

**HALOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL ASOCIADAS A *Lippia palmeri* (VERBENACEAE) EN LA ZONA ÁRIDA DEL NOROESTE DE MÉXICO****Plant growth promoting halobacteria associated to plant growth promoting halobacteria associated to *Lippia palmeri* (Verbenaceae) in the arid zone of northwestern Mexico**Fátima R. MÉNDEZ-MAYBOCA<sup>1</sup>, Maribel PLASCENCIA-JATOMEA<sup>1</sup>, Carmen L. DEL-TORO-SÁNCHEZ<sup>1</sup>, Francisco J. WONG-CORRAL<sup>1</sup>, Jesús BORBOA-FLORES<sup>1</sup>, Kevyn GUERRA<sup>2</sup>, Bernardo MURILLO-AMADOR<sup>2</sup>, Edgar O. RUEDA-PUENTE<sup>3\*</sup><sup>1</sup>. Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México. C.P. 83000.<sup>2</sup>. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, B.C.S. México.<sup>3</sup>. Departamento de Agricultura y Ganadería-Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México. CP. 83000.\* **For correspondence:** [erueda04@santana.uson.mx](mailto:erueda04@santana.uson.mx)**Received:** 1<sup>st</sup> December 2019 **Returned for revision:** 16<sup>th</sup> October 2020. **Accepted:** 8<sup>th</sup> December 2020.**Associate Editor:** Francisco Martínez Pérez**Citation/ citar este artículo como:** Méndez-Mayboca FR, Plascencia-Jatomea M, Del Toro Sánchez CL, Wong-Corral FJ, Borboa-Flores J, Guerra K, Murillo Amador B, Rueda-Puente EO. Halobacterias promotoras de crecimiento vegetal asociadas a *Lippia palmeri* (verbenaceae) en la zona árida del noroeste de México. Acta Biol Colomb. 2021;26(3):439-448. Doi: <https://doi.org/10.15446/abc.v26n3.83820>**RESUMEN**

La producción de orégano es de relevancia económica en el noroeste de México. Sin embargo, los productores para obtener altos rendimientos recurren a la fertilización química, pero su mal uso, agudiza la salinidad. *Lippia palmeri* crece de manera natural en suelos áridos, pobres en materia orgánica, alta salinidad y temperatura en el noroeste de México. En el contexto de una agricultura sustentable, los microorganismos mantienen la fertilidad del suelo e incrementan la productividad de la planta. Actualmente existe interés en proponer biofertilizantes en la agricultura de alta intrusión salina y elevadas temperaturas para el cultivo de orégano. Las Halobacterias Promotoras del Crecimiento de Plantas (HPCP), se han destacado por beneficiar a los cultivos nutrimentalmente y mitigar el efecto de la salinidad. El objetivo del presente trabajo consistió en identificar termo- y halo-tolerantes HPCP asociadas a la rizosfera de *L. palmeri*; se evaluó la actividad solubilizadora de fosfatos, producción de ácidos orgánicos, sideróforos y fijación de nitrógeno; se identificaron mediante el gen ARNr-16S aquellas con alta actividad evaluándose su efecto en la germinación y longitud radicular. Quince diferentes colonias sobresalieron al crecer en NaCl (0.25, 0.50 y 0.75 M) a 35 y 45 °C, destacando tres bacterias identificadas: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*. El efecto en la longitud radicular es significativo por la aplicación de *B. amyloliquefaciens*. Estudios relacionados con la promoción vegetal deben ser considerados en posteriores estudios. Este es el primer informe de *B. amyloliquefaciens* como una bacteria fijadora de nitrógeno asociada a *L. palmeri*.

**Palabras Clave:** plantas aromáticas, biofertilizante, salinidad, promoción del crecimiento.**ABSTRACT**

The production of oregano is of economic relevance in northwestern Mexico. However, to obtain high yields, producers resort to chemical fertilization, but its misuse increases salinity. *Lippia palmeri* Watts is a species of oregano that naturally grows in arid soils with poor organic matter, high salinity and temperature in the northwestern Mexico. In the context of sustainable agriculture, microorganisms activate soil fertility and increase plant productivity. Currently there is interest in proposing biofertilizers in the agriculture with high saline intrusion and temperatures for the cultivation of oregano. The Plant Growth Promoting Halobacteria (HPCP) have stood out by the beneficiary of the nutritious crops and mitigate the effect of the salinity. The goal of this work was to identify HPCP associated to the rhizosphere of *L. palmeri*, thermo and halotolerant; phosphate solubilizing activity, organic acid production, siderophores and nitrogen fixation were evaluated; the highest activity colonies were identified by the rRNA-16S gene

and the effect on germination and root length was evaluated. Fifteen different colonies stood out when growing in NaCl (0.25, 0.50 and 0.75 M) at 35 and 45 °C, from which three bacteria were identified: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. The effect on root length was significant for *B. amyloliquefaciens*. Studies related to plant promotion should be involved in subsequent studies. This is the first report of *Bacillus amyloliquefaciens* as a nitrogen fixing bacteria associated with *Lippia palmeri*.

**Keywords:** aromatic plants, biofertilizer, salinity, promotion growth.

## INTRODUCCIÓN

México ocupa el segundo lugar en producción y exportación de orégano en todo el mundo (Orona-Castillo *et al.*, 2017). Destaca por tener un gran potencial económico y una importante demanda internacional, debido a sus usos en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria; posee propiedades antimicrobianas, citotóxicas, antioxidantes y antifúngicas (Aguilar-Murillo *et al.*, 2013). En México, la producción de orégano rebasa las 80 toneladas anuales; sus ventajas y utilidades lo convierten en uno de los productos de mayor aprovechamiento mundial. En el noroeste de México, habita un pueblo amerindio denominado COMCAAC con un total de habitantes ~20 000 personas; tienen usos, costumbres, tradiciones y lengua propios; tienen autoridades tradicionales propias, que se eligen por voto, y se respeta su jerarquía a la par de las leyes civiles mexicanas; se autodenominan “Seris” (caminantes de dunas o arenales). Actualmente la comunidad se dedica a la agricultura, frecuentemente con técnicas avanzadas y con prácticas sustentables. En la actualidad y con base a los apoyos federales de la nación y en aras de producir subproductos de orégano (extracto para medicina tradicional, aceite esencial, especias, pan, etc.), y si bien ya utilizan líneas mejoradas, están demandando se les proponga un sistema de producción de orégano con el uso de biofertilizantes; lo anterior debido a las condiciones bajo las que producen (suelos con baja disponibilidad de materia orgánica (M.O.) <1% y pH arriba de 8); aunado a lo anterior, la salinidad se ha vuelto un intruso de suelos agrícolas (Borboa-Flores *et al.*, 2016; Lastiri *et al.*, 2017; Romero-Perdomo *et al.*, 2017) y los costos de producción se ven incrementados, sobre todo al sustituir la baja disponibilidad de M.O. por altas aplicaciones de fertilizantes químicos y donde su uso indiscriminado ha agravado el problema local de la salinidad, el cual está presente en las regiones agrícolas de la zona árida de México.

