

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



**Caracterización de bacterias con actividad de ACC desaminasa,
como promotoras del crecimiento en *Lactuca sativa* L. (Lechuga)
bajo estrés salino**

TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

Jesica María Ramírez Villalobos

LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JAL., JULIO DE 2015

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS



**Caracterización de bacterias con actividad de ACC desaminasa,
como promotoras del crecimiento en *Lactuca sativa* L. (Lechuga)
bajo estrés salino**

TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

Jesica María Ramírez Villalobos

DIRECTOR

Dr. Gil Virgen Calleros

ASESOR

Dra. Josefina Casa Solís

LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JAL., JULIO DE 2015



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología

C. JESSICA MARÍA RAMÍREZ VILLALOBOS.
PRESENTE

Manifestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título: **"Caracterización de bacterias con actividad de ACC desaminasa, como promotoras del crecimiento en *Lactuca sativa* L. (Lechuga) bajo estrés salino."**, para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director de dicho trabajo: **Dr. Gil Virgen Calleros** y como asesor a **Dra. Josefina Casas Solís**. Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 9 de junio de 2015

DRA. GEORGINA ADRIANA QUIROZ ROCHA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

COMITE DE
TITULACION



DRA. CLAUDIA AURORA URIBE MÚ.
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Dra. Georgina Adriana Quiroz Rocha.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 CUCBA.
PRESENTE

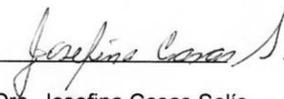
Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad **TESIS E INFORMES**, opción **TESIS** con el título: **“Caracterización de bacterias con actividad de ACC desaminasa, como promotoras del crecimiento en *Lactuca sativa* L. (Lechuga) bajo estrés salino”** que realizó la pasante **C. Jesica María Ramírez Villalobos** con número de código **206676065** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente
 Las Agujas, Zapopan, Jal.
 22 de Junio 2015

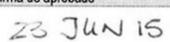
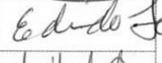
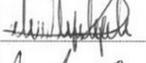
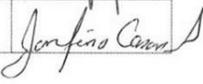


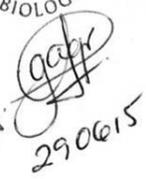
 Dr. Gil Virgen Calleros
 Director


 Dra. Josefina Casas Solís
 Asesor

COMITE DE
 TITULACION



Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dr. José Pedro Castruita Domínguez		23 JUN 15
Dr. Eduardo López Alcocer		24 Junio 2015
M.C. Leticia Maya Zepeda		23 / junio / 15
Supl. Dra. Josefina Casas Solís		23 / junio / 15


 290615

“Si de todos los organismos creados por Dios los más pequeños y aparentemente menos útiles fueran suprimidos, la vida se tornaría imposible, ya que el regreso a la atmósfera y al reino mineral de todo lo que dejó de vivir sería bruscamente suprimido”.

Luis Pasteur

“El investigador sufre las decepciones, los largos meses pasados en una dirección equivocada, los fracasos. Pero los fracasos son también útiles, porque, bien analizados, pueden conducir al éxito”.

Alexander Fleming

DEDICATORIAS

A mis padres por su apoyo incondicional durante toda mi formación personal y académica. Gracias a ellos, hoy soy una mejor persona.

A Roberto por acompañarme y apoyarme en este proceso tan largo, darme ánimos, consejos y recordarme que las cosas que valen la pena no son fáciles de conseguir.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento a la Universidad de Guadalajara ya que a través de esta institución pude concluir mis estudios de licenciatura.

De manera especial expreso mi más sincero agradecimiento a la Dra. Josefina, por ser un pilar en mi formación en el área de microbiología, por transmitirme de forma desinteresada sus valiosos conocimientos y su gusto por la investigación. Gracias por su amistad, paciencia y apoyo. Con su ayuda y asesoría este proyecto pudo llegar a su fin.

Al Dr. Gil, por darme la oportunidad y su confianza para llevar a cabo este proyecto. Y por apoyarme en diferentes etapas de mi formación académica.

Mtra. Martha por brindarme su amistad, sus preciados y útiles consejos, además de su apoyo constante durante todo este proceso.

Al Dr. Iñiguez y al Ing. Juan del Departamento de Madera Celulosa y Papel, por su invaluable aporte en la parte experimental.

Mtro. Gabriel por ofrecerme su ayuda y conocimientos que contribuyeron a mi formación como bióloga y a la culminación de este proyecto.

Mtra. Verónica por su orientación en la parte estadística.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Microbiología Claudia, Milagros, Rafa, Irais, Gustavo, Sara y Ariana por su ayuda, y por todos los momentos que compartimos, gracias a ellos las largas horas en el laboratorio fueron más llevaderas y placenteras.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Fitopatología en especial a Liz, Maricela y Aby por su amistad y por toda la ayuda que me brindaron.

A mis sinodales M.C. Leticia Maya, Dr. Pedro Castruita y Dr. Eduardo López por sus valiosas sugerencias y revisión del documento.

A mi tutora la Dra. Julia por su apoyo incondicional a lo largo de la carrera.

CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Salinidad	2
2.2. Origen de la salinidad del suelo	2
2.3. Suelos salinos	4
2.4. Efecto de la salinidad en las plantas	4
2.5. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal	7
2.6. Mecanismos de PGPB en condiciones salinas	10
2.7. Etileno y ACC desaminasa	13
2.8. El cultivo de lechuga	17
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
4. JUSTIFICACIÓN	21
5. OBJETIVOS	22
5.1. Objetivo general	22
5.2. Objetivos particulares	22
6. HIPÓTESIS	23
7. MATERIALES Y MÉTODOS	24
7.1. Muestras de suelo y rizósfera	24
7.2. Aislamientos bacterianos	24
7.3. Actividad de ACC desaminasa	25
7.4. Prueba de tolerancia a la salinidad	25
7.5. Efectividad de bacterias ACC desaminasa	26
7.5.1. Ensayo de germinación <i>in vitro</i>	26
7.5.2. Crecimiento vegetal bajo condiciones salinas	26
7.6. Capacidades de promoción de crecimiento <i>in vitro</i>	27
7.6.1. Solubilización de fosfatos	27
7.6.2. Producción de índoles totales	28
7.7. Caracterización y determinación de cepas bacterianas	29

7.7.1. Caracterización morfológica	29
7.7.2. Resistencia a antibióticos	29
7.7.3. Caracterización bioquímica e identificación	30
7.7.4. Curva de crecimiento	30
7.8. Diseño experimental y análisis estadístico	31
8. RESULTADOS	32
8.1. Muestras de suelo y rizósfera	32
8.2. Aislamientos bacterianos y actividad ACC desaminasa	32
8.3. Prueba de tolerancia a la salinidad	34
8.4. Efectividad de bacterias ACC desaminasa	36
8.4.1. Ensayo de Germinación in vitro	36
8.4.2. Crecimiento vegetal bajo condiciones salinas	37
8.5. Capacidades de promoción de crecimiento in vitro	40
8.5.1. Solubilización de fosfatos	40
8.5.2. Producción de índoles totales	40
8.6. Caracterización y determinación de cepas bacterianas	42
8.6.1. Caracterización morfológica	42
8.6.2. Resistencia a antibióticos	43
8.6.3. Caracterización bioquímica e identificación	45
8.6.4. Curva de crecimiento	46
9. DISCUSIÓN	48
10. CONCLUSIONES	55
11. PERSPECTIVAS	56
12. BIBLIOGRAFÍA	57
13. ANEXOS	70

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N°		Página
1	Sitios de colecta de muestras de suelo y rizósfera.	24
2	Determinación de CE y pH de las muestras en base a las normas NMX-AA-093-SCFI-2001 y NMX-AA-008-SCFI-200.	32
3	Cepas aisladas de muestras de suelo y rizósfera que producen ACC desaminasa.	33
4	Cepas aisladas y productoras de ACC desaminasa por tipo de muestra.	34
5	Prueba de tolerancia a NaCl en cepas ACC desaminasa positivas.	35
6	Tratamientos utilizados para el experimento de crecimiento vegetal en condiciones salinas.	37
7	Altura de tallos a los días 1, 10, 20, 30 y 40 a partir del trasplante.	39
8	Cuantificación de clorofila total a los 20, 30 y 40 días.	39
9	Peso fresco y seco de lechugas en los días 20, 30 y 40.	39
10	Solubilización de fosfatos insolubles.	40
11	Concentración de AIA en ppm.	41
12	Morfología colonial de las cepas SR2-6 y SS2-10.	42
13	Morfología celular y tinción de Gram de las cepas SR2-6 y SS2-10.	43
14	Perfil de sensibilidad antimicrobiana de las cepas SR2-6 y SS2-10.	44
15	Pruebas bioquímicas convencionales.	45
16	Resultados de identificación con el sistema Api Staph.	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°		Página
1	PGPB incluye bacterias que interaccionan con las plantas de diferentes formas.	7
2	Mecanismos para la disminuir el efecto inhibitorio de la sal en el crecimiento y el desarrollo de las plantas por PGPB.	10
3	El etileno participa en diferentes procesos durante el crecimiento y desarrollo de una planta.	13
4	La producción de etileno en plantas está en función del tiempo después de un estrés ambiental.	15
5	Modelo que describe la función de la enzima ACC desaminasa en la promoción del crecimiento de las plantas.	16
6	Cepas con producción de la enzima ACC desaminasa.	33
7	Porcentaje de bacterias ACC desaminasa positivas y negativas.	34
8	Cepas crecidas en medio nutritivo adicionado con 13% de NaCl.	35
9	Cepas de suelo y rizósfera resistentes a más de 9% de NaCl.	36
10	Número de semillas germinadas a la concentración 80 mM de NaCl a los 4 y 7 días.	37
11	Tratamientos T1, T2, T3, T4 y T5 en condiciones salinas.	38
12	Curva patrón de AIA (técnica de Salkowsky).	41
13	Curva patrón de AIA y línea de tendencia.	41
14	Colonias de las cepas seleccionadas.	42
15	Cocos Gram positivos de las cepas seleccionadas (Objetivo 100X).	43
16	Antibiogramas después de 24 h de incubación en donde se observan los halos de inhibición.	44
17	Absorbancia de cepas cultivadas en CST a 37 °C por 32 h.	47
18	Número de UFC Log ₁₀ de cepas cultivada en CST a 37 °C por 32 h.	47

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N°		Página
1	Medios de cultivo.	70
2	Preparación de la solución Steiner.	72
3	Diámetro del halo de inhibición en mm para establecer puntos de corte.	73
4	Parámetros de interpretación del sistema API® Staph (BioMérieux).	74
5	Análisis de varianza de la altura de tallos de lechuga a los días 1, 10, 20, 30 y 40 a partir del trasplante.	75
6	Análisis de varianza de la cuantificación de clorofila total en lechuga a los días 20, 30 y 40.	75
7	Análisis de varianza del peso fresco y seco de lechugas a los días 20, 30 y 40.	76
8	Análisis de varianza de la producción de AIA e índoles de las cepas SS2-10, SR2-6 y el control.	76
9	Diámetro en mm de los halos de inhibición de las cepas SR2-6 y SS2-10.	77

ABREVIATURAS

μL	Microlitros
ACC	Acido1-aminociclopropano-1-carboxílico
AIA	Ácido indol-3-acético
AN	Agar nutritivo
BAPEN	Bagazo de agave en Película Nutritiva
CE	Conductividad eléctrica
CN	Caldo nutritivo
CST	Caldo soya tripticaseina
dS	decisiemens
h	Hora
H_2O_2	Peróxido de hidrogeno
M	Molar
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetros
mS	milisiemens
nm	Nanómetros
O_2^-	Superóxido
PGPB	Plant Growth-Promoting Bacteria
ppm	Partes por millón
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
ton/ha	Toneladas por hectárea
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue caracterizar y evaluar el efecto de cepas bacterianas que contienen la enzima ACC desaminasa para promover el crecimiento de plantas de lechuga bajo condiciones salinas.

Las cepas utilizadas para esta investigación se aislaron de muestras de suelo y rizósfera colectadas en diferentes predios de Sayula, Jalisco y Tecomán, Colima. Se seleccionaron cinco cepas las cuales presentaron la actividad ACC desaminasa, crecimiento en medios de cultivo con altas concentraciones de NaCl y promoción de la germinación de semillas de lechuga bajo concentraciones de 80 mM de NaCl. Posteriormente, se determinó el efecto promotor de crecimiento vegetal bajo condiciones salinas, inoculando semillas de lechuga con las cepas seleccionadas. Para el experimento se implementó un sistema de hidroponía llamado “Bagazo de agave en Película Nutritiva” (BAPEN). Fue utilizada la solución nutritiva Steiner al 50% adicionada con 80 mM de NaCl. Se realizaron aplicaciones de la suspensión bacteriana desde la siembra de las semillas y hasta la cosecha cada 15 días. Las variables analizadas fueron altura, peso fresco, peso seco y clorofila total mediante un Spad 500. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos inoculados y sin inocular al momento de la cosecha. Sin embargo se observó una tendencia a aumentar todas las variables estudiadas con las cepas SR2-6 y SS2-10 con respecto al control. Los valores más bajos se obtuvieron con la cepa SR1-9 la cual redujo las variables de altura, peso fresco y seco al día de la cosecha. Las cepas SR2-6 y SS2-10 no solubilizaron fosfato, produjeron de 1.5 a 5.5 ppm de ácido indolacético y son potencialmente fijadoras de N₂. Estas cepas fueron identificadas taxonómicamente por medio del sistema API Staph como *Staphylococcus xylosus*.

1. INTRODUCCIÓN

Los suelos salinos constituyen un grave problema en la agricultura, debido a que suprimen el crecimiento de las plantas y su rendimiento en todo el mundo. En México, el problema de la salinidad se presenta fundamentalmente en las zonas áridas con riego y a lo largo de la costa. Se estima que la superficie afectada es del orden de 1 millón de ha (Serrato *et al.*, 2002).

El estrés causado por el exceso de sales, produce un incremento en la cantidad de etileno contenido en los tejidos vegetales, que puede inhibir el crecimiento vegetal debido a la síntesis autocatalítica del etileno y no a la acción directa del factor estresante, por esta razón los inhibidores de la acción del etileno pueden disminuir significativamente la severidad inducida por los factores de estrés (Siddiquee *et al.*, 2011; Gutiérrez, 2010; Glick *et al.*, 2007).

Se han buscado estrategias para disminuir el estrés salino en los cultivos. En este contexto se tienen reportes del uso de bacterias productoras de ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico,) desaminasa, que es una enzima que cataliza la conversión del ACC un precursor inmediato de la síntesis del etileno en plantas, en α -cetobutirato y amoníaco (Glick, 2005), que mitiga el estrés salino, al disminuir la cantidad de etileno (Karthikeyan *et al.*, 2012).

Las bacterias del suelo son capaces de degradar y utilizar el ACC que es exudado por los tejidos vegetales y es tomado por la ACC desaminasa localizada en el citoplasma de los microorganismos (Glick, 2005). Esta enzima ha sido reportada en numerosas especies microbianas de bacterias Gram negativas, bacterias Gram positivas, bacterias y hongos endófitos (Saleem, 2007). Por lo que el uso de esta enzima como complemento en la agricultura podría ser una herramienta importante para aumentar los rendimientos en los cultivos con altos niveles de salinidad (Glick, 2005).

2. ANTECEDENTES

2.1. Salinidad

La salinidad es el estrés abiótico más severo y la principal causa de daño para los cultivos (Velarde, 2009; Saharan & Nehra, 2011). La salinización altera las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, y en consecuencia su fertilidad (Falcón, 2002). Lo que ocasiona considerables pérdidas en el rendimiento de una amplia variedad de cultivos alrededor del mundo (Carranza *et al.*, 2009). Limita la productividad aproximadamente en un 6% de los terrenos agrícolas del mundo y en un 20% de los suelos con riego, lo que representa un 15% de las áreas cultivadas (Munns, 2005).

El término salinidad se refiere a la presencia en el suelo de una elevada concentración de sales que perjudican el desarrollo y crecimiento de los cultivos por su efecto tóxico y la disminución del potencial osmótico del suelo. Existen registros históricos de migraciones provocadas por la salinización del suelo cultivable, este fenómeno afecta a la humanidad desde el inicio de la agricultura (Leidi & Pardo, 2002).

En México, el problema de la salinidad se presenta fundamentalmente en las zonas áridas con riego, a lo largo de la costa y las cuencas cerradas que, a través de miles de años, han acumulado paulatinamente sales en el suelo. Se estima que la superficie afectada es del orden de 1 millón de ha (Serrato *et al.*, 2002).

2.2. Origen de la salinidad del suelo

La fuente original de donde provienen las sales del suelo y el agua, son los minerales que se encuentran formando las rocas que constituyen la corteza terrestre. La formación de las sales se realiza mediante el proceso de intemperización (hidrolisis-solución-oxidación y carbonatación, a veces precipitación) de las rocas, donde se liberan los minerales que con el tiempo constituirán los suelos (Rueda *et al.*, 2009). Los suelos con alto contenido de sales

tienen dos orígenes fundamentales, naturales y antropológicos (Szymańska *et al.*, 2013).

Las causas naturales pueden condicionar los procesos de salinización tales como: cercanía y la altura sobre el nivel del mar, la intemperización: erosión hídrica (los minerales presentes en las rocas, sedimentos y suelos producen sales minerales disueltas, cuya principal vía de desembocadura después de las lluvias son los océanos); erosión eólica (los vientos arrastran gran cantidad de sales a otras áreas). La presencia de períodos secos más largos, ya que cuando hay mayor evaporación de agua que precipitaciones, los suelos no pueden ser lavados, formándose áreas con alto contenido en sales, tal como sucede en las zonas áridas (Lamz & González 2013). Las propiedades físico-químicas del perfil del suelo, como son: la textura, la estructura, la porosidad, la permeabilidad, la capacidad de retención de humedad y de intercambio catiónico juegan un papel importante en la salinización. Los cambios climáticos mayores, como el calentamiento global que derrite los polos rápidamente y los huracanes, que pueden introducir a la tierra considerable cantidad de sales provenientes del mar (Velarde, 2009).

Las causas antropogénicas pueden ser: prácticas agrícolas incorrectas en el suelo, como el uso excesivo de fertilizantes químicos, la presencia de sales en los desechos animales, el mal manejo del agua para el riego, la extracción intensiva de aguas subterráneas y la utilización de estas para otros fines no relacionados con cuestiones agrícolas, provocan un incremento en el suelo de las sales solubles (Lamz & González, 2013; Velarde, 2009).

