



**EDUCACIÓN**  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO  
NACIONAL DE MÉXICO®

Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MEXICO  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

**ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD DE BACTERIAS PROMOTORAS DE  
CRECIMIENTO VEGETAL ASOCIADAS A PLANTAS PIONERAS DEL  
VOLCÁN EL CHICHÓN**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGIA

PRESENTA:  
M.C. CLARA IVETTE RINCÓN MOLINA

DIRECTOR DE TESIS:  
DR. REINER RINCÓN ROSALES

CODIRECTORA:  
DRA. MARÍA ESPERANZA MARTÍNEZ ROMERO

**TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS, MÉXICO.**

**OCTUBRE 2020**



Carretera Panamericana Km. 1080, C. P. 29050, Apartado Postal 599, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.  
Tel. (961) 61 5 04 61, 61 5 01 38, 61 5 48 08 Ext. 325 e-mail: posgrado@ittg.edu.mx  
[www.tuxtla.tecnm.mx](http://www.tuxtla.tecnm.mx)



Fecha de Inicio: 2015.10.13  
Fecha de Último Ciclo: 2018.10.13  
Fecha de Restauración: 2018.10.22  
Fecha de Terminación: 2021.10.13



APOYAMOS  
EL PACTO GLOBAL



Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez  
División de Estudios de Posgrado e Investigación

"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas **21/septiembre/2020.**

OFICIO No. DEPI-583/2020.

**C. M.C. CLARA IVETTE RINCÓN MOLINA  
PASANTE DEL DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA  
EGRESADO DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ  
PRESENTE.**

Habiendo recibido la comunicación, por parte de los CC.DR. DR. REINER RINCÓN ROSALES, DRA. MARÍA ESPERANZA MARTINEZ ROMERO, DRA. NANCY RUIZ LAU, DR. VÍCTOR MANUEL RUIZ VALDIVIEZO, DR. JUAN JOSÉ VILLALOBOS MALDONADO, DR. EDUARDO RAYMUNDO GARRIDO RAMÍREZ, en el sentido de que se encuentra satisfactorio el contenido de la tesis denominada "Estudio de la diversidad de Bacterias promotoras de Crecimiento Vegetal asociadas a plantas pioneras del volcán El Chichón", elaborada por usted, como prueba escrita para obtener el Grado de Doctora en Ciencias de los Alimentos y Biotecnología, AUTORIZAMOS a que se proceda a la impresión de la misma.

SIN MAS POR EL MOMENTO ENVIO UN CORDIAL SALUDO.

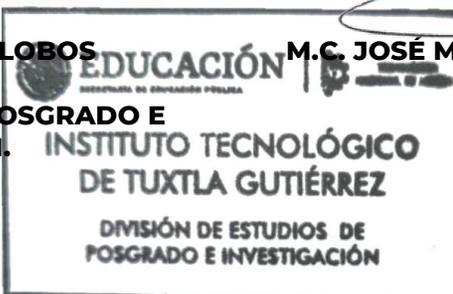
ATENTAMENTE.

Vo. Bo.

*Excelencia en Educación Tecnológica®  
"Ciencia y Tecnología con Sentido Humano"*

**DR. JUAN JOSÉ VILLALOBOS  
MALDONADO  
JEFE DE LA DIVISION DE POSGRADO E  
INVESTIGACION.**

**M.C. JOSÉ MANUEL ROSADO PÉREZ  
DIRECTOR.**



C.c.p. Servicios escolares  
C.c.p. Archivo



## CONTENIDO

	PAGINA
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>5</b>
<b>INDICE DE CUADROS</b>	<b>6</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>8</b>
<b>I. INTRODUCCION</b>	<b>9</b>
<b>II. ANTECEDENTES</b>	<b>11</b>
<b>III. MARCO TEORICO</b>	<b>13</b>
<b>3.1. Microorganismos benéficos del suelo</b>	<b>13</b>
3.1.1. Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV)	13
3.1.2. Bacterias Fijadoras de Nitrógeno (BFN)	14
3.1.3. Bacterias Solubilizadoras de Fosfato (BSP)	15
3.1.4. Producción de sideróforos por BPCV	16
3.1.5. Biosíntesis de auxinas por BPCV	17
<b>3.2. Descripción del Volcán “El Chichón”.</b>	<b>18</b>
3.2.1. Ubicación geográfica	18
3.2.2. Estructura fisiográfica y geológica	18
3.2.3. Historia eruptiva	19
3.2.4. Características del Lago-cráter	20
3.2.4.1. Aspectos fisicoquímicos del Lago-cráter	21
3.2.4.2. Vegetación del Lago-cráter	21
<b>3.3. Métodos moleculares empleados para el estudio de la diversidad bacteriana</b>	<b>22</b>
3.3.1. Huellas genómicas bacterianas	22
3.3.2. Estudio de genes cromosomales	23
3.3.3. Estudio de genes plasmídicos	24
3.3.4. Secuenciamiento genómico	26
<b>3.4. Interacción Planta-Suelo-Microorganismo</b>	<b>28</b>
<b>3.5. Potencial biotecnológico de las BPCV extremófilos como biofertilizantes</b>	<b>31</b>
<b>IV. JUSTIFICACION</b>	<b>34</b>
<b>V. OBJETIVOS</b>	<b>36</b>
<b>5.1. Objetivo general</b>	<b>36</b>
<b>5.2. Objetivos específicos</b>	<b>36</b>
<b>VI. METODOLOGIA</b>	<b>37</b>
<b>6.1. Descripción del área de estudio</b>	<b>37</b>
<b>6.2. Recolección de material biológico</b>	<b>37</b>
<b>6.3. Caracterización fisicoquímica del suelo rizosferico</b>	<b>38</b>

<b>6.4. Aislamiento y cultivo de cepas bacterianas</b>	<b>38</b>
<b>6.5. Caracterización fenotípica de las cepas bacterianas</b>	<b>40</b>
<b>6.6. Caracterización genotípica de las cepas bacterianas</b>	<b>41</b>
6.6.1. Extracción del ADN genómico	41
6.6.2. Estudio de huellas genómicas BOX_PCR	41
6.6.3. Amplificación del gen 16S ARNr bacteriano	41
6.6.4. Huellas genómicas ARDRA (Análisis de Restricción de ARNr Amplificado)	42
6.6.5 Extracción de ADN metagenómico y secuenciamiento	43
<b>6.7. Evaluación de las cepas bacterianas como BPCV</b>	<b>43</b>
6.7.1. Ensayo de la reducción de acetileno (ARA)	43
6.7.2. Prueba de solubilización de fosfato	44
6.7.3. Determinación de la capacidad de síntesis de sideróforos	44
6.7.4. Cuantificación de la producción de auxinas (AIA)	44
6.7.5. Actividad de la ACC desaminasa	44
6.7.6. Producción de enzimas extracelulares por las cepas bacterianas	45
6.7.7 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de metales pesados	46
<b>6.8. Pruebas de inoculación usando cepas bacterianas PCV</b>	<b>46</b>
6.8.1 Ensayo de inoculación a nivel de cámara bioclimática	46
6.8.2 Ensayo de inoculación bajo condiciones de invernadero	47
<b>6.9. Análisis de estadístico de datos</b>	<b>48</b>
<b>VII. RESULTADOS Y DISCUSION</b>	<b>49</b>
<b>7.1. Características botánicas y ecológicas de las plantas pioneras del lago-cráter, “El Chichón”</b>	<b>49</b>
<b>7.2. Características fisicoquímicas del suelo rizosferico</b>	<b>50</b>
<b>7.3. Aislamiento y cultivo de cepas bacterianas</b>	<b>53</b>
<b>7.4. Características morfológicas de las cepas bacterianas aisladas del volcán El Chichón</b>	<b>55</b>
<b>7.5. Características genómicas de cepas bacterianas aisladas de las plantas pioneras del volcán El Chichón</b>	<b>57</b>
7.5.1. Características del ADN genómico bacteriano	57
7.5.2. Huellas genómicas bacterianas	58
7.5.3. Amplificación del gen cromosomal 16S ARNr	60
7.5.4. Perfil genómico ARDRA	60
7.5.5. Identificación taxonómica de las cepas bacterianas	62
7.5.6. Características de la comunidad bacteriana: estructura y diversidad	66
<b>7.6. Potencial de las cepas bacterianas como BPCV</b>	<b>69</b>
7.6.1. Tolerancia a la salinidad y pH	69
7.6.2. Propiedades multifuncionales de las bacterias asociadas a las plantas pioneras del volcán El Chichón	70

7.6.3. Capacidad de promoción del crecimiento de las plantas de cepas bacterianas en <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. Negro Xamapa	78
7.6.4. Efecto de la inoculación con cepas bacterianas extremófilas en plantas de chile habanero ( <i>Capsicum chinense</i> )	80
<b>VIII. CONCLUSION</b>	<b>82</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>83</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

No.	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
<b>1</b>	a) Imagen satelital de la ubicación del volcán Chichón en el estado de Chiapas. b) Vista superior del edificio volcánico principal.	<b>18</b>
<b>2</b>	Fotografía de la morfología del cráter Somma, con el lago que alberga en su interior	<b>19</b>
<b>3</b>	Lago-cráter, volcan Chichón.	<b>20</b>
<b>4</b>	Puntos de muestreo en el exterior del volcán El Chichón.	<b>38</b>
<b>5</b>	Plantas pioneras que crecen en el lago-cráter del volcán Chichón, Chiapas (México). a) <i>Cheilanthes aemula</i> (Pteridaceae) y b) <i>Andropogon glomeratus</i> (Poaceae).	<b>50</b>
<b>6</b>	Colonias bacterianas formadas en los medios de cultivo selectivos. a) medio AOB (para bacterias oxidantes de amonio) y b) medio NOB (para bacterias oxidantes de nitrito).	<b>56</b>
<b>7</b>	Electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X de ADN total bacteriano	<b>58</b>
<b>8</b>	Imagen representativa de productos de PCR del gen 16S ARNr. Electroforesis en gel de agarosa 1%	<b>60</b>
<b>9</b>	Abundancia relativa de filos bacterianos en la rizósfera de plantas pioneras del lago-cráter del volcán El Chichón	<b>66</b>
<b>10</b>	Heat Map de abundancia relativa de clases bacterianas en la rizósfera de plantas pioneras del lago-cráter del volcán El Chichón	<b>67</b>
<b>11</b>	Heat Map de abundancia relativa de géneros bacterianos en la rizósfera de plantas pioneras del lago-cráter del volcán El Chichón	<b>68</b>
<b>12</b>	Crecimiento de cepas bacterianas en medio de cultivo nutritivo. A): diferentes concentraciones de NaCl; B): diferentes niveles de pH	<b>69</b>
<b>13</b>	Solubilización bacteriana de fosfato $Ca_3(PO_4)_2$	<b>71</b>
<b>14</b>	Producción bacteriana de Proteasa	<b>71</b>
<b>15</b>	Producción bacteriana de Amilasa. A): solución yodo lugol aplicado; B): Yodo lugol después de dos minutos	<b>72</b>
<b>16</b>	Producción bacteriana de lipasa	<b>72</b>
<b>17</b>	Producción bacteriana de celulasa	<b>73</b>
<b>18</b>	Producción bacteriana de sideróforos	<b>73</b>
<b>19</b>	Inoculación de plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> L con BPCV	<b>79</b>
<b>20</b>	Ensayo de inoculación de plantas de <i>Capsicum chinense</i> con BPCV	<b>80</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

No.	DESCRIPCION DEL CUADRO	PÁGINA
<b>1</b>	Tratamientos utilizados para evaluar el crecimiento de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	<b>47</b>
<b>2</b>	Características botánicas y estatus taxonómico de las plantas pioneras del lago-cráter del volcán El Chichón	<b>49</b>
<b>3</b>	Características fisicoquímicas de muestras de suelo rizosférico	<b>51</b>
<b>4</b>	Cepas bacterianas rizosféricas y endófitas aisladas de las plantas pioneras del lago-cráter del volcán El Chichón usando medios de cultivos específicos	<b>53</b>
<b>5</b>	Cepas bacterianas rizosféricas y endófitas aisladas de las plantas pioneras en el exterior del volcán El Chichón usando medios de cultivos específicos	<b>54</b>
<b>6</b>	Características morfológicas de las cepas bacterianas aisladas de las plantas pioneras que crecen en el lago-cráter del volcán El Chichón, empleando medios de cultivo selectivos	<b>55</b>
<b>7</b>	Características morfológicas de las cepas bacterianas aisladas de las plantas pioneras que crecen en el exterior del volcán El Chichón, empleando medios de cultivo selectivos	<b>57</b>
<b>8</b>	Índice diversidad y abundancia de las cepas bacterianas asociadas a las plantas pioneras del lago-cráter del volcán El Chichón de acuerdo al perfil genómico BOX	<b>59</b>
<b>9</b>	Índice diversidad y abundancia de las cepas bacterianas asociadas a las plantas pioneras del exterior del volcán El Chichón de acuerdo al perfil genómico BOX.	<b>59</b>
<b>10</b>	Índice de diversidad y abundancia de las especies bacterianas asociadas a las plantas pioneras en lago-cráter del volcán El Chichón de acuerdo a las huellas genómicas ARDRA	<b>61</b>
<b>11</b>	Índice de diversidad y abundancia de las especies bacterianas asociadas a las plantas pioneras del exterior del volcán El Chichón de acuerdo a las huellas genómicas ARDRA.	<b>61</b>
<b>12</b>	Clasificación taxonómica de cepas bacterianas aisladas de la rizósfera de plantas pioneras en el lago-cráter del volcán el Chichón	<b>63</b>
<b>13</b>	Identificación molecular de cepas bacterianas asociadas a <i>A. glomeratus</i> creciendo en el exterior del complejo volcánico.	<b>64</b>
<b>14</b>	Identificación molecular de cepas bacterianas asociadas a <i>C. aemula</i> creciendo en el exterior del complejo volcánico.	<b>65</b>
<b>15</b>	Capacidad de producción de AIA, solubilización de P, actividad de la nitrogenasa y ACC desaminasa por las bacterias asociadas a las plantas pioneras del volcán El Chichón.	<b>70</b>
<b>16</b>	Producción de enzimas extracelulares, exopolisacáridos y sideróforos de las cepas bacterianas aisladas	<b>74</b>
<b>17</b>	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las cepas bacterianas aisladas de las plantas pioneras que crecen en el lago-cráter del volcán El Chichón	<b>75</b>
<b>18</b>	Efecto de la inoculación de bacterias aisladas del lago-cráter Chichón sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	<b>79</b>
<b>19</b>	Efecto de la inoculación de bacterias aisladas del lago-cráter Chichón sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de chile habanero ( <i>Capsicum chinense</i> )	<b>81</b>

## RESUMEN

El uso de inoculantes microbianos es una alternativa biotecnológica efectiva para nutrir los cultivos y aumentar la productividad. En este trabajo se estudió la diversidad de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) asociadas con las plantas pioneras del lago-cráter del volcán El Chichón así como en el exterior del complejo volcánico. Bacterias se aislaron utilizando medios de cultivo selectivos y se caracterizaron fenotípicamente. La diversidad genética de las cepas fue revelada por BOX\_PCR y por secuenciación del gen 16S rDNA. Adicionalmente, de las plantas pioneras del interior del volcán se realizó un análisis metagenómico de la rizósfera. Pruebas bioquímicas multifuncionales y ensayos de inoculación de plantas *in vitro* y en invernadero se evaluaron para conocer el potencial como BPCV. En el lago-cráter predominaron las plantas *Cheilanthes aemula* (Pteridaceae) y *Andropogon glomeratus* (Poaceae) de las cuales se aislaron un total de 208 cepas de la rizosfera y endófitas. Se analizó el crecimiento de las cepas en altas concentraciones de sal, a diferentes niveles de pH y en concentraciones moderadas de metales pesados. Los aislados de *A. glomeratus* y *C. aemula* se clasificaron dentro de los géneros *Brevibacillus*, *Sinomonas*, *Sphingobium*, *Chryseobacterium*, *Pantoea*, *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Methylobacterium*, *Dyella*, *Microbacterium*, *Enterobacter*, *Exiguobacterium*, *Pandoraea*, *Kocuria* y *Agrobacterium* utilizando el análisis de las secuencias del gen 16S rDNA. Por otro lado, un total de 174 cepas fueron aisladas de la rizósfera y de los tejidos vegetales de *A. glomeratus* y *C. Aemula* creciendo en las laderas del volcán El Chichón. Las cepas bacterianas se agruparon en los géneros *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Serratia*, *Pandoraea*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Cupriavidus*, *Stenotrophomonas*, *Arthrobacter*, *Klebsiella*, *Lysinibacillus* y *Pantoea*. De acuerdo al análisis metagenómico, los filos *Acidobacteria* y *Proteobacteria* fueron los más abundantes y la abundancia de las clases de *Acidobacteria*, *alfa-Proteobacteria* y *Actinobacteria* permanecieron igual en ambas rizósferas. Las cepas rizosféricas y endofíticas tienen capacidad para producir enzimas extracelulares, compuestos de indol (AIA), solubilizar fosfato, sintetizar sideróforos, ACC desaminasa y actividad de nitrogenasa y mostraron un efecto positivo sobre el crecimiento y desarrollo de *Phaseolus vulgaris*, así como de *Capsicum chinense*, principalmente sobre el contenido total de nitrógeno y fósforo de las plantas. La diversidad de bacterias asociadas a las plantas pioneras del volcán El Chichón tienen cualidades como BPCV y pueden ser empleadas como biofertilizantes en diversos cultivos agrícolas cultivadas bajo condiciones adversas.

**Palabras clave:** BPCV, biofertilizantes, suelo rizosferico, ambiente extremo volcánico.

## ABSTRACT

The use of microbial inoculants is an effective biotechnological alternative to nourish crops and increase productivity. This work studied the diversity of plant growth promoting bacteria (PGPB) associated with pioneer plants of the El Chichón volcano crater-lake as well as outside the volcanic complex. Bacteria were isolated using selective culture media and phenotypically characterized. The genetic diversity of the strains was revealed by BOX\_PCR and by sequencing of the 16S rDNA gene. Additionally, a metagenomic analysis of the rhizosphere was carried out on the pioneer plants inside the volcano. Multifunctional biochemical tests and plant inoculation assays *in vitro* and in green house condition were evaluated to know the potential as PGPB. *Cheilanthes aemula* (Pteridaceae) and *Andropogon glomeratus* (Poaceae) predominated in the crater-lake, from which a total of 208 rhizosphere and endophytic strains were isolated. The strains development was analyzed at high concentrations of salt, at different pH levels and at moderate concentrations of heavy metals. Isolates of *A. glomeratus* and *C. aemula* were classified within the genera *Brevibacillus*, *Sinomonas*, *Sphingobium*, *Chryseobacterium*, *Pantoea*, *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Methylobacterium*, *Dyella*, *Microbacterium*, *Pandobacter*, *Exiguococcus* and *Agrobacterium* using analysis of 16S rDNA gene sequences. On the other hand, a total of 174 strains were isolated from the rhizosphere and from the plant tissues of *A. glomeratus* and *C. Aemula* growing on the slopes of the El Chichón volcano. The bacterial strains were grouped into the genera *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Serratia*, *Pandora*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Cupriavidus*, *Stenotrophomonas*, *Arthrobacter*, *Klebsiella*, *Lysinibacillus* and *Pantoea*. According to the metagenomic analysis carried out, *Acidobacteria* and *Proteobacteria* were the most abundant bacterial phylum and the abundance of bacterial classes of *Acidobacteria*, *Alpha-proteobacteria* and *Actinobacteria* remained the same in both rhizospheres. The rhizospheric and endophytic strains were distinguished by their ability to produce different extracellular enzymes. Extremophile isolates have the ability to produce indole compounds (IAA), solubilize phosphate, synthesize siderophores, ACC deaminase, and nitrogenase activity and showed a positive effect on the growth and development of *Phaseolus vulgaris* as well as in *Capsicum chinense*, mainly on the total nitrogen and phosphorous content in plants. The diversity of bacteria associated with pioneer plants from El Chichón volcano has PGPB properties and they can be used as biofertilizers in agricultural crops growing under adverse conditions.

**Key words:** BPCV, biofertilizers, rizospheric soil, extreme volcanic environment.

## I. INTRODUCCION

Los microorganismos promotores del crecimiento son principalmente organismos derivados del suelo y de la rizósfera que son capaces de colonizar las raíces e influir positivamente sobre el crecimiento de las plantas bajo ciertas condiciones ambientales y condiciones del suelo (Spaepen, 2009). Muy cerca de las raíces de las plantas existe una zona que alberga diferentes microorganismos conocida como rizósfera. Las Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV) son un grupo heterogéneo de bacterias que se encuentran en la rizósfera, las superficies radiculares y en asociación con las raíces, y que contribuyen en el crecimiento de las plantas directa e indirectamente (Amaresan et al., 2013). Las investigaciones relacionadas con las BPCV están creciendo significativamente, principalmente con enfoques sobre la estructura, función y salud de las plantas. El empleo de las Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV) con potencial de fijación de nitrógeno es un enfoque alternativo para mejorar la disponibilidad de nitrógeno en los sistemas de producción agrícola sostenibles. Algunas investigaciones confirman que los inoculantes formulados con BPCV han mostrado efectos positivos sobre el rendimiento agrícola y calidad del cultivo (Bashan y de-Bashan, 2005). Las BPCV pueden presentar una variedad de características responsables de influir en el crecimiento de las plantas. Los mecanismos exactos por los cuales este tipo de bacterias promueven el crecimiento de las plantas, incluyen: (i) la capacidad de producir o cambiar la concentración de reguladores de crecimiento de plantas, tales como: ácido indolacético (AIA), ácido giberélico, citoquininas y etileno; (ii) fijación de  $N_2$ ; (iii) antagonismo contra microorganismos patógenos mediante la producción de sideróforos y (iv) solubilización de fosfato mineral y otros nutrientes. Algunas cepas agrupadas en los géneros bacterianos: *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Burkholderia*, *Chryseobacterium*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Herbaspirillum*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* entre otros, han sido aislados de la rizósfera de varias especies de plantas y a través de pruebas de inoculación han demostrado su potencial como Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (Jha y Kumar, 2009).

Así también, una importante diversidad de bacterias ha sido aislada de ambientes volcánicos. Estos microorganismos aislados de ambientes extremos presentan cualidades biológicas multifuncionales que las convierten en importantes recursos bióticos para su empleo como inoculantes en cultivos agrícolas bajo condiciones de estrés (Medrano-Santillana et al., 2017). Después de la erupción volcánica, inicia un proceso de sucesión ecológica, en donde los microorganismos juegan un papel importante para el restablecimiento de la funcionalidad de este

tipo de ecosistemas extremos. De igual manera, aparecen las plantas pioneras que establecen asociación con estos microorganismos y contribuyen en la captación de nutrientes y devuelven la fertilidad de los suelos. A la fecha, se han reportado pocos estudios sobre la diversidad de bacterias PCV aisladas en ambientes volcánicos activos (Web of Science™ 2020). Por ejemplo, Amaresan et al, (2013), caracterizaron bacterias aisladas del suelo del volcán activo Barren en la India. Los resultados indicaron que los aislados presentaron cualidades multifuncionales como BPCV, considerando su capacidad para fijar N<sub>2</sub>, solubilizar fosfato, producción de sideróforos, entre otras y así también mostraron potencial para su empleo como inoculantes en cultivos de chile y berenjena en suelos salinos y ambientes áridos.

Por otro lado, en Chiapas (México), existen ambientes extremos volcánicos activos, como es el caso del Volcán “El Chichón”. Después de la erupción del volcán, en el año de 1982, se formó un lago-cráter de 1.0 km de diámetro. El cráter está rodeado por suelo tipo andisol incipiente irregulares, con oquedades y respiraderos, presenta diferentes gradientes de temperatura y extremada acidez y un alto contenido de azufre (Contreras y Salgado, 2012). En el cráter del volcán se ha formado suelo y esto ha permitido su colonización por especies de plantas pioneras, agrupadas en las familias: *Arecaceae*, *Bromeliaceae*, *Ericaceae*, *Gleicheniaceae*, *Lycopodiaceae*, *Poaceae*, *Verbenaceae*, entre otras especies de plantas que pueden sobrevivir en este ambiente tan inhóspito (Hernández-Morales, 2009).

La presente investigación tuvo como objetivos principales los siguientes puntos: a) estudiar la estructura y diversidad genética de las Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV) asociadas a la rizósfera de las plantas pioneras que crecen en el volcán El Chichón y b) determinar mediante pruebas de biofertilización la funcionalidad biológica de las cepas y su potencial como bioinoculantes en cultivos de plantas de importancia agrícola.

Los resultados que se logren obtener en esta investigación permitirán corroborar que las BPCV aisladas de suelos de sitios volcánicos representan un nicho ecológico que alberga una diversa y hasta ahora poco caracterizada comunidad microbiana con alto potencial de aplicaciones biotecnológicas.

## II. ANTECEDENTES

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) son un grupo heterogéneo de bacterias que se encuentran en la rizósfera, las superficies de las raíces y en asociación con las raíces, lo que puede mejorar la extensión o calidad del crecimiento de las plantas directa o indirectamente. En las últimas décadas, una gran variedad de bacterias, incluyendo especies de *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* y *Serratia* han sido reportadas como promotoras del crecimiento de las plantas. Estas bacterias pueden exhibir una variedad de características responsables de influir en el crecimiento de la planta. Los mecanismos exactos mediante los cuales las BPCV promueven el crecimiento de las plantas no se conocen completamente, pero se cree que incluyen: (i) la capacidad de producir o cambiar la concentración de reguladores del crecimiento de las plantas, tales como; IAA, ácido giberélico, citoquininas y etileno; (ii) fijación de N<sub>2</sub>; (iii) antagonismo contra microorganismos fitopatógenos por producción de sideróforos, antibióticos y (iv) solubilización de fosfatos minerales y otros nutrientes (Amaresan et al., 2013).

Las BPCV han sido aisladas de una amplia diversidad de plantas, así como de diferentes tipos de ambientes, e incluyendo los ambientes extremos o inhóspitos. Dentro de los ambientes naturales extremos, se encuentran los sistemas volcánicos. Los volcanes activos se encuentran entre los ambientes más extremos de la Tierra. Las temperaturas extremas, la presencia de metales pesados tóxicos y la baja biodisponibilidad de nutrientes favorecen el desarrollo de especies bacterianas extremófilas. Estas bacterias tienen el potencial biológico y la capacidad bioquímica para vivir en ambientes y condiciones altamente extremas en donde otros microorganismos no podrían sobrevivir. Como parte de las estrategias de sobrevivencia, las bacterias establecen asociación con plantas. Estas relaciones mutualistas benefician a ambos organismos. Las raíces y demás tejidos vegetales de las plantas ofrecen refugio, protección y nutrientes a las bacterias. A cambio, las plantas se ven favorecidas con los diferentes metabolitos que producen estos microsimbiontes.

En México, existen algunos volcanes activos, en donde además de los estudios geológicos, también se han realizado investigaciones encaminadas en conocer la diversidad microorganismos extremófilos. Recientemente, Medrano-Santillana et al, (2017), caracterizaron las comunidades bacterianas que habitan las fumarolas del volcán Parícutín, ubicado en Michoacán (México) usando librerías genómicas. Las poblaciones bacterianas más abundantes, confirmadas por las bibliotecas de

genes T-RFLP y 16S rRNA, se relacionaron con miembros de los filos *Firmicutes* y *Proteobacteria*, incluidas las secuencias asociadas con termófilos y bacterias sulfato reductoras (BSR).

En relación al aislamiento y estudio de BPCV aisladas de sitios con actividad volcánica, se encuentra el trabajo de Amaresan et al, (2013), quienes, aislaron 102 cepas bacterianas en el sitio volcánico Barren, India. Los géneros encontrados fueron *Bacillus*, *Escherichia*, *Ralstonia* y *Staphylococcus*. El 57.8% de los aislados sintetizaron AIA, 55.9% produjeron sideróforos y 33.3% tuvieron capacidad para solubilizar fosfato. La cepa BAN 86, BAN 87 y BAN43, mostraron efecto positivo sobre la longitud de la raíz y planta en los cultivos de chile y berenjena.

El volcán “El Chichón” es un volcán activo, ubicado al norte del estado de Chiapas. Este volcán hizo erupción en 1982, como resultado de este evento, se formó un lago-cráter de 1.0 km de diámetro. El cráter está rodeado por suelo tipo andisol, con oquedades y respiraderos, presenta diferentes gradientes de temperatura y extremada acidez y un alto contenido de metales pesados tóxicos. Rincón-Molina y colaboradores en 2019, realizaron una primera exploración encaminada en conocer la diversidad de bacterias en varios puntos del cráter tomando como referencia diferentes gradientes de temperatura. Varias de estas especies identificadas son reportadas como BPCV considerando su potencial para fijar nitrógeno, solubilizar fosfato y sintetizar auxinas. Un evento importante que está ocurriendo en el cráter del volcán El Chichón es la presencia de vegetación pionera, que ha iniciado la colonizando de los suelos recientemente formados en este ambiente extremo. Estas especies de plantas pioneras están agrupadas dentro de las familias: *Arecaceae*, *Bromeliaceae*, *Ericaceae*, *Gleicheniaceae*, *Lycopodiaceae*, *Poaceae*, *Verbenaceae* y también se registró la presencia de helechos agrupados en la familia *Pteridaceae* (Hernández-Morales, 2009). Estas plantas cuentan con mecanismos bioquímicos y fisiológicos especializados que han permitido su adaptación y sobrevivencia a las condiciones altamente extremas que operan en el volcán El Chichón. Sin embargo, es importante considerar que gran parte del éxito adaptativo de estas plantas, puede deberse a las asociaciones que se están estableciendo con diversas especies de bacterias que habitan en este ambiente extremo.

Por lo anterior, en este trabajo se estudió la diversidad genética de bacterias asociadas a la rizósfera de las plantas pioneras que crecen en el volcán El Chichón, y se determinó el potencial como BPCV, a través del estudio de las cualidades multifuncionales y en pruebas de inoculación con plantas de importancia agrícola.

