



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
UNIDAD ENES MORELIA

LICENCIATURA EN ECOLOGÍA

LABORATORIO DE MICROBIÓMICA

Influencia de las interacciones bacterianas en su capacidad
como bacterias promotoras de crecimiento vegetal:
¿cooperación o competencia?

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADA EN ECOLOGÍA

PRESENTA:

FRIDA MICHELLE ISLAS GONZALEZ

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. ROCIO HERNANDEZ LEON

CO-DIRECTORA:

Dra. YUNUEN TAPIA TORRES

Morelia, Mich. Octubre 1 de 2023.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



ESCUELA
NACIONAL
DE ESTUDIOS
SUPERIORES
UNIDAD MORELIA

10
años
(2011-2021)

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO ESCUELA
NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD MORELIA
SECRETARÍA GENERAL
SERVICIOS ESCOLARES

MTRA. IVONNE RAMÍREZ WENCE

DIRECTORA

DIRECCIÓN GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR

P R E S E N T E

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la **sesión ordinaria 10** del **Comité Académico de la Licenciatura en Ecología** de la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES), Unidad Morelia, celebrada el día **25 de septiembre de 2023**, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para la presentación del Trabajo Profesional de la alumna **Frida Michelle Islas González** de la Licenciatura en **Ecología**, con número de cuenta **314073976**, con el trabajo titulado: **"Influencia de las interacciones bacterianas en su capacidad como bacterias promotoras de crecimiento vegetal: ¿Cooperación o competencia?"**, bajo la dirección como tutora de la **Dra. Rocío Hernández León** y como co-tutora la **Dra. Yunuen Tapia Torres**.

El jurado queda integrado de la siguiente manera:

Presidente:	Dr. Luis Eduardo Servín Garcidueñas
Vocal:	Dr. Jesús Llanderal Mendoza
Secretario:	Dra. Rocío Hernández León
Suplente:	Dr. Fernando Pineda García
Suplente:	Dr. Daniel Rojas Solís

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Morelia, Michoacán a 30 de enero de 2024.

DRA. YUNUEN TAPIA TORRES
SECRETARIA GENERAL

CAMPUS MORELIA

Antigua Carretera a Pátzcuaro N° 8701, Col. Ex Hacienda de San José de la Huerta
58190, Morelia, Michoacán, México. Tel: (443)689.3500 y (55)5623.7300, Extensión Red UNAM: 80614
www.enesmorelia.unam.mx

Agradecimientos Institucionales

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad Morelia y en especial a la licenciatura en Ecología así como a todo su cuerpo de Profesores por haberme otorgado una educación de alta calidad con buena competencia a nivel mundial.

Al laboratorio de Microbiómica por recibirme en sus instalaciones y brindarme todo lo necesario para montar mis experimentos.

A mi directora de tesis la Dra. Rocio Hernandez León por guiarme en la investigación científica, recibir su mentoría es un placer y sobre todo un privilegio. A mi co-directora la Dra. Yunue Tapia Torres por acompañarme e impulsarme a ser mejor estudiante.

Al Dr. Antonio Gonzalez Rodriguez y a su laboratorio de Genética de la conservación por brindarme equipo e instalaciones para realizar mis experimentos.

También agradezco a todos los miembros de mi jurado por el tiempo dedicado a revisar esta tesis: Dr. Luis Eduardo Servin Garcidueñas, Dr. Jesus Llanderal Mendoza, Dra. Rocio Hernandez León, Dr. Fernando Pineda Garcia y al Dr. Daniel Rojas Solís.

Al programa de impulso a la titulación por actividades académicas en el extranjero "PITAAE" por permitirme acudir presencialmente al laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad de L'Aquila (Italia) para profundizar en el entendimiento de mis sujetos de estudio, así como ampliar mis conocimientos tanto culturales como científicos. A la Dra. Marika Pellegrini por recibirme en su laboratorio y apoyarme en todo mi proceso de estancia. Al proyecto PAPIME titulado "Red colaborativa para la enseñanza de la biogeoquímica en México a través de un laboratorio virtual basado en estudios de caso" con clave PE206922 por financiar parte de esta tesis de licenciatura.

Agradecimientos personales

A mi madre María Cenia Gonzalez Haro por su total e ilimitado apoyo.
A mis compañeros de grupo por acompañarme en el camino.
Por ser mi compañero incondicional y siempre estar cerca
de mí apoyándome Aarón Jair Ortega Zamora.
Y a mi familia por confiar en mí.

Summary

Abiotic stress such as those caused by drought and salinity are an important limitation in the growth and productivity of native corn. These types of stress trigger the formation of reactive oxygen species (ROS) causing oxidative stress. Plant growth promoting bacteria (PGPB) through their secondary metabolites, which interact with specific plant receptors, activate the defense system, reducing the damage caused by ROS.

The objective of this thesis was to develop the use of secondary metabolites of PGPB without the need to inoculate living cells. Bacterial interactions play an important role in the release of enzymes called public goods, which are mostly important catalysts or enzymes. that play important roles both in soil functions and for the evolution of the individual.

Compatibility tests were carried out between four PGPBs where biofilm production was measured and we found that they do not cooperate but some groups coexist. We tested their cell-free extracts in a greenhouse experiment, where it was found that individually grown bacteria activated enzymes that increase resistance to oxidative stress. Therefore, it is confirmed that interactions play a fundamental role in the release of bacterial enzymes

Resumen

El estrés abiótico como los ocasionados por sequía y salinidad son un importante limitante en el crecimiento y productividad del maíz criollo, estos tipos de estrés desencadenan la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) causando estrés oxidativo. Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPB) por medio de sus metabolitos secundarios, los cuales interactúan con receptores específicos de las plantas, activan el sistema de defensa disminuyendo los daños ocasionados por ROS.

El objetivo de esta tesis fue desarrollar el uso de los metabolitos secundarios de las PGPB sin necesidad de inocular las células vivas. Las interacciones bacterianas juegan un papel importante en la liberación de enzimas denominadas bienes públicos, las cuales en su mayoría son importantes catalizadores o enzimas que juegan papeles importantes tanto en las funciones del suelo como para la evolución del individuo.

Se realizaron pruebas de compatibilidad entre cuatro PGPB en donde se midió la producción de biofilm y encontramos que entre ellas no cooperan pero algunos grupos coexisten. Probamos sus extractos libres de células en un experimento de invernadero, donde se encontró que las bacterias crecidas de forma individual activaron las enzimas que aumentan la resistencia al estrés oxidativo. Por lo tanto se confirma que las interacciones juegan un papel fundamental en la liberación de enzimas bacterianas.

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES.....	7
2.Hipótesis.....	15
3.Justificación.....	16
4.Objetivo general.....	16
5.Objetivos específicos.....	16
6.MÉTODOS.....	17
6.1Producción de Biofilm.....	17
6.2 Experimento de plantas de maíz inoculadas con Extracto Libre de células en invernadero.....	18
6.3 Utilización de diferentes fuentes de fósforo (en placa) por bacterias promotoras de crecimiento crecidas en comunidad y en forma aislada.....	21
6.4 Estadística.....	23
7. RESULTADOS.....	24
7.1 Invernadero.....	24
7.2 Enzimas.....	25
7.3 Producción Biofilm.....	25
7.4 Fuentes de fósforo.....	26
8. DISCUSIÓN.....	29
9.CONCLUSIONES.....	33
10. Apéndice.....	35
11. Referencias.....	37

1.INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES

El maíz es una fuente principal de alimento para millones de personas, por lo que este es un cultivo básico muy importante tanto para México como para América Latina (Ortega, 2014).Una problemática actual es satisfacer la demanda de alimentos que exige una población con un crecimiento exponencial. Según estimaciones de la ONU la población mundial para el 2050 será de 9,7 mil millones de personas (ONU,2022). Aunado a esto el aumento demográfico va acompañado de mayor actividad antropogénica, como la urbanización, deforestación, pérdida de tierras fértiles y avance de la frontera agrícola.Todos estos factores son preocupantes ya que la principal causa de la pérdida de biodiversidad en todos los ecosistemas es el cambio de uso de suelo (Koza, et al, 2022).

El maíz es altamente susceptible a cambios en la temperatura, se ha documentado que el aumento de 1°C en la temperatura, reduce la producción en un 1.7% (Wu, et al, 2021). Además los impactos de la sequía afectan tanto su ciclo de cosecha, como la viabilidad del polen (Hatfield, et al, 2011), la disminución en la producción por la alteración del tiempo entre la apertura de las flores y la floración (Maazou, et al,2016)aunado a esto se deteriora la calidad del producto final. Por lo que resalta la importancia de atender su situación frente a escenarios de cambio climático (Wu, et al, 2021).

El uso desmedido de agroquímicos (pesticidas y fertilizantes químicos) han contaminado las aguas superficiales, subterráneas, acuíferos y ha provocado la eutrofización de ríos, lagos y mares, desequilibrando el ciclo global del nitrógeno y del fósforo, elementos esenciales para la vida (Laurin, et al; 2006). Al igual que esto, los daños ocasionados al suelo son graves, como la pérdida de su fertilidad por la disminución de la complejidad de las redes alimentarias y la disminución de la masa de los microorganismos del suelo (Tsiafouli, et al 2015).

Una disminución de la biodiversidad del suelo se ve reflejada en una pérdida de sus funciones clave, como la regulación de los ciclos biogeoquímicos globales (Geisen,

et al, 2019). Los desechos agrícolas y farmacéuticos encabezan la lista de desechos más tóxicos que se liberan al medio ambiente, desencadenando graves impactos negativos tanto en el medio ambiente como en la salud humana (Saravanan, et al 2022)

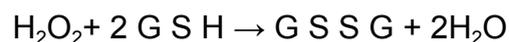
Una alternativa al uso de agroquímicos son las bacterias promotoras de crecimiento vegetal por sus siglas en inglés “PGPB” (Plant Growth Promoting Bacteria) las cuales son aquellas comunidades bacterianas del suelo capaces de colonizar diferentes órganos vegetales y estimular su crecimiento a través de diferentes mecanismos (Quispel, 1992; Albino, et al 2006; Cabrera et al 2018). Existen varios mecanismos por los cuales las bacterias promotoras de crecimiento vegetal cumplen su función dentro del ecosistema como la fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, excreción de fitohormonas: auxinas (IAA), citoquininas (Z), giberelinas (GA3) y producción de reguladores de crecimiento como ácido abscísico (ABA), óxido nítrico (NO) y poliaminas, otros beneficios que éstas ofrecen son los sideróforos, control de fitopatógenos y protección de las plantas contra el estrés ambiental (Bishnoi, 2015; Khan, et al, 2016).