En resumen, todo proceso de salinización estará sujeto a la acumulación continua y constante de sales, y/o a que se sobrepase la capacidad natural del drenaje de los suelos, favoreciendo un desplazamiento de masas salinas en condiciones naturales o propiciadas por el hombre (Rueda *et al.*, 2009).

2.3. Suelos salinos

Los suelos salinos son aquellos que contienen elevada concentración de sales solubles que reducen el crecimiento de las plantas, con conductividad eléctrica (CE) en la pasta de saturación igual o mayor a 4 dS/m (equivalente a 40 mM NaCl) (Szymańska *et al.*, 2013) y un porcentaje de sodio intercambiable de menos del 15% (Lesmes *et al.*, 2007).

La solubilidad de las sales es una propiedad muy importante, a mayor concentración de sales disueltas, el efecto será más nocivo para los cultivos ya que dan lugar a soluciones salinas muy concentradas, en cambio, las sales poco solubles precipitan antes de alcanzar los niveles perjudiciales (Proaño *et al.*, 2004).

Se identifican como sales solubles todos aquellos compuestos químicos e inorgánicos más solubles que el sulfato de calcio (CaSO_4), cuya solubilidad es de 0.241 gramos en 100 mililitros de agua a 0 °C. Tal es el caso del cloruro de sodio (NaCl), que es 150 veces más soluble que el sulfato de calcio (Falcón, 2002), siendo esta sal, la causa más frecuente de salinidad en los suelos, aunque los suelos salinos suelen presentar distintas combinaciones de sales, como los cloruros y los sulfatos de Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} (Lamz & González, 2013; Proaño *et al.*, 2004). Siendo las más importantes en relación con los suelos salinos el sulfato magnésico, sulfato sódico y cloruro sódico. Y le siguen en importancia: carbonato sódico y cloruro magnésico (Proaño *et al.*, 2004).

Las sales son utilizadas por las plantas como nutrientes, de forma selectiva y preferente, sin embargo, los problemas surgen cuando rebasan ciertos límites de concentración que pueden ocasionar daños en el desarrollo de las plantas, en la calidad del cultivo o el rendimiento (Rueda *et al.*, 2009).

2.4. Efecto de la salinidad en las plantas

No todos los cultivos responden de igual manera a la salinidad, unos producen rendimientos aceptables a niveles altos y otros son sensibles a niveles

relativamente bajos. La diferencia se debe a la mejor capacidad de adaptación osmótica que tienen algunos cultivos, lo que les permite absorber, bajo condiciones de salinidad, una mayor cantidad de agua (Proaño *et al.*, 2004).

El daño que el exceso de sales produce en las plantas, varía según el estado fenológico, la composición iónica del suelo y el estado de salud general de las plantas (Saghir *et al.*, 2009). Normalmente es más perjudicial en las plantas jóvenes y puede retrasar varios días la germinación o inhibirla completamente (Falcón, 2002).

La salinidad puede inhibir el crecimiento de la planta y reducir la productividad (Dell'Amico & Parra, 2005), principalmente por tres factores: estrés hídrico, toxicidad ion específica, y desbalance nutricional. Como consecuencia de la combinación de estos tres, se manifiesta un cuarto factor que es el incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Lamz & González, 2013; Carranza *et al.*, 2009).

El estrés hídrico debido a la presencia en exceso de solutos en la solución del suelo produce una disminución del potencial osmótico (Lamz & González, 2013). La alta concentración de sales incrementa el potencial de las fuerzas que mantienen el agua en el suelo y hace más difícil la extracción del agua por las raíces de las plantas, las sales en la solución del suelo pueden alcanzar niveles tan altos que pueden llegar a deshidratarse y morir (Falcón, 2002).

Algunas plantas presentan toxicidad a iones específicos, los más comunes son el Cloro (Cl), Sodio (Na) y boro (B). Los efectos tóxicos pueden ser causados por un ión individualmente o en combinación con otros (Falcón, 2002). Generalmente las plantas absorben los iones y los acumulan en los tejidos foliares; cuando esta acumulación excede ciertos niveles se presenta daño, el cual a su vez depende de la concentración, del tiempo, de la sensibilidad del cultivo y uso del agua por la planta (García, 2012).

El desbalance nutricional debido al desequilibrio iónico por la acumulación excesiva de iones Na^+ y Cl^- se reduce la captación de otros nutrientes minerales

tales como K^+ , Ca^{2+} , y Mn^{2+} . Esto produce inactivación de enzimas y efectos en los procesos metabólicos de las plantas (Lamz & González, 2013). Altas concentración de Na^+ inhiben la absorción de nutrientes directamente por interferencia con transportadores en la membrana plasmática de la raíz, tales como los canales selectivos de K^+ (Goykovic & Saavedra, 2007).

La toxicidad iónica, estrés hídrico y deficiencias nutricionales ocasionan como resultado desequilibrios metabólicos y como consecuencia un estrés oxidativo. La presencia de ROS, tales como H_2O_2 (peróxido de hidrógeno), O_2^- (superóxido) y OH (radicales hidroxilo), pueden causar en las plantas reacciones fitotóxicas como la peroxidación de lípidos, degradación de proteínas y mutaciones en el ADN (Lamz & González, 2013).

El efecto general de la salinidad es la reducción de la tasa de crecimiento, afectando el tamaño y número de hojas, así como la altura. Otra respuesta fisiológica es la disminución de la conductancia estomática; de esta forma se reduce la transpiración evitando la sequía fisiológica para mantener la turgencia de las células. La reducción implica el cierre de estomas lo que reduce el ingreso de CO_2 inhibiendo la fotosíntesis, lo que ocasiona la disminución de la producción de biomasa en raíces, hojas, tallos y semillas, relacionados con el área foliar y la longitud de las plantas (Carranza *et al.*, 2009). La acumulación de sales en las hojas induce la pérdida de pigmentos y provoca una senescencia acelerada (Lesmes *et al.*, 2007).

Por otra parte, el estrés causado por el exceso de sales, produce un desbalance en la cantidad de etileno contenido en los tejidos vegetales, el incremento de esta fitohormona puede inhibir el crecimiento de la raíz, el tallo y en general el crecimiento vegetal (Siddikee *et al.*, 2011).

Un nuevo enfoque biológico para disminuir los problemas de salinidad que ha ganado interés por muchos investigadores en todo el mundo es el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) para promover el

crecimiento y rendimiento de plantas en suelos salinos (Lubna *et al.*, 2013; Afrasayab *et al.*, 2010).

2.5. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Existen dos tipos generales de bacterias benéficas para las plantas: las que forman relaciones simbióticas, que involucran la formación de estructuras especializadas o nódulos en las raíces de las plantas hospedadas; y las que están libres en el suelo y usualmente se encuentran cerca, o en las raíces de las plantas (Saghir *et al.*, 2009). Las bacterias benéficas libres del suelo asociadas con las raíces son frecuentemente referidas como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR, por sus siglas en inglés (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria). Sin embargo para incluir los diferentes tipos de bacterias, Bashan & Holguin (1998) propusieron el término bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPB, por sus siglas en inglés (Plant Growth-Promoting Bacteria), se encuentran asociados con la mayoría de las especies de plantas, y comúnmente se les encuentra en la mayoría de los ambientes (Caballero, 2006). Pueden interactuar con las plantas de formas diferentes, como se puede observar en la figura 1 (Glick, 2014).



Figura 1. PGPB incluye bacterias que interaccionan con las plantas de diferentes formas (Glick, 2014).

La rizósfera del suelo se define como el volumen de suelo que está influenciada por las raíces de la planta, y representa una región de intensa actividad microbiana (Sarabia *et al.*, 2010). Los microorganismos tienen la capacidad de colonizar las raíces de las plantas, esta interacción planta-microbio en la rizósfera es responsable de incrementar el crecimiento vegetal, la salud en las plantas y la fertilidad del suelo (Criollo *et al.*, 2012). El suelo es un sistema ambiental complejo en donde los efectos benéficos de las interacciones con las PGPB dependen de las cepas y de la planta, por lo que la asociación puede ser inestable (Kumar *et al.*, 2012a; Sarabia *et al.*, 2010; Ahmad *et al.*, 2008).

En los últimos años, el número de PGPB que han sido identificadas han aumentado, principalmente por que el papel de la rizósfera como un ecosistema ha ganado importancia en el funcionamiento de la biosfera y además porque los mecanismos de acción han sido ampliamente estudiados. Generalmente cerca del 2 al 5 % de las bacterias rizosféricas son PGPB (Barriuso *et al.*, 2008). Sin embargo no todas las cepas de un género o especie en particular tienen las mismas características genéticas o las mismas capacidades metabólicas, el conjunto de genes definen las capacidades metabólicas para promover el crecimiento vegetal (Gamalero *et al.*, 2009; Glick, 2014).

En la rizósfera el crecimiento de las plantas y microorganismos es mutuamente afectado por las moléculas que secretan. Estas moléculas exudadas por las raíces de las plantas son llamados rizodepósitos, los cuales incluyen carbohidratos, amino ácido, ácidos grasos, nucleótidos, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, reguladores de crecimiento, putrescina, esteroides y vitaminas. Mientras algunos de estos actúan como repelente de microbios, otros actúan como atrayentes para dar alojamiento al crecimiento microbiano (Kang *et al.*, 2010). Por otra parte, se ha demostrado que las plantas pueden responder a compuestos de señalización provenientes de las bacterias, tales como las moléculas auto inductoras dependientes de la densidad celular (quorum sensing) y compuestos volátiles (Han & Lee, 2005). Este tipo de mecanismos son importantes en la regulación en rasgos de bacterias benéficas para las plantas, tales como promoción del

crecimiento, protección contra patógenos o protección a estrés salino (Barriuso *et al.*, 2008).

Las cepas PGPB utilizan mecanismos directos e indirectos para aumentar el crecimiento y mejorar la condición de las plantas. Estos mecanismos pueden ser activados simultáneamente o de forma independiente en diferentes etapas del desarrollo fenológico de las plantas (Kumar *et al.*, 2012a; Glick, 2012; Holguin *et al.*, 2003).

Los mecanismos indirectos ocurren cuando las bacterias disminuyen los efectos perjudiciales de los organismos fitopatógenos a través de la producción de sustancias antimicrobianas, sideróforos, enzimas líticas, por competencia de nutrientes o de espacio en el nicho ecológico; así como por resistencia sistémica inducida (RSI) (Esquivel *et al.*, 2013; Penrose & Glick, 2003).

Los mecanismos directos incrementan la disponibilidad de nutrientes en la rizósfera al influir en el metabolismo de las plantas y mejorar su nutrición. Estos mecanismos son: fijación de nitrógeno, síntesis de fitohormonas (auxinas, giberelinas y citocininas), vitaminas y enzimas; solubilización de fósforo inorgánico y mineralización de fósforo orgánico; oxidación de sulfuros, incremento en la permeabilidad de la raíz, producción de nitritos, acumulación de nitratos, y reducción de la toxicidad por metales pesados (Esquivel *et al.*, 2013; Penrose & Glick, 2003).

Como muchas PGPB poseen diversos rasgos para facilitar el crecimiento vegetal, su efectividad puede variar dependiendo de la planta hospedera y de las condiciones del suelo. Las PGPB generalmente tienen poco o un efecto no cuantificable en el crecimiento de las plantas cuando estas están cultivadas en condiciones óptimas en ausencia de factores de estrés (Gamalero *et al.*, 2009).

2.6. Mecanismos de PGPB en condiciones salinas

La salinidad afecta negativamente la actividad biológica, excepto a las bacterias halófilas. Por lo tanto, las bacterias tolerantes a sales que colonizan las raíces pueden sobrevivir a las condiciones adversas del medio ambiente y pueden ayudar con sus propiedades benéficas en los ambientes en los cuales difícilmente otros organismos sobreviven (Yildirim *et al.*, 2008).

Existen numeros reportes del papel de las bacterias del suelo para la mitigación del efecto inhibitorio de la sal en el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Sin embargo no existe información sobre los fundamentos de esta protección. Se han sugerido posibles explicaciones para este comportamiento como se muestra en la figura 2 (Gamalero *et al.*, 2009).

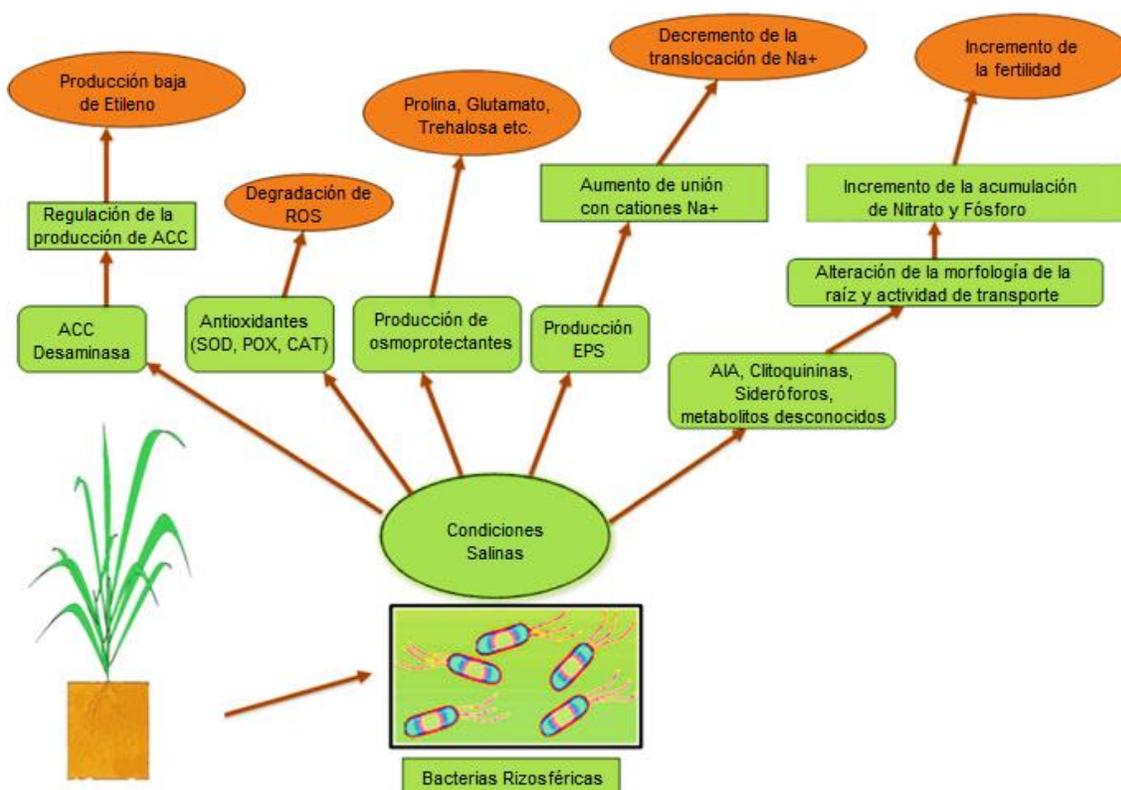


Figura 2. Mecanismos para la disminuir el efecto inhibitorio de la sal en el crecimiento y el desarrollo de las plantas por PGPB (Arora *et al.*, 2012).

Distintas PGPB poseen un interesante mecanismo para promover el crecimiento de plantas influenciadas por el estrés ambiental como la salinidad mediante el uso

de la enzima ACC desaminasa, la cual puede disminuir las concentraciones de etileno deletéreo en las plantas al desaminar el ACC, que es precursor del etileno, e incrementar la disponibilidad de amonio en la rizósfera (Esquivel *et al.*, 2013., Kang *et al.*, 2010).

Diferentes microorganismos poseen mecanismos de osmotolerancia que les permiten sobrevivir al estrés osmótico. Las células necesitan adaptarse mediante la acumulación de solutos específicos bajo condiciones hiperosmóticas y liberarlos bajo condiciones hiposmóticas. Tales solutos incluyen K^+ , aminoácidos (prolina, glutamato), aminoácidos derivativos (peptidos y N-acetilado aminoácidos), aminas cuaternarias (glicina, betaína y carnitina), azúcares (sacarosa y trehalosa) y tetrahidropirimidinas (ectoínas). Estos solutos pueden ser acumulados en altas concentraciones y ser transportados sin interferir con los procesos vitales de la célula y proveen estabilización de las enzimas (Arora *et al.*, 2012). Estos compuestos pueden ser sintetizados o tomados del medio ambiente (Szymańska *et al.*, 2013).

Las cepas PGPB pueden producir exopolisacáridos que unen los cationes incluyendo el Na^+ y disminuir el contenido disponible para las plantas (Siddiquee *et al.*, 2011). Se ha observado que la inoculación con estas cepas no solo disminuyen la concentración de Na^+ y el Cl^- inducen el incremento en N, P y K, de esta forma ayudan a reducir los efectos del estrés salino (Arora *et al.*, 2012).

Durante las condiciones salinas las plantas generan ROS que pueden causar daño oxidativo en diferentes biomoléculas. Las PGPB pueden producir enzimas antioxidantes tales como superóxido dismutasa, peroxidasa y catalasa y antioxidantes no enzimáticos como ascorbato, glutatión y tocoferol que pueden degradar ROS ayudando de esta forma al crecimiento vegetal (Arora *et al.*, 2012). Chakraborty *et al.* (2011), realizaron un estudio en donde *Bacillus cereus* promovió respuestas antioxidantes en condiciones de estrés por salinidad en plantas, incrementando las enzimas superóxido dismutasa, peroxidasa, ascorbato peroxidasa y catalasa.

Por otra parte, algunos microorganismos incrementan la disponibilidad de nutrientes como, fósforo, nitrógeno, iones y síntesis de fitohormonas y pueden promover el crecimiento en condiciones de estrés salino (Szymańska *et al.*, 2013). La mayor parte del nitrógeno biodisponible viene del nitrógeno fijado por microorganismos llamados diazótrofos en vida libre o en simbiosis con plantas, (Bruning & Rozema 2013). Esto contribuye significativamente a la nutrición de plantas crecidas en suelos salinos sódicos con baja fertilidad y en zonas áridas (Malik *et al.*, 1991).

La salinidad suprime la toma de fósforo por las raíces de las plantas y reduce el fósforo disponible por procesos de adsorción y baja solubilidad de fosfatos de calcio. Los efectos adversos en el crecimiento de plantas en suelos salinos se multiplica por falta de fosforo (Soni *et al.*, 2013). Muchas bacterias del suelo tienen la capacidad de convertir las formas insolubles del fósforo en formas asimilables para las plantas; la acción de solubilización puede generarse a través de procesos como producción de ácidos orgánicos, quelación e intercambio de reacciones (Lara *et al.*, 2011).

