



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS CAMPECHE**

POSGRADO EN BIOPROSPECCIÓN Y SUSTENTABILIDAD AGRÍCOLA  
EN EL TRÓPICO

**POTENCIAL BIOFERTILIZANTE DE BACTERIAS  
HALÓFILAS AISLADAS DE SUELOS SALINOS OBTENIDOS  
DE LA RESERVA DE LA BIÓSFERA DE LOS PETENES**

**MARIA CONSEPCION MAGAÑA TZUC**

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

Sihochac, Champotón, Campeche

2021



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

MÉXICO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSI-TABASCO-VERACRUZ-CÓRDOBA-CAMPECHE

## CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, la que suscribe **Maria Concepcion Magaña Tzuc**, alumna de esta institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección de la Profesora Consejera **Dra. Arely Anayansi Vargas Díaz**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis “**Potencial biofertilizante de bacterias halófilas aisladas de suelos salinos obtenidos de la Reserva de la Biósfera de los Petenes**” y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos que se pueden derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la institución, la consejera y directora de tesis y la que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta institución.

Sihochac, Champotón, Campeche a 16 de febrero de 2021.

---

**LBI. Maria Concepcion Magaña Tzuc**  
**Estudiante**

---

**Vo.Bo.**  
**Dra. Arely Anayansi Vargas Díaz**  
**Profesora Consejera**

La presente tesis, titulada: **Potencial biofertilizante de bacterias halófilas aisladas de suelos salinos obtenidos de la Reserva de la Biósfera de los Petenes**, realizada por la alumna: **Maria Concepcion Magaña Tzuc**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

**BIOPROSPECCIÓN Y SUSTENTABILIDAD AGRÍCOLA EN EL TRÓPICO**

CONSEJO PARTICULAR



CONSEJERA:

---

DRA. ARELY ANAYANSI VARGAS DÍAZ

ASESOR:



---

DR. ALFREDO SÁNCHEZ VILLARREAL

ASESORA:



---

DRA. HILDA VICTORIA SILVA ROJAS

Sihochac, Champotón, Campeche, 13 de enero de 2021

# **POTENCIAL BIOFERTILIZANTE DE BACTERIAS HALÓFILAS AISLADAS DE SUELOS SALINOS OBTENIDOS DE LA RESERVA DE LA BIÓSFERA DE LOS PETENES**

Maria Concepcion Magaña-Tzuc, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2021

## **RESUMEN**

La reserva de la biósfera de los Petenes (RBLP) está caracterizada por presentar una matriz de suelo de alta salinidad denominada blanquizal. En estos ecosistemas habitan comunidades microbianas halófilas que podrían tener efectos positivos sobre el crecimiento de las plantas. El objetivo de este estudio fue aislar e identificar bacterias halófilas/halotolerantes presentes en dos sitios con suelos blanquizales en la RBLP y determinar su potencial de biofertilización in vitro. Se realizaron dos etapas experimentales: 1) el aislamiento de cepas halófilas, seguido de la caracterización fenotípica e identificación molecular basada en el gen 16S rRNA; y 2) la evaluación del potencial de biofertilización in vitro en actividades de promoción del crecimiento vegetal como fijación de nitrógeno, solubilización de fósforo y potasio y producción de ácidos orgánicos. Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey. En total se aislaron 64 bacterias, 49 en el blanquizal del sitio (A) considerado como perturbado y 15 en el sitio (B), blanquizal considerado como conservado. Un gran número de los aislados (48%, n=31) presentaron alta tolerancia a la salinidad mostrando ser halófilos extremos. El análisis filogenético de las secuencias del gen 16S rRNA

reveló que los 64 aislamientos se encuentran dentro de tres filos, el 95% Firmicutes, 3% Proteobacteria y 2% Actinobacteria. El género con mayor frecuencia correspondió a *Bacillus* (91%) y en este estudio se reportan por primera vez los géneros *Neobacillus*, *Metabacillus* y *Priestia*, recientemente reclasificados dentro de este género. La especie con mayor frecuencia correspondió a especies aún no descritas dentro del reclasificado género *Bacillus* sp. (28%), seguido de *Bacillus stratosphericus* (17%) y *Bacillus subtilis* (14%). La actividad promotora de crecimiento vegetal más representativa entre los aislados correspondió a la fijación de nitrógeno (92%), seguida por la solubilización de fósforo (72%), solubilización de potasio (63%) y, por último, la producción de ácidos orgánicos (28%). Del total de los aislados el 20% (n=13) presentaron las cuatro actividades evaluadas. Por lo que estos resultados, nos indican que las bacterias halófilas/halotolerantes nativas de los suelos blanquizales de la RBLP podrían ser a futuro, candidatos prometedores como agentes de biofertilización en una agricultura sostenible.

**Palabras clave:** bacterias halófilas, suelos salinos, blanquizales, biofertilización

# **BIOFERTILIZING POTENTIAL OF HALOPHYL BACTERIA ISOLATED FROM SALINE SOILS OBTAINED FROM THE PETENES BIOSPHERE RESERVE**

Maria Concepcion Magaña-Tzuc, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2021

## **ABSTRACT**

The Petenes Biosphere Reserve (RBLP) is characterized by a high salinity soil matrix called blanquizal. Halophilic microbial communities that inhabit this ecosystem could have positive effects on plant growth. The objective of this study was to isolate and identify halophilic/halotolerant bacteria present in two sites with whitish soils in the RBLP and to determine their potential for biofertilization *in vitro*. Two experimental stages were carried out: 1) the isolation of halophilic strains, followed by phenotypic characterization and molecular identification based on the 16S rRNA gene; and 2) the evaluation of the potential of *in vitro* biofertilization to promote plant growth through activities such as nitrogen fixation, phosphorus and potassium solubilization, and organic acid production. The data obtained were analyzed using an analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test. In total, 64 bacteria were isolated, 49 in the blanquizal of site (A) considered as disturbed and 15 in site (B), blanquizal considered as conserved. A large number of the isolates (48%, n=31) presented high tolerance to salinity, showing they were extreme halophiles. Phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene sequences revealed that the 64 isolates are found within three phyla, 95% Firmicutes, 3% Proteobacteria and 2% Actinobacteria. The most frequent genus corresponded to *Bacillus* (91%) and in

this study the genera *Neobacillus*, *Metabacillus* and *Priestia*, recently reclassified within this genus, are reported for the first time. The species most frequently corresponded to species not yet described within the reclassified genus *Bacillus* sp. (28%), followed by *Bacillus stratosphericus* (17%) and *Bacillus subtilis* (14%). The most representative plant growth promoting activity among the isolates corresponded to nitrogen fixation (92%), followed by phosphorus solubilization (72%), potassium solubilization (63%) and, finally, organic acid production. (28%). Of the total of the isolates, 20% (n=13) presented the four activities evaluated. Therefore, these results indicate that the halophilic/halotolerant bacteria native to the whitish soils of the RBLP could be promising candidates as biofertilization agents for a sustainable agriculture.

**Keywords:** halophilic bacteria, saline soils, whitish soils, biofertilization

## AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**, por la beca (número 723269) otorgada para el financiamiento de mis estudios y la realización de este trabajo de investigación.

Al **Colegio de Postgraduados, Campus Campeche** por brindarme la oportunidad de desarrollarme profesional y académicamente, dentro de la línea de investigación de **Innovación Tecnológica para una Agricultura Tropical Sustentable**.

A la **Dra. Arely Anayansi Vargas Díaz**, por aceptarme en su equipo de trabajo en el **Laboratorio de Bioprocesos**, Campus Campeche y siempre procurar tener todos los materiales necesarios para la realización de los experimentos requeridos, por ser mi consejera, por su compañía en las colectas, por su apoyo económico y tiempo dedicado a este proyecto.

A la **Dra. Hilda Victoria Silva Rojas**, por haberme permitido realizar una estancia en el **Laboratorio de Bioquímica y Biotecnología de Semillas**, en el Campus Montecillo y brindarme todas las facilidades para desarrollar los experimentos en tiempo y forma de un objetivo importante en esta investigación, agradezco su tiempo, paciencia y apoyo, pero sobre todo sus observaciones para mejorar personal y profesionalmente.

Al **Dr. Alfredo Sánchez Villarreal**, por sus asesorías, recomendaciones y el tiempo dedicado en los cursos impartidos para enriquecer y mejorar este trabajo de investigación.

Al **Sr. Rogaciano Pat Canul**, al **Sr. José del Carmen Haas Huchin** y su secretario el **Sr. Rodolfo Ek Carballo**, por ser los guías y por acompañarnos durante las colectas realizadas en la Reserva de la Biósfera de los Petenes.

Al **Laboratorio de Fitopatología y Microbiología Agrícola**, Campus Campeche, por abrirme las puertas y por su accesibilidad, para la culminación de los experimentos de este trabajo de investigación.



Al **Dr. Efraín Ramírez Benítez**, por su recibimiento en el **Laboratorio de Operaciones Unitarias**, en la Universidad Autónoma de Campeche (UAC) para la culminación de este trabajo de investigación.

Al **Dr. Alberto Santillán**, por sus asesorías en los programas estadísticos.

Al **Dr. Jairo Ricardo Villanueva Toledo**, por su colaboración en uno de los objetivos claves de este trabajo de investigación.

Al **M.C. Manuel Aguirre Rayo**, al **Ing. José Eduardo Godínez Alemán**, por su apoyo y tips en los experimentos realizados durante mi estancia y por brindarme su amistad, a la **Sra. Martha y compañeros/as** del Laboratorio de Bioquímica y Biotecnología de Semillas, son muchos los aprendizajes que me llevo, gracias.

A todos mis compañeros y amigos del Colegio de Postgraduados, Campus Campeche en especial al **IBQ. Gerardo Alfonso Ayil Chan** por su compañía y apoyo incondicional, sin importar el día y la hora, a la **IA. Yaritza Quintal Vargas** por su apoyo y amistad, al **Biol. Román León** y al **Ing. Juan Caamal** por su apoyo en las colectas y al técnico del Laboratorio de Bioprocesos **IBQ. Delmi Chablé**.

***Dedico esta tesis:***

***A Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el período de realización de este trabajo de investigación.***

***A mis padres César y Eusebia, por la herencia más valiosa que he recibido “su apoyo para continuar con mi superación”.***

***A mis sobrinos David y Daniel, para que vean en mi un ejemplo de superación.***

***A todos los que han confiado en mí, quiero que sientan que el objetivo logrado también es suyo y que la fuerza que me ayudó a conseguirlo fue su apoyo.***

## CONTENIDO

<b>RESUMEN .....</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>V</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE CUADROS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>XIV</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Áreas naturales protegidas en el mundo.....</b>	<b>3</b>
2.1.1 Áreas naturales protegidas en México .....	5
2.1.2 Reservas de la biósfera.....	7
2.1.2.1 Reservas de la Biósfera en México .....	9
2.1.2.1.1 Reserva de la Biósfera de los Petenes .....	11
<b>2.2 La salinidad y su efecto en la agricultura.....</b>	<b>15</b>
<b>2.3 Microorganismos.....</b>	<b>19</b>
2.3.1 Microorganismos halófilos.....	21
2.3.1.1 Mecanismo de Salt-in .....	24
2.3.1.2 Solutos compatibles.....	26
2.3.1.3 Exopolisacáridos.....	28
2.3.2 Dominio Bacteria.....	30
2.3.3 Dominio Arquea.....	32
2.3.4 Dominio Eukarya.....	33
<b>2.4 Aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos halófilos .....</b>	<b>34</b>
2.4.1 Producción de enzimas .....	38
2.4.2 Producción de polihidroxicanoatos .....	39
<b>2.5 Aplicaciones de las bacterias halófilas en la agricultura.....</b>	<b>40</b>
2.5.1 Biofungicidas.....	43

2.5.2 Biofertilizantes .....	44
2.5.1 Fijación biológica de nitrógeno .....	46
2.5.2 Solubilización de fósforo .....	47
2.5.3 Solubilización de potasio .....	48
2.5.4 Producción de ácidos orgánicos .....	50
2.5.5 Hormonas vegetales .....	51
<b>III. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>53</b>
<b>IV. OBJETIVOS E HIPÓTESIS .....</b>	<b>54</b>
<b>4.1 Objetivo general.....</b>	<b>54</b>
4.1.1 Objetivos específicos .....	54
<b>4.2 Hipótesis.....</b>	<b>54</b>
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>55</b>
<b>5.1 Aislamiento de bacterias halófilas de dos sitios de blanquizales dentro de la Reserva de la Biósfera de los Petenes .....</b>	<b>55</b>
5.1.1 Área de estudio y recolección de muestras.....	55
5.1.2 Procesamiento y caracterización química de las muestras de suelo ....	57
5.1.3 Aislamiento y purificación de microorganismos.....	57
5.1.4 Caracterización fenotípica de los aislados .....	58
5.1.5 Tolerancia de bacterias a altas concentraciones de cloruro de sodio (NaCl).....	59
<b>5.2 Identificación mediante reconstrucción filogenética de bacterias halófilas aisladas .....</b>	<b>60</b>
5.2.1 Identificación molecular.....	60
<b>5.3 Evaluación del potencial de biofertilización <i>in vitro</i> de bacterias halófilas aisladas .....</b>	<b>62</b>
5.3.1 Solubilización de fósforo .....	62
5.3.2 Solubilización de potasio.....	62
5.3.3 Fijación de nitrógeno .....	63
5.3.4 Producción de ácidos orgánicos .....	63
5.3.5 Análisis estadístico.....	64