Existe una especie de orégano, *Lippia palmeri* Watts que crece de manera natural en suelos costeros, adaptada a suelos pobres en materia orgánica y alta temperatura (García-Pérez *et al.*, 2012). La aplicación de microorganismos benéficos presentes en el sistema radicular de las plantas, entre los que resaltarían aquellos tolerantes a la salinidad y que son denominadas halobacterias promotoras del crecimiento de plantas (HPCP) se plantea como una alternativa a la intrusión salina y que disminuiría las aplicaciones de fertilización

sintética (Romero-Perdomo *et al.*, 2017; Renganathan *et al.*, 2018). Las HPCP tienen la capacidad de asociarse al sistema radicular, beneficiar a la planta y mitigar el efecto de la salinidad en el suelo; mejoran los rendimientos de los cultivos proveyéndoles de nutrientes mediante la fijación de nitrógeno atmosférico, solubilización de fosfatos, asimismo influyen en la planta por su producción de fitohormonas, como las auxinas y gibelinas (AG<sub>3</sub>) (Puente y Bashan, 1993; Puente *et al.*, 1999; Loredano-Osti *et al.*, 2004). Entre los estudios con halobacterias y cultivos hortícolas y de interés forrajero figuran los de Rueda-Puente *et al.* (2009), Villegas-Espinoza *et al.* (2014), Borboa-Flores *et al.* (2016), Pathak y Kumar (2016), Mahanty *et al.* (2017), Jiménez-Gómez *et al.* (2018), Renganathan *et al.* (2018) y Söğüt y Çiğ (2019), entre otros. Sin embargo, aquellos estudios dirigidos a plantas aromáticas y su asociación con bacterias benéficas como son las promotoras del crecimiento vegetal de tipo halotolerante, son nulos en la región noroeste de México. En el contexto de una agricultura sustentable, y a que las HPCP incrementan la productividad de la planta, es importante proponer biofertilizantes en una agricultura de alta intrusión salina y temperatura para el cultivo de orégano en el noroeste de México. Con base a lo anterior, el objetivo del presente trabajo consistió en aislar e identificar las HPCP termo- y halo-tolerantes, con actividad solubilizadora de fosfatos, productoras de ácidos orgánicos y sideróforos, además de su capacidad de fijar nitrógeno asociadas a la rizosfera de *L. palmeri*, en la zona árida del Noroeste de México.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestreo de raíces y suelo para aislamiento microbiano

El muestreo se realizó en la zona árida indígena de los COMCÁAC (indígenas Seris) a 140 km al oeste de la ciudad de Hermosillo, Sonora, México. Las coordenadas son 112° 07' 14.9" y 112° 07' 15.3" W y 28° 59' 18.2" y 28° 59' 18.4" N a 46 metros sobre el nivel del mar. Predominan suelos tipo franco-arenosos y arenosos, pobres en nitrógeno y materia orgánica, con clima seco árido-desértico (BWh) (según la clasificación climática de Köppen) con temperatura media anual de 20-22 °C y precipitación media de 123 mm.

Las muestras de raíz y suelo fueron colectadas a 10 cm de distancia del tronco de cinco plantas silvestres de *L. palmeri* en la etapa de floración y de tres años de edad aproximadamente. Se tomaron tres submuestras por cada

planta (500 g de suelo y raíces) y a una profundidad de 20, 40 y 60 cm. Los arbustos fueron seleccionados por su robustez ( $1.80 \pm 10$  cm de ancho), altura ( $1,50 \pm 10$  cm) y color (verde opaco intenso). El material colectado se depositó en bolsas de plástico oscuras, se etiquetaron con sus correspondientes datos de colecta y se guardaron en un recipiente térmico con hielo que presentaba una temperatura entre los  $4 \pm 2$  °C para su traslado al laboratorio.

### Procesamiento de muestras de suelo rizosférico y raíces para el aislamiento de cepas fijadoras de N<sub>2</sub>

El aislamiento microbiano se llevó a cabo considerando las siguientes condiciones: temperatura de incubación (35 y 45 °C), medio de cultivo (Rennie y Ashby) y concentración de NaCl (0, 0,25, 0,50 y 0,75 M), con tres replicas. Considerando las cinco plantas, y las tres profundidades hace un total de 480.

En el laboratorio, suelo y raíces de cada muestra fueron separada; las raíces fueron seccionadas a 2 cm según Puente *et al.* (1999). Las raíces de cada planta fueron depositadas en dos medios de cultivo carentes de una fuente de nitrógeno; uno de ellos en medio líquido (medio de Rennie) (Rennie, 1981) en matraces de 500 mL y el otro en medio sólido (medio de Ashby) en cajas Petri según Vital López *et al.* (2015). Posteriormente, las cajas Petri con medio sólido se incubaron en una cámara climática por 43 h, sometiendo a dos temperaturas los medios de cultivo con raíces de cada planta a 35 y 45 °C. Por su parte, de los matraces con medio líquido y raíces, una vez transcurrida la incubación, se tomó una alícuota para ser diluida en agua estéril en una proporción 1:10 y de la quinta dilución se tomó 0.1 mL para sembrar por triplicado en medio libres de la fuente de nitrógeno: sólido Rennie (Rennie, 1981) y medio sólido Ashby (Vital López *et al.*, 2015); ambos medios considerando concentraciones de NaCl (0, 0,25, 0,50 y 0,75 M).

Con relación al suelo colectado, se seleccionó el suelo adherido a las raíces (rizósfera); 4 gr de suelo rizosférico (SR) se obtuvieron de cada muestra y se depositaron en agua destilada estéril para su dilución (1:100 SR: agua por volumen). La solución resultante fue diluida en serie en una proporción 1:10 y de la quinta dilución se tomó 0,1 mL para sembrar por triplicado en dos medio líquidos libres de la fuente de nitrógeno: Rennie (Rennie, 1981) y Ashby (Vital López *et al.*, 2015); ambos medios considerando concentraciones de NaCl (0,25, 0,50 y 0,75 M). Los medios de cultivo se incubaron por 120 horas a 30 y 45 °C, según Rueda-Puente *et al.* (2010). Con relación a los matraces con medio líquido y SR, una vez transcurrida la incubación, se tomó una alícuota para ser diluida en agua estéril en una proporción 1:10 y de la quinta dilución se tomó 0,1 mL para sembrar por triplicado en medio libre de la fuente de nitrógeno: sólido Rennie (Rennie, 1981) y medio sólido Ashby (Vital López *et al.*, 2015); ambos medios considerando concentraciones de NaCl (0, 0,25, 0,50 y 0,75 M). Con base a lo anterior descrito, 96 unidades experimentales (cajas Petri) por cada planta selecta

y muestreada fueron consideradas para SR y raíz, originando 486 en total para su análisis por las cinco plantas.