La aplicación exógena de reguladores de crecimiento como las auxinas producen beneficios en el alivio de los afectos adversos del estrés salino y también mejoran la germinación, el crecimiento, la maduración de frutos y rendimiento (Egamberdieva, 2009). La auxina natural mas crucial y común es el ácido indol-3-acético (AIA) (Duca *et al.*, 2014). Las PGPB pueden producir AIA que estimula de forma directa el crecimiento vegetal bajo condiciones de estrés. Sin embargo, puede promover la síntesis de la ACC sintasa lo que incrementa la cantidad de etileno, que en cantidades muy elevadas inhibe el crecimiento vegetal. Por lo que las bacterias que más protegen bajo condiciones de estrés producen AIA y ACC desaminasa (Arora *et al.*, 2012; Glick, 2012).

En la actualidad diferentes géneros de bacterias que promueven el crecimiento vegetal bajo condiciones salinas, han sido estudiadas, tal es el caso de *Acinetobacterium*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Halobacillus*, *Halomonas*, *Klebsiella*,

Oceanobacillus, *Planococcus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Sporosarcina*, *Streptomyces*, *Thiobacillus*, *Thalassobacillus*, *Terribacillus* y *Virgibacillus* (Arora *et al.*, 2012; Aneela *et al.*, 2012; Lubna *et al.*, 2013).

2.7. Etileno y ACC desaminasa

El etileno (C_2H_4) es una molécula gaseosa orgánica con actividad biológica, y puede funcionar de forma eficiente en la regulación del crecimiento vegetal a concentraciones muy bajas como $0.05 \mu L/L$ y en la maduración de frutos pueden alcanzar niveles aproximados de $200 \mu L/L$ (Glick, 2012; Glick, 2014). Puede tener efectos estimulantes o inhibitorios en el crecimiento de las plantas dependiendo de la concentración en los estados fenológicos. Por lo tanto, factores que causen cambios en los niveles endógenos del etileno puede modificar el crecimiento vegetal y el desarrollo (Shahzad *et al.*, 2013). Esta fitohormona es esencial en las plantas y esta involucrada en diferentes procesos del crecimiento y desarrollo vegetal, tales como la germinación, desarrollo de pelos radiculares, elongación de la raíz, abscisión de pétalos y hojas, maduración de frutos, senescencia de órganos, biosíntesis de otras fitohormonas y señalización de estrés (Figura 3) (Siddikee *et al.*, 2011; Ali *et al.*, 2014).



Figura 3. El etileno participa en diferentes procesos durante el crecimiento y desarrollo de una planta (Glick, 2014).

El etileno también participa en respuesta al estrés, debido a que su síntesis se incrementa por diferentes señales de estrés, tales como lesiones mecánicas, salinidad, sustancias químicas, anegamiento, temperaturas extremas, estrés hídrico, luz ultravioleta, daños por insectos, enfermedades y contaminación ambiental (Gontia *et al.*, 2014; Glick, 2005). Sin embargo, los niveles de etileno elevados, producidos por diferentes tipos de estrés (Gutiérrez, 2010) pueden provocar daño en la planta debido a la síntesis autocatalítica de etileno y no a la acción directa del factor estresante (Glick *et al.*, 2007).

Se ha propuesto un modelo para explicar los efectos de la producción de etileno en respuesta al estrés, que incluye la producción de dos picos (Figura 4A). El primero es típicamente una pequeña fracción del segundo y es técnicamente difícil de medir, este pico consume la reserva de ACC que se encuentra contenido en los tejidos y puede ser el responsable de la transcripción de genes que codifican para proteínas de defensa. El segundo pico es mucho más largo y ocurre después de la síntesis de ACC en respuesta al estrés, este pico es generalmente dañino para las plantas y está involucrado en procesos tales como senescencia, clorosis y abscisión de las hojas. De manera que se predice que cualquier tratamiento, químico o biológico, que pueda disminuir la magnitud del segundo pico de etileno debe disminuir simultáneamente el daño que se produce como consecuencia del estrés (Glick *et al.*, 2007; 2014).

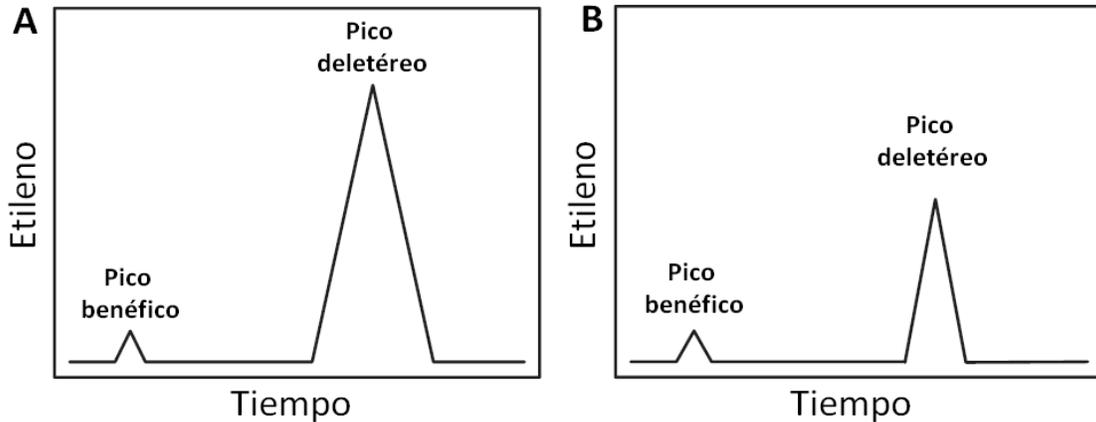


Figura 4. La producción de etileno en plantas está en función del tiempo después de un estrés ambiental. A) En la ausencia de bacterias exógenas. B) En presencia de una bacteria promotora del crecimiento vegetal productora de ACC desaminasa (Glick *et al.*, 2007).

En 1998 se determinó que algunas rizobacterias promueven el crecimiento vegetal mediante la disminución de los niveles de etileno en las plantas, a través de la ACC desaminasa, que convierte el ACC en α -cetobutirato y amoníaco. Con esta estrategia las plantas disponen de un recurso extra de nutrimentos y los microorganismos de la rizósfera tienen una alternativa más en la generación del nitrógeno para su supervivencia (Esquivel *et al.*, 2013; Govindasamy *et al.*, 2009).

Las cepas ACC desaminasa se unen a la superficie de las plantas usualmente semillas o raíces, aunque también pueden ser encontradas en hojas y flores o dentro de tejidos internos. Las bacterias degradan y utilizan el ACC que es exudado por los tejidos vegetales (mucho del ACC es exudado de las semillas, tallos y hojas) y es tomado por la ACC desaminasa localizada en el citoplasma de los microorganismos (Saleem, 2007; Glick, 2005).

Glick *et al.* (1998) plantearon un modelo mediante el cual las PGPB disminuyen los niveles de etileno en plantas y a su vez estimulan el crecimiento vegetal (Figura 5). La enzima ACC desaminasa comúnmente está presente en las bacterias a bajos niveles, la inducción de la actividad enzimática ocurre a través

de un proceso lento y complejo que requiere de la presencia del ACC. Después de la inducción de las enzimas biosintéticas del etileno (ACC sintasa y ACC oxidasa), una mayor cantidad de ACC es producida, lo cual favorece la síntesis de la enzima ACC desaminasa y ésta a su vez disminuye la concentración del precursor (ACC) y la síntesis de etileno. Además, algunas bacterias producen ácido indolacético (AIA) el cual al ser asimilado por las plantas favorece la elongación y proliferación de las células vegetales. El modelo sugiere que adicionalmente, el AIA favorece la síntesis del ACC. Las bacterias que contienen ACC desaminasa al hidrolizar el ACC mantienen el equilibrio de la concentración del etileno en el interior de las plantas.

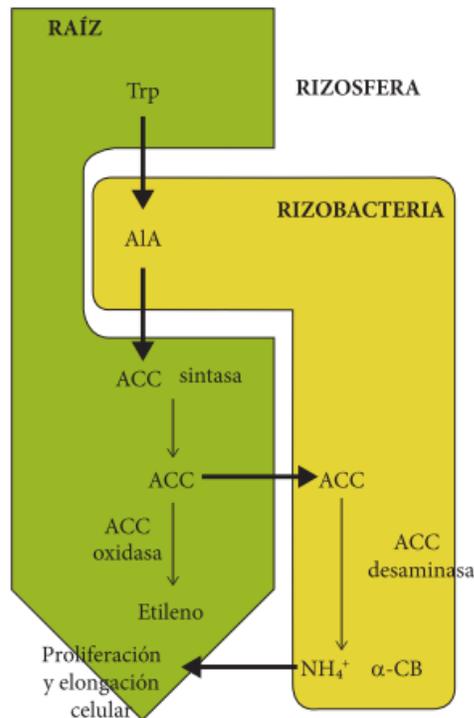


Figura 5. Modelo que describe la función de la enzima ACC desaminasa en la promoción del crecimiento de las plantas. AIA, ácido Indolacético (Glick *et al.*,1998).

Inmediatamente después del estrés ambiental, las reservas de ACC es tan baja como el nivel de ACC desaminasa asociada con las bacterias. Esto es seguido de una rápida inducción de un nivel bajo de ACC oxidasa en la planta, que da como resultado la formación del primer pico benéfico del etileno (Figura 4A). Con el

tiempo la ACC desaminasa de las bacterias es inducida por el incremento de las cantidades de ACC derivado de la inducción de ACC sintasa. Así la magnitud del segundo pico deletéreo de etileno es reducido significativamente (Figura 4B). Este pico nunca es completamente abolido debido a que la ACC oxidasa tiene una mayor afinidad por el ACC que la ACC desaminasa (Glick *et al.*, 2007).

La ACC desaminasa ha sido ampliamente reportada en numerosas especies microbianas de bacterias Gram negativas, bacterias Gram positivas y bacterias y hongos endófitos (Arora *et al.*, 2012). Sin embargo, estudios genéticos del gen *acdS* que codifica para la enzima ACC desaminasa, han mostrado que la secuencia a nivel de nucleótidos no es muy similar entre géneros bacterianos, ya que varía incluso entre cepas del mismo género; así dentro de un mismo género o especie existen cepas que presentan la actividad de la enzima y otras no (Esquivel *et al.*, 2013).

Existen reportes que han mostrado que tratamientos con PGPB que poseen la enzima ACC desaminasa reducen los niveles de estrés y confieren tolerancia a salinidad en cultivos que crecen en medios con altas concentraciones salinas (Gontia *et al.*, 2014; Saharan & Nehra, 2011; Ali *et al.*, 2014). La bacteria *Pseudomonas fluorescens* proporciona resistencia al estrés salino en plantas de cacahuate (Saravanakumar & Samiyappa, 2007). Las bacterias halotolerantes como *Arthrobacter nicotianae*, *Bacillus stratosphericus*, *Corynebacterium variabile*, *Exiguobacterium acetylicum*, *Halomonas neptunia*, *Oceanimonas smirnovii*, *Planococcus rifietensis* y *Zhihengliuella alba* incrementan el crecimiento y la resistencia a la salinidad de plantas de pimiento (Siddikee *et al.*, 2010). Existen muchos cultivos sensibles a la salinidad que pueden afectar su desarrollo vegetativo (Carranza *et al.*, 2009), entre ellos se encuentran muchas hortalizas como la lechuga, el brócoli, pepino y coliflor (Barassi *et al.*, 2006).

2.8. El cultivo de lechuga

La lechuga es la planta más importante del grupo de las hortalizas de hoja, es ampliamente conocida y se cultiva en casi todos los países del mundo. Por tratarse de un producto de consumo natural, de sabor agradable, bajo contenido calórico y ricas en vitamina C (Vallejo & Estrada, 2004). A nivel mundial durante el 2004, México fue el décimo productor de lechuga en el mundo con 247, 385 mil t; obtuvo el octavo lugar en la lista de principales exportadores y respecto a importadores ocupó el quinceavo lugar (Bobadilla *et al.*, 2010).

En México la producción de lechuga se desarrolla en 25 estados de la República. Los principales estados productores son Guanajuato, Sonora, Puebla, Baja California, Jalisco y San Luis Potosí. Se puede cultivar durante todo el año bajo riego; se reporta una superficie sembrada de 4,000 ha; con rendimientos que pueden variar desde 7 a 23 ton/ha (Tapia, 2003).

La lechuga (*Lactuca sativa* L.) es una planta herbácea anual perteneciente a la familia Compositae (Carranza *et al.*, 2009). Está íntimamente relacionado con la lechuga silvestre común o lechuga espinosa (*L. serriola* L.) (Davis *et al.*, 2002).

Las principales raíces de absorción son relativamente pequeñas y poco extendidas (5-30 cm). Las hojas pueden ser de forma redondeada, lanceolada o casi estipulada; son lisas, sin peciolo. El borde de los limbos foliares puede ser liso, ondulado o serrado. Su color va del verde amarillo hasta el morado claro dependiendo de la variedad. El tallo es pequeño y no se ramifica, sin embargo a temperaturas altas se ramifica del extremo y presenta en las ramillas terminales una inflorescencia o tallo floral. Las semillas son largas (4-5 mm), su color generalmente es blanco crema. (Tapia, 2003; Montesdeoca, 2009).

Es una hortaliza de climas frescos (15-20 °C), la temperatura media óptima para el desarrollo de la parte aérea de la planta está entre 15 y 18 °C, con máximas de 21 a 24 °C y mínimas de 7 °C; las semillas germinan a temperaturas de 20 a 25 °C (Vallejo & Estrada, 2004). El cultivo exige mucha luz, la escasez de ésta provoca

que las hojas sean delgadas y que en múltiples ocasiones las cabezas se suelten (Montesdeoca, 2009).

La lechuga se caracteriza por adaptarse a una amplia variedad de suelos, aunque prefiere los suelos francos-arenosos y fértiles con altos contenido de materia orgánica y buen drenaje (Tapia, 2003). Siendo el pH más apropiado entre 5.2 y 5.8 en suelos orgánicos y de 5.5 a 6.7 en suelos de origen mineral, pero puede tolerar una amplia gama de pH a excepción de ≤ 5 (Montesdeoca, 2009; Gómez, 1987).

La lechuga es relativamente sensible a la salinidad, esta condición con frecuencia varía dentro de la misma especie (Carranza *et al.*, 2009). Es más sensible que el brócoli, pepino, coliflor y chile, y menos sensible que las zanahorias, ajos y rábanos. Altas concentraciones de NaCl (60 mM) afectan la velocidad de germinación, la elongación del tallo y el crecimiento vegetativo (Barassi *et al.*, 2006). Los valores umbral para la especie están en el rango de 1.0 a 1.4 dS/m, y la pendiente para la disminución del rendimiento, desde 6.2 hasta 8% por dS/m (Carranza *et al.*, 2009). La lechuga puede llegar a bajar su rendimiento hasta en un 50% en condiciones de suelo de 11.4 dS/m de CE (Lesmes *et al.*, 2007). En un estudio hecho por Carranza *et al.*, (2009) los parámetros de mayor afectación en lechugas sometidas a estrés por salinidad fueron el área foliar y la acumulación de masa seca foliar.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La salinidad en los suelos agrícolas, es un problema a nivel mundial, especialmente en las zonas costeras, áridas con riego o en zonas con exceso de fertilizantes. La cantidad elevada de sales reduce el crecimiento de las plantas, principalmente las que son sensibles a la salinidad, esto conlleva a una reducción del rendimiento en los cultivos, lo que repercute de manera negativa en la economía del productor. Por otra parte, la demanda creciente de alimentos debido al aumento poblacional y la disminución de las zonas agrícolas debido a la urbanización, hace necesario que estos suelos sigan siendo utilizados.

El estrés por salinidad produce cambios fisiológicos en las plantas, entre ellos, el aumento de etileno en los tejidos vegetales, el cual tiene un efecto autocatalítico que aumenta los efectos provocados por el factor estresante, por esta razón los inhibidores de la síntesis o de la acción del etileno pueden disminuir significativamente la severidad inducida por el estrés salino.

En este contexto se tienen reportes del uso de bacterias productoras de ACC desaminasa, una enzima que cataliza la conversión del ACC que es un precursor inmediato de la síntesis del etileno en plantas, en α -cetobutirato y amoníaco, lo que mitiga el estrés salino, al disminuir la cantidad de etileno.

4. JUSTIFICACIÓN

Las bacterias del suelo que presentan la enzima ACC desaminasa podrían ser una herramienta importante para aumentar los rendimientos en los cultivos con altos niveles de salinidad. Para lograr este propósito es necesario determinar el efecto benéfico de estas bacterias sobre diferentes tipos de cultivos. En el caso de la lechuga, no se tiene suficiente información acerca del efecto de ACC desaminasas bacterianas, ni de los mecanismos de promoción de crecimiento vegetal, que puedan estar participando.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Caracterizar bacterias que presenten la enzima ACC desaminasa y evaluar la capacidad para promover el crecimiento en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) bajo estrés salino.

5.2. Objetivos particulares

1. Aislar de cepas bacterianas productoras de ACC desaminasa de suelo y rizósfera.
2. Seleccionar cepas bacterianas con capacidad para desarrollarse en medios de cultivo adicionados con altas concentraciones de NaCl.
3. Determinar la efectividad de las cepas bacterianas seleccionadas con ACC desaminasa en la promoción del crecimiento de lechuga (*Lactuca sativa* L.) bajo condiciones de estrés por salinidad.
4. Caracterizar las capacidades bacterianas para promover el crecimiento vegetal *in vitro* de cepas seleccionadas.
5. Identificar y caracterizar de cepas bacterianas que proporcionen un efecto benéfico en las lechugas.

6. HIPÓTESIS

La inoculación con bacterias productoras de la enzima ACC desaminasa en el cultivo de lechuga, disminuirá los efectos provocados por el estrés salino y promoverá su crecimiento.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Muestras de suelo y rizósfera

Muestras de suelo y rizósfera fueron colectadas en diferentes predios de Sayula, Jalisco; y de Tecomán, Colima; como se muestra en el cuadro 1. Se tomó 1 Kg de suelo por cada muestra, se colocaron en bolsas de plástico y se almacenaron a temperatura ambiente. En la muestra de rizósfera, se excavo alrededor de la planta, cuidando que el sistema radicular saliera por completo, se colocaron en bolsas de plástico y fueron almacenadas a 4 °C hasta su análisis.