<b>VI. RESULTADOS .....</b>	<b>65</b>
<b>6.1 Propiedades fisicoquímicas del suelo .....</b>	<b>65</b>
<b>6.2 Aislamiento y caracterización de bacterias halófilas en dos sitios de la Reserva de la Biósfera de los Petenes .....</b>	<b>66</b>
<b>6.3 Tolerancia de bacterias a altas concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) .....</b>	<b>75</b>
<b>6.4 Identificación molecular de los microorganismos aislados .....</b>	<b>76</b>
<b>6.5 Potencial biofertilizante de los aislados obtenidos .....</b>	<b>85</b>
<b>VII. DISCUSIÓN .....</b>	<b>95</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>101</b>
<b>IX. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>102</b>
<b>X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>103</b>

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Áreas naturales protegidas en México (CONANP, 2018).....	6
<b>Cuadro 2.</b> Reservas de la Biósfera en México registradas en el Sistema Nacional de Áreas Protegidas.....	9
<b>Cuadro 3.</b> Categorías de microorganismos halófilos establecidos por Kushner, 1985.....	23
<b>Cuadro 4.</b> Aplicaciones en diferentes aspectos económicos de las bacterias halófilas.....	36
<b>Cuadro 5.</b> Aplicaciones de las bacterias halófilas como biofungicidas/biofertilizantes.....	41
<b>Cuadro 6.</b> Sitios de muestreo y condiciones ambientales del suelo blanquizal.....	56
<b>Cuadro 7.</b> Propiedades fisicoquímicas de los suelos blanquizales colectados en dos sitios de la Reserva de la Biósfera de los Petenes.....	65
<b>Cuadro 8.</b> Características macroscópicas y microscópicas de las cepas aisladas en el sitio A (Perturbado, Tankuché).....	69
<b>Cuadro 9.</b> Características macroscópicas y microscópicas de las cepas aisladas en el sitio B (Conservado, Nunkiní).....	73
<b>Cuadro 10.</b> Identificación molecular de cepas bacterianas halófilas/halotolerantes aisladas de suelos salinos blanquizales de la Reserva de la Biósfera de los Petenes.....	77
<b>Cuadro 11.</b> Evaluación de las actividades de las cepas bacterianas aisladas de dos sitios de suelos salinos blanquizales.....	90

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Áreas naturales protegidas en el mundo.....	4
<b>Figura 2.</b> Categorías de las áreas naturales protegidas en México, federales, estatales y municipales.....	6
<b>Figura 3.</b> Zonas de clasificación de las Reservas de la Biósfera.....	9
<b>Figura 4.</b> Petenes ubicados en la Reserva de la Biósfera de los Petenes.....	13
<b>Figura 5.</b> Blanquizal ubicado en la Reserva de la Biósfera de los Petenes....	15
<b>Figura 6.</b> Distribución global de afectaciones al suelo por la salinización.....	16
<b>Figura 7.</b> Árbol filogenético basado en la secuencia de la subunidad pequeña 16S rRNA y la distribución de microorganismos halófilos.....	22
<b>Figura 8.</b> Principales mecanismos de adaptación de los microorganismos halófilos en ambientes salinos.....	24
<b>Figura 9.</b> Estrategia adaptativa de microorganismos halófilos en ambientes salinos por mecanismo <i>salt in</i> .....	26
<b>Figura 10.</b> Estrategia adaptativa de microorganismos halófilos en ambientes salinos por mecanismo de solutos compatibles.....	27
<b>Figura 11.</b> Estructura química de la Ectoína e Hidroxiectoína producida por <i>Halomonas elongata</i> .....	28
<b>Figura 12.</b> Estructura y composición del exopolisacárido haloglicano.....	30
<b>Figura 13.</b> Géneros bacterianos halófilos frecuentemente reportados en suelos salinos.....	31

<b>Figura 14.</b> Aplicaciones biotecnológicas de los compuestos presentes en bacterias halófilas y sus usos industriales.....	35
<b>Figura 15.</b> Área de estudio de los suelos blanquizales ubicados en la Reserva de la Biósfera de los Petenes, Campeche, México.....	56
<b>Figura 16.</b> Escala de clasificación de los microorganismos halófilos.....	59
<b>Figura 17.</b> Número totales de morfotipos aislados encontrada en dos sitios de muestreo (A y B) en relación al medio de cultivo.....	67
<b>Figura 18.</b> Abundancia relativa de aislados en ambos sitios muestreo (A y B), crecidos con diferentes concentraciones de NaCl.....	75
<b>Figura 19.</b> Frecuencia de las cepas bacterianas encontradas en dos sitios (A y B) de la Reserva de la Biósfera de los Petenes.....	83
<b>Figura 20.</b> Construcción del árbol filogenético de las bacterias correspondientes al género dominante <i>Bacillus</i> basado en la secuenciación del gen 16S rRNA por método inferencia bayesiana.....	84
<b>Figura 21.</b> Construcción del árbol filogenético de las bacterias que no correspondieron al género <i>Bacillus</i> , basado en la secuenciación del gen 16S rRNA por método inferencia bayesiana. ....	85
<b>Figura 22.</b> Número de cepas bacterianas que presentaron las actividades promotoras del crecimiento vegetal evaluadas.....	88
<b>Figura 23.</b> Cepas bacterianas que resultaron positivo a las cuatro actividades evaluadas y que presentaron mejor índice de solubilización.....	89



## I. INTRODUCCIÓN

En la región sur-sureste de México, Campeche ocupa el primer lugar en cuanto a Áreas Naturales Protegidas (ANP) con 2' 342, 118 ha, equivalentes al 41.2% del área total del estado (Rosano, 2011; CONANP, 2018). Entre las ANP del estado se encuentra la Reserva de la Biósfera de los Petenes (RBLP) con una extensión de 282, 857 ha en donde predominan ciertos ambientes denominados Petenes, que son islotes de vegetación arbórea asociadas a manantiales localizados dentro de una matriz de suelo de alta salinidad (Oliva *et al.*, 2014; Zamora-Crescencio *et al.*, 2015). Estos ecosistemas son considerados como únicos a nivel internacional ya que se encuentran ubicados dentro de una planicie costera con sedimentación palustre adyacente al mar, en la que existen tres distintas geoformas de origen: litoral, palustre y kárstico (Koyoc-Ramírez *et al.*, 2015). Debido a estas condiciones, en la RBLP se presentan ciertos ambientes extremos como son suelos hipersalinos y calcáreos, conocidos como blanquizales, en los cuales se han registrado altos valores de salinidad ( $27.1 \pm 8.0$  y  $47.0 \pm 7.0$  g L<sup>-1</sup>) con condiciones mesohalinas en la temporada de lluvias e hipersalinas en la temporada seca (Ayala-Pérez *et al.*, 2014; Toro-Ramírez *et al.*, 2017; Chan-Keb *et al.*, 2018).

Los ambientes hipersalinos albergan diferentes grupos de bacterias halófilas y halotolerantes capaces de crecer en una amplia concentración de NaCl (0 a 33%), éstas presentan características bioquímicas y metabólicas únicas lo que las convierte en los microorganismos idóneos para interactuar con plantas crecidas bajo estrés salino (Oren, 2008; Thatoi *et al.*, 2020). En los últimos años, se han

identificado varias bacterias halófilas promotoras del crecimiento vegetal (por sus siglas en inglés, PGPB) con capacidad de fijar nitrógeno, solubilizar fosfato, producir ácido indol-acético (AIA) y sideróforos (Orhan, 2016; Shah *et al.*, 2017; Mallick *et al.*, 2018; L. Bensidhoum *et al.*, 2019). Por tal razón, el uso de microorganismos benéficos halófilos es de gran interés en la agricultura sustentable (Paul & Lade, 2014).

Actualmente, más de 835 millones de ha (alrededor del 34%) de la tierra cultivada en todo el mundo se ve afectada por el estrés salino y esta cantidad va en aumento cada día. Se estima que más del 50% de la tierra cultivable estará salinizada para el año 2050 (Jamil *et al.*, 2011; Gupta & Huang, 2014; FAO, 2016; Etesami & Noori, 2019). En México, se estima que el 30% de su superficie agrícola se encuentra afectada por la salinidad con alrededor de 1.7 millones de ha (Hernández *et al.*, 2016). Por lo tanto, existe una necesidad creciente de comprender los entornos salinos y la diversidad microbiana existente, que sirvan como modelos para comprender las interacciones en estos ecosistemas para la búsqueda de nuevas alternativas de producción en suelos afectados por la salinidad (Jiang *et al.*, 2018). Por tal razón, es importante identificar la diversidad bacteriana halófila/halotolerante existente en hábitats hipersalinos como son los blanquizales de la RBLP. Con estos antecedentes, el objetivo de la presente investigación fue aislar e identificar bacterias halófilas/halotolerantes presentes en dos sitios con suelos blanquizales en la RBLP y determinar su potencial de biofertilización *in vitro*

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Áreas naturales protegidas en el mundo

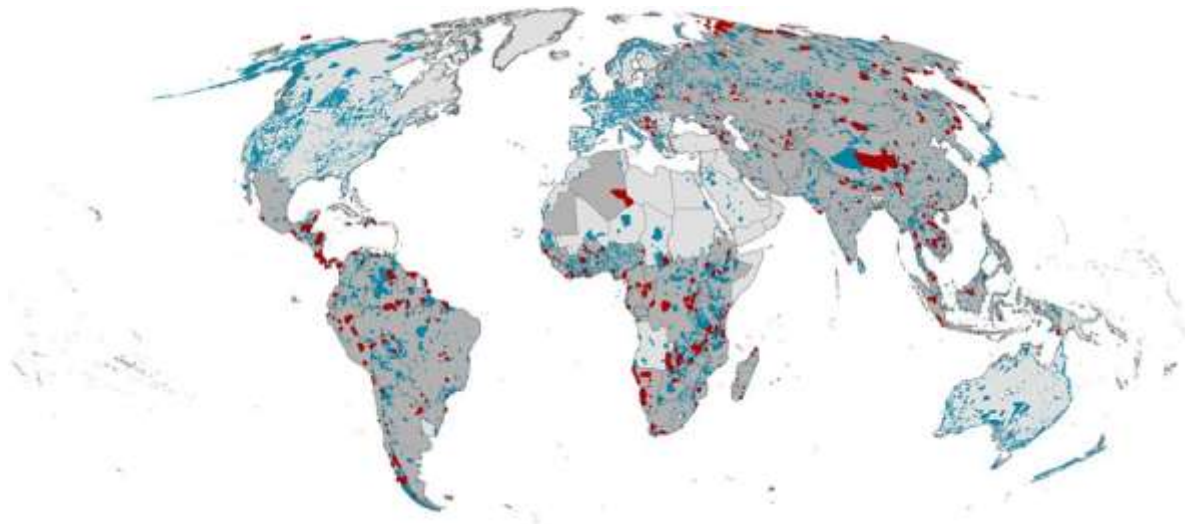
En la actualidad en el mundo existen 202, 467 áreas naturales protegidas (ANP) (Figura 1), que cubren casi 20 millones de km<sup>2</sup> equivalente al 14.7% de la superficie terrestre, con exclusión de la Antártida. Las ANP ofrecen al planeta una muestra de cada uno de los biomas que hasta la fecha han sido identificados, como desiertos, selvas, bosques, tundras, casquetes polares, pastizales, manglares y arrecifes, distribuidos a lo largo y ancho de los continentes (Geldmann *et al.*, 2019).

Europa, es un continente muy rico en biodiversidad, además es reconocido en todo el mundo por mantener ANP extensas de bosques y montañas que sirven de hogar de miles de especies de flora y fauna. En los últimos 25 años, el continente europeo ha diseñado una red de 26, 000 ANP denominada “Red Natura 2000”, lo que la coloca como la mayor red de ANP en el mundo. Entre las ANP de Europa se encuentra el Parque Nacional del Teide, Parque Nacional del Mar de Coral y Reserva Natural Zíngaro, entre otras (Nastran & Pirnat, 2012).

Por otro lado, África es un continente con una riqueza en biodiversidad valorada a nivel mundial, pero también explotada y poco regulada. Se estima que posee 1, 200 ANP que comprenden 2 millones de km<sup>2</sup>, con un gran porcentaje de animales salvajes, muchos de ellos en peligro de extinción. Entre algunas de estas áreas se encuentra la Reserva Natural Masái Mara, Parque Nacional Salonga y Reserva Natural Integral del Monte Nimba, entre otras (Newmark, 2008).

Asia por su parte cuenta con 49 estados soberanos y seis territorios dependientes. La parte meridional cuenta con un 10% de los peces del mundo y en toda su extensión se desarrollan especies de plantas y animales totalmente endémicos. Algunas de estas ANP son: el Parque Nacional de Jiuzhaigou-China, Parque Nacional de Sundarbans, Bangladés-India y Parque Nacional de Khao Sok, Tailandia, por mencionar algunos (Clark *et al.*, 2013).

En América, la superficie protegida cubre más de 211 millones de ha, lo que corresponde un porcentaje del 10.4% de los 22 países que forman parte de los segmentos más importantes y representativos de la naturaleza latinoamericana. Algunas de éstas ANP son: la Reserva de la Biósfera El Vizcaíno, Parque Nacional Sierra de Órganos, Parque Nacional del Darién, Santuario de mamíferos marinos, Parque Nacional y Reserva Nacional Los Glaciares, Humedales del Chalco, entre otras (Elbers, 2011).