### **III. MARCO TEORICO**

#### **3.1. Microorganismos benéficos del suelo**

Una multitud de diferentes especies de microorganismos están presentes en muchos suelos. Las bacterias del suelo son muy importantes en los ciclos biogeoquímicos. Las interacciones entre plantas y bacterias en la rizósfera son determinantes para la salud de las plantas y la fertilidad del suelo (Hayat et al., 2010). La rizósfera se puede definir como la región del suelo donde los procesos mediados por los microorganismos son influenciados específicamente por el sistema de la raíz (Souza et al., 2015). La rizósfera del suelo se define como el volumen del suelo adyacente y está influenciada por las raíces de la planta, y representa una región de intensa actividad microbiana. La rizósfera es un ambiente que la planta misma ayuda a crear y donde los microorganismos patógenos y benéficos constituyen una fuerte influencia sobre la salud y crecimiento de las plantas. El grupo de microorganismos y otros agentes que se encuentran en la rizósfera incluyen bacterias, hongos, nematodos, protozoos, algas y microartrópodos (Johansson et al., 2004).

En la rizósfera hay expresión de relaciones simbióticas mutualistas entre microorganismos y plantas, debido a la exudación de nutrimentos orgánicos útiles para el metabolismo microbiano, a la vez, participan en numerosos beneficios, como: influencia en el crecimiento radical, regulación de la actividad metabólica de la raíz e influencia en las propiedades físicas y químicas del suelo, así como de los contaminantes (Gano-Cohen et al., 2016).

##### **3.1.1. Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV)**

Las bacterias que colonizan la raíz y su zona de influencia (suelo rizosférico) son denominadas “rizobacterias”. Las rizobacterias beneficiosas conocidas en la literatura con el acrónimo PGPB (del inglés “Plant Growth Promoting Bacteria”) desempeñan funciones claves para la planta tales como: control biológico de los patógenos mediante efectos antagonistas o de inducción de resistencia sistémica (Van Loon et al., 2007), incremento de la biodisponibilidad de elementos minerales y la fitoestimulación al propiciar la emergencia o el enraizamiento. La fitoestimulación provocada por la inoculación de las BPCV ocurre por varios mecanismos. Uno de ellos se basa en la síntesis de sustancias reguladoras de crecimiento, como auxinas, giberelinas y citoquininas, las cuales estimulan la densidad y longitud de los pelos radicales, lo que incrementa a su vez la capacidad de absorción de agua y nutrimentos, y permite que las plantas sean más vigorosas, productivas y tolerantes a condiciones climáticas adversas, como la sequía.

Las BPCV deben cumplir tres características intrínsecas: ser capaces de colonizar la raíz y/o su zona de influencia; sobrevivir y multiplicarse en los micro-hábitats asociados a la superficie de la raíz donde compiten con la microbiota natural, al menos el tiempo suficiente para ejercer de forma efectiva su actividad promotora del crecimiento y estimular el crecimiento vegetal (Ahemad y Kibret, 2014).

En el proceso de colonización de la raíz o rizósfera la bacteria es atraída por quimiotaxis basada en compuestos presentes en los exudados radicales, para posteriormente unirse a la superficie radical. Algunas bacterias, como por ejemplo *Azospirillum* sp., pueden incluso llegar a penetrar en la raíz y colonizar los espacios intercelulares, aunque no forman estructuras especializadas como ocurre en el caso de la asociación *Rhizobium*-leguminosa. Dentro de este grupo se encuentran especies pertenecientes a los géneros *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Xanthomonas*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Burkholderia* y *Bacillus* (Karnwal, 2009; García et al., 2015).

Las BPCV pueden presentar una variedad de características responsables de influir en el crecimiento de las plantas. Los mecanismos exactos por los cuales estas promueven el crecimiento de las plantas no se entienden completamente, pero se piensa que incluyen: (i) la capacidad de producir o cambiar la concentración de reguladores de crecimiento de plantas, tales como; IAA, ácido giberélico, citoquininas y etileno (Glick, 1995); (ii) fijación de N<sub>2</sub> (Boddey y Dobereiner, 1995); (iii) antagonismo contra microorganismos patógenos mediante la producción de sideróforos (Scher y Baker, 1982) y (iv) solubilización de fosfato mineral y otros nutrientes (De Freitas, 1997).

La conjunción de todos los mecanismos de acción ha dado como resultado la promoción evidente del crecimiento en plantas, un incremento en la emergencia, el vigor y el peso de plántulas, un mayor desarrollo en sistemas radicales y un incremento hasta de 30% en la producción de cultivos de interés comercial (Jiménez, 2001).

### **3.1.2. Bacterias Fijadoras de Nitrógeno (BFN)**

En la rizósfera habitan especies bacterianas, tales como *Azospirillum*, *Azotobacter* y *Rhizobium*, que tienen la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>) y reducirlo a una forma orgánica (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) que pueda ser empleada por las plantas e incorporarlo a su metabolismo. Se han reportado también bacterias endófitas, que pueden invadir tejidos de los vegetales y sintetizar algunos metabolitos y nutrimentos que resultan esenciales para el crecimiento de las plantas (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006).

Todos los organismos requieren nitrógeno para sintetizar biomoléculas tales como proteínas y ácidos nucleicos. Sin embargo, la fuente principal de N en la naturaleza, el nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ), no es accesible a la mayoría de los organismos vivos, incluyendo eucariontes. La fijación biológica de nitrógeno (FBN) es el proceso responsable de la reducción de  $N_2$  a amoníaco ( $NH_3$ ) y se realiza en microorganismos diazótrofos, particularmente bacterias y arqueas (Dixon y Kahn, 2004). En el suelo, el nitrógeno es transformado por varios procesos como la amonificación, que es la liberación de nitrógeno en forma de amonio a partir de sustancias orgánicas; y la nitrificación, que es la conversión de amonio en nitratos. El nitrógeno es el elemento más limitante para el crecimiento vegetal tanto en ambientes naturales como para la producción agrícola (Martínez-Romero, 2013).

Los microorganismos diazotróficos realizan FBN a través de la nitrogenasa, una enzima altamente conservada que comprende dos metaloproteínas; FeMo-proteína y Fe-proteína (Dixon y Kahn, 2004). El uso de la reducción catalizada por nitrogenasa de acetileno ( $C_2H_2$ ) a etileno ( $C_2H_4$ ) como un ensayo sensible y simple para medir la fijación biológica de nitrógeno ha contribuido en gran medida al progreso de la investigación en esta área.

### **3.1.3. Bacterias Solubilizadoras de Fosfato (BSP)**

El fósforo es el segundo nutriente más importante para las plantas, después del nitrógeno. Existe en el suelo como sales minerales o está incorporado a compuestos orgánicos. A pesar de que estos compuestos de fósforo son abundantes en los suelos agrícolas, la mayoría de ellos ocurre en forma insoluble. Algunas bacterias, especialmente las que establecen asociación con las raíces, tienen la habilidad de solubilizar el fosfato e incrementar el crecimiento de las plantas y su productividad (Rosas et al., 2006). Las bacterias solubilizadoras de fosfato (BSP) constituyen un grupo importante de BPCV, pues están involucrados en un amplio rango de procesos que afectan la transformación del fósforo, siendo componentes integrales del ciclo edáfico de este nutriente. En ambientes naturales, la rizósfera de diferentes especies de plantas es afectada por las BPCV, incluidos las bacterias solubilizadoras de fosfatos; estos últimos microorganismos movilizan fosfato inorgánico insoluble desde la matriz mineral hasta el suelo donde puede ser absorbido por las raíces, y las plantas les suministran compuestos carbonados que son metabolizados para el crecimiento microbiano (Pérez et al., 2007).

La biodisponibilidad limitada de fósforo (P) en el suelo, combinada con el hecho de que este elemento es esencial para el crecimiento de las plantas, significa que la incapacidad para obtener suficiente fósforo limita el crecimiento de las plantas. La solubilización y mineralización del fósforo por las bacterias solubilizadoras de fosfato ( $PO_4^{3-}$ ) es un rasgo importante en las bacterias

promotoras del crecimiento de las plantas. Las cepas de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Rhizobium* se encuentran entre los solubilizadores de fosfato más potentes. El mecanismo principal para la solubilización del fosfato mineral es la producción de ácidos orgánicos, y las fosfatasas ácidas juegan un papel importante en la mineralización del fósforo orgánico en el suelo. Diferentes especies bacterianas, particularmente bacterias colonizadoras de la rizósfera, tienen la capacidad de liberar fosfatos orgánicos o de solubilizar compuestos de fosfato inorgánicos insolubles tales como fosfato tricálcico, fosfato dicálcico, hidroxiapatita y fosfato de roca. Estas bacterias hacen disponible los fosfatos solubles a las plantas y, a cambio, obtienen compuestos de carbono producido por las raíces, principalmente azúcares y ácidos orgánicos, necesarios para el crecimiento bacteriano (Khan et al., 2010).

Por otro lado, la mineralización del fósforo orgánico se produce a través de la síntesis de una variedad de diferentes fosfatasas, catalizando la hidrólisis de ésteres fosfóricos. Es importante destacar que la solubilización y mineralización de fosfato pueden coexistir en la misma cepa bacteriana (Mohammad et al., 2020).

Para el aislamiento y selección de Bacterias Solubilizadoras de Fosfato (BSP), se han documentado en la literatura diferentes medios de cultivos que incluyen en su composición variadas fuentes de fosfato, tanto de origen orgánico, como inorgánico (Pi). Sin embargo, el medio NBRIP (National Botanical Research Institute Phosphate) ha sido uno de los más usados por su eficiencia para seleccionar microorganismos con alta capacidad para solubilizar fuentes de Pi (Díaz-de la Osa et al., 2015). Varios autores atribuyen la solubilización del fosfato insoluble inorgánico por microorganismos a la producción de ácidos orgánicos y oxoácidos quelantes a partir de azúcares (Kundu et al., 2009).

Cotidianamente se usan medios de cultivo en placa enriquecidos con fuentes de Pi como un método para asegurar el aislamiento de BSP. Este método se usa también en ensayos preliminares de solubilización de fosfato. La evaluación de la capacidad de solubilización de fosfato se lleva a cabo seleccionando aquellos microorganismos que son capaces de producir una zona clara (o halo) en la placa debido a la producción de ácidos orgánicos en el medio circundante (Nautiyal, 1999).

#### **3.1.4. Producción de Sideróforos por BPCV**

A pesar de que el hierro es el cuarto elemento más abundante en la tierra, en suelos aeróbicos, el hierro no es fácilmente asimilado por bacterias o plantas porque el ion férrico o  $Fe^{+3}$ , que es la forma predominante en la naturaleza, es escasamente soluble, de modo que la cantidad de hierro disponible para la asimilación por los organismos vivos es extremadamente baja. Para

sobrevivir con un suministro limitado de hierro, las bacterias sintetizan sideróforos de bajo peso molecular (~400-1500 Da), moléculas con una alta afinidad por  $\text{Fe}^{+3}$  así como receptores en las membranas que son capaces de unir el complejo Fe-sideróforo, facilitando así, la asimilación de hierro por los microorganismos (Scher y Baker, 1982).

Se han desarrollado diversos ensayos para detectar diferentes fenotipos de sideróforos (Arnold y Viswanatha, 1983). Aunque estos ensayos son útiles para identificar varios sideróforos, sería necesario realizar numerosos ensayos para detectar todas las formas posibles de sideróforos. Schwyn y Neiland en 1987 desarrollaron un ensayo universal de sideróforos utilizando cromo azurol S (CAS) y bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMA) como indicadores, basado en la afinidad por hierro (III). El complejo CAS/HDTMA se enlaza fuertemente con hierro o magnesio para producir un color azul. Cuando un agente quelante fuerte como un sideróforo remueve al hierro o magnesio del complejo de colorantes, el color cambia de azul a naranja (Louden et al., 2011).

### **3.1.5. Biosíntesis de Auxinas (AIA) por BPCV**

El ácido indol-3-acético (AIA) es el más común, así como la auxina más estudiada, y gran parte de la literatura científica considera la auxina y el AIA términos intercambiables. El AIA afecta a la división, extensión y diferenciación celular de las plantas; estimula la germinación de semillas y tubérculos; aumenta la tasa de desarrollo del xilema y de las raíces; controla los procesos de crecimiento vegetativo; inicia la formación de raíces laterales y adventicias; media las respuestas a la luz, la gravedad y la fluorescencia; afecta a la fotosíntesis, formación de pigmentos, biosíntesis de diversos metabolitos y resistencia a condiciones estresantes (Glick, 1995). El triptófano (Trp) se considera generalmente como el precursor del ácido indol-acético (AIA). Se han descrito varias rutas biosintéticas del AIA, como la vía indol-3-acetamida, la vía indol-3-piruvato, la vía triptamina, la ruta de la enzima triptófano cadena-lateral oxidasa, la vía indol-3-acetonitrilo y las vías independientes del triptófano (Spaepen et al., 2007). En las vías dependientes de Trp, el triptófano se convierte en indol-3-acetamida (IAM) por la enzima triptófano-2-monooxigenasa y el IAM se metaboliza en AIA por la enzima IAM-hidrolasa (Matsukawa et al., 2007).

Para determinar AIA se emplea comúnmente la técnica de Gordon y Weber (1951). Cada cepa bacteriana debe cultivarse separadamente en caldo de medio de cultivo enriquecido con Trp, y luego realizarse un estudio colorimétrico a partir del sobrenadante, lo que consume mucho tiempo y no aporta fiabilidad debido a que no pueden cuantificarse con certeza las concentraciones de AIA. Por ello se ha hecho uso de técnicas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para poder realizar un análisis cuantitativo de los niveles de biosíntesis del AIA (Zakharova *et al.*, 2001).

### 3.2. Descripción del Volcán “El Chichón”.

#### 3.2.1. Ubicación geográfica

El Chichón (o Chichonal) es un volcán aislado, que data del Pleistoceno-Holoceno tardío (hace 2.59 millones de años). Se localiza en el estado de Chiapas (México) ( $17.36^{\circ}$  N,  $93.23^{\circ}$  O) (Figura 1), aproximadamente a 68 km en línea recta al NNO de Tuxtla Gutiérrez y 20 km al SO de la ciudad de Pichucalco (Arellano et al., 2012), cuenta con una altura de 1150 m sobre el nivel del mar (msnm), siendo el más joven de los volcanes cuaternarios que forman al arco volcánico de Chiapas y situado al final de éste (López et al., 2012).



**Figura 1.** a) Imagen satelital de la ubicación del volcán El Chichón en el estado de Chiapas.

b) Vista superior del edificio volcánico principal. (<https://www.google.com.mx/maps>)

Este volcán se ubica en una zona sujeta a diferentes procesos geológicos: sedimentación, subducción de la Placa de Cocos por debajo de la Placa de Norteamérica, plegamientos, fallamientos normales, laterales e inversos y con actividad volcánica en épocas recientes. Se encuentra en una zona tropical-húmeda, con una precipitación anual promedio de alrededor de 4000 mm. El edificio volcánico está cubierto por una espesa vegetación que creció después de la erupción de 1982 (Taran et al., 2008).

#### 3.2.2. Estructura fisiográfica y geológica

El Chichón es un volcán compuesto con un cráter con diámetro de (1.5 x 2.0) km, denominado Somma. En realidad, el cráter Somma es un anillo de domos (domos anulares) que tiene paredes internas sub-verticales y pendientes externas suaves. La elevación relativa del Somma con respecto a la topografía circundante es de sólo 700 msnm con respecto a la parte Este y de 900 msnm en la parte occidental. El cráter Somma está cortado por estructuras más jóvenes, en su parte SE por el cono de tobas Guayabal y al SO por un domo de lavas. Alberga en su parte interior un lago-cráter creado por la destrucción de un domo en la erupción de 1982 con un diámetro de 1.0 Km

y paredes verticales de 140.0 m. La altura máxima del cráter sobre el nivel del mar es de 1100 m y la altura del fondo del cráter es de 860 msnm (Figura 2).



**Figura 2.** Fotografía de la morfología del cráter Somma, con el lago que alberga en su interior (Arellano et al., 2012)

El Somma representa la estructura más antigua del complejo volcánico de El Chichón. Está disectado en tres partes de su estructura, en donde nacen las cabeceras de los ríos Platanar y Mova al este, Cambac en el norte y Agua Caliente en el sureste. Existen otras estructuras asociadas al edificio principal del volcán, esencialmente domos, a los cuales se les ha denominado Domo NO, Domo SO y Domo Cambac, que a diferencia de los domos anulares del Somma se encuentran en la parte externa del edificio principal. En la zona del complejo volcánico de El Chichón hay varias estructuras de origen secundario, consistentes en anticlinales y sinclinales con ejes de dirección NO-SE y NNO-SSE, cuyos flancos varían de  $42^\circ$  a  $65^\circ$ . Al norte de Chapultenango se encuentra un valle producto de un sinclinal de orientación E-O, que da lugar al drenaje del Río Mova. Uno de los plegamientos es el Anticlinal de Caimba, situado en la parte NE del volcán, con orientación NO-SE y buzamiento al NO. Las rocas calcáreas constituyen su núcleo y afloran en su cima, formando una serranía con una altura de 1140 msnm.

### 3.2.3. Historia eruptiva

Después de 550 años de inactividad, el volcán volvió a entrar en actividad en 1982 (Espíndola et al., 2000; Macías et al., 2004). Diez episodios eruptivos se documentaron entre el 29 de marzo y 4 de abril 1982 (McClelland et al., 1989), pero sólo tres de ellos, que tuvieron lugar el 29 de marzo y el 4 de abril, produjeron depósitos piroclásticos importantes (Sigurdsson et al., 1984). La primera fase de la erupción Pliniana, comenzó el 29 de marzo con una duración de 6 horas aproximadamente. Este evento formó un cráter nuevo de 1 Km de ancho y 230 m de profundidad (De la Cruz Reyna y Martin del Pozzo, 2009; Tilling, 2009). En la cumbre de la cúpula prehistórica

del volcán se formó una columna eruptiva con una altura de aproximadamente 20 Km (Carey y Sigurdsson, 1986). Posteriormente el volcán produjo una serie de explosiones hidromagmáticas que dispersaron alrededor, corrientes altamente turbulentas de flujos piroclásticos densos. (Sigurdsson et al., 1984; Macías et al., 1997a; Scolamacchia et al., 2005). El segundo gran evento el 4 de abril, y se prolongó durante cerca de 4.5 h. Este acontecimiento produjo una nube eruptiva de la que se emitió una oleada piroclástica, que se propagó en todas direcciones, pero sobre todo en el sur, hasta 8 Km desde el cráter. Esta columna eruptiva fue la más energética, alcanzando una altura máxima de 32 Km (Carey y Sigurdsson, 1986). El evento final comenzó 4 de abril y tuvo una duración de aproximadamente 7 h. Se estima que la columna eruptiva Pliniana llegó a la altura 29 Km (Carey y Sigurdsson, 1986). La erupción aplanó completamente un área de aproximadamente 100 km<sup>2</sup> de selva con la emisión de más de 2.0 km<sup>3</sup> de material piroclástico.

Las erupciones no produjeron flujos de lava, pero presentaron caída de ceniza traquiandesita en el aire, oleadas piroclásticas y flujos que inundaron una zona de aproximadamente 6 Km a la redonda desde el cráter (Sigurdsson *et al.*, 1985). Durante la erupción, el volcán Chichón emitió 7.5 Tg de SO<sub>2</sub> a la atmósfera.

#### **3.2.4. Características del lago-cráter**

Tras la erupción de 1982, rápidamente apareció un lago poco profundo (1 a 3.3 m de profundidad) que cubrió un área de aproximadamente  $1.4 \times 10^5$  m<sup>2</sup> en el suelo del centro del cráter (Casadevall et al., 1984). Sin embargo, su forma y dimensiones han cambiado a lo largo de los años. La forma del lago es plana-alargada, el agua es ácida (pH 2-3) y temperatura (30°C) (Jutzeler et al., 2011), de color verde-blanquecino, con manifestaciones de vapor caliente sobre la superficie (Figura 3).



**Figura 3.** Lago-cráter, volcan Chichón, 2015.

El lago cambia periódicamente su volumen y salinidad. Una declaración general suele ser aplicable para los lagos de los cráteres en zonas tropicales-húmedas: el lago de un cráter disminuye sus niveles de salinidad e incrementa su volumen durante la temporada de lluvias, mientras que para las estaciones secas su volumen se reduce considerablemente y los niveles de salinidad se elevan. Las variaciones de su volumen y el hecho de que no desaparezca durante la temporada de sequía, también se atribuyen a un manantial intermitente, rico en cloro llamado "Soap Pool" que alimenta al lago (Rouwet et al., 2008; Taran et al., 1998). El sistema hidrotermal asociado con el volcán comprende varios manantiales que van desde aguas ácidas hasta casi neutras y calientes (hasta 80°C) sobre la pendiente de la plataforma volcánica.

#### **3.2.4.1. Aspectos fisicoquímicos del lago-cráter**

La composición del agua del lago-cráter se ha estudiado desde 1983 por varios investigadores (Taran et al., 1998; Rouwet et al., 2008; Jutzeler et al., 2011). Durante estos estudios se han determinado concentraciones variables de Arsénico (As), desde 0.032 hasta 0.17 mg kg<sup>-1</sup>. También se han presentado variaciones en la acidez del agua; en 1986 se midió un menor nivel de acidez (pH de 2.5) (Armienta et al., 2000), con respecto a 1983 (pH 0.56) (Casadevall et al., 1984). A partir de esto, los valores de pH han variado, manteniéndose alrededor de 2.5. El lago-cráter era ácido tipo cloruro de calcio en el año 1983, posteriormente, el tipo de aniones principales ha fluctuado entre cloruro y sulfato, y como cationes principales ha variado entre magnesio, sodio y calcio (Armienta et al., 1995; Armienta et al., 2000, 2008). La acidez es proporcionada por la oxidación del H<sub>2</sub>S. Mientras que la salinidad del lago y su contenido en cloro depende directamente de la actividad de un grupo de manantiales termales cercados (Taran et al., 1998).

#### **3.2.4.2. Vegetación del lago-cráter**

La estructura del suelo se estudia con base al desarrollo de perfiles edafogénicos, y en suelos de origen volcánico, como los que se presentan en el volcán El Chichón, pueden repetirse estructuras completas superpuestas, ya que cada proceso eruptivo deposita una nueva capa de ceniza, tefra y/o material magmático, que a partir de ese momento inicia un nuevo proceso edafogénico como material parental.

De modo análogo a la edafogénesis se desarrolla el proceso biológico denominado sucesión ecológica, partiendo de un ambiente recientemente afectado por algún proceso físico que haya acabado con la vegetación nativa, como es el ejemplo de una erupción volcánica de gran magnitud. El nuevo ambiente será prontamente colonizado por las denominadas especies colonizadoras,

representadas por briofitas y hepáticas; a continuación sobre el suelo modificado por estos organismos y enriquecido por sus componentes reabsorbidos por la matriz del suelo, surgen las colonizadoras primarias, herbáceas, gramíneas y algunas pocas arbustivas, en secuencia seguirán siendo desplazadas las especies colonizadoras por las colonizadoras secundarias y finalmente las especies tardías, que son aquellas que presentan mayor necesidad de suelos desarrollados.

El Chichón mostró la presencia predominante de colonizadoras primarias, pioneras y vegetación marginal, corrobora las conclusiones sobre la presencia de suelos con poco grado de desarrollo. Dentro de los géneros de plantas reportadas en el lago-cráter se encuentran *Cheilanthes*, *Gleichenella*, *Liabum*, *Lycopodium*, *Lycopodiella* y *Poaceae* (Hernández-Morales, 2009)

### **3.3. Métodos moleculares empleados para el estudio de la diversidad bacteriana**

Cuando se desea analizar a una especie o grupo biológico, es importante conocer el contexto ambiental y biológico en el que se encuentra. El contexto biológico se refiere a las especies con las que coexiste y en muchos casos de las que depende. El conjunto de especies que coexisten en un lugar y tiempo constituye la comunidad (Harper et al., 2006). En el caso de organismos macroscópicos es relativamente sencilla la caracterización y el conteo de las diferentes especies presentes en ella, pero en el caso de microorganismos esta caracterización se complica y es por ello que en los últimos años se han desarrollado diferentes estrategias, principalmente moleculares para identificar las especies o grupos de microorganismos que constituyen la comunidad.

La determinación de secuencias o patrones del gen que codifica para la subunidad pequeña de los ribosomas (16S para procariontes y 5S o 18S para eucariontes; Ward et al., 1992), es una de las técnicas más útiles y ampliamente utilizadas. Esta subunidad pequeña (SSU) de ARNr es adecuada para este tipo de estudios por varias razones. Se encuentra en los tres dominios de la vida conocidas: Bacteria, Archaea y Eucarya (Woese et al., 1990). Son moléculas que tienen regiones altamente conservadas y regiones de secuencia variable (Woese, 1987) y gracias a las tasas de evolución diferentes en cada tipo de región, se pueden establecer relaciones en diferentes niveles jerárquicos en un análisis comparativo de secuencias (Hill et al., 2000). Así mismo, el ARNr puede amplificarse fácilmente por PCR y ser secuenciado.

#### **3.3.1. Huellas genómicas bacterianas**

Las técnicas para el análisis a nivel genómico se fundamentan en la amplificación de fragmentos del genoma, que se encuentran entre dos secuencias repetidas. Son tres las secuencias repetitivas que se han utilizado con esta finalidad: las secuencias REP (repetitive extragenic

palindromic), las ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) y los elementos BOX. En tales casos, las técnicas se han denominado REP-PCR, ERIC-PCR y BOX-PCR respectivamente, y rep-PCR colectivamente. Estas técnicas se han mostrado más reproducibles que las AP-PCR (Arbitrary Primed-PCR) y se están aplicando para el estudio de ecología microbiana de un gran número de especies distintas; además, son de gran utilidad por su sencillez y rapidez, pudiendo introducirse en el día a día del laboratorio (Prats, 2006).

### **3.3.2. Estudio de genes cromosomales**

El ARN ribosómico (ARNr) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas. Su aplicación como cronómetro molecular fue propuesta por Carl Woese (Universidad de Illinois) a principios de la década de 1970 (Olsen et al., 1993). Los estudios de Woese originaron la división de los procariotas en dos grupos o reinos: Eubacteria y Archae o bacteria, cuya divergencia es tan profunda como la encontrada entre ellos y los eucariotas. Además, permitieron establecer las divisiones mayoritarias y subdivisiones dentro de ambos reinos (Woese, 1987).

Posteriormente, Woese introdujo el término dominio para sustituir al reino como categoría taxonómica de rango superior, y distribuyó a los organismos celulares en tres dominios: Bacteria, Archaea y Eukarya, el último de los cuales engloba a todos los seres eucariotas (Woese et al., 1990). Desde entonces, el análisis de los ARNr 16S se ha utilizado ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas dentro del mundo procariota, causando un profundo impacto en nuestra visión de la evolución y, como consecuencia, en la clasificación e identificación bacteriana (Rodicio y Mendoza, 2004). De hecho, las ediciones vigentes de los dos tratados fundamentales de bacteriología, el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (<http://www.springer-ny.com/bergeysoutline/main.htm>) y *The Prokaryotes* (<http://www.prokaryotes.com>), basan su estructuración del mundo procariota en las relaciones filogenéticas establecidas con esta macromolécula.

La identificación molecular basada en el análisis de secuencias del gen ARNr 16S (o del gen que lo codifica) puede representar una ventaja tanto en tiempo como en precisión, llegando incluso a competir de manera favorable con otras técnicas rápidas y eficaces, como las inmunológicas.

Aunque existen cronómetros moleculares alternativos al gen ARNr 16S, hasta el momento ninguno ha conseguido desplazarle. De hecho, esta macromolécula presenta una serie de características, en base a las cuales fue considerado por Woese como cronómetro molecular definitivo (Rodicio y Mendoza, 2004):

1. Se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales. Constituye, por tanto, una diana universal para su identificación.
2. Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios.
3. Los cambios ocurren de manera suficientemente lenta, como para aportar información acerca de todos los procariotas y, junto con las variaciones en los ARNr 18S, a lo largo de toda la escala evolutiva. Los ARNr contienen, sin embargo, suficiente variabilidad para diferenciar no sólo los organismos más alejados, sino también los más próximos.
4. El tamaño relativamente largo de los ARNr 16S (1500 nt) minimiza las fluctuaciones estadísticas.
5. La conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso.
6. Dado que resulta relativamente fácil secuenciar los ARNr 16S existen bases de datos amplias, en continuo crecimiento.

Una vez determinada la secuencia de nucleótidos y establecidas las comparaciones, será el grado de similitud entre las secuencias de los ARNr 16S de dos bacterias lo que indique su relación evolutiva. Además, el análisis comparativo de secuencias permite construir árboles filogenéticos, que reflejan gráficamente la genealogía molecular de la bacteria, mostrando su posición evolutiva en el contexto de los organismos comparados (Rodicio y Mendoza, 2004).

### **3.3.3. Estudio de genes plasmídicos**

Los plásmidos son importantes "vehículos" para la comunicación de información genética entre bacterias. El intercambio de plásmidos transmite rasgos patogénicos y ambientalmente relevantes a las bacterias hospedadoras, promoviendo su rápida evolución y adaptación a diversos ambientes. Los plásmidos son replicones extracromosómicos (ERs) circulares o lineales que se encuentran en muchos microorganismos en los dominios Bacteria, Archaea y Eukaryota (Funnell y Phillips, 2004). Los plásmidos son transmisibles por conjugación. La conjugación es uno de los mecanismos más efectivos para diseminar elementos genéticos entre las bacterias. Por lo tanto, es uno de los "vehículos" más importantes para la comunicación bacteriana de la información genética, lo que facilita la rápida evolución y las habilidades de adaptación que se ven en las bacterias (Aminov, 2011). Los plásmidos también son importantes herramientas genéticas utilizadas para manipular y analizar microorganismos mediante la introducción, modificación o eliminación de genes diana. Nuevos plásmidos han sido reportados con la revolución reciente de la tecnología de secuenciación de nucleótidos.