### Muestreo y análisis químico de suelo

Durante la colecta de suelo y raíz de las plantas de orégano, se realizó un muestreo de transecto variable de 2 x 10 mts y con el apoyo de una pala, se tomaron tres submuestras de suelo alrededor cada planta muestreada a una distancia de 10 cm del tronco de *L. palmeri*, se consideraron diferentes profundidades de 20, 40 y 60 cm hasta obtener la cantidad de 500 g de suelo para formar una muestra compuesta. Se realizó el análisis de suelo para identificar su clasificación, en ppm (mg/kg suelo): N-NO<sub>3</sub>, P, Ca, Mg, Na, C.I.C. en mEq/100gm, % Cationes Intercambiables: Ca, Mg, Na y K con base a Aguilar-Murillo *et al.* (2013).

### Selección y purificación de los microorganismos fijadores de N<sub>2</sub>

Con la finalidad de aislar y purificar las colonias desarrolladas, las bacterias presentes en los distintos cultivos sólidos y en las diferentes concentraciones de NaCl utilizadas, se manejó el medio sólido TSA (Trypticase Soy Agar) (Becton, Dickinson and Company) considerando la concentración salina a la que se desarrolló siguiendo las recomendaciones de Manovsky (1982) e incubándolas a 30 °C durante 24 h. Los aislados bacterianos fueron preservados y almacenados en 15 % de glicerol a -70 °C (Carrillo *et al.*, 1998). Posteriormente se tomó una colonia de cada aislado y se le realizó un frotis para la tinción de Gram, apoyándose de portaobjetos y utilizando un kit para tinción (Hycel de México S.A. de C.V.), según Javor *et al.* (1984); las muestras bacterianas fueron observadas en un microscopio óptico (Olympus cx31). Posteriormente a cada uno de los aislados se le realizó una caracterización morfológica en donde se incluyeron datos de color, consistencia, apariencia, borde, elevación, tipo de crecimiento y forma de la colonia según Javor *et al.* (1984), Barrow y Feltham (1993) y MacFaddin (2000). Posteriormente, se realizó a cada cepa bacteriana una curva logarítmica de crecimiento; se cultivaron en TSA durante 24 h a 150 rpm a 30 °C tomando muestras cada 2 h, de acuerdo al siguiente procedimiento: 1 mL del cultivo se vertió en una celda para espectrofotómetro (FISHER SCIENTIFIC 415), tomando la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 540 nm contra un control de medio nutritivo sin células bacterianas. La suspensión bacteriana se diluyó hasta obtener una absorbancia de 1,00 unidad, que corresponde a una concentración de  $1 \times 10^9$  UFC/mL (Rueda *et al.*, 2009; 2010; 2011).

### Evaluación de la fijación de Nitrógeno (FN), Solubilización de fosfatos inorgánico (SF) y Producción de sideróforos (PS) por las bacterias aisladas

Para cada actividad biológica evaluada, las cepas seleccionadas se reactivaron por separado en medio de cultivo en TSB (Trypticase Soy Broth) durante 24 h a 150

rpm en una incubadora (Infort HT) a 30 °C. Para realizar la prueba de FN, se preparó agar sólido “Rennie” (Rennie, 1981), para SF medio SRSM (Santoro *et al.*, 2015), el cual contiene sales de fosfato de calcio, así como purpura de bromocresol como indicador de Ph y para la prueba de PS se preparó medio sólido cromoazuro S (CAS) todos se colocaron en cajas Petri por triplicado. Las placas se dividieron en seis segmentos considerando uno para el control, posteriormente en cada segmento se agregaron 2µL de cultivo puro de las cepas previamente crecidas en TSB, se incubaron a 30 °C durante 48 h, tomando lectura de diámetros de crecimiento a las 21 y 48 h con un vernier milimétrico (Mitutoyo America Corporation).

Para la prueba de FN se consideró la cepa control *Azospirillum brasilense* (proporcionada por el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste = CIBNOR=); Con base en las medidas de crecimiento obtenidas se clasificaron como actividad nula (-) cuando no se presentó crecimiento 0,0 mm, como actividad moderada (+) cuando se presentó crecimiento de 0-7 mm y como actividad alta (++) cuando el crecimiento superó los 7 mm. Con relación a la SF y PS, con la finalidad de observar alrededor de la(s) colonia(s) bacteriana(s) una degradación mineral que se manifiesta en forma de halo (índice de degradación =mm= y evidenciado por la clarificación del medio ocasionada por la solubilización de fosfatos y producción de sideróforos). De acuerdo a los resultados de crecimiento, se clasificó como actividad nula (-) cuando no se presentó crecimiento 0,0 mm; como actividad moderada (+) con crecimiento de 0-3 mm y como actividad alta (++) cuando el crecimiento superó los 3 mm. El control utilizado para SF y PS fue “*Bacillus subtilis* cepa 1118<sup>a</sup>” de la colección de microorganismos extremófilos del CIBNOR”.

El diseño experimental para las actividades bacterianas de fijación de Nitrógeno, solubilización de fosfatos inorgánicos y producción de sideróforos, fue un diseño completamente al azar. Los valores obtenidos, fueron evaluados con estadística descriptiva, se obtuvo la media y desviación estándar. Los resultados fueron analizados con el paquete estadístico INFOSTAT versión 2017e.

### **Identificación de las halobacterias con capacidad de fijar N<sub>2</sub>, solubilización de fosfatos inorgánicos y producción de sideróforos**

La caracterización molecular de las halobacterias se desarrolló partir de la secuenciación del ADN que codifica para el ARN ribosomal 16s (GENEWIZ). Las condiciones para la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los primers bacterianos universales se realizó como se reportó previamente (McCabe *et al.*, 1999; Baker *et al.*, 2003); una secuenciación de los amplicones del gen ARN ribosomal 16S (GENEWIZ, NJ,USA) Posteriormente, las secuencias nucleotídicas se analizaron mediante un alineamiento múltiple utilizando el programa Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para identificación de las especies bacterianas.

### **Evaluación de la germinación por efecto de *Bacillus amyloliquefaciens***

Con base en los resultados de las actividades biológicas realizadas a las cepas en estudio; se seleccionó a *Bacillus amyloliquefaciens*, debido a su capacidad halotolerante y por presentar actividad positiva a las tres pruebas biológicas de promoción de crecimiento (capacidad de crecer en concentraciones de NaCl (0, 0,25, 0,50 y 0,75 M), a 45 °C, fijar N<sub>2</sub>, solubilización de fosfatos inorgánicos y producción de sideróforos). Posteriormente las semillas de orégano fueron sometidas a pruebas de germinación siguiendo las reglas ISTA (2016); utilizando un diseño estadístico completamente al azar con tres tratamientos pre-germinativos (*B. amyloliquefaciens* + AG<sub>3</sub> (100 ppm) + Control agua destilada) los cuales fueron sujetos a tres concentraciones de NaCl (0, 0,06, 0,12 M) y tres réplicas.