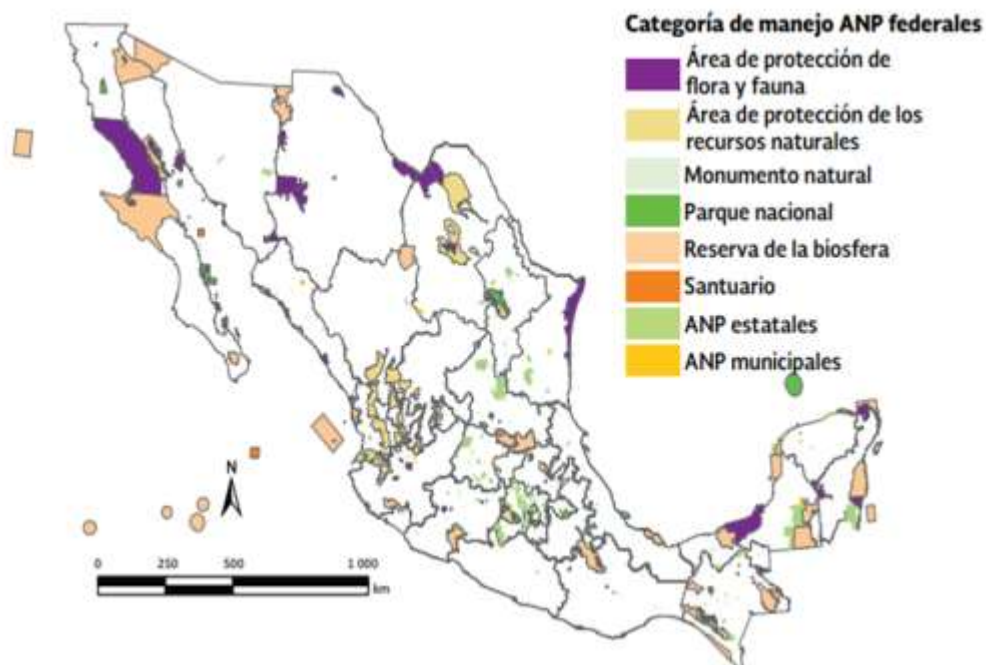


**Figura 1.** Áreas naturales protegidas en el mundo indicadas en azul y rojo (Geldmann *et al.*, 2019).

### 2.1.1 Áreas naturales protegidas en México

México es el país de América Latina y el Caribe que cuenta con más ANP inscritas y se coloca en la cuarta posición a nivel mundial, sólo detrás de Estados Unidos, Rusia y España (Elbers, 2011). México posee una abundante biodiversidad, administrada por la CONANP con un total de 571 ANP, de las cuales 177 son de carácter federal; equivalente a 25' 628, 238 ha en todo el país. Estas ANP de carácter federal se encuentran divididas en las regiones: Península de Baja California y Pacífico Norte, Noreste y Alto del Golfo de California, Norte y Sierra Madre Occidental, Norte y Sierra Madre Oriental, Occidente y Pacífico Centro, Centro y Eje Neovolcánico, Planicie Costera y Golfo de México, Frontera sur, Istmo y Pacífico Sur y Península de Yucatán y Caribe Mexicano (List *et al.*, 2017).

La Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente (LGEEPA) divide las ANP federales en 6 categorías (Figura 2). Clasificándolas de la siguiente manera: reservas de la biósfera (n=41), parques nacionales (n=66), áreas de protección de flora y fauna (n=39), monumentos naturales (n=5), áreas de protección natural (n=8) y santuarios (n=18). Además, se reconocen dos categorías que no están en el ámbito federal: áreas protegidas estatales y zonas municipales de conservación ecológica (DOF, 2013; Íñiguez *et al.*, 2014). Éstas ANP son consideradas de especial relevancia en el país por su diversidad y características ecológicas (CONANP, 2018; García-Bañuelos *et al.*, 2019). A continuación, se presentan algunos ejemplos (Cuadro 1):



**Figura 2.** Categorías de las áreas naturales protegidas en México, federales, estatales y municipales (SEMARNAT, 2012).

**Cuadro 1.** Áreas naturales protegidas en México (CONANP, 2018)

Año	Categoría	Nombre del (ANP)	Estado	Superficie (ha)	No. de registro SINAP*	Fecha de aviso en D.O.F.
2000	PN	Bahía de Loreto	Baja California Sur	206,580.75	007	7 de junio de 2000
2000	PN	Isla Contoy	Quintana Roo	5,126.25	008	7 de junio de 2000
2000	APFF	Maderas del Carmen	Coahuila	208,381.15	009	7 de junio de 2000

2000	APFF	Cuatro Ciénegas	Coahuila	84,347.47	018	7 de junio de 2000
2002	PN	Arrecifes de Cozumel	Quintana Roo	11,987.87	046	27 de noviembre de 2002
2002	APFF	Sierra de Álamos- Río Cuchujaqui	Sonora	92,889.69	047	27 de noviembre de 2002
2003	PN	Huatulco	Oaxaca	11,890.98	048	27 de marzo de 2003
2016	MN	Río Bravo del Norte	Chihuahua y Coahuila	2,175	065	8 de junio de 2016
2016	APFF	Valle de los Cirios	Baja California	2,521,987.61	066	8 de junio de 2016
2016	APFF	Laguna de Términos	Campeche y Tabasco	706,147.67	077	8 de junio de 2016

---

\*Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SINAP); Parque Nacional (PN); Área de Protección de Flora y Fauna (APFF); Monumento Natural (MN).

### 2.1.2 Reservas de la biósfera

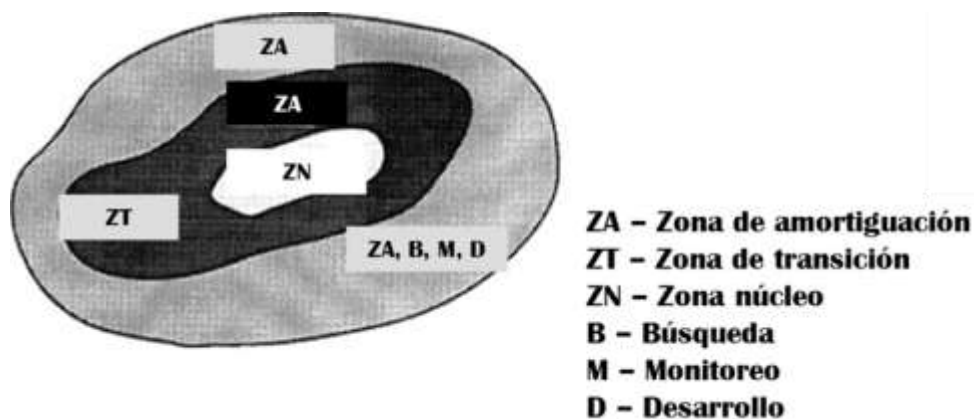
En 1970, la UNESCO inició el programa “El hombre y la biósfera”, que tuvo como objetivo establecer las bases del uso racional de los recursos naturales, esbozando el concepto actual de desarrollo sostenible. Como parte de ese proyecto se seleccionaron áreas geográficas representativas de los diferentes hábitats del planeta, abarcando tanto ecosistemas terrestres como marítimos. Esas áreas se conocen como reservas de la biósfera (UNESCO, 2016).

Las reservas de la biósfera están reconocidas internacionalmente, aunque permanecen bajo la soberanía de sus respectivos países. La función principal de estos espacios es obviamente la conservación y protección de la biodiversidad. Sin embargo, también se persigue el desarrollo económico y humano de estas zonas, así como la investigación, la educación y el intercambio de información entre las diferentes reservas, que forman una red mundial (CONANP, 2018).

Actualmente el Programa MAB–UNESCO, coordinador internacional de las reservas de la biósfera, se apoya en tres ejes de acción: 1) Reducir al mínimo la pérdida de biodiversidad a través de la investigación y la creación de capacidades en materia de gestión; 2) Promover la sustentabilidad del medio ambiente; 3) Fortalecer los vínculos entre la diversidad cultural y la diversidad biológica (Halffter, 2011; UNESCO, 2016).

Las reservas de la biósfera, constituyen la estrategia de conservación más importante en México, por el porcentaje de la superficie conservada que representan. La cantidad de recursos financieros y la atención que reciben, y por sus objetivos, los cuales incorporan explícitamente la conservación estricta (en sus zonas núcleo), el manejo sustentable de recursos naturales (en las zonas de amortiguación) que permitieran la investigación “aprobada” y los usos de bajo impacto por parte de los residentes locales. Esto se combina con una (zona de transición) en la que la educación de los residentes locales facilitaría su colaboración con los objetivos de conservación de la reserva (Smardon & Faust, 2006) (Figura 3).





**Figura 3.** Zonas de clasificación de las Reservas de la Biósfera (Smardon & Faust, 2006).

### 2.1.2.1 Reservas de la Biósfera en México

México tiene actualmente 41 reservas de la biósfera, lo que corresponde a 12' 751, 149 ha del país (CONANP, 2018; García-Bañuelos *et al.*, 2019). Las reservas de la biósfera establecidas en México incluyen áreas que anteriormente estaban protegidas en otras categorías legales y se enlistan en la siguiente (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Reservas de la Biósfera en México registradas en el Sistema Nacional de Áreas Protegidas (CONANP, 2018).

Año	Nombre del (ANP)	Estado	Superficie (ha)	No. de registro SINAP*	Fecha de aviso en DOF
2000	Calakmul	Campeche	723,185.12	001	7 de junio de 2000
2000	Sian Ka'an	Quintana Roo	528,147.66	002	7 de junio de 2000

2000	Los Tuxtlas	Veracruz	155,122.46	003	7 de junio de 2000
2000	Alto Golfo de California y Delta del Río Colorado	Sonora y Baja California	934,756.25	004	7 de junio de 2000
2000	Montes Azules	Chiapas	331,200	005	7 de junio de 2000
2000	El Pinacate y Gran Desierto de Altar	Sonora	714,556.50	006	7 de junio de 2000
2000	Pantanos de Centla	Tabasco	302,706.62	010	7 de junio de 2000
2000	Chamela-Cuixmala	Jalisco	13,141.69	012	7 de junio de 2000
2000	La Encrucijada	Chiapas	144,868.15	013	7 de junio de 2000
2002	Los Petenes	Campeche	282,857.62	042	27 de noviembre de 2002

---

\*Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SINAP)

Las Reservas de la Biósfera encontradas en la península de Yucatán en México están divididas entre los estados de Campeche, Quintana Roo y Yucatán. Estos incluyen: en Campeche a Calakmul (contigua a la Reserva de la biósfera Maya en el área norte de Guatemala, conocida como Petén) con una extensión de 723,185 ha; su vegetación incluye: bosque templado caducifolio, bosque semiperenne medio, vegetación acuática y secundaria (tintales) (Smardon & Faust, 2006), así como a la Reserva de la Biósfera de los Petenes, que se detalla más

adelante. También se encuentra Ría Lagartos (en la costa norte del estado de Yucatán); con una superficie de 47,840 ha; en su vegetación destacan bosque bajo estacionalmente inundado, bosques medianos, semiperennes y dunas costeras. La Ría Celestún (en el noreste de Yucatán, en la frontera con el estado de Campeche); con una extensión de 59,130 ha; en su vegetación se encuentran bosques bajos estacionalmente inundados, bosques medianos semiperennes y dunas costeras; y Sian Ka'an (en el sureste de Quintana Roo, y de las áreas naturales protegidas vecinas en Belice) con una extensión de 528,148 ha; en su vegetación se encuentran: bosques semiperennes bajo y medianos, bosques caducifolios bajos, manglares, dunas costeras y bosques medianos inundados estacionalmente (Elbers, 2011).

#### ***2.1.2.1.1 Reserva de la Biósfera de los Petenes***

La Reserva de la Biósfera de los Petenes (RBLP) es un área federal protegida establecida por decreto presidencial el 24 de mayo de 1999, que abarca 282,857 ha (64% marino y 36% terrestre). Es declarada como sitio RAMSAR en febrero del 2004, designación internacional que reconoce su valor como humedal costero de importancia internacional para la Península de Yucatán. Actualmente, no hay asentamientos humanos en el área terrestre de la RBLP (CONANP, 2018).

Esta reserva se localiza en la costa norte del estado mexicano de Campeche, al sureste del golfo de México. En la región los climas dominantes son: BS'H'W (semiseco y seco-cálido) con temperatura ambiente promedio de 28 °C, precipitación promedio de 164.8 mm y vientos débiles del sureste. Aw (cálido-

subhúmedo con lluvias en verano) la temperatura promedio de 24 °C, precipitación promedio de 976.7 mm y vientos frecuentes y fuertes del sureste (Torrescano-Valle *et al.*, 2019). Los sedimentos son principalmente autóctonos, lo que significa que son principalmente orgánicos y se originan en la producción *in situ*. La tasa de sedimentación media y su desviación estándar en promedio es de  $3.8 \pm 1.08 \text{ kg m}^{-2} \text{ año}^{-1}$ , que contiene Petén ( $1.26 \pm 0.45 \text{ kg m}^{-2} \text{ año}^{-1}$ ) y manglar de franja ( $6.31 \pm 3.56 \text{ kg m}^{-2} \text{ año}^{-1}$ ), que son los ecotipos dominantes en el área (Cinco-Castro & Herrera-Silveira, 2020). Los tipos de vegetación dominantes son manglares, bosques caducifolios bajos y bosques caducifolios compuestos por *Haematoxylum campechianum* (Gutiérrez-Ayala *et al.*, 2012; Roy *et al.*, 2017).