Cuadro 1. Sitios de colecta de muestras de suelo y rizósfera.

Sitio de colecta	Predio	Tipo de muestra	Nº de muestras	Abreviación
Tecomán, Colima	RED STARR (Cabeza de Toro)	Suelo	4	S1, S2, S3, S4
Usmajac, Sayula, Jalisco	Vivero Biotique	Rizósfera	7	R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7
Tecomán, Colima	RED STARR (Don Pedro)	Suelo	1	PS
	RED STARR (Cabeza de Toro)	Suelo	1	CTS
	Ave María (El Delirio)	Suelo	1	DS
Sayula, Jalisco	Laguna de Sayula	Rizósfera	2	SR1, SR2
	Laguna de Sayula	Suelo	2	SS2, SS1

A las muestras de suelo y rizósfera, se les determinó la conductividad eléctrica (CE) empleándose la norma NMX-AA-093-SCFI-2001, y el pH en base a la norma NMX-AA-008-SCFI-200.

7.2. Aislamientos bacterianos

Para el aislamiento de bacterias a partir de suelo rizosférico, se cortó la parte aérea de las plantas, dejando solo la parte radicular. Se desprendió el suelo adherido a las raíces con un lavado de agua destilada estéril; de la suspensión se realizaron diluciones hasta la 1:1000. En el caso del suelo, se homogeneizó la muestra y se tomó un gramo haciéndose diluciones igual que lo mencionado para la suspensión de suelo rizosférico. A partir de la dilución 1:1000 de suelo y de

suelo rizosférico, se realizaron 24 diluciones seriadas en placas de agar nutritivo (AN) mediante una esponja impregnada con las soluciones.

Para ambos casos las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h. Las colonias axénicas que se obtuvieron, se tomaron y se sembraron en tubos de agar soya tripticaseína (AST), incubándose a las mismas condiciones, posteriormente se almacenaron a 4 °C.

7.3. Actividad ACC desaminasa

Para determinar la presencia de la enzima ACC desaminasa se siguió la metodología propuesta por Penrose & Glick (2003). Los aislamientos que se obtuvieron de las muestras de suelo y rizósfera, se sembraron en medio mínimo Dworkin & Foster (1958) (medio DF), el cual contiene por litro: 4 g KH_2PO_4 , 6 g Na_2HPO_4 , 0.2 g MgSO_4 , 1 mg FeSO_4 , 10 μg H_3BO_3 , 10 μg MnSO_4 , 50 μg CuSO_4 , 22.5 μg Na_2MoO_4 , 70 μg ZnSO_4 , 5 g sacarosa, y 20 g agar bacteriológico. El medio mínimo fue ajustado a un pH de 7.2 y esterilizado a 121 °C por 15 min, posteriormente se dejó enfriar a 45 °C y se adicionó 1.5 mM de ACC como única fuente de nitrógeno que previamente fue esterilizado mediante filtración a través de una membrana de 0.45 μm de nitrocelulosa. Las placas inoculadas fueron incubadas por 72 h a 37 °C, las cepas que presentaron crecimiento en el medio se consideraron positivas para la producción de la ACC desaminasa. Las cepas que resultaron positivas fueron sometidas a una prueba de tolerancia a la salinidad.

7.4. Prueba de tolerancia a la salinidad

Las cepas bacterianas se crecieron en placas de AN adicionado con diferentes concentraciones de NaCl, (0% al 18%), como un posible factor de tolerancia a salinidad y en consecuencia adaptación a este tipo de ambientes. Las cepas que resistieron mayor concentración de salinidad fueron seleccionadas para los siguientes experimentos.

7.5. Efectividad de bacterias ACC desaminasa

La efectividad de las bacterias productoras de ACC desaminasa que toleraron concentraciones salinas altas de NaCl, fue determinada por un ensayo de germinación *in vitro* y una prueba *ex vitro* bajo condiciones de estrés salino.

7.5.1. Ensayo de germinación *in vitro*

Se desinfecto la superficie de las semillas de lechuga con 3% de hipoclorito de sodio por 1 min, se lavó con agua destilada estéril tres veces. Posteriormente las semillas se inocularon por inmersión durante 3 h en un volumen de agua destilada adicionada con sacarosa 50 mM más la suspensión bacteriana que se ajustó a una concentración de 1.5×10^8 UFC/mL en base a la escala de McFarland (Yildirim *et al.*, 2008). Simultáneamente, se instaló el control negativo al cual sólo se le adicionó agua destilada estéril con sacarosa.

Los tratamientos inoculados y sin inocular fueron compuestos por 40 semillas, las cuales se colocaron en cajas Petri estériles y se distribuyeron en medio de dos hojas de papel filtro previamente humedecidas con una solución de 0 y 80 mM NaCl, lo que representa una CE de 0 y 6.94 dS/m respectivamente. Las cajas se sellaron con Parafilm® y se dejaron a 25 °C en una incubadora. Para determinar el porcentaje de germinación se registró el número de semillas germinadas, a los cuatro y siete días después de la inoculación (Barassi *et al.*, 2006).

7.5.2. Crecimiento vegetal bajo condiciones salinas

Para este experimento se seleccionaron las cepas con las que se obtuvo un mayor porcentaje de germinación. Se estableció un diseño aleatorio de seis tratamientos y 16 repeticiones.

Para inducir la producción de la ACC desaminasa fue seguida la metodología descrita por Penrose & Glick (2003). Cada uno de las cepas se cultivó en caldo soya tripticaseina, fueron incubadas a 37 °C con agitación a 200 rpm por 24 h. El cultivo fue centrifugado por 20 min a 4,000 rpm, el sobrenadante fue descartado y la biomasa lavada con medio mínimo DF. Se volvió a centrifugar a las mismas

condiciones, descartado el sobrenadante la biomasa fue suspendida en 5 mL de medio mínimo DF adicionado con 3 mM de ACC, el cultivo se dejó incubando 24 h en agitación a 30 °C. Se concentró la biomasa por centrifugación y se realizaron tres lavados con una suspensión de 0.03M MgSO₄.

El pellet fue ajustado a una concentración de 1.5×10^8 UFC/mL en 0.03M MgSO₄ según la escala de McFarland. Las semillas (previamente desinfectadas) fueron inoculadas por inmersión en la suspensión bacteriana por 3 h. Como control negativo se utilizaron semillas sin inocular. Las semillas inoculadas y no inoculadas se colocaron en charolas de germinación con Peat Moss como sustrato, fueron regadas cada dos días. Cuando las plántulas alcanzaron una altura alrededor de los 4 cm se trasplantaron en sustrato de agave (previamente lavado y desinfectado) empaquetado en bolsas de poliestireno, las cuales se colocaron en canaletas de PVC, el sistema hidropónico que se empleó fue “Bagazo de agave en Película Nutritiva” (BAPEN). Después de 5 días del trasplante se utilizó la solución Steiner al 50% adicionada con 80 mM de NaCl lo que corresponde a una CE de 7.3 dS/m. Se realizaron aplicaciones de la suspensión bacteriana (1×10^7 UFC/mL) desde la siembra de las semillas y hasta la cosecha cada 15 días. Muestras de plantas se tomaron a los 20, 30 y 40 días después de la aplicación de la solución con NaCl. Las variables evaluadas fueron altura, peso seco, peso fresco y clorofila total mediante un Spad 500.

7.6. Capacidades de promoción de crecimiento *in vitro*

Para determinar las capacidades de promoción del crecimiento vegetal se utilizaron las cepas que proporcionaron efectos benéficos a las plantas de lechuga sometidas a estrés por salinidad.

7.6.1. Solubilización de fosfatos

Las cepas se sembraron en medio Pikoskava's agregando como minerales de estudio el Ca₃(PO)₃ (fosfato tricálcico), AlO₄P (fosfato de aluminio) y FeO₄P (fosfato de hierro) de manera insoluble, con el fin de determinar si las cepas tienen

la capacidad de solubilizar estos compuestos. El medio tenía la siguiente composición en g/L: 5, Fosfato insoluble; 0.5, $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$; 0.2, NaCl; 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0.2, KCl; 0.002, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0.002, $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0.5, extracto de levadura; 10, dextrosa; 15, agar bacteriológico. El pH se ajustó a 7.2.

Se colocaron cuatro cepas por caja, y se dejaron incubando por siete días a 37 °C. La solubilización se consideró positiva por la presencia de un halo transparente en el área de crecimiento y/o alrededor de la colonia.

7.6.2. Producción índoles totales

La determinación de producción de índoles totales se llevó a cabo mediante una reacción colorimétrica utilizando el reactivo de Salkowsky, el cual se preparó a partir de H_2SO_4 a 7.9 M y FeCl_3 al 1.2% (Glickmann & Dessaux, 1995).

Las cepas se sembraron en caldo soya tripticaseina, incubándose por 24 h a 37 °C, posteriormente se ajustaron 25 mL de CN y medio de Burk's (libre de nitrógeno) sin y con triptófano (1 g/L) a 1×10^6 UFC/mL en base a la escala de McFarland. Las cepas permanecieron en agitación constante a 180 rpm en un agitador orbital. A las 72 h se tomaron 5 mL del medio de cultivo y se centrifugó a 4,000 rpm por 20 min. Del sobrenadante se tomó 1 mL y se adicionó 1 mL de reactivo de Salkowsky, cada muestra se realizó por triplicado. Se dejaron reposar por 30 min en obscuridad a temperatura ambiente para después medir la absorbancia de la muestra en un espectrofotómetro a 530 nm, ya que la intensidad de color de la muestra es directamente proporcional a la cantidad de índoles totales presentes. Para este ensayo fue utilizado como control positivo la cepa 7RC-7 productora de AIA.

Para determinar la concentración de índoles totales de las muestras se elaboró una curva estándar para lo cual se prepararon soluciones de ácido indolacético comercial (Sigma®) con las siguientes concentraciones: 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 y 30 ppm. Con los datos de absorbancia se construyó una gráfica, sobre la cual se calculó la ecuación de la recta y el valor r^2 . Se utilizó como blanco una solución de agua destilada. Se determinó la producción total de la hormona con

los valores de absorbencias de las muestras remplazados en la ecuación de la recta.

7.7. Caracterización y determinación de cepas bacterianas

Se identificaron las cepas que proporcionaron promoción del crecimiento vegetal bajo condiciones de estrés por salinidad.

7.7.1. Caracterización morfológica

Las cepas se inocularon en cajas de AN por estría cruzada para realizar la caracterización morfológica colonial. Se hicieron tinciones de Gram para determinar la forma y la agrupación celular de las cepas, así como las características tintoriales de la pared celular.

7.7.2. Resistencia a antibióticos

Fue utilizado el método de Kirby-Bauer para determinar la sensibilidad antimicrobiana de las cepas bacterianas.

Las cepas se inocularon en caldo soya tripticaseína, incubándose a 37 °C hasta alcanzar una densidad de 0.5 en la escala de McFarland que corresponde a 1.5×10^8 UFC/mL aproximadamente. Se impregnaron los hisopos estériles de algodón en la suspensión bacteriana, se quitó el exceso de medio de cultivo y se estrío el medio en la totalidad de la superficie de las placas de agar Mueller Hinton. Se dejó reposar por 15 min y después, fue colocado el multidisco combinado BIO-RAD®. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 h; transcurrido el período de incubación se determinó la sensibilidad a los antibióticos midiendo el diámetro del halo de inhibición.

Las cepas se clasificaron en Resistentes (R), Intermedias (I) o Sensibles (S), de acuerdo a las especificaciones del fabricante, los puntos de corte se observan en el anexo 3.

7.7.3. Caracterización bioquímica e identificación

Para las cepas Gram positivas fueron seleccionadas las siguientes pruebas bioquímicas convencionales descritas por Holt *et al.* (1994): fermentación de manitol en medio agar salado manitol, oxidasa, catalasa, coagulasa, hemólisis en agar sangre y esculina.

Tomando en cuenta el resultados de las pruebas convencionales y a la caracterización fenotípica, fue seleccionado el sistema miniaturizado para identificación API® Staph (BioMérieux), estandarizado para la identificación de *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Kocuria*, que consiste en una serie de 20 pruebas bioquímicas deshidratadas contenidas en microtubos. Las cepas se sembraron en caldo soya tripticaseína y se incubaron a 37 °C por 24 h, posteriormente fueron ajustadas a 0.5 en la escala de McFarland en el medio API Staph. Se inocularon cada uno de los pocillos de la galería, cubriéndose la cúpula con aceite mineral para crear condiciones de anaerobiosis cuando fuera requerido, se incubaron a 37 °C por 24 h. Durante la incubación el metabolismo de las bacterias produce cambios en la coloración de manera directa o indirecta (con la adición de reactivos). La interpretación de las reacciones se realizó utilizando los parámetros indicados por el fabricante (Anexo 4). Fue obtenido un perfil digital a partir de los resultados obtenidos, el cual se ingresó en el software de identificación apiweb, obteniéndose una identificación a nivel de género y especie.

7.7.4. Curva de crecimiento

Las cepas se sembraron por estría en placas de AN y se incubaron por 24 h a 37 °C. Se tomó una colonia pura con un asa y se inoculo en 60 mL de caldo soya tripticaseína (CST). La suspensión bacteriana permaneció en agitación constante a 180 rpm a una temperatura de 37 °C por 32 h. Se analizó la evolución del crecimiento bacteriano tomando una alícuota del cultivo cada dos horas y midiendo su densidad óptica en un espectrofotómetro a 595 nm.

Se realizó vaciado en placa para hacer un recuento de las células viables cada cuatro horas. Se realizaron diluciones seriales a partir de la suspensión

bacteriana, de las tres últimas diluciones se tomaron 100 μ L del cultivo y fueron colocados en cajas Petri, homogenizando con el medio agar para métodos estándar, se realizaron dos repeticiones por cada dilución. Después de que las placas se solidificaron fueron incubadas a 37 °C, a las 24 h de incubación las UFC se contaron en un contador de colonias.

7.8. Diseño experimental y análisis estadístico

Para determinar si existían diferencias significativas en el número de semillas germinadas por cepa en una condición de salinidad de 0 y 80 mM de NaCl se utilizó X^2 de bondad y ajuste.

Las variables del experimento de crecimiento vegetal bajo condiciones salinas y la producción de AIA en diferentes medios de cultivo fueron analizadas utilizando el análisis de varianza ANOVA y la comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$). Fue empleando el software estadístico SPSS® Statistics 22 para Windows.

8. RESULTADOS

8.1. Muestras de suelo y rizósfera

De acuerdo a la CE, Tecomán, Colima presentó los valores más bajos entre 0.08 y 0.28 dS/m, seguido por los suelos del predio de Usmajac, Sayula con 0.42 dS/m y finalmente los valores de CE de Sayula con valores de 5.52 a 7.98 dS/m. En cuanto al pH las muestras variaron desde 6.4 hasta 9.8 como se muestra en el cuadro 2.

Cuadro 2. Determinación de CE y pH de las muestras en base a las normas NMX-AA-093-SCFI-2001 y NMX-AA-008-SCFI-200.

Sitio de colecta	Muestra	dS/m	pH
Tecomán, Colima	S1	0.19	8.62
	S2	0.10	8.06
	S3	0.08	7.82
	S4	0.20	8.89
	PS	0.28	8.5
	CTS	0.20	7.3
	DS	0.14	8.2
Usmajac, Sayula, Jalisco	R1-R7	0.42	6.4
Laguna de Sayula	SR1 y SS1	7.98	9.7
	SR2 y SS2	5.52	9.8

8.2. Aislamientos bacterianos y Actividad ACC desaminasa

De las cepas aisladas el 88.7% presentaron producción de la enzima ACC desaminasa (Cuadro 3). Se aislaron 257 cepas a partir de muestras de suelo de las cuales 87% fueron ACC desaminasa positivas. Mientras que de las muestras de rizósfera se obtuvieron 177 cepas y 91% resultaron positivas (Cuadro 4 y Figura 7). En la figura 6 se observa el crecimiento de cepas ACC desaminasa positivas.

Cuadro 3. Cepas aisladas de muestras de suelo y rizósfera que producen ACC desaminasa.

Muestra	Cepas aisladas	ACC desaminasa
S1	10	8
S2	13	10
S3	28	24
S4	72	60
R1	22	21
R2	16	15
R3	20	18
R4	20	18
N1	26	25
N3	23	20
N4	28	26
PS	61	57
CTS	9	9
DS	35	31
SR1	11	10
SR2	11	8
SS1	7	7
SS2	22	18
Total	434	385



Figura 6. Cepas con producción de la enzima ACC desaminasa.

Cuadro 4. Cepas aisladas y productoras de ACC desaminasa por tipo de muestra.

Tipo de muestra	Cepas aisladas	ACC desaminasa
Suelo	257	224
Rizósfera	177	161

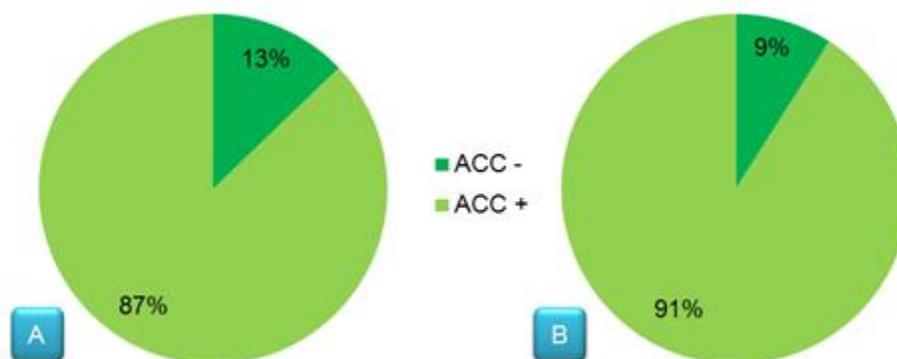


Figura 7. Porcentaje de bacterias ACC desaminasa positivas y negativas. A) Muestras de suelo. B) Muestras de rizósfera.