Existen varios factores bióticos y abióticos que generan estrés en las plantas, el estrés se puede entender como una situación desfavorable para el óptimo desarrollo metabólico del organismo (Bouremani, et al, 2023). El estrés abiótico provocado por la sequía es la mayor limitante en el crecimiento y productividad de los sistemas agrícolas a escala global (Bouremani, et al, 2023). Varios tipos de estrés como el provocado por sequía y salinidad desencadenan la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS son átomos o moléculas que presentan uno o varios electrones no apareados en sus órbitas externas, estas moléculas sustraen un electrón de cualquier molécula vecina, descomponiendo su estructura. El término ROS es un término colectivo que incluye tanto radicales de oxígeno como ciertos no radicales que son agentes oxidantes y/o se convierten fácilmente en radicales por lo tanto hay una variedad de ROS (Halliwell, 2006).

El estrés oxidativo se define como una alteración en el equilibrio de la producción de ROS metabólico celular resultando en daños en enzimas, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos e incluso puede causar mutaciones en el ADN. Dicho daño a

menudo se denomina daño oxidativo, que se ha definido como el daño biomolecular causado por el ataque de especies reactivas, a los constituyentes de los organismos vivos (Halliwell y Whiteman, 2004). Varios tipos de estrés abiótico induce la formación de ROS en plantas y es por esto que existe toda una maquinaria compuesta de sistemas antioxidantes, de los cuales destacan enzimas como la catalasa (CAT), deshidrogenasa (NADH), superóxido dismutasa (SOD), guayacol peroxidasa (PX) y reductasa (González-Bosch, 2018).

La Guayacol peroxidasa (GPX) es una enzima oxidoreductasa que cataliza la detoxificación del H_2O_2 (Núñez, 2012), esta enzima se localiza en el citoplasma y en el apoplasto de la célula y cataliza la reacción que consiste en sustraer un átomo de H_2 de una molécula de guayacol para cederla a una molécula de peróxido de hidrógeno H_2O_2 produciendo tetraguayacol + H_2O (Halliwell, 2006)



El producto, el glutatión oxidado (GSSG), consta de dos GSH unidos por un puente disulfuro y puede volver a convertirse en GSH mediante las enzimas glutatión reductasa (Halliwell, 2006). De este mismo modo la APX (ascorbato peroxidasa) invierte la concentración de H_2O_2 dentro de la célula catalizando la reducción del H_2O_2 oxidando una molécula de ascorbato que actúa como dador de electrones en la siguiente reacción:



Estas enzimas catalizan la reacción que transforma las moléculas radicales a no radicales y así éstas puedan transitar por el organismo sin causar daños (Halliwell, 2006; Mano, et al, 2001).

La tolerancia al estrés permite a las plantas mantener un buen nivel de actividad fisiológica mediante la regulación y el ajuste de miles de genes que activan diversas rutas metabólicas para mantener sus funciones normales y minimizar el daño. Algunos ejemplos de los mecanismos que las plantas activan son, osmoprotectores, altos niveles de ABA o la inducción de mecanismos de defensa (Zia, et al, 2021).

Varios de estos mecanismos son desencadenados con ayuda de las PGPB por medio de los metabolitos secundarios, los cuales interactúan con receptores específicos de las plantas.

La respuesta al estrés es más rápida cuando la planta mantiene activos los mecanismos de defensa, invertir en su defensa mejora la calidad de los cultivos, creando variantes cada vez más resistentes al estrés. Activar el sistema de defensa inducido es una propiedad de las PGPB, en la cual se activan rutas de mecanismos contra defensa biótica y abiótica.

Los agentes que aumentan la tolerancia al estrés abiótico también se han asociado con el control del estrés oxidativo por ejemplo, el hidrosulfuro de sodio (NaHS) protege a las plantas de la salinidad y del estrés osmótico no iónico al alterar la maquinaria redox, también el tratamiento con NaHS mantiene bajas concentraciones de H_2O_2 en plantas de fresa estresadas mediante la activación de antioxidantes enzimáticos como SOD, CAT y APX. Estados redox inducen a la expresión de genes clave para la biosíntesis de ascorbato y glutatión (Christou, et al, 2013; Glazebrook et al, 2003).

Los metabolitos secundarios son moléculas extracelulares y muchos procesos relevantes ocurren extracelularmente como la solubilización y la mineralización. La mineralización es catalizada por enzimas microbianas y la solubilización ocurre como un subproducto del proceso catalizado por enzimas intracelulares (Vitousek, et al, 2010). Estos procesos son la base del reciclaje biológico del fósforo elemento esencial para la vida y de esto depende su disponibilidad en el suelo, las enzimas necesarias para la mineralización del fósforo orgánico son fosfatasas, CP liasas, fosfonatos y fitasas (Hernández-León, et al, 2022).

Las PGPB liberan al medio diferentes metabolitos útiles, los metabolitos primarios en sentido estricto son aquellos que se producen en la fase exponencial y son necesarios para la sobrevivencia del microorganismo. Mientras que los metabolitos secundarios son moléculas que se producen en la fase estacionaria y estos tienen una variedad de funciones biológicas entre las cuales destacan, armas competitivas frente otros organismos, hormonas sexuales y efectores de diferenciación (QS). Por

lo que no son imprescindibles para el microorganismo, pero juegan un papel en la supervivencia de la especie como de protección o competencia (Rosales, 2019; Karlovsky, 2008).

Uno de los limitantes al utilizar células bacterianas en campo sin un vehículo o formulación correcta es que, posteriormente a la inoculación en el suelo, hay una drástica disminución de la población bacteriana focal. Esta baja presencia combinada con bajos niveles de producción de biomasa bacteriana dificulta el mantenimiento de la actividad rizosférica. La fase o estado fisiológico del recurso bacteriano es importante a la hora de la aplicación. A menudo se destacan las características de nuevas cepas de PGPB; sin embargo, muy pocas se encuentran en el mercado, ya que la baja supervivencia bacteriana durante la vida útil del producto rara vez, es aplicado con éxito en los agroecosistemas (Pellegrini et al., 2020).

Se ha evaluado la colonización de la rizosfera y el rizoplano de las plántulas de trigo por ambos aislamientos individualmente y por co-inoculación de dos PGPR (*Pseudomonas fluorescens* FAP2 y *Bacillus licheniformis* B642). con el fin de desarrollar un consorcio eficaz. Ya que su capacidad de formar biofilm tanto in vitro como en rizosfera confiere otras bondades como la producción de exopolisacáridos, alginato, hidrofobicidad de la superficie celular y motilidad de enjambre. Este estudio resalta la importancia de la formación de biopelículas en interacciones de PGPR (rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal) en el sistema suelo-planta bajo interacciones multiespecíficas (Firoz Ahmad Ansari & Ahmad, 2019).

También se ha intentado formar un inoculante multiespecies de bacterias solubilizadoras de roca fosfórica (PRSB) compatible con micorrizas arbusculares, y se investigó la combinación de cuatro diferentes PRSB en donde se encontró que la inoculación de estas ya sea individualmente o en combinación aumentó significativamente la colonización de HM (Hongos micorrízicos arbusculares) en raíces de maíz y esto aumentó el peso seco de los brotes y la absorción de nutrientes en comparación con el control sin inoculación bacteriana o el inoculante de monocultivo. En este artículo se llega a la conclusión de que la capacidad de formar biopelículas aunque no mejoró la solubilización de roca fosfórica confirió

mejora en la resistencia a los metales pesados y una exitosa colonización de raíces lo que confiere una ventaja como promotoras del crecimiento vegetal (Magallón-Servín, et al, 2020).

El Quorum sensing (QS) es un mecanismo mediante el cual las bacterias censan su población. El mecanismo QS utiliza autoinductores que son moléculas extracelulares de señalización, las bacterias tienen la capacidad de producir, liberar y monitorear los cambios en su entorno de las concentraciones de estos para actuar al unísono como población, desencadenando cambios en la expresión génica y en su comportamiento (Papenfort, et al, 2016). Los autoinductores se acumulan en el medio y pasado un umbral de concentración actúan proteínas que se adhieren al ADN y se cree que estas interactúan con secuencias de reconocimiento específicas, los autoinductores son péptidos de estructura diversificada, el más común en bacterias gram negativas es de estructura tiolactona/lactona (Marios, et al, 2014).

La detección del quórum sensing es un tipo de señalización célula - célula denso-dependiente (Rhea G. 2018), y a menudo este comportamiento involucra bienes públicos costosos. Los bienes públicos se liberan al ambiente e involucran moléculas como enzimas relevantes para la catalización de nutrientes esenciales que se pueden encontrar ocluidos, en alguna forma no mineralizada o de difícil acceso como el fósforo, el nitrógeno y el carbono. Someter estos bienes bajo control de quórum sensing evita la explotación de estos por individuos oportunistas (Schuster, 2013).

Se ha documentado que las bacterias limitan su producción de bienes cooperativos a condiciones donde los beneficios de fabricar dichos productos superen los costos de producción (Bruger, EL et al.,2016; Pai, et al, 2012) y también se ha concluido que existen entornos en donde se desfavorecen todas las formas de cooperación (Allen, et al 2016).

La dinámica ecológica y social tiene consecuencias importantes en la configuración del comportamiento y estructura de las comunidades polimicrobianas en el suelo (Abisado RG,2018). Sin embargo, la capacidad de las bacterias inoculadas para

sobrevivir, competir con la microflora nativa y colonizar la rizosfera sigue siendo un paso crítico para una aplicación exitosa en campo (Basan, 1998; Niu, et al, 2018). Por lo tanto, la ciencia se encuentra en la necesidad de innovar y ofrecer nuevas biotecnologías en las cuales se pueda aprovechar los beneficios de los metabolitos secundarios que ofrecen las PGPB de forma eficiente. Buscando el beneficio de las plantas en cultivos de importancia económica, en donde se pretende mantener una buena productividad y promover la conservación del suelo. Una de estas alternativas es usar un extracto libre de células.

Los extractos libres de células (ELC) son una mezcla derivada de caldos de cultivo mediante varios procesos mecánicos y físicos que permiten eliminar en su totalidad las células suspendidas. Los ELC se obtienen por medio de dos principales operaciones, centrifugación y filtración (es decir, microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración, ósmosis inversa). Estas técnicas se pueden aplicar individualmente o en combinación con otras tecnologías según el producto final deseado. Se pueden aplicar varios procesos posteriores para aislar y purificar los metabolitos objetivo, también desde el interior de las células (Doran, et al, 1995; Pellegrini et al., 2020).

Para generar un protocolo de obtención de un óptimo extracto libre de células adecuado para las plantas de maíz criollo, este debe desencadenar el sistema de defensa vascular de la planta, para mantener a las plantas en un estado de alerta y obtener una respuesta más rápida, así como disminuir el daño causado por estrés.