Asimismo, en esta reserva se localizan ciertos hábitats complejos que le confieren la unicidad del área denominada Petenes (Figura 4), los cuales solo se localizan en la Península de Yucatán, México, los Everglades en Florida, Estados Unidos de América, y la Ciénega de Zapata, Cuba, por lo que esta región es considerada como área biogeográfica única a nivel nacional (Koyoc-Ramírez *et al.*, 2015; CONANP, 2018).



**Figura 4.** *Petenes ubicados en la Reserva de la Biósfera de los Petenes (Fotografía M. Magaña-Tzuc, 2019)*

Los Petenes son islotes rodeados de vegetación con alta heterogeneidad que permiten la existencia de múltiples hábitats que sostienen una elevada biodiversidad global (Hernández-Montilla *et al.*, 2016). Son reconocidos por presentar montículos boscosos formados naturalmente, se desarrollan en un terreno ligeramente elevado que escapan de las inundaciones durante la temporada de lluvias, presenta una matriz de praderas naturales, la vegetación se caracteriza por presentar pastizales, selva caducifolia, bosque subcaducifolio, selva espinosa, vegetación hidrófila y manglar. Las especies representativas y emblemáticas son el mangle rojo (*Rizophora mangle*), mangle negro (*Avicennia germinans*), mangle blanco (*Laguncularia racemosa*), mangle botoncillo (*Conocarpus erectus*) y el zapote (*Manilkara zapota*) (Oliva *et al.*, 2014).

De igual forma, está conformado por parches de vegetación secundarios (hubches), arbustos xerofílicos, praderas inundadas estacionalmente y campos agrícolas. Los vertebrados terrestres en la región incluyen 66% de aves, 17% de

mamíferos y 17% de anfibios y reptiles. Las especies de caza tradicionales más importantes son el venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*), el pecarí de collar (*Pecari tajacu*), la paca (*Cuniculus paca*), el pavo ocelado (*Agriocharis ocellata*) y la iguana (*Ctenosaura similis*) (Oliva *et al.*, 2014).

Los Petenes están caracterizados por presentar una matriz de suelo de alta salinidad denominada blanquizal. A su vez los blanquizales son franjas palustres generalmente sin cubierta vegetal (Figura 5), conformada por intrusiones salinas (Smardon & Faust, 2006). Este ambiente extremo de salinidad es favorecido por la alta evaporación del agua durante las cálidas temperaturas de verano superiores a los 30 °C (Chan-Keb *et al.*, 2018). Los mayores valores de salinidad se presentan en la época de secas y los mínimos en la época de lluvias (Toro-Ramírez *et al.*, 2017).

En todos estos ecosistemas naturales con condiciones extremas inusuales pudieran habitar microorganismos novedosos que aún no se han descubierto por la falta de estudios y, por lo tanto, gran parte de la diversidad biológica pudiera perderse antes de ser estudiada (Di Donato *et al.*, 2011). Por tal razón, es importante estudiar y aprovechar estos recursos microbianos en el estado de Campeche para conocer su existencia y uso potencial.



**Figura 5.** Blanquizal ubicado en la Reserva de la Biósfera de los Petenes (Fotografía M. Magaña-Tzuc, 2019).

## **2.2 La salinidad y su efecto en la agricultura**

La salinidad del suelo consiste en la elevada acumulación de sales solubles en agua en el suelo que incluye cationes de sodio ( $\text{Na}^+$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ), calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) (Bensidhoum *et al.*, 2019). La salinización es un fenómeno ambiental global (Figura 6) que cambia la composición química de los recursos hídricos naturales (lagos, ríos y aguas subterráneas), degrada la calidad del suministro de agua para el hogar y sectores de la agricultura, y contribuye a la pérdida de suelo fértil; lo cual ocasiona un colapso en la industria agrícola y pesquera (Ahmad, 2016).



**Figura 6.** Distribución global de afectaciones al suelo por la salinización (Ahmad, 2016).

El origen de la salinidad puede ser por dos vías: la primera puede ser natural o primaria, por la cercanía y la altura sobre el nivel de mar, la intemperización y la existencia de sales que se agudizan en condiciones heterogéneas de microtopografía o a las propiedades físico-químicas del perfil del suelo, como son la textura, la estructura, la porosidad, la permeabilidad, la capacidad de retención de humedad y de intercambio catiónico (Li *et al.*, 2017; Bensidhoum *et al.*, 2019). La segunda, es el resultado de las incorrectas prácticas agrícolas del suelo y el mal manejo del agua para el riego, lo cual permite la movilización de las sales dentro del suelo y el transporte de las mismas a nuevos sitios. Esto es conocido como proceso de salinidad antrópica o secundaria (Li *et al.*, 2017; Bensidhoum *et al.*, 2019). Un ejemplo de lo anterior, son las altas tasas de fertilización química con nitrógeno (N) que han dado lugar a una salinización y acidificación secundaria en el suelo en ecosistemas agrícolas intensivos (Shen *et al.*, 2016).



Por su parte, se le denomina suelo salino, cuando la concentración de sales minerales es superior al 0.2% (p/v), y cuando la conductividad eléctrica (CE) es superior a  $4 \text{ dSm}^{-1}$  (40 mM de NaCl) en la zona de la raíz y con sodio intercambiable <15%. Los suelos afectados por sales se pueden clasificar como: salinos, sódicos y alcalinos, y a menudo presentan una costra de sal blanca o gris y con  $\text{pH} \leq 8.5$  (Lamz & González, 2013; Canfora *et al.*, 2015). La salinización del suelo, es el segundo factor limitante después de la sequía en la agricultura, debido a que disminuye la producción de cultivos e impacta negativamente en el crecimiento de las plantas, y por lo tanto, en la economía en todo el mundo, principalmente en las regiones áridas y semiáridas (Zhao *et al.*, 2020).

Actualmente, a nivel mundial se estima que más de 835 millones de ha (Mha) de suelos agrícolas se encuentran afectados por la salinización, lo que equivale a más del 34% de la tierra cultivada de todo el mundo. Se distribuyen en los continentes de la siguiente manera: el primer lugar lo ocupa Asia con una superficie afectada de 444 Mha, el segundo lugar América con 238 Mha, el tercer lugar Europa con 80 Mha y finalmente África con 73 Mha (Ahmad, 2016; FAO, 2016).

Por su parte, en México, a partir de la información topográfica y geológica, se estima que el 30% de su superficie agrícola está afectada por la salinidad, lo que representa 1.7 Mha. Estas áreas se caracterizan por presentar una gran cantidad de sales disueltas de tipo carbonatos, sulfatos y yesos en una profundidad de 8-10 mm en el suelo, repercutiendo negativamente en la productividad y en la calidad de sus cosechas (Hernández *et al.*, 2016; Etesami & Noori, 2019).

La exposición a la salinidad puede inducir estrés primario incluyendo estrés hiperosmótico o hiperiónico o secundario (explosión oxidativa), interrumpiendo así varias respuestas fisiológicas de las plantas (Hayat *et al.*, 2020). Sin embargo, las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (por sus siglas en inglés PGPB) halófilas pueden aliviar el estrés salino, influyendo en el crecimiento y la resistencia de las plantas directa o indirectamente. Estas bacterias actúan directamente cuando producen varios tipos de moléculas bioactivas (antibióticos, sideróforos, enzimas hidrolíticas extracelulares, etc.), capaces de reducir o evitar la proliferación de patógenos y plagas, así como al lisar las células fúngicas patógenas (biocontrol) (Masmoudi *et al.*, 2019). De forma indirecta, cuando sintetizan compuestos que facilitan la absorción de nutrientes esenciales del suelo y actúan como inductores de un amplio espectro de vías de señalización como provisión de nitrógeno, secuestro de hierro a través de sideróforos, solubilización de fosfato, entre otros (Masmoudi *et al.*, 2019). Además, este tipo de bacterias tienen versatilidad catabólica y producen una amplia gama de metabolitos que contribuyen al crecimiento de las plantas mientras resisten condiciones de estrés biótico y abiótico (Upadhyay & Singh, 2015).

En este sentido, se ha visto que las plantas se asocian con microorganismos para poder crecer en suelos salinos (Etesami & Beattie, 2018). Por ello, recientemente se ha prestado atención a las bacterias presentes en suelos hipersalinos y se han llevado a cabo investigaciones rigurosas para identificar cepas bacterianas halófilas que promuevan el crecimiento de las plantas. Entre los principales mecanismos de promoción de crecimiento se encuentra la fijación de

nitrógeno, solubilización de fósforo, potasio, zinc y silicio, producción de enzima ACC desaminasa (1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa), producción de sideróforos y fitohormonas como ácido indol-3-acético (AIA) (Jiang *et al.*, 2018; L. Bensidhoum *et al.*, 2019; Saghafi *et al.*, 2019).

### **2.3 Microorganismos**

Los microorganismos son parte fundamental de los ecosistemas, la vida en la tierra no sería posible sin la presencia de estos organismos puesto que constituyen el 60% de la biomasa en la tierra, además de que realizan la mayoría de los ciclos biogeoquímicos (carbono, nitrógeno, fósforo y azufre) así como la supresividad de patógenos vegetales. Por tanto, sus funciones son fundamentales para mantener el equilibrio de los agroecosistemas (Beltrán, 2015; Delgado-Baquerizo *et al.*, 2016; Shen *et al.*, 2016).

De igual forma, los microorganismos (epífitos, endófitos y rizosféricos) son de importancia en la producción agrícola. Por ejemplo, se ha visto que las comunidades microbianas participan en ciertas características esenciales como la comunicación con las raíces de las plantas (compuestos orgánicos volátiles), el ciclo de nutrientes (N, C) y la protección y crecimiento de las plantas (antibiosis y fitohormonas, respectivamente) (Upadhyay & Singh, 2015; Qin *et al.*, 2016). En las raíces las interacciones microbianas pueden involucrar microorganismos endofíticos o de vida libre, y éstos pueden ser simbióticos o asociativos. Los simbiontes beneficiosos incluyen bacterias fijadoras de nitrógeno, como las rizobacterias quienes se asocian con algunas leguminosas (Maróti & Kondorosi,

2014). Los microorganismos asociativos de vida libre contribuyen en la nutrición de las plantas a través de diversos mecanismos, incluidos los efectos directos sobre disponibilidad de nutrientes (por ejemplo, fijación de N por diazotróficas y movilización de P por muchos otros microorganismos), mejoran el crecimiento de la raíz (a través de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, por sus siglas en inglés PGPR), como antagonistas a patógenos de la raíz mediante la secreción de ácidos orgánicos (Turner *et al.*, 2013), o como saprófitos que descomponen algunos compuestos del suelo y posteriormente, aumentan la disponibilidad de nutrientes a través de mineralización (Beltrán, 2015).

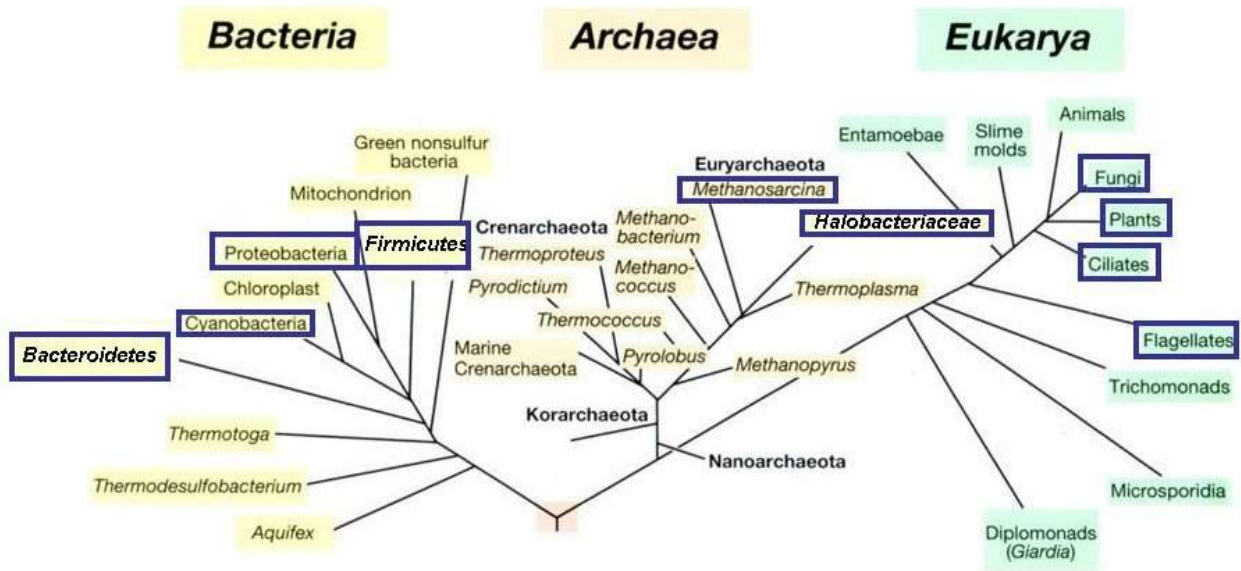
A pesar de las propiedades antes mencionadas, solo un número reducido de estos microorganismos han sido utilizados por el hombre logrando un éxito comercial, muchas veces por su incapacidad para ofrecer mejores propiedades de las ya existentes en el mercado (Amjres *et al.*, 2015). No obstante, solo una pequeña fracción de los microorganismos del suelo se han estudiado, la mayor parte de la diversidad microbiana permanece sin describir (Delgado-Baquerizo *et al.*, 2018). Por lo tanto, se requiere bioprospección de nuevos recursos microbianos autóctonos que puedan mejorar el crecimiento y la resistencia de las plantas en suelos con estrés biótico y abiótico (Masmoudi *et al.*, 2019).