La estructura de los plásmidos está conformada de moléculas circulares de ADN de doble cadena que se replican autónomamente en una célula huésped. Su longitud varía desde algunas kilobases (kb) hasta varios cientos de kb (1 kb = 1000 pares de bases (pb), 1 pb = 660 dalton (Da), 106 Da = 1 megadalton (MDa)). Los plásmidos se pueden integrar en el cromosoma y entonces se denominan episomas. Algunos plásmidos bacterianos grandes, llamados "cointegrados", pueden caer en una disociación reversible en unidades separadas. Los plásmidos bacterianos pueden contener genes implicados en procesos, tales como; quimiotaxis, síntesis de exopolisacáridos, sideróforos, entre otros metabolitos que facilitan la colonización de las plantas hospederas. Algunos plásmidos, megaplásmidos o crómidos codifican muchos genes relacionados con la asimilación de carbono (Datta y Chakrabarty, 2014), vitaminas como biotina, tiamina o pantotenato, bacteriocina e incluso contienen genes relacionados con la síntesis de chaperonas y sistema de modificación-restricción, que son procesos bioquímicos claves en la adaptación y funcionalidad de las bacterias en el ambiente donde habitan. En especies de *Rhizobium*, muchos genes que participan en la nodulación y la fijación de nitrógeno han sido ampliamente estudiados. Estos genes se encuentran en estructuras genómicas especializadas denominados plásmido simbiótico o pSym. Los plásmidos se han considerado durante mucho tiempo (por definición) como componentes no esenciales de genomas bacterianos, no requeridos para la supervivencia y la replicación de bacterias individuales. Su función reconocida es conferir rasgos adicionales, aunque prescindibles, que mejoran la capacidad de las poblaciones bacterianas para colonizar y competir en comunidades naturales. Los pSyms cumplen con esta definición, al conferir la capacidad de colonizar un nicho particular, el nódulo de la raíz de la leguminosa. Las implicaciones básicas y aplicadas de la nodulación y la fijación de N<sub>2</sub> han motivado una intensa investigación sobre la base genética de estos fenómenos que se ha concentrado casi invariablemente en los pSyms.

Los ambientes extremos son un desafío para todos los organismos. En su mayoría están habitados por bacterias y arqueas, que emplean diversas estrategias para hacer frente a estas condiciones hostiles. Dichos entornos hostiles a menudo son muy vulnerables a la influencia de factores externos y puede sufrir cambios dinámicos frecuentes. La adaptación rápida de bacterias a condiciones ambientales cambiantes es crucial para su supervivencia. La evolución "a corto plazo" a menudo es posible gracias a los plásmidos: replicones extracromosómicos que representan a los principales actores en la transferencia horizontal de genes. Las secuencias genómicas de miles de microorganismos, incluyendo las de muchas bacterias extremófilas, se han obtenido en la última década, pero los datos recopilados aún no se han analizado a fondo. A pesar de esta situación, se conoce que genes contenidos en plásmidos de bacterias extremófilas codifican para enzimas que

están involucradas en (i) protección contra la acidez, frío y la radiación ultravioleta, (ii) eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS), (iii) metabolismo de aminoácidos, carbohidratos, nucleótidos y lípidos, (iv) producción y conversión de energía, (v) utilización de compuestos orgánicos tóxico (por ejemplo, naftaleno) y (vi) resistencia a metales pesados, metaloides y antibióticos. Algunos de los plásmidos también contienen sistemas de restricción / modificación de tipo II, que están implicados tanto en la estabilización del plásmido, como en la protección contra el ADN extraño. Algo importante, es que este tipo de plásmidos llevan módulos genéticos responsables de la transferencia conjugativa o movilización para la transferencia, lo que puede facilitar la propagación de estos replicones entre varias bacterias, incluso a través de los límites de las especies (Dziewit y Bartosik, 2014). En ambientes extremos, los plásmidos aumentan la plasticidad de los genomas bacterianos, y en consecuencia promueven la diversidad genética de sus huéspedes (Siefert, 2009). Además de un conjunto de módulos genéticos estructurales básicos responsables para la replicación, mantenimiento y propagación del plásmido, estos replicones muy a menudo llevan una carga adicional de información genética. Estos genes accesorios sirven como un depósito de diversos determinantes genéticos cuya presencia puede conferir una ventaja evolutiva a las cepas huésped en condiciones ambientales extremas. Así también, la transferencia horizontal de genes es un mecanismo importante que contribuye a la diversificación y adaptación bacteriana, y los plásmidos son los principales actores en este proceso. Muchos plásmidos son replicones auto-transmisibles o movilizables, que pueden transferirse de un huésped a otro, junto con varios genes "pasajeros" (a menudo incrustados dentro de transposones), que pueden ser útiles bajo presiones de selección particulares (Tamminen et al., 2012). Este fenómeno es extremadamente rentable para las bacterias y, de hecho, acelera el proceso de evolución.

#### **3.3.4. Secuenciamiento genómico**

Las técnicas de análisis genómico que se basan en la secuenciación masiva, han generado una revolución en la última década, no sólo en Biomedicina o Agronomía, sino también en el estudio de la diversidad biológica (Koboldt et al., 2013). Las plataformas de *secuenciación de segunda y tercera generación* que vienen a complementar a la secuenciación tradicional por el método Sanger, permiten analizar un gran número de individuos obteniendo una profundidad de secuenciación significativa de sus genomas o transcriptomas (Heather y Chain, 2016).

La secuenciación de genomas completos es un método versátil en la identificación rápida de genes en un organismo, y sirve como herramienta básica para exámenes posteriores funcionales de los nuevos genes descubiertos. La secuencia genómica provee un conjunto virtual de todas las proteínas

que el organismo puede expresar (Aguilar y Falquet, 2015). La secuenciación masiva ha sido extensivamente usada desde aplicaciones a escala micro hasta nivel macro, incluyendo la secuenciación de *novó* de genomas enteros, la resecuenciación de genomas, el perfil de los ARNm, el análisis de la evolución molecular, la detección de patrones de metilación, la exploración de registros fósiles y la evaluación de las proteínas de unión al ADN y a las estructuras de la cromatina (Koboldt et al., 2013). Las nuevas tecnologías han facilitado la secuenciación del ADN genómico de muchas especies de bacterias, generándose un gran volumen de datos en corto tiempo. Los estudios de la expresión de genes, que incluyen los análisis transcriptómico y proteómico, han ayudado a reconocer familias de genes y proteínas de varios sistemas biológicos que son regulados durante la colonización de la planta. Estas cifras sirven como indicadores en el establecimiento de las funciones proteicas bacterianas requeridas para sobrevivir en el medio ambiente (Vorholt, 2012).

Las tecnologías de secuenciación de próxima generación y herramientas bioinformáticas junto con la habilidad de generar conjuntos de cifras a escala genoma, están transformando la naturaleza de la investigación biológica (Mardis, 2013; Aguilar y Falquet, 2015). Para procesar y analizar el enorme volumen de datos biológicos acumulados, como resultado del uso de estas técnicas, ha sido necesario el empleo de aparatos bioinformáticos que permitan manipular eficientemente esta creciente cantidad de información, métodos que también se han venido modificando y perfeccionando a la par de las tecnologías NGS (Secuenciamiento de nueva generación). No queda duda alguna de que las NGS y los instrumentos bioinformáticos correspondientes han transformado la exploración sobre la microbiota de las plantas, animales y microorganismos.

El método de Sanger pertenece a la primera generación de técnicas de secuenciación, y terminó imponiéndose por su sencillez y precisión, pero posteriormente gracias a la secuenciación masiva se obtienen millones de secuencias a una velocidad sin precedentes y cada vez a costos más reducidos (Thomas y Gilbert, 2012). Con el objetivo de reducir costos se desarrollaron los llamados secuenciadores de segunda generación, o de alto rendimiento, capaces de generar cientos de miles de secuencias de manera más rápida y económica. La secuenciación de segunda generación se inició basándose en la pirosecuenciación del ADN. Existen 4 plataformas disponibles para secuenciación masiva, cuyas características son: Roche (454) (Margulies et al., 2005), b) SOLiD (Sequencing by Oligo Ligation Detection) (Krishnan et al., 2016), c) Illumina (MiSeq, HiSeq y NextSeq) (Krishnan et al., 2016) y d) Ion-Torrent (Perkel, 2011). Estas tecnológicas han permitido obtener una mayor información sobre la estructura y funcionalidad de las comunidades bacterianas aisladas en diferentes ambientes ecológicos.

### 3.4. Interacción: Planta-Suelo-microorganismos en ambientes extremos

Aunque los fisiólogos vegetales a veces ven al suelo simplemente como una fuente de nutrientes para las plantas, en realidad es un ecosistema complejo que alberga bacterias, hongos, protistas y animales (Muller et al., 2016). Las plantas exhiben una gran variedad de interacciones con estos organismos que viven en el suelo, que abarcan todo el rango de posibilidades ecológicas. En su entorno natural, las plantas son parte de un ecosistema rico que incluye en el suelo; numerosos y diversos microorganismos. Desde hace tiempo se reconoce que algunos de estos microbios, como las bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno, desempeñan un papel importante en el rendimiento de la planta al mejorar la nutrición mineral. Sin embargo, recientemente se comenzó a descubrir la gama completa de microbios asociados con las plantas y su potencial para reemplazar los insumos agrícolas sintéticos. En los últimos años, se ha avanzado mucho en el conocimiento de la composición de los microbiomas rizosféricos y su dinámica. Existe evidencia clara de que las plantas dan forma a las estructuras del microbioma, muy probablemente por exudados de las raíces, y también que las bacterias han desarrollado diversas adaptaciones para prosperar en el nicho de la rizósfera.

El filum *Proteobacteria* es el grupo más numeroso actualmente reconocido en el dominio Bacteria. Dentro de este grupo, la clase de *Alfaproteobacteria* alberga un conjunto misceláneo de metabolismos, fenotipos celulares y una amplia gama de hábitats, incluidos géneros fototróficos, simbioses de plantas (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Azorhizobium*), patógenos de animales y plantas (*Rickettsia*, *Brucella*, *Agrobacterium*) y también géneros capaces de metabolizar compuestos C1 (*Methylobacterium*). Los hábitats colonizados por alfaproteobacteria, van desde los suelos rizosféricos hasta ambientes volcánicos, en los que pueden interactuar con las raíces de las plantas. Las alfaproteobacteria, muestran una gran heterogeneidad en la arquitectura y tamaño del genoma (de 1.1 a 9.2 Mbp), con la presencia de replicones adicionales, como los cromosomas, y los plásmidos. Debido a estos rasgos genómicos, y también gracias a su versatilidad para adaptarse a diferentes hábitats, *Alfaproteobacteria* constituye un modelo biológico excelente para estudiar cómo evolucionan los genomas bacterianos y cómo las características genómicas se relacionan con la interacción con las plantas y con adaptación ambiental.

Particularmente intrigante es la capacidad de las alfaproteobacterias para interactuar con las plantas, como patógenos y como mutualistas/comensales no patógenos (simbioses/no simbioses) (p. ej., *Rhizobium*, *Azospirillum*). La bacteria *sensu lato* asociada a la planta se puede encontrar en y alrededor de las raíces, en el sistema vascular, en tejidos o en órganos específicamente desarrollados

(por ejemplo, nódulos de raíz), lo que permite clasificar las cepas como filosférico, rizosférico y endofítico. La bacteria filosférica habita las partes aéreas de la planta (hojas, tallos, brotes, flores y frutas), posiblemente afectando el crecimiento y desarrollo de la planta. La rizósfera es parte de suelo alrededor de raíces de plantas pobladas por microbios (bacterias y hongos); microorganismos de la rizósfera interactúa con las raíces en varios procesos como la descomposición de la materia orgánica, el mantenimiento de la estructura del suelo y las relaciones del agua, como consecuencia la rizósfera es un elemento nicho fundamental del ecosistema del suelo. Las bacterias endofíticas se pueden definir como aquellas bacterias que colonizan el tejido interno de las plantas (endósfera) sin signos externos de infección o efecto negativo en su hospedero; se pueden clasificar como endófitos 'obligatorios' o 'facultativos' de acuerdo con su estrategia de vida. Los endófitos obligatorios dependen estrictamente de la planta huésped para su crecimiento y supervivencia y la transmisión a otras plantas podría ocurrir solo por semillas o vía vectores, mientras que los endófitos facultativos podrían crecer fuera de la planta hospedera (Pini et al., 2011).

En ambientes naturales extremos, las interacciones entre las plantas y microorganismos, se encuentran restringidas por diversos factores abióticos y condiciones fisicoquímicas. En ambientes extremos salinos estas asociaciones se ven limitadas por las altas concentraciones de sal que reducen la comunicación química entre la planta hospedera y las bacterias; por ejemplo, bajo estrés por salinidad, las plantas reducen la producción de azúcares y en especial flavonoides, moléculas que son clave en los procesos de la quimiotaxis entre las raíces y las bacterias. Para el caso de las bacterias rizosféricas, la presencia de altas concentraciones de sal disminuye la capacidad de la producción de exopolisacáridos, compuestos que son importantes en el proceso de la colonización de las raíces.

En los ambientes volcánicos, el material piroclástico recientemente expuesto contiene altas concentraciones de dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>) y cantidades insignificantes de materiales orgánicos. Las erupciones volcánicas ofrecen numerosas oportunidades para aumentar nuestra comprensión de la formación de los ecosistemas terrestres. El primer paso clave del proceso de formación es la entrada de carbono y nitrógeno atmosféricos biológicamente transformados al ecosistema por microorganismos pioneros (King, 2003). La mayoría de los primeros colonizadores microbianos tienen capacidad de fijación de CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>, y pueden crecer utilizando sistemas de generación de energía foto- o quimiolitotróficos (es decir, mediante oxidación de sustratos inorgánicos: por ejemplo, S<sup>0</sup>, Fe<sup>2+</sup>, CO e H<sub>2</sub>). Como resultado, su actividad promueve el crecimiento de diversas comunidades heterotróficas, que se asocian con los cambios fisicoquímicos de los microambientes circundantes (Mackelprang et al., 2011). Sin embargo, el conocimiento del proceso de desarrollo de

sus ecosistemas y los mecanismos en la etapa inicial de la formación aún es limitado. En otro estudio sobre comunidades microbianas en ambientes volcánicos, se reportó que en los sustratos formados de la lava en el volcán Eyjafjallajökull en Islandia, predominaron bacterias agrupadas en las *Betaproteobacterias* relacionadas con diazotrofos no fotótrofos y quimiolitótrofos, tales como: *Herbaspirillum* y *Thiobacillus*, respectivamente. Por lo tanto, el predominio de los oxidantes de hierro acidófilos como organismos pioneros es una característica única de los depósitos volcánicos de reciente formación (Kelly et al., 2014).

Por otro lado, la ausencia o escasez de vegetación en muchos sitios volcanes activos exacerbaban la situación al limitar los insumos posdeposicionales. La falta de materia orgánica limita sustancialmente la naturaleza y tasas de colonización y sucesión microbianas. En tales sistemas, las entradas atmosféricas o sustratos reducidos liberados por la intemperie (por ejemplo,  $Mn^{2+}$ ) pueden apoyar el metabolismo y crecimiento. Las fuentes no exclusivas de carbono y energía para el desarrollo de las comunidades microbianas bajo estas condiciones incluyen (i) colonización fototrófica, (ii) entradas de materia orgánica acuosa o eólica, y (iii) deposición seca y húmeda de  $NH_4^+$  y gases traza (por ejemplo,  $CO$ ,  $H_2$  y  $CH_4$ ).

Relativamente pocos estudios han examinado la importancia de estas fuentes o patrones temporales de sucesión microbiana bajo condiciones extremas. Datos de comunidades cryptoendolíticas sugieren que la colonización bacteriana y la sucesión dependen de la fotosíntesis autóctona. Los análisis microbiológicos de recientes materiales volcánicos han llevado al aislamiento de termófilos, psicrotrofos, y otros heterótrofos, pero las actividades y funciones de estos organismos permanecen esencialmente desconocidos. Además, no está claro si los aislados observados representan poblaciones dominantes o son cepas oportunistas de rápido crecimiento.

Los datos obtenidos de volcanes activos en Hawái y otros sistemas volcánicos indican que varios grupos funcionales bacterianos tienen la capacidad de colonizar la lava y tephra con una relativa rapidez. Burleigh y Dawson en 1994 cultivaron el actinomiceto *Frankia* aislado de tephra hawaiana no depurada de 25 años. Este actinomiceto demostró capacidad para nodular eficientemente a *Myrica cerifera*, *Casuarina equisetifolia* y *Alnus glutinosa* en pruebas de inoculación. Crews et al., (2001) y Kurina y Vitousek, (2001) documentaron la capacidad de fijación de nitrógeno por la especie de liquen *Stereocaulon vulcani* en lava de 10 años en el volcán Mauna Loa. El análisis del material recolectado del volcán activo Mt. Erebus ha revelado varios taxones, incluyendo *Bacillus schlegeli*, un oxidante de  $CO$  y  $H_2$  reportado de suelos templados y muestras acuáticas. Usando enfoque molecular, Nusslein y Tiedje en 1998, observaron una sustancial diversidad en suelos forestales derivados de lava de 200 años de edad. La información reveló la

presencia de géneros que usan gases trazas y fijan N<sub>2</sub> (p. ej., *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Rhizobium*), así como numerosas formas novedosas, no-cultivables. Estos microorganismos pueden establecer asociaciones mutualísticas con plantas pioneras bajo condiciones de ambientes volcánicos empleando una serie de procesos bioquímicos y metabolitos, tales como solubilización de minerales (fósforo y potasio), fijación de nitrógeno y la producción de exopolisacáridos. De esta forma la interacción planta-microorganismos resulta de mucha importancia en la funcionalidad de los ambientes extremos.

Varios estudios han demostrado que los microorganismos fueron los colonizadores primarios en sustratos volcánicos recién expuestos, como la lava, la tefra y la ceniza volcánica, y contribuyeron al desarrollo temprano del ecosistema en tales nuevos sustratos. Antes de la colonización por las plantas, se descubrió que los microbios pioneros desempeñaban un papel importante en la fijación de carbono y nitrógeno de la atmósfera, lo que daba como resultado la entrada de materia orgánica en el depósito. La posterior colonización de las plantas influye directamente en la comunidad microbiana de depósito a través de la entrada de hojarasca, exudados de raíz y tejidos de raíces muertas. Tales interacciones planta-microbio impulsarán la sucesión primaria del ecosistema en el depósito volcánico. Con respecto a los ambientes volcánicos, la información sobre tales interacciones es limitada, pero varios estudios sobre un desierto volcánico y depósitos volcánicos jóvenes mostraron que la biomasa microbiana del suelo y la estructura de la comunidad se vieron influenciadas por las plantas colonizadoras (Guo et al., 2014).

### **3.5. Potencial biotecnológico de las BPCV extremófilas como biofertilizantes**

Las estrategias actuales de manejo del suelo dependen principalmente de los fertilizantes a base de sustancias químicas inorgánicas, que causan una grave amenaza a la salud humana y al medio ambiente. La explotación de microbios beneficiosos como biofertilizantes se ha convertido de primordial importancia en el sector agrícola por su papel potencial en la inocuidad de los alimentos y la producción sostenible de cultivos. Los enfoques ecológicos inspiran una amplia gama de aplicaciones de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) y muchos otros microorganismos útiles que conducen a una mejor absorción de nutrientes, crecimiento de plantas y tolerancia de plantas al estrés abiótico y biótico.

La microbiota de las plantas tienen la capacidad de colonizar la rizósfera, la filósfera y los tejidos internos de diferentes partes de la planta. La microbiota de plantas (epífitas, endofíticas y rizosféricas) tienen la capacidad de producir fitohormonas, solubilizar nutrientes y antagonizar contra patógenos. Los microbios asociados a la planta se han aislado de plantas creciendo bajo

diversas condiciones de estrés abiótico y estos microbios extremófilos ayudan en la promoción del crecimiento de la planta y las adaptaciones en ambientes hostiles de temperaturas, salinidad, pH y estrés por sequía. Los microbios aislados de plantas que crecen bajo diferentes tipos de estrés abiótico se denominan microorganismos extremófilos asociados a las plantas. Los extremófilos asociados a las plantas se han reportado de los tres dominios: arqueas, bacterias y eukaryas de diferentes filum/grupos. Por ejemplo: *Actinobacteria*, *Ascomycota*, *Bacteroidetes*, *Basidiomycota*, *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Firmicutes* y *Proteobacteria*. Los microbios poseen atributos multifuncionales para promover el crecimiento de las plantas y estos eficientes microbios pueden ser aplicados como biofertilizantes para mejorar los cultivos y la salud del suelo. Los microorganismos aislados de diferentes plantas que crecen bajo condiciones estrés abiótico de temperatura, salinidad, pH y deficiencia de agua, se dicen que son psicrófilos (-2°C a 20°C), termófilos (60°C a 115°C), halófilos (2-5 M), acidófilos (pH<4), álcalis (pH> 9) y xerófilos (potencial de agua 0.75 kPa). Los hábitats/nichos extremos representan ecosistemas únicos que albergan una biodiversidad novedosa con adaptaciones potenciales para diversos estreses. Para sobrevivir en condiciones tan extremas, estos organismos denominados extremófilos han desarrollado características de adaptación que les permite crecer de manera óptima bajo uno o más extremos ambientales, mientras que los poli-extremófilos crecen de manera óptima bajo múltiples condiciones (Yadav, 2017).

Las BPCV son un grupo heterogéneo de bacterias encontradas en la rizósfera, lo que puede mejorar la extensión o calidad del crecimiento de las plantas directa o indirectamente. Gracias al conocimiento de las señales de comunicación entre los organismos rizosféricos, es posible entender, al menos parcialmente, los mecanismos de acción de las BPCV. La diversidad microbiana asociada con cultivos se considera importante para el mantenimiento de la sostenibilidad de los sistemas de producción agrícola. La rizósfera es la zona del suelo influenciada por las raíces a través de la producción de sustratos que afectan la actividad microbiana (Bhardwaj et al., 2014).

En la búsqueda de especies bacterianas con alto potencial como BPCV, los ambientes extremos volcánicos resultan un nicho interesante y atractivo para su exploración. A la fecha existen pocos trabajos relacionados con el estudio de BPCV aisladas de sitios volcánicos activos. Destaca el trabajo reportado por Amaseran y colaboradores en 2013, quienes aislaron del suelo del volcán activo Barren (India) especies bacterianas agrupadas dentro del género *Bacillus*, *Escherichia*, *Ralstonia* y *Staphylococcus*. Estas bacterias demostraron alta capacidad para solubilizar fosfato inorgánico, sintetizar ácido indolacético (AIA) y producir sideróforos, y en pruebas de inoculación influyeron positivamente sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de chile y berenjena. Así, también las bacterias *Pantoea agglomerans* y *Exiguobacterium* sp. fueron aisladas del sedimento

fangoso y en cuevas de cal en el volcán de la Isla de Baratang (Islas Andamán, India). Estas bacterias mostraron un efecto antagónico contra fitopatógenos y propiedades como BPCV, tales como: producción de AIA, producción de HCN, solubilización de fosfato, producción sideróforos y síntesis de enzimas hidrolíticas (Venkadesaperumal et al., 2014).

Una aplicación innovadora de la investigación microbiológica en sistemas volcánicos son las BPCV, aquellas que ayudan a mantener el crecimiento de la planta en condiciones ambientales geoquímicas extremas. Solo ciertas plantas pioneras, principalmente las de la familia *Poaceae*, puede tolerar las severas condiciones ambientales que tipifican los suelos afectados por la actividad volcánica, por ejemplo, altas temperaturas, flujos de gases tóxicos a través de los suelos y sedimentos, bajo pH y presencia de elementos potencialmente tóxicos en aerosoles y agua (Baldantoni et al., 2009). Una actividad bacteriana PCV que es importante para las plantas que colonizan los sistemas volcánicos es la desintoxicación de compuestos fitotóxicos, como metales pesados. Las BPCV aisladas de plantas pioneras en áreas volcánicas también tienen el potencial de ser incorporadas en 'biofertilizantes' para sustentar el crecimiento de la planta en suelos alterados y degradados durante las prácticas de fitorremediación y restauración de tierras, por ejemplo, en la remediación de desechos de minas ácidas. El cultivo de microorganismos de sistemas volcánicos o la aplicación de la información de estos, así como el conocimiento de los taxones no cultivables, pueden contribuir a prácticas socialmente aceptables y amigables con el medio ambiente en la restauración de suelos.

#### **IV. JUSTIFICACION**

Es conocido que la aplicación constante de fertilizantes y durante largos periodos de tiempo altera significativamente la estructura biológica y fisicoquímica de los suelos provocando que estos

pierdan su fertilidad. Por este motivo, hoy en día, se buscan nuevas alternativas de fertilización que permitan la regeneración de suelos y mejoren el crecimiento y nutrición de los cultivos. El empleo de las Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV), consiste en utilizar microorganismos que, en interacción con el suelo, mejoren el crecimiento de las plantas. El estudio de las bacterias asociadas con las plantas de importancia agrícola, ha incrementado recientemente, considerando el potencial de estos microorganismos para su empleo como biofertilizantes.

Una de las principales razones de la búsqueda de especies microbianas para su empleo como biofertilizantes, es debido a la capacidad de algunas bacterias para fijar nutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas. Dentro de este grupo de bacterias benéficas se encuentran las BPCV, que se caracterizan por sus cualidades multifuncionales, tales como: (i) la capacidad de producir o cambiar la concentración de reguladores del crecimiento de las plantas como AIA, ácido giberélico, citoquininas y etileno; (ii) fijación de  $N_2$ ; (iii) antagonismo contra microorganismos fitopatógenos por producción de sideróforos, antibióticos y cianuro, y (iv) solubilización de fosfatos minerales, entre otros metabolitos de importancia biológica y bioquímica que influyen positivamente en el crecimiento de las plantas.

Los ambientes volcánicos activos se han convertido en nichos ecológicos importantes, que albergan una amplia diversidad de especies microbianas que juegan un papel clave en la fijación y movilización de nutrientes. Estos microorganismos se han adaptado a condiciones de estrés altamente extremas, tales como la acidez, alcalinidad, salinidad, altas temperaturas, presencia de metales tóxicos y una reducida concentración de oxígeno. Especies de bacterias agrupadas en el género *Acinetobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Rhizobium*, *Stenotrophomonas*, entre otras; han sido aislados de suelos en ambientes volcánicos y en pruebas de inoculación han demostrado alto potencial como BPCV y su aplicación como inoculantes en cultivos agrícolas y en programas encaminados a la regeneración de suelos erosionados ha cobrado relevancia en los últimos años.

Una de las estrategias biológicas más importantes de las comunidades microbianas de ambientes extremos es la capacidad para establecer asociación con las plantas pioneras. Las bacterias rizosféricas colonizan las raíces y otros tejidos vegetales, y bajo estas condiciones realizan procesos bioquímicos poco estudiados que están relacionados con la captación de nutrientes y síntesis de metabolitos que influyen sobre la salud y crecimiento de las plantas.

Por lo anterior, esta investigación está enfocada en el estudio de la diversidad de bacterias extremófilas asociadas con plantas pioneras que crecen en el lago-cráter de volcán El Chichón,

determinar sus cualidades multifuncionales como BPCV y su uso potencial como biofertilizantes en cultivos de importancia agrícola.

## **V. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo general**

Estudiar la estructura, diversidad y funcionalidad de las comunidades bacterianas promotoras del crecimiento vegetal asociadas a plantas pioneras del volcán El Chichón.

## **5.2. Objetivos específicos**

- 1.- Determinar las características fisicoquímicas del suelo rizosférico de las plantas pioneras del volcán El Chichón
- 2.- Estudiar la diversidad y estructura de las comunidades bacterianas asociadas a las plantas pioneras del volcán El Chichón usando enfoque cultivable (genómica) y no-cultivable (metagenómico)
- 3.- Evaluar la habilidad multifuncional bioquímica de las cepas bacterianas asociadas a las plantas pioneras
- 4.- Evaluar el potencial como Promotoras del Crecimiento Vegetal de las especies bacterianas a través de pruebas de inoculación

## **VI. METODOLOGÍA**

### **6.1 Descripción del área de estudio**

Las muestras biológicas se recolectaron en el volcán El Chichón, ubicado en la región Norte del estado de Chiapas (17.36° Latitud Norte y 93.23° Longitud Oeste), a una altitud de 1150 m sobre el nivel del mar. Este lugar presenta un clima cálido-húmedo tipo Af-A(C) f(m) con lluvias abundantes en verano. La precipitación media anual es de 4,029.4 mm y la temperatura promedio anual es de 26.4°C, en una zona determinada isotermal (Pérez-Jiménez y Sarukhan-Kermes, 1971). El suelo de color negro, tipo Andosol incipiente (o inceptisol tendiente a andosol), de naturaleza acida y presenta un alto contenido de alófono.

## 6.2. Recolección de material biológico

Las cepas bacterianas fueron aisladas del suelo rizosférico y de tejidos vegetales (bacterias endófitas) de las plantas que crecen en el lago-cráter del volcán El Chichón. Así también se tomaron muestras en el exterior del complejo volcánico en dos transectos sobre las laderas del volcán. Los dos puntos T1 y T2 del transecto estuvieron serapados a 1.62 km de distancia en línea recta (Figura 4). Las muestras biológicas consistieron en tres plantas completas con suelo rizosférico, las cuales fueron extraídas por cada punto de muestreo utilizando el método descrito por Schafer et al, (2014). Para el caso de las muestras en el interior del volcán, los puntos de colecta se seleccionaron de acuerdo a la metodología de muestreo de cinco de oros, todo esto en un área mínima de 20×20 m. Así también, se colectó un ejemplar de cada una de las plantas para la identificación taxonómica. Se tomaron fotografías de las plantas hospederas y del perfil edáfico del suelo para fines de análisis de datos. Las muestras se etiquetaron y se colocaron en hieleras portátiles refrigeradas para su transporte al laboratorio y estudios correspondientes. Posteriormente, las muestras de rizósfera fueron obtenidas cuidadosamente como lo indicado por Clemensson-Lindell y Persson, (1992).



**Figura 4.** Puntos de muestreo en el exterior del volcán El Chichón.

### **6.3. Caracterización fisicoquímica del suelo rizosférico**

El pH, conductividad eléctrica (CE) y la capacidad de intercambio catiónico (CIC) de los suelos rizosféricos de las plantas pioneras se realizó de acuerdo a lo indicado en la Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de los suelos, estudio y análisis. Así también, se determinó el contenido de carbono y nitrógeno total usando un auto-analizador FLASH 2000 y en el caso del fósforo total fue determinado por el método de solubilización con HNO<sub>3</sub>/HClO<sub>4</sub>. Adicionalmente se realizaron los análisis fisicoquímicos para una muestra control, la cual consistía en un suelo circundante al lago-cráter pero sin presencia de plantas y también un suelo agrícola fue incluido en este estudio.