Para comprobar si la planta de maíz tiene activos estos mecanismos de defensa planteamos un experimento en donde en un tratamiento se inoculó a la raíz con extracto libre de células de bacterias promotoras de crecimiento (PGPB) crecidas en consorcio y en otro se inoculó con extracto libre de células de bacterias crecidas individualmente para analizar el nivel de dos enzimas (APX y GPX) las cuales ayudan a mantener bajos los niveles de H_2O_2 y aumentan la capacidad de respuesta de la planta al estrés oxidativo.

ANTECEDENTES

En nuestro grupo de trabajo se han puesto a prueba cuatro bacterias que fueron aisladas del suelo de un bosque pino-encino (Avandaro EdoMex) he identificadas como: *Pseudomona fluorescens* (PF), *Pseudomona poae* (PP), *Rahnella sp* (RH) y *Serratia sp.* (SR), Por lo que *P. fluorescens* cuenta con la capacidad de inhibir el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos como *Botrytis cinerea* un 7.1% y *F. oxysporum* un 5.9% en observaciones del coeficiente de inhibición el cual incorporó los parámetros de tasa radial de crecimiento antes de la interacción, tasa de extensión radial después de la interacción y capacidad de inhibición en cultivo mixto, además de que si produce compuestos indol como el ácido 3-indolacético y el ácido indol pirúvico (Hernández-León et al., 2022). Existen otros experimentos en donde se aislaron las cepas *P. fluorescens* DR7 y *P. fluorescens* D11 de *Setaria italica* L., un cultivo tolerante a la sequía en el noreste de China donde la alta tasa de producción de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa de estas bacterias, tiene potencial para futuras aplicaciones biotecnológicas (Niu, et al, 2018).

Rahnella aquatilis tiene la capacidad de producir sideróforos que pueden tener importantes implicaciones antimicrobianas in vitro, lo que ayuda a la microflora de las plantas (Calvo, et al., 2007). Además previamente se ha reportado que *Rahnella sp* tiene la capacidad de inhibir el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos como *B. cinerea* en un 12.1% y *F. oxysporum* 6.1% en observaciones del coeficiente de inhibición, además de que capaz de producir compuestos (como el ácido 3-indolacético y el ácido indol pirúvico) que están involucrados en la biosíntesis de auxinas, compuestos que pueden modular el desarrollo de las raíces aumentando el peso total fresco y seco de las plántulas de maíz.(Ryu, et al, 2003). Al igual en *Rahnella sp* destacan reportes de rasgos positivos como la producción de 1-aminociclopropano-1-carboxilato-desaminasa, amoniacó y la solubilización de fosfato orgánico e inorgánico como rasgos que promueven el crecimiento vegetal (Hernández-León et al., 2022; Vyas, et al, 2010; Magallon-Servin, et al, 2020).

De la misma forma hay reportes de que *Pseudomonas poae* tiene la capacidad de inhibir el crecimiento micelial de los hongos *Botrytis cinerea* en un 8.9% y *Fusarium*

oxysporum se 14.9% en observaciones del coeficiente de inhibición, en condiciones de laboratorio, además en este mismo artículo concluyen que *Pseudomonas poae* es un prometedor recurso bacteriano tanto para el control de fitopatógenos en la agricultura como para promover significativamente la germinación y la elongación de la raíz primaria en maíz criollo (Hernández-León, et al, 2022). De la misma forma la cepa *Pseudomonas poae* JSU-Y1 se reportó como recurso bacteriano prometedor para controlar la contaminación por patulina y el crecimiento de hongos toxigénicos en productos agrícolas, la patulina es una de las micotoxinas producida principalmente por la especie *Penicillium Aspergillus* y *Byssochlamys* (Ren, et al, 2021). Otro reporte nos dice que *P. poae* FL10F produce un lipopéptido cíclico perteneciente a la subfamilia de la viscosina que posee actividad antagónica contra *Erwinia amylovora* (Dagher, et al 2021).

Serratia sp. tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de los hongos *Botrytis cinerea* en un 8.2%, *Fusarium oxysporums* 5.5%, en el índice del coeficiente de inhibición, de la misma forma *Serratia sp.* aumentó el peso seco y fresco de las plántulas de maíz criollo (Hernández-León, et al, 2022). También produce compuestos indol relacionados con la síntesis de auxinas benéficas para el sistema radicular aumentando su densidad y arquitectura, lo que resulta en beneficios relacionados con el intercambio de nutrientes (Agarwal, et al, 2019; Probanza, et al, 1996; Ambreetha, et al., 2018). Además *Serratia sp* ha reportado diferentes mecanismos de solubilización de fósforo lo que aumenta sus características de PGPB (Dastager, et al, 2011).

2.Hipótesis

Los extractos libres de células de bacterias crecidas en comunidad tienen un menor efecto sobre las especies vegetales que las que fueron crecidas de forma individual, ya que las bacterias compiten por recursos cuando crecen en comunidad y pueden inhibirse entre ellas.

3. Justificación

La sobre población aumenta la demanda de alimentos lo que aumenta el uso excesivo de pesticidas y fertilizantes que contaminan suelo, agua y aire, causando grandes problemas de salud humana, por lo que proponer una alternativa para aminorar el uso de estos agroquímicos es de suma relevancia. El uso de PGPBs es una alternativa ya que puede reemplazar los agroquímicos sin afectar la producción de los cultivos. Aunado a esto los extractos libres de células permiten estandarizar el efecto que tendrá en las plantas y es aquí donde las combinaciones de las bacterias PGPBs son relevantes. Todo esto es el camino para alcanzar el óptimo desarrollo de un producto para uso agrícola. El uso del extracto libre de células es clave ya que las condiciones bióticas y abióticas influyen en el éxito de la colonización en raíces de PGPBs en el suelo ,por lo que usar solo sus metabolitos secundarios es suficiente para promover el crecimiento vegetal y resistencia de especies vegetales de relevancia económica. Sin embargo, la competencia y la cooperación son interacciones comunes entre especies. Conocer las interacciones de la comunidad bacteriana como la cooperación y la competencia ayudará a comprender sí el extracto libre de células es más eficiente cuando las bacterias crecen en comunidad que cuando crecen de manera independiente.

4. Objetivo general

Identificar las interacciones positivas y las interacciones negativas entre cuatro bacterias promotoras de crecimiento vegetal con el fin último de obtener una óptima alternativa al uso de fertilizantes químicos.

5. Objetivos específicos

- 1) Identificar si hay una diferencia entre las plantas que fueron inoculadas con metabolitos secundarios de bacterias crecidas en consorcio e individualmente.
- 2) Identificar qué grupos tienen la capacidad de producir mayor cantidad de biofilm.
- 3) Identificar si las cuatro bacterias de interés crecen en 5 diferentes fuentes de fósforo y si al crecer en pares inhiben o favorecen el crecimiento entre ellas.

6.MÉTODOS

6.1 Producción de Biofilm

Se realizó el medio de cultivo con 2 gr de caldo nutritivo en un frasco de cristal de 500 ml se aforó a 250 ml y se esterilizó en autoclave a 1.3 kg/cm² por 20 min, posteriormente se vertieron 5 ml en tubos falcón de 15 ml y se tomó la muestra de una caja petri con los aislados previamente preparados con una asa bacteriológica para dejarla en cada tubo. Se prepararon 11 tubos con los respectivos tratamientos (Tabla 1.) Se dejaron crecer las bacterias a 30°C por 24 horas.

Después con el cultivo crecido se tomó una muestra de 90µ y se midió a 570 nm para calcular la densidad celular que alcanzó. Posteriormente se hace una dilución +/- 1:100 con agua estéril en cada tubo para estandarizar la proporción celular en la que se comienza. De esta dilución se tomaron 0.5 ml y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml, se realizaron tres réplicas de cada tratamiento por tres tiempos de interés, estas se mantuvieron a 30°C sin agitar hasta llegado el tiempo de interés.

Pasado el tiempo de interés se procedió a teñir las células con 1µ de cristal violeta (El cristal violeta es un tinte básico, que se une a moléculas con carga negativa en su superficie y a los polisacáridos en la matriz extracelular, por lo tanto, la absorbancia obtenida se estima proporcional a la biomasa del biofilm formado), y se mantiene así por 15 min a temperatura ambiente, después se decantan los tubos y se lavan con agua estéril agitando vigorosamente para eliminar las células no unidas al tubo, posterior se realizó un segundo lavado utilizando etanol al 95 % para

solubilizar las células que han quedado unidas al tubo y que por lo tanto han tenido la capacidad de formar biofilm, por último las células que han solubilizado con ayuda del etanol serán leídas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm.

Diseño experimental

Clave	Diferentes combinaciones de las PGB
4X	4x (<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas poae</i> , <i>Rahnella sp</i> , <i>Serratia sp</i>)
PF	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
PP	<i>Pseudomonas poae</i>
RH	<i>Rahnella sp</i>
SR	<i>Serratia sp</i>
PF-SR	<i>Pseudomona fluorescens-Serratia sp</i>
PF-RH	<i>Pseudomonas fluorescens-Rahnella sp</i>
PP-SR	<i>Pseudomona poae-Serratia sp</i>
PP-RH	<i>Pseudomona poae -Rahnella sp</i>
PF-PP	<i>Pseudomona fluorescens-Pseudomonas poae.</i>
RH-SR	<i>Rahnella sp-Serratia sp</i>

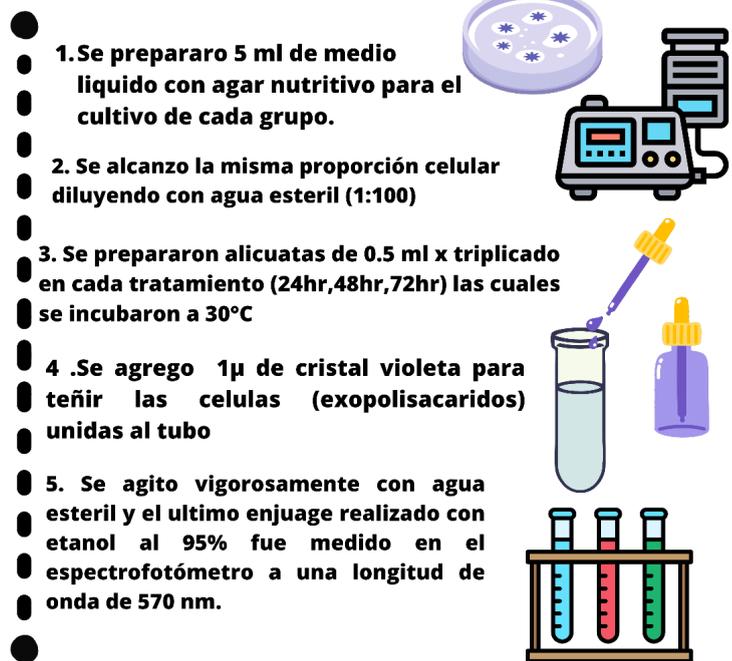


Figura 1. Diagrama del diseño experimental resumido e ilustrado.

