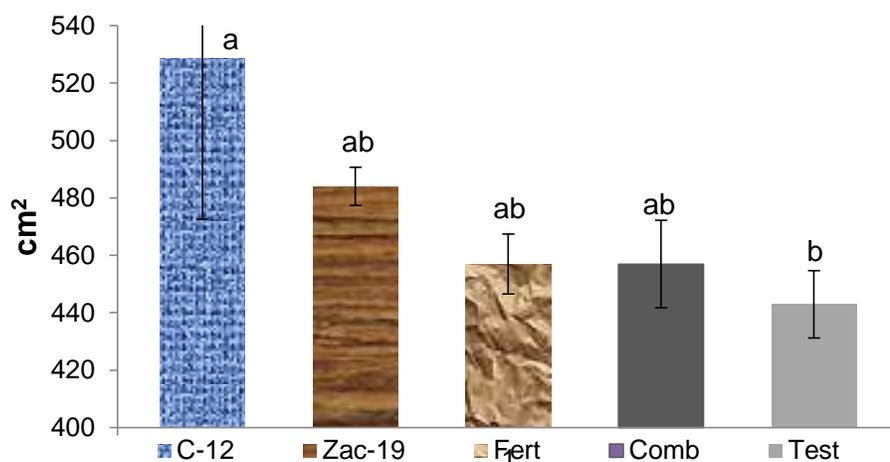
## Tasa de transpiración relativa



**Figura 5.6. Tasa de transpiración relativa para higuera, mostrando diferencias significativas para la prueba LSD, valores con la misma letra no difieren entre sí, al 5% de probabilidad.**

El área foliar específica (AFE) está dada por la relación entre el área foliar y el peso seco foliar (Figura 5.7), El AFE está fuertemente ligado al crecimiento de las plantas y es atribuido como una de las principales características competitivas (Reich *et al.*, 1997), y está estrechamente relacionada con el crecimiento y productividad de los individuos (Nouvellon *et al.*, 2010), pudiendo esta variable explicar hasta un 80 % de las diferencias en tasa de crecimiento de diferentes especies (Villar *et al.*, 2004). a mayor AFE menos eficiente, como lo encontrado en el tratamiento C-12 cuya altura y biomasa es inferior a los demás tratamientos.

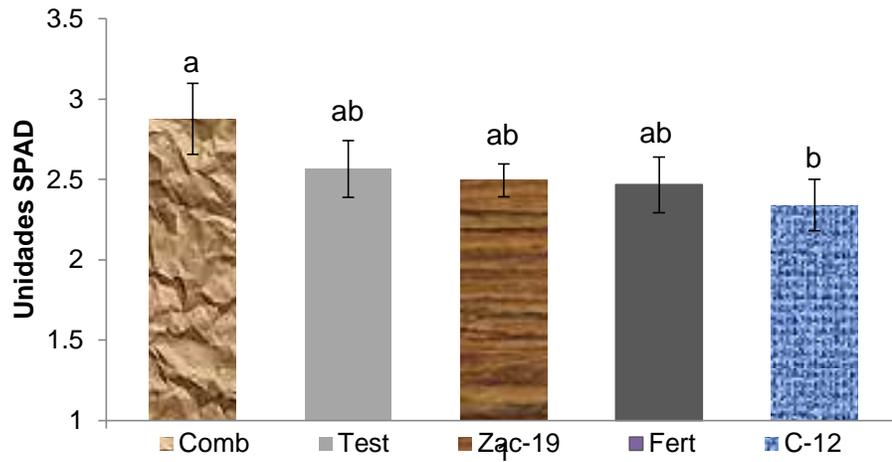
## Área foliar específica



**Figura 5.7. Área foliar específica de plantas de higuera, mostrando diferencias significativas para la prueba LSD, valores con la misma letra no difieren entre sí, al 5% de probabilidad.**

El mayor contenido de clorofila se encontró en el tratamiento Comb (Figura 5.8) coincidiendo con Bonfim *et al.*, (2010) encontrado en las hojas del café de sombra, lo que indica un buen estado nutricional de la planta. Según Reis *et al.* (2006), el contenido de clorofila se puede utilizar como valor de referencia para estimar el contenido de N de la hoja y la productividad en el café. Según Franco y Cano (2006), en los estudios sobre la actividad de los HMA en la rizósfera del pasto buffel (*Cenchrus ciliar* L.) encontraron que la colonización micorrízica aumentó significativamente los niveles de clorofila. Por lo que, se atribuye este aumento como una respuesta a la colonización micorrízica.