En relación a comunidades microbianas halófilas, la mayoría de los estudios se centran principalmente en comunidades acuáticas y tapetes microbianos, mientras que muy poco en caracterizar suelos y sedimentos hipersalinos (Pandit *et al.*, 2015). Sin embargo, los suelos salinos tienen un potencial biotecnológico en sus comunidades microbianas. Estos microorganismos representan no solo una reserva

genética con aplicaciones biotecnológicas en la mejora y conservación de ambientes salinos, ya que pueden servir como sistemas modelos para explorar las relaciones entre diversidad y actividad a nivel del suelo (Canfora *et al.*, 2015).

### **2.3.1 Microorganismos halófilos**

El término “halófilo” viene del griego, donde “halo” es sal y “filo” es “amante de” es decir, significa “amante de la sal”. Por lo tanto, los microorganismos halófilos son aquellos microorganismos que son capaces de vivir bajo condiciones extremas de salinidad, pero se diferencian de los halotolerantes porque son capaces de reproducirse y realizar sus funciones metabólicas de una manera más eficaz en presencia de altas concentraciones de sales que en su ausencia. Los microorganismos halófilos se encuentran ampliamente distribuidos en diversas áreas geográficas de la tierra, como lagos salinos, salinas o marismas con ambientes hipersalinos (Setati, 2010; Pandit *et al.*, 2015). La diversidad filogenética de los microorganismos halófilos es muy amplia ya que se encuentran distribuidos en los tres reinos de la vida: Bacteria, Archaea y Eukarya (Figura 7) (Oren, 2008; Quillaguamán *et al.*, 2010).



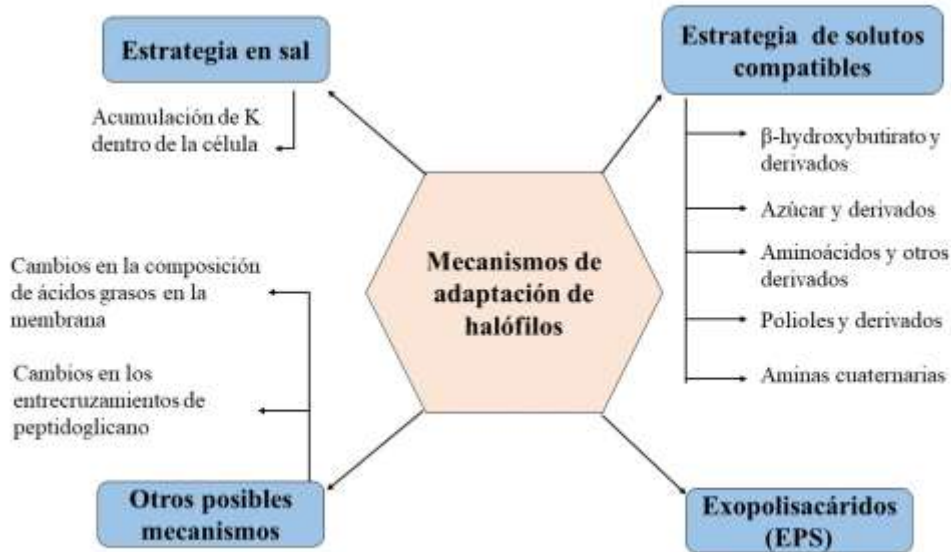
**Figura 7.** Árbol filogenético basado en la secuencia de la subunidad pequeña 16S rRNA y la distribución de microorganismos halófilos (Oren, 2008).

A su vez, la diversidad metabólica de los halófilos también es grande e incluye fotótrofos oxigénicos y anoxigénicos, heterótrofos, aeróbicos, fermentadores, denitrificadores, reductores de sulfato y metanógenos (Oren, 2002). Aunque no todos los microorganismos halófilos tienen los mismos requerimientos de sal, por lo que tienden a agruparse en función de la concentración de sales que necesitan para tener un crecimiento óptimo. De acuerdo con (Kushner, 1985) se considera los siguientes grupos (Cuadro 3):

**Cuadro 3.** Categorías de microorganismos halófilos establecidos por Kushner, 1985

Categoría	Concentración de sal	
	Intervalo	Óptimo
No halófilos	0-1.0	<0.2 M
Halotolerante	0.2-0.4	0.2-0.4 M
Halófilos moderados	0.5-3.5	0.5-2.0 M
Halófilos extremos	2.0-5.2	>3.0 M

Los iones de sodio son dañinos para el funcionamiento de la célula, sin embargo, todos los microorganismos halófilos cuentan con estrategias que les permiten enfrentar el estrés osmótico como: mecanismos de transporte potentes, generalmente basados en antiportadores de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  para expulsar los iones de sodio del interior de la célula, asimismo, mantienen altas concentraciones intracelulares de sal y sintetizan solutos compatibles que les permiten balancear su presión osmótica (González-Hernández & Peña, 2002). Existen tres diferentes mecanismos principales que los microorganismos halófilos han desarrollado para adaptarse al estrés osmótico (Figura 8) entre ellos se encuentra los mecanismos de *salt-in*, solutos compatibles y exopolisacáridos (Kumar *et al.*, 2019).



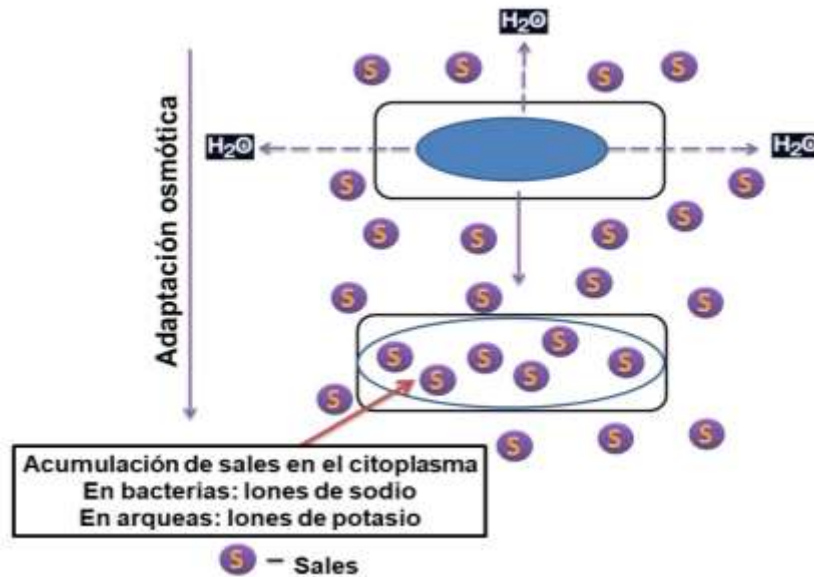
**Figura 8.** Principales mecanismos de adaptación de los microorganismos halófilos en ambientes salinos (Choudhary *et al.*, 2016).

### 2.3.1.1 Mecanismo de Salt-in

Es un proceso que consiste en un equilibrio osmótico en las células acumulando altas concentraciones en el citoplasma de sales inorgánicas, tales como iones de potasio, sodio y cloruro (Mokashe *et al.*, 2018). Este mecanismo requiere que todas las proteínas intracelulares sean estables y activas en presencia de altas concentraciones molares de potasio y otras sales. Se ha observado que los microorganismos halófilos muestran adaptaciones moleculares dentro de las cuales existe un exceso de aminoácidos con carácter ácido y pocos aminoácidos hidrofóbicos en sus proteínas (Thombre *et al.*, 2016).



Esta estrategia es típico de Arqueas y se ha mostrado hasta ahora en un solo grupo, dentro del dominio Bacteria, orden Haloanaerobiales, que consiste en anaerobios, fermentativos u homoacetogénicos (Ramírez. *et al.*, 2006; Oren, 2010) siendo observado especialmente en *Salinobacter ruber*, *Salinibacter* spp. Las arqueas acumulan potasio intracelular y excluyen el sodio, mientras que las bacterias acumulan sodio en lugar de potasio (Figura 9), lo que conduce a una mayor concentración de estos iones en las células opuestas al ambiente salino. La captación o expulsión de iones de las células juega un papel importante, el de la regulación aniónica en la osmoadaptación. La osmoadaptación se refiere a los cambios fisiológicos y genéticos que se producen frente a la escasa actividad del agua, en la cual las bacterias halófilas desarrollan esta característica para compensar la alta presión osmótica del medio (Mohammadipanah *et al.*, 2015). En el caso de las arqueas, el ion cloruro tiene un papel importante en la osmorregulación en diferentes grupos, principalmente aerobios de la familia *Halobacteriaceae* de los géneros *Haloquadratum*, *Halorhabdus*, *Natronobacterium*, *Natronococcus* y *Halobacterium*, quienes usan sales inorgánicas casi exclusivamente para el equilibrio osmótico (Kanekar *et al.*, 2012).



**Figura 9.** Estrategia adaptativa de microorganismos halófilos en ambientes salinos por mecanismo *salt in* (Mokashe *et al.*, 2018).

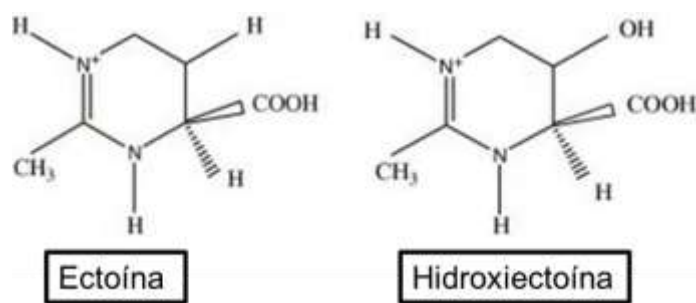
### 2.3.1.2 Solutos compatibles

Este mecanismo adaptativo funciona mediante la acumulación y/o síntesis *de novo* de solutos orgánicos (zwitteriónico, aniónico y catiónico) de bajo peso molecular en la célula, al tiempo que excluye las sales del citoplasma tanto como sea posible, para equilibrar la presión osmótica (Figura 10). Estas pequeñas moléculas orgánicas y osmóticamente activas se denominan “solutos compatibles” (Mokashe *et al.*, 2018). Los solutos compatibles se denominan así porque, incluso a altas concentraciones en el citoplasma, no interfieren con los procesos celulares vitales y pueden ser sintetizados por microorganismos halotolerantes/halófilos o acumulados por la absorción del medio circundante (Mohammadipanah *et al.*, 2015). Estos solutos, una vez acumulados en el citosol celular, mantienen el equilibrio osmótico (concentración de electrolitos, presión de turgencia y volumen



ectoína (ácido carboxílico 1,4,5,6-tetrahidro-2-metil-4-pirimidina) aumenta en la fase estacionaria (Mohammadipanah *et al.*, 2015).

Las ectoínas son comunes en las Eubacterias heterotróficas aeróbicas. A diferencia de la betaína, las ectoínas y las hidroxiectoínas (Figura 11) solo pueden obtenerse mediante procedimientos biotecnológicos. Por ejemplo, *Halomonas elongata*, es una bacteria extremadamente halotolerante utilizada en procesos biotecnológicos conocido como “ordeño bacteriano” para la producción de estos compuestos (Kanekar *et al.*, 2012). Esta cepa produce, al igual que otros halófilos o halotolerantes, los solutos compatibles en respuesta a la salinidad del medio.



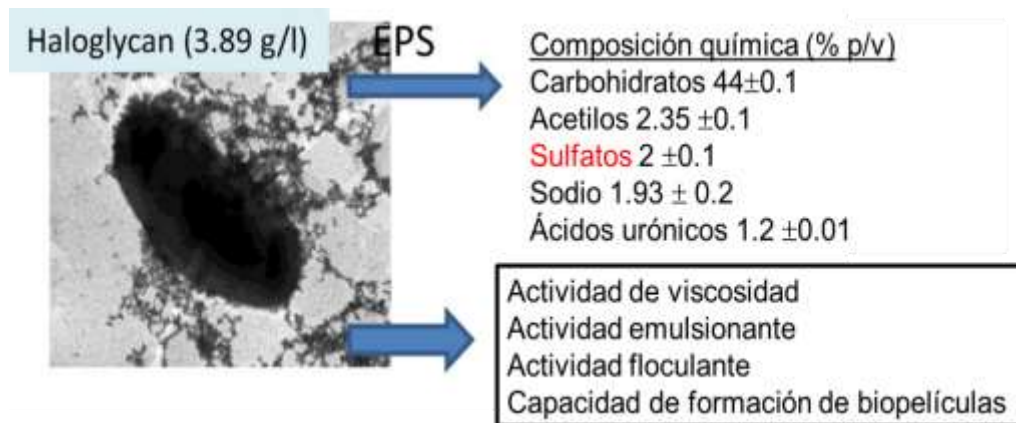
**Figura 11.** Estructura química de la Ectoína e Hidroxiectoína producida por *Halomonas elongata*

### 2.3.1.3 Exopolisacáridos

Por otro lado, los microorganismos halófilos también han desarrollado otros mecanismos para adaptarse a los ambientes salinos, cambiando la composición de su célula especialmente sobre los exopolisacáridos (EPS). Muchos microorganismos halófilos poseen una cápsula de EPS alrededor de la célula, que ayuda a proteger la integridad de su membrana. Exopolisacárido es un término que se utilizó por primera vez por Sutherland, para describir polímeros de carbohidratos

de alto peso molecular producidos por bacterias halófilas (Nicolaus *et al.*, 2010). Los EPS son polímeros de alto peso molecular que están compuestos de residuos de azúcar y son secretados por microorganismos en el medio ambiente circundante. Generalmente se componen de monosacáridos y algunos sustituyentes no carbohidratos (como acetato, piruvato, succinato y fosfato). Debido a la gran diversidad en la composición, los EPS han encontrado múltiples aplicaciones en diversas industrias alimenticias y farmacéuticas como emulsionantes, agentes gelificantes y para la recuperación de aceite (Nicolaus *et al.*, 2010).