Las semillas fueron colectadas en el estero Santa Rosa de Bahía de Kino (coordenadas: 28° 59' 18.2" N y 112° 10' 9.5" O), a 46 metros sobre el nivel del mar; se utilizaron 50 semillas (0,9 x 0,6 mm de diámetro en promedio) por tratamiento y sin daños mecánicos ni de insecto. Luego, las semillas se depositaron en recipientes con agua destilada por 60 min. (Rueda-Puente *et al.*, 2009). Enseguida se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 3 % durante tres minutos (Carrillo *et al.*, 1998; Rueda-Puente *et al.*, 2009). *Bacillus amyloliquefaciens* se reactivó utilizando el medio de cultivo en TSB; la concentración microbiana inoculada en semilla fue la de 1 x 10<sup>9</sup> UFC/mL y la inoculación en semilla fue con base a la técnica del vacío reportada por Carrillo *et al.* (1998). Las semillas con su tratamiento y por triplicado se colocaron en cajas Petri utilizando como sustrato papel filtro.

Las placas fueron colocadas en una germinadora bajo oscuridad continua, con temperatura y humedad relativa controlada de 28 ± 2 °C y 90 % respectivamente, por un período de 30 días. Cada una de las placas se irrigó con las diferentes concentraciones de NaCl de manera inicial con 5 mL y posteriormente para evitar evaporación se utilizó un atomizador, se cambió el papel filtro de cada caja Petri cada tercer día. Al segundo día se observaron las primeras semillas germinadas, realizándose conteos de plántulas germinadas cada dos días (ISTA, 2016). En esta prueba se consideraron tres variables: semillas germinadas (%), tasa de germinación y longitud radicular (Gulzar y Khan, 2001).

Para determinar el porcentaje de germinación, el valor germinativo y la tasa de velocidad de germinación se siguió la metodología empleada por Borboa-Flores *et al.* (2016). La tasa es la velocidad de germinación en tiempo; asimismo, fue evaluada la longitud de radicular apoyándose de un vernier.

Se utilizó un diseño estadístico completamente al azar; se realizaron análisis de varianza del porcentaje de germinación transformando previamente los valores porcentuales con arcoseno (Sokal y Rohlf, 1995). La diferencia mínima significativa entre las medias de los tratamientos, de las

variables estudiadas (porcentaje de germinación), fueron evaluadas mediante la prueba de Rango Múltiple de Duncan al 0,05 %. Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico de cómputo SAS 9.1.

## RESULTADOS

Con base en la metodología planteada, los resultados indican que el tipo de suelo donde se desarrolla de manera natural *L. palmeri* es un tipo franco arenoso (Arena: 62,14; Limo 22,77; Arcilla: 15,09); C.E. Milimho  $s_{sc} = 6,14$ ; saturación =  $31,5 \text{ g kg}^{-1}$ ; Capacidad de campo =  $12,63 \text{ g kg}^{-1}$ ; MO  $0,088 \text{ g kg}^{-1}$ ;  $\text{N-NO}_3 = 0,09 \text{ mg kg}^{-1}$ ;  $\text{P} = 3,1 \text{ mg kg}^{-1}$ ; Permeabilidad K (cm·h) = de alta a excesiva 12,5; Cationes Intercambiables:  $\text{Ca} = 250 \text{ g kg}^{-1}$ ;  $\text{Na} = 190 \text{ g kg}^{-1}$ , lo cual es indicativo de que el orégano presente en el estero de Santa Rosa es tolerante a la salinidad según la C.E. obtenida en los análisis y un bajo contenido de M.O. presente.

Con relación a los aislados bacterianos de raíz (R) y suelo rizosférico (SR), se observa en la Tabla 1 un total de 15 aislados bacterianos; diez fueron obtenidos de R (crecimiento a las 43 h de incubación) y cinco de SR (crecimiento a las 120 h de incubación). Cabe indicar que, de las 15 colonias obtenidas, el 26 % corresponde a aquellas obtenidas a 0 M de NaCl; 33 % a las desarrolladas a 0,25 M

y 40 % a las que crecieron a 0,5 y 0,75 M de NaCl, lo cual señala la capacidad de estos microorganismos para tolerar los altos contenidos de NaCl y similares al presente en el agua de mar (0,5 M de NaCl = 32 gr/L) y presente en el Golfo de California, que con sus mareas logra irrigar a las plantas de orégano del estero Santa Rosa. No obstante, en la Tabla 1 se indica la temperatura de preferencia para cada aislado, se observa que aquellas colonias halotolerantes tienden a desarrollarse en la alta temperatura estudiada.

Con base en las características morfológicas de los 15 aislados obtenidos, cuatro resultaron ser bacterias Gram positivas y 11 Gram negativas (Tabla 1). los aislados 1F, 4F y 15F presentaron morfología de bacilo y Gram negativo pequeños y cortos, mientras que los aislados 2F, 3F, 5F, 6F, 10F, 12F y 13F, presentaron morfología de bacilo pequeño y largo Gram negativo; por su parte los aislados 10F y 11F mostraron bacilos Gram positivos pequeños largos. El aislado 8F presentó morfología de cocobacilo Gram negativo pequeño y corto. El aislado 9F resultó con morfología de diplobacilo Gram positivo pequeño y largo. Por último, el aislado 14F presentó morfología de estreptobacilo grande Gram positivo (Tabla 1).

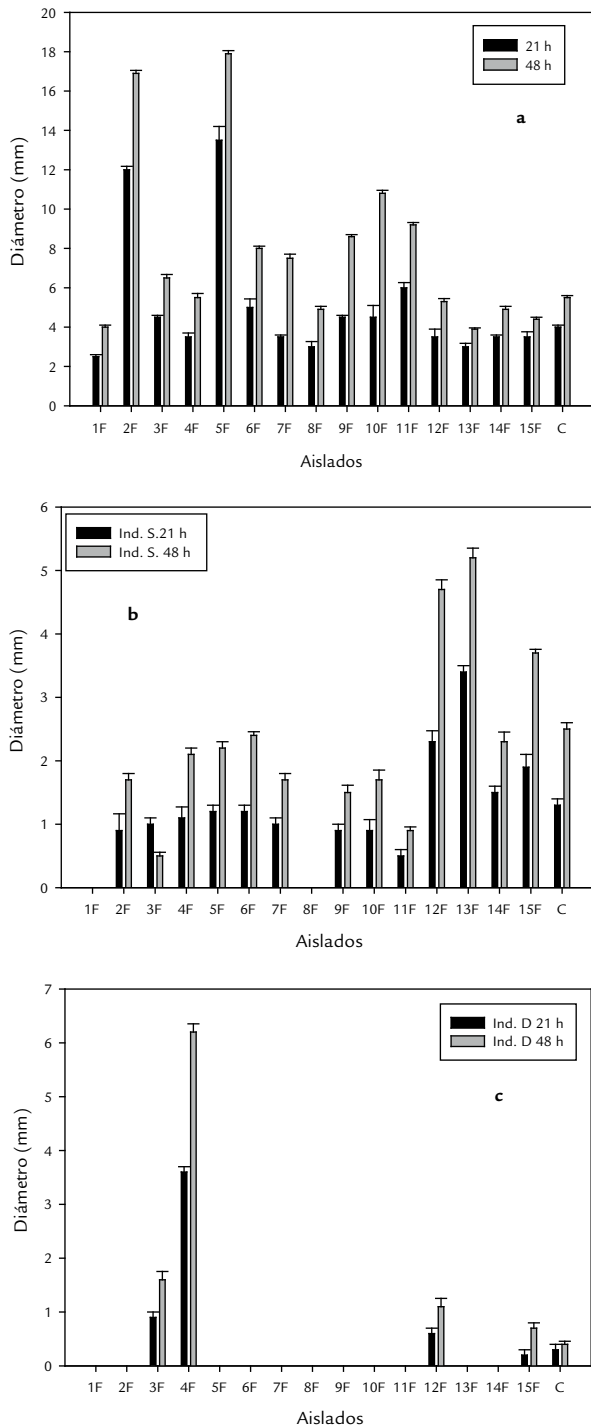
De acuerdo con los resultados obtenidos en la tabla 2, el 46,6 % de los aislados mostró una actividad alta ++ (cuando el crecimiento superó los 7 mm), 6F, 9F, 10F y 11F mostraron