## Unidades spad



**Figura 5.8. Contenido de nitrógeno en hoja de higuera medido en unidades spad, mostrando diferencias significativas para la prueba LSD, valores con la misma letra no difieren entre sí, al 5% de probabilidad.**

### 5.3.2. Colonización y dependencia micorrízica

La colonización micorrízica fue dada principalmente por *Claroideoglossum claroideum* (contenido en Zac-19) como lo muestra la Figura 5.9, presentándose únicamente en los tratamientos inoculados con el consorcio que lo contiene, con la presencia de arbuscúlos (Figura 5.10), vesículas, esporas e hifas, como las que se muestran en las Figuras 5.11 y 5.12.

## Colonización micorrízica

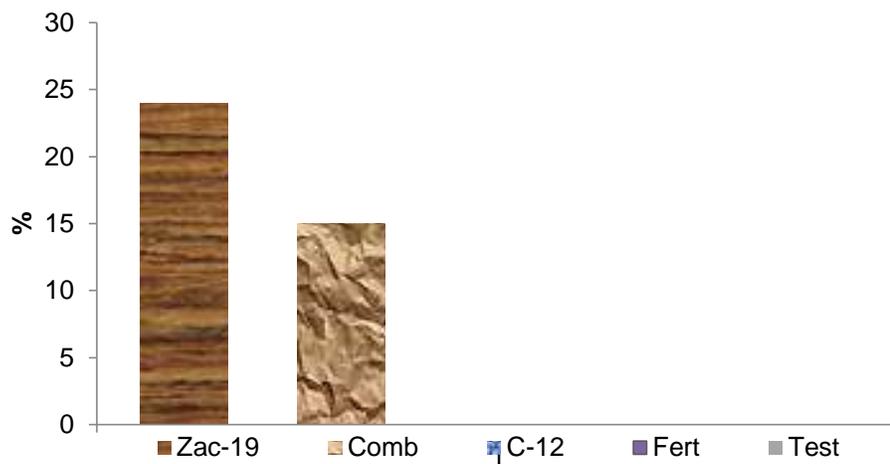


Figura 5.9. Colonización micorrízica de plantas de higuera por hongos micorrizicos arbusculares.