Los productores de EPS más comunes pertenecen al género de *Halomonas*, principalmente entre las especies se pueden encontrar *H. maura*, *H. eurihalina*, *H. ventosae*, *H. anticariensis* y *Halomonas* sp. Los EPS sintetizados por las cepas de *Halomonas* tienen diferentes composiciones químicas y propiedades funcionales. Sin embargo, comparten el carácter en común de ser heteropolímeros sulfatados y que contienen una cantidad significativa de ácido urónico (Figura 12) que determina sus buenas propiedades gelificantes (Demian & Adrio, 2007). Por ejemplo, Amjres *et al.*, 2015, reportaron un aumento en la producción del EPS haloglicano en la fase de crecimiento exponencial (3.89 g/L de medio) en la bacteria *H. stenophila* HK30, aislada de un humedal salino en Brikcha, Marruecos.

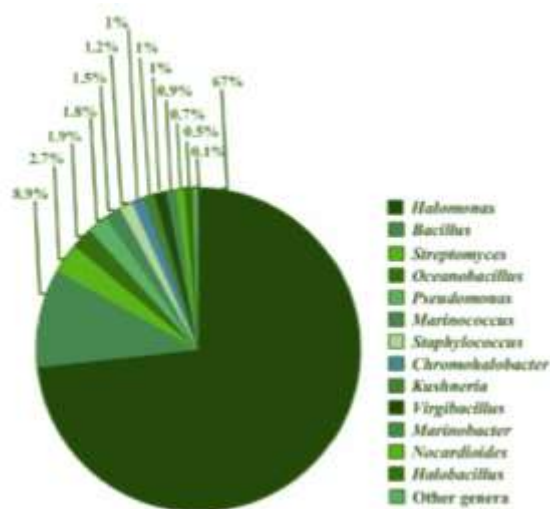


**Figura 12.** Estructura y composición del exopolisacárido haloglicano (Amjres *et al.*, 2015).

### 2.3.2 Dominio Bacteria

Este dominio contiene muchos tipos de microorganismos halófilos y halotolerantes, entre éstos se encuentran algunos representantes de las proteobacterias, cianobacterias y actinomicetos (Kumar *et al.*, 2019). Una característica en los halófilos bacterianos es la ausencia de peptidoglicano en sus paredes celulares, se cree que la carencia de peptidoglicano se debe a una incapacidad para sintetizar ácido murámico (González-Hernández & Peña, 2002). La fisiología intracelular de los organismos halófilos extremos está dominada por la masiva acumulación de  $K^+$  y  $Cl^-$  y por una eficaz exclusión del  $Na^+$ . Este hecho fue demostrado por Christian y Waltho, quienes encontraron que *Halobacterium salinarium*, al crecer hasta la fase estacionaria en un medio que contenía 4 M de NaCl y 0.03 M de KCl, acumuló  $K^+$  hasta una concentración de 4.5 M y concentraciones de  $Na^+$  y  $Cl^-$  de 1.4 y 3.6 M, respectivamente (Christian & Waltho, 1962). Entre las bacterias halófilas se pueden encontrar los géneros *Halomonas*,

*Pseudomonas*, *Oceanobacillus*, *Flavobacterium*, *Halovibrio*, *Deleya* y *Chromobacterium*, sin embargo, los estudios filogenéticos revelan que la mayoría de las especies pertenecen a los géneros *Halomonas* y *Streptomyces* (Mohammadipanah *et al.*, 2015; Etesami & Glick, 2020), *Bacillus* es considerado como el segundo género frecuentemente reportado en suelos salinos (Figura 13), recientemente se aclararon relaciones evolutivas entre las especies de este género (Patel & Gupta, 2020; R. Gupta *et al.*, 2020).



**Figura 13.** Géneros bacterianos halófilos frecuentemente reportados en suelos salinos (Etesami & Glick, 2020).

De igual forma, se pueden encontrar algunas actinobacterias halófilas, las cuales son capaces de producir una cantidad de metabolitos secundarios que le permiten su supervivencia en hábitats extremos. Muchos de estos metabolitos son considerados como compuestos bioactivos únicos y pertenecen a una amplia variedad de clases químicas como terpenos, policétidos, péptidos y alcaloides con estructuras y actividades farmacológicas variables (Qin *et al.*, 2016). Por lo cual,

han sido considerados como un recurso valioso para la producción de compuestos bioactivos con propiedades antimicrobianas, antineoplásicas, antivirales, antimitóticas y neurotóxicas (Ghosh *et al.*, 2019).

### **2.3.3 Dominio Arquea**

En este dominio se distribuyen seis géneros, de los cuales cuatro incluyen miembros que crecen a pH neutro: *Halobacterium*, *Haloferax*, *Haloarcula* y *Halococcus*. Los miembros pertenecientes a los géneros *Natronobacterium* y *Natronococcus* requieren condiciones alcalinas para su crecimiento. Dentro de la especies más estudiadas se encuentra a *Halobacterium halobium* (Ramírez. *et al.*, 2006).

Las Haloarchaeas (orden Halobacteriales) tienen características de arqueas típicas, como los lípidos ligados al éter. Las densidades celulares son tan altas que hacen que las salmueras se vuelvan rojas, lo que alienta aún más la evaporación al atrapar la radiación solar. Este color es causado por los pigmentos conocidos como carotenoides que protegen a las células de los efectos dañinos de la luz ultravioleta. Este tipo de metabolitos son uno de los principales que producen las arqueas bajo altas concentraciones de sal (McGenity *et al.*, 2000).

De igual forma, las Haloarqueas que viven en ambientes con alto contenido de sal, producen más proteínas constituidas en aminoácidos ácidos que en aminoácidos básicos, por ejemplo, la bacteriorrodopsina y halorrodopsina (González-Hernández & Peña, 2002). Estas proteínas requieren altas concentraciones de sal para una actividad óptima (Mevarech *et al.*, 2000), y han



ganado la atención de varios investigadores por su aplicación biotecnológica en diversos campos (agricultura, tratamiento de aguas residuales, campo médico y bioplásticos). El interés se ha dirigido principalmente hacia enzimas específicas (glicosil hidrolasas, proteasas, lipasas y esterasas) y productos (biopolímeros y tensioactivos) producidos por Haloarqueas con una posible aplicación en procesos industriales (Margesin & Schinner, 2001). Muchas de las enzimas mencionadas anteriormente son extracelulares, por lo que es más fácil su aislamiento y purificación. Además, debido a que muchas Haloarchaeas pueden crecer a baja salinidad, es posible disminuir la concentración de cloruro de sodio manipulando el medio de crecimiento, obteniendo una buena producción de enzimas (Di Donato *et al.*, 2011).

#### **2.3.4 Dominio Eukarya**

Una de las características principales del dominio Eukarya es la acumulación de glicerol o inositol para el equilibrio osmótico (Roberts, 2006). Este dominio, posee el único miembro omnipresente en ambientes con alto contenido de sal: el alga verde *Dunaliella* sp., que es considerado halotolerante ya que puede sobrevivir a un amplio intervalo de concentraciones de sal. Algunas especies de *Dunaliella* son productoras de  $\beta$ -caroteno y tienen una gran demanda como antioxidante, como fuente de provitamina A (retinol) y como agente colorante de alimentos (Oren, 2010).

Asimismo, una variedad de especies de diatomeas como *Amphora coffeaeformis*, *Nitzschia* sp. y *Navicula* sp. resisten concentraciones de sal de hasta 0.3 M (DasSarma, 2006). Además de éstos microorganismos halófilos, se encuentran los camarones de salmuera *Artemia* sp. (Oren, 2002), la levadura

halotolerante *Debaromyces hansenii* aislada del agua de mar (Buchalo *et al.*, 2000), algunos hongos como *Trimmatostroma salinum* y la levadura negra *Hortaea werneckii* los cuales son considerados halófilos en función de sus características como son su requisito absoluto de alto contenido de hasta 1.5-3.5 M de NaCl y su capacidad de crecer en ambientes iónicos saturados (Maheshwari & Saraf, 2015).

#### **2.4 Aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos halófilos**

En el mundo globalizado se ha incrementado la demanda de nuevos productos y procesos tecnológicos, y existiendo una gran tendencia en el mercado de usar fuentes menos contaminantes para obtener diferentes productos; lo cual abre gran expectativa y futuro para la biotecnología blanca, la cual se basa en la producción de sustancias químicas utilizando microorganismos o productos a partir de ellos (Zavaleta, 2006). El objetivo de la biotecnología industrial es desarrollar alternativas que garanticen una producción basada en microorganismos amigables con el medio ambiente, pero el alto costo del bioprocesamiento es un grave inconveniente, por lo tanto, se deben desarrollar nuevos enfoques para superar este desafío. Los microorganismos halófilos han sido utilizados por el hombre y han demostrado este potencial (Figura 14) por desarrollar un bioproceso no contaminante continuo y estéril (Oren, 2010) por el alto contenido de sal de los medios de crecimiento/producción garantizando el ahorro de energía y tiempo, por lo que consecuentemente se reducen los costos de producción (Wang *et al.*, 2014; Ghosh *et al.*, 2019). Por ejemplo, en comparación con las enzimas mesófilas, los organismos halófilos pueden producir enzimas capaces de resistir mucho mejor las

condiciones de reacción industrial, generando rendimientos y ventajas económicas (Mohammadipanah *et al.*, 2015).



**Figura 14.** Aplicaciones biotecnológicas de los compuestos presentes en bacterias halófilas y sus usos industriales (Choudhary *et al.*, 2016).

Por tal razón, los microorganismos halófilos tienen diversas aplicaciones que van desde la industria alimentaria hasta la biomédica. Asimismo, se ha demostrado que los microorganismos halófilos son esenciales en diversos procesos industriales, farmacéuticos y en la agricultura (Liu *et al.*, 2019), algunos ejemplos se presentan en la (Cuadro 4)

:

\*

**Cuadro 4.** Aplicaciones en diferentes aspectos económicos de las bacterias halófilas

Microorganismos halófilos	Géneros	Aplicaciones	Referencias
En la industria	<i>Bacillus subtilis</i>	Salsas fermentadas y modificadoras de sabor y texturas en alimentos. Transformación y degradación de desechos	(Ghosh <i>et al.</i> , 2019)
	<i>Fillobacillus</i> sp.		
	<i>Vibriobacillus</i> spp. SK33		
	<i>Staphylococcus</i> sp. SK-1-5		(Zhuang <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Bacillus</i> sp.	Proteasas (Síntesis peptídica) Xilanasas	(Sinha & Khare, 2013)
	<i>Bacillus aquimaris</i>		
	<i>Bacillus cererus</i>	Bacteriorrodopsina (Interruptores ópticos y generadores fotónicos de corriente en dispositivos bioelectrónicos)	(Kanekar <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Bacillus subtilis</i>		
	<i>Halobacillus salinus</i>		
	<i>Virgibacillus</i> sp.		
<i>Pseudomonas</i> sp.			
<i>Chromohalobacter</i> sp.		(Kaplan <i>et al.</i> , 2018)	
<i>Bacillus pumilis</i>	Actividad biofloculante de sustancias exopoliméricas (EPS)	(Nicolaus <i>et al.</i> , 2010)	
<i>Chromohalobacter</i> sp.			
<i>Halobacterium</i> sp.			
<i>Halobacterium salinarum</i>			
<i>Halomonas</i> sp. AAD6			
<i>Halobacillus</i> sp.			
En la farmacéutica	<i>Bacillus</i> sp.	Metabolitos anticancerígenos	(He <i>et al.</i> , 2001)
	<i>Streptomyces</i> sp.		
	<i>Halomonas stenophila</i>		

\*

	<i>Bacillus</i> sp. <i>Halomonas boliviensis</i> <i>Cobetia marina</i>	Polihidroxicanoatos (Plásticos de uso en medicina)	(García-Torreiro <i>et al.</i> , 2016)
	<i>Micromonospora</i> sp. <i>Streptomyces</i> sp. <i>Halomonas salina</i> <i>Salinivibrio</i> sp. <i>Marinobacter lipolyticus</i>	Glicerol (Productos farmacéuticos) Membranas (Surfactantes para productos farmacéuticos) Lípidos (Liposomas para liberación de fármacos y cosméticos)	(Kawata & Aiba, 2010)  (Chen & Wan, 2017)
<b>En la agricultura</b>	<i>Bacillus</i> sp. <i>Halobacterium</i> sp. <i>Halobaiills</i> sp. <i>Streptomyces</i> sp. <i>Staphylococcus aureus</i>  <i>Streptomyces bikiniensis</i> <i>Halobacterium salinarium</i>  <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Bacillus</i> sp. <i>Halomonas shengliensis</i> <i>Virgibacillus</i> sp.	Metabolitos antimicrobianos  Polímeros reológicos (Recuperación de petróleo)  Biorremediación de metales (Cd)	(Todkar <i>et al.</i> , 2012)  (Yadav <i>et al.</i> , 2017) (Martínez-Espinosa <i>et al.</i> , 2007)  (Lefebvre & Moletta, 2006)

### 2.4.1 Producción de enzimas

En procesos industriales las enzimas se someten a diferentes condiciones extremas como por ejemplo, de sal o temperatura, por lo que la estabilidad y caracterización de las enzimas halófilas extra e intracelulares es un factor importante. Las proteasas de los microorganismos halófilos muestran una actividad y estabilidad superiores en condiciones extremas como alta alcalinidad, alta temperatura y alta salinidad, así como en presencia de solventes orgánicos, líquidos iónicos y vibraciones ultrasónicas (Mokashe *et al.*, 2018). Las proteasas halófilas poseen amplias aplicaciones en la industria de detergentes, cerveza, alimentos, curtido de cuero e industria farmacéutica. Se han informado muchas proteasas de varios géneros bacterianos como *Bacillus* sp. (Sinha & Khare, 2013).