8.3. Prueba de tolerancia a la salinidad

Las 385 cepas aisladas con producción de ACC desaminasa se probaron a las diferentes concentraciones de NaCl desde 0% hasta 18%, de las cuales solamente 141 cepas bacterianas soportaron concentraciones superiores al 9% como se muestra en el cuadro 5. Las cepas de las muestras S2 y S3 (Tecomán, Colima) mostraron menor tolerancia a la salinidad, mientras que en las muestras provenientes de la Laguna de Sayula SR1, SR2, y SS2 se encontraron las cepas con mayor tolerancia soportando hasta 18%, con un total de seis cepas de muestras de suelo y rizósfera, las cuales fueron seleccionadas para posteriores experimentos, así mismo 5 cepas del mismo sitio con tolerancia a 17% y 3 cepas de Usmajac, Sayula, que presentaron tolerancia al 10%. Se observó que todas las cepas disminuyeron su crecimiento cuando la salinidad incremento. En la figura 8 se observa el crecimiento de cepas en 13% de NaCl.

Cuadro 5. Prueba de tolerancia a NaCl (%) en cepas ACC desaminasa positivas.

Muestra	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
S1	1									
S2										
S3										
S4	4									
R1	8									
R2	6									
R3	3									
R4	5	3*								
N1	10									
N3	1									
N4	2									
PS	38	13	8	2						
CTS	8	5	2	2						
DS	24	13	5	2						
SR1	5	4	4	4	1	1	1*	1	1	1
SR2	8	7	7	7	3	2	2*	2	2	2
SS1	4	3	3	2	1					
SS2	14	13	13	13	10	9	8*	8	8	3
Total	141	61	42	32	15	12	11	11	11	6

*Cepas seleccionadas para el siguiente experimento.

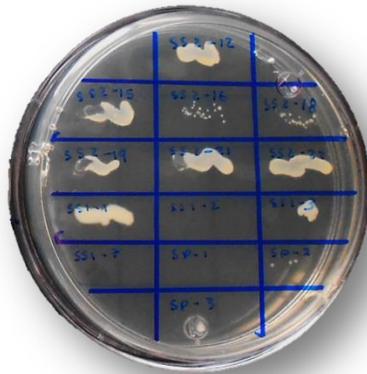


Figura 8. Crecimiento bacteriano en medio nutritivo adicionado con 13% de NaCl.

Se obtuvo una mayor proporción de cepas tolerantes a concentraciones de NaCl superiores al 9%, a partir de aislamientos provenientes de suelo que de rizósfera. Solo en la concentración de 18%, las proporciones fueron iguales (Figura 11).

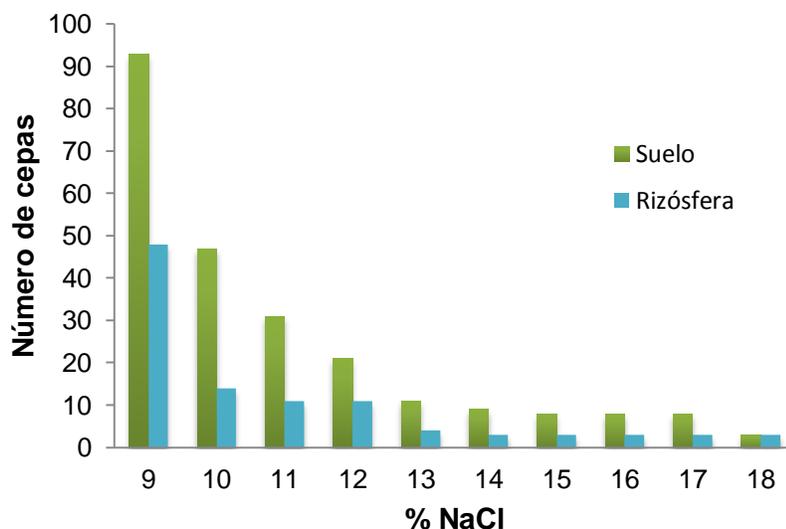


Figura 9. Cepas de suelo y rizósfera resistentes a más de 9% de NaCl.

8.4. Efectividad de bacterias ACC desaminasa

Para este experimento se seleccionaron catorce cepas tolerantes a altas concentraciones salinas.

8.4.1. Ensayo de germinación *in vitro*

Las cepas no mostraron diferencias significativas en comparación con el control a la concentración de 0 mM NaCl. Mientras que 8 cepas incrementaron la cantidad de semillas germinadas en la concentración de 80 mM NaCl de forma significativa a los 4 días, y 9 cepas a los 7 días (Figura 10). Las cepas con las que se obtuvieron mejores resultados a los 4 días fueron SR1-9 y R4-3 que aumentaron en un 67% y 66.1% respectivamente el número de semillas germinadas; mientras que al día 7 las cepas R4-11 y SR2-6 aumentaron en 63.1% el número de semillas. En general todas las cepas aumentaron el número de semillas germinadas en condiciones de salinidad con respecto al control excepto la cepa SS2-19 que presentó una reducción del 82.6%. Las cepas SS2-10 y SS2-22

mostraron diferencias entre el número de semillas germinadas a los 4 y 7 días a la concentración de 80 mM.

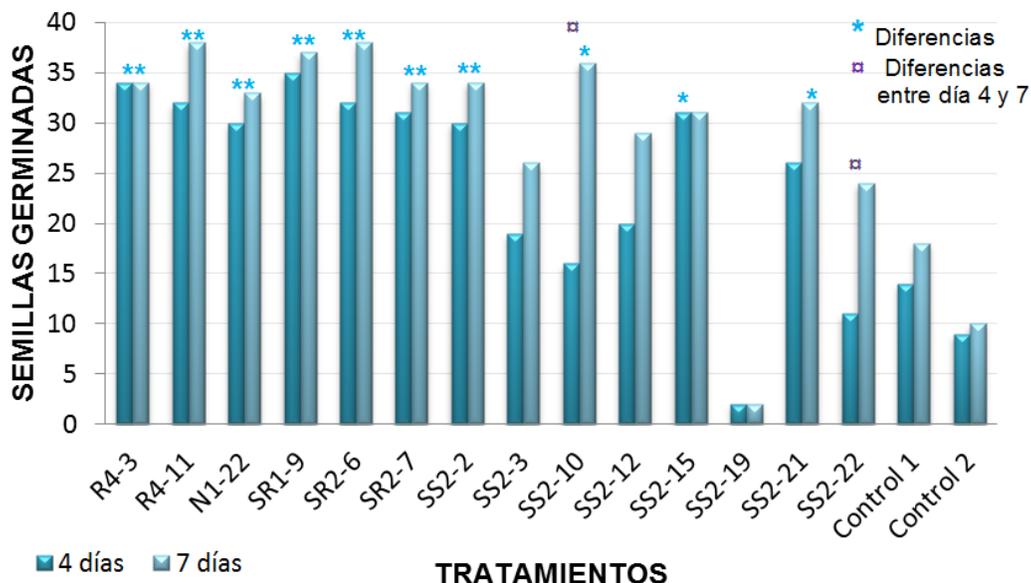


Figura 10. Número de semillas germinadas a la concentración 80 mM de NaCl a los 4 y 7 días.

8.4.2. Crecimiento vegetal bajo condiciones salinas

Las cinco cepas con las que se obtuvo una mayor cantidad de semillas germinadas a la concentración de 80 mM de NaCl a los 7 días, se estableció el siguiente experimento con un diseño completamente aleatorio de seis tratamientos y 16 repeticiones (Cuadro 6).

Cuadro 6. Tratamientos utilizados para el experimento de crecimiento vegetal en condiciones salinas.

Tratamiento	Descripción
T1	Cepa R4-3
T2	Cepa R4-11
T3	Cepa SR1-9
T4	Cepa SR2-6
T5	Cepa SS2-10
T6	Testigo sin inocular

Al evaluar la altura del tallo de las plantas de lechuga inoculadas con la cepa SR2-6 hubo un incremento al día 10 y 20, en un 12.7% y 19% respectivamente con respecto al control (sin inocular) de forma significativa. En las variables de clorofila total, peso fresco y peso seco no se observaron diferencias significativas con respecto al control (Cuadro 7, 8 y 9). Sin embargo se observó una tendencia a aumentar la altura con todas las cepas al día 10 con respecto al control, al día 20 con las cepas SS2-10 y R4-11, y al día 30 y 40 con las cepas SR2-6 y SS2-10. Se aumentó la clorofila total al día 20 con la cepa SR2-6 y al día 30 y 40 con todas las cepas excepto con SR1-9. El peso fresco y seco aumento al día 20 con las cepas R4-11, SR2-6 y SS2-10, al día 30 con SR2-6 y SS2-10 y al día 40 con la cepa SS2-10. La cepa SR1-9, inhibió el crecimiento del cultivo de lechuga al reducir la altura en un 25%, 41.7% y 10.9% en los días 20, 30 y 40 respectivamente; el peso fresco se disminuyó en 40%, 85.1% y 50.7%; así como el peso seco en 34.3%, 78.8% y 58.2% a los 20, 30 y 40 días respectivamente como se presenta en la figura 11.



Figura 11. Tratamientos T1, T2, T3, T4 y T5 en condiciones salinas A) Al día 37 B) al día 51.

Cuadro 7. Altura de tallos de a los días 1, 10, 20, 30 y 40 a partir del trasplante.

Tratamiento	1	10	20	30	40
T1	3.875 a	7.881 b	11.700 c	17.692 b	20.938 a
T2	3.731 a	8.088 b	12.981 b	19.327 ab	20.629 a
T3	3.738 a	7.969 b	9.138 d	11.658 c	19.588 a
T4	3.756 a	9.081 a	15.075 a	21.408 a	22.425 a
T5	3.994 a	7.919 b	12.656 bc	20.400 ab	22.413 a
T6	4.000 a	7.700 b	12.200 bc	20.009 ab	22.000 a

*Medias entre columnas seguidas por la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey 0.05).

Cuadro 8. Cuantificación de clorofila total a los 20, 30 y 40 días.

Tratamiento	20	30	40
T1	36.627 c	36.290 a	36.666 c
T2	38.436 bc	37.880 a	41.004 abc
T3	35.948 c	41.640 a	41.831 abc
T4	42.631 a	42.281 a	45.081 a
T5	41.600 ab	41.960 a	42.563 ab
T6	42.700 a	37.518 a	37.679 bc

*Medias entre columnas seguidas por la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey 0.05).

Cuadro 9. Peso fresco y seco de lechugas en los días 20, 30 y 40.

Tratamiento	Peso fresco			Peso seco		
	20	30	40	20	30	40
T1	6.45 ab	27.37 b	54.23 bc	0.548 a	1.941 b	3.761 bc
T2	7.98 ab	29.02 b	74.62 ab	0.696 a	2.098 b	5.761 ab
T3	3.98 b	5.96 c	40.53 c	0.421 a	0.605 c	2.943 c
T4	8.88 a	46.30 a	71.46 ab	0.772 a	3.561 a	6.841 a
T5	7.68 ab	43.04 a	90.61 a	0.692 a	3.128 a	7.917 a
T6	6.64 ab	40.14 ab	82.29 a	0.641 a	2.864 ab	7.054 a

*Medias entre columnas seguidas por la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey 0.05).

El tratamiento 4 y 5 que corresponde a las cepas SR2-6 y SS2-10 respectivamente, fueron capaces de promover el crecimiento vegetal en el cultivo de lechuga bajo condiciones salinas, por lo que fueron seleccionadas para los siguientes experimentos.

8.5. Capacidades de promoción de crecimiento in vitro

8.5.1. Solubilización de fosfatos

Se probaron 3 fosfatos AlO_4P , $\text{Ca}_3(\text{PO})_3$ y FeO_4P insolubles con las 2 cepas seleccionadas que presentaron capacidad de promoción de crecimiento en el cultivo de lechuga. En las dos cepas estudiadas no se observó un halo en el área de crecimiento bacteriano o en la periferia lo que indica que no hubo solubilización de los fosfatos insolubles, la cepa control solubilizo solo el fosfato tricálcico como se muestra en el cuadro 10.

Cuadro 10. Solubilización de fosfatos insolubles.

Cepa	AlO_4P	$\text{Ca}_3(\text{PO})_3$	FeO_4P
SR2-6	-	-	-
SS2-10	-	-	-
Control positivo	-	+	-

8.5.2. Producción de índoles totales

Se construyó una curva estándar con las absorbencias obtenidas a 530 nm contra concentraciones conocidas de AIA (Figura 12), la curva muestra una dispersión homogénea con un valor de $r^2=0.9822$ y mediante esta curva se calculó cada una de las concentraciones en ppm de AIA liberado durante el crecimiento de cada cepa en los cuatro diferentes medios, utilizando la siguiente ecuación $y=0.0161x + 0.034$ (Figura 13).

En el cuadro 11 se presentan las producciones de AIA en ppm de las cepas SS2-10, SR2-6 y una cepa control. Las cepas SS2-10 Y SR2-6 presentaron producciones similares de AIA, los valores de la producción de la fitohormona entre los diferentes medios fueron significativamente diferentes obteniéndose una

mayor cantidad en los medios con nitrógeno (CN) con respecto al medio de Burk's. En ambos medios se produjo una mayor cantidad en ppm en los medios adicionados con L-triptófano. Mientras que en la cepa control los medios adicionados con L-triptófano fueron los que produjeron más concentración de AIA indistintamente del medio utilizado.

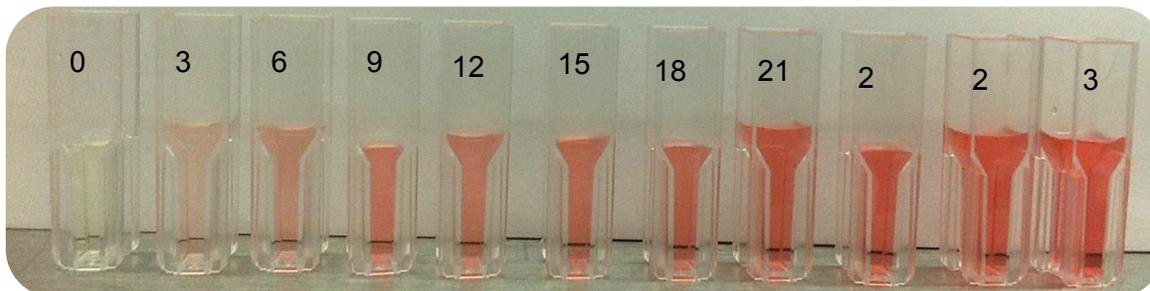


Figura 12. Curva patrón de AIA en ppm (técnica de Salkowsky).

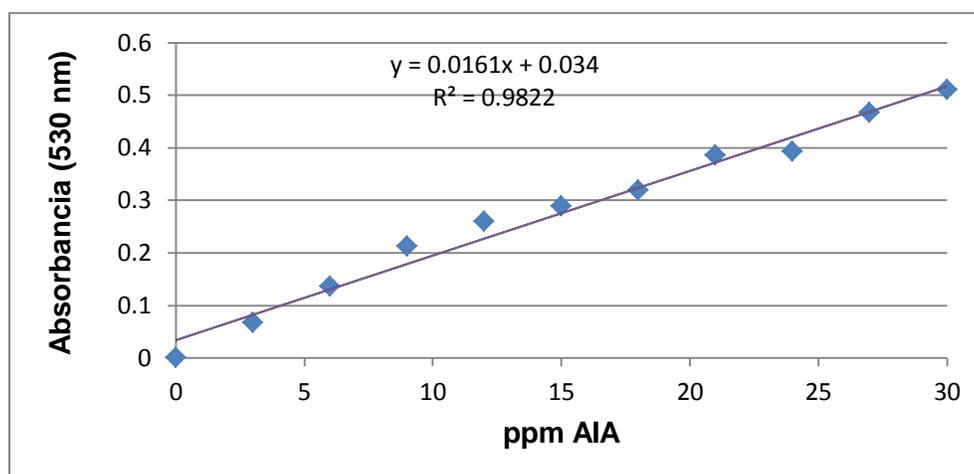


Figura 13. Curva patrón de AIA y línea de tendencia.

Cuadro 11. Concentración de AIA en ppm

Cepa	SR2-6	SS2-10	Control
CN + T	5.403 a	5.569 a	7.515 a
CN	2.795 b	2.732 b	1.656 b
Burk's + T	2.401 c	2.194 c	9.233 a
Burk's	1.614 d	1.821 d	1.739 b

*+ T= Medios adicionados con Triptófano. *Medias entre columnas seguidas por la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey 0.05).

8.5. Caracterización y determinación de cepas bacterianas

8.5.1. Caracterización morfológica

En la morfología colonial las cepas SR2-6 y SS2-10 fueron similares en todos los aspectos evaluados como se muestra en el cuadro 12 a excepción del tamaño de la colonia en la cual solo variaron por 0.002 mm (Figura 14). En la morfología celular y tinción de Gram fueron similares, siendo Gram positivas, con forma de coco y agrupación en racimos de forma irregular; el tamaño de la célula de SR2-6 fue de 1.28 μm , mientras que de SS2-10 fue 1.34 μm , las células individuales muestran variación en el tamaño (Cuadro 13 y Figura 15).

Cuadro 12. Morfología colonial de las cepas SR2-6 y SS2-10.

Características	SR2-6	SS2-10
Tamaño colonia	0.015 mm	0.017 mm
Forma	Irregular	Irregular
Elevación	Crateriforme	Crateriforme
Borde	Irregular	Irregular
Color	Crema	Crema
Superficie	Mate	Mate
Densidad	Opaca	Opaca
Consistencia	Cremosa	Cremosa

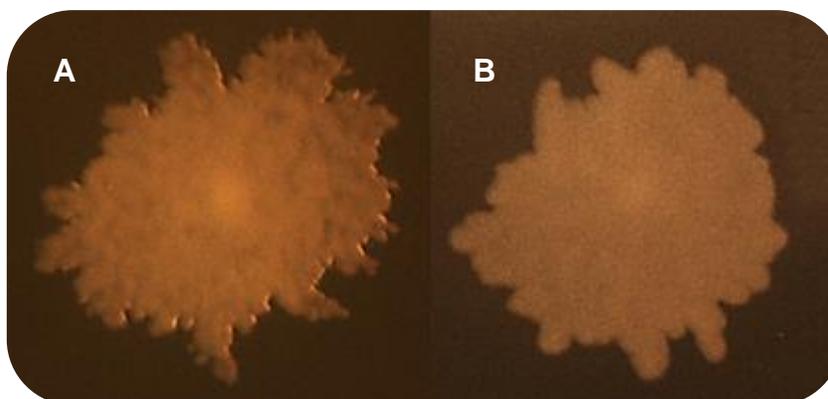


Figura 14. Colonias de las cepas seleccionadas. A) cepa SR2-6. B) cepa SS2-10.

Cuadro 13. Morfología celular y tinción de Gram de las cepas SR2-6 y SS2-10.