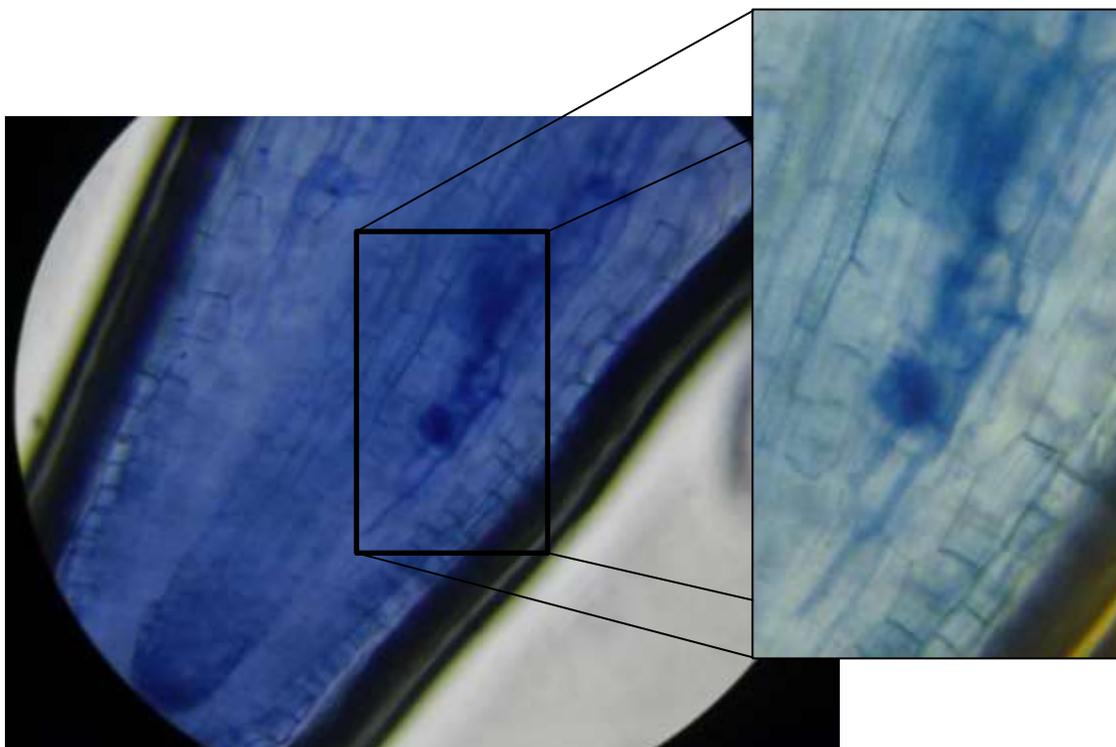


Figura 5.10. Arbúsculos de hongo formador de micorriza arbuscular (*Glomus* sp.), en raíz de *Ricinus communis*.

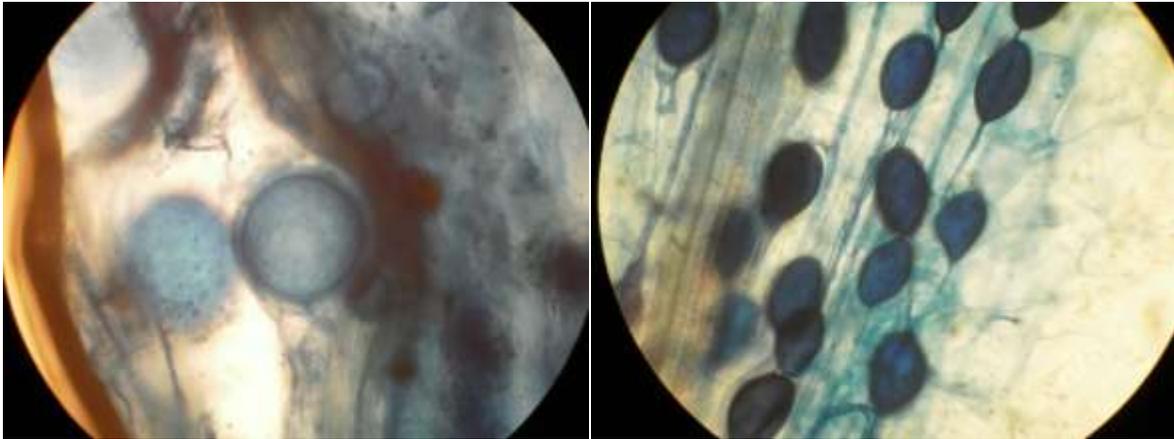


Figura 5.11. Hongos formadores de micorrizas arbusculares (*Glomus* sp.) esporas (izquierda) y vesículas (derecha), en raíz de *Ricinus communis*.