6.2 Experimento de plantas de maíz inoculadas con Extracto Libre de células en invernadero

Para determinar el efecto de los tratamientos del ELC de las bacterias (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas poae*, *Rahnella sp* y *Serratia sp.*) crecidas en consorcio o de forma individual, se desarrolló un experimento de invernadero con bloques al azar de semillas de maíz criollo de cultivos en tierra caliente Michoacán inoculadas con los diferentes tratamientos.

Esterilización e Inoculación de semillas.

Las semillas de maíz criollo 20 por tratamiento por tres tratamientos fueron esterilizadas en frascos de vidrio con hipoclorito de sodio al 5% durante 5 minutos, posteriormente se lavaron con agua desionizada estéril cuatro veces, después fueron sumergidas en el ELC correspondiente por 30 min y más tarde se colocaron

sobre papel en un ambiente estéril por una hora para que secan y posteriormente sembradas en maceta.

Preparación del ELC de los diferentes tratamientos

Para producir el ELC de las bacterias crecidas en comunidad estas se inocularon con un asa bacteriológica en 25 ml de caldo nutritivo MCD-LAB en un tubo falcón de 45 ml a 28°C por 72 horas. Posteriormente el cultivo se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos y del sobrenadante se tomaron 20 ml los cuales se filtraron utilizando un Thermo Scientific Nalgene Syringe Filter 0.2 µm.

Para producir el ELC de las bacterias crecidas de forma aislada se preparó un inóculo con cada bacteria en 25 ml de caldo nutritivo MCD-LAB a 28 °C por 72 h. Posteriormente los cultivos fueron centrifugados 5000 rpm por 10 min y del sobrenadante se tomaron 5 ml por cultivo, los cuales se filtraron utilizando un Thermo Scientific Nalgene Syringe Filter 0.2µ para finalmente generar un tubo con 20 ml.

Invernadero

Se prepararon 60 macetas de 2L con un sustrato estéril con las siguientes proporciones: Peat moss 50%: perlita 25% y vermiculita 25%,posteriormente el sustrato fue humedecido antes de colocar la semilla y posteriormente. Se acomodaron 20 macetas por bloque, se realizaron 3 tratamientos.

Tratamiento 1: inoculación con ELC de bacterias crecidas en comunidad.

Tratamiento 2: inoculación con ELC de bacterias crecidas de forma individual.

Tratamiento 3: bloque control inoculadas solo con caldo nutritivo.

Posteriormente se realizaron dos inoculaciones más las cuales consistieron en adicionar 1ml de tratamiento en la base del tallo de cada individuo.La segunda fue después de la inoculación que se realizó desde semilla y se ilustra en el siguiente diagrama (Figura.2). Al término del experimento y con el objetivo de cuantificar el

efecto de los tratamientos sobre la planta se midió la altura de las plantas, la concentración de clorofila y el peso seco de raíz y biomasa aérea para lo cual se tomó el peso fresco del tejido y posteriormente se deshidrató en una estufa por 48 hr a 65°C de acuerdo al protocolo modificado de Paz, L & De, M. 2022. Además, se tomaron muestras de raíz para determinación de enzimas antioxidantes.

Diseño experimental



Figura 2: Diagrama del experimento de invernadero paso a paso, especificando los días transcurridos entre A y B.

Analisis de Enzimas

Para el análisis de enzimas se pesaron 0.25gr de raíz limpia, se trituraron en un mortero con nitrógeno líquido, posteriormente el tejido molido se pasó a un tubo de 1.5ml y se agregó 1ml de buffer de extracción, se agitaron con vortex y se filtraron con una malla de acero con apertura de 250 micrones, se recolectó el volumen homogenizado y se centrifugó a 1100 rpm por diez minutos a 4°C, con el sobrenadante se prepararon las alícuotas correspondientes. Para analizar la enzima Guayacol Peroxidasa se depositaron 25µ de homogenizado y se agregaron 975µ de buffer de reacción la mezcla se puso en una celda y se midió en el fotómetro a 470

nm cada 30 segundos durante 3 minutos a partir del tiempo 0. Para la enzima Ascorbato Peroxidasa se realizaron alícuotas de 50 μ de volumen homogenizado y se agregaron 550 μ l de buffer de reacción, se vació la reacción en una celda, y se midió en el fotómetro a 290 nanómetros cada minuto durante tres minutos a partir del tiempo 0.

6.3 Utilización de diferentes fuentes de fósforo (en placa) por bacterias promotoras de crecimiento crecidas en comunidad y en forma aislada.

Para determinar las capacidades de las cuatro bacterias: *P. fluorescens*, *P. poae*, *Rahnella sp* y *Serratia sp*, fueron inoculadas en medio mínimo definido (DM) sin fósforo por 72 hr a 37°C (Tapia-Torres et al., 2015), con el propósito de que agotaran sus recursos de fósforo. Posteriormente fueron pasadas a los diferentes medios de cultivo en las combinaciones previamente planeadas, las cuatro cepas individualmente, seis combinaciones y un tratamiento de las 4 juntas (Tabla 1). Esto para corroborar que unas no inhiben el crecimiento de otras. Los diferentes medios de cultivo son medio DM con una fuente de fósforo diferente, las fuentes usadas fueron: Fosfato de Potasio (K_2HPO_4), Fosfato de Aluminio ($AlPO_4$), Hidroxiapatita ($Ca_5(OH)(PO_4)_3$), Ácido 2-aminoetil fosfórico (2AEP), Ácido Fítico (PA) y un control negativo sin fósforo (-P) para comparar su crecimiento.

Las bacterias sembradas en las diferentes fuentes de fósforo se dejaron 72 hr a 37°C y fueron pasadas a la misma fuente por otras 72 hr a 37°C. Este último crecimiento se tomó como la capacidad bacteriana de metabolizar los diferentes compuestos para integrar a biomasa el fósforo que requieren (metodología modificada de Tapia-Torres et al, 2015 y Hernández-León et al, 2022).

Tabla 1. Claves de las diferentes combinaciones de las PGPBs

Clave	Diferentes combinaciones de las PGPB
4X	4x (<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas poae</i> , <i>Rahnella sp</i> , <i>Serratia sp</i>)
PF	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
PP	<i>Pseudomonas poae</i>
RH	<i>Rahnella sp</i>
SR	<i>Serratia sp</i>
PF-SR	<i>Pseudomona fluorescens-Serratia sp</i>
PF-RH	<i>Pseudomonas fluorescens-Rahnella sp</i>
PP-SR	<i>Pseudomona poae-Serratia sp</i>
PP-RH	<i>Pseudomona poae -Rahnella sp</i>
PF-PP	<i>Pseudomona fluorescens-Pseudomonas poae.</i>
RH-SR	<i>Rahnella sp-Serratia sp</i>

Preparación del medio mínimo definido (DM)

Se colocaron 500 ml de agua desionizada en un vaso de precipitados de 1 L. Se adicionaron el Tris-base y se ajustó pH a 7.5 con HCl concentrado. (El pH inicial de la solución fue de 10.5). Una vez ajustado el pH se pueden adicionar los reactivos faltantes (tabla 2, apéndice 1). Seleccionar la fuente de fósforo a utilizar, disolver y adicionar según corresponda (tabla 4, apéndice 1). Aforar con agua desionizada hasta alcanzar la cantidad deseada. En caso de requerir medio sólido, añadir 14g por litro de agar noble con agente solidificante, agitar y esterilizar en autoclave.

Adicionar los 20 aminoácidos con las concentraciones correspondientes al volumen Tabla 3 (apéndice 1). Una vez que la temperatura disminuya para no desnaturalizarse, al igual que el complejo B se añade a la solución esterilizado por

filtración utilizando un Thermo Scientific Nalgene Syringe Filter 0.2 SFCA μ y dentro de una campana de flujo laminar.



Figura 3. Diagrama del diseño experimental resumido e ilustrado.

6.4 Estadística

Las diferencias significativas entre las variables fueron probadas con un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y una prueba post-hoc Tukey-Kramer HSD en el programa JMP y se utilizó Rstudio para la elaboración de gráficos.

7. RESULTADOS

7.1 Invernadero

Las variables medidas para ver el efecto de los tratamientos sobre el crecimiento de las plántulas.

Clorofila

Como resultado de los parámetros medidos en el experimento de invernadero pudimos observar que la concentración de clorofila (la cual se midió en unidades SPAD) no tuvo una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.529$) en los tres tratamientos.

Altura

En la altura de los individuos, el tratamiento de bacterias crecidas individualmente no fue estadísticamente diferente al control ($p= 0.6166$) mientras que el tratamiento de bacterias crecidas en consorcio muestran una disminución significativa con respecto al control ($p=0.0407$). En la variable del ancho del tallo, el tratamiento de bacterias crecidas en consorcio es el menor con respecto al control ($p=0.1612054$) mientras que el tratamiento de bacterias crecidas individualmente es igual al control ($p=0.8905665$). (Figura 3. A, B, C)

Peso seco y fresco

En el peso fresco de raíz, se observó que el tratamiento de bacterias crecidas de forma individual es igual al control ($p= 0.7649$), mientras que el tratamiento de bacterias crecidas en consorcio fue menor respecto al control (Figura 2A). El peso seco de raíz no mostró ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los tres tratamientos. Sin embargo en el peso fresco de biomasa aérea pudimos observar que el tratamiento de bacterias crecidas en consorcio es estadísticamente

diferente y menor con respecto al control y el tratamiento de bacterias crecidas individualmente solo es menor respecto al control. En los datos del peso seco de la biomasa aérea la ANOVA arrojó que no existe diferencia significativa entre los tratamientos ($f= 0.0403$) sin embargo se observó en la prueba TUKEY que el tratamiento consorcio es significativamente menor al control mientras que el tratamiento de bacterias crecidas de forma individual solo es menor respecto al control (individual-control $p=0.2905$, consorcio-control $p=0.0400$).

7.2 Enzimas

En la actividad enzimática de la raíz, la enzima ascorbato peroxidasa no mostró diferencias significativas entre los tres tratamientos. Mientras que respecto a la enzima de guayacol peroxidasa los tratamientos de bacterias crecidas en consorcio y el control no mostraron diferencias significativas ($p=0.6909$) y nuestro tratamiento de interés que fue bacterias crecidas de forma individual mostró ser diferente, positivamente ($p=0.000$).