**Tabla 1.** Características morfológicas de los aislamientos bacterianos en rizósfera de *Lippia palmeri*.

Aislamiento Clave/ identificación	Parte analizada y medio de cultivo	Tiempo (h) de aparición y formación colonial/ 1ª vez	NaCl (M)	T °C de aisla- miento	Color	Consistencia	Apariencia	Borde	Elevación	(h)/ Fase de Meseta	TG	Forma colonia
1F	R/a	43	0	35	crema	cremosa	húmeda	liso	convexa	48	-	circular
2F	R/a	43	0.25	35	crema	viscosa	húmeda	ondulado	convexa	24	-	irregular
3F	R/a	43	0.5	35	amarillo	dura	seca	ondulado	papilada	48	-	irregular
4F	SR/r	120	0	35	blanquecino	viscosa	húmeda	liso	convexa	48	-	circular
5F	SR/r	120	0.5	35	crema	viscosa	húmeda	ondulado	convexa	24	-	rizoide
6F	SR/r	120	0.75	35	crema	viscosa	húmeda	ondulado	convexa	24	-	irregular
7F	R/a	43	0	45	blanquecino	viscosa	húmeda	ondulado	convexa	24	-	irregular
8F	R/a	43	0.25	45	blanquecino	cremosa	húmeda	liso	convexa	48	-	circular
9F	R/a	43	0.5	45	crema	viscosa	húmeda	rizado	convexa	24	+	rizoide
10F	R/a	43	0.75	45	crema	viscosa	húmeda	liso	convexa	24	+	irregular
11F	SR/r	120	0.75	45	crema	viscosa	húmeda	rizado	convexa	24	+	rizoide
12F	R/a	43	0.25	45	amarillo	dura	seca	ondulado	papilada	48	-	circular
13F	R/a	43	0.25	45	crema	cremosa	húmeda	liso	convexa	48	-	circular
14F	R/a	43	0.25	35	crema	cremosa	húmeda	ondulado	elevada	24	+	irregular /circular
15F	SR/r	120	0	35	amarillo	dura	seca	ondulado	umbilicada	48	-	irregular

TG: Tinción de Gram; SR: suelo rizosférico; R: raíz; r: Rennie; a: Ashby; /FM: Tiempo transcurrido para alcanzar la fase de meseta en el crecimiento bacteriano.

desarrollos significativos a las 48 h con mediciones arriba de los 8 mm (Fig. 1). El 64,4 % mostró una actividad moderada (+), con un crecimiento colonial que no superó los 6 mm (Fig. 1). En la solubilización de fosfatos (SF), la actividad alta fue en los aislados (12F,13F y 15F) (Tabla 2 y Fig. 1b),



**Figura 1.** Colonias bacterianas aisladas de Orégano (*L. palmeri*) sobre medio Rennie, para la prueba de fijación de nitrógeno. a) solubilización de fosfatos. b) y producción de sideróforos. c) mostrando promedios de diámetro de crecimiento radial colonial a las 21 y 48 h de incubación. Barras en columnas indican desviación estándar

resultado que se puede apreciar con valores numéricos altos en comparación de los restantes aislados en la Figura 2a y 2b.

Por su parte en la actividad biológica de Producción de sideróforos (PS), sólo se mostró actividad en cuatro aislados (Tabla 2), sobresaliendo el aislado con clave 4F, con valores significativos vs aislados activos (Fig. 1c). Cabe indicar que en las tres pruebas biológicas. Aquellos aislados con valores superiores indicados previamente, superaron a los controles utilizados para las pruebas biológicas (*Azospirillum halopraeferens* para FN y *Bacillus subtilis* 1118a). La caracterización mediante el gen 16S ribosomal arrojan que, de los microorganismos bacterianos aislados, y con base a las propiedades biológicas evaluadas, fueron selectos el 3F, 6f y 10F, correspondiendo a *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*, respectivamente (Tabla 2).

En la prueba de germinación, se pudo observar que la salinidad decremento los porcentajes de germinación (Tabla 3). No obstante, el porcentaje final de la germinación no fue favorecido por el AG<sub>3</sub> y *Bacillus amyloliquefaciens* en salinidad inferiores a 0,06M de NaCl. Ésta variable fue influenciada positivamente por el inoculante bacteriano y AG<sub>3</sub> en la más alta salinidad estudiada (0,12 M de NaCl). Este influjo fue reflejado positivamente en la Tasa de Germinación, apreciándose que la velocidad de la germinación aumenta por la halobacteria *B. amyloliquefaciens*, reflejándose principalmente en la germinación bajo condiciones de salinidad. Asimismo, el efecto favorable por el inoculante y el AG<sub>3</sub>, fueron positivamente con  $p < 0,05$ , en la longitud radicular, superando la halobacteria al control y al AG<sub>3</sub> en un 100 y 70 %, respectivamente, a 0 M de NaCl, mientras que a 0,06 y 0,12 M, fue en un 35 y 60 % respectivamente.