Características	SR2-6	SS2-10
Tinción Gram	+	+
Forma celular	Cocos	Cocos
Agrupación	Racimos	Racimos
Tamaño célula	1.28 μm	1.34 μm

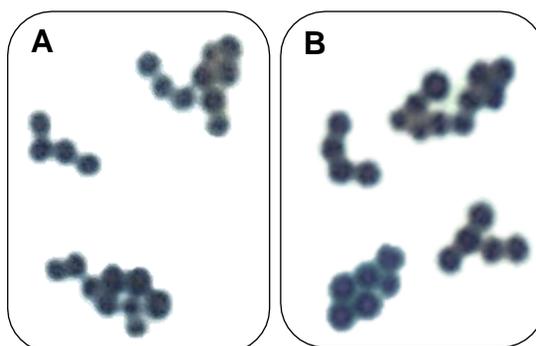


Figura 15. Cocos Gram positivos de las cepas seleccionadas (Objetivo 100X) A) cepa SR2-6. B) cepa SS2-10.

8.5.2. Resistencia a antibióticos

Las cepas estudiadas mostraron diferente perfil de sensibilidad. La cepa SR2-6 fue resistencia a Ampicilina y Penicilina; intermedio a Ceftriaxona y a los demás antibióticos fue sensible. Mientras que SS2-10 mostró resistencia a Ampicilina, Dicloxacilina y Penicilina; intermedio a Ceftriaxona y Eritromicina; y sensible a los demás antibióticos como se muestra en el cuadro 14. En la figura 16 se muestra el antibiograma después de 24 h de incubación en donde se pueden observar los halos de inhibición. Los valores en mm de los halos se pueden ver en el anexo 9.



Figura 16. Antibiogramas después de 24 h de incubación en donde se observan los halos de inhibición. A) SR2-6. B) SS2-10.

Cuadro14. Perfil de sensibilidad antimicrobiana de las cepas SR2-6 y SS2-10.

Antibiótico	Abreviación	Concentración	SR2-6	SS2-10
Amikacina	AK	30 µg	S	S
Ampicilina	AM	10 µg	R	R
Cafalotina	CF	30 µg	S	S
Ceftriaxona	CRO	30 µg	I	I
Cloranfenicol	CL	30 µg	S	S
Dicloxacilina	DC	1 µg	S	R
Enoxacina	ENX	10 µg	S	S
Eritromicina	E	15 µg	S	I
Gentamicina	GE	10 µg	S	S
Netilmicina	NET	30 µg	S	S
Penicilina	PE	10 U	R	R
Trimetoprim-sulfametoxazol	SXT	25 µg	S	S

*R: resistente. I: intermedio. S: sensible

8.5.3. Caracterización bioquímica e identificación

Las cepas estudiadas mostraron un comportamiento similar en el metabolismo bacteriano con las pruebas bioquímicas convencionales como se muestra en el cuadro 15, lo que indicó que se trata del género *Staphylococcus*.

Se corrobora dichos resultados mediante el método de identificación Api Staph con el cual se determinó la especie. Los resultados de los perfiles bioquímicos se observan en el cuadro 16, mediante el software del programa apiweb de Biomeriux®, se identificó que ambas cepas eran *Staphylococcus xylosus* con un 99.5% de identidad.

Cuadro 15. Pruebas bioquímicas convencionales.

Prueba bioquímica	SR2-6	SS2-10
Fermentación de manitol	+	+
Catalasa	+	+
Oxidasa	-	-
Coagulasa	-	-
Esculina	-	-
Movilidad	-	-
Ornitina	-	-
Indol	-	-
Hemólisis	Gamma	Gamma

Cuadro 16. Resultados de identificación con el sistema API Staph.

Prueba	SR2-6	SS2-10
0	-	-
GLU	+	+
FRU	+	+
MNE	+	+
MAL	+	+

LAC	-	-
TRE	+	+
MAN	+	+
XLT	-	-
MEL	-	-
NIT	+	+
PAL	-	-
VP	-	-
RAF	-	-
XYL	+	+
SAC	+	+
MDG	-	-
NAG	+	+
ADH	-	-
URE	+	+
Nombre científico	<i>Staphylococcus xylosus</i>	
% ID	99.5	

*ID= identificación

8.5.4. Curva de crecimiento

Los resultados de las curvas de crecimiento en base a la absorbancia y UFC Log₁₀ se pueden observar en las figuras 17 y 18. Se observó que la curva en base a la absorbancia muestra que ambas cepas presentaron un comportamiento similar, en donde la fase exponencial terminó alrededor de las 12 h. En la curva en base a las UFC se observó que las cepas se comportaron de forma similar hasta las 18 h. Las cepas se adaptaron muy rápido al medio de cultivo por lo que la fase de latencia duro menos de dos h; la fase exponencial termino a las 12 h. La cepa SR2-6 concluyó la fase estacionaria a las 24 h para después entrar a la fase de muerte. La cepa SS2-10 permaneció en la fase estacionaria hasta las 32 h. El mismo comportamiento se observó tanto en las lecturas de absorbancias como en la cuantificación de UFC por mL.

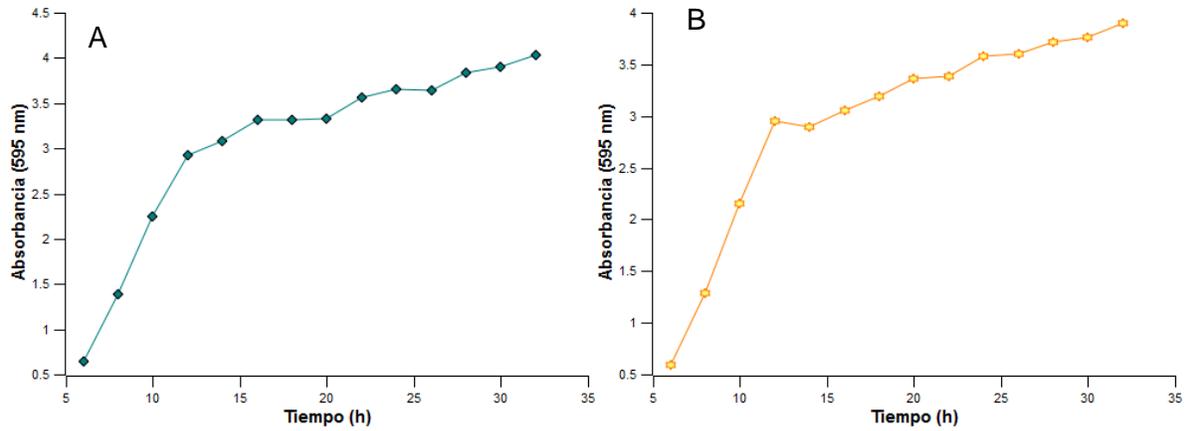


Figura 17. Absorbancia de cepas cultivadas en CST a 37 °C por 32 h. A) cepa SR2-6. B) cepa SS2-10.

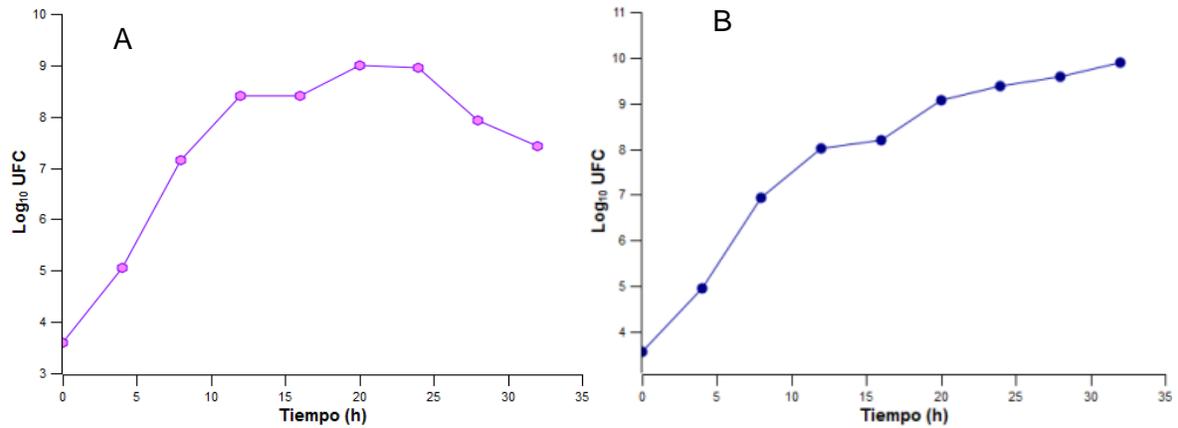


Figura 18. Número de UFC Log₁₀ de cepas cultivada en CST a 37 °C por 32 h. A) cepa SR2-6. B) cepa SS2-10.

9. DISCUSIÓN

La Laguna de Sayula corresponde a un inmenso llano de suelos salinos, en su gran mayoría la Laguna presenta la unidad de suelo denominada Solanchak, este tipo de suelo tiene alto contenido de sales en todo o en algunas partes del suelo. Mientras que la localidad de Usmajac, Sayula presenta suelo Feozem háplico que presenta una fase química moderadamente salina y tiene una capa superficial de materia orgánica y nutrientes (González, 2009; INEGI, 2004). En el caso de la Laguna de Sayula la CE tuvo un promedio de 6.75 y el pH 9.75 lo que concuerda con el tipo de suelo reportado para este sitio. Mientras que para Usmajac la CE fue de 0.42, mucho más baja de lo esperado y con un pH cercano a 6.5 que según la FAO (s.f) es el valor ideal para los cultivos agrícolas, esto pudo ser debido a que previamente se habían hecho enmiendas con abonos, que de acuerdo con Serrato *et al.* (2002) la utilización de estiércol y abonos reduce las sales del suelo.

Según datos de la SEDESOL (2012) la conformación del suelo en Tecomán, Colima presenta características muy complejas y heterogéneas ya que se encuentran aproximadamente 55 tipos de suelos, siendo más salino en las costas. Las muestras colectadas en Tecomán, Colima no estaban cercanas a las costas por lo que la CE presentó valores bajos de 0.08 hasta 0.28 dS/m, sin embargo, el pH en tres de las muestras fue fuertemente alcalino lo que es característico de los suelos no salinos sódicos que presentan pH arriba de 8.5 (Thompson & Troeh, 1988), este tipo de suelos crean problemas químicos como la reducción de la disponibilidad de fósforo, potasio y de la mayoría de los micronutrientes; por otro lado, los problemas físicos que origina son valores bajos de permeabilidad lo que imposibilita el crecimiento de las plantas (Rueda *et al.*, 2009).

Se encontró que la mayoría de las bacterias que se aislaron de suelos y rizósfera salinos presentaron actividad ACC desaminasa (87y 91% respectivamente), lo que concuerda con Saleem (2007) que menciona que la presencia de ACC desaminasa es relativamente común en los microorganismos del suelo. Además Blaha *et al.* (2006) encontraron la actividad/genes ACC desaminasa en encontrados en un amplio rango de bacterias. Abduelafez (2002) describió la gran

diversidad y abundancia de bacterias ACC desaminasa autóctonas cultivables en la rizósfera de plantas de trigo.

Las bacterias halotolerantes son un grupo de bacterias capaces de crecer bien en medios que contienen un rango amplio de NaCl (1%-33%) (Larsen, 1986). Las cepas aisladas en el presente estudio crecieron en rangos de 3% al 18% de NaCl por lo que entran en el grupo de bacterias halotolerantes. Se observó que el porcentaje de cepas tolerantes a sales disminuye cuando la salinidad aumenta lo que concuerda con un estudio hecho por Ramadoss *et al.* (2013) en donde del total de cepas aisladas 92.8%, 70%, 32% y 25% crecieron en 5, 10, 15 y 20% de NaCl respectivamente. Mientras que en este estudio el 15%, 2.8% y el 1.5% de las cepas aisladas crecieron en 10, 15 y 18% de NaCl respectivamente. Las cepas que toleraron mayores concentraciones 18% de sal correspondían a las muestras de suelo y rizósfera colectadas en la Laguna de Sayula que fue el único sitio clasificado como suelo salino en base a la CE, este comportamiento puede deberse a la naturalización en los ambientes salinos (Ramadoss *et al.*, 2013), existen reportes que indican que las bacterias aisladas de ambientes salinos sobreviven más a las concentraciones inhibitorias de sal que las aisladas de suelos no salinos (Upadhyay *et al.*, 2009).

En cuanto a la germinación se observó que a 0 y 80 mM de NaCl algunas cepas que disminuyeron el número de semillas germinadas con respecto al control, lo que concuerda con Díaz *et al.* (2001), quien reportó que del total de cepas inoculadas en semillas de lechuga 10% no tuvieron efecto y 13.3% disminuyeron el porcentaje de germinación. Se observó que en ausencia de NaCl las cepas no presentaron un efecto significativo en la germinación, datos similares fueron obtenidos por Chookietwattana & Maneewan (2012) quienes inocularon cepas tolerantes a sales con actividad de ACC desaminasa en semillas de tomate y no encontraron diferencias significativas en el porcentaje de germinación a la concentración de 0 mM de NaCl. Las cepas estudiadas aumentaron de forma significativa el número de semillas germinadas solo en condiciones de salinidad, esto debido a que las PGPB generalmente tienen poco o no cuantificable efecto

en el crecimiento de las plantas cuando estas están en ausencia de factores de estrés (Gamalero *et al.*, 2009). En un estudio hecho por Barassi *et al.* (2006) semillas de lechuga inoculadas con *Azospirillum* aumentaron en 87.5% el porcentaje de germinación en concentraciones de 80 mM de NaCl a los 7 días, mientras que en este estudio se logró aumentar en un 63.1% el número de semillas germinadas a las mismas condiciones, el efecto benéfico en la germinación bajo condiciones salinas pudo ser debido a la reducción en los niveles de etileno por efecto de la actividad ACC desaminasa en la semilla, lo que aumentaría su germinación, y junto con la producción de AIA estimularía la división celular, para así favorecer el inicio del crecimiento del embrión (Lubna *et al.*, 2013).

En el experimento de crecimiento vegetal las plantas de lechuga inoculadas con las cepas SR2-6 y SS2-10 aumentaron la altura, la clorofila, el peso fresco y seco del cultivo de lechuga en condiciones de salinidad (80 mM) en un 1.8, 13.9, 9.1 y 10.9% respectivamente con respecto al control. En un cultivo de lechugas en condiciones salinas (7 dS/m) Han & Lee (2005) observaron un incremento en el peso fresco y seco de 6.8-12.9 %, así como en la cantidad de clorofila en los tratamientos inoculados con PGPB comparado con el control no inoculado. Mayak *et al.* (2004) reportaron que cepas de *Achromobacter peichaudii* ARV8 productoras de ACC desaminasa incrementaron el peso fresco y seco de plántulas de tomate crecida en presencia de 172 mM NaCl. Plantas de trigo en condiciones de salinidad (15 dS/m), aumentaron el crecimiento y el rendimiento al ser inoculadas con cepas ACC desaminasa (Nadeem *et al.*, 2010). El papel de las PGPB con actividad ACC desaminasa que promueven la tolerancia a la salinidad en plantas ha sido reportada en diversas investigaciones en estudios donde semillas o plantas fueron inoculadas con este tipo de bacterias (Nadeem *et al.*, 2012).

La cepa SR1-9 no favoreció el crecimiento vegetal, ya que disminuyó la altura, peso fresco y seco en un 10.9, 50.7 y 58.2% respectivamente con respecto al control. Lo que concuerda con Afrasayab *et al.* (2010) que observó que algunas cepas resistentes a sales redujeron el crecimiento del tallo en plántulas de trigo. El

bajo o nulo efecto de las cepas SR1-9, R4-3 y R4-11 en el crecimiento del cultivo de lechuga pudo deberse a que las cepas no encontraron el medio adecuado en la rizósfera, ya que, en general, para que los microorganismos puedan asociarse íntimamente con las raíces, tienen que evadir los mecanismos de defensa de la planta y encontrar condiciones nutritivas y ambientales adecuadas para su crecimiento, se sabe que los exudados vegetales son esenciales para la asociación de bacterias con la rizósfera de las plantas estas pueden depositar metabolitos secundarios en la rizósfera que atraen o inhiben el crecimiento de microorganismos específicos (Díaz *et al.*, 2001; Bais *et al.*, 2006; Lucy *et al.*, 2004).

La cepa SR1-9 tuvo la capacidad de aumentar la germinación en concentraciones salinas, pero redujo el desarrollo vegetal, lo que podría indicar que el efecto benéfico de esta cepa podría estar relacionado con el estado fenológico de la planta, ya que hay estudios que sugieren que las plantas pueden seleccionar un subconjunto de microorganismos en diferentes estados del desarrollo, presumiblemente por funciones específicas (Chaparro *et al.*, 2014).

Entender los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal es importante cuando se decide el tipo de bacteria que será utilizado en una planta ante una situación determinada, por ejemplo las bacterias con ACC desaminasa son más efectivas en plantas que son susceptibles al efecto del etileno como en las condiciones de estrés (Lucy *et al.*, 2004). En el presente estudio las cepas SR2-6 y SS2-10 seleccionadas por su capacidad para promover el crecimiento vegetal bajo condiciones salinas, presentaron la capacidad de producir la enzima ACC desaminasa, producción de AIA y crecimiento en medio Burk's carente de nitrógeno lo que indica la posibilidad de fijación de N₂, ya que este medio ha sido utilizado para el aislamiento y mantenimiento de bacterias fijadoras de nitrógeno (Stella & Suhaimi, 2010).

Las cepas SR2-6 y SS2-10 produjeron mayor cantidad de AIA en los medios con nitrógeno que sin nitrógeno, esto debido a que uno de los factores más importantes que impacta la producción de AIA es la fuente de nitrógeno, las

fuentes de nitrógeno orgánico promueven más la producción de AIA que fuentes inorgánicas. La producción de AIA por microorganismos varía entre diferentes especies y cepas de la misma especie y está influenciada por las condiciones de cultivo, estado de crecimiento y disponibilidad de sustratos. El triptófano es el mayor efector de la biosíntesis de AIA, ya que la mayoría de las vías para la biosíntesis inician con triptófano (Duca *et al.*, 2014). Por este motivo en el presente estudio las cepas crecidas en medios adicionados con L-triptófano presentaron una mayor producción de AIA, lo que concuerda con diferentes estudios en donde las cepas probadas aumentaron significativamente la concentración de AIA en presencia de L-triptófano (Peña & Reyes, 2007; Akbari *et al.*, 2007; Zimmer & Bothe, 1988). La AIA promueve la síntesis de la ACC sintasa lo que incrementa la cantidad de etileno, que en cantidades muy elevadas inhibe el crecimiento vegetal, pero en combinación con bacterias ACC desaminasa, el efecto auto catalítico del etileno se reduce, permitiendo que el AIA pueda promover el crecimiento vegetal en condiciones de estrés (Arora *et al.*, 2012; Glick, 2012).