Por su parte, las lipasas de microorganismos halófilos se utilizan en la producción de ácidos grasos, en la cocción, en detergentes, como biocatalizadores en el procesamiento de diesel y para la conversión de aceite vegetal en combustible (Ghosh *et al.*, 2019). Una de las lipasas más importantes perteneciente a las glicosilhidrolasas es la agarasa que cataliza la hidrólisis del agar. Asimismo, las lipasas de los microorganismos halófilos degradan algunos lípidos ligados a la pared celular de los hongos fitopatógenos por lo que son de gran importancia en la agricultura (Etesami & Glick, 2020). Las agarasas se utilizan en experimentos de biología molecular y en la extracción de compuestos bioactivos de algas (Mohammadipanah *et al.*, 2015).

Las xilanasas de los microorganismos halófilos degradan parte del xilano de la hemicelulosa que es considerado como el segundo recurso renovable natural y más abundante. Estas enzimas son utilizadas para eliminar la lignina residual de la pulpa (Mohammadipanah *et al.*, 2015). Las enzimas celulolíticas halófilas se utilizan para la biotransformación de polímeros de plantas y animales en productos útiles como los biocombustibles. Se conocen como enzimas de importancia en las industrias del papel, la alimentación y lavandería.

#### **2.4.2 Producción de polihidroxicanoatos**

Los polihidroxicanoatos (PHA) son los bioplásticos más versátiles que tienen propiedades similares con los plásticos a base de petróleo. Como una familia de poliéster biodegradable y biocompatible, el PHA podría desarrollarse en una cadena de valor industrial que abarca desde bioplásticos, biocombustibles y productos químicos hasta implantes sintéticos (Chen & Patel, 2012; Liu *et al.*, 2019).

En los microorganismos halófilos también se han explorado por su potencial para producir bioplásticos como los PHA (Ghosh *et al.*, 2019). Entre los halófilos productores de PHA, las *Haloarchaea* son el grupo más importante (Koller, 2019). Recientemente, se detectó que la acumulación de PHA por las células bacterianas las protege de ambientes hipertónicos, lo que indica que la acumulación de PHA es una estrategia de adaptación adicional hacia la salinidad del medio ambiente (Sedlacek *et al.*, 2019). *Haloferax mediterrani* es una especie de las más estudiadas de la familia Halobacteriaceae, ya que es capaz de producir 48.6 mg de polihidroxibutirato (PHB) (Liu *et al.*, 2019).

Asimismo, en un estudio, realizado por Weiss *et al.*, (2017), reportaron que el co-cultivo de la cianobacteria *Synechococcus* y la bacteria halófila *Halomonas boliviensis*, resulta en la acumulación de 28.3 mg de PHB. Por lo tanto, la producción de PHA y PHB por las bacterias es una estrategia para protegerse de ambientes hipersalinos y que pueden ser utilizados en la biotecnología.

## **2.5 Aplicaciones de las bacterias halófilas en la agricultura**

La presión de selección impuesta por la sal y la adaptación de los microorganismos halófilos a estas condiciones, los hace candidatos para ser utilizados como promotores de crecimiento vegetal en cultivos con condiciones de suelos salinos como biofertilizantes, principalmente debido a sus características beneficiosas que incluyen la capacidad de sintetizar compuestos activos biológicos como estimuladores del crecimiento vegetal, osmolitos y enzima desaminasa 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC desaminasa) (Egamberdieva *et al.*, 2017; Etesami & Alikhani, 2019). Asimismo, como agentes de biocontrol contra hongos fitopatógenos ya que son capaces de sintetizar compuestos antifúngicos (Zhuang *et al.*, 2010; Egamberdieva *et al.*, 2017). Estudios previos han demostrado que las bacterias halófilas son beneficiosas para las plantas ya que mejoran el crecimiento de las plantas, la adquisición de nutrientes y la tolerancia a diversos estreses abióticos como la sequía y la salinidad, además de que controlan las enfermedades fúngicas de las plantas (Egamberdieva *et al.*, 2017). Algunos de estos ejemplos se enlistan en el siguiente (Cuadro 5):



**Cuadro 5.** Aplicaciones de las bacterias halófilas como biofungicidas/biofertilizantes

Aplicación	Bacterias halotolerantes	Modo de acción	Concentración de. NaCl	Cultivo	Efectos en la planta	Referencias
Biofungicidas	<i>Bacillus subtilis</i> J9 <i>Halomonas sp.</i> K2-5	-	2900 mM	Tomate	Reducción en lesiones causadas por <i>Botrytis cinerea</i>	(Sadfi-Zouaoui <i>et al.</i> , 2007)
	<i>Bacillus sp.</i>	Producción de Lipopéptidos Sideróforos Enzimas líticas Toxinas Excreción de antibióticos	.	Maíz Arroz Tomate	Inhibición de agentes fitopatógenos	(Villarreal-Delgado <i>et al.</i> , 2018) (Mohammadipannah <i>et al.</i> , 2015)
Biofertilizantes	<i>Serratia sp.</i> SL-12	-	150-200mM	Trigo	Aumento en la longitud y biomasa en el sistema radical y aéreo. Acumulación de pigmento fotosintético	(Singh & Jha, 2016)
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 002	Secreción de ácido indol-3-acético (AIA) y actividad desaminasa	150 mM	Maíz	Aumento de la longitud y biomasa radical	(Zerrouk <i>et al.</i> , 2016)

<i>Achromobacter piechaudii</i>	Actividad de AIA y ACC desaminasa	172 mM	Tomate	Aumento de la biomasa en plántulas	(Mayak <i>et al.</i> , 2004)
<i>Azospirillum brasilense</i>	Fijación de N	40, 80 o 120 mM	Trébol blanco	Aumento del crecimiento de las plantas	(Khalid <i>et al.</i> , 2017)
Consortio de <i>Bacillus (alcalophilus, thuringiensis)</i> y <i>Gracilibacillus saliphilus</i>	Solubilización de fosfato y producción de sideróforos	0, 510 y 1030 mM	<i>Arthrocnemun macrostachyum</i>	Resistencia a la salinidad	(Navarro-Torre <i>et al.</i> , 2017)
<i>Klebsiella, Pseudomonas, Agrobacterium</i> y <i>Ochrobactrum</i>	(AIA) y solubilización de (P)	1-20%	Maní	Un aumento en el contenido total de N en brote y raíz	(Sharma <i>et al.</i> , 2016)
<i>Bacillus</i> sp. y <i>Arthrobacter pascens</i>	Solubilización de P y producción de sideróforos	100 mmol/L	Maíz	Aumentó la longitud de brotes y raíces y la masa fresca y seca de brotes y raíces.	(Ullah & Bano, 2015).

### 2.5.1 Biofungicidas

Los fungicidas se utilizan para controlar los patógenos de las plantas en la agricultura, pero el efecto secundario de estos agentes químicos ha generado muchos problemas ambientales y de salud debido al aumento de los residuos químicos en el medio ambiente y desarrollo de resistencia fúngica a los fungicidas sintéticos (Mohammadipanah *et al.*, 2015). Actualmente el uso de bacterias halófilas o halotolerantes aisladas de hábitats naturalmente salinos tiene el potencial de ser utilizados como agentes de protección de plantas en cultivos con condiciones estresantes por salinidad. Estas bacterias al estar expuestas a condiciones estresantes y entornos cambiantes son capaces de producir varios tipos de moléculas bioactivas (antibióticos, sideróforos, enzimas hidrolíticas extracelulares etc.) (Egamberdieva *et al.*, 2017). Entre estas moléculas bioactivas se encuentran los metabolitos secundarios que son sustancias producidas naturalmente que se originan por el metabolismo que no tienen importancia como fuentes de energía o como sustancias de reserva (Mishra & Arora, 2018). Asimismo, las bacterias promotoras del crecimiento vegetal son antagonistas potenciales y son capaces de producir enzimas hidrolíticas que lisan las células fúngicas patógenas (Choudhary *et al.*, 2016), por tal razón pueden desempeñar un papel importante en el control biológico de las enfermedades (Masmoudi *et al.*, 2019). Numerosas bacterias halófilas y halotolerantes poseen estas propiedades destacando como agentes de biocontrol los géneros *Azospirillum*, *Bacillus*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Virgibacillus*, *Halomonas*, *Halobacillus*, *Planococcus*, *Marinococcus*, *Salinococcus* y *Halovibrio* (Choudhary *et al.*, 2016; Mishra & Arora, 2018). Algunas especies de bacterias

halotolerantes pueden actuar como biofertilizantes y biofungicidas, por ejemplo, Bhattacharyya & Jha (2012) observaron cepas de *Burkholderia cepacia* con características de biocontrol contra *Fusarium* spp., las que también pueden estimular el crecimiento del maíz.

### **2.5.2 Biofertilizantes**

Los biofertilizantes son sustancias o productos que contienen células vivas de uno o diferentes microorganismos, que pueden aplicarse a las semillas, o a la superficie de las plantas o el suelo. Se caracterizan por colonizar el exterior o el interior de ellas y promueven su crecimiento mediante un mayor suministro de nutrientes para la planta (nitrógeno y fósforo) a través de importantes procesos biológicos tales como la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfatos (Choudhary *et al.*, 2016; Atieno *et al.*, 2020). Los mecanismos de promoción del crecimiento de las plantas de los biofertilizantes se podrían resumir de la siguiente manera: los biofertilizantes aumentan la tolerancia de las plantas al estrés abiótico (Souza *et al.*, 2015), fijan el nitrógeno atmosférico a través de la nitrogenasa, y solubilizan el fosfato del fosfato roca (Zhu *et al.*, 2018). Por lo tanto, los biofertilizantes son importantes componentes para el manejo integrado de nutrientes. Además, muestran un gran potencial en la producción agrícola sostenible y protegen el medio ambiente (Zhang *et al.*, 2020)

Las plantas al ser organismos sésiles establecen asociaciones con microorganismos para tolerar condiciones estresantes como altas concentraciones de sal. En este sentido, las bacterias halófilas ayudan a las plantas a tolerar estos

efectos negativos de estrés abiótico. Asimismo, desarrollan mecanismos como la secreción de varias fitohormonas, enzimas como la ACC desaminasa, solubilizan fosfato, producen enzimas antioxidantes y sideróforos (Chakraborty *et al.*, 2011; Maheshwari & Saraf, 2015; Giri & Varma, 2019). El uso de bacterias halófilas como promotoras de crecimiento vegetal (PGPB) bajo condiciones de estrés salino se está volviendo una estrategia común en todo el mundo para lograr una agricultura sostenible (Tank & Saraf, 2010; L. Bensidhoum *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2020). Se ha documentado en los géneros *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Flavobacterium* y *Rhizobium*, tres propiedades: su capacidad de sobrevivir y tolerar estrés salino, su capacidad de competir con otros microorganismos a través de la colonización de las raíces, el crecimiento y la reproducción; y su capacidad de aumentar la tasa de crecimiento de las plantas mediante la promoción del crecimiento vegetal (Upadhyay & Singh, 2015; Qin *et al.*, 2016; Saghafi *et al.*, 2019). Los efectos positivos se han demostrado en plántulas de trigo, Upadhyay *et al.* (2011) estudiaron el efecto de PGPB sobre el crecimiento y estrés oxidativo en trigo sembrado en suelo salino e informaron que la co-inoculación de *Bacillus subtilis* y *Arthrobacter* sp. reduce los efectos adversos de la salinidad. Asimismo, Ramadoss *et al.* (2013) estudiaron el efecto de cinco bacterias halotolerantes promotoras del crecimiento de las plantas sobre el crecimiento de trigo y encontraron que la inoculación de esas cepas bacterianas halotolerantes produjo un aumento en la longitud de la raíz del 71.7%, en comparación con los controles positivos no inoculados. Por otro lado, se han realizado estudios en plantas de tomate, los resultados reportados demostraron que los aislados halófilos pudieron solubilizar fosfato, producir fitohormonas, sideróforos

y enzima ACC-desaminasa en condiciones de estrés salino al 2-6% (Tank & Saraf, 2010). Asimismo, se ha demostrado que la aplicación de *Bacillus pumilis* WP8 en plantas de tomate tiene efectos significativos en la mejora de la calidad del fruto bajo condiciones de riego con solución de NaCl al 2% (Shen *et al.*, 2012). Por lo tanto, estos estudios muestran que los aislados bacterianos halófilos pueden utilizarse para la promoción del crecimiento vegetal de plantas bajo estrés salino (Choudhary *et al.*, 2016).