### **6.4. Aislamiento y cultivo de cepas bacterianas**

Se utilizaron medios de cultivo sintéticos selectivos-enriquecidos para aislar grupos específicos de Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV). El procedimiento preliminar para aislar consistió en tomar 10 g de suelo rizosférico y posteriormente la muestra fue diluida en 100 mL en agua estéril. A continuación, se inocularon las suspensiones en el medio líquido correspondiente y después fueron incubados hasta presentar turbidez.

Se realizaron diluciones seriadas (desde 10<sup>-1</sup> hasta 10<sup>-6</sup>) y se inocularon en los diferentes medios sólidos específicos que a continuación se indican:

#### **a) Bacterias fijadoras de nitrógeno**

Se emplearon los medios de cultivo libres de Nitrógeno Winogradsky y NFB, con la finalidad de obtener únicamente microorganismos con capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico (Navarro-Noya et al., 2012; Baldani et al., 2014).

Se tomó una alícuota de 1.5 mL de la suspensión realizada (10 g de suelo rizosférico) y se inoculó en medio líquido Winogradsky libre de Nitrógeno [10 g L<sup>-1</sup> sacarosa o glucosa, 5 mL L<sup>-1</sup> de solución concentrada de sales\* [\*Solución concentrada de sales g L<sup>-1</sup>: (50.0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25.0 g MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 25.0 g NaCl, 1.0 g FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 1.0 g MnSO<sub>4</sub> 4H<sub>2</sub>O, 1.0 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 4H<sub>2</sub>O), una pizca de CaCO<sub>3</sub>] ajustado a un pH de 6.5.

Para el caso del medio semi-sólido NFB g L<sup>-1</sup>: (5.0 g ácido málico, 5.0 mL KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10%, 2.0 mL MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 10%, 1.0 mL NaCl 10%, 0.04 g FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 2.0 mL Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 4H<sub>2</sub>O 0.1%, 1.0

mL  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1%, 4.8 g KOH, 0.2 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.3 g extracto de levadura, 5.0 mL azul de bromotimol, 7.0 g agar) ajustado a un pH de 6.8.

Los matraces con medio líquido Winogradsky se incubaron a 120 rpm hasta presentar turbidez y los tubos de ensayo con medio semisólido NFB se incubaron a 28-30°C hasta presentar crecimiento en forma de película bacteriana sobre la superficie del medio.

Se realizaron diluciones seriadas del medio de cultivo líquido Winogradsky en agua destilada estéril y 100  $\mu\text{L}$  de las diluciones  $10^{-3}$  a la  $10^{-6}$  se esparcieron sobre la superficie de medio Winogradsky sólido con ayuda de perlas de vidrio estériles. Se dejaron incubar a 28-30°C hasta mostrar crecimiento colonial.

Posteriormente, al crecimiento de una película bacteriana en el medio semi-sólido NFB, se realizó resiembra de ésta en medio NFB sólido. En ambos casos, se resembraron todos los morfotipos diferentes que fueron observados.

#### b) **Bacterias oxidantes de nitrito**

Se tomó una alícuota de 1.5 mL de la suspensión de suelo como inóculo en medio líquido para bacterias oxidantes de nitrito (por sus siglas en inglés NOB): 1 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{NaNO}_2$ , 1 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.3 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{NaCl}$ , 0.1 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.03 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.3 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$ , 1 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{CaCO}_3$ , 0.05 g  $\text{L}^{-1}$  urea, ajustado a un pH de 7.5.

Se incubó 28°C en agitación a 120 rpm hasta presentar turbidez. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas del cultivo anterior en agua destilada estéril y 100  $\mu\text{L}$  de las diluciones  $10^{-3}$  a la  $10^{-6}$  se esparcieron sobre la superficie del medio NOB sólido. Se dejaron incubar a 28-30°C hasta mostrar crecimiento de las colonias. Posteriormente se resembraron todos los morfotipos diferentes que fueron observados (Yang et al., 2015).

#### c) **Bacterias oxidantes de amonio**

Los aislados de bacterias oxidantes de amonio (por sus siglas en inglés AOB) se obtuvieron usando un medio de cultivo rico en iones de amonio. Se tomó una alícuota de 1.5 mL de la suspensión de suelo como inóculo en medio líquido AOB: 0.5 g  $\text{L}^{-1}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.03 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.3 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{NaCl}$ , 0.3 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 7.5 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{CaCO}_3$ . Se incubó a 28°C en agitación a 120 rpm hasta la clarificación del medio. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas del cultivo anterior en agua destilada estéril y 100  $\mu\text{L}$  de las diluciones  $10^{-3}$  a la  $10^{-6}$  se esparcieron sobre la superficie del medio AOB sólido. Se dejaron incubar a 28-30°C hasta mostrar

crecimiento colonial. Posteriormente se sembraron todos los morfotipos diferentes que fueron observados

#### d) **Solubilizadoras de fosfato**

Se tomó una alícuota de 1.5 mL de la suspensión de suelo o de las raíces finamente molidas como inóculo en medio líquido NBRIP: 10 g L<sup>-1</sup> dextrosa, 5.0 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 10 mL L<sup>-1</sup> stock de sales\*.

\*Stock de sales (250 mL): [6.25 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 5.0 g KCl, 2.5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>], 125 g MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O], ajustado a un pH de 7.0.

Se incubó a 28°C en agitación a 120 rpm hasta la clarificación del medio. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas del cultivo anterior en agua destilada estéril y 100 µL de las diluciones 10<sup>-3</sup> a la 10<sup>-6</sup> se esparcieron sobre la superficie del medio NBRIP sólido. Se dejaron incubar a 28-30°C hasta mostrar crecimiento colonial. Posteriormente se sembraron todos los morfotipos diferentes que fueron observados (Liu et al., 2015).

### **6.5 Caracterización fenotípica de cepas aisladas**

Con base en la nomenclatura bacteriana (Manual de Bergey), se realizó el estudio de la morfología celular de los aislados usando microscopio fotónico (Zeiss®, Primo Star) y tinción diferencial de Gram. Así también, la morfología de las colonias crecidas en los distintos medios de cultivo se analizó. Se consideró el aspecto, tamaño, forma, color y la capacidad para producir algún tipo de pigmento o exopolisacáridos (EPS). Se probó la capacidad de las cepas bacterianas seleccionadas para crecer en medios de cultivo a diferentes concentraciones de NaCl y a diferentes niveles de pH. Los aislados se cultivaron individualmente en caldo nutritivo durante la noche y la DO<sub>600</sub> nm se ajustó a 1 antes de sembrarse en medio sólido nutritivo con las diferentes concentraciones de NaCl y niveles de pH.

### **6.6 Caracterización genotípica de las bacterias**

#### **6.6.1 Extracción de ADN genómico**

El ADN total de cada una de las cepas bacterianas puras se extrajo usando el kit Fungal/Bacterial total DNA (ZYMO RESEARCH®), siguiendo las especificaciones del fabricante. Para verificar la integridad del ADN extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa en TAE

1X al 0.8%, 7 V/cm, 25 min y utilizando 3 µL/carril de ADN, los fragmentos de ADN se observaron bajo luz UV usando un transiluminador (UVP's Benchtop™). La concentración y calidad del ADN extraído se corroboró por espectrofotometría en Nanodrop One (Thermo Scientific™).

### 6.6.2 Estudio de huellas genómicas bacterianas

Se generaron huellas genómicas usando el oligo BOX A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') a partir del ADN extraído de las cepas bacterianas en estudio. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó usando un termociclador Applied Biosystem™ 2720 y el siguiente programa: Una desnaturalización a 95°C 7 min, 35 ciclos de amplificación (94°C 1 min, 53°C 1 min, 56 °C 4 min), con un paso de elongación final de 16 min de 65 °C. La mezcla de reacción fue realizada para un volumen final de 10 µL con buffer de PCR 1X y MgCl<sub>2</sub> a 2 mM, Taq polimerasa 0.5 U, dNTP 0.1 mM cada uno, cebador A1R 50 pmoles, 1µL de ADN molde. Los patrones genómicos fueron identificados después de la separación de los productos de PCR por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y analizadas con la ayuda del software *GelCompar II* (Applied Maths™). El índice de diversidad y abundancia de las cepas aisladas por cada medio de cultivo utilizado se calculó utilizando índice de Shannon-Weaver (Versalovic et al., 1991)

### 6.6.3 Amplificación del gen 16S ARNr bacteriano

El gen 16S ARNr amplificado de cada muestra se obtuvo mediante PCR utilizando los cebadores universales 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3'). Las mezclas de reacción (10 µL) consistieron en buffer de PCR 1X, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, 0.2 mM de cada dNTP, 0.5 µM de cada cebador y 0.5 U de Taq polimerasa. Luego se añadió 1µL de ADN molde. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Mastercycler 5333 Eppendorf™ con una etapa de desnaturalización inicial a 94°C 7 min, 30 ciclos de amplificación (94°C 30 s, 55°C 30 s, 72 °C 1 min) y una extensión final a 72°C 7 min. Para visualizar los productos de PCR, se cargaron 5 µL de la reacción en un gel de agarosa al 1% adicionado con GelRed™ como colorante y se realizó una electroforesis a 80 V durante 25 min en buffer TAE 1X. El gel se analizó con un fotodocumentador *Bio-Rad GelDoc™ EZ Imager*. Posteriormente, los productos de PCR se purificaron usando el kit de sistema de purificación de productos de PCR de ROCHE® y se enviaron para su secuenciamiento a la empresa MACROGEN® (Seúl, Corea). Las secuencias obtenidas se compararon con otras secuencias de referencia obtenidas mediante la búsqueda de BLAST en GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). Posteriormente, las

secuencias se alinearon usando el software CLUSTAL X (2.0) y se realizaron modificaciones menores a las secuencias con el editor BIOEDIT v 7.2.5. Así mismo, se realizaron análisis evolutivos filogenéticos y moleculares con MEGA v 5.2. Se construyeron árboles filogenéticos basados en las secuencias del gen 16S ARNr usando "Neighbour-Joining" (Saitou y Nei, 1987) con 1000 pseudoreplicas y utilizando el modelo Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993). Las secuencias del gen 16S ARNr que se obtuvieron en este estudio se depositaron en la base de datos GenBank.

#### **6.6.4 Huellas genómicas ARDRA (Análisis de Restricción de ARNr Amplificado)**

La digestión de los amplicones del gen 16S ARNr se llevó a cabo usando la enzima *Alu I* (New England Biolabs®) en reacciones de 10 µL que contenían 0.2 U de enzima y 2.0 µL de producto de PCR. La digestión se llevó a cabo mediante una incubación térmica a 37°C por 24 h. Los productos de digestión se cargaron en un gel de agarosa al 3% para realizar la electroforesis a 80 V durante 40 minutos. Los geles se visualizaron en un fotodocumentador *Bio-Rad GelDoc™ EZ Imager*. Los perfiles ARDRA fueron analizados por el software *GelCompar II* (Applied Maths™). Se eligió una muestra de cada patrón diferente obtenido, como representativa del grupo al que pertenece para análisis posteriores.

Los perfiles genómicos obtenidos por ARDRA fueron utilizados para calcular la diversidad ( $H$ ) de bacterias usando el índice de Shannon-Weaver con la siguiente fórmula (Pereira et al., 2011):

$$H' = - \sum_{i=1}^S (p_i \times \log_2 p_i)$$

Donde S: número de especies; N: total de individuos; ni: número de individuos de especie; Pi: ni/N Abundancia relativa de especie I.

#### **6.6.5 Extracción de ADN metagenómico y secuenciación**

Se extrajo el ADN metagenómico de las muestras de suelo rizosférico de ambas plantas usando un kit comercial ZymoBIOMICSTM DNA Miniprep, siguiendo las especificaciones del fabricante. La integridad y calidad del ADN extraído se observó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% TAE 1X, teñido en bromuro de etidio 1%. Los fragmentos de ADN se observaron bajo UV-transiluminador (UPV-3000). La concentración y calidad del ADN extraído se corroboró con un espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop™ One Microvolume (Thermo Scientific®).

El ADN metagenómico de cada muestra ambiental fue enviado bajo las especificaciones de la empresa MACROGEN® para su secuenciamiento mediante la plataforma de secuenciación HiSeq 2000. Los resultados de los análisis de las muestras fueron procesados mediante la plataforma bioinformática QIIME v1.9.1.

## **6.7. Evaluación de las cepas bacterianas como Promotoras del Crecimiento Vegetal (PCV).**

### **6.7.1 Ensayo de la Reducción de Acetileno (ARA)**

El potencial de fijación de nitrógeno fue analizado por medio del ensayo de reducción de acetileno (ARA) (Staal et al., 2001). Se utilizó una sola colonia bacteriana previamente cultivada en medio semisólido Winogradsky libre de N. Los cultivos se incubaron a 28°C por 72 h, y luego se inyectó una atmósfera de acetileno en una concentración final de 10%. El acetileno se produjo disolviendo carburo de calcio ( $\text{CaC}_2$ ) en agua y se inyectó a una concentración final de 10% (v/v) mediante la sustitución de un volumen idéntico de aire. Las muestras se incubaron por 6 h para poder detectar la actividad de la enzima nitrogenasa. La actividad de reducción de acetileno se midió en un cromatógrafo de gases Varian 3300 (Walnut Creek, CA, EE.UU.) con un detector de ionización de flama.

### **6.7.2. Solubilización de fosfato**

La capacidad de los aislados bacterianos para solubilizar el fosfato se evaluó cualitativamente utilizando el medio de cultivo NBRIP (Nautiyal, 1999). Las cepas se inocularon y posteriormente se incubaron a 30°C durante 5 días. La solubilización de fosfato se determinó midiendo la zona clarificada (halo de solubilización) que rodea a la colonia bacteriana desarrollada. El índice de solubilización de fosfato (SI) se calculó usando la fórmula:  $[\text{diámetro de colonia} / \text{diámetro de la zona de halo}] / [\text{diámetro de colonia}]$  (Liu et al., 2015).

### **6.7.3. Producción de sideróforos**

Para determinar la producción de sideróforos por los aislados bacterianos, las cepas seleccionadas se sembraron en medio CAS-agar [chromeazurool-S (CAS), iron (III) y bromuro hexadeciltrimetilammonio (HDTMA)] a 28°-30°C durante 5 días hasta notar el halo de producción (Liu et al., 2014).

#### **6.7.4. Producción de Ácido Indolacético (AIA)**

Se realizó el método descrito por Gordon y Weber, (1951) para analizar la capacidad de producción de AIA. Se utilizaron tubos de ensayo que contenían 5 ml de medio de caldo de soya tripticaseína al 10% suplementado con L-triptófano 5 mM se inocularon con 10  $\mu$ l de inóculo bacteriano ( $OD_{600nm} = 0.2-10^9$  células  $mL^{-1}$ ) y se incubaron a 30°C, durante 72 h, bajo agitación constante a 180 rpm. Los tubos se centrifugaron a 10 000 rpm durante 10 min, se transfirieron 500  $\mu$ L del sobrenadante a un tubo de ensayo y se agregaron 500  $\mu$ l de solución Salkowsky ( $FeCl_3$  al 2% en ácido perclórico 0.5 M al 35%). Esta mezcla se mantuvo en la oscuridad, a temperatura ambiente durante 30 min. El AIA producido por cada cepa se midió por triplicado (Hernández-Mendoza et al., 2008).

#### **6.7.5. Actividad de la ACC desaminasa**

La actividad de la ACC desaminasa fue determinada de acuerdo a lo descrito por Glick, (1995). Un inóculo bacteriano de 5  $\mu$ l de  $10^9$  cel  $mL^{-1}$  ( $OD_{600nm}=0.2$ ) de cada uno de los aislados fue inoculado en medio de cultivo conteniendo: 0.25 g  $K_2HPO_4$ ; 0.05 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0.025 g  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0.25 g  $CaCO_3$ ; 0.05 g  $NaCl$  0.0012 g  $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ ; 2.5 g glucosa; 3.75 g agar; 240 ml agua destilada, y 0.03 % de ACC como única fuente de nitrógeno. Las placas de Petri fueron incubadas a 30°C por cuatro días. Las colonias que crecieron fueron sub-cultivadas a medio fresco conteniendo ACC e incubadas bajo las mismas condiciones para confirmar el crecimiento. El desarrollo de colonias bacterianas indica la producción de ACC deaminasa por estos aislamientos.

#### **6.7.6. Producción de enzimas extracelulares**

Las cepas bacterianas se cultivaron individualmente en caldo nutritivo durante la noche y la  $DO_{600 nm}$  se ajustó a 1.0 antes de sembrarse en los respectivos medios sólidos (20 g  $L^{-1}$  agar) para la visualización de producción de enzimas extracelulares. A continuación, se describen los medios utilizados:

##### *a) Lipasa*

Se preparó agar nutritivo al volumen deseado y se agregó a la solución  $CaCl_2$  al 0.01% y  $NaCl$  10 g  $L^{-1}$ . Posteriormente se agregó a la solución Tween 80 al 1%. Las bacterias fueron consideradas positivas en la producción de lipasa si se formaba un halo blanquecino alrededor de la colonia crecida (Dastager et al., 2009).

#### b) Amilasa

Se preparó medio sólido utilizando almidón 10 g L<sup>-1</sup>, peptona 5 g L<sup>-1</sup>, extracto de levadura 3 g L<sup>-1</sup> y NaCl 10 g L<sup>-1</sup>, se ajustó el pH a 7 y se incubaron las cajas una vez inoculadas por 72 h. La zona de digestión de almidón se determinó aplicando a las placas yodo-lugol (Kammoun et al., 2008).

#### c) Celulasa

Se preparó medio sólido agar-CMC (carboximetil celulosa) utilizando 2 g L<sup>-1</sup> de NaNO<sub>3</sub>, 1 g L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>, 0.5 g L<sup>-1</sup> de KCl, 2 g L<sup>-1</sup> CMC, 0.2 g L<sup>-1</sup> peptona, 17 g L<sup>-1</sup> agar bacteriológico. Las placas se incubaron a 28°C por 48 h, una vez transcurrido el tiempo de incubación se tiñeron con solución yodo-lugol de 3 a 5 min (Kasana et al., 2008).

#### d) Proteasa

Se preparó medio sólido utilizando peptona 10 g L<sup>-1</sup>, extracto de levadura 3 g L<sup>-1</sup>, leche deslactosada 10 g L<sup>-1</sup>, NaCl 10 g L<sup>-1</sup>, ajustado a un pH de 8.5. Las cajas se incubaron hasta mostrar crecimiento a 28°C. La actividad proteolítica se determinó observando una zona clara de hidrólisis alrededor de las cepas (Mahanta et al., 2008).

### 6.7.7 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de metales pesados.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de metales pesados se determinó mediante microdilución en caldo (Navarro-Noya et al., 2012). Los metales se usaron como sales de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, ZnCl<sub>2</sub>, AlSO<sub>4</sub>, Pb<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, CoSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. Una suspensión de inóculo se ajustó a 0.5 McFarland (OD<sub>600</sub> de 0.125) en medio PY (Yao et al., 2002). Las microplacas se incubaron a 28°C. Las concentraciones de metales utilizadas (mM) fueron para Al<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup> de 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y 5.0. Las concentraciones (mM) utilizadas para Co<sup>2+</sup> y Cr<sup>3+</sup> fueron de 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5. Las cepas que crecieron a 1 mM de Cu<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Pb<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup>; y 0.5 mM de Co<sup>2+</sup> y Cr<sup>3+</sup> se consideraron resistentes (Brim et al., 1999; Nieto et al., 1987).

## 6.8. Pruebas de inoculación usando cepas bacterianas PCV

### 6.8.1 Ensayo de inoculación a nivel de cámara bioclimática

Un representante de cada una de las especies bacterianas identificadas taxonómicamente fue seleccionado para realizar las pruebas de inoculación *in vitro*. Plantas frijol (*Phaseolus vulgaris* L.

cv. Negro Xamapa) fueron empleadas como planta trampa. Las semillas de Negro Xamapa se esterilizaron con etanol al 70% durante 5 min. y en hipoclorito de sodio al 25% durante 15 min, seguido de diez lavados con agua estéril. Las semillas esterilizadas se germinaron en una placa que contenía 0.8% de medio de agar-agua. Una vez que se vio la radícula, las plántulas se colocaron en matraces Erlenmeyer que contenían vermiculita humedecida con medio Fahraeus libre de N [CaCl<sub>2</sub>, 0.1 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.12 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.15 g; citrato de Fe, 0.005 g; trazas de Mn, Cu, Zn, B; agua destilada 1000 mL; pH 6.5] (Fahraeus, 1957). El protocolo de inoculación fue establecido de acuerdo al manual teórico-práctico: “*Los Biofertilizantes y su uso en la Agricultura*” (Martínez-Romero et al., 2013). Para la inoculación de las plantas se utilizó una concentración celular de 1×10<sup>6</sup> cel mL<sup>-1</sup> (Amaresan et al., 2013). El ensayo de inoculación se realizó usando un diseño completamente al azar. Se evaluaron 17 tratamientos con cuatro repeticiones cada uno (Cuadro 1). Doce tratamientos consistieron en las cepas seleccionadas aisladas en este estudio. *Sinorhizobium mexicanum* ITTG-R7 y *Azospirillum brasilense* CD se incluyeron como cepas de referencia. Las plantas tratadas con KNO<sub>3</sub>-N y con Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> sirvieron como controles positivos. Las plantas no inoculadas se usaron como controles negativos. Las plantas se cultivaron en condiciones de cámara de crecimiento a 25°C y 38% de humedad relativa (HR) durante 30 días con un fotoperíodo de 14 h de luz/10 h de oscuridad. La iluminación fue proporcionada por lámparas fluorescentes con 50 µE m<sup>-2</sup> S<sup>-1</sup>.

**Cuadro 1.** Tratamientos utilizados para evaluar el crecimiento de *Phaseolus vulgaris* L. cv. Negro Xamapa.

No. Tratamiento	Cepa Bacteriana
1	<i>Brevibacillus choshinensis</i> W12
2	<i>Chryseobacterium culicis</i> NOB78
3	<i>Pantoea ananatis</i> PO4103
4	<i>Burkholderia</i> sp. PO4109
5	<i>Serratia marcescens</i> AOB122
6	<i>Exiguobacterium indicum</i> AOB127
7	<i>Methylobacterium</i> sp. EC-06
8	<i>Kocuria palustris</i> EC-17
9	<i>Microbacterium arborescens</i> EC-18
10	<i>Bacillus sralis</i> EA-40
11	<i>Agrobacterium larrymoorei</i> EC-34
12	<i>Sphingomonas sanguinis</i> EA-45
13	<i>Sinorhizobium mexicanum</i> ITTG-R7
14	<i>Azospirillum brasilenses</i> CD

15	Control fertilizante KNO <sub>3</sub> -N
16	Control fertilizante Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>
17	Control negativo

Al término del tiempo de cultivo las plantas se colectaron y se evaluó los siguientes parámetros: altura total de planta (cm), peso seco total (g), peso seco raíz (g), contenido de clorofila (%), nitrógeno total (%) y fosforo total (%) (Ruíz-Valdiviezo *et al.*, 2010).

### 6.8.2 Ensayo de inoculación bajo condiciones de invernadero

Se evaluó el efecto de la inoculación de cepas bacterianas del complejo volcánico El Chichón, aisladas e identificadas en este trabajo, sobre el crecimiento de plantas de chile habanero (*Capsicum chinense*) a nivel invernadero. Para la inoculación de las plantas se utilizó una concentración celular de  $1 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>. Las plantas fueron distribuidas siguiendo un diseño completo aleatorizado (DCA) con seis repeticiones por tratamiento. Se evaluaron 10 tratamientos donde siete correspondían a cepas aisladas del volcán Chichón, una cepa control *Sinorhizobium mexicanum* ITTG-R7, un control positivo con fertilizante químico (Phyto Green®) y un control negativo (plantas sin inocular). Las cepas aisladas del volcán utilizadas en la inoculación fueron *Agrobacterium larrymoorei* EC34, *Pseudomonas* sp. EAR140, *Bacillus* sp. EAE19, *Brevibacillus choshinensis* W12, *Exiguobacterium indicum* AOB127, *Acinetobacter* sp. EAR111 y *Arthrobacter* sp. ECR152. Las plantas se inocularon dos veces durante el periodo de experimentación. Al término del tiempo de cultivo (62 días) las plantas se colectaron y se evaluaron los siguientes parámetros: Altura total de planta (cm), peso seco total (g), peso seco raíz (g), contenido de clorofila (%), carbono orgánico (%), nitrógeno total (%) y fosforo total (%).

### 6.9 Análisis estadístico de datos

Todos los datos obtenidos en los análisis fisicoquímicos y pruebas de inoculación fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA simple) con un nivel de significancia  $\alpha=0.05$ . Se realizó la prueba de Tukey para la comparación de medias ( $p<0.05$ ) utilizando el paquete estadístico Statgraphics Centurion versión XV.2 (Statpoint Tech®, VA, USA).

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **7.1. Características botánicas y taxonómicas de las plantas pioneras del lago-cráter del volcán El Chichón.**

Los suelos de reciente formación del lago-cráter del volcán El Chichón, se han venido colonizando paulatinamente con algunas plantas pioneras. En este sitio únicamente dos especies de plantas fueron colectadas e identificadas taxonómicamente (Cuadro 2). Ambas plantas son dominantes, sin embargo, la especie *Andropogon glomeratus* (Poaceae) mostró una mayor distribución y densidad poblacional. La característica más sobresaliente de esta planta es el sistema radicular tipo fibroso que forma agregados con el suelo y permite su rápido crecimiento a través de estolones o retoños (Figura 5).

**Cuadro 2.** Características botánicas y estatus taxonómico de las plantas pioneras del lago-cráter Chichón.

No. de registro Herbario*	Nombre Científico	Familia	Características Botánicas
<b>CHIP-51832</b>	<i>Andropogon glomeratus</i> (Walt) B.S.P 	Poaceae	Planta de 0.6 a 1.5 m de alto. Raíz fibrosa. Tallo cespitoso y comprimido. Hojas basales y caulinares, sin tricomas: vainas con forma de quilla, lígula de 0.8 a 1.5 mm de largo y ciliada. Inflorescencia: Panículas compuestas, numerosas, ovoides y plumosas; Al madurar, la inflorescencia se vuelve rojizo o café. Flores: Espiguillas sésiles de 3.2 a 3.5 mm de longitud. Planta 2n=20.
<b>CHIP-51833</b>	<i>Cheilanthes aemula</i> Maxon 	Pteridaceae	Planta de tallo corto, 4-7 mm de diámetro; con escamas marrones a oscuras. Hojas agrupadas, 10-50 cm; venación no-circinada. Pecíolo negro a marrón. Hoja ovada-deltada, 3-pinnada en la base, 4-15 cm de ancho; raquis redondeado. Pinnas no articuladas, color oscuro, pápulas basiscópicas. Falso indusio marginal, 0.05-0.25 mm de ancho. Sori discontinuo, en lóbulos laterales interrumpidos. Esporangios con 64 esporas. 2 n = 58.

- Las plantas pioneras fueron identificadas por el Jardín Botánico "Faustino Miranda" (CHIP), de la Secretaría de Medio Ambiente e Historia Natural (SEMAHN).

La planta *Cheilanthes aemula* (Pteridaceae), es un helecho litótrofo que crece principalmente sobre el suelo rocoso derivado del material piroclástico y/o tefra, La mayor parte de estas plantas crecen cerca de la zona litoral del lago sobre la zona fangosa donde la temperatura oscila entre los 30-45°C, estas condiciones al parecer favorecen la proliferación de esta especie, considerando la naturaleza de su reproducción. Este tipo de helechos presenta un fino rizoma, que penetra el material pétreo y también forma agregados con el poco material fangoso donde coloniza esta especie (Figura 5).



**Figura 5.** Plantas pioneras que crecen en el lago-cráter del volcán Chichón, Chiapas (México). a) *Cheilanthes aemula* (Pteridaceae) y b) *Andropogon glomeratus* (Poaceae).

## 7.2. Características fisicoquímicas del suelo rizosférico

Muestras de suelo rizosférico obtenidas de la rizósfera de las plantas pioneras *A. glomeratus* y *C. aemula* fueron sometidas a un análisis fisicoquímico (Cuadro 3). Este análisis permitió determinar que el suelo de la planta *A. glomeratus* registró un pH ácido (5.1) y una moderada conductividad eléctrica ( $CE=0.97 \text{ dS m}^{-1}$ ), lo cual puede deberse a la presencia de iones Al, exceso de Cu, Fe, Mn y otros metales pesados, que es común encontrar en estos ambientes volcánicos.

**Cuadro 3.** Características fisicoquímicas de muestras de suelo.

Planta pionera	Sitio de colecta	pH	CE <sup>†</sup> (dSm <sup>-1</sup> )	CIC <sup>‡</sup> (Cmolkg <sup>-1</sup> )	MOS <sup>§</sup> (%)	N total (%)	Organic C (%)	P total (%)	Relación C:N
<i>Andropogon glomeratus</i>	Lago-cráter	5.1 C <sup>  </sup>	0.97 B	12.0 CD	12.50 D	0.17 D	1.28 F	1.06 G	7.50 D
<i>Cheilanthes aemula</i>	Lago-cráter	6.7 A	0.48 C	16.7 C	16.80 C	0.19 D	1.74 F	2.25 F	9.10 CD
<i>Andropogon glomeratus</i>	Exterior Transecto 1	4.8 CD	0.02 D	4.1 E	18.20 BC	0.21 C	3.16 D	17.10 B	15.0 A
<i>Cheilanthes</i>	Exterior	5.4 BC	0.02 D	7.8 D	21.34 B	0.23 C	3.22 D	3.66 E	14.0 B

<i>aemula</i>	Transecto 1								
<i>Andropogon glomeratus</i>	Exterior Transecto 2	5.8 B	0.58 C	23.0 AB	23.60 AB	0.50 B	7.20 B	11.30 C	14.40 B
<i>Cheilanthes aemula</i>	Exterior Transecto 2	6.2 AB	0.46 C	27.0 A	24.70 A	0.60 B	9.40 A	4.50 D	15.60 A
Suelo agrícola	Suchiapa, Chiapas (16° 37' 06' N/ 93° 05' 28' W)	5.4 BC	3.64 A	22.1 B	24.50 A	1.05 A	5.43 C	3.22 E	5.30 E
Suelo control (sin plantas)	Lago-cráter	4.3 D	0.93 B	5.17 DE	4.13 E	0.16 D	2.94 E	21.48 A	10.30 C
HSD <sup>#</sup>		0.298	0.186	2.019	0.847	0.090	0.938	1.392	5.053

<sup>†</sup>CE= Conductividad eléctrica.