Los resultados de la caracterización morfológica y las pruebas bioquímicas convencionales nos permitieron determinar que las cepas SR2-6 y SS2-10 pertenecían al género *Staphylococcus*. Las especies de este género son conocidas como bacterias halotolerantes que pueden habitar en diferentes ambientes salinos. En estudios hechos en suelos salinos, 66.7% de las bacterias aisladas Gram-Positivas fueron especies de *Staphylococcus* (Hassan & Mahgoub, 2011). Y en aislados de minas salinas del estado de Ebonyi, Nigeria encontraron frecuencias del 23.5% de especies de *Staphylococcus* (Anyim *et al.*, 2012).

En nuestro estudio las cepas SR2-6 y SS2-10 fueron identificadas como *Staphylococcus xilosus*. Esta especie es una bacteria ubicua, que puede ser encontrada en varios nichos, y persiste en suelos y superficies. Adicionalmente a su habilidad de formar biofilms, su ubicuidad puede ser explicada por su habilidad para adaptarse a diferentes ambientes (Dordet *et al.*, 2007). Es definida como un *Staphylococcus* no patogénico pero unas pocas cepas son potencialmente peligrosas y están relacionadas con infecciones oportunistas en animales y

humanos (Winn *et al.*, 2013). En diferentes estudios esta especie se ha encontrado asociada con suelos salinos y diversas especies de plantas. Fue encontrada en suelos salinos en Egipto y en el lago salado de Sambhar en la India (Hassan & Mahgoub, 2011; Kumar *et al.*, 2012b). Se encontró de forma endófito en metaxilema y coronilla de raíces de zanahoria (Surette *et al.*, 2003) y en tallos de papa (Reiter *et al.*, 2002); así como en nódulos de raíces de leguminosas silvestres (Singha & Sharma, 2013). En un estudio hecho por Afrasayab *et al.* (2010) la inoculación de *S. xilosus* (aislado de la rizósfera de *Mazus* sp) en plantas de trigo en condiciones de salinidad (100 mM de NaCl) incremento la germinación de semillas, la longitud de las plántulas, peso fresco, contenido de humedad, auxinas y contenido de proteínas solubles.

Las características morfológicas celulares y las pruebas bioquímicas convencionales aisladas en el presente trabajo coinciden con Schleifer & Kloos (1975) que describieron por primera vez la especie *S. xilosus*. Sin embargo, en la morfología colonial hubo diferencias en el diámetro de las colonias que tenían un promedio de 0.016 mm, mientras que los aislados descritos por Schleifer & Kloos eran de 5 a 10 mm de diámetro. Las cepas crecidas en AN presentan una coloración de crema a blanco lo que coincide con datos reportados por Janave & Sharma (2008).

Las pruebas de acidificación de lactosa, fosfatasa, producción de metil acetil carbinol y arginina dihidrolasa varían entre cepas de la misma especie (Schleifer & Kloos, 1975). Surpat *et al.* (2010) identificaron *S.xilosus* por medio del sistema API Staph, por lo que las pruebas antes mencionadas no coinciden con los resultados de las cepas SR2-6 y SS2-10.

La resistencia a antibióticos es uno de los más importantes criterios de persistencia y competición de las bacterias con otras bacterias en su habitat (Hassan & Mahgoub, 2011). Las cepas SR2-6 y SS2-10 variaron en el perfil de resistencia a antibióticos, esto pudo ser debido a que las bacterias pueden adquirir resistencia a los antimicrobianos a través de transferencia vertical u horizontal de información genética (Cuevas *et al.*, 2009). Las cepas fueron resistentes a más de

un antibiótico (penicilina, ampicilina y dicloxacilina), lo que concuerda con diferentes estudios (Al-Mathkhury *et al.*, 2012; Slaughter *et al.*, 2001; Hassan & Mahgoub, 2011; Surpat *et al.*, 2010; Schleifer & Kloos, 1975; Mikulášová *et al.*, 2014). La resistencia a múltiples antibióticos de las cepas estudiadas y en general de cepas aisladas de suelo y rizósfera puede ser debido a que los microorganismos de la rizósfera producen sustancias antibióticas, por lo que la presencia de genes de resistencia a antibióticos les puede conferir una ventaja frente a otros microorganismos (Berg *et al.*, 2005).

En la curva de crecimiento bacteriano en base a las UFC se observó que en las cepas SR2-6 y SS2-10 la fase de latencia fue corta con una duración de menos de dos horas, esto debido a que esta fase depende de la historia del cultivo, de las condiciones de crecimiento y el origen de las cepas, como las cepas previamente habían sido crecidas en el mismo medio y a la misma temperatura, ya se encontraban adaptadas a las condiciones del medio y por lo tanto presentaban los componentes esenciales para dividirse, lo que permitió que el crecimiento exponencial iniciara muy rápido. En la curva relativa a la absorbancia no fue posible observar la fase de muerte, debido a que esta técnica nos permite conocer la cantidad de biomasa y no el número de células viables, el complementar esta técnica con el vaciado en placa nos permitió conocer el número de células vivas y poder determinar el inicio de la fase de muerte, la cual solo se observó en la cepa SR2-6 a las 24 horas, en la otra cepa no fue posible establecer el inicio de esta fase debido a que hicieron falta realizar más recuentos por mayor tiempo (Madigan *et al.*, 2009).

En este estudio se hace evidente el potencial de las cepas SR2-6 y SS2-10 como inoculantes en la producción del cultivo de lechuga en sitios con problemas de salinidad. La aplicación de estos microorganismos benéficos de forma adecuada puede incrementar las opciones para tratar los problemas de crecimiento vegetal en sitios con altas concentraciones de sal, ofreciendo un tratamiento económico y simple y por otra parte contribuyendo a la agricultura sustentable.

10. CONCLUSIONES

- Se lograron aislar un total de 385 cepas de bacterias productores de ACC desaminasa. De las cuales 87% provenían de muestras de suelo y 91% de rizósfera.
- Fueron seleccionadas 14 cepas tolerantes a concentraciones iguales o mayores a 10% de NaCl provenientes de muestras de suelo y rizósfera colectadas en Sayula, Jalisco.
- Las cepas SR2-6 y SS2-10 fueron efectivas para promover el crecimiento del cultivo de lechuga en condiciones salinas, ya que mejoraron la germinación de semillas y aumentaron la altura, peso fresco, peso seco y clorofila total en presencia de NaCl.
- Las cepas SR2-6 y SS2-10 tienen la capacidad de producir ACC desaminasa, AIA y son potencialmente fijadoras de nitrógeno atmosférico. Por lo que podrían ser una herramienta útil para disminuir los efectos del estrés salino en plantas.
- Las dos cepas seleccionadas fueron identificadas como *S. xylosus*; en el perfil de antibióticos fueron resistente a ampicilina, penicilina y dicloxacilina; presentaron una fase de adaptación corta y llegaron a la fase exponencial a las 12 h.

11. PERSPECTIVAS

Medir la actividad enzimática de la ACC desaminasa en las cepas que promovieron el crecimiento vegetal del cultivo de lechuga en condiciones salinas.

Hacer la medición de AIA en los tejidos vegetales de lechugas sometidas a estrés salino tratadas con cepas productoras de ACC desaminasa.

Determinar si las cepas SR2-6 y SS2-10 de *S. xylosus* presentan factores de virulencia que puedan causar problemas en la salud, cuando son inoculadas en plantas.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Abduelafez, I. (2002). *The abundance of ACC desaminase-positive bacteria and their interaction with winter wheat in a Colorado soil*. Degree of Master. Colorado State University, Fort Collins, Colorado.
- Afrasayab, S., Faisal, M. & Hasnain, S. (2010). Comparative study of wild and transformed salt tolerant bacterial strains on *Triticum aestivum* growth under salt stress. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4), 946-955.
- Ahmad, F., Ahmad, I. & Khan, M. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 163(2), 173–81.
- Akbari, G. A., Arab, S. M., Alikhani, H. A., Allakdadi, I. & Arzanesh, M. H. (2007). Isolation and selection of indigenous *Azospirillum* spp. and the IAA of superior strains effects on wheat roots. *World Journal of Agricultural Sciences*, 3(4), 523-529.
- Ali, S., Charles, T. & Glick, B. (2014). Amelioration of high salinity stress damage by plant growth promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80,160-167.
- Al-Mathkhury, H., Flaih, M. & Tawfiq, H. (2012). Histopathological effects of *S. xylosus* peptidoglycan in comparison to *E. coli* lipopolysaccharide in the urinary tract of mice. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 42(1), 1278-1285.
- Aneela, R., Iftikhar, A., Muhammad, I. & Muhammad, J. (2012). Preliminary isolation and characterization of halotolerant and halophilic bacteria from salt mines of Karak, Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 44, 365-370.
- Anyim, C., Aneke, C., Orji, J., Nworie, O. & Egbule, U. (2012). Microbiological Examination and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from salt mining site in Ebonyi state. *Journal of Natural Sciences Research*, 2(7), 95-102.

- Arora, N., Tewari, S., Singh, S., Lal, N. & Maheshwari, D. (2012). PGPR for protection of plant health under saline conditions. En Maheshwari, D. (ed.). *Bacteria in Agrobiolology: Stress Management* (239-258). Berlin: Springer Berlin Heidelberg.
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S. & Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 233-266.
- Barassi, C., Ayrault, G., Creus, C., Sueldo, R. & Sobrero, M. (2006). Seed inoculation with *Azospirillum* mitigates NaCl effects on lettuce. *Scientia Horticulturae*, 109(1), 8–14.
- Barriuso, J., Ramos, S., Lucas, J., Lobo, A., García, V. & Gutiérrez, M. (2008) Ecology, Genetic Diversity and Screening Strategies of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). En Ahmad, I., Pichtel, J. & Hayat, S. (eds.) *Plant-Bacteria Interactions: Strategies and Techniques to Promote Plant Growth* (1-17). Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Bashan, Y. & Holguin, G. (1998). Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology & Biochemistry*, 30, 1225-1228.
- Berg, G., Eberl, L. & Hartmann, A. (2005). The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental Microbiology*, 7(11), 1673-1685.
- Blaaha, D., Prigent, C., Mirza, M. & Moenne, L. (2006). Phylogeny of the l-aminocyclopropane-l-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phyto-beneficial and pathogenic Proteobacteria and relation with strain biogeography. *FEMS Microbiology Ecology*, 56, 455-470.
- Bobadilla, S., Rivera, H. & Del Moral, B. (2010). Factores de competitividad del cultivo de lechuga en Santa María Jajalpa, Estado de México. *Análisis Económico*, 25(59), 143-154.

- Bruning, B. & Rozema, J. (2013). Symbiotic nitrogen fixation in legumes: Perspectives for saline agriculture. *Environmental and Experimental Botany*, 92, 134-143.
- Caballero, M. J. (2006). Microbiología agrícola e interacciones microbianas con plantas. *Revista Latinoamericana de microbiología*, 48(2), 154-161.
- Carranza, C., Lancho, O., Miranda, D. & Chaves, B. (2009). Análisis del crecimiento de lechuga (*Lactuca sativa* L.) "Batavia" cultivada en un suelo salino de la Sabana de Bogotá. *Agronomía Colombiana*, 27(1), 41-48.
- Chakraborty, U., Roy, S., Chakraborty, A., Dey, P. & Chakraborty, B. (2011). Plant Growth Promotion and Amelioration of Salinity Stress in Crop Plants by a Salt-Tolerant Bacterium. *Recent Research in Science and Technology*, 3(11), 61-70.
- Chaparro, J. M., Badri, D. V. & Vivanco, J. M. (2014). Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *The ISME journal*, 8(4), 790-803.
- Chookietwattana, K. & Maneewan, K. (2012). Selection of efficient salt-tolerant bacteria containing ACC deaminase for promotion of tomato growth under salinity stress. *Soil and Environment*, 31(1), 30-36.
- Criollo, P., Obando, M., Sánchez, M. & Bonilla R. (2012). Efecto de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) asociadas a *Pennisetum clandestinum* en el altiplano cundiboyacense. *Revista Corpoica*, 13(2), 189-195.
- Cuevas, L. O., León, J. E., Jiménez, M. E. & Chaidez, C. Q. (2009). Detección y resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* y *Salmonella* en agua y suelo agrícola. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32(2), 119-126.
- Davis, R., Subbarao, K., Raid, R. & Kurtz, E. (2002). *Plagas y enfermedades de la lechuga*. Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa.

- Dell'Amico, J. & Parra, M. (2005). Efecto del estrés por NaCl en el contenido de cloruros, el potencial osmótico real y el crecimiento de dos cultivares de tomate Cubanos. *Cultivos Tropicales*, 26(2), 39-44.
- Díaz, V., Ferrera, C., Almaraz, S. & González, G. (2001). Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. *Terra*, 19(4), 327-335.
- Dordet, F., Dorchies, G., De Araujo, C., Talon, R. & Leroy, S. (2007). Genomic diversity in *Staphylococcus xylosum*. *Applied and environmental microbiology*, 73(22), 7199-7209.
- Duca, D., Lorv, J., Patten, C., Rose, D. & Glick, B. (2014) Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106, 85-124.
- Dworkin, M. & Foster, J. (1958). Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. *Journal of Bacteriology*, 75, 592-601.
- Egamberdieva, D. (2009). Alleviation of salt stress by plant growth regulators and IAA producing bacteria in wheat. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31, 861-864.
- Esquivel, C., Gavilanes, R., Cruz, O. & Huante, P. (2013). Importancia agrobiotecnológica de la enzima ACC desaminasa en rizobacterias , una revisión. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(3), 251-258.
- Falcón, R. L. (2002). *Degradación del suelo: causas, procesos, evaluación e investigación*. Mérida, Venezuela: CIDIAT.
- FAO. (s.f.) *Propiedades del suelo*. Recuperado de <http://www.fao.org/soils-portal/levantamiento-de-suelos/propiedades-del-suelo/propiedadesquimicas/es/>.
- Gamalero, E., Berta, G. & Glick, B. (2009). The Use of Microorganisms to Facilitate the Growth of Plants in Saline Soils. En Khan, M., Zaidi, A. & Musarrat, J. (eds.). *Microbial Strategies for Crop Improvement* (1-22). Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- García, A. (2012). Criterios modernos para evaluación de la calidad del agua para riego. *International Plant Nutrition Institute*, 6, 26-34.
- Glick, B. R. (2005). Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters*, 251(1), 1-7.
- Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012, 1-15.
- Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169(1), 30-9.
- Glick, B. R., B. Todorovic, J. Czarny, Z. Cheng, Duan, J. & McConkey, B. (2007). Promotion of Plant Growth by Bacterial ACC Deaminase. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 26, 227-242.
- Glick, B., Penrose, D. & Li, J. (1998). A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology*, 190(1), 63-8.
- Glickmann, E. & Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2), 793-796.
- Gómez, A. (1987). *Cultivo de lechuga iceberg*. Valencia: Generalitat Valenciana.
- Gontia, M., Sasidharan, S. & Tiwari, S. (2014). Recent developments in use of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase for conferring tolerance to biotic and abiotic stress. *Biotechnology Letters*, 36(5), 889–98.
- González, E. (2009). *Restauración ecológica comunitaria participativa de la Laguna de Sayula: Investigación, planeación y capacitación para la conservación de las aves acuáticas*. (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México.

- Govindasamy, V., Senthilkumar, M., Mageshwaran, V. & Annapurna, K. (2009). Detection and characterization of ACC deaminase in Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Journal of Plant Biochemistry & Biotechnology*, 18(1), 71-76.
- Goykovic, C. & Saavedra, R. (2007). Algunos efectos de la salinidad en el cultivo del tomate y prácticas agronómicas de su manejo. *IDESIA*, 25(3), 47-58.
- Gutiérrez, G. (2010). *Detección y caracterización del gen 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa (acdS) en cepas de Frankia sp.* Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.
- Han, H. S. & Lee, K. D. (2005). Plant Growth Promoting Rhizobacteria Effect on Antioxidant Status, Photosynthesis, Mineral Uptake and Growth of Lettuce under Soil Salinity. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 1(3), 210-215.
- Hassan, A. & Mahgoub, S. (2011). Salt inducible-proteins and conjugal gene transfer of halotolerant *Staphylococcus* isolated from salinity soil. *Egyptian journal of genetics and cytology*, 40, 263-280.
- Holguin, G., Bashan, Y., Puente, E., Carrillo, A., Bethlenfalvai, G., Rojas, A., Vázquez, P., Toledo, G., Jiménez, M. B., Glick, B. R., González, L., Lebsky, V., Moreno, M. & Hernández, J. P. (2003). Promoción del crecimiento en plantas por bacterias de la rizósfera. *Agricultura Técnica en México*, 29 (2), 201-211.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H., Staley, J.T. & Williams, S.T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore, Maryland: The Williams and Wilkins Company.
- INEGI. (2004). *Guía para la Interpretación de Cartografía Edafología*. Recuperado de <http://www.inegi.org.mx/inegi/SPC/doc/INTERNET/EDAFI.pdf>
- Janave, M. & Sharma, A. (2008). Spongy tissue development in Alphonso mango: association with *Staphylococcus xylosum*. *European journal of plant pathology*, 122(3), 335-348.