7.3 Producción Biofilm

En cuanto a la capacidad de las bacterias de producir biofilm, podemos observar que *Pseudomona fluorescens* y *Serratia sp* de manera individual son las que producen mayor cantidad mientras que *Rahnella sp* y *Pseudomona poae* producen menos. Una vez que se llevaron a cabo las combinaciones pudimos observar que la combinación *P. poae-P. fluorescens* produce menos biofilm que PF de manera individual, sin embargo la combinación produce más que PP estando sola. La combinación *Pseudomona fluorescens- Rahnella sp* disminuye drásticamente la producción de biofilm de las dos bacterias, ya que de manera individual las dos bacterias producen una mayor cantidad de biofilm. En la combinación *Pseudomona poae-Rahnella* disminuye la producción de biofilm de *Rahnella* ya que sola tiene la capacidad de formar más biofilm mientras que la de PP se mantiene igual. La combinación de *Rahnella sp-Serratia* disminuye la producción de biofilm de *Serratia*

mientras que la producción de RH se mantiene sin diferencia significativa. En cuanto a la combinación PP-SR esta disminuye la producción de biofilm de SR pero es mayor que la cantidad de biofilm producida por PP de manera individual. La combinación de PF-SR mantiene los niveles de producción de biofilm de las dos cepas individuales por lo que podemos suponer que estas dos cepas no compiten entre ellas

7.4 Fuentes de fósforo

Las cuatro bacterias fueron capaces de crecer en las cinco diferentes fuentes de fósforo estando solas (crecidas en una caja) a excepción de *Pseudomona poae*, la cual no creció en la fuente de 2AEP. En el tratamiento 4x, en el cual se crecieron las cuatro bacterias juntas en cada caja en las cinco diferentes fuentes de fósforo, en fosfato de aluminio y en ácido fítico todas crecieron. Mientras que en la fuente de calcio *Rahnella* no creció. En la combinación 4 (Tabla 2) (*Rahnella* sp y *P. fluorescens*) *Rahnella* sp no creció en la fuente de fosfato de calcio. En la combinación 6 (*Rahnella* sp y *Serratia* sp), en esta caja de interacciones *Rahnella* sp no creció en 2AEP.

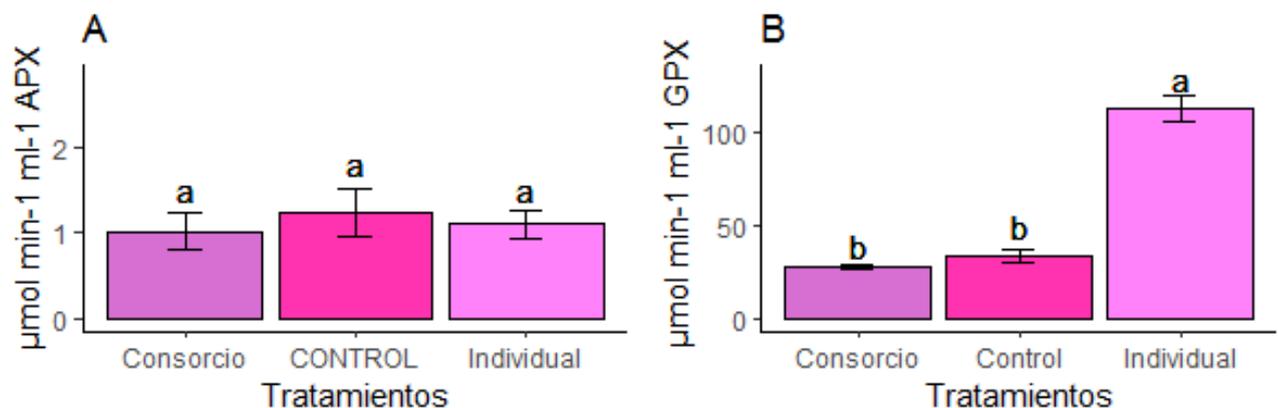


Figura 1: Producción de enzimas en raíz; A: Ascorbato Peroxidasa, B:Guayacol peroxidasa.

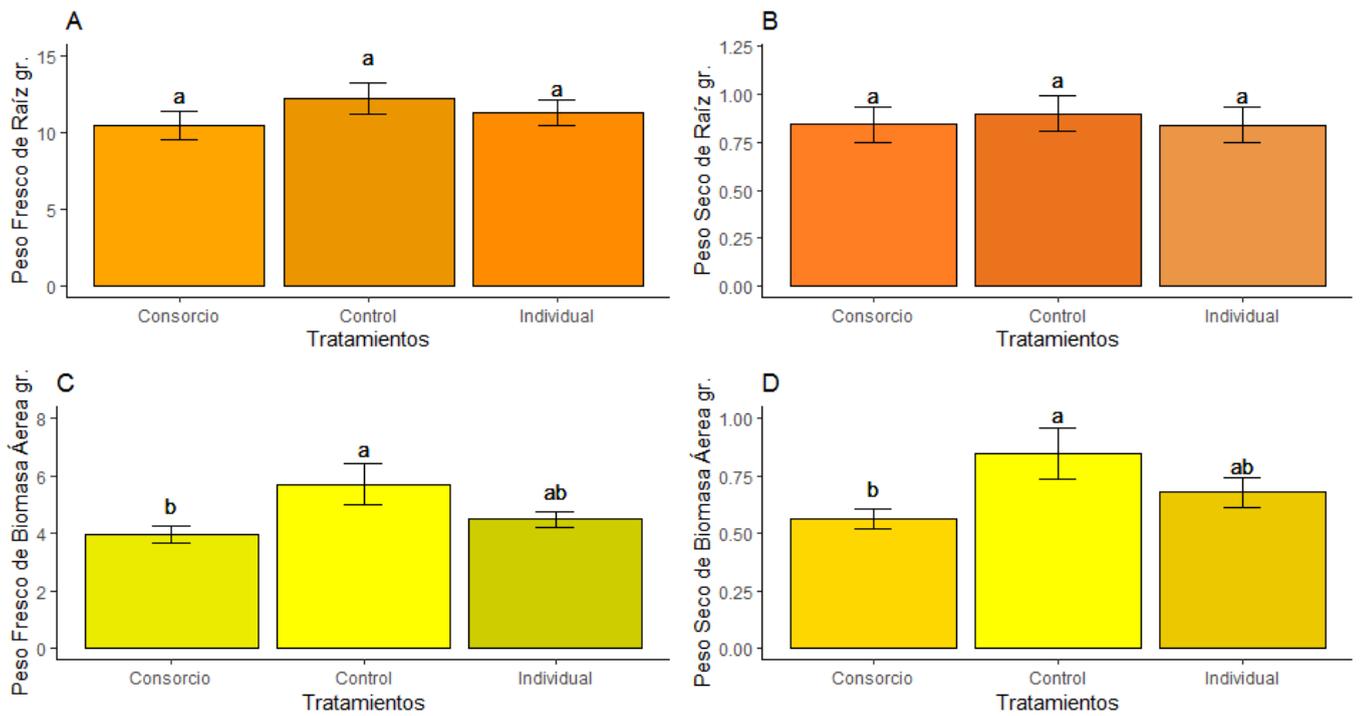


Figura 2: A peso fresco de raíz por tratamientos B: peso seco de raíz por tratamiento, C: peso fresco de biomasa aérea, D: peso seco de biomasa aérea.

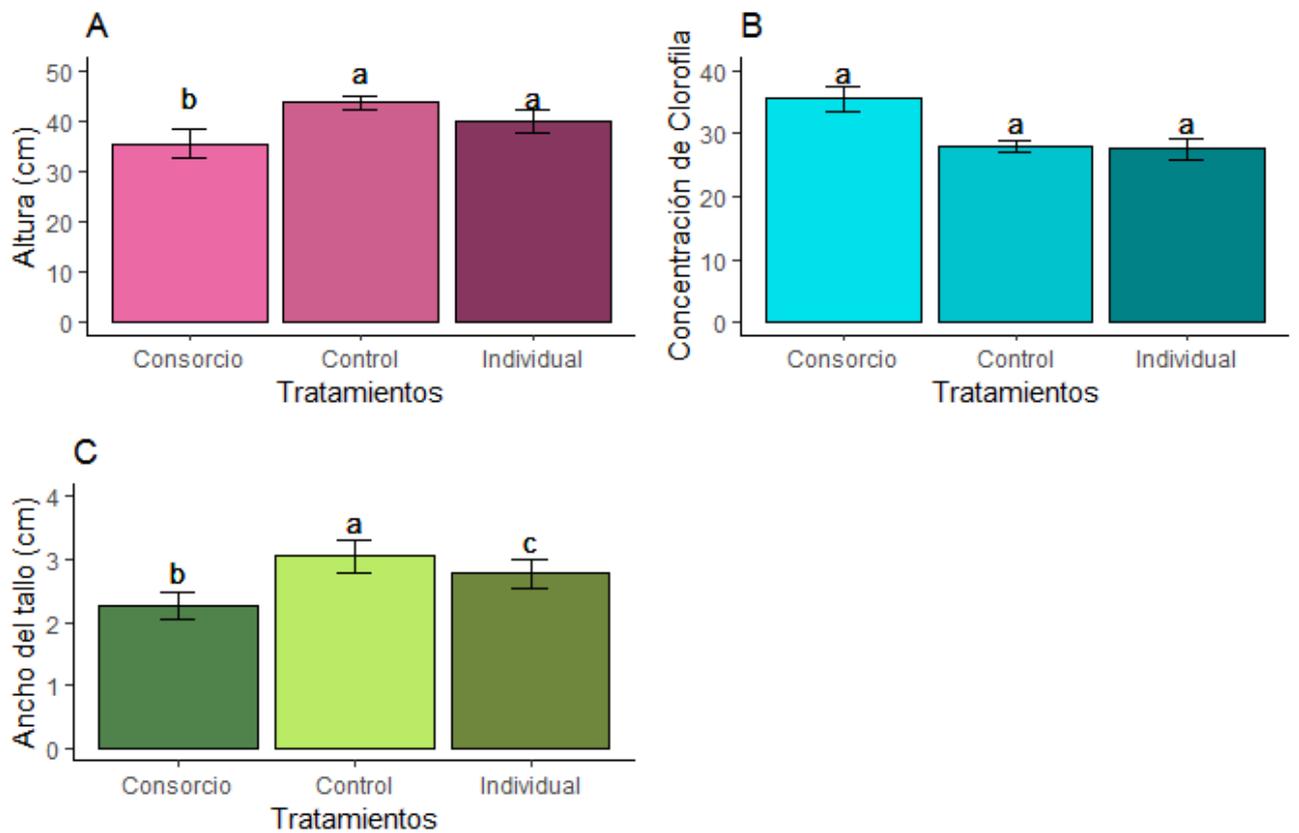


Figura 3 : Datos de invernadero, A: altura en centímetros por tratamiento,B: concentración de clorofila la cual se cuantificó utilizando un medidor de clorofila CCM-200 (Opti-Sciences, Inc., Hudson, NH, EE. UU.), que mide las concentraciones de clorofila en función de las tasas de radiación transmitida (940 y 660 nm) a través de una hoja. C: ancho del tallo medido con un vernier en cm de todos los individuos por tratamiento.