<sup>‡</sup>CIC= Capacidad de Intercambio Catiónico

<sup>§</sup>MOS=Materia orgánica del suelo

<sup>¶</sup>Valores promedio de tres repeticiones. Promedios con la misma letra son no-significativos (Prueba de Tukey, P<0.05)

<sup>#</sup>Diferencia Significativa Honesta

En el interior del complejo volcánico, en el caso del suelo rizosférico de la planta *C. aemula*, el pH fue ligeramente ácido (6.71) y presentó una baja CI (0.48 dS m<sup>-1</sup>). De acuerdo a Norma Oficial Mexicana NOM-021 RECNAT-2000 (que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudios, muestreo y análisis), estos suelos rizosféricos presentaron una adecuada Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC), lo que indica una retención y movilidad de nutrientes a pesar de las condiciones extremas de acidez y temperatura del lago-cráter del volcán El Chichón. Así también, en ambas muestras se determinó un alto porcentaje de materia orgánica (>12.0 %), producto de la descomposición de material vegetal y combinación de cenizas volcánicas (alófanos). Por otro lado, la cantidad de nitrógeno total (% NT), carbono total (% CT) y fósforo total (% PT) fueron encontrados en cantidades bajas en los suelos de ambas plantas, esto indica que, en la rizósfera existe una lenta mineralización de los suelos y por ende una baja actividad microbiana. Con respecto a la relación carbono/nitrógeno, el análisis fisicoquímico mostró valores bajos, lo cual indica poca fertilidad en estos suelos volcánicos. La relación C/N en el suelo de la planta *A. glomeratus* (C/N= 7.5) fue menor a la determinada en la rizósfera del helecho *C. aemula* (C/N=9.10). Esto puede deberse a un lento proceso de descomposición del material vegetal por los microorganismos rizosféricos, debido a la baja disponibilidad del C orgánico y otros nutrientes esenciales requeridos para su actividad biológica.

Con respecto al suelo circundante del lago-cráter (suelo control sin plantas) se registró un pH ácido (4.3), que es común encontrar en estos depósitos volcánicos. Así también presentó moderada

conductividad eléctrica (0.93 dS/m). El valor de la capacidad de intercambio catiónico (CIC) del suelo sin plantas fue de 5.17 (Cmol kg<sup>1</sup>). Se determinó un valor bajo de contenido de materia orgánica (4.13%) y niveles considerables para la relación C/N. En este suelo sin plantas fue notable la cantidad de P total (21%) siendo mucho mayor a los valores obtenidos anteriormente de los suelos rizosféricos de *A. glomeratus* y *C. aemula*. Una de las características más importantes de los Andisoles es su capacidad para inmovilizar (fijar) fósforo (P) en la superficie de los minerales.

Los resultados del análisis fisicoquímico de las muestras de rizósfera de la parte exterior del complejo volcánico fueron muy interesantes. Se observó que el pH y la CE aumentan gradualmente conforme las plantas se ubican más alejadas del cráter. Lo anterior podría significar una mejor calidad en la fertilidad del suelo que permite mayor adaptabilidad de las especies vegetales. La CIC es mayor en el transecto 2 (T2) y guarda similitud con un suelo agrícola (>20 Cmol kg<sup>-1</sup>). Existe mayor porcentaje de materia orgánica en el exterior del lago-cráter (>20%) lo cual podría indicar que la actividad y diversidad microbiana está siendo mayor en los suelos. La cantidad de fósforo presente en las muestras rizosféricas de *A. glomeratus* del exterior es mayor a las presentes en el lago-cráter pero no así para *C. aemula*. Las plantas de *C. aemula* en el exterior del cráter lago podrían estar asociadas con una mayor diversidad y abundancia de bacterias solubilizadoras de P (BSP). En cuanto a la relación C/N en el exterior y en ambos transectos (T1 y T2), los valores indican que son suelos con mejores condiciones a comparación con los suelos rizosféricos en el interior, mostrando mayor fertilidad. La presencia de interacciones entre plantas-suelo y microorganismos juega un papel importante para el desarrollo de los ecosistemas que presentan condiciones ambientales extremas.

En el caso del suelo agrícola, que fue utilizado como control, presentó una textura franco-arcillo-arenoso, tuvo un pH ácido (5.45) y una moderada conductividad eléctrica (3.64 dS/m). Lo cual indica la presencia de salinidad, en parte adquirida por el suministro de sales de urea o nitratos a través de la fertilización química. Con respecto a la capacidad de intercambio catiónico (CIC) se observó que este suelo presenta un contenido de nutrientes que proviene principalmente del proceso de mineralización de la materia orgánica. Este suelo presentó un contenido de materia orgánica de 24.5 %. La relación C/N del suelo agrícola permite determinar que en los campos de cultivo se pueden tener condiciones de poca fertilidad, que puede deberse al excesivo uso de fertilizantes químicos.

### **7.3. Aislamiento y cultivo de cepas bacterianas**

Un total de 208 cepas bacterianas fueron aisladas de las dos plantas pioneras que crecen en lago-cráter del volcán El Chichón usando cinco medios de cultivo de cultivo específicos (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Cepas bacterianas rizosféricas y endófitas aisladas de las plantas pioneras del lago-cráter del volcán El Chichón usando medios de cultivos específicos.

Especie vegetal	Muestra biológica	No. cepas aisladas/Medio de cultivo					Total
		Winogradsky (WNG)	NFB	AOB	NOB	NBRIP	
<i>Andropogon glomeratus</i>	Suelo rizosférico	16	24	9	12	12	73
	Endófitas	7	7	10	9	11	44
	<b>Subtotal=</b>	<b>23</b>	<b>31</b>	<b>19</b>	<b>21</b>	<b>23</b>	<b>117</b>
<i>Cheilanthes aemula</i>	Suelo rizosférico	8	23	12	7	5	55
	Endófitas	9	9	5	6	7	36
	<b>Subtotal=</b>	<b>17</b>	<b>32</b>	<b>17</b>	<b>13</b>	<b>12</b>	<b>91</b>
<b>Total</b>		<b>40</b>	<b>63</b>	<b>36</b>	<b>34</b>	<b>35</b>	<b>208</b>

De la planta pionera *A. glomeratus* (Poaceae), 117 cepas bacterianas fueron obtenidas; 73 fueron aisladas del suelo rizosférico y 44 aislados fueron obtenidos de los diferentes tejidos de esta planta (bacterias endófitas). En este caso, el medio de cultivo NFB (libre de nitrógeno) fue el más eficiente y permitió aislar el mayor número de aislados bacterianos (31), en comparación con el medio AOB (para bacterias oxidantes de amonio) solo permitió aislar 19 cepas bacterianas. Con respecto a las cepas bacterianas aisladas de la planta *C. aemula* (Pteridaceae) se logró obtener un total de 91 aislados. De la rizósfera de este helecho se obtuvo 55 aislados, mientras que de los tejidos vegetales se obtuvo 36 cepas endófitas. De igual manera, el medio NFB permitió aislar el mayor número de cepas de esta especie de planta y en contraste el medio NBRIP (utilizado para aislar bacterias solubilizadoras de fósforo) permitió obtener 12 aislados.

Por otro lado, el mismo procedimiento de aislamiento y cultivo se llevó a cabo para la parte exterior del complejo volcánico logrando aislar un total de 174 cepas puras. De la planta pionera *A. glomeratus* (Poaceae), 86 cepas bacterianas fueron obtenidas; 51 fueron aisladas del suelo rizosférico y 35 aislados fueron obtenidos de los diferentes tejidos de esta planta (bacterias endófitas). Con respecto a las cepas bacterianas aisladas de la planta *C. aemula* (Pteridaceae) se

logró obtener un total de 88 aislados. De la rizósfera de este helecho se logró obtuvo 55 aislados, mientras que de los tejidos vegetales se obtuvo 33 cepas endófitas (Cuadro 5)

**Cuadro 5.** Cepas bacterianas rizosféricas y endófitas aisladas de las plantas pioneras en el exterior del volcán El Chichón usando medios de cultivos específicos.

Especie vegetal	Muestra biológica	No. cepas aisladas/Medio de cultivo				Total
		NFB	AOB	NOB	NBRIP	
<i>Andropogon glomeratus</i>	Suelo rizosférico	15	11	5	20	51
	Endófitas	11	7	4	13	35
	<b>Subtotal=</b>	<b>26</b>	<b>18</b>	<b>9</b>	<b>33</b>	<b>86</b>
<i>Cheilanthes aemula</i>	Suelo rizosférico	17	11	12	15	55
	Endófitas	15	6	5	7	33
	<b>Subtotal=</b>	<b>32</b>	<b>17</b>	<b>17</b>	<b>22</b>	<b>88</b>
<b>Total</b>		<b>58</b>	<b>35</b>	<b>26</b>	<b>55</b>	<b>174</b>

#### 7.4. Características morfológicas de las cepas bacterianas aisladas de las plantas pioneras del volcán El Chichón.

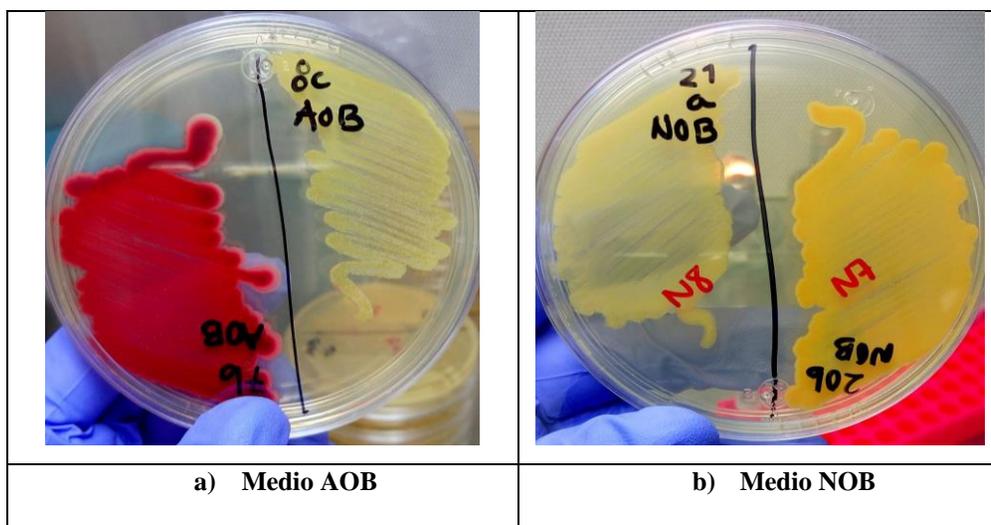
La morfología de las cepas bacterianas aisladas de las plantas pioneras que crecen en el lago-cráter del volcán el Chichón, se muestran en el Cuadro 6. Las bacterias aisladas de la rizósfera y de los tejidos vegetales (endófitas) de plantas *A. glomeratus* y *C. aemula* fueron en general bacilos pequeños, cocos y coco-bacilos. En ambas plantas pioneras, el mayor porcentaje de las cepas fueron Gram negativo, las cuales se aislaron de la rizósfera de las plantas. De las 117 cepas aisladas de *A. glomeratus*, 92 aislados fueron Gram negativo y solo 25 fueron Gram positivo. Para el caso del helecho *C. aemula*, 91 aislados bacterianos fueron obtenidos, 75 fueron Gram negativo y el resto fueron bacterias Gram positivo.

**Cuadro 6.** Características morfológicas de las cepas bacterianas aisladas de las plantas pioneras que crecen en el lago- cráter del volcán El Chichón, empleando medios de cultivo selectivos

Especie planta	Muestra Biológica	Medio cultivo	No. aislados	No. aislados Gram		Morfología celular*	Morfología colonial			
				(-)	(+)		Color	Diámetro (Ø mm)	EPS**	TC*** (hrs)
<i>Andropogon glomeratus</i>	Suelo rizosférico	WNG	16	11	5	B, C, B-C	Blanca	1.2-2.0	++	24
		NFB	24	18	6	B, C, B-C	Blanca	1.5-2.0	++	24-48
		AOB	9	8	1	B, C	Crema	1.5-2.5	++	24-48
		NOB	12	10	2	B, C	Crema	1.5-2.0	++	24
		NBRIP	12	9	3	B, C, B-C	Blanca	1.5-2.0	+++	24-48
	Endófitas	WNG	7	6	1	B	Blanca	1.0-2.0	++	24-48
		NFB	7	5	2	B, C,	Blanca	1.5-2.2	++	24-48
		AOB	10	8	2	B, C	Roja	1.5-2.0	++	24
		NOB	9	8	1	B	Roja	1.2-2.5	++	24-48
		NBRIP	11	9	2	B	Blanca	1.0-2.0	+++	24
<i>Cheilanthes aemula</i>	Suelo rizosférico	WNG	8	5	3	B, C	Blanca	1.0-2.0	++	24-48
		NFB	23	19	4	B, C, B-C	Blanca	1.0-2.0	+	24-48
		AOB	12	8	1	B, C, B-C	Amarilla	1.2-2.2	+	24-48
		NOB	7	8	3	B, C, B-C	Roja	1.0-2.0	+	24-48
		NBRIP	5	6	3	B, C, B-C	Blanca	1.0-1.5	++	24-48
	Endófitas	WNG	9	7	2	B, C	Blanca	1.2-2.2	+	48-72
		NFB	9	8	1	B	Blanca	1.0-2.0	+	48-72
		AOB	5	5	0	B	Roja	10-2.0	+	48-72
		NOB	6	4	2	B, C	Amarilla	1.5-2.5	+	48-72
		NBRIP	7	5	2	B, C	Blanca	1.0-2.0	++	24-48

\*Morfología Celular: B= bacilo, C= coco, B-C= cocobacilo. \*\*EPS\_ Exopolisacáridos: (+) = poco; (++)= moderado; (+++)= abundante. \*\*\* TC = Tiempo de crecimiento en el medio de cultivo en horas.

Con respecto a la morfología de las colonias formadas por las bacterias en los medios de cultivo, se observó el crecimiento de colonias con una variedad de tonalidades y formas. La mayor parte de las colonias fueron en color blanco y brillante, con excepción de las cepas cultivadas sobre el medio para bacterias oxidantes de amonio (AOB), las cuales formaron colonias en color amarillo y rojo (Figura 6).



**Figura 6.** Colonias bacterianas formadas en los medios de cultivo selectivos. a) medio AOB (Bacterias Oxidantes de Amonio) y b) medio NOB (Bacterias Oxidantes de Nitrito).

Así también, se observó que las colonias bacterianas fueron de forma cóncavas, redondas u ovaladas, de bordes lisos y tuvieron un diámetro promedio de la colonia de 1.2-2.2 mm. Una característica importante de los aislados fue la capacidad para producir exopolisacáridos (EPS). Esta cualidad bioquímica fue observada especialmente en aquellas cepas bacterianas aisladas de la rizósfera de las plantas usando el medio NBRIP (un medio de cultivo selectivo para aislar bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico).

También se observó un rápido crecimiento (24-48 h) de las cepas aisladas de la rizósfera de las plantas, en comparación con los aislados endófitos que requieren de un mayor tiempo para su crecimiento (48-72 h). En el caso de los microorganismos aislados en el exterior del complejo volcánico, estos de igual manera fueron gram negativos en su mayoría y presentando diferentes morfologías coloniales (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Características morfológicas de las cepas bacterianas aisladas de las plantas pioneras que crecen en el exterior del volcán El Chichón, empleando medios de cultivo selectivos.

--	--	--	--	--	--	--

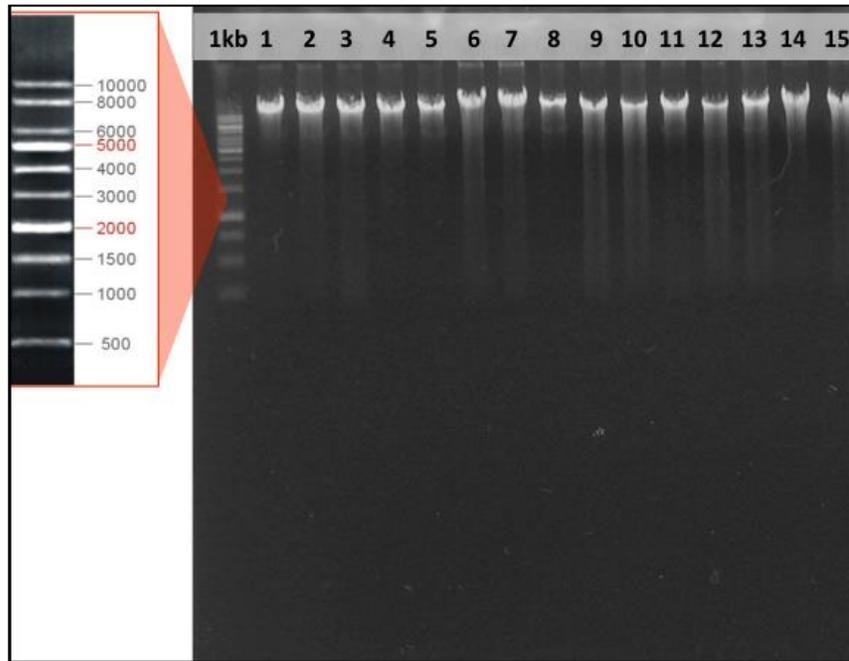
Especie planta	Muestra Biológica	Medio cultivo	No. aislados	No. aislados Gram		Morfología celular*	Morfología colonial			
				(-)	(+)		Color	Diámetro (Ø mm)	EPS**	TC*** (hrs)
<i>Andropogon glomeratus</i>	Suelo rizosférico	NFB	15	9	6	B, C, B-C	Blanca	1.0-2.0	+++	24-48
		AOB	11	7	4	B, C, B-C	Blanca	1.0-2.0	++	24-48
		NOB	5	3	2	B, C, B-C	Crema	1.0-2.0	++	24-48
		NBRIP	20	11	9	B, C, B-C	Crema	1.0-2.0	+++	24-48
	Endófitas	NFB	11	6	5	B, C, B-C	Blanca	1.0-2.2	+++	24-48
		AOB	7	3	4	B, C, B-C	Roja	1.0-2.0	++	24-48
		NOB	4	3	1	B, C, B-C	crema	1.0-2.5	++	24-48
		NBRIP	13	8	5	B, C, B-C	Blanca	1.0-2.0	+++	24-48
<i>Cheilanthes aemula</i>	Suelo rizosférico	NFB	17	12	5	B, C, B-C	Blanca	1.0-2.0	+	24-48
		AOB	11	7	4	B, C, B-C	Blanca	1.2-2.2	+	24-48
		NOB	12	8	4	B, C, B-C	Crema	1.0-2.2	+	24-48
		NBRIP	15	9	6	B, C, B-C	Crema	1.0-2.0	++	24-48
	Endófitas	NFB	15	7	8	B, C, B-C	Blanca	1.0-2.0	+	24-48
		AOB	6	3	3	B, C, B-C	Roja	1.0-2.2	+	24-48
		NOB	5	2	3	B, C, B-C	crema	1.0-2.0	+	24-48
		NBRIP	7	4	3	B, C, B-C	Blanca	1.0-2.0	++	24-48

## 7.5. Características genómicas de cepas bacterianas aisladas de las plantas pioneras del volcán El Chichón.

### 7.5.1 Características del ADN genómico bacteriano

Se logró la extracción de ADN genómico total de 208 cepas. En la Figura 7, se muestra la integridad obtenida del ADN total de algunas de las cepas aisladas del volcán El Chichón, mediante la electroforesis en un gel de agarosa.

En el primer carril se observa el marcador de peso molecular de 1 kb y en los siguientes el ADN total de cada una de las cepas.



**Figura 7.** Electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TAE 1X de ADN total bacteriano.

La cantidad y calidad de ADN obtenido de las cepas bacterianas fue analizado por espectrofotometría (Nanodrop) usando la relación  $A_{260}/A_{280}$ . Los valores obtenidos indicaron una buena concentración del material genómico ( $>100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ). Así también se obtuvo un valor mayor a 1.8 usando la relación  $A_{260} / A_{280}$ . Un valor entre 1.8 a 2 indican una buena pureza e integridad del ADN. Por tal se determinó que el ADN extraído de las diferentes cepas bacterianas cuenta con la calidad y concentración requerida para realizar las diferentes pruebas genómicas y moleculares, entre estas la amplificación de genes por la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

### 7.5.2 Huellas genómicas bacterianas

En el análisis de las muestras en el interior del lago-cráter del volcán El Chichón, la técnica BOX\_PCR permitió agrupar a las 117 cepas bacterianas aisladas de la planta *A. glumeratus* (Poaceae) dentro de 14 grupos, cada uno con perfiles genómicos diferentes (Cuadro 8).

Del suelo rizosférico asociada a esta especie de planta fueron aisladas 73 cepas, las cuales se agruparon en 9 perfiles genómicos y de los tejidos vegetales fueron obtenidos 44 aislados endófitos que se agruparon en 5 perfiles con huellas genómicas diferentes.

El índice de Shannon-Weaver permitió determinar que en la rizósfera de la *A. glumeratus* existe una alta diversidad ( $H=2.14$ ) y abundancia ( $d=4.29$ ) de cepas bacterianas (Cuadro 8).

Para el caso de la planta *C. aemula* (Pteridaceae) se aislaron 91 cepas, las cuales fueron agrupadas en 11 grupos, cada uno con perfiles genómicos diferentes (Cuadro 8). Del suelo rizosférico de esta planta fueron aisladas 55 cepas, las cuales se agruparon en cuatro perfiles genómicos y de los tejidos vegetales se aislaron 36 endófitos que se agruparon en siete perfiles con huellas genómicas diferentes.

El índice de Shannon-Weaver permitió determinar que una alta diversidad ( $H=1.72$ ) y abundancia ( $d=3.85$ ) de cepas bacterianas en los tejidos vegetales de esta especie de helecho (Cuadro 8).

Con respecto a las muestras del exterior del volcán El Chichón, la técnica BOX\_PCR permitió agrupar a las 86 cepas bacterianas aisladas de la planta *A. glumeratus* (Poaceae) dentro de siete grupos, cada uno con perfiles genómicos diferentes. Para el caso de la planta *C. aemula* (Pteridaceae) se aislaron 88 cepas, las cuales fueron agrupadas en 11 grupos (Cuadro 9).

**Cuadro 8.** Índice diversidad y abundancia de las cepas bacterianas asociadas a las plantas pioneras del lago-cráter del volcán El Chichón de acuerdo al perfil genómico BOX.

Especie Planta	Muestra biológica	No. aislados	No. Grupos BOX	Índice de Shannon-Weaver	
				Abundancia (d)	Diversidad (H)
<i>Andropogon glumeratus</i>	Suelo rizosférico	73	9	4.29	2.14
	Endófitos	44	5	2.43	1.87
	<b>Total=</b>	<b>117</b>	<b>14</b>		
<i>Cheilanthes aemula</i>	Suelo rizosférico	55	4	1.86	1.38
	Endófitos	36	7	3.85	1.72
	<b>Total=</b>	<b>91</b>	<b>11</b>		

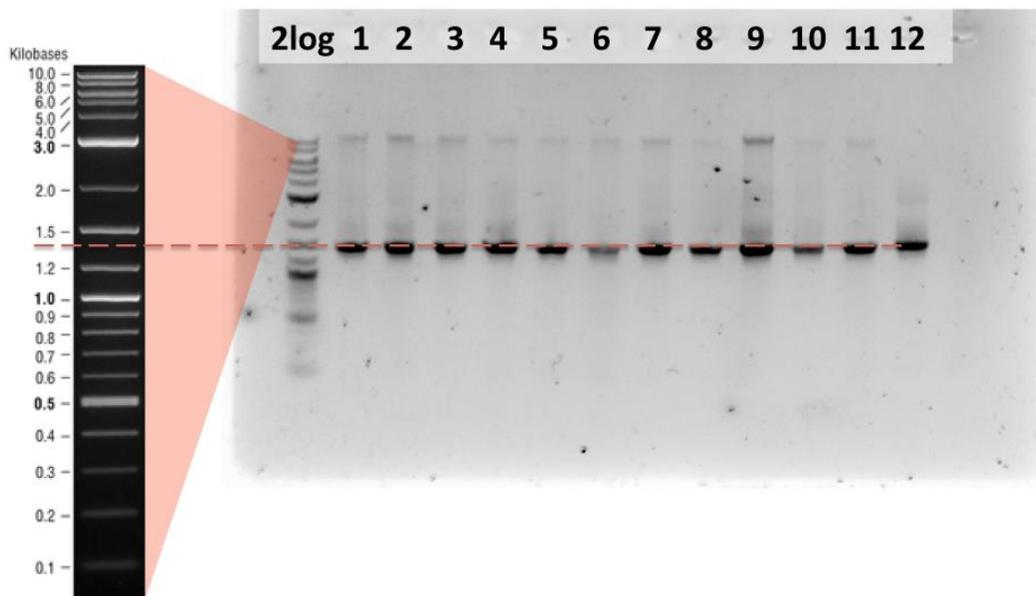
**Cuadro 9.** Índice diversidad y abundancia de las cepas bacterianas asociadas a las plantas pioneras del exterior del volcán El Chichón de acuerdo al perfil genómico BOX.

Especie Planta	Muestra biológica	No. aislados	No. Grupos BOX	Índice de Shannon-Weaver	
				Abundancia (d)	Diversidad (H)
<i>Andropogon glumeratus</i>	Suelo rizosférico	51	5	4.17	3.12
	Endófitos	35	2	2.06	1.13
	<b>Total=</b>	<b>86</b>	<b>7</b>		
<i>Cheilanthes aemula</i>	Suelo rizosférico	55	9	1.32	1.38
	Endófitos	33	2	2.32	1.21
	<b>Total=</b>	<b>88</b>	<b>11</b>		

### 7.5.3 Amplificación del gen 16S ARNr bacteriano

Se logró la amplificación del gen 16S ARNr de 208 muestras de ADN así como de las 174 muestras del exterior del complejo volcánico. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se observaron amplicones que correspondían al tamaño esperado del gen aprox. 1500 pb (Figura 8).

La espectrofotometría  $A_{260/280}$  permitió determinar que el material genético amplificado tuvo concentraciones mayores a  $90 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  así como una absorbancia por arriba de 1.8 que indicó que los productos de PCR cuentan con la calidad y cantidad requeridas para diversas pruebas genómicas.



**Figura 8.** Imagen representativa de productos de PCR del gen 16S ARNr. Electroforesis en gel de agarosa 1%.

### 7.5.4 Perfil genómico ARDRA

La digestión de los productos de PCR del gen 16S ARNr de las cepas bacterianas usando la enzima endonucleasa *Alu I*, permitió agrupar las cepas de acuerdo a los perfiles genómicos. En el interior del lago-cráter, de la planta *A. glumeratus* fueron obtenidos 19 perfiles genómicos (morfotipos ARNr), de los cuales 12 morfotipos corresponden a las cepas bacterianas obtenidas del suelo rizosférico y siete fueron de las cepas endófitas aisladas de los tejidos de esta planta.

El índice de Shannon-Weaver permito determinar una alta diversidad ( $H=2.38$ ) y abundancia ( $d=5.90$ ) de especies bacterianas aisladas del suelo rizosférico de *A. glumeratus*.

Para el caso de la planta *C. aemula*, la técnica ARDRA permitió determinar un total de 11 perfiles genómicos (Cuadro 10). De los tejidos de este helecho fueron identificados cinco morfotipos ARNr específicos. Por el contrario, del suelo rizosferico se identificaron seis perfiles genómicos diferentes. Lo anterior permitió determinar que en la rizósfrera de esta planta es donde existe una mayor diversidad ( $H=1.21$ ) y abundancia ( $d=3.31$ ) de especies bacterianas.

En cuanto a los resultados de la parte exterior del volcán, de la planta *A. glumeratus* fueron obtenidos 16 perfiles genómicos (morfotipos ARNr), de los cuales 13 morfotipos corresponden a las cepas bacterianas obtenidas del suelo rizosferico y tres fueron de las cepas endófitas aisladas de los tejidos de esta planta. Para el caso de la planta *C. aemula*, la técnica ARDRA permitió determinar un total de 16 perfiles genómicos (Cuadro 11). De los tejidos de este helecho fueron identificados tres morfotipos ARNr específicos. Por el contrario, del suelo rizosférico se identificaron 13 perfiles genómicos diferentes.

**Cuadro 10.** Índice de diversidad y abundancia de las especies bacterianas asociadas a las plantas pioneras en el lago-cráter del volcán El Chichón de acuerdo a las huellas genómicas ARDRA.

Especie Planta	Muestra biológica	No. cepas	No. Grupos ARDRA	Índice de Shannon-Weaver	
				Abundancia (d)	Diversidad (H)
<i>Andropogon glumeratus</i>	Suelo rizosférico	73	9	5.90	2.38
	Endófitos	44	6	3.65	1.81
<hr/>					
<i>Cheilanthes aemula</i>	Suelo rizosférico	55	6	3.31	1.21
	Endófitos	36	5	2.14	1.13

**Cuadro 11.** Índice de diversidad y abundancia de las especies bacterianas asociadas a las plantas pioneras del exterior del volcán El Chichón de acuerdo a las huellas genómicas ARDRA.

Especie Planta	Muestra biológica	No. cepas	No. Grupos ARDRA	Índice de Shannon-Weaver	
				Abundancia (d)	Diversidad (H)
<i>Andropogon glumeratus</i>	Suelo rizosférico	51	13	3.22	2.43
	Endófitos	35	3	2.26	1.38
<hr/>					
<i>Cheilanthes aemula</i>	Suelo rizosférico	55	13	3.13	2.84
	Endófitos	31	3	2.14	2.25

### 7.5.5 Identificación taxonómica de las cepas bacterianas

El análisis filogenético de las secuencias del gen 16S ARNr de cada cepa rizosférica representativa seleccionada por los perfiles ARDRA de *A. glomeratus* y *C. aemula* en el lago-cráter reveló que los aislados pertenecían a 13 géneros bacterianos. Las cepas rizosféricas pertenecían a los géneros *Brevibacillus*, *Sinomonas*, *Sphingobium*, *Chryseobacterium*, *Pantoea*, *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Dyella*, *Microbacterium*, *Enterobacter*, *Exiguobacterium* y *Pandoraea* (Cuadro 12).