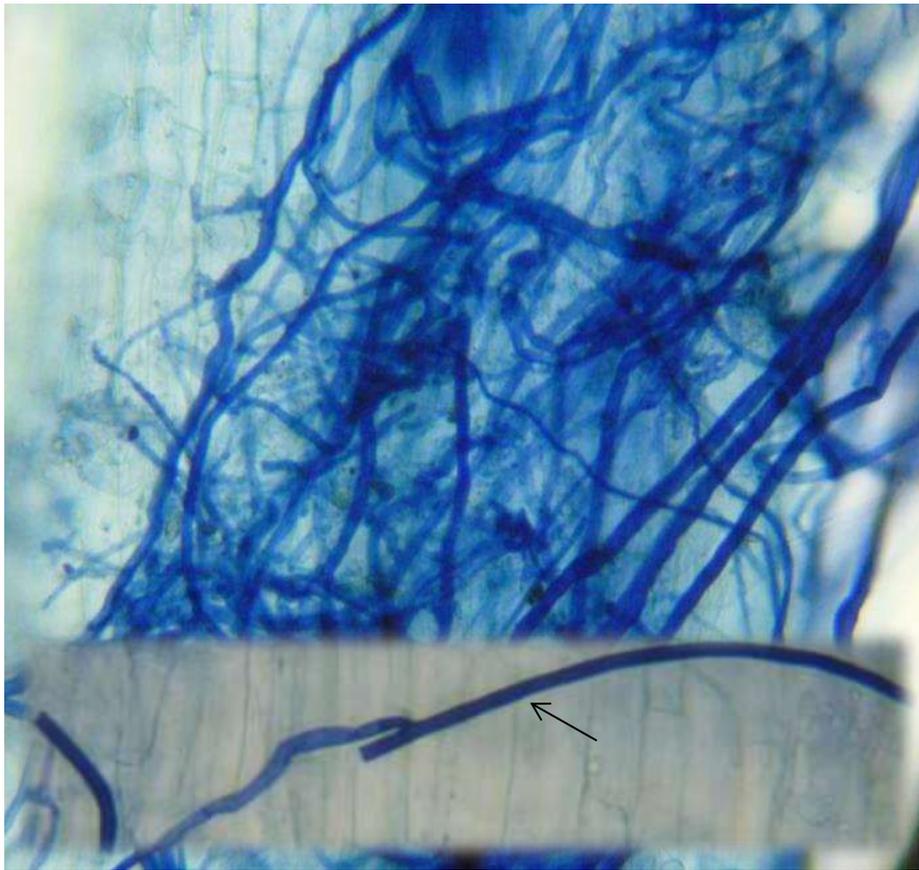


Figura 5.12. Hifas cenocíticas (flechas) de hongo formador de micorriza arbuscular (*Glomus* sp.), en raíz de *Ricinus communis*.

Después de ser evaluada la colonización, no se encontró dependencia micorrízica entre higuera y los consorcios estudiados, concordando con Pérez *et al.* (2010), probablemente debido a que las condiciones nutrimentales del sustrato donde fue sembrada la higuera no permitió la colonización por HMA. Aunque, Silva, Antonioli y Andreatta (2002) mencionaron que la asociación micorrízica no favorece la absorción de nutrientes (N, P y K) en el desarrollo de la parte aérea de plántulas de pinos, como sucedió con higuera al no encontrarse diferencias significativas entre los tratamientos Comb y test como se muestra en el Cuadro 5.2, contrario a lo indicado por Ortas (2010) para plántulas de pepino.

Generalmente, un alto contenido nutrimental (Cuadro 5.1), conduce a una colonización mínima por parte de la micorriza arbuscular, a tal grado que difícilmente se encontrarán asociaciones simbióticas (Guerra-Sierra, 2008). Es muy sabido que el P es el más importante nutriente inorgánico que afecta el desarrollo de los HMA, controlando principalmente la tasa de crecimiento fúngico intrarradical. Normalmente, altas concentraciones de P en la planta inhiben la colonización de las raíces, en tanto, bajas concentraciones favorecen la colonización intrarradical. Se dice que el P puede afectar la exudación radical, cuyos componentes pueden ser importantes para la nutrición del hongo, o la señalización molecular durante los procesos de infección y colonización (Kiriachek *et al.*, 2009).

Machineski, Balota y Sousa (2011), al inocular la higuera con HMA (*Gigaspora margarita* y *Glomus clarum*) y diferentes niveles de fósforo, encontraron que proporcionan aumento en la cantidad de materia seca, principalmente en los niveles más bajos de fósforo en el suelo, así como una alta colonización radical, determinando una alta dependencia a la micorrización, contrario a los resultados encontrados en este trabajo, coincidiendo con Schiavo *et al.* (2010), en plantas de *Jatropha curcas* inoculadas con *Glomus clarum* con baja o nula dependencia micorrízica.

Según Koide (1991), varios factores están relacionados con el grado de interacción planta-hongo: en la colonización de la raíz pueden ocurrir alteraciones, pero su respuesta potencial a la colonización parece ser una característica intrínseca de la herencia genética relacionada con las características morfológicas y fisiológicas del huésped, así como el grado de dependencia de la planta.

Para las variables área foliar (AF), volumen radical (VR), peso seco (PS), contenido interno de CO<sub>2</sub> (CI), peso seco de raíz (r) y uso eficiente del agua (WEU, por sus siglas en inglés), no se encontraron diferencias significativas.

#### **5.4. Conclusiones**

La inoculación con los dos consorcios simultáneamente (Zac-19 y C-12), constituyó el mejor tratamiento para la producción de planta de higuera en invernadero.

Con estos resultados inicia en México el estudio de la colonización micorrízica en *Ricinus communis*, con grandes expectativas de su potencial uso como bioinoculante.