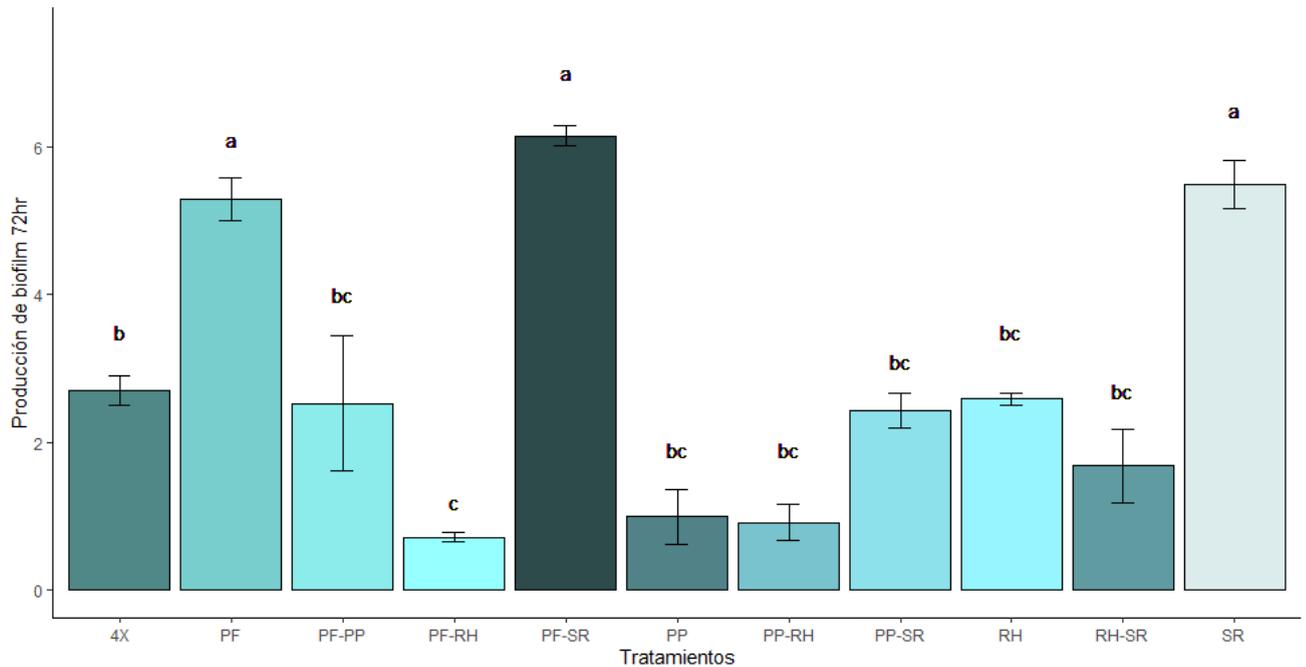


Figura 4: Producción de biofilm a las 72 horas de cada grupo, medio por densidad óptica (590nm), Experimento de producción de biofilm. Letras diferentes muestran diferencias significativas por la prueba de Tukey (P < 0.05)

TRAT	K	AL	AC.FITICO	Ca	2AEP
Tratamientos de cada una crecida en una caja sola.					
PF	***	***	***	***	***
PP	*	*	***	***	/
RH	**	**	**	*	**
SR	***	***	***	*	**
Tratamiento 4x , una caja con todas juntas					
PF	***	***	***	***	***
PP	/	*	***	***	/
RH	*	*	**	/	***
SR	***	***	***	**	***

Tratamiento combinación 1					
PF	***	***	**	***	**
PP	*	*	**	***	*
Tratamiento combinación 2					
PF	***	***	***	***	**
SR	***	**	***	***	**
Tratamiento combinación 3					
PP	*	*	**	***	/
RH	*	**	**	/	/
Tratamiento combinación 4					
PF	***	***	***	***	***
RH	*	*	**	/	**
Tratamiento combinación 5					
PP	**	*	**	***	/
SR	***	***	**	***	**
Tratamiento combinación 6					
RH	**	**	**	*	/
SR	***	***	***	***	***

Tabla 2: Las 5 fuentes de fósforo utilizadas y todos los tratamientos reportando su crecimiento, en una escala de tres asteriscos , uno poco crecimiento, dos crecimiento medio y tres mucho crecimiento. Los / son no creció

8. DISCUSIÓN

En este trabajo se buscó obtener una óptima alternativa para reemplazar el uso desmedido de agroquímicos en el cultivo de maíz ya que estos causan daños irreversibles al medio ambiente y a la salud humana, esto por medio de una nueva biotecnología compuesta por el extracto libre de células de PGPB.

Las plantas se adaptan a las condiciones mediante mecanismos fisiológicos y moleculares para mantener el equilibrio homeostático, lo que provoca que eventualmente generen una tolerancia al estrés abiótico. Según Singhal y colaboradores (2016) los genes que responden a esta presión ambiental varían entre especies y genotipos pero se pueden dividir en cuatro categorías 1) Genes que codifican enzimas implicadas en la síntesis de osmolitos, 2) Genes que

codifican antioxidantes (ROS), 3) Genes que codifican proteínas de choque térmico implicadas en el mantenimiento de la integridad celular y 4) Genes que codifican proteínas quinasas y factores de transcripción (Ojuederie, et al, 2019; Singhal, et al 2016)

Las plantas controlan su nivel de estrés a través de mecanismos redox para mantener una adecuada homeostasis celular mediante mecanismos enzimáticos y no enzimáticos, los primeros incluyen enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la ascorbato peroxidasa (APX), la glutatión reductasa (GR), la glutatión peroxidasa (GPX), la monodeshidroascorbato reductasa (MDAR) y la deshidroascorbato reductasa (DHAR), las moléculas antioxidante incluyen el tior glutatión no proteico (GSH) y el ácido ascórbico , el compuesto antioxidante más abundante en las células vegetales (Foyer, et al, 2011). El peróxido de hidrógeno es un claro indicador de estrés abiótico y se ha observado que es más elevado el nivel de H₂O₂ en estrés por sequía que por salinidad. (Ojuederie, et al, 2019)

Encontramos que la enzima guayacol peroxidasa mostró más actividad en el tratamiento de bacterias crecidas de forma individual lo que nos indica que las interacciones tienen una influencia en el proceso de liberar metabolitos secundarios al medio. La ruta de defensa contra ROS de la enzima Guayacol Peroxidasa se localiza en el citoplasma y en el apoplasto de la célula vegetal. (Halliwell, 2006) . El ciclo ascorbato-glutatión (AsA-GSH) es un agente importante en el mantenimiento del nivel de concentración de H₂O₂ para mantener la homeostasis intracelular, esto al reducir los enlaces disulfuro y desintoxicar los xenobióticos con su forma oxidada, disulfuro de glutatión (GSSG). La glutatión reductasa (GR) permite mantener una proporción alta de GSH a GSSG (Apel, et al, 2004). Estudios han encontrado que la interacción entre los niveles intracelulares de H₂O₂ y glutatión (GSH) determina las respuestas de defensa (González , 2018).

Por lo tanto, encontramos que la mejor forma para cultivar bacterias y usar sus extractos libres de células es de forma individual a menos que entre éstas exista una sinergia importante. Hay estudios que informan una asociación sinérgica entre *Candida albicans* y *Streptococos* y concluyen que es importante la presencia física de las células interactuantes para mantener la sinergia ya que no se mantiene al

utilizar solo los extractos libres de células de las bacterias crecidas individualmente (Ren, et al; 2015).

El término “tolerancia sistémica inducida” se acuñó para nombrar los cambios físicos y químicos inducidos por microorganismos en la vegetación resultando en una mayor tolerancia al estrés (Vurukonda, et al, 2016; Karimi,et al. 2022) . Al desarrollar resistencia inducida las plantas son capaces de activar sus mecanismos de defensa frente a futuros ataques de patógenos, así como de responder de forma rápida y eficiente (Conrath, et al. 2002).

En el tratamiento de extracto libre de células bacterianas crecidas en consorcio tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento de las plantas observado en una menor altura, ancho del tallo y peso fresco de raíz, mientras que en la biomasa aérea ambos tratamientos fueron menores al control, pero se puede observar que el tratamiento donde las bacterias fueron crecidas en consorcio es aún menor que el tratamiento donde las bacterias fueron crecidas de forma individual, esto lo atribuimos al efecto de compensación (trade-off) entre el crecimiento y la defensa ya que podría ser un problema sobre inversión de recursos (Guirnalda, 2014), sobre todo en una etapa temprana de desarrollo como lo fue en este experimento, no sabemos si este resultado se compensa al final de la etapa de crecimiento como un leve retraso o conlleve consecuencias en la etapa adulta.

Una de las problemáticas más fuertes derivadas del cambio climático es el aumento en la incidencia de sequías, lo que trae consigo una fuerte presión sobre la biota del suelo y las plantas. El estrés osmótico y oxidativo es causado por salinidad y sequías intensas, ya que limita la movilidad de nutrientes en el suelo y el acceso a estos por las raíces de las plantas, además de que existe el obstáculo mecánico para la penetración de las raíces en suelos duros con deficiencia de agua. (Zia,et al, 2021)

Las plantas sésiles son menos resilientes a estos tipos de estrés, por lo que es preocupante los rendimientos agrícolas mundiales en un futuro y promover la resistencia a la sequía por cualquier estrategia es apremiante. Se sabe que la membrana plasmática junto con el apoplasto es el principal sitio que responde a

señales endógenas y estímulos ambientales exógenos (Zia, et al, 2021). Por lo que incluir el desarrollo de resistencia inducida por bacterias promotoras de crecimiento vegetal y sus posibles aplicaciones es una buena alternativa en cuestión de enfrentar el cambio climático.

Al explorar la dinámica entre las 4 cepas focales encontramos que *Pseudomona fluorescens* y *Serratia sp.* coexisten ya que de las demás combinaciones analizadas son las que no disminuyeron abruptamente su producción de biofilm en la interacción. *Pseudomona fluorescens* y *Rahnella sp* compiten entre ellas ya que la producción de biofilm disminuyó drásticamente en la interacción. Parece ser que *Pseudomona poae* y *Pseudomona fluorescens* si coexisten (no compiten ni cooperan) pero su interacción no forma una sinergia ya que *Pseudomona fluorescens* es capaz de producir más biofilm estando sola. Por otra parte, *Pseudomona poae* disminuye la producción de biofilm de *Rahnella* ya que sola tiene la capacidad de formar más biofilm. *Rahnella* y *Serratia* compiten entre ellas ya que *Serratia* tienen mayor producción creciendo sola.