La cepa W12 está afiliada dentro del género *Brevibacillus* con un 99.0% de similitud genética de la secuencia del gen 16S ARNr con *B. choshinensis* DSM8552. La cepa NFB57 se agrupó dentro del género *Sinomonas* y mostró una similitud del 99.0% con *S. atrocyanea* B73. El aislado NFB69 mostró una similitud de 98.5% con *S. yanoikuyae* NBRC15102, mientras que el aislado NOB78 mostró una similitud de 98.5% con *C. culicis* R41A. La cepa PO4103 tuvo una similitud de 99.0% con *Pantoea ananatis* JCM6986. Para el aislado PO4096, la secuencia del gen 16S ARNr fue un 99.0% similar a *Ralstonia insidiosa* AU2944. Las cepas PO4104, PO4109 y NFB35 se agruparon en el género *Burkholderia*. La cepa de AOB122 fue 99.0% similar a *Serratia marcescens* NBRC102204. En el caso del aislado W14 se relacionó con *Dyella jiangningensis* SBZ3-12 con una similitud de 97.0%. La cepa NFB41 tuvo una similitud de 99.3% con *Microbacterium azadirachtae* AI-S262 y NOB74 tuvo una similitud de 99.0% con *Enterobacter asburiae* ATCC. Las cepas de suelo rizosférico AOB127 y AOB132 tenían similitud de secuencia génica con *Exiguobacterium indicum* HHS-3 y *Pandoraea sputorum* DSM2109.

De manera similar, las cepas de tejidos vegetales de *A. glomeratus* y *C. aemula* están relacionadas con los géneros *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Methylobacterium*, *Kocuria*, *Microbacterium* y *Agrobacterium* (Cuadro 12). Las cepas bacterianas EA-40, EA-72, EA-76 y EA-79 se agruparon dentro del género *Bacillus*. La cepa bacteriana endofítica EA-45 se relacionó con el género *Sphingomonas* y las cepas EA-50 y EC-06 fueron similares a *Methylobacterium*. La cepa EC-17 se relacionó con *Kocuria palustris* TAGA2 con una similitud de 99.8%. Con respecto a los aislados EC-18 y EC-26 tuvieron una similitud de secuencia con el género *Microbacterium*. La cepa EC-34 tuvo una similitud del 99.5% con *Agrobacterium larrymoorei* CFBP5473. Con respecto a la identidad taxonómica de las especies bacterianas, el análisis filogenético de la secuencia del gen 16S ARNr mostró que la comunidad bacteriana aislada de *A. glomeratus* y *C. aemula* pioneros de plantas incluyó seis grupos filogenéticos principales ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  proteobacteria, Firmicutes, Actinobacterias y Bacteroidetes).

**Cuadro 12.** Clasificación taxonómica de cepas bacterianas aisladas de la rizósfera de plantas pioneras en el lago-cráter del volcán el Chichón

Planta pionera	Perfiles ARDRA <sup>†</sup>	Relación filogenética			Clase bacteriana	Sección de la planta
		Cepa	Pariente más cercano NCBI / Similitud (%) <sup>‡</sup>	Número de acceso		
<i>Andropogon glomeratus</i>	A-A	W12	<i>Brevibacillus choshinensis</i> DSM8552 <sup>T</sup> /99.3	MH058012	Bacilli	Suelo rizosférico
	A-B	NFB57	<i>Sinomonas atrocyanea</i> DSM20127 <sup>T</sup> /99.6	MH058026	Micrococcales	Suelo rizosférico
	A-C	NFB69	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> NBRC15102 <sup>T</sup> /98.5	MH058028	Alpha-proteobacteria	Suelo rizosférico
	A-D	NOB78	<i>Chryseobacterium culicis</i> R41A <sup>T</sup> /98.5	MH058017	Flavobacteria	Suelo rizosférico
	A-E	PO4103	<i>Pantoea ananatis</i> JCM6986 <sup>T</sup> /99.9	MH058023	Gamma-proteobacteria	Suelo rizosférico
	A-F	PO4096	<i>Ralstonia insidiosa</i> AU2944 <sup>T</sup> /99.2	MH058024	Beta-proteobacteria	Suelo rizosférico
	A-G	PO4104	<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416 <sup>T</sup> , <i>Burkholderia paludis</i> MSh1 <sup>T</sup> , <i>Burkholderia lata</i> 383 <sup>T</sup> and <i>Burkholderia contaminans</i> J2956 <sup>T</sup> /99.9	MH058011	Beta-proteobacteria	Suelo rizosférico
	A-H	PO4109	<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416 <sup>T</sup> , <i>Burkholderia paludis</i> MSh1 <sup>T</sup> , <i>Burkholderia lata</i> 383 <sup>T</sup> and <i>Burkholderia contaminans</i> J2956 <sup>T</sup> /99.9	MH058014	Beta-proteobacteria	Suelo rizosférico
	A-I	AOB122	<i>Serratia marcescens</i> NBRC 102204 <sup>T</sup> /99.9	MH058025	Gamma-proteobacteria	Suelo rizosférico
	A-J	EA-40	<i>Bacillus soralis</i> 171544 <sup>T</sup> /98.2	MK078585	Bacilli	Hojas
	A-K	EA-45	<i>Sphingomonas sanguinis</i> NBRC 13937 <sup>T</sup> /93.7	MK078586	Alpha-proteobacteria	Hojas
	A-L	EA-50	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 <sup>T</sup> /96.7	MK078587	Alpha-proteobacteria	Hojas
	A-M	EA-72	<i>Bacillus albus</i> MCCC 1A02146 <sup>T</sup> /100	MK078589	Bacilli	Tallo
	A-N	EA-76	<i>Bacillus megaterium</i> NBRC 15308 <sup>T</sup> (ATCC 14581 <sup>T</sup> )/99.9	MK078590	Bacilli	Tallo
A-O	EA-79	<i>Bacillus megaterium</i> NBRC 15308 <sup>T</sup> (ATCC 14581 <sup>T</sup> )/100	MK078591	Bacilli	Flores	
<i>Cheilanthes aemula</i>	C-A	W14	<i>Dyella jiangningensis</i> SBZ3-12 <sup>T</sup> /97.0	MH058019	Gamma-proteobacteria	Suelo rizosférico
	C-B	NFB35	<i>Burkholderia paludis</i> MSh1 <sup>T</sup> , <i>Burkholderia lata</i> 383 <sup>T</sup> and <i>Burkholderia contaminans</i> J2956 <sup>T</sup> /100	MH058015	Beta-proteobacteria	Suelo rizosférico
	C-C	NFB41	<i>Microbacterium azadiractae</i> AI-S262 <sup>T</sup> /99.3	MH058016	Micrococcales	Suelo rizosférico
	C-D	NOB74	<i>Enterobacter asburiae</i> ATCC 35953 <sup>T</sup> /99.6	MH058018	Gamma-proteobacteria	Suelo rizosférico
	C-E	AOB127	<i>Exiguobacterium indicum</i> HHS-31 <sup>T</sup> /99.6	MH058013	Bacilli	Suelo rizosférico
	C-F	AOB132	<i>Pandoraea sputorum</i> DSM21091 <sup>T</sup> /99.9	MH058020	Beta-proteobacteria	Suelo rizosférico
	C-G	EC-06	<i>Methylobacterium tardum</i> RB677 <sup>T</sup> , <i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 <sup>T</sup> /99.5	MK078576	Alpha-proteobacteria	Raquis
	C-H	EC-17	<i>Kocuria palustris</i> TAGA27 <sup>T</sup> /99.8	MK078577	Micrococcales	Raquis
	C-I	EC-18	<i>Microbacterium arborescens</i> DSM 20754 <sup>T</sup> /99.2	MK078578	Micrococcales	Pinna
	C-J	EC-26	<i>Microbacterium arborescens</i> DSM 20754 <sup>T</sup> /99.5	MK078580	Micrococcales	Pinna
	C-K	EC-34	<i>Agrobacterium larrymoorei</i> CFBP 5473 <sup>T</sup> /99.5	MK078583	Alpha-proteobacteria	Pinna

En cuanto al análisis filogenético de las secuencias del gen 16S ARNr de cada cepa rizosférica y endófito representativa seleccionada por los perfiles ARDRA de *A. glomeratus* y *C. aemula* correspondientes a la parte exterior del complejo volcánico, reveló que los aislados pertenecían a 13 géneros bacterianos.

Las cepas rizosféricas pertenecían a los géneros *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Serratia*, *Pandoraea*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Cupriavidus*, *Stenotrophomonas*, *Arthrobacter*, *Klebsiella*, *Lysinibacillus* y *Pantoea* (Cuadro 13 y 14).

**Cuadro 13.** Identificación molecular de cepas bacterianas asociadas a *A. glomeratus* creciendo en el exterior del complejo volcánico.

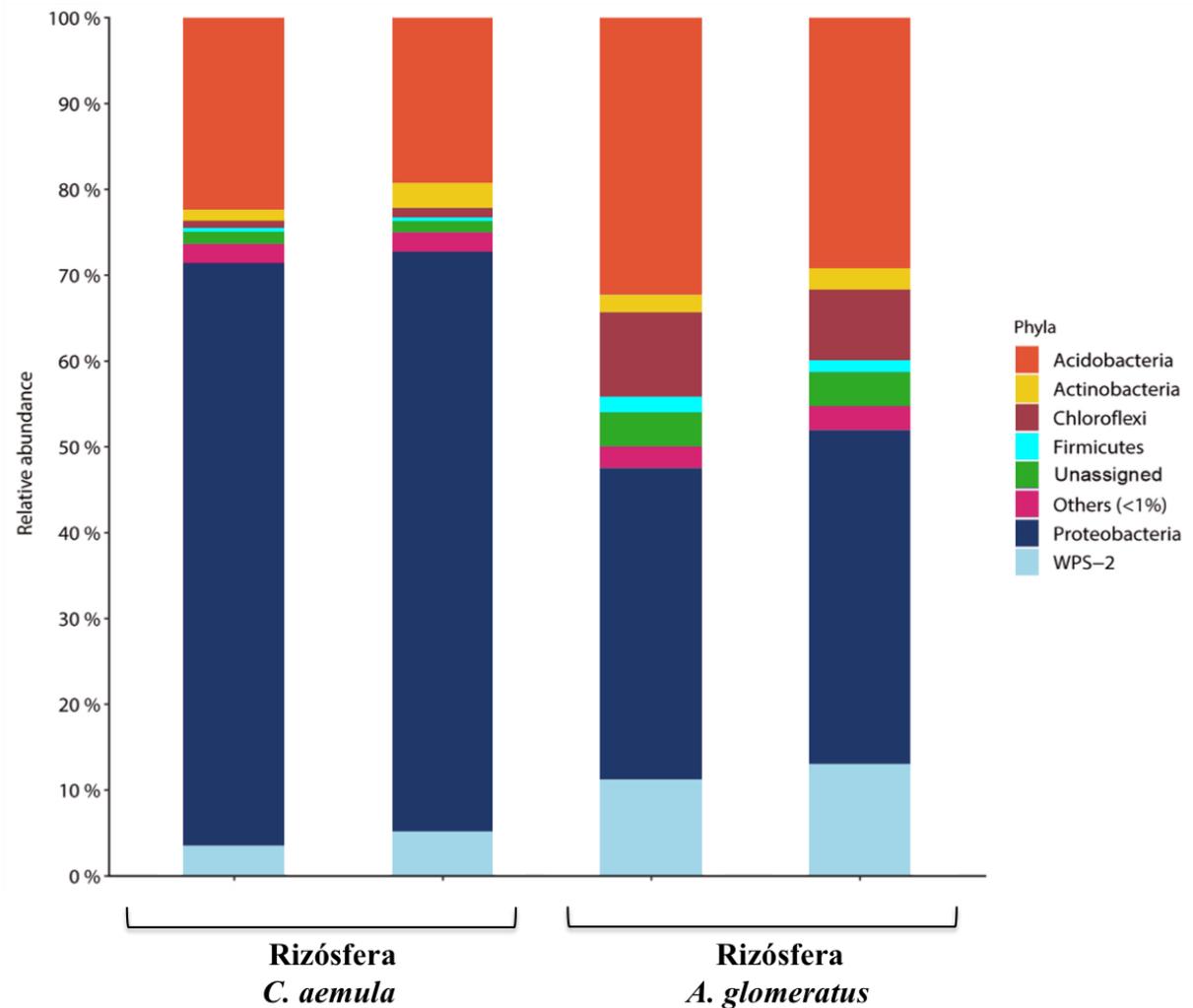
Planta pionera	Perfiles ARDRA <sup>†</sup>	Relación filogenética		Clase bacteriana	Transecto	Sección de aislamiento	
		Cepa	Especie más cercana NCBI/ Similitud (%) <sup>‡</sup>				
<i>Andropogon glomeratus</i>	A-A	111	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> KM114923.1/99.8	Gammaproteobacteria	T1	Suelo rizosférico	
	A-B	114	<i>Burkholderia</i> sp. U96938.1/99.8	Betaproteobacteria	T1	Suelo rizosférico	
	A-C	128	<i>Bacillus</i> sp. KR185866.1/99.1	Bacilli	T1	Suelo rizosférico	
	A-D	129	<i>Burkholderia contaminans</i> MN428223.1/100	Betaproteobacteria	T1	Suelo rizosférico	
	A-E	110	<i>Serratia marcescens</i> CP041134.1/100	Gammaproteobacteria	T2	Suelo rizosférico	
	A-F	113	<i>Pandoraea sputorum</i> LT906435.1/99.8	Betaproteobacteria	T2	Suelo rizosférico	
	A-G	130	<i>Pandoraea</i> sp. LR536853.1/100	Betaproteobacteria	T2	Suelo rizosférico	
	A-H	135	<i>Pseudomonas</i> sp. DQ229106.1/99.7	Gammaproteobacteria	T2	Suelo rizosférico	
	A-I	136	<i>Serratia marcescens</i> CP041134.1/97.7	Gammaproteobacteria	T2	Suelo rizosférico	
	A-J	140	<i>Pseudomonas mosselii</i> MN227542.2/100	Gammaproteobacteria	T2	Suelo rizosférico	
	A-K	163	<i>Enterobacter tabaci</i> MN177190.1/100	Gammaproteobacteria	T2	Suelo rizosférico	
	A-L	165	<i>Pseudomonas putida</i> L28676.1/100	Gammaproteobacteria	T2	Suelo rizosférico	
	A-M	167	<i>Burkholderia</i> sp. LC484703.1/100	Betaproteobacteria	T2	Suelo rizosférico	
		A-A	2	<i>Bacillus pumilus</i> KX905145.1 /93	Bacilli	T1	Hojas
	A-B	18	<i>Bacillus safensis</i> MN428231.1/100	Bacilli	T1	Tallo	
	A-C	19	<i>Bacillus subtilis</i> MN421473.1/100	Bacilli	T2	Tallo	

**Cuadro 14.** Identificación molecular de cepas bacterianas asociadas a *C. aemula* creciendo en el exterior del complejo volcánico.

Planta pionera	Perfiles ARDRA <sup>†</sup>	Relación filogenética		Clase bacteriana	Transecto	Sección de aislamiento	
		Cepa representativa	Especie más cercana NCBI/ Similitud (%) <sup>‡</sup>				
<i>Cheilanthes aemula</i>	C-A	90	<i>Serratia</i> sp. MK156448.1/99.3	Gammaproteobacteria	T2	Suelo rizosférico	
	C-B	93	<i>Cupriavidus</i> sp. KC879693.1/99.9	Betaproteobacteria	T2	Suelo rizosférico	
	C-C	95	<i>Acinetobacter seifertii</i> MK874918.1/100	Gammaproteobacteria	T2	Suelo rizosférico	
	C-D	98	<i>Burkholderia cepacia</i> LC462133.1/99.4	Betaproteobacteria	T2	Suelo rizosférico	
	C-E	117	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> MG890231.1/100	Gammaproteobacteria	T2	Suelo rizosférico	
	C-F	125	<i>Arthrobacter</i> sp. KF887413.1/99.1	Micrococcales	T1	Suelo rizosférico	
	C-G	120	<i>Pseudomonas</i> sp. MN429134.1/100	Gammaproteobacteria	T2	Suelo rizosférico	
	C-H	147	<i>Klebsiella michiganensis</i> MK070023.1/99.7	Gammaproteobacteria	T2	Suelo rizosférico	
	C-I	148	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> MN382366.1/99.2	Bacilli	T2	Suelo rizosférico	
	C-J	152	<i>Arthrobacter woluwensis</i> MK253239.1/98.7	Micrococcales	T2	Suelo rizosférico	
	C-K	153	<i>Acinetobacter</i> sp. MH297590.1/99.7	Gammaproteobacteria	T2	Suelo rizosférico	
	C-L	183	<i>Burkholderia cepacia</i> LC462133.1/99.2	Betaproteobacteria	T2	Suelo rizosférico	
	C-M	194	<i>Pseudomonas putida</i> CP043835.1/100	Gammaproteobacteria	T2	Suelo rizosférico	
		C-A	9	<i>Bacillus pumilus</i> HQ844969.2/98.7	Bacilli	T1	Pinna
	C-B	20	<i>Pantoea ananatis</i> MG574385.1/99.4	Gammaproteobacteria	T1	Raquis	
	C-C	14	<i>Bacillus altitudinis</i> MN421521.1/97	Bacilli	T2	Pinna	

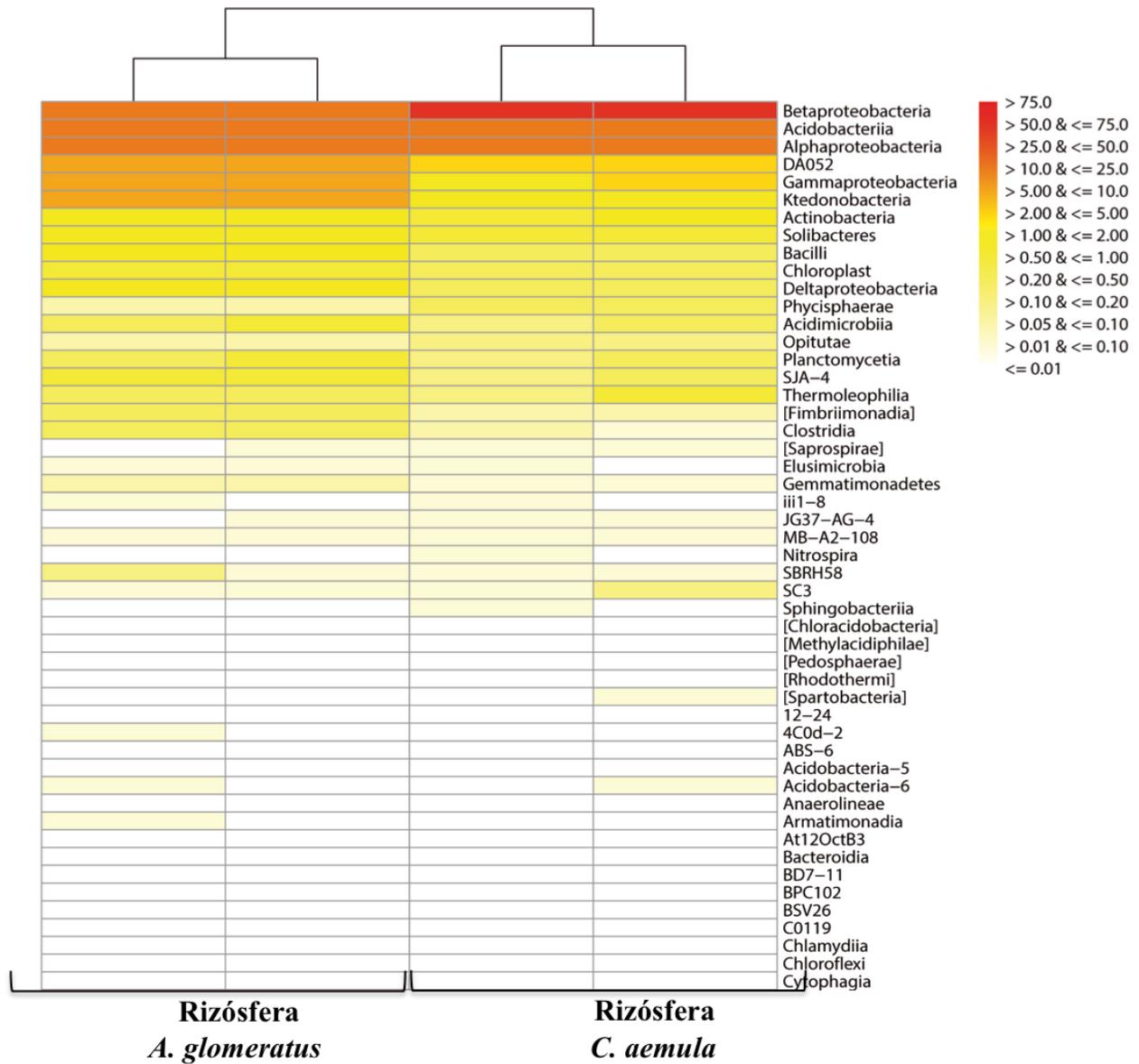
### 7.5.6 Características de la comunidad bacteriana: estructura y diversidad

Se obtuvo un total de 20,000 secuencias después de la evaluación de calidad. Con respecto a los resultados referentes a filos bacterianos, acidobacteria y proteobacteria fueron las más abundantes (Figura 9).



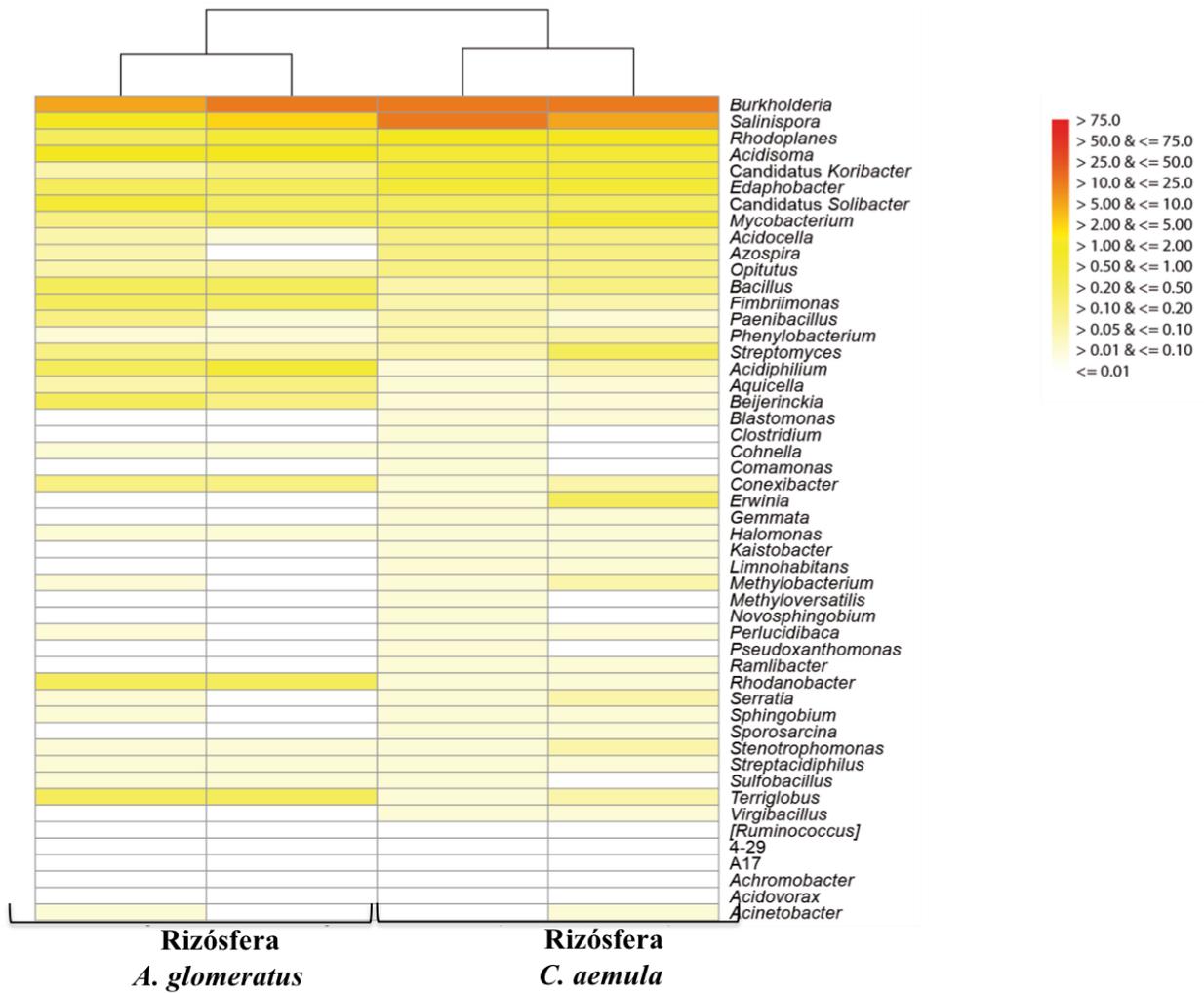
**Figura 9.** Abundancia relativa de filos bacterianos en la rizósfera de plantas pioneras del lago-cráter del volcán El Chichón.

El análisis de las clases bacterianas de ambas rizósferas muestra que existe una diferencia en la abundancia relativa entre *A. glomeratus* y *C. aemula*. Las clases bacterianas de acidobacteria, alfa-proteobacteria y actinobacteria permanecen igual en ambas rizósferas (Figura 10).



**Figura 10.** Heat Map de abundancia relativa de clases bacterianas en la rizósfera de plantas pioneras del lago-cráter del volcán El Chichón.

Dentro de los géneros bacterianos encontrados, *Burkholderia* es el más abundante (10-20%) en ambos casos. Este género bacteriano presenta habilidades para la promoción del crecimiento vegetal y la rizoremediación (Figura 11).



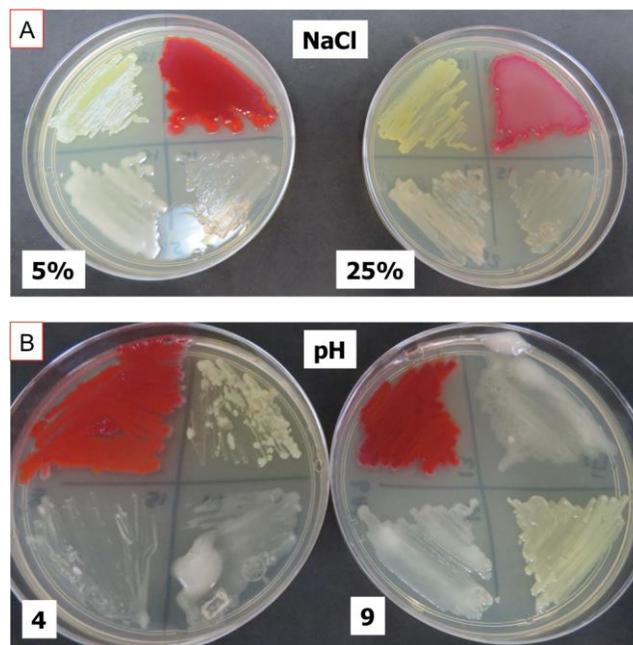
**Figura 11.** Heat Map de abundancia relativa de géneros bacterianos en la rizósfera de plantas pioneras del lago-cráter del volcán El Chichón.

## 7.6. Potencial de las cepas bacterianas como promotoras del crecimiento vegetal (BPCV).

Las cepas *Brevibacillus choshinensis* W12, *Chryseobacterium culicis* NOB78, *Pantoea ananatis* PO4103, *Burkholderia* sp. PO4109, *Serratia marcescens* AOB122, *Exiguobacterium indicum* AOB127, *Methylobacterium* sp. EC-06, *Kocuria palustris* EC-17, *Microbacterium arborescens* EC-18, *Bacillus soralis* EA-40, *Agrobacterium larrymoorei* EC-34, *Sphingomonas sanguinis* EA-45 del lago-cráter del volcán El Chichón fueron seleccionadas para realizarles pruebas bioquímicas multifuncionales para comprobar su versatilidad. Así mismo de la colección de cepas del exterior del volcán se seleccionaron las cepas *Pseudomonas* sp. EAR140, *Acinetobacter* sp. EAR111, *Arthrobacter* sp. ECR152 y *Bacillus* sp. EAE19.

### 7.6.1 Tolerancia a la salinidad y pH

Las cepas analizadas mostraron capacidad para crecer en concentraciones de NaCl de 5, 7, 13, 15, 17, 20, 22 y 25% así también lograron crecer a valores de pH de 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 8.5 y 9. Los resultados anteriores son importantes ya que demuestran el potencial de estas cepas bacterianas para sobrevivir y adaptarse a condiciones que sobrepasan los límites normales de salinidad y pH (Figura 12).



**Figura 12.** Crecimiento de cepas bacterianas en medio de cultivo nutritivo.

A): diferentes concentraciones de NaCl; B): diferentes niveles de pH.

## 7.6.2 Propiedades multifuncionales de las bacterias asociadas a las plantas pioneras del volcán El Chichón

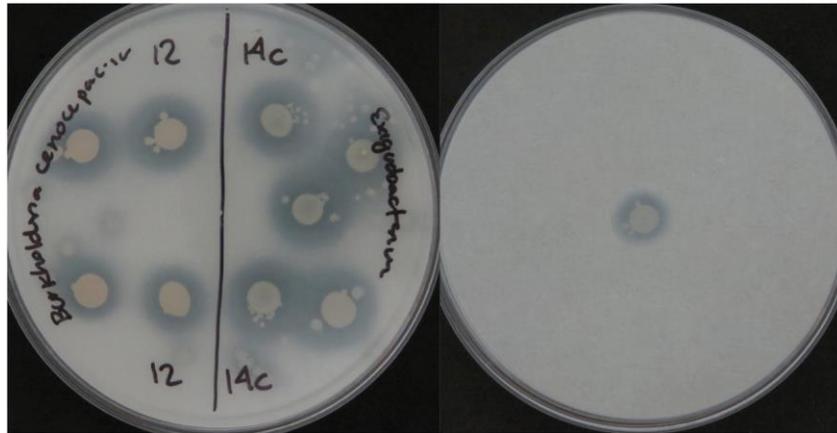
Como podemos observar en el Cuadro 15, las cepas bacterianas NOB78, PO4103, PO4109, AOB127, EC-06, EC-18, EA-40, EC-34, EAR111, EAR140, EAE19 y ECR152 biosintetizaron ácido indol acético (AIA). Para la solubilización de fosfato, la mayoría de las cepas mostraron zonas claras (halos de solubilización) alrededor de las colonias y el índice de solubilización de fosfato varió de 2.2 a 3.5 (Figura 13). Solo 8 cepas (PO4103, PO4109, AOB122, AOB127, EC-06, EA-40, EC-34 y EAR111) tuvieron actividad de nitrogenasa (ARA). La actividad desaminasa de ACC estaba presente en 13 cepas, excepto para NOB78, AOB122 y EC-17.