### **2.5.1 Fijación biológica de nitrógeno**

El nitrógeno (N) es el nutriente más importante para el crecimiento y la productividad de las plantas. Aunque hay aproximadamente un 78% de N<sub>2</sub> en la atmósfera, el N del suelo se encuentra principalmente en formas orgánicas y no está disponible para las plantas. La deficiencia de este nutriente en el suelo resulta en una reducción significativa en el crecimiento y rendimiento de la planta (Etesami & Alikhani, 2019). Por otro lado, el uso de fijación biológica de nitrógeno (FBN) es más eficiente y favorable que los fertilizantes químicos. El N<sub>2</sub> atmosférico se convierte en formas utilizables por las plantas por el proceso de FBN, que cambia el N<sub>2</sub> a amoníaco (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) por las bacterias PGPR utilizando un sistema enzimático complejo (nitrogenasa) que contiene dos componentes de metaloproteína de la proteína molibdeno-hierro (MoFe) y proteína de hierro (Fe) (Hu & Ribbe, 2015). En presencia de sal, la capacidad de FBN por los microorganismos se reduce (Maróti & Kondorosi, 2014). Sin embargo, el mecanismo de FBN en los microorganismos halófilos o halotolerantes requiere necesariamente de sales (Staal *et al.*, 2007). Algunos géneros de bacterias halotolerantes fijadoras de N de la familia

Rhizobizaceae son *Azorhizobium*, *Allorhizobium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Mesorhizobium* que fijan el 80% del nitrógeno biológico. Por otro lado, se ha reportado que la cepa halotolerante *Rhizobium* sp. mejoró el crecimiento, la nodulación y el contenido de N en la planta *Acacia ampliceps* a una concentración de 200 mM (Egamberdieva, D. *et al.*, 2017). Además, se ha documentado que 20 cepas de *Halomonas*, con capacidad de fijación de N pueden crecer a una concentración de 5% de NaCl (Etesami & Glick, 2020). Por lo tanto, las bacterias halófilas pueden hacer uso del N<sub>2</sub> atmosférico y convertirlo en una forma asimilable y favorecer el crecimiento de las plantas a pesar de condiciones de estrés por salinidad.

### **2.5.2 Solubilización de fósforo**

El fósforo (P) es un macronutriente que influye en el crecimiento y desarrollo de las plantas, ya que participa en varios procesos bioquímicos como la síntesis de ácidos nucleicos, nucleótidos, fosfolípidos y fosfoproteínas. A diferencia del N, no tiene una fuente atmosférica (Archana *et al.*, 2012). El P en suelos calcáreos se convierte en compuestos insolubles de calcio y magnesio, y en suelos ácidos en fosfatos de hierro y aluminio, se reduce a formas inorgánicas que las plantas no asimilan (Etesami & Alikhani, 2019). Los microorganismos solubilizadores de fosfato están involucrados en la conversión de las formas inorgánicas / insolubles de fósforo en formas solubles que las plantas absorben fácilmente (Choudhary *et al.*, 2016). Muchas cepas bacterianas con capacidad de solubilización de P se han evaluado, pero pocas de ellas son eficientes a altas concentraciones de NaCl (Archana *et al.*, 2012). Por lo tanto, el aislamiento y la aplicación de bacterias halófilas

solubilizadoras de fosfato, facilitan el desarrollo de la agricultura en suelo salino- alcalino (Zhu *et al.*, 2011). Para la solubilización de P, las bacterias halófilas utilizan mecanismos, como las reacciones de intercambio iónico, quelación, acidificación y la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, como los ácidos glucónicos (Jiang *et al.*, 2018; Kalayu, 2019; Etesami & Glick, 2020). Por lo tanto, bajo condiciones de estrés salino, las bacterias halófilas son críticas para la transferencia de P a formas disponibles. Además, se ha reportado que cepas de bacterias con capacidad de solubilizar fosfato incluso en condiciones de alta salinidad (60g.L<sup>-1</sup> NaCl) (Upadhyay *et al.*, 2011). También se ha aislado una bacteria halófila *Kushneria* sp. YCWA18 con capacidad de solubilizar altos niveles de P (Zhu *et al.*, 2011). Asimismo, la bacteria halotolerante *Pseudomonas fluorescens*, es capaz de solubilizar Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> mediante la liberación de ácidos orgánicos, como ácido glucónico, ácido cítrico y ácido succínico (Choudhary, 2012). Por otro lado, aislados halotolerantes de *Klebsiella* sp., *Kosakonia cowanii* y *Sinorhizobium meliloti*, tienen la capacidad de solubilizar P hasta una concentración de 1200 mM de NaCl (Noori *et al.*, 2018). De igual forma, la inoculación de *Pseudomonas* sp. tuvo un efecto favorable sobre la tolerancia a estrés por salinidad con NaCl en maíz (*Zea mays* L.) (Bano & Fatima, 2009). Estos reportes indican que las bacterias halófilas o halotolerantes son capaces de proporcionar el P a las plantas para su crecimiento a pesar de la salinidad.

### **2.5.3 Solubilización de potasio**

El potasio (K) es un macronutriente fundamental para el crecimiento de las plantas después del N y el P. Participa en la activación de varios procesos



metabólicos, incluida la síntesis de proteínas, la fotosíntesis y la activación enzimática (Zahedi, 2016). Desempeña un papel muy importante en la fotosíntesis, la división y el crecimiento celular, la producción de proteínas, la cantidad y la calidad de los productos, y el aumento de la resistencia de las plantas a enfermedades y plagas (Etesami & Alikhani, 2019). También se requiere K para activar más de 80 enzimas diferentes responsables de procesos de plantas y animales como el metabolismo energético, la síntesis de almidón, la reducción de nitratos, la fotosíntesis y la degradación del azúcar (Meena *et al.*, 2015). Este elemento existe principalmente en tres formas diferentes en el suelo. El K utilizable, el K estabilizado y el K mineralizado (mica, ortoclasa e illita) (Saghafi *et al.*, 2019). La salinidad del suelo también ha causado que la deficiencia de K sea una de las principales limitaciones en la producción de cultivos, por lo que el uso de microorganismos halófilos solubilizadores de K puede favorecer la nutrición de las plantas al aumentar las formas solubles de K en el suelo (Etesami & Alikhani, 2019). Se ha reportado que uno de los mecanismos por los que las bacterias halófilas llevan a cabo la solubilización de K, es mediante la secreción de ácidos orgánicos (ácido cítrico, oxálico, tartárico, succínico y  $\alpha$ -cetoglucónico), estos ácidos solubilizan los minerales de K directamente o por quelación de iones de silicio (Archana *et al.*, 2012). Asimismo, la solubilización de K, puede determinarse por la producción de sideróforos y EPS (Saghafi *et al.*, 2019). Ejemplos de géneros bacterianos halófilos solubilizadores de potasio incluyen los géneros *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Paenibacillus* y *Pseudomonas* (Ayangbenro & Babalola, 2020).

#### 2.5.4 Producción de ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos son compuestos de bajo peso molecular caracterizados por la posesión de uno o más grupos carboxilo. Dependiendo del número de estos grupos carboxílicos y sus constantes de disociación, los ácidos orgánicos pueden formar complejos con los cationes y provocar su secuestro con la liberación simultánea de aniones asociados con minerales, así como causar el desplazamiento de los aniones de la matriz del suelo. Ambas propiedades (secuestro de cationes y liberación de aniones) son importantes en los diversos papeles que juegan los ácidos orgánicos en la rizósfera, incluidos varios bioprocesos importantes del suelo, como la disponibilidad de nutrientes (Archana *et al.*, 2012).

La secreción de ácidos orgánicos por las bacterias halófilas, ya sea por quelación o por acidólisis ha sido el principal factor responsable del aumento de la solubilización de P y K. La eficacia como biofertilizantes está determinada por la naturaleza y la cantidad de ácidos orgánicos secretados (Archana *et al.*, 2012). La mayoría de los ácidos orgánicos secretados se forman como productos finales o subproductos de la fermentación de azúcares y polisacáridos y la base bioquímica y molecular de la secreción de ácidos orgánicos está bien establecida en varios géneros. Sin embargo, la secreción de ácidos orgánicos depende no sólo del potencial metabólico del organismo sino también de la fisiología de la planta, ya que los exudados de las raíces son la principal fuente de carbono (Archana *et al.*, 2012). Existen reportes que indican que las bacterias halófilas pertenecientes los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* son capaces de producir hasta ocho diferentes ácidos

orgánicos (ácido glucónico, ácido fórmico, ácido málico, ácido láctico, ácido succínico, ácido cítrico y ácido propiónico). Se ha observado que la mayor solubilización de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  posiblemente está relacionada con la producción de ácido propiónico y oxálico (Jiang *et al.*, 2018). Otros ejemplos de especies bacterianas halófilas reportadas como productoras de ácidos orgánicos son *Azotobacter niger*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* (Choudhary *et al.*, 2016). Por lo tanto, las bacterias halófilas son capaces de producir diferentes ácidos orgánicos que participan en la solubilización de fósforo y potasio en el suelo (Saghafi *et al.*, 2019).

### **2.5.5 Hormonas vegetales**

El principal mecanismo involucrado en PGPB en la estimulación del crecimiento de las plantas es la producción de sustancias reguladoras del crecimiento. Entre las principales sustancias reguladoras de crecimiento vegetal se encuentran las fitohormonas, las cuales influyen en procesos fisiológicos en las plantas en concentraciones bajas, afectando la diferenciación y el desarrollo de las plantas. Entre las principales fitohormonas se encuentran las auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico y etileno (Saghafi *et al.*, 2019). Las citoquininas y las giberelinas están involucradas en la morfología de las plantas y en la promoción del crecimiento de la parte aérea. El ácido abscísico participa en la regulación de la germinación de semillas; actúa como señal celular y modula varios genes en respuesta a la deficiencia de agua y al estrés salino (Numan *et al.*, 2018). Las auxinas como el ácido indol-3-butírico (IBA) y el ácido indol-3-acético (AIA) o sus precursores son producidos por una amplia gama de bacterias como parte de su

metabolismo. El AIA es una de las fitohormonas más importantes involucradas en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas, por ejemplo, división celular, germinación de semillas, diferenciación de tejidos, expansión de las hojas y alargamiento de la raíz (Numan *et al.*, 2018).

El AIA, el ácido giberélico, el ácido abscísico (ABA), las citoquininas y otros reguladores del crecimiento de las plantas, producidas por bacterias tolerantes al NaCl, mantienen el enraizamiento exterior, aumenta la longitud de la raíz, la longitud del brote y el número de las puntas de las raíces, y finalmente conducen a un aumento de la absorción de nutrientes de la planta en circunstancias de estrés salino (Verma *et al.*, 2016). El AIA, es producido por bacterias halófilas a través de vías dependientes de L-triptófano (uso de triptófano como precursor de la síntesis de AIA) e independientes, demostrando un efecto positivo (Saghafi *et al.*, 2019). Por ejemplo, en un estudio, realizado con un aislado de *Streptomyces* sp. se observó un aumento en el crecimiento de las plantas de trigo y producción de AIA en presencia de sal (Sadeghi *et al.*, 2012). Por otra parte, se ha determinado que cepas que pertenecen a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, llevaron a cabo la producción de AIA, mejorando el crecimiento del cultivo de soja a una concentración de NaCl 100 Mm al aumentar la actividad antioxidante y disminuir la peroxidación lipídica (Kumari *et al.*, 2015). Por lo tanto, la producción de estas fitohormonas por bacterias halófilas puede favorecer el crecimiento y desarrollo de las plantas, lo que conduce a mejorar su salud y tolerancia a condiciones de estrés por salinidad (Sharma *et al.*, 2016).

### III. JUSTIFICACIÓN

La salinidad de los suelos afecta la producción de alimentos a nivel mundial. Alrededor del 34% de la tierra cultivada en el mundo es afectada por la salinidad y esta cantidad va en aumento cada día. Los ambientes hipersalinos albergan una gran cantidad de microorganismos halófilos/halotolerantes, los cuales pueden promover el crecimiento de las plantas mediante la fijación de nitrógeno, solubilización de fósforo y potasio y producción de ácidos orgánicos. Por lo tanto, son una alternativa sostenible para mejorar el crecimiento y el rendimiento de cultivos en suelos afectados por la salinidad.

La Reserva de la Biósfera de los Petenes en el estado de Campeche, presenta ambientes extremos, tal como los suelos hipersalinos o calcáreos conocidos como blanquizales, los cuales no se han explorado, y que pudieran presentar una diversidad microbiana con potencial biofertilizante que favorezca a futuro la producción en cultivos afectados por la salinidad en una agricultura sostenible.

## IV. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### 4.1 Objetivo general

Aislar e identificar bacterias halófilas/halotolerantes presentes en dos sitios con suelos salinos blanquizales en la Reserva de la Biósfera de los Petenes y determinar su potencial de biofertilización *in vitro*.

#### 4.1.1 Objetivos específicos

1. Aislar y caracterizar morfológicamente bacterias halófilas/halotolerantes presentes en los suelos salinos de la Reserva de la Biósfera de los Petenes.
2. Identificar mediante reconstrucción filogenética las bacterias halófilas/halotolerantes aisladas.
3. Evaluar el potencial de biofertilización *in vitro* de las bacterias halófilas/halotolerantes aisladas.

### 4.2 Hipótesis

Los suelos salinos blanquizales encontrados en la Reserva de la Biósfera de los Petenes presentan una gran diversidad de bacterias halófilas/halotolerantes con potencial en la agricultura como biofertilizantes.

## **V. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Aislamiento de bacterias halófilas de dos sitios de blanquizales dentro de la Reserva de la Biósfera de los Petenes**

#### **5.1.1 Área de estudio y recolección de muestras**