Parece ser que solo una combinación de las siete analizadas coexisten armoniosamente, contrario a la teoría de la dependencia comunitaria en donde las especies que se desarrollan dentro de un biofilm o biopelícula son impulsadas a una simplicidad de metabolismos mejorando la aptitud individual, lo que favorece la cooperación en sistemas complejos en donde se mantiene la coexistencia (Ren, et al, 2015; Morris et al, 2012).

Se ha observado que las bacterias que están dentro de la matriz de exopolisacáridos aumentan su producción de biomasa, además existen especies que no forman biofilm de forma aislada, pero promueven la formación de este en un biofilm multiespecies, confiriendo así el biofilm un hábitat bacteriano favorable e incluso protector ante compuestos inhibidores hacia especies más sensibles. (Ren et al., 2015; Lee et al., 2014)

“El requerimiento de recursos está inversamente correlacionado con la aptitud y, por lo tanto, es una medida de la capacidad competitiva”(Bonachela et al., 2017). En los

experimentos de placas *Rahnella* creció de forma individual en la fuente de calcio $[Ca_5(OH)(PO_4)_3]$ pero no así en la fuente de calcio en las cajas compartidas con *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas Poae*. Tampoco creció en la caja con *Serratia sp* en la fuente de 2AEP, lo que nos dice que no es buena absorbiendo esas fuentes de fósforo y por lo tanto *Rahnella* no es buena compitiendo. Por otro lado, se sabe que el potencial de coadaptación a largo plazo y el grado de superposición de nichos son importantes rasgos que definen si las bacterias compiten o cooperan (Ren, et al, 2015).

Considerando todo lo anterior podemos decir que utilizar el extracto libre de células es una buena alternativa para contar con algunos beneficios de las PGPB sin inocular las células físicas. Depende de las condiciones y necesidades de cada cultivo al que se pretende atender se debe tomar la decisión de las bacterias que requiere y en qué forma aplicarse.

9.CONCLUSIONES

La combinación de *Pseudomonas fluorescens* y *Serratia sp*. fue la más compatible y es la que proponemos aplicar en campo ya que *Serratia sp* tiene capacidades promotoras de crecimiento por producción de compuestos indol y auxinas benéficas para el crecimiento y *Pseudomonas fluorescens* produce compuestos importantes contra los fitopatógenos.

Al evaluar los diferentes tipos de interacciones para obtener el extracto libre de células óptimo, concluimos que cultivarlas de forma individual y mezclar extractos libres a posteriori resulta mejor ya que aumentó la actividad de GPX. Estas cuatro bacterias seleccionadas por sus importantes atributos como PGPB fueron aisladas de diferentes puntos por lo que entre ellas no existe coadaptación o biopelículas multiespecie favorables y por lo tanto se sugiere solo usar su extracto libre de células en campo para no tener reacciones contraproducentes.

Este trabajo es relevante ya que estas cuatro cepas no habían sido reportadas previamente en su uso como importantes recursos para la obtención de extractos libres de células. Sería interesante analizar los metabolitos secundarios que contienen los extractos libres de células responsables de la inducción del sistema de defensa y conocer el tiempo de vida útil de sus componentes activos para poder utilizarlos en campo exitosamente.

De la misma forma sería muy interesante probar las combinaciones propuestas en invernadero así como ponerlas a prueba con diferentes agentes de estrés y comparar resultados, además probar si la inducción del sistema de defensa es posible en otras especies vegetales similares.

10. Apéndice

Apéndice 1. Reactivos para la preparación del medio DM.

Tabla 2. Reactivos utilizados para elaborar el Medio Mínimo Definido.

Reactivo	Concentración	g/L	g/2L
Tris base	50mM	6.057g	13.114g
Ajustar PH a 7.5 con HCL concentrado			
NH ₄ NO ₃	3.3 mM	0.26g	0.52g
MgSO ₄	40 mM	0.48 g	0.96 g
ZnCL ₂	0.01 mM	0.000136g ó (10µ sol 1 M)	0.000272g ó (20µ sol 1 M)
NaCL	0.17 mM	5 g	10 g
FeCL ₃	49.9 mM	0.27 g	0.54 g
KCL	0.67 mM	0.1 g	0.2 g
MnCL ₂		0.2 g	0.4 g
CaCL		0.4 g	0.8 g
Glucosa(Dextrosa)		9 g	18 g
ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE			
Mezcla de 20 aa			
Complejo B		100µ	200 µ

Preparación de los 20 aminoácidos esenciales

La mayoría de los aminoácidos se disuelven fácilmente en agua al agitarlos. Sin embargo, algunos aminoácidos requieren cierto pH para disolverse (Ác. Aspártico, Ác. Glutámico, Tirosina y Triptófano).

Para aquellos aminoácidos cuyo pH debe ajustarse:

*Pesar gramos de aminoácido y añadir 15 ml de agua estéril.

*Ajustar pH con NaOH.

*Aforar con agua estéril hasta los 25 ml.

Tabla 3. Stocks de aminoácidos a 0.1 M.

Aminoácido	Cantidad (g)	Volumen (ml)	Agua estéril	pH	ml/ L DM
D- alanina	0.2227	25	Si		4.88
L-arginina	0.4355	25	Si		5.62
L-asparagina	0.3753	25	Si		2.29
L-Ác. Aspártico	0.3327	25	Si	10.6	2.29
L-cisteína-HCl	0.3029	25	Si		0.87
L-Ác. Glutámico	0.3678	25	Si	12.8	2.5
L-Glutamina	0.3653	25	Si		2.5
Glicina	0.1876	25	Si		5.82
L-Histidina	0.3878	25	Si		0.9
L-iso-leucina	0.3279	25	Si		2.76
L-Leucina	0.3279	25	Si		4.28
L-Lisina	0.3654	25	Si		3.26
L-Metionina	0.373	25	Si		1.46
L Fenilalanina	0.4129	25	Si		1.76
L-Prolina	0.2878	25	Si		2.1
L-Serina	0.2627	25	Si		2.05
L-Treonina	0.29	25	Si		2.41
L-Tirosina	0.4529	25	Si	12.9	1.31
L-Valina	0.2928	25	Si		4.02
L-Triptófano	0.5105	25	Si	10.8	0.54

Fuentes de fósforo

Dependiendo de la fuente de fósforo se agrega estas concentraciones a la solución antes de esterilizar en la autoclave.

Tabla 4. Fuentes de fósforo utilizadas.

Reactivo	Concentración	g/L	Observaciones
K ₂ HPO ₄	0.065 mM	0.0113	Se disuelve rápido

			en 300 ml
ALPO ₄	0.065 mM	0.008	Ajustar pH a 7.5 Se disuelve lentamente. Esterilizar en autoclave de manera independiente
FeO ₄ P2H ₂ O fosfato diácido férrico	0.065 mM	0.12	Ajustar pH a 7.5 Se disuelve aproximadamente en 2hr. Esterilizar en autoclave de manera independiente
Ca ₅ (OH)(PO ₄) ₃	0.065 mM	0.0108	Se disuelve lentamente. Aproximadamente en 2 horas.
2AEP	0.065 mM	0.0072	

11. Referencias

- Christou A. , GA Manganaris , I. Papadopoulos , V. Fotopoulos (2013).El sulfuro de hidrógeno induce tolerancia sistémica a la salinidad y al estrés osmótico no iónico en plantas de fresa mediante la modificación de la biosíntesis de especies reactivas y la regulación transcripcional de múltiples vías de defensa. Exp. J. Bot., 64 (7) , págs. 1953 – 1966
- Agarwal, P., Singh, PC, Chaudhry, V., Shirke, PA, Chakrabarty, D., Farooqui, A., y Sane, VA (2019). OsASR6 inducido por PGPR mejora el crecimiento y el rendimiento de las plantas al alterar la sensibilidad a las auxinas de la raíz y la estructura del xilema en Arabidopsis thaliana transgénica. Revista de fisiología vegetal, pág, 240, 153010.

- Albino, U. et al. (2006) High diversity of diazotrophic bacteria associated with the carnivorous plant *Drosera villosa* var. *villosa* growing in oligotrophic habitats in Brazil. *Plant Soil* 287,págs 199–207.
- Allen, RC, McNally, L., Popat, R. y Brown, SP (2016). La detección de quórum protege la cooperación bacteriana de la explotación por parte de tramposos. *La revista ISME*, 10 (7),págs. 1706-1716.
- Ambreetha, S., Chinnadurai, C., Marimuthu, P. y Balachandar, D. (2018). El bacilo asociado a plantas modula la expresión de genes de arroz que responden a auxinas y modifica la arquitectura de la raíz. *Rizosfera*, Elsevier,págs 57-66.
- Apel, K. y Hirt, H. (2004). Especies reactivas de oxígeno: metabolismo, estrés oxidativo y transducción de señales.*Rev. Plant Biol.* , 55 , págs. 373-399.
- Basán, Y. (1998). Inoculantes de bacterias promotoras del crecimiento vegetal para uso en agricultura. *Avances de la biotecnología*, 16 (4),págs. 729-770.
- Bishnoi U. (2015) Interacción PGPR: un enfoque ecoamigable que promueve el sistema de agricultura sostenible. *Adv Bot Res.* 75:págs. 81 -113.
- Cabrera, EVR, Bonilla, B. y Aguilar, M. (2018). Interacciones entre plantas y bacterias promotoras de crecimiento vegetal. *Revista Citecsa*, 10 (15),pág. 23.
- Calvo, J., Calvente, V., de Orellano, ME, Benuzzi, D., & de Tosetti, MIS (2007). Control biológico del deterioro poscosecha causado por *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea* en manzana mediante el uso de la bacteria

Rahnella aquatilis. Revista Internacional de Microbiología Alimentaria, 113 (3), págs. 251-257.