**Cuadro 15.** Capacidad de producción de AIA, solubilización de P, actividad de la nitrogenasa y ACC desaminasa por las bacterias asociadas a las plantas pioneras del volcán El Chichón.

Cepas bacterianas	AIA	Índice de solubilización de P <sup>a</sup>	ARA <sup>c</sup>	ACC desaminasa
<i>Brevibacillus choshinensis</i> W12	-	2.68± 016 <sup>b</sup>	-	+
<i>Chryseobacterium culicis</i> NOB78	+	2.98 ± 015	-	-
<i>Pantoea ananatis</i> PO4103	+	2.87 ± 0.12	+	+
<i>Burkholderia</i> sp. PO4109	+	3.44 ± 0.25	+	+
<i>Serratia marcescens</i> AOB122	-	2.74 ± 0.14	+	-
<i>Exiguobacterium indicum</i> AOB127	+	3.55 ± 0.09	+	+
<i>Methylobacterium</i> sp. EC-06	+	2.67 ± 0.02	+	+
<i>Kocuria palustris</i> EC-17	-	2.95 ± 0.08	-	-
<i>Microbacterium arborescens</i> EC-18	+	2.91 ± 0.11	-	+
<i>Bacillus soralis</i> EA-40	+	3.24 ± 0.10	+	+
<i>Agrobacterium larrymoorei</i> EC-34	+	2.73 ± 0.08	+	+
<i>Sphingomonas sanguinis</i> EA-45	-	2.69 ± 0.12	-	+
<i>Pseudomonas</i> sp. EAR140	+	2.35 ± 0.02	-	+
<i>Acinetobacter</i> sp. EAR111	+	2.26 ± 0.08	+	+
<i>Arthrobacter</i> sp. ECR152	+	2.62 ± 0.11	-	+
<i>Bacillus</i> sp. EAE19	+	3.12 ± 0.12	-	+

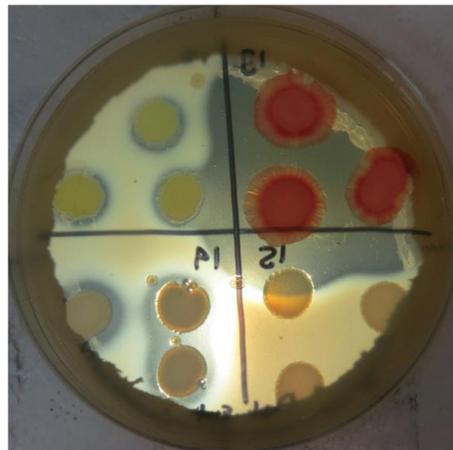
+: actividad positiva; -: actividad negativa;

<sup>a</sup> Índice de solubilización de fosfato; <sup>b</sup> Promedio de tres réplicas; <sup>c</sup> ARA: Acetylene reduction assay, Ensayo de reducción de acetileno



**Figura 13.** Solubilización bacteriana de fosfato  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .

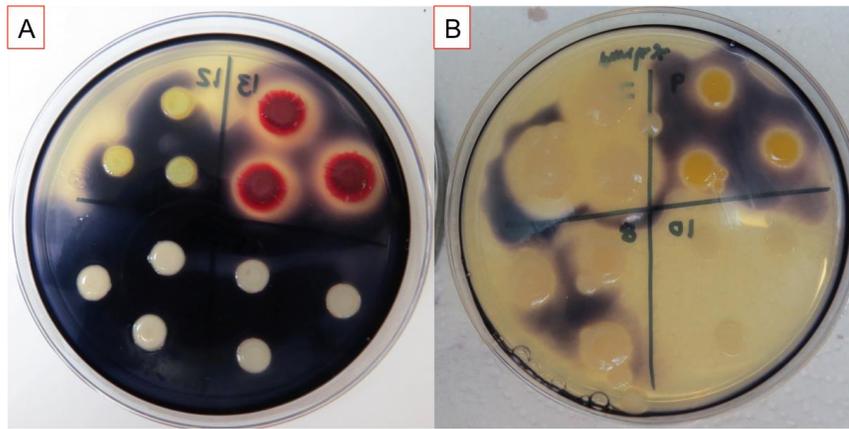
En relación con las propiedades de las enzimas extracelulares (Cuadro 15), las cepas W12, NOB78, PO4109, AOB127, EC-06, EA-40, EC-34, EA-45, EAR111, EAR140, EAE19 y ECR152 produjeron proteasa (Figura 14). En esta metodología se empleó leche descremada (desnatada). La leche descremada es una leche muy baja en grasas y con una concentración muy elevada de proteínas, en específico de caseína. La caseína se degrada por la acción de las proteasas y deja un halo transparente. Las proteasas hidrolizan la caseína para formar compuestos nitrogenados solubles (se solubilizan y por lo tanto dejan un halo transparente).



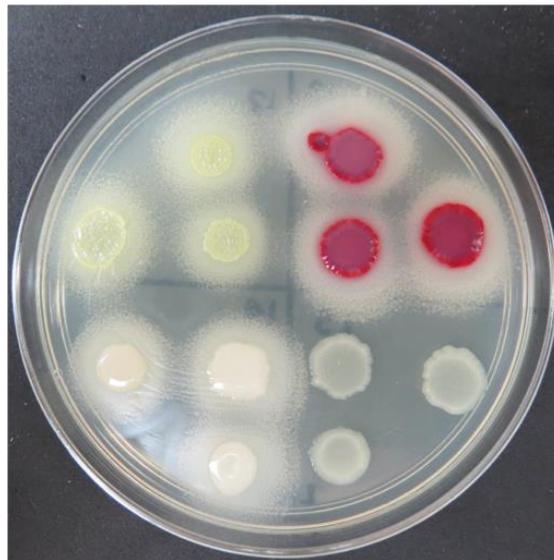
**Figura 14.** Producción bacteriana de Proteasa.

Todas las cepas fueron capaces de producir amilasa a excepción de W12, AOB127 y ECR152 (Figura 15). La enzima lipasa fue producida por W12, PO4109, AOB127, EC-06, EC-17, EA-40, EA-45, EAR111, EAR140, EAE19 y ECR152 (Figura 16). Así también, las cepas PO4103,

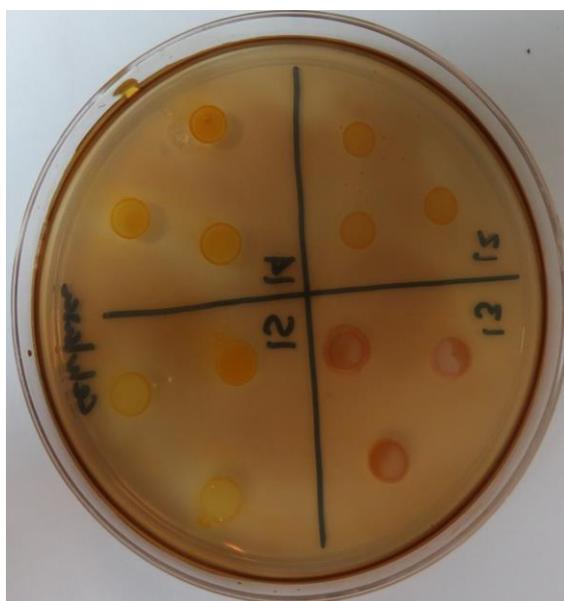
PO4109, AOB122, AOB127, EC-06, EC-17, EA-40, EA-45 y EAE19 produjeron celulasa (Figura 17).



**Figura 15.** Producción bacteriana de Amilasa. A): solución yodo lugol aplicado; B): yodo lugol después de 2 min.

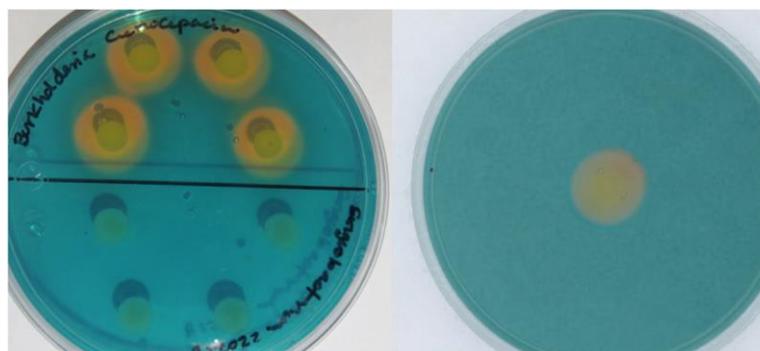


**Figura 16.** Producción bacteriana de Lipasa.



**Figura 17.** Producción bacteriana de Celulosa.

Por otro lado, un total de 14 cepas bacterianas presentaron capacidad para producir sideróforos (W12, NOB78, PO4109, AOB122, AOB127, EC-06, EC-17, EC-18, EA-40, EC-34, EAR111, EAR140, EAE19 y ECR152), (Figura 18). Además, la producción de EPS se observó en las cepas W12, NOB78, PO4109, AOB122, EC-06, EC-17, EC-18, EC-34, EA-45, EAR111, EAR140, EAE19 y ECR152 (Cuadro 16). Los exopolisacáridos forman una capa protectora para las bacterias, que permite la tolerancia al estrés abiótico y contribuye a la colonización de la superficie de la raíz. De la misma manera, los sideróforos contribuyen a la protección de las bacterias contra patógenos rizosféricos que compiten por los iones de hierro (Sandhya y Ali, 2015).



**Figura 18.** Producción bacteriana de sideróforos.

**Cuadro 16.** Producción de enzimas extracelulares, exopolisacáridos y sideróforos de las cepas bacterianas aisladas.

Cepas bacterianas	Producción de enzimas extracelulares				Producción de metabolitos	
	Proteasa	Amilasa	Lipasa	Celulasa	Sideróforos	EPS <sup>a</sup>
<i>Brevibacillus choshinensis</i> W12	+	-	+	-	+	+
<i>Chryseobacterium culicis</i> NOB78	+	+	-	-	+	+
<i>Pantoea ananatis</i> PO4103	-	+	-	+	-	-
<i>Burkholderia</i> sp. PO4109	+	+	+	+	+	+
<i>Serratia marcescens</i> AOB122	-	+	-	+	+	+
<i>Exiguobacterium indicum</i> AOB127	+	-	+	+	+	-
<i>Methylobacterium</i> sp. EC-06	+	+	+	+	+	+
<i>Kocuria palustris</i> EC-17	-	+	+	+	+	+
<i>Microbacterium arborescens</i> EC-18	-	+	-	-	+	+
<i>Bacillus siralis</i> EA-40	+	+	+	+	+	-
<i>Agrobacterium larrymoorei</i> EC-34	+	+	-	+	+	+
<i>Sphingomonas sanguinis</i> EA-45	+	+	+	+	-	+
<i>Pseudomonas</i> sp. EAR140	+	+	+	-	+	+
<i>Acinetobacter</i> sp. EAR111	+	+	+	-	+	+
<i>Arthrobacter</i> sp. ECR152	+	-	+	-	+	+
<i>Bacillus</i> sp. EAE19	+	+	+	+	+	+

+: actividad positiva; -: actividad negativa; <sup>a</sup>EPS: Exopolisacáridos

En el caso de la resistencia a metales pesados (HM) todas las cepas analizadas fueron resistentes a Cu<sup>2+</sup> y Al<sup>3+</sup>, solo cinco cepas pudieron crecer hasta 1 mM de Pb<sup>2+</sup> y con respecto a la resistencia a Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> y Cr<sup>3+</sup> los resultados fueron variables para cada cepa (Cuadro 17).

### Cuadro 17

Concentración mínima inhibitoria (CMI) de las cepas bacterianas aisladas de las plantas pioneras que crecen en el lago-cráter del volcán El Chichón.

Cepa bacteriana	Concentración mínima inhibitoria (mM) <sup>a</sup>					
	Al	Co	Cr	Cu	Pb	Zn
<i>Brevibacillus choshinensis</i> W12	1.0	0.5	0.5	2.0	0.5	0.25
<i>Chryseobacterium culicis</i> NOB78	2.0	0.25	0.12	2.0	0.5	0.5
<i>Pantoea ananatis</i> PO4103	4.0	0.5	0.5	4.0	1.0	0.5
<i>Burkholderia</i> sp. PO4109	4.0	0.5	0.5	4.0	0.25	1.0
<i>Serratia marcescens</i> AOB122	4.0	0.5	0.5	4.0	1.0	0.5
<i>Exiguobacterium indicum</i> AOB127	4.0	0.5	0.5	4.0	0.25	2.0
<i>Methylobacterium</i> sp. EC-06	1.0	0.25	0.25	2.0	1.0	2.0
<i>Kocuria palustris</i> EC-17	2.0	0.25	0.12	2.0	0.25	2.0
<i>Microbacterium arborescens</i> EC-18	2.0	0.5	0.25	2.0	1.0	2.0
<i>Bacillus soralis</i> EA-40	1.0	0.5	0.5	4.0	1.0	2.0
<i>Agrobacterium larrymoorei</i> EC-34	4.0	0.5	0.5	4.0	0.25	4.0
<i>Sphingomonas sanguinis</i> EA-45	2.0	0.25	0.12	2.0	0.25	2.0

<sup>a</sup> Cepas creciendo a 1 mM de Al<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup>; y a 0.5 mM de Co<sup>2+</sup> y Cr<sup>3+</sup> fueron consideradas resistentes (Brim et al., 1999; Nieto et al., 1987).

Es interesante observar diferentes resultados con respecto a la resistencia a metales pesados. En primera instancia, todas las cepas fueron resistentes a Al<sup>3+</sup> y Cu<sup>2+</sup>. Aunque se requiere Al<sup>3+</sup> para el crecimiento de las plantas, tiene efectos tóxicos en el desarrollo principalmente en los suelos ácidos. La resistencia a Al<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup> y otros metales tóxicos se correlaciona con la producción de los

sideróforos como se menciona por Farh et al., (2017). La mayoría de las cepas resistentes a  $Al^{3+}$  y  $Cu^{2+}$  presentadas en este estudio también produjeron sideróforos, por lo que se sugiere que la tolerancia a la toxicidad de estos elementos probablemente se deba a la producción de sideróforos.

En el caso de la resistencia a  $Pb^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ , las cepas EC-06, EC-18 y EA-40 pudieron crecer en presencia de ambos metales pesados. La cepa EC-18 es una bacteria endofítica que coloniza el interior de los tejidos de las plantas, se sugiere que podría proteger a las plantas contra los efectos inhibitorios de las altas concentraciones de  $Pb^{2+}$  y promover el crecimiento de las plantas mediante la producción de sideróforos o la solubilización de  $Pb^{2+}$  en suelos como lo muestran Sheng et al., (2008). En ese trabajo se analizó la cepa *Microbacterium* sp. G16 y se notó la capacidad de éste para promover el crecimiento y la absorción de  $Pb^{2+}$ . Por otro lado, *Methylobacterium* spp. es capaz de biodegradar compuestos orgánicos (herbicidas) e inorgánicos (metales pesados) del suelo de cultivos contaminados o del agua utilizada para regar suelos agrícolas como se comenta en varios estudios (Muller et al., 2011; Dourado et al., 2012). De acuerdo con los resultados, la cepa EC-06 debe desempeñar un papel clave en la absorción de metales pesados del suelo volcánico y promover el crecimiento de las plantas. Ciertos metales, como el cobalto y el cromo, en concentraciones traza, son esenciales para algunos procesos celulares, ejerciendo funciones catalíticas en reacciones bioquímicas o en conversiones metabólicas, que actúan como micronutrientes o cofactores enzimáticos, o pueden estabilizar las estructuras de proteínas (Marrero-Coto et al., 2010). Sin embargo, a concentraciones más altas ejercen un efecto tóxico, por lo que el mantenimiento de concentraciones adecuadas de ellas es un factor importante. Las cepas resistentes a  $Co^{2+}$  y  $Cr^{3+}$  evaluadas este estudio también podrían representar una alternativa biotecnológica para la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados.

Los resultados obtenidos en las pruebas anteriores son importantes ya que demuestran que las cepas aisladas tienen características bioquímicas que las hacen ser potencialmente promotoras de crecimiento vegetal. Las enzimas sintetizadas por BPCV están relacionadas en la nutrición vegetal y biocontrol. Las enzimas más activas en suelos son proteasa, ureasa, pectinasa, celulasa, deshidrogenasa, catalasa, amilasa y fosfatasa (Choubane et al., 2016). La amilasa es importante porque se encarga de degradar el almidón presente en la materia orgánica del suelo y transformarlo en un nutriente con mejor biodisponibilidad. El almidón es almacenado en tejidos vegetales como las semillas y es hidrolizado para ser utilizado para satisfacer los requerimientos energéticos (Ebrahim y Saleem, 2017). Por otra parte, en la industria la amilasa es importante para la producción de glucosa.

Así también, la entrada de rizobacterias a través de la epidermis de la raíz puede ser facilitada por las enzimas que degradan la pared celular, como la celulasa y la pectinasa, lo anterior es muy importante ya que es un mecanismo de colonización por parte de las bacterias hacia las plantas.

Las lipasas y proteasas son muy importantes desde el punto de vista para la promoción de crecimiento vegetal, participan en el control biológico contra patógenos, inducen la lisis de las paredes celulares de hongos degradando los lípidos asociados a estos.

Existen estudios sobre la promoción de crecimiento vegetal, por mencionar algunos, Amaresan *et al.*, (2013), en un estudio en la Isla Barren, India, reportan que los géneros bacterianos como *Bacillus*, *Enterobacter* y *Staphylococcus* tienen la capacidad de crecimiento en porcentajes de NaCl de 7, 8, 11, 12 y 13%. Reportaron también producción de algunas enzimas extracelulares para estos géneros, en el caso de *Bacillus* tuvieron capacidad de producir proteasa, amilasa, celulasa, así como la mostraron capacidad de producción de sideroforos y un índice de solubilización de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  de 0.3 a 0.5. En el caso de las cepas aisladas de *Staphylococcus* por los autores anteriormente mencionados, reportan producción de proteasa, amilasa, lipasa, celulasa, sideroforos y un PSI de 0.6 a 0.9. Los resultados obtenidos por parte de estos investigadores y comparando con los resultados obtenidos relacionados a la rizósfera de plantas que crecen en el volcán El Chichón, nos hace notar que las cepas similares que se han aislado en este trabajo son competentes y demuestran tener características como BPCV al igual que las anteriormente estudiadas aun siendo de lugares geográficamente distintos y lejanos. Por otro lado, Pereira y Castro en 2014, realizaron un estudio relacionado a rizobacterias solubilizadoras de  $\text{PO}_4$  para el mejoramiento en el crecimiento de *Zea mays* en suelos agrícolas deficientes de fósforo, estos autores evalúan diferentes géneros en especial *Burkholderia*, ellos determinan un índice de solubilización de fosfato (PSI) alrededor de 1.98, producción de sideróforos, celulasa y lipasa. La cepa *Burkholderia* sp. PO4109 aislada de la rizósfera de plantas del lago-cráter del volcán Chichón mostró capacidad para producir lipasa, amilasa, celulasa, proteasa y sideróforos. La cepa PO4109 notablemente es mejor solubilizadora de  $\text{PO}_4$  en comparación a las estudiadas por los autores anteriormente mencionados.

En la actualidad se han aislado microorganismos del suelo de cultivos con importancia agroindustrial en diferentes partes del mundo, cultivos de *Oryza sativa* L, *Solanum lycopersicum* L, *Brassica campestris* L, *Saccharum officinarum* L, plantas ornamentales, *Coffea arabica* L, etc (Restrepo-Franco *et al.*, 2015). Se ha probado la capacidad de estas cepas, de igual manera, para solubilizar  $\text{PO}_4$ , teniendo valores PSI entre 1.11 y 6.37 de géneros *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Pantoea*, *Brevibacillus*, *Bacillus*, *Azospirillum* etc. Como se pudo apreciar

anteriormente, las cepas estudiadas en este trabajo se encuentran en un rango óptimo de solubiización de  $\text{PO}_4$  bajo las mismas características experimentales realizadas por diversos autores.

### **7.6.3 Efecto de la inoculación de plantas con cepas bacterianas extremófilas en *Phaseolus vulgaris* L. cv. Negro Xamapa**

La inoculación con las cepas seleccionadas tuvo un efecto positivo en el crecimiento de las plantas de *P. vulgaris* (Figura 19). La cepa *A. larrymoorei* EC-34 tuvo el mayor efecto positivo en la altura total de la planta y el peso seco ( $p < 0.05$ ) en comparación con las plantas utilizadas como control sin inocular y con aquellas con  $\text{KNO}_3$  y  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  adicionados.

Las plantas inoculadas con la cepa de control *A. brasilenses* CD mostraron un peso seco de la raíz significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) y la cepa *S. marcescens* AOB122 tuvo un efecto similar. Las plantas inoculadas con la cepa *P. ananatis* PO4103 mostraron tener la mayor cantidad de clorofila ( $9.15 \text{ mg mL}^{-1}$ ) justo por debajo de *A. brasilenses* CD ( $9.24 \text{ mg mL}^{-1}$ ), además, se observó el mayor efecto sobre el contenido total de nitrógeno y fósforo en las plantas inoculadas con *Burkholderia* sp. PO4109 (Cuadro 18).

Por otro lado, fue importante notar que la cepa *A. larrymoorei* EC-34 se aisló de una planta no leguminosa, ya que este género es conocido por estar en simbiosis con diferentes especies de leguminosas y fijar nitrógeno (Zhang et al., 1991; Gopalakrishnan et al., 2015). Este resultado indicó que la cepa *A. larrymoorei* EC-34 puede tener un potencial de promoción del crecimiento vegetal en una amplia gama de especies de plantas y sugiere que estas cepas pueden adaptarse a diferentes condiciones ambientales influenciadas por los exudados de las raíces de sus huéspedes. Las bacterias aisladas de ambientes extremos han sido estudiadas como posibles bioinoculantes para mejorar el crecimiento de las plantas ya sea en diferentes condiciones de estrés o con diferentes especies de plantas (Mishra et al., 2011; Venkadesaperumal et al., 2014; Verma et al., 2017; Patel et al. al., 2017). Los resultados del presente estudio demuestran que los entornos volcánicos son adecuados para encontrar cepas que proporcionan una mejor comprensión de la relación entre los microorganismos y la promoción del crecimiento de las plantas en condiciones ambientales adversas.



**Figura 19.** Inoculación de plantas de *Phaseolus vulgaris* L con BPCV.

**Cuadro 18.** Efecto de la inoculación de bacterias aisladas del lago-cráter del volcán El Chichón sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L).

Tratamientos	Altura total (cm)	Peso seco de la planta (g)	Peso seco de la raíz (g)	Clorofila (mg/mL)	N total (mg/planta)	P total (mg/planta)
<i>Brevibacillus choshinensis</i> W12	61.2 ABC <sup>a</sup>	1.66 CDEF	0.84 CD	7.19 CDEF	5.57 H	7.1 DEFG
<i>Chryseobacterium indologenes</i> NOB78	64.7 AB	0.89 F	0.81 CD	4.74 HI	15.02 F	7.0 EFG
<i>Pantoea ananatis</i> PO4103	59.5 BC	1.19 DEF	0.69 CDE	9.15 AB	16.28 EF	8.5 BCDE
<i>Burkholderia territorii</i> PO4109	62.7 AB	1.90 BCDEF	0.30 EF	4.78 HI	27.53 A	10.52 A
<i>Serratia marcescens</i> AOB122	53.7 BCD	1.67 CDEF	0.90 BC	6.84 DEF	21.88 C	8.95 ABC
<i>Exiguobacterium indicum</i> AOB127	63.2 AB	2.16 ABCDE	0.23 EF	7.61 CDE	12.90 G	9.57 AB
<i>Methylobacterium radiotolerans</i> EC-06	68.0 A	1.33 CDEF	0.50 CDEF	5.82 FGH	17.90 DE	5.42 G
<i>Kocuria palustris</i> EC-17	50.7 DEF	1.68 BCDEF	0.14 F	6.44 EFG	11.30 G	8.85 ABCD
<i>Microbacterium arborescens</i> EC-18	63.2 AB	1.57 CDEF	0.40 DEF	4.37 I	25.50 B	6.6 FG
<i>Bacillus siraes</i> EA-40	62.7 AB	1.10 F	0.53 CDEF	7.79 BCDE	12.65 G	3.07 H
<i>Rhizobium larrymoorei</i> EC-34	68.7 A	2.28 ABC	0.85 CD	8.20 ABCD	11.00 G	7.17 CDEFG
<i>Sphingomonas yabuuchiae</i> EA-45	47.0 EF	1.15 EF	0.12 F	8.19 ABCD	15.60 F	6.67 FG
<i>Sinorhizobium mexicanum</i> R7	50.7 DEF	2.72 AB	1.36 AB	8.44 ABC	12.73 G	5.8 FG
<i>Azospirillum brasilenses</i> CD	57.2 BCD	3.19 A	1.66 A	9.24 A	18.58 D	6.57 FG
KNO <sub>3</sub> -N	63.0 AB	2.2 ABCD	0.89 BCD	2.28 J	15.05 F	6.62 FG
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	43.0 F	1.26 CDEF	0.14 F	5.34 GHI	16.35 EF	7.52 CDEF
No-inoculada	27.3 G	1.17 DEF	0.13 F	2.59 J	22.07 C	2.42 H
valor-p	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
HSD <sup>b</sup> (P<0.05)	7.634	1.038	0.485	1.413	2.005	1.784

<sup>a</sup> Promedio de seis réplicas. Promedios con la misma letra son no-significantes (Prueba de Tukey, P<0.05).

<sup>b</sup> HSD: Diferencia significativa más honesta

#### 7.6.4 Efecto de la inoculación con cepas bacterianas extremófilas en plantas de chile habanero (*Capsicum chinense*)

La inoculación con las cepas bacterianas seleccionadas para evaluarse en *Capsicum chinense* en invernadero tuvo un efecto positivo sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas (Figura 20).



**Figura 20.** Ensayo de inoculación de plantas de *Capsicum chinense* con BPCV.

La cepa EAE19 (aislada del exterior del volcán Chichón) y la cepa ITTG-R7 tuvieron el mayor efecto positivo en la altura total de la planta ( $p < 0.05$ ) en comparación con las plantas utilizadas como control sin inocular y con aquellas con fertilizante químico añadido. Las plantas inoculadas con la cepa de control ITTG-R7, EAR140 y EAE19 mostraron un peso seco total significativamente mayor ( $p < 0.05$ ). Las plantas inoculadas con la cepa EAR140 mostraron tener la mayor cantidad de clorofila ( $3.57 \text{ mg mL}^{-1}$ ), además, se observó el mayor efecto sobre el contenido total de nitrógeno en las plantas inoculadas con las cepas EC34 y ECR152. La cepa EAE19 tuvo mayor efecto sobre el contenido de fósforo total (0.37%) y la cepa EAR140 sobre el contenido de carbono orgánico (54.1%), (Cuadro19). Esto es muy importante ya que estos elementos son fundamentales para diferentes procesos bioquímicos como lo son la fotosíntesis, la biosíntesis de proteínas y fosfolípidos, la síntesis de ácidos nucleicos, los transportes de membrana, la transformación de energía, la división celular etc. La mayor absorción de nutrientes conduce a un mayor desarrollo del sistema radicular así como de la parte aérea de las plantas (ramificación), y por lo tanto, a una acumulación de materia seca (Singh et al., 2017). La inoculación de plantas de chile

con BPCV extremófilas se ha reportado anteriormente (Kumar et al., 2011; Amaresan et al., 2013), donde se ha observado una mejora en el crecimiento de los brotes y un aumento correspondiente en la biomasa de raíces en las plántulas. Los resultados de este experimento son importantes ya que podría indicar que las bacterias aisladas del volcán El Chichón están mejorando el ciclo de nutrientes y así mismo contribuyendo a la fertilidad del suelo volcánico. Entonces, las cepas bacterianas podrían mejorar el crecimiento de las plantas en condiciones ambientales deterioradas y reducir así, la contaminación ambiental promoviendo prácticas agrícolas sustentables. Cabe mencionar que se requieren estudios futuros para probar la naturaleza de las cepas y ver si es posible el aprovechamiento de su potencial como bioinoculantes en la agricultura y otras aplicaciones.

**Cuadro 19.** Efecto de la inoculación de bacterias aisladas en el volcán El Chichón sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de chile habanero (*Capsicum chinense*).

Tratamiento	Altura total (cm)	Longitud raíz (cm)	Peso seco total (g)	Peso seco raíz (g)	Diámetro tallo (mm)	Numero de frutos	Clorofila (mg/mL)	PT (%)	CO (%)	NT (%)
<i>Agrobacterium larrymoorei</i> EC-34	71.5 CD	36.5 DE	3.9 DE	1.9 CDE	4.3 CD	2.3 BC	2.24 E	0.30 C	51.9 E	1.47 A
<i>Arthrobacter</i> sp. ECR152	76.3 B	35.6 DE	4.6 B	1.3 F	5.0 BC	2.0 BC	1.88 F	0.29 C	49.8 H	1.48 A
<i>Pseudomonas</i> sp. EAR 140	76.5 B	41.6 BCD	5.1 A	2.6 A	6.0 A	2.5 AB	3.57 A	0.30 C	54.1 A	1.30 F
<i>Bacillus</i> sp. EAE19	84.8 A	49.6 A	5.3 A	2.1 BC	5.0 BC	2.6 AB	2.72 C	0.37 A	52.4 D	1.29 G
<i>Exiguobacterium indicum</i> AOB127	75.6 BC	31.8 EF	4.2 CD	2.0 BCD	5.0 BC	1.0 D	2.25 E	0.34 B	52.8 C	1.32 E
<i>Acinetobacter</i> sp. EAR111	76.0 B	39.5 CD	4.63 B	1.7 E	5.3 AB	2.83 AB	3.18 B	0.27 D	51.6 F	1.42 C
<i>Brevibacillus choshinensis</i> W12	74.3 BCD	43.3 ABC	4.3 BC	1.3 F	6.0 A	2.66 AB	2.50 D	0.29 C	49.4 I	1.37 D
<i>Sinorhizobium mexicanum</i> ITTG-R7	84.8 A	47.1 AB	5.3 A	2.2 B	6.0 A	3.33 A	3.34 B	0.30 C	54.0 B	1.46 B
Fertilizante (Phyto Green)	70.5 D	32.6 EF	3.8 E	1.8 DE	4.0 D	2.33 BC	1.36 G	0.24 E	51.0 G	1.29 G
Sin inoculo	65.5 E	26.8 F	3.7 E	1.7 E	4.0 D	1.5 CD	0.93 H	0.23 F	47.3 J	1.22 H
HSD (P<0.05)	4.219	6.510	0.325	0.215	0.961	0.955	0.177	0.0093	0.0086	0.0060

## VIII. CONCLUSION

Se aislaron y caracterizaron bacterias rizosféricas y endofíticas asociadas con las plantas pioneras *Andropogon glomeratus* y *Cheilanthes aemula* que crecen en interior (lago-cráter) y exterior del volcán El Chichón, que se caracteriza por ser un ambiente volcánico activo. Las cepas aisladas mostraron potencial como BPCV, debido a su capacidad para producir diferentes enzimas extracelulares, su capacidad para producir AIA, solubilizar fosfato, sintetizar sideróforos, actividad ACC desaminasa y nitrogasa. Así también las cepas tuvieron un efecto positivo sobre el crecimiento y desarrollo de los cultivos de *Phaseolus vulgaris* y *Capsicum chinense* principalmente, en el contenido total de nitrógeno, carbono y fósforo.

La amplia diversidad de bacterias asociadas a las plantas pioneras con cualidades como BPCV representan una alternativa biotecnológica sustentable para la producción de cultivos agrícolas en suelos de ambientes erosionados, siendo utilizadas eficientemente como biofertilizantes para promover el crecimiento de las plantas.

## IX. BIBLIOGRAFIA

- Ahemad, M., Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University-Science*, 26:1-20.
- Aguilar-Bultet, L., Falquet, L. (2015). Secuenciación y ensamblaje de novo de genomas bacterianos: una alternativa para el estudio de nuevos patógenos. *Revista de salud animal*, 37(2):125-132.
- Amaresan, N., Kumar, K., Sureshbabu, K., y Madhuri, K. (2013). Plant growth promoting potential of bacteria isolated from active volcano sites of Barren Island, India. *Letters in applied microbiology*, 58(2): 130-137.
- Aminov, R. I. (2011). Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Frontiers in microbiology*, 2, 158.
- Arellano Contreras U., Jiménez Salgado E. (2012). Geologic-structural assessment of the Chichonal volcanic complex, Chiapas, as alternative energy source. *Geotermia*, 25:4-9.
- Arnold, L. D., T. Viswanatha. (1983). The use of bis (mercaptoacetato-S,O) hydroxoiron (III) complex for the determination of hydroxamates. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 8:307-320.
- Armienta, M.A., De la Cruz-Reyna, S., (1995). Some hydrochemical fluctuations observed in Mexico related to volcanic activity. *Applied Geochemistry*. 10:215–227.
- Armienta, M.A., De La Cruz-Reyna, S., Macías, J.L., (2000). Chemical characteristics of the crater lakes of Popocatépetl, El Chichón, and Nevado de Toluca in central Mexico: *Journal of Volcanology and Geothermal Research*. 97:105–125.
- Armienta, M.A., Vilaclara, G., De la Cruz-Reyna, S., Ramos, S., Cenicerros, N., Cruz, O., Aguayo, A., Arcega-Cabrera, F., (2008). Water chemistry of lakes related to active and inactive Mexican volcanoes. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*. 178:249–258.
- Baldani, J.I., Reis, V.M., Videira, S.S., Boddey, L.H., Baldani, V.L.D., (2014). The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant Soil*. 384:413–431.
- Baldantoni, D., Ligrone, R., & Alfani, A. (2009). Macro-and trace-element concentrations in leaves and roots of *Phragmites australis* in a volcanic lake in Southern Italy. *Journal of Geochemical Exploration*, 101(2):166-174.
- Bashan, Y., & De-Bashan, L. E. (2005). Plant growth-promoting. *Encyclopedia of soils in the environment*, 1:103-115.

- Bhardwaj, D., Ansari, M. W., Sahoo, R. K., & Tuteja, N. (2014). Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial cell factories*, 13(1):66.
- Boddey, R.M. Dobereiner, J. (1995) Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent progress and perspectives for the future. *Fertilizer Research*. 42:241–250.
- Brim, H., Heyndrickx, M., de Vos, P., Wilmotte, A., Springael, D., Schiegel, H.G., Mergeay, M., (1999). Amplified rDNA restriction analysis and further genotypic characterisation of metal-resistant soil bacteria and related facultative hydrogenotrophs. *Systematic and Applied Microbiology*. 22:258–268.
- Burleigh, S. H., & Dawson, J. O. (1994). Occurrence of Myrica-nodulating Frankia in Hawaiian volcanic soils. *Plant and Soil*, 164(2):283-289.
- Carey, S. N. and H. Sigurdsson, (1986). The 1982 eruptions of El Chichón volcano, Mexico: 2. Observations and numerical modeling of tephra fall distribution. *Bulletin of Volcanology*. 48:127-141.
- Casadevall TJ, de la Cruz-Reyna S, Rose WI, Bagley S, Finnegan DL, Zollwer WH (1984) Crater lake and post-eruption hydrothermal activity, El Chichón volcano, Mexico. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 23:169–191
- Choubane, S., Cheba, B. A., Benourrad, A. (2016). Screening and Phenotypic Diversity of Amylase Producing Rhizospheric Bacteria from Some North African Plants. *Procedia Technology*, 22:1197-1204.
- Clemensson-Lindell, A., y Persson, H. (1992). Effects of freezing on rhizosphere and root nutrient content using two soil sampling methods. *Plant and soil*, 139:39-45.
- Contreras, U. A., y Salgado, E. J. (2012). Evaluación geológico-estructural del complejo volcánico Chichonal, Chiapas, como fuente alterna de energía. *Geotermia*, 3.
- Crews, T. E., Kurina, L. M., & Vitousek, P. M. (2001). Organic matter and nitrogen accumulation and nitrogen fixation during early ecosystem development in Hawaii. *Biogeochemistry*, 52(3):259-279.
- Dastager, S.G., Pandey, A., Lee, J.C., Li, W.J. and Kim, C.J. (2009). Polyphasic taxonomy of novel actinobacteria showing macromolecule degradation potentials in Bigeum Island, Korea. *Current Microbiology* 59:21–29.
- Datta B, Chakrabartty PK. (2014). Siderophore biosynthesis genes of *Rhizobium* sp. isolated from *Cicer arietinum* L. *3 Biotech*, 4(4):391-401.

- De Freitas, J.R., Banerjee, M.R. Germida, J.J. (1997). Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biology and Fertility of Soils*. 24: 358–364.
- De la Cruz-Reyna, S., A. L. Martin del Pozzo, (2009). The 1982 eruption of El Chichón Volcano, Mexico: Eye-witness perspectives of the disaster: *Geofísica Internacional*. 48- 1, 12-31.
- Díaz-de la Osa, A; Marulanda-Moreno, S; de la Fe-Pérez, Y; Hernández-Rodríguez, A; Restrepo-Franco, G M; Lucia-Baldani, V. (2015). Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*. 46:63-76.
- Dixon, R. y Kahn, D. (2004). Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology*. 2:621-631.
- Dourado, M.N., Ferreira, A., Araújo, W.L., Azevedo, J.L., Lacava, P.T., (2012). The diversity of endophytic methylotrophic bacteria in an oil-contaminated and an oil-free mangrove ecosystem and their tolerance to heavy metals. *Biotechnology research international*. doi:10.1155/2012/759865.
- Dziewit, L., Bartosik, D. (2014). Plasmids of psychrophilic and psychrotolerant bacteria and their role in adaptation to cold environments. *Frontiers in microbiology*. 5:596.
- Ebrahim, M. K., Saleem, A. R. (2017). Alleviating salt stress in tomato inoculated with mycorrhizae: Photosynthetic performance and enzymatic antioxidants. *Journal of Taibah University for Science*. 11:850-860.
- Espíndola J. M., J. L. Macías, R. I. Tilling and M. F. Sheridan, (2000). Volcanic history of El Chichón Volcano (Chiapas, Mexico) during the Holocene, and its impacts on human activity. *Bulletin of Volcanology*. 62, 2: 90-104.
- Farh, M.E.A., Kim, Y.J., Sukweenadhi, J., Singh, P., Yang, D.C., (2017). Aluminium resistant, plant growth promoting bacteria induce overexpression of Aluminium stress related genes in *Arabidopsis thaliana* and increase the ginseng tolerance against Aluminium stress. *Microbiological Research*. 200: 45-52.
- Fahraeus, G., (1957). The infection of clover root hair by nodule bacteria studied by a single glass slide technique. *Journal of general microbiology*. 16:374–381.
- Fujimura, R., Sato, Y., Nishizawa, T., Nanba, K., Oshima, K., Hattori, M., Kamijo, T., Ohta. H., (2012). Analysis of early bacterial communities on volcanic deposits on the island of Miyake

- (Miyake-Jima), Japan: a 6-year Study at a Fixed Site. *Microbes and Environments*. 27:19–29.
- Funnell, B. E., Phillips, G. J. (2004). *Plasmid biology* (Vol. 672). Washington, DC: American Society for Microbiology press.
- Gano-Cohen, K.A., Stokes, P.J., Blanton, M.A., Wendlandt, C.E., Hollowell, A.C., Regus, J.U., Sachs, J.L. (2016). Nonnodulating *Bradyrhizobium* spp. Modulate the Benefits of Legume-*Rhizobium* Mutualism. *Applied and Environmental Microbiology*, 82:5259-5268.
- García, R.A., Lovaisa, N. C., Ulla, E.L. (2015). Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfatos del Noroeste Argentino y su efecto en la promoción de crecimiento en maíz (*Zea mays* L.). *Revista agronómica del noroeste argentino*. 35:19-28
- Glick, B.R. (1995). The enhancement of plant growth by free living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 41:109–114.
- Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Varshney, R. K., Gowda, C. L., Krishnamurthy, L. (2015). Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech*, 5(4):355-377.
- Gordon S. A, Weber R. P. (1951). Colorimetric estimation of indol acetic acid. *Plant Physiology* 26:192-195
- Guo, Y., Fujimura, R., Sato, Y., Suda, W., Kim, S.W., Oshima, K., Ohta, H. (2014). Characterization of early microbial communities on volcanic deposits along a vegetation gradient on the Island of Miyake, Japan. *Microbes and Environments*. 29:38-49.
- Harper, J. L., Begon, M., Townsend, C. (2006). *From Individuals to Ecosystems*. Ecology. Blackwell Publishing, Oxford
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of microbiology*, 60(4):579-598.
- Heather, J. M., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1):1-8.
- Hernández-Morales, J. (2009). Impacto antrópico sobre suelos incipientes en el volcán El Chichón (Chiapas, México). *Lacandonia, Rev. Ciencias UNICACH*, 3(2):29-43.
- Hernández-Mendoza, J. L., Quiroz-Velásquez, J. D., Moreno-Medina, V. R., y Mayek-Pérez, N. (2008). Biosíntesis de ácido antranílico y ácido indolacético a partir de triptófano en una cepa de *Azospirillum brasilense* nativa de Tamaulipas, México. *Revista de Avances en Investigación Agropecuaria*, 12:57-67.

- Hill, G.T., N.A. Mitkowski, L. Aldrich-Wolfe, L.R. Emele, D.D. Jurkonie, A. Ficke, S. Maldonado-Ramírez, S.T. Lynch y E.B. Nelson. (2000). Methods for assessing the composition of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology* 15:25-36.
- Jha, P., Kumar, A. (2009). Characterization of novel plant growth promoting endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* from wheat plant. *Microbial Ecology*, 58(1):179-188.
- Johansson J.F, Paul L.R, Finlay R. D. (2004) Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiology Ecology* 48:1–13
- Jiménez, R. (2001). *Uso de Microorganismos Rizosféricos en Solanáceas*. Presentation, Buenavista, Saltillo, Coahuila.
- Jutzeler, M., Varley, N., Roach, M., (2011). Geophysical characterization of hydrothermal systems and intrusive bodies, El Chichón volcano (Mexico). *Journal de Geophysical Research*. 116:B04104.
- Kammoun, R., Naili, B., Bejar, S. (2008) Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). *Bioresour Technology* 99:5602–5609.
- Karnwal, A. (2009). Production of indole acetic acid by fluorescent *Pseudomonas* in the presence of L-tryptophan and rice root exudates. *Journal of Plant Pathology*. 61-63.
- Kasana, R.C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S. Gulati, A. (2008). A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Current Microbiology* 57:503–507.
- Kelly, L. C., Cockell, C. S., Thorsteinsson, T., Marteinson, V., Stevenson, J. (2014). Pioneer microbial communities of the Fimmvörðuháls lava flow, Eyjafjallajökull, Iceland. *Microbial ecology*, 68(3):504-518.
- Khan, M. S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M., and Wani, P. A. (2010). Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi—current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science*. 56:73–98.
- King, G. M. (2003). Contributions of atmospheric CO and hydrogen uptake to microbial dynamics on recent Hawaiian volcanic deposits. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(7):4067-4075.
- Koboldt, D. C., Steinberg, K. M., Larson, D. E., Wilson, R. K., Mardis, E. R. (2013). The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell*. 155(1):27-38.

- Krishnan, P., Ghosh, S., Wang, B., Heyns, M., Graham, K., Mackey, J. R., Damaraju, S. (2016). Profiling of small nucleolar RNAs by next generation sequencing: potential new players for breast cancer prognosis. *PloS one*, 11(9):e0162622.
- Kumar, K., Amaresan, N., Madhuri, K., Gautam, R.K. and Srivastava, R.C. (2011b). Isolation and characterization of plant growth promoting bacteria and their effect on chilli (*Capsicum annuum*) seedling growth. In 2nd Asian Congress on Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) for Sustainable Agriculture. 90–98.
- Kundu, B. S., Nehra, K., Yadav, R., Tomar, M. (2009). Biodiversity of phosphate solubilizing bacteria in rhizosphere of chickpea, mustard and wheat grown in different regions of Haryana. *Indian journal of microbiology*, 49(2):120-127.
- Kurina, L. M., Vitousek, P. M. (2001). Nitrogen fixation rates of *Stereocaulon vulcani* on young Hawaiian lava flows. *Biogeochemistry*, 55(2):179-194.
- Liu, Z., Zhu, J., Li, M., Xue, Q., Zeng, Y., Wang, Z. (2014). Effects of freshwater bacterial siderophore on *Microcystis* and *Anabaena*. *Biological Control*. 78:42-48.
- Liu, Z., Li, Y., Zhang, S., Fu, Y., Fan, X., Patel, J. Zhang, M. (2015). Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from calcareous soils. *Applied Soil Ecology*, 96:217-224.
- López, D., Bundschuh, J., Birkle, P., Armienta, M., Cumbal, L., Sracek, O. (2012). Arsenic in volcanic geothermal fluids of Latin America. *Science of the Total Environment*, 429:57-75.
- Louden, B., Lynne, A. Haarmann, D. (2011). Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection. *Journal of Microbiology and Biology Education*, 12(1):51-53.
- Macías, J. L., J. M. Espíndola., T. Taran., A. García- Palomo, (1997). Explosive volcanic activity during the last 3,500 years at El Chichón Volcano, Mexico. IAVCEI, General Assembly, Puerto Vallarta, Mexico. Field Trip Guide, 53.
- Macías J. L., L. Capra, K. M. Scott, J. M. Espíndola, A. García-Palomo and J. E. Costa. (2004). The 26 May 1982 breakout ows derived from failure of volcanic dam at El Chichón, Chiapas, Mexico: *Geological Society of American Bulletin*, 116:233-246.
- Mackelprang, R., Waldrop, M. P., DeAngelis, K. M., David, M. M., Chavarria, K. L., Blazewicz, S. J., Jansson, J. K. (2011). Metagenomic analysis of a permafrost microbial community reveals a rapid response to thaw. *Nature*, 480(7377): 368.
- McClelland L, Simkin T, Summers M, Nielsen E, Stein TC. (1989). *Global volcanism, 1975–1985*. Prentice- Hall, Englewood Cliffs. 655

- Mahanta, N., Gupta, A. Khare, S.K. (2008). Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. *Bioresour Technology* 99:1729–1735.
- Mardis, E. R. (2013). Next-generation sequencing platforms. *Annual review of analytical chemistry*, 6:287-303.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., Dewell, S. B. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437(7057):376.
- Martínez-Romero E., López-Guerrero M., Ernesto-Ormeño O., Carlos-Moles A., González-Monterrubio C. F., Ibarra-Rodríguez M. A., Campos-Hernández A. (2013). *Los Biofertilizantes y su uso en la Agricultura*. SAGARPA – COFUPRO – UNAM. Editorial Prado S.A.de C.V. 50 p.
- Marrero-Coto, J., Díaz-Valdivia, A., Coto-Pérez, O. (2010). Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 41:1.
- Matsukawa, E., Nakagawa, Y., Iimura, Y., Hayakawa, M. (2007). Stimulatory effect of indole-3-acetic acid on aerial mycelium formation and antibiotic production in *Streptomyces* spp. *Actinomycetologica*. 21:32-39.
- Medrano-Santillana, M., Brito, E.M.S., Duran, R., Gutiérrez-Corona, F., Reyna-López, G.E. (2017). Bacterial diversity in fumarole environments of the Parícutín volcano, Michoacán (Mexico). *Extremophiles* 21:499–511
- Mishra, P.K., Bisht S.C., Ruwari, P.G., Selvakumar Joshi, G.K., Bisht, J.K., Bhatt, J.C., Gupta, H.S. (2011). Alleviation of cold stress in inoculated wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings with psychrotolerant Pseudomonads from NW Himalayas. *Archives of Microbiology*. 193:497–513.
- Mohammad R. S., Nasser A., Bahman K. (2020). P Solubilizing Potential of Some Plant Growth Promoting Bacteria Used as Ingredient in Phosphatic Biofertilizers with Emphasis on Growth Promotion of *Zea mays* L., *Geomicrobiology Journal*, 37:4, 327-335
- Muller, E. E., Hourcade, E., Louhichi-Jelail, Y., Hammann, P., Vuilleumier, S., Bringel, F. (2011). Functional genomics of dichloromethane utilization in *Methylobacterium extorquens* DM4. *Environmental Microbiology*. 13:2518-2535.
- Müller, D. B., Vogel, C., Bai, Y., Vorholt, J. A. (2016). The plant microbiota: systems-level insights and perspectives. *Annual review of genetics*, 50:211-234.

- Navarro-Noya, Y. E., Hernández-Mendoza, E., Morales-Jiménez, J., Jan-Roblero, J., Martínez-Romero, E., Hernández-Rodríguez, C. (2012). Isolation and characterization of nitrogen fixing heterotrophic bacteria from the rhizosphere of pioneer plants growing on mine tailings. *Applied soil ecology*, 62:52-60.
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*. 170:265-270.
- Nieto, J.J., Ventosa, A., Ruiz-Berraquero, F. (1987). Susceptibility of Halobacteria to heavy metals. *Applied and Environmental Microbiology*. 53: 1199–1202.
- Nüsslein, K., Tiedje, J. M. (1999). Soil bacterial community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in a tropical soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(8):3622-3626.
- Olsen GJ, Woese CR. (1993). Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *The FASEB Journal*. 7(1):113-123
- Patel, K.S., Naik, J.H., Chaudhari, S., Amaresan, N. (2017). Characterization of culturable bacteria isolated from hot springs for plant growth promoting traits and effect on tomato (*Lycopersicon esculentum*) seedling. *Comptes Rendus Biologies*. 340:244-249.
- Pereira P, Ibáñez F, Rosenblueth M, Etcheverry M, Martínez-Romero E. (2011). Analysis of the bacterial diversity associated with the roots of maize (*Zea mays* L.) through culture-dependent and culture-independent methods. *ISRN Ecology* 1-10
- Pereira SIA, Castro PL. (2014). Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance *Zea mays* growth in agricultural P-deficient soils. *Ecological Engineering*. 73:526–535.
- Pérez-Jiménez, L.A., Sarukhán-Kermes, J. (1971). La vegetación de la región de Pichucalco, Chiapas. *Compilado en Lecturas Chiapanecas no. 6*. (No. CH/581.972751 P4)
- Pérez E, Sulbaran M, Ball M, Yarzabal L. (2007). Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. *Soil Biology & Biochemistry*. 39:2905–2914
- Perkel, J. (2011). Making contact with sequencing's fourth generation. *BioTechniques*. 50(2):93-95.
- Pini, F., Galardini, M., Bazzicalupo, M., Mengoni, A. (2011). Plant-bacteria association and symbiosis: are there common genomic traits in Alphaproteobacteria?. *Genes*, 2(4):1017-1032.
- Prats-Pastor, G. (2006). *Microbiología Clínica. Epidemiología microbiana*. 1ª Edición. Madrid, España. Ed. Médica Panamericana. 213-215.

- Restrepo-Franco, G. M., Marulanda-Moreno, S., de la Fe-Pérez, Y., Díaz-de la Osa, A., Lucia-Baldani, V., Hernández-Rodríguez, A. (2015). Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista Cenic Ciencias Biológicas*, 46(1):63-76.
- Rincón-Molina, C.I., Hernández-García, J.A., Rincón-Rosales, R., Gutiérrez-Miceli, F.A., Ramírez-Villanueva, D.A., González-Terrerros, E., Peña-Ocaña, B.A., Palomeque-Domínguez, H., Dendooven, L, Ruíz-Valdiviezo, V.M. (2019). Structure and diversity of the bacterial communities in the acid and thermophilic crater-lake of the volcano “El Chichón”, Mexico. *Geomicrobiology Journal*. DOI: 10.1080/01490451.2018.1509158.
- Rodicio M, Mendoza M.C (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 22:238-245.
- Rosenblueth, M., Martínez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular plant-microbe interactions*, 19(8):827-837.
- Rosas S, Rovera M, Correa J. (2006). Phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* can influence the rhizobia-legume symbiosis. *Soil Biology & Biochemistry*. 38:3502–3505.
- Rouwet, D., Taran, Y., Inguaggiato, S., Varley, N., Santiago, S.J.A. (2008). Hydrochemical dynamics of the “lake-spring” system in the crater of El Chichón volcano (Chiapas, Mexico). *Journal of Volcanology and Geothermal Research*. 178:237–248.
- Ruíz-Valdiviezo, V. M., Luna-Guido, M., Galzy, A., Gutiérrez-Miceli, F. A., Dendooven, L. (2010). Greenhouse gas emissions and C and N mineralization in soils of Chiapas (México) amended with leaves of *Jatropha curcas* L. *Applied soil ecology*, 46(1):17-25.
- Sandhya, V., Ali, S.Z. (2015). The production of exopolysaccharide by *Pseudomonas putida* GAP-P45 under various abiotic stress conditions and its role in soil aggregation. *Microbiology* 84:512–519.
- Saitou N, Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4:406–425.
- Sayed, R. Z., Badgajar, M. D., Sonawane, H. M., Mhaske, M. M., Chincholkar, S. B. (2005). Production of microbial iron chelators (siderophores) by fluorescent *Pseudomonads*. *Indian Journal of Biotechnology*, 4(4):484-490.
- Schafer, J. R., Hallett, S. G., Johnson, W. G. (2014). Rhizosphere microbial community dynamics in glyphosate-treated susceptible and resistant biotypes of giant ragweed (*Ambrosia trifida*). *Weed science*, 62(2):370-381.

- Scher, F. M., Baker, R. (1982). Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathology*, 72(12):1567-1573.
- Schwyn, B., J. B. Neilands. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*. 160:47-56.
- Scolamacchia, T., Macías, J.L., Sheridan, M.F., Hughes, S.R. (2005). Morphology of ash aggregates from wet pyroclastic surges of the 1982 eruption of El Chichón Volcano, Mexico. *Bulletin of Volcanology*. 68 (2):171–200.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat). (2002). Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudios, muestreo y análisis. *Diario oficial de la Federación*, 85-85.
- Sheng, X.F., Xia, J.J., Jiang, C.Y., He, L.Y., Qian, M. (2008). Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. *Environmental Pollution*. 156:1164-1170.
- Siefert, J. L. (2009). Defining the mobilome. In *Horizontal Gene Transfer*. Humana Press. 13-27
- Sigurdsson, H., S. N. Carey and J. M. Espíndola. (1984). The 1982 eruptions of El Chichón Volcano, Mexico: Stratigraphy of pyroclastic deposits: *Journal of Volcanology and Geothermal Research*. 11-37.
- Singh, Z., Singh, G., Aggarwal, N. (2017). Effect of Mesorhizobium, plant growth promoting rhizobacteria and phosphorus on plant biometry and growth indices of desi chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Applied and Natural Science*. 9(3):1422-1428.
- Souza, R. D., Ambrosini, A., Passaglia, L. M. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and molecular biology*. 38(4):401-419.
- Spaepen, S, Vanderleyden, J, Remans R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Review*. 31:425-448.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., Okon, Y. (2009). Plant growth-promoting actions of rhizobacteria. *Advances in botanical research*. 51:283-320.
- Staal, M., Lintel-Hekkert, S. T., Harren, F., Stal, L. (2001). Nitrogenase activity in cyanobacteria measured by the acetylene reduction assay: a comparison between batch incubation and online monitoring. *Environmental Microbiology*. 3(5):343-351.

- Tamminen, M., Virta, M., Fani, R., Fondi, M. (2012). Large-scale analysis of plasmid relationships through gene-sharing networks. *Molecular Biology and Evolution*. 29:1225–1240.
- Tamura K., Nei M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*. 10:512–526.
- Taran Y, Fischer T. P., Pokrovsky B., Sano Y., Armienta M. A., Macías J. L. (1998). Geochemistry of the volcano–hydrothermal system of El Chichón Volcano, Chiapas, Mexico. *Bulletin of Volcanology*. 59:436–449
- Taran, Y., Rouwet, D., Inguaggiato, S., Aiuppa, A. (2008). Major and trace element geochemistry of neutral and acidic thermal springs at El Chichón volcano, Mexico. *Journal Of Volcanology And Geothermal Research*. 178(2):224-236.
- Thomas, T., Gilbert, J., Meyer, F. (2012). Metagenomics-a guide from sampling to data analysis. *Microbial informatics and experimentation*. 2(1):3.
- Tilling, R. I. (2009). El Chichón's "surprise" eruption in 1982: Lessons for reducing volcano risk. *Geofísica internacional*. 48(1):3-19.
- Van Loon, L. C. (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*. 119(3):243-254.
- Venkadesaperumal, G., Amaresan, N., Kumar, K. (2014). Plant growth promoting capability and genetic diversity of bacteria isolated from mud volcano and lime cave of Andaman and Nicobar Islands. *Brazilian Journal of Microbioly*. 45:1271-1281.
- Verma, P., Yadav, A.N., Kumar, V., Singh, D.P., Saxena, A.K. (2017). Beneficial Plant-Microbes Interactions: Biodiversity of microbes from diverse extreme environments and its impact for crop improvement. In *plant-microbe interactions in agro-ecological perspectives*. Springer, Singapore. 543-580.
- Versalovic, J., T. Koeuth., J.R. Lupski. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*. 19(24):6823–6831.
- Vorholt, J. A. (2012). Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology*. 10(12):828.
- Ward, D.M., M.M. Bateson, R. Weller., A.L. Ruff-Roberts. (1992). Ribosomal RNA analysis of microorganisms as they occur in nature. *Advances in Microbial Ecology*. 219-286
- Woese, C.R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiology Reviews*. 51:221-271.

- Woese C. R, Kandler O, Wheelis M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 87(12):4576–9.
- Yadav, A. N. (2017). Beneficial role of extremophilic microbes for plant health and soil fertility. *Journal Agricultural Science Botany*. 1:30-33.
- Yang, L., Ren, Y., Zhao, S., Liang, X. y Wang, J. (2015). Isolation and characterization of three heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacteria from a sequencing batch reactor. *Annals of Microbiology*. 66(2):737-747.
- Yao, Z.Y., Kan, F.L., Wang, E.T., Wei, G.H., Chen, W.X., (2002). Characterization of rhizobia nodulating legume species within the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52:2219–2230.
- Zakharova, E., Shcherbakov, A., Brudnik, V., Skripko, N., Bulkhin, N. Ignatov, V. (2001). Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. *European Journal of Biochemistry*. 259(3):572-576.
- Zhang, X. P., M. Karsisto, R. Harper, K. Lindstrom. (1991). Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from the root nodules of leguminous trees. *International Journal of Systematic Microbiology*. 41:104-113.
- Zhang, C., Kong, F. (2016). Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria from tobacco rhizospheric soil and their effect on tobacco plants. *Applied Soil Ecology*. 18-25

Anexo. Visto bueno del director de tesis. Dr. Reiner Rincón Rosales.

**TECNOLOGICO NACIONAL DE MEXICO  
INSTITUTO TECNOLOGICO NACIONAL DE MEXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y  
BIOTECNOLOGIA**

**Borrador de la Tesis:**

**Estudio de la Diversidad de Bacterias Promotoras de Crecimiento  
Vegetal asociadas a plantas pioneras del volcán El Chichón**

**Presentado por:**

**M.C. Clara Ivette Rincón Molina**



**Comité Tutorial:**

VISTO BUENO  
DR. REINER RINCÓN ROSALES  
28/mayo/2020

**Dr. Reiner Rincón Rosales** (Director de la tesis)

**Dra. María Esperanza Martínez Romero** (Co-Directora)

**Dra. Nancy Ruiz Lau** (Asesora)

**Dr. Víctor Manuel Ruiz Valdiviezo** (Asesor)

**Dr. Juan José Villalobos Maldonado** (Asesor)

**Dr. Eduardo Raymundo Garrido Ramírez** (Asesor externo)

**Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.**

**Mayo/2020**