- Kang, B., Kim, W., Yun, H. & Chang, S. (2010). Use of plant growth-promoting rhizobacteria to control stress responses of plant roots. *Plant Biotechnology Reports*, 4, 179-183.
- Karthikeyan, B., Manoharan, M. J., Rashedul, I. & Sa, T. (2012). ACC deaminase containing diazotrophic endophytic bacteria ameliorate salt stress in *Catharanthus roseus* through reduced ethylene levels and induction of antioxidative defense systems. *Symbiosis*, 56, 77-86.
- Kumar, A., Kumar, A., Devi, S., Patil, S., Payal, C. & Negi, S. (2012a). Isolation, screening and characterization of bacteria from Rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities : an in vitro study. *Recent Research in Science and Technology*, 4(1), 1-5.
- Kumar, S., Karan, R., Kapoor, S., Singh, S. P., & Khare, S. K. (2012b). Screening and isolation of halophilic bacteria producing industrially important enzymes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1595-1603.
- Lamz, P. & González, C. (2013). La salinidad como problema en la agricultura. *Cultivos Tropicales*, 34(4), 31-42.
- Lara, C., Esquivel, A. & Negrete, P. (2011). Bacterias nativas solubilizadores de fosfatos para incrementar los cultivos en el Departamento de Córdoba-Colombia. *Bioteconología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 9(2), 114-120.
- Larsen, H. (1986). Halophilic and halotolerant microorganisms-an overview and historical perspective. *FEMS Microbiology Reviews*, 39, 3-7.
- Leidi, E. & Pardo, J. (2002). Tolerancia de los cultivos al estrés salino: qué hay de nuevo. *Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 2, 70-91.
- Lesmes, R., Molano, A., Miranda, D. & Chaves, B. (2007). Evaluación de concentraciones de sal (NaCl) en el agua de riego sobre el crecimiento de

- lechuga "Batavia" (*Lactuca sativa* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 1(2), 222-235.
- Lubna, R., Asma, I., Fathia, M. & Fauzia, Y. (2013). Salt-tolerant PGPR strain *Planococcus rifietoensis* promotes the growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivated in saline soil. *Pakistan Journal of Botany*, 45(6), 1955-1962.
- Lucy, M., Reed, E. & Glick, B. R. (2004). Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86(1), 1-25.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. & Clark, D. (2009). *Biología de los Microorganismos*. Madrid, España: Pearson Education/Prentice Hall.
- Malik, K., Bilal, R., Rasul, G., Mahmood, K. & Sajjad, M. (1991). Associative N₂-fixation in plants growing in saline sodic soils and its relative quantification based on ¹⁵N natural abundance. *Plant and Soil*, 137(1), 67-74.
- Mayak, S., Tirosh, T. & Glick, B. (2004). Plant growth-promoting bacteria that confer resistance in tomato to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42, 565-572
- Mikulášová, M., Valáriková, J., Dušínský, R., Chovanová, R. & Belicová, A. (2014). Multiresistance of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus equorum* from Slovak Bryndza cheese. *Folia microbiológica*, 59(3), 223-227
- Montesdeoca, P. (2009). *Caracterización física, química y funcional de la lechuga rizada (Lactuca sativa variedad crispera), para la creación de una norma técnica ecuatoriana, por parte del instituto ecuatoriano de normalización*. Tesis de licenciatura. Universidad Tecnológica Equinoccial, Quito, Ecuador.
- Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist*, 167(3), 645-663.
- Nadeem, S., Shaharoonab, B., Arshadb, M. & Crowleyc, D. (2012). Population density and functional diversity of plant growth promoting rhizobacteria

- associated with avocado trees in saline soils. *Applied Soil Ecology*, 62, 147–154.
- Nadeem, S., Zahir Z., Naveed, M., Asghar, H. & Arshad, M. (2010). Rhizobacteria Capable of Producing ACC-deaminase May Mitigate Salt Stress in Wheat. *Soil Science Society of America Journal*, 74, 533-542.
- Peña, H. & Reyes, I. (2007). Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Interciencia*, 32(8), 560-565.
- Penrose, D. M. & Glick, B. R. (2003). Technical focus Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum*, 118, 10-15.
- Proaño, S., Cioppo, M. & Correa, M. (2004). *La salinidad de los suelos y su efecto en la agricultura*. Guayaquil: Universidad Agrari-PROMSA MAG.
- Ramadoss, D., Lakkineni, V. K., Bose, P., Ali, S. & Annapurna, K. (2013). Mitigation of salt stress in wheat seedlings by halotolerant bacteria isolated from saline habitats. *Springer Plus*, 2(1), 6.
- Reiter, B., Pfeifer, U., Schwab, H. & Sessitsch, A. (2002). Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2261-2268.
- Rueda, P., Barrón, H., Preciado, R., López, R., Murillo, A., García, H., Tarazón, H. & Troyo, D. (2009). *La salinidad: ¿un problema o una opción para la agricultura?*. México: Plaza y Valdés S.A. de C.V.
- Saghir, K. M., Zaidi, A. & Musarrat, J. (Ed). (2009). *Microbial Strategies for Crop Improvement*. London New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Saharan, B. & Nehra, V. (2011). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research*, 2011, 1-30.

- Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S. & Bhatti, A. (2007). Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34, 635-648.
- Sarabia, O. M., Madrigal, P., Martínez, T. & Carreón, A. (2010). Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Biológicas*, 12(1), 65-71.
- Saravanakumar, D. & Samiyappan, R. (2007) ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) plants. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 1283-1292.
- Schleifer, K. & Kloos, W. (1975). Isolation and characterization of Staphylococci from Human Skin. I. Amended descriptions of *Staphylococcus epidermis* and *Staphylococcus saprophyticus* and descriptions of three new species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus*, and *Staphylococcus xylosus*. *International Journal of Systematic Bacteriology* Jan, 25(1), 50-61.
- Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Análisis de agua - Determinación de la conductividad electrolítica. - Método de prueba. Norma Mexicana (NMX) NMX-AA-093-SCFI-2000. 18 de diciembre 2000.
- Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Análisis de agua – Determinación del pH - Método de prueba. Norma Mexicana (NMX) NMX-AA-008-SCFI-2011. Diario Oficial de la Federación. 5 noviembre 2011.
- SEDESOL. (2012). *Actualización de Atlas Municipal de Riesgos por Amenazas Naturales (Geológicas e Hidrometeorológicas) del Municipio de Tecomán, Colima*. Recuperado de http://www.normateca.sedesol.gob.mx/work/models/SEDESOL/Resource/2612/Atlas_Estados/06009_TECOMAN/1_ATLAS_TECOMAN.pdf
- Serrato, S., Ortiz, A., Dimas, L. & Berúmen, P. (2002). Aplicación de lavado y estiercol para recuperar suelos salinos en la comarca lagunera, México. *TERRA*, 20(3), 329-336.

- Shahzad, S., Arif, M., Riaz, M., Iqbal, Z. & Ashraf, M. (2013). PGPR with varied ACC-deaminase activity induced different growth and yield response in maize (*Zea mays* L.) under fertilized conditions. *European Journal of Soil Biology*, 57, 27-34.
- Siddikee, M., Chauhan, P., Anandham, R., Han, G. & Sa, T. (2010) Isolation, characterization, and use for plant growth promotion under salt stress, of ACC deaminase-producing halotolerant bacteria derived from coast soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 1577-1584.
- Siddikee, M., Glick, B., Chauhan, S., Yima, W. & Sayim, T. (2011). Enhancement of growth and salt tolerance of red pepper seedlings (*Capsicum annum* L.) by regulating stress ethylene synthesis with halotolerant bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase activity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49, 427-34.
- Singha, F. & Sharma, D. (2013). Biodiversity of Rhizospheric Soil Bacteria and Arbuscular Mycorrhizal (AM) Fungi in Some of The Wild Medicinal Legumes of Barak Valley. *Current World Environment*, 8(1), 123-126.
- Slaughter, D. M., Patton, T. G., Sievert, G., Sobieski, R. J. & Crupper, S. S. (2001). Antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci isolated from Cope's gray treefrogs (*Hyla chrysoscelis*). *FEMS microbiology letters*, 205(2), 265-270.
- Soni, A., Rokad, S. & Sharma, P. (2013). Screening of efficient halotolerant phosphate solubilizing bacteria and their effect on seed germination under saline conditions. *Journal of Scientific and Innovative Research*, 2(5), 932-937.
- Stella, M. & Suhaimi, M. (2010). Selection of suitable growth medium for free-living diazotrophs isolated from compost. *Journal of Tropical Agriculture and Food Science*, 38(2), 211-219.
- Surette, M., Sturz, A., Lada, R. & Nowak, J. (2003). Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. *sativus*): their localization, population

- density, biodiversity and their effects on plant growth. *Plant and Soil*, 253(2), 381-390.
- Surpat, A, Herman, V., Pascu, C., Costinar, L., Irimie, S., Văduva, I., Faur, B. & Serbescu, M. (2010). Isolation and characterization of *Staphylococcus xylosus* strain from sheep abortion. *Lucrări Stiintifice Medicină Veterinară*, 63(1), 115-117.
- Szymańska, S., Piernik, A. & Hryniewicz, K. (2013). Metabolic potential of microorganisms associated with the halophyte *Aster tripolium* L. in saline soils. *Ecological Questions*, 18(1), 9–19.
- Tapia, G. (2003). *Identificación de hongos micorrízicos arbusculares aislados de suelos salinos y su eficiencia en plantas de lechuga (Lactuca sativa L.)*. Tesis de doctorado. Universidad de Colima. Tecomán, Colima.
- Thompson, L. & Troeh, F. (1988). *Los suelos y su fertilidad*. España: Editorial REVERTÉ.
- Upadhyay, S., Singh, D. & Saikia, R. (2009). Genetic diversity of plant growth promoting rhizobacteria isolated from rhizospheric soil of wheat under saline condition. *Current microbiology*, 59(5), 489-496.
- Vallejo, C. & Estrada, S. (2004). *Producción de hortalizas de clima cálido*. Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Velarde, B. A. (2009). *Modulación del transporte iónico por las poliaminas y especies reactivas de oxígeno y su posible impacto en la respuesta al estrés salino*. Tesis de maestría. Universidad de Colima. Colima, Colima.
- Winn, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P. & Woods, G. (2013). *Koneman Diagnóstico microbiológico: Texto y atlas en color*. México: Editorial Médica Panamericana S.A. de C.V.

Yildirim, E., Turan, M. & Figen, D. (2008). Mitigation of salt stress in radish (*Raphanus Sativus* L.) by plant growth promoting rhizobacteria. *Roumanian Biotechnological Letters*, 13(5), 3933-3943.

Zimmer, W. & Bothe, H. (1988). The phytohormonal interactions between *Azospirillum* and wheat. *Plant and Soil*, 110, 239-247.

13. ANEXOS

Anexo 1. Medios de cultivo.

Agar soya tripticaseina

Formula en g/L

Peptona de caseína	15
Peptona de soya	5
Cloruro de sodio	5
Agar	15
pH final	7.3 ± 0.2

Agar nutritivo

Formula en g/L

Peptona de gelatina	5
Extracto de carne	3
Cloruro de sodio	8
Agar	15
pH final	7.3 ± 0.2

Medio de Burk's N-free

Formula en g/L

Glucosa	10
KH_2PO_4	0.41
K_2HPO_4	0.52
Na_2SO_4	0.05
CaCl_2	0.2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.005
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.0025
El pH se ajustó a	7.0 ± 0.1

Agar Mueller Hinton

Formula en g/L

Agar	17
Almidón	1.5
Infusión de carne de res	2
Peptona de caseína ácida	17.5
pH final	7.3 ± 0.1

Agar para métodos estándar

Formula en g/L

Peptona de Caseína	5
Extracto de Levadura	2.5
Dextrosa	1
Agar	15
pH final	7.0 ± 0.2

Agar de sal y manitol

Formula en g/L

Extracto de carne	1
Cloruro de sodio	75
D-manitol	10
Peptona especial	10
Rojo de fenol	0.025
Agar	15
pH final	7.4 ± 0.2

Medio MIO

Formula en g/L

Dextrosa	1
Extracto de levadura	3
L-Ornitina	5
Peptona de gelatina	10
Peptona de caseína	10
Púrpura de bromocresol	0.02
Agar	2

pH final 6.5 ± 0.2

Agar sangre

Formula en g/L

Extracto de levadura	5
Infusión de musculo cardiaco	2
Peptona de caseína	13
Cloruro de sodio	5
Agar	15

pH final 7.3 ± 0.2

El medio fue esterilizado y una vez enfriado a una temperatura alrededor de los 45-50 °C fue adicionada la sangre humana estéril al 5%.

Anexo 2. Preparación de la solución Steiner.

Se prepararon en 5 L de agua solución madre de nitratos, sulfatos y fosfatos en las cantidades siguientes:

Solución madre de nitratos:

- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 531 g de
- KNO_3 51.5 g de

Solución madre de sulfatos:

- MgSO₄ 246.9 g
- K₂SO₄ 130.8 g

Solución madre de fosfatos:

- KH₂PO₄ 64 g

Para preparar 50 L de solución Steiner al 100% se toman 500 mL de las soluciones madre anteriores, disolviendo por separado nitratos y sulfatos y luego juntando en la solución de fosfatos. Los micros S, B, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Zn fueron agregados de manera foliar.

Anexo 3. Diámetro del halo de inhibición en mm para establecer puntos de corte.

Antibiótico	Concentración	R	I	S
Amikacina	30 µg	≤ 14	15-16	≥17
Ampicilina	10 µg	≤28	-	≥29
Cafalotina	30 µg	≤14	15-17	≥18
Ceftriaxona	30 µg	≤13	14-20	≥21
Cloranfenicol	30 µg	≤12	13-17	≥18
Dicloxacilina	1 µg	≤10	11-12	≥13
Enoxacina	10 µg	≤14	15-17	≥18
Eritromicina	15 µg	≤13	14-17	≥18
Gentamicina	10 µg	≤12	13-14	≥15
Netilmicina	30 µg	≤12	13-14	≥15
Penicilina	10 U	≤28	-	≥29
Trimetoprim-sulfametoxazol	25 µg	≤10	11-15	≥16

*R: resistente. I: intermedio. S: sensible

Anexo 4. Parámetros de interpretación del sistema API® Staph (BioMérieux).

Prueba	Componente activo	Actividad	Resultados	
			Negativo	Positivo
0	Testigo negativo	Testigo negativo	Rojo	-
GLU	D-glucosa	Acidificación (glucosa)	Rojo	Amarillo
FRU	D-fructosa	Acidificación (fructosa)		
MNE	D-manosa	Acidificación (manosa)		
MAL	D-maltosa	Acidificación (maltosa)		
LAC	D-lactosa (origen bovino)	Acidificación (lactosa)		
TRE	D-thehalosa	Acidificación (thehalosa)		
MAN	D-manitol	Acidificación (manitol)		
XLT	Xilitol	Acidificación (Xilitol)		
MEL	D-melibiosa	Acidificación (melibiosa)		
NIT	Nitrato de potasio	Reducción de nitratos a nitritos		
PAL	β -naphthyl fosfato	Fosfatasa alcalina	amarillo	violeta
VP	Piruvato de sodio	Producción de metil acetil carbinol	Incoloro-rosa palo	Violeta-rosa
RAF	D-rafinosa	Acidificación (rafinosa)	rojo	amarillo
XYL	D-xylosa	Acidificación (xilosa)		
SAC	D-sacarosa	Acidificación (sacarosa)		
MDG	Methyl α -D-glucopyranoside	Acidificación (Methyl α -D-glucopyranoside)		
NAG	N-acetilglucosamina	Acidificación (N-acetilglucosamina)		
ADH	L-arginina	arginina dihidrolasa	amarillo	Naranja-rojo
URE	Urea	Ureasa	amarillo	Rojo-violeta

Anexo 5. Análisis de varianza de la altura de tallos de lechuga a los días 1, 10, 20, 30 y 40 a partir del trasplante.

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1 d	Entre grupos	1.269	5	.254	1.087	.373
	Dentro de grupos	21.011	90	.233		
	Total	22.280	95			
10 d	Entre grupos	19.364	5	3.873	5.370	.000
	Dentro de grupos	64.185	89	.721		
	Total	83.549	94			
20 d	Entre grupos	298.594	5	59.719	42.866	.000
	Dentro de grupos	123.991	89	1.393		
	Total	422.585	94			
30 d	Entre grupos	745.934	5	149.187	29.215	.000
	Dentro de grupos	326.818	64	5.107		
	Total	1072.752	69			
40 d	Entre grupos	51.076	5	10.215	2.245	.068
	Dentro de grupos	181.986	40	4.550		
	Total	233.061	45			

Anexo 6. Análisis de varianza de la cuantificación de clorofila total en lechuga a los días 20, 30 y 40.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
20 d	Entre grupos	731.591	5	146.318	11.377	.000
	Dentro de grupos	1144.604	89	12.861		
	Total	1876.195	94			
30 d	Entre grupos	414.619	5	82.924	.678	.642
	Dentro de grupos	7833.379	64	122.397		
	Total	8247.998	69			
40 d	Entre grupos	385.021	5	77.004	5.392	.001
	Dentro de grupos	571.269	40	14.282		
	Total	956.290	45			

Anexo 7. Análisis de varianza del peso fresco y seco de lechugas a los días 20, 30 y 40.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
20 F	Entre grupos	59.037	5	11.807	2.787	.047
	Dentro de grupos	80.481	19	4.236		
	Total	139.517	24			
20 S	Entre grupos	.320	5	.064	1.894	.143
	Dentro de grupos	.642	19	.034		
	Total	.963	24			
30 F	Entre grupos	4403.543	5	880.709	25.566	.000
	Dentro de grupos	620.078	18	34.449		
	Total	5023.621	23			
30 S	Entre grupos	22.441	5	4.488	23.058	.000
	Dentro de grupos	3.504	18	.195		
	Total	25.945	23			
40 F	Entre grupos	13463.108	5	2692.622	9.174	.000
	Dentro de grupos	11740.497	40	293.512		
	Total	25203.604	45			
40 S	Entre grupos	153.462	5	30.692	13.005	.000
	Dentro de grupos	94.399	40	2.360		
	Total	247.860	45			

F: Peso fresco S: Peso seco

Anexo 8. Análisis de varianza de la producción de AIA e índoles de las cepas SS2-10, SR2-6 y el control.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
SS2-10	Entre grupos	26.052	3	8.684	1800.778	.000
	Dentro de grupos	.039	8	.005		
	Total	26.090	11			
SR2-6	Entre grupos	24.254	3	8.085	3592.571	.000
	Dentro de grupos	.018	8	.002		
	Total	24.272	11			
Control	Entre grupos	138.188	3	46.063	37.764	.000
	Dentro de grupos	9.758	8	1.220		
	Total	147.945	11			

Anexo 9. Diámetro en mm de los halos de inhibición de las cepas SR2-6 y SS2-10.

Halo de inhibición (mm)			
Antibiótico	Concentración	SR2-6	SS2-10
AK	30 µg	26	26
AM	10 µg	22	22
CF	30 µg	38	36
CRO	30 µg	20	16
CL	30 µg	30	26
DC	1 µg	13	9
ENX	10 µg	22	21
E	15 µg	24	22
GE	10 µg	26	24
NET	30 µg	26	29
PE	10 U	16	16
SXT	25 µg	30	29