## DISCUSIÓN

Las zonas áridas adolecen de factores abióticos que agudizan una agricultura convencional. Las altas temperaturas, los bajos contenidos de materia orgánica aunado a una intrusión salina figuran son los principales causantes de una agricultura improductiva, y el noroeste de México no es omiso a estos factores. Para contrarrestar lo anterior, en una agricultura alemana a los sistemas costeros, entre las alternativas se propone promover cultivos tolerantes a la salinidad como el orégano, que últimamente resulta atractivo principalmente para comunidades ubicados en el litoral costero, entre ellas la comunidad indígena COMCAAC en el estero Santa Rosa, Bahía de Kino, Sonora. Entre otras alternativas se encuentran los biofertilizantes, sobre todos aquellos que tengan la capacidad de tolerar la salinidad y altas temperaturas que prevalecen en el tipo de ambientes donde se produce orégano.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, revelan la gran biodiversidad de microorganismos capaces de fijar N<sub>2</sub> atmosférico, solubilizar fosfatos y producir sideróforos asociados a la raíz y suelo rizosférico de *L. palmeri* silvestre presente en el estero costero; microorganismos que deben

**Tabla 2.** Actividad biológica asociadas a la promoción de crecimiento de halobacterias aisladas de raíz y suelo rizosférico de *Lippia palmeri* e identificación molecular mediante el gen 16Sr.

Cepas	Actividad biológica			Identificación molecular			
	Fijación de nitrógeno (FN)	Producción de Sideróforos (PS)	Solubilización de fosfatos (SF)	GenBank/GB	Nombre	Score	Identidad (%)
1F	+	-	-				
2F	++	-	+				
3F	+	+	+	NR041455.1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1398	99
4F	+	++	+				
5F	++	-	+				
6F	++	-	+	NR102783.2	<i>Bacillus subtilis</i>	898	99
7F	++	-	+				
8F	+	-	-				
9F	++	-	+				
10F	++	-	+	NR118996.1	<i>Bacillus licheniformis</i>	928	99
11F	++	-	+				
12F	+	+	++				
13F	+	-	++				
14F	+	-	+				
15F	+	+	++				

FN: Actividad nula (-) cuando no se presentó crecimiento colonial bacteriano; como actividad moderada (+) cuando se presentó crecimiento de 0-7 mm y como actividad alta (++) cuando el crecimiento superó los 7 mm. Técnica desarrollada por triplicado.

SF y PS: Actividad nula (-) cuando no se presentó crecimiento; como actividad moderada (+) con crecimiento de 0-3 mm y como actividad alta (++) cuando el crecimiento superó los 3 mm.

tener la capacidad halotolerante pues habitan en suelos con características físico-químicas con concentraciones de sales y pH altos, en comparación de aquellos requeridos para el desarrollo de cultivos agrícolas. Los estudios con halobacterias promotoras del crecimiento de plantas van en aumento, debido a las múltiples bondades obtenidas, la capacidad de adaptación en medios desfavorables y la increíble respuesta de su metabolismo con la simbiosis de una amplia gama de vegetales. Bondades que favorecen al desarrollo de las plantas mediante la habilidad de reducir el nitrógeno atmosférico a amonio, a través de la síntesis de un complejo enzimático denominado nitrogenasa (Ahemad y Kibret, 2014; Rincon-Molina *et al.*, 2020), resultado que fue corroborado en presente estudio con las técnicas de actividad biológica. De manera similar a la capacidad de desarrollarse en medios libres de la fuente de Nitrógeno, los resultados del estudio arrojaron que las cepas obtenidas pudieron solubilizar (acidificar) el medio SRS, tornándolo de color amarillo brillante, la cual se evalúa cualitativamente por observación visible y medición del halo de solubilización, halo que es producto de la acidificación del medio por los metabolitos secundarios (ácidos orgánicos) producidos por las colonias bacterianas (Schwyn y Neilands, 1987).

Los ácidos orgánicos, tienen entre otras funciones actuar como quelantes de los cationes de calcio ( $Ca^{+2}$ ) principalmente; sin embargo, también son relevantes para Fe, Al y Mg que acompañan la liberación de fosfatos a partir de compuestos fosfáticos insolubles (Goswami *et al.*, 2014). Con relación a la prueba de secreción de sideróforos, se pudo observar que no se encontró actividad en más del 50 % de los aislados, sin embargo y con base a la Tabla 2, los cuatro microorganismos con actividad positiva mostraron moderada y alta actividad en esta prueba (4F). Actividades que rebasaron a los controles utilizados en el presente estudio y que muestran que aparentemente estas bacterias son capaces de liberar sustancias quelantes (sideróforos) que atraen el hierro hacia la rizósfera, donde puede ser absorbido por la planta (Radzki *et al.*, 2013; Ahmed y Holmström, 2014; Mancilla *et al.*, 2017). Además, estos sideróforos son secretados por las bacterias favoreciendo la competitividad e inhibiendo el crecimiento de otros microorganismos, debido a su acción antibiótica que impide el crecimiento de patógenos limitando el hierro disponible para ellos (Shen *et al.*, 2013).

Por otra parte, con relación al estudio de germinación bajo las condiciones evaluadas, se pudo observar que resultados similares se han obtenido para otras plantas (Puente *et al.*, 1999; Corella y Ortega, 2013; Costerousse

**Tabla 3.** Efecto en la germinación (%), tasa de germinación y longitud radicular de *Lippia palmeri* por la inoculación por *Bacillus amyloliquefaciens* en semilla de orégano vs Acido giberélico, bajo condiciones de salinidad.

Tratamientos	NaCl (M)	Germinación (%)	Longitud radicular (mm)	Tasa de germinación		
				Inicio de la germinación (d)	Días en que se logró el % más alto de germinación	Término de la germinación (d)
Agua destilada	0	35,00 ±3 a	3,40±0.4c	5	18-22	26
Agua destilada	0,06	12,5 ±3 c	3,34±0.4c	10	25-28	28
Agua destilada	0,12	5,00 ±3 d	3,55±0.3bc	12	12	12
AG3	0	37,5 ±4 a	3,80±0.9bc	2	13-25	15
AG3	0,06	32,5 ±4 a	2,59±0.8d	4	15-18	18
AG3	0,12	22,5 ±2 b	2,56±0.4d	6	16-19	19
B. a.	0	22,5 ±5 b	6,25±1.2a	3	14-18	30
B. a.	0,06	7,50 ±6 c	4,60±1.4ab	7	15-18	18
B. a.	0,12	15,00 ±2 bc	3,65±1.5bc	5	20-25	26

AG3: Ácido giberélico a 200 ppm.; B.a.: *Bacillus amyloliquefaciens*; d: días. Las medias con letras iguales en una columna para cada factor no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ); ± desviación estándar.

*et al.*, 2018) y que, aunque los ensayos se hayan efectuado con otras plantas y otros microorganismos benéficos, algunos inhiben los efectos sobre la germinación (Hanslin y Eggen, 2005; González *et al.*, 2017; Tahami *et al.*, 2017). Sin embargo, otros estudios muestran efectos positivos con este tipo de microorganismo (Puente y Basham, 1993) que también coinciden con los resultados del presente estudio. Los efectos positivos de *Bacillus amyloliquefaciens* observados en el presente estudio se deben aparentemente a la producción de sustancias promotoras de crecimiento según lo reportado en otros estudios (Mishra *et al.*, 2017; Rajput *et al.*, 2018; Khan *et al.*, 2019; Kutlu *et al.*, 2019; Ribeiro y Simoes, 2019).