Se reporta por primera vez la presencia de arbusculos en raíces de higuera.

### **5.5. Literatura citada**

- Acebo, Y., Rives, N., Heydrich, M. y Hernandez, A. 2007. Efecto promotor del crecimiento vegetal de cepas de *Azospirillum* sp. en el cultivo del arroz. Cultivos Tropicales, vol. 26. No. 3. P. 29-32
- Almeida M., C.R. e Soares S., L. 2004. Influência do emcharcamento do solo sobre o crescimento e desenvolvimento da mamoneira. I Congresso Brasileiro de Mamona. Campina Grande. PB. Embrapa Algodão. Brasil.
- Azevedo, D. M. P. e Lima, E. F. 2001. O agronegócio da mamona no Brasil. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica.
- Beltrão, N.E.M., Silva, L.C. e Melo, F.B. 2002. Cultivo da mamona (*Ricinus communis* L.) consorciada com feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) para o semi-árido nordestino, em especial do Piauí. Campina Grande: EMBRAPA Algodão, 44p.
- Bonfim, J.A., Matsumoto S.N., Lima, J.M., Coutinho, F.R.F.C. e Ferreira, M.A.S. 2010. Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e aspectos fisiológicos em cafeeiros cultivados em sistema agroflorestal e a pleno sol. Bragantia, Campinas, v.69, n.1, p.201-206.

- Carneiro, R. F. V. *et al.* 2008. Bagaço de cana-deaçúcar como substrato para multiplicação de fungos micorrízicos arbusculares e sua influência sob o estímulos. *Revista Caatinga*, Mossoró, v. 21, n. 5, p. 189-196.
- Covacevich, F. y Echeverría, H.E. 2010. Indicadores para seleccionar inóculos de hongos micorrízicos arbusculares eficientes en suelos moderadamente ácidos. *Cl. Suelo (Argentina)* 28(1): 9-22.
- Díaz-Vargas, P., Ferrera-Cerrato, R., Almaraz-Suárez, J. J., y Alcántar-González, G. 2001. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. *Terra*. 19: 327-335.
- DOF. 2002. Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. México DF. 74 pp.
- Flores, C. 2010. Respuesta micorrízica de siete especies leñosas pertenecientes a diferentes etapas sucesionales del bosque nublado de altos de pipe, Venezuela. *Interciencia*. 35(11).
- Franco-Correa, M. 2009. Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización. *Revista peruana de biología*. 16(2): 239 - 242
- Freire, R.M.M., Sousa, R.L., Saldanha, L. e Milani, M. 2006. Avaliação da qualidade do óleo de mamona de diferentes genótipos. IN: II Congresso Brasileiro de Mamona. Aracaju-SE. CD ROM. Embrapa Algodão. Brasil.

- Guerra-Sierra, B. E. 2008. Micorriza arbuscular. Recurso microbiológico en la agricultura sostenible. *Tecnología en Marcha*, Vol. 21-1, Enero-Marzo 2008, P. 191-201
- Harris-Valle, C., Esqueda, M., Valenzuela-Soto, E. M. y Castellanos, A. E. 2009. Tolerancia al estrés hídrico en la interacción planta-hongo micorrízico arbuscular: metabolismo energético y fisiología. *Revista Fitotecnia Mexicana*. Vol. 32 (4): 265-271.
- Hernández, M. I. y Chailloux, M. 2004. Las micorrizas arbusculares y las bacterias rizosféricas como alternativa a la nutrición mineral del tomate. *Cultivos tropicales*, Vol. 25. No. 2
- Johnson, N., Wilson, G., Bowker, M., Wilson, J. and Miller, M. 2010. Resource limitation is a driver of local adaptation in mycorrhizal symbioses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 2093-2098.
- Kikvidze, Z., Armas, C., Fukuda, K., Martínez-García, L. B., Miyata, M., Oda-Tanaka, A., Pugnaire, F. I. y Wu, B. 2010. The role of arbuscular mycorrhizae in primary succession: differences and similarities across habitats. *Web Ecology* 10: 50–57.
- Kiriachek, S.G., Carvalho, B.A.L., Pereira P., L.E., Rodrigues L., M. 2009. Regulação do desenvolvimento de micorrizas arbusculares. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 33 (1): 1-16
- Koide, R. T. 1991. Nutrient supply, nutrient demand and plant response to mycorrhizal infection. *New Phytologist*, v.117, p.365-386.

- Machineski, O., Balota, E.L. y Souza, J.R.P. 2011. Resposta da mamoneira a fungos micorrízicos arbusculares e a níveis de fósforo. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 32, suplemento 1, p. 1855-1862.
- Martínez, L.B. y Pugnaire, F.I. 2009. Interacciones entre las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares y de plantas. Algunos ejemplos en los ecosistemas semiáridos. *Ecosistemas* 18 (2): 44-54.
- Meir, D., Pivonia, S., Levita, R., Dori, I., Ganot, L., Meir, S., Salim, S., Resnick, N., Wininger, S., Shlomo, E. y Koltai, H. 2010. Application of mycorrhizae to ornamental horticultural crops: *lisianthus (Eustoma grandiflorum)* as a test case. *Span J Agric Res* 8(1): 5-10
- Mello, A.H., Antonioli, Z.I., Kaminski, J., Souza, E.L. e Oliveira, V.L. 2006. Fungos arbusculares e ectomicorrízicos em áreas de eucalipto e de campo nativo em solo arenoso. *Ciência Florestal*, v. 16, n. 3.
- Minhoni, M.T.A. e Auler, P.A.M. 2003. Efeito do fósforo, fumigação do substrato e fungo micorrízico arbuscular sobre o crescimento de plantas de mamoeiro. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v. 27, p. 841 – 847.
- Nelson, L. M. 2004. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Prospects for new inoculants. *Crop Management, Plant Management Network*.
- Nouvellon, Y., Laclau, J.P., Epron, D., Kinana, A., Mabiála, A., Roupsard, O., Bonnefond, J.M., le Maire, G., Marsden, C., Bontemps, J.D. and Saint-Andre', L. 2010. Within-stand and seasonal variations of specific leaf area in

- a clonal Eucalyptus plantation in the Republic of Congo. *Forest Ecology and Management*. Vol. 259: 1796-1807.
- Ortas, I. 2010. Effect of mycorrhiza application on plant growth and nutrient uptake in cucumber production under field conditions. *Spanish Journal of Agricultural Research*. Vol. 8(1): 116-122.
- Pautasso J.M. 2010. Efectos de la inoculación de semillas de trigo sobre el rendimiento y sus componentes Actualización Técnica N° 1 – Cultivos de invierno. INTA - EEA Paraná
- Pérez C., A. y Fuentes C., J. 2009. Regresión logística en la evaluación de la esporulación de micorrizas en pasto *Bothriochloa pertusa* (L) A. Camus. *Rev. Colombiana cienc. Anim.* 1(1).
- Pimienta-Barrios, E., Zañudo-Hernández, J. y López -Alcocer, E. 2009. Efecto de las micorrizas arbusculares en el crecimiento, fotosíntesis y anatomía foliar de plantas jóvenes de *Agave tequilana*. *Acta Botánica Mexicana* 89: 63-78.
- Rajkumar, M. y Freitas, H. 2008. Influence of metal resistant-plant growth-promoting bacteria on the growth of *Ricinus communis* in soil contaminated with heavy metals. *Chemosphere* 71 (2008) 834–842
- Reich, P.B., Walters, M.B. and Ellsworth, D. S. 1997. From tropics to tundra: Global convergence in plant functioning. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United State of America*. Vol.94: 13730–13734.