- Conrath, U., Pieterse, CM y Mauch-Mani, B. (2002). Cebado en interacciones planta-patógeno. Tendencias en la ciencia de las plantas , 7 (5),págs. 210-216.
- Dagher, F., Nickzad, A., Zheng, J., Hoffmann, M. y Déziel, E. (2021). Caracterización de la actividad de biocontrol de tres aislados bacterianos frente al fitopatógeno Erwinia amylovora. MicrobiologyOpen , 10 (3), pág. 1202.
- Dastager, S.G.; Deepa, C.K.; Pandey, A.(2011) Potential plant growth-promoting activity of Serratia nematodiphila NII-0928 on black pepper (Piper nigrum L.). World J. Microbiol. Biotechnol. 27,págs. 259–265.
- Doran, P. M. (1995). Bioprocess engineering principles. Elsevier.págs.445-595.
- Ansari, F. A., & Ahmad, I. (2019). Pseudomonas-FAP2 fluorescente y Bacillus licheniformis interactúan positivamente en modo biopelícula mejorando el crecimiento de las plantas y los atributos fotosintéticos. Informes científicos, 9(1), pág. 4547.
- Foyer, CH y Noctor, G. (2011). Ascorbato y glutatión: el corazón del eje redox. Fisiología vegetal , 155 (1),págs. 2-18.
- Geisen, S., Wall, D. H., & van der Putten, WH (2019). Retos y oportunidades para la biodiversidad del suelo en el antropoceno. Biología Actual, 29(19), R1036-R1044.

- Glazebrook, J., Chen, W., Estes, B., Hur Song Chang, Nawrath, C., Jean Pierre Métraux, Zhu, T., & Katagiri, F. (2003). Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *34(2)*, págs. 217–228.
- González-Bosch, C. (2018). Cebado de la resistencia de las plantas mediante la activación de genes sensibles a redox. *Free Radical Biology and Medicine* , 122 , 171-180.
- Guirnalda, T. (2014). compensaciones. *Biología actual*, 24 (2), R60-R61.
- Halliwell B, Whiteman M (2004) Medición de especies reactivas y daño oxidativo in vivo y en cultivo celular: ¿cómo se debe hacer y qué significan los resultados? *Br J Pharmacol* 142 : 231–255
- Halliwell, B. (2006). Reactive Species and Antioxidants. *Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. Plant Physiology*, 141(2), 312–322.
- Hatfield, J. L., Boote, K. J., Kimball, B. A., Ziska, L. H., Izaurralde, R. C., Ort, D. R., Thomson, A. M., & Wolfe, D. A. (2011). Climate Impacts on Agriculture: Implications for Crop Production. *Agronomy Journal*, 103(2), 351-370.
- Hernández-León, R., González-Rodríguez, A., & Tapia-Torres, Y. (2022). Capacidades de Reciclaje de Fósforo, Biocontrol y Promoción del Crecimiento de Aislados Bacterianos del Suelo de Robles Mexicanos: Una Alternativa para Reducir el Uso de Agroquímicos en el Cultivo de Maíz. *Microbiología aplicada*, 2 (4), 965-980.
- Karimi, E., Nasser Aliasghar Zad, Esfandiari, E., Mohammad Bagher Hassanpouraghdam, Neu, T. R., François Buscot, Reitz, T., Breitzkreuz, C., & Tarkka, M. T. (2022). Biofilm forming rhizobacteria affect the physiological and biochemical responses of wheat to drought. *12(1)*.

- Karlovsky, P. (2008) Secondary metabolites in soil ecology. In: Karlovsky P (ed) Soil biology, vol 14. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 1–19.
- Khan AL, Halo BA, Elyassi A, Ali S, Al-Hosni K, Hussain J, Al-Harrasi A, Lee IJ. (2016) El ácido indol acético y la ACC desaminasa de bacterias endófitas mejoran el crecimiento de *Solanum lycopersicum*. *Electron J Biotechnol* 21: 58 – 64.
- Koza, N. A., Adedayo, A. A., Babalola, O. O., & Kappo, A. P. (2022). Microorganisms in plant growth and development: Roles in abiotic stress tolerance and secondary metabolites secretion. *Microorganisms*, 10(8), 1528.
- Laurin, M., Llosá, M. J., González, V., Porcuna, J. L., & CAPA, S. V. (2006). El papel de la agricultura ecológica en la disminución del uso de fertilizantes y productos fitosanitarios químicos.
- Maazou, A. S., Tu, J., Qiu, J., & Liu, Z. (2016). Breeding for Drought Tolerance in Maize. *American Journal of Plant Sciences*, 07(14), 1858-1870.
- Magallon-Servin, P., Antoun, H., Salma Taktek, & de-Bashan, L. E. (2020). Designing a multi-species inoculant of phosphate rock-solubilizing bacteria compatible with arbuscular mycorrhizae for plant growth promotion in low-P soil amended with PR. *Biology and Fertility of Soils*, 56(4), 521–536.
- Mano J, Ohno C, Domae Y, Asada K (2001) La peroxidasa de ascorbato cloroplástica es el objetivo principal del estrés fotooxidativo inducido por metil viológeno en hojas de espinaca: su relevancia para el radical monodehidroascorbato detectado con ESR in vivo. *Biochim Biophys Acta* 504: 275–287

- Marios Arvanitis , Beth Burgwyn Fuchs, Eleftherios ;Mylonakis(2014).Chapter Imaging N-Acyl Homoserine Lactone Quorum Sensing In Vivo.Gianfranco Donelli.Microbial Biofilms Methods and Protocols,Springer New York Heidelberg Dordrecht London (168-181).
- Morris JJ, Lenski RE, Zinser ER. (2012). La hipótesis de la reina negra: evolución de las dependencias a través de la pérdida de genes adaptativos. *mBio* 3 : e00036–12.
- Naoual Bouremani, Hafsa Cherif-Silini, Allaoua Silini, Ali Chenari Bouket, Lenka Luptakova, Alenezi, F. N., Баранов, О. Ю., & Lassaad Belbahri. (2023). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): A Rampart against the Adverse Effects of Drought Stress. *Water*, 15(3), 418–418.
- Nations, U. (2022). Población | Naciones Unidas. United Nations; United Nations.
- Niu, X., Song, L., Xiao, Y., & Ge, W. (2018). Drought-Tolerant Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Associated with Foxtail Millet in a Semi-arid Agroecosystem and Their Potential in Alleviating Drought Stress. *Frontiers in Microbiology*, 8.
- Núñez Sánchez, M. A. (2012). Efecto del agua electrolizada sobre el sistema antioxidante y la enzima mirosinasa en brócoli, mínimamente procesado.
- Ojuederie, O. B., Olanrewaju, O. S., & Babalola, O. O. (2019). Plant growth promoting rhizobacterial mitigation of drought stress in crop plants: Implications for sustainable agriculture. *Agronomy*, 9(11), 712.
- Pai, A., Tanouchi, Y. y You, L. (2012). Optimalidad y robustez en la regulación mediada por detección de quórum (QS) de una costosa enzima de bien público. *Actas de la Academia Nacional de Ciencias*, 109 (48), 19810-19815.

- Papenfort, K., Bassler, B. (2016) Sistemas de respuesta de señal de detección de quórum en bacterias Gram-negativas. *Nat Rev Microbiol* 14, 576–588.
- Paz, L., & De, M. (n.d.) (October 18, 2022) Protocolo para la medición de características funcionales Proyecto Inventario Florístico de la Región Madidi. Retrieved.
- Probanza, A., Lucas, JA, Acero, N. y Gutiérrez Mañero, FJ (1996). La influencia de las rizobacterias nativas en el crecimiento del aliso europeo (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.): 1. Caracterización de cepas bacterianas promotoras e inhibidoras del crecimiento. *Planta y suelo*, 182 , 59-66.
- Quispel, A.(1992) A search for signals in endophytic microorganisms. *Molecular signals in plant microbe communications* 471–490.
- Ren, D., Jonas Stenlørkke Madsen, Sørensen, S. J., & Mette Burmølle. (2015). High prevalence of biofilm synergy among bacterial soil isolates in cocultures indicates bacterial interspecific cooperation. *9*(1), 81–89.
- Ren, Y., Yao, M., Chang, P., Sun, Y., Li, R., Meng, D., ... y Wang, Y. (2021). Aislamiento y caracterización de una *Pseudomonas poae* JSU-Y1 con capacidad de degradación de patulina y potencial de biocontrol frente a *Penicillium expansum*. *Toxicón* , 195 , 1-6.
- Rosales Torres, J. D. (2019). Extracción de metabolitos secundarios y el estudio de su actividad biológica (Bachelor's thesis, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla).
- Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Wei HX, Paré PW, Kloepper JW (2003 Jul 8) Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad*

Sci U S A. 2003 Apr 15;100(8):4927-32. doi: 10.1073/pnas.0730845100. Epub 2003 Apr 8. Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A;100(14):8607. PMID: 12684534; PMCID: PMC153657.

- Ortega, I. S. (2014). Maíz I (Zea mays). Reduca (Biología), 7(2).
- Saravanan, A., Kumar, P. S., Jeevanantham, S., Anubha, M., & Jayashree, S. (2022). Degradation of toxic agrochemicals and pharmaceutical pollutants: Effective and alternative approaches toward photocatalysis. Environmental Pollution, 118844.
- Schuster, M., Sexton, DJ, Diggle, SP y Greenberg, EP (2013) Detección de quórum de acil-homoserina lactona: de la evolución a la aplicación. año Rev. Microbiol. 67 , 43–63 .
- Singhal, P., Jan, AT, Azam, M. y Haq, QMR (2016). Estrés abiótico de las plantas: una estrategia prospectiva para explotar los promotores como alternativa para superar la creciente carga. Fronteras en las ciencias biológicas, 9 (1), 52-63.
- Tsiafouli, MA, Thébault, E., Sgardelis, SP, De Ruiter, PC, Van Der Putten, WH, Birkhofer, K., & Hedlund, K. (2015). La agricultura intensiva reduce la biodiversidad del suelo en toda Europa. Biología del cambio global, 21 (2), 973-985.
- Vitousek, PM, Porder, S., Houlton, BZ y Chadwick, OA (2010). Limitación de fósforo terrestre: mecanismos, implicaciones e interacciones nitrógeno-fósforo. Aplicaciones ecológicas , 20 (1), 5-15.
- Vurukonda SS, Vardharajula S, Shrivastava M (2016) Mejora de la tolerancia al estrés por sequía en cultivos mediante rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. Microbiol Res 184:13–24.

- Vyas, P., Joshi, R., Sharma, KC, Rahi, P., Gulati, A. y Gulati, A. (2010). Cepa de *Rahnella* sp. adaptada al frío y competente en la rizosfera. con un potencial de amplio espectro para promover el crecimiento de las plantas. *Diario de Microbiología y Biotecnología* , 20 (12), 1724-1734.
- Wu, J., Zhang, J., Ge, Z., Liwei, X., Shuqing, H., Shen, C., & Kong, F. (2021). Impact of climate change on maize yield in China from 1979 to 2016. *Journal of Integrative Agriculture*, 20(1), 289-299.
- Zia, R., Muhammad Shoib Nawaz, Siddique, M., Hakim, S., & Imran, A. (2021). Plant survival under drought stress: Implications, adaptive responses, and integrated rhizosphere management strategy for stress mitigation. *Microbiological Research*, 242, 126626–126626.