## CONCLUSIONES

El presente estudio, evidencia la presencia de microorganismos que se desarrollan en zonas áridas como halotolerantes y asociados a *Lippia palmeri* en los esteros de Santa Rosa de la Comunidad Indígena COMCAAC; 15 aislados presentaron la capacidad de crecer en medios de cultivo libre de una fuente de nitrógeno como un indicativo a la fijación de nitrógeno, además de tener actividad para solubilizar fosfatos y producir sideróforos. La identificación por el gen ribosomal 16S indican la presencia de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* y *Bacillus licheniformis*. La inoculación de *Bacillus amyloliquefaciens*, en la etapa de germinación como fase inicial, muestra resultados significativos con  $p < 0,05$ , en la longitud radicular en presencia de NaCl. Este es el primer informe de *Bacillus amyloliquefaciens* como una bacteria fijadora de nitrógeno asociada a *Lippia palmeri*. Estudios relacionados con la (co-inoculación) promoción vegetal deben ser considerados en posteriores estudios considerando a los microorganismos caracterizados en el presente estudio (*Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*).

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la beca doctoral por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con clave/registro: 234741; asimismo al proyecto institucional de Interacción planta microorganismo y registrado ante la Universidad de Sonora- Departamento de Agricultura y Ganadería y División de Ciencias Administrativas Contables y Agropecuarias y apoyado por el Conacyt-Conafor y Gobierno del estado de Sonora. Un agradecimiento especial a responsables y técnicos laboratoristas del Laboratorio de Biotecnología en el CIBNOR, La Paz, B.C.S. Se ofrece el presente trabajo en memoria del Dr. Cándido Márquez Hdez. QEPD. Profesor investigador de Cs<sup>í</sup> Biológicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango.

## CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses

## REFERENCIAS

- Aguilar-Murillo X, Valle G, González G, Murillo B. Guía de Cultivo de Orégano. Ed. S.C. La Paz, Baja California Sur, México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste; 2013. p. 106.
- Ahemad M, Kibret M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. J King Saud Univ. Science. 2014;26(1):1-20. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- Ahmed E, Holmström SJM. Siderophores in environmental research: Roles and applications. Microb Biotechnol. 2014;7(3):196-208. Doi: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12117>
- Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. J Microbiol Methods.



- 2003;55(3):541-555. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.009>
- Barrow GI, Feltham RKA. Cowan, Steel's Manual for the identification of medical bacteria. 3 Ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1993. p. 331.
- Borboa-Flores J, Wong F, Rodríguez F, Hernández L, Reyes J, Rueda E. Halobacterias promotoras del crecimiento vegetal en *Brassica oleracea* en el noroeste de México. *Rev Mex Cienc Agríc.* 2016;17:3509-3519.
- Carrillo A, Puente E, Castellanos T, Bashan Y. Aplicaciones biotecnológicas de Ecología Microbiana. Manual de Laboratorio. La Paz, B.C.S., México: Pontificia Universidad Javeriana Santa Fe de Bogotá, Colombia y Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste; 1998. p. 51.
- Corella R, Ortega M. Importancia del aceite esencial y la producción de orégano *Lippia palmeri* Watson en el estado de Sonora. *Biotecnia.* 2013;15(1):57-64.
- Costerousse B, Schonholzer-Mauclair L, Frossard E, Thonar C. Identification of Heterotrophic Zinc Mobilization Processes among Bacterial Strains Isolated from Wheat Rhizosphere (*Triticum aestivum* L.) *Appl Environ Microbiol.* 2018;84:1-16. Doi: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01715-17>
- García-Pérez E, Castro F, Gutiérrez J, García S. Revisión de la producción, composición fitoquímica y propiedades nutraceuticas del orégano mexicano. *Rev Mex Cienc Agríc.* 2012;3(2):339-353.
- González A, Almaraz J, Ferrera R, Rodríguez M, Taboada O, Trinidad A, Alarcón A, Arteaga R. Caracterización y selección de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de chile poblano (*Capsicum annuum* L.). *Rev Int Contam Ambient.* 2017;33(3)463-474. Doi: <http://dx.doi.org/10.20937/RICA.2017.33.03.09>
- Goswami D, Dhandhukia P, Patel P, Thakker JN. Screening of PGPR from saline desert of Kutch: Growth promotion in *Arachis hypogea* by *Bacillus licheniformis* A2. *Microbiol Res.* 2014;169(1):66-75. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.07.004>
- Gulzar S, Khan MA. Seed germination of a halophytic grass *Aeluropus lagopoides*. *Ann Bot.* 2001;87 (3):319-324. Doi: <https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1336>
- Hanslin HM, Eggen T. Salinity tolerance during germination of seashore halophytes and salt-tolerant grass cultivars. *Seed Sci Res.* 2005;15(01):43-50. Doi: <https://doi.org/10.1079/SSR2004196>
- ISTA. International Rules for Seed Testing. Bassersdorf, Switzerland: International Seed Testing Association; 2016.
- Javor JB. Growth potential of halophilic bacteria isolated from solar salt environments: carbon sources and salt requirements. *Appl Environ Microbiol.* 1984;48:352-360. Doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.48.2.352-360.1984>
- Jiménez-Gómez A, Flores-Félix JD, García-Fraile P, Mateos PF, Menéndez E, Velázquez E, *et al.* Probiotic activities of *Rhizobium laguerreae* on growth and quality of spinach. *Sci Rep.* 2018;8 :1-10. Doi: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-18632-z>
- Khan MA, Ullah I, Waqas M, Hamayun M, Khan A, Asaf S, *et al.* Halo-tolerant rhizospheric *Arthrobacter woluwensis* AK1 mitigates salt stress and induces physio-hormonal changes and expression of GmST1 and GmLAX3 in soybean. *Symbiosis.* 2019; 77:9-21. Doi: <https://doi.org/10.1007/s13199-018-0562-3>
- Kutlu M, Cakmakci R, Hosseinpour A, Karagöz H. The use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)'s effect on essential oil rate, essential oil content, some morphological parameters and nutrient uptake of Turkish oregano. *Appl Ecol Env Res.* 2019; 17:1641-1653. Doi: [http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1702\\_16411653](http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1702_16411653)
- Lastiri Hernández M, Álvarez Bernal D, Soria Martínez LH, Ochoa Estrada S, Cruz Cárdenas G. Efecto de la salinidad en la germinación y emergencia de siete especies forrajeras. *Rev Mex Cienc Agríc.* 2017;8(6):1245-1257. Doi: <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i6.291>
- Loredo-Osti C, López L, Espinosa D. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *Terra Latinoam.* 2004;22(2):225-239.
- MacFaddin J. *Biochemical tests for identification of medical bacteria.* 3 Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000. p.912.
- McCabe KM, Zhang YH, Huang BL, Wagar EA, McCabe ERB. Bacterial species identification after DNA amplification with a universal primer pair. *Mol Genet Metab.* 1999;66(3):205-211. Doi: <https://doi.org/10.1006/mgme.1998.2795>
- Mahanty T, Bhattacharjee S, Goswami M, Bhattacharyya P, Das B, Ghosh A, *et al.* Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. *Environ Sci Pollut Res.* 2017;24(4)3315-3335. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8104-0>
- Mancilla A, Almaraz J, Ferrera R, Rodríguez M, Taboada O, Trinidad A, *et al.* Caracterización y selección de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de chile poblano (*Capsicum annuum* L.) *Rev Int Contam Ambie.* 2017;33(3)463-474. Doi: <https://dx.doi.org/10.20937/RICA.2017.33.03.09>
- Manovsky E. *Identificación de bacterias fitopatógenas.* México, D.F.: Universidad Autónoma Chapingo; 1982. p. 84.
- Mishra B, Dubey P, Aishwath O, Kant K, Sharma Y, Vishal M. Effect of plant growth promoting rhizobacteria on coriander (*Coriandrum sativum*) growth and yield under semi-arid condition of India. *Indian J Agr Sci.* 2017; 87:607-12.
- Orona-Castillo I, Salvador A, Espinoza J, Vázquez C. Recolección y comercialización del orégano (*Lippia* spp) en el semi-desierto mexicano, un caso de estudio: reserva ecológica municipal sierra y cañón de Jimulco, México. *Rev Mex de Agroneg.* 2017; 41:684-695.