- Reis, A.R., Junior, E.F., Buzzetti, S. e Andreotti, M. 2006. Diagnóstico da exigência do cafeeiro em nitrogênio pela utilização do medidor portátil de clorofila. *Bragantia*, v.65, p.163-171.
- Reyes J., I. 2002. Asociaciones biológicas en el suelo: la micorriza arbuscular (M A). *ContactoS* 44, 5-10
- Rives, N., Acebo, Y. y Hernández, A. 2007. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Perspectivas de uso en Cuba. Reseña Bibliográfica. Cultivos Tropicales*. Vol. 28, No. 2, p. 29-38.
- Schiavo, J.A., Silva, C.A., Rosset, J.S., Secretti, M.L., Sousa, R.A.C. e Cappi, N. 2010. Composto orgânico e inoculação micorrízica na produção de mudas de pinhão manso. *Pesq. Agropec. Trop.*, Goiânia, v. 40, n. 3, p. 322-329.
- Severino, L.S., Lima, R.L.S., Beltrão, N.E.M. e Sampaio, L.R. 2008. Crescimento e teor de macronutrientes em mudas de mamoneira cultivadas em cinco substratos orgânicos. *Revista de Biología e Ciências da Terra*. v. 8, n. 1.
- Silva, R.F., Antonioli, Z.I. y Andrezza, R. 2002. Produção de mudas de pinus *elliottii* engelm. Micorrizadas em solo arenoso. *Ciência Florestal*, Santa Maria, v. 13, n. 2, p. 57-65.
- Silveira, A.P.D. y Freitas, S.S. (Ed.) 2007. *Microbiota do solo e qualidade ambiental*. Campinas: Instituto Agrônomo,
- Smith, S.E., and Read, D.J. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. (San Diego, CA: Academic Press, Inc.).

- Sousa, C.S., Soares, A.C.F., Coimbra, J.L., Garrido, M.S. y Machado, G.S. 2010. Fungos micorrízicos arbusculares no controle de *Meloidogyne incognita* em mudas de tomateiro. Revista Caatinga, Mossoró, v. 23, n. 1, p. 15-20.
- Urquiaga, S., Rodrigues A., B.J. y Boddey, R. M. 2004. Producción de biocombustibles: una cuestión de balance energético. IN: I Congresso Brasileiro de Mamona. Campina Grande. PB. Embrapa Algodão. Brasil.
- Villar, R., Ruiz-Robledo, J., Quero, J.L., Poorter, H., Valladares, F. y Marañón, T. 2004. Tasas de crecimiento en especies leñosas: aspectos funcionales e implicaciones ecológicas. Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante. Editor Valladares, F. Ministerio de Medio Ambiente, Madrid. Pag.191-227.
- Whipps, J. M. 2001. Microbial Interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany. Vol. 52, p. 487-511.
- Zambrano, J. A. y Díaz, L. A. 2009. Efecto de la inoculación de *Azospirillum brasilense* y *Glomus* sp. en *Gmelina arborea* durante su germinación y manejo en vivero. Universitas Scientiarum, Vol. 13 n. 2, p. 162-170.

## CAPÍTULO VI

### 6. CONCLUSIONES GENERALES

El presente trabajo contribuye al conocimiento ecofisiológico y biotecnológico de la relación entre microorganismos rizosféricos y la producción de planta de *Ricinus communis*, al aislar, contabilizar y seleccionar bacterias multifuncionales promotoras de crecimiento vegetal de rizósfera de higuera, capaces de solubilizar fosfatos, producir AIA y crecer en medio libre de nitrógeno. El análisis molecular de ADNr identificó las cepas multifuncionales dentro de las especies *Arthrobacter koreensis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus simplex*, *Paenibacillus lactis*, *Pseudomonas extremorientalis* y *Raoultella ornithinolytica*. Hasta donde conocemos, se reporta por primera ocasión la capacidad de solubilizar fosfatos y de producir AIA en *Arthrobacter koreensis* y *Bacillus megaterium*. Se demuestra la existencia de la multifuncionalidad de propiedades benéficas para las plantas, teniendo estas, la habilidad de solubilizar fosfatos, producir ácido indolacético y a excepción de *Bacillus simplex*, todas crecen en medio libre de nitrógeno. El estudio de las poblaciones de hongos, bacterias y actinomicetos aislados de rizosfera de higuera, proveniente de diferentes sitios de muestreo, mostró que el sitio de San Nicolás Tlaminca tuvo las mayores poblaciones microbianas y el campo de cultivo de higuera de la Universidad Autónoma Chapingo presentó las menores poblaciones microbianas, determinada principalmente por las condiciones del sitio. Con la evaluación de colonización micorrízica se comprobó

que la especie de *Ricinus communis* L. es susceptible de infección por hongos micorrízicos arbusculares, registrándose la presencia de estructuras intrarradicales como, arbusculos, vesículas, esporas e hifas. Reportándose por primera vez la presencia de arbusculos en esta especie. Estos datos demuestran el gran potencial que poseen los microorganismos rizosféricos en la producción de bioinoculantes para la producción de plantas de higuera, y su consecuente potencial en la producción de bioenergéticos.