- Pathak D, Kumar M. Microbial inoculants as biofertilizers and biopesticides. Vol 1. Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity. Nueva Delhi: Springer India. 2016. p. 197-209. Doi: <https://dx.doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5>
- Puente M, Bashan Y. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* strains on germination and seedlings growth of the giant columnar cardon cactus (*Pachycerus pringler*). Symbiosis 1993; 15:49-60.
- Puente M, Holguin G, Glick BR, Bashan Y. Root-surface colonization of black mangrove seedlings by *Azospirillum halopraefers* and *Azospirillum brasilense* in seawater. FEMS Microbiol Ecol. 1999; 29(3):283-292. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00619.x>
- Radzki W, Gutiérrez Mañero FJ, Algar E, Lucas García JA, García-Villaraco A, Ramos B. Bacterial siderophores efficiently provide iron to iron-starved tomato plants in hydroponics culture. ALJMAO. 2013; 104:321-330. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9954-9>
- Rajput L, Imran A, Mubeen F, Hafeez F. Wheat (*Triticum aestivum* L.) growth promotion by halo-tolerant PGPR-consortium. Soil Environ. 2018;37:178-189. Doi: <http://dx.doi.org/10.25252/SE/18/61522>
- Renganathan P, Borboa-Flores J, Rosas-Burgos EC, Cárdenas-López JL, Murillo-Amador B, Ortega-García J, Rueda-Puente EO. Inoculación de halobacterias fijadoras de nitrógeno en la contribución a la tolerancia al estrés salino en frijol tepary (*Phaseolus acutifolius*). Rev Mex Cienc Agríc. 2018; 2:4289- 4300. Doi: <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i20.998>
- Rennie RJ. A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soil. Can J Microbiol. 1981; 27:8-14. Doi: <https://doi.org/10.1139/m81-002>
- Ribeiro M, Simoes M. Advances in the antimicrobial and therapeutic potential of siderophores. Environ Chem Lett. 2019;17(4):1485-1494. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00887-9>
- Rincon-Molina CI, Martínez-Romero E, Ruiz-Valdiviezo VM, Velazquez E, Ruiz-Lau N, Rogel-Hernández MA, et al. Plant growth-promoting potential of bacteria associated to Pioneer plants from an active volcanic site of Chiapas (México). Appl Soil Ecol. 2020;146:1-10. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103390>
- Romero-Perdomo F, Abril J, Camelo M, Moreno-Galván A, Patrana I, Rojas-Tapias D, et al. *Azotobacter chroococcum* as a potentially useful bacterial biofertilizer for cotton (*Gossypium hirsutum*): Effect in reducing N fertilization. Rev Argent Microbiol. 2017;49(4):377-383. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.04.006>
- Rueda-Puente E, Villegas J, Gerlach L, Tarazón M, Murillo B, García J, et al. Efecto de la inoculación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal sobre la germinación de *Salicornia bigelovii*. Terra Latinoam. 2009;27(4):345-354.
- Rueda-Puente E, Castellanos T, Díaz J, Preciado P, Almaguer G. Bacterial community of rhizosphere associated to the annual halophyte *Salicornia bigelovii* (Torr.). Terra Latinoam. 2010;28:345-353.
- Rueda Puente E, Beltrán F, Ruíz F, Valdez R, García J, Ávila N, et al. Opciones de manejo sostenible del suelo en zonas áridas: aprovechamiento de la halófito *Salicornia bigelovii* (Torr.) y uso de biofertilizantes en la agricultura moderna. Trop Subtrop Agroecosystems. 2011;13:157-167.
- Santoro MV, Capellari LR, Giordano W, Banchio E. Plant growth-promoting effects of native *Pseudomonas* strainson *Mentha piperita* (peppermint): an in vitro study. Plant Biol. 2015;17(6):1218-1226. Doi: <https://doi.org/10.1111/plb.12351>
- Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal Biochem. 1987;160(1):47-56. Doi: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)
- Shen X, Hu H, Peng H, Wang W, Zhang X. Comparative genomic analysis of four representative plant growth-promoting rhizobacteria in *Pseudomonas*. BMC Genomics. 2013;14:271. Doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-271>
- Söğüt S, Çiğ F. Determination of the effect of plant growth promoting bacteria on wheat (*Triticum aestivum* L.) development under salinity stress conditions. Appl Ecol Env Res. 2019;17:1129-1141. Doi: [http://dx.doi.org/10.15666/aer/1701\\_11291141](http://dx.doi.org/10.15666/aer/1701_11291141)
- Sokal RR, Rohlf J. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. 3 ed. New York: Editorial Dover; 1995. p. 353.
- Tahami MK, Jahan M, Khalilzadeh H, Mehdizadeh M. Plant growth promoting rhizobacteria in an ecological cropping system: A study on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil production. Ind Crops Prod. 2017;107: 97-107. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.020>
- Villegas-Espinoza JA, Rueda-Puente EO, Murillo-Amador B, Puente ME, Ruiz-Espinoza F, Zamora-Salgado S, et al. Bacterias promotoras de crecimiento de plantas autóctonas y su efecto en *Prosopis chilensis* (Molina) Stunz. Rev Mex Cienc Agríc. 2014;5(6):1041-1053. Doi: <https://doi.org/10.29312/remexca.v5i6.888>
- Vital López L, Cruz-Hernández MA, Fernández Dávila S, Mendoza Herrera A. Diversidad bacteriana en raíces de maíz híbrido convencional y genéticamente modificado. Phytion. 2015;84(1):233-243. Doi: <https://doi.org/10.32604/phyton.2015.84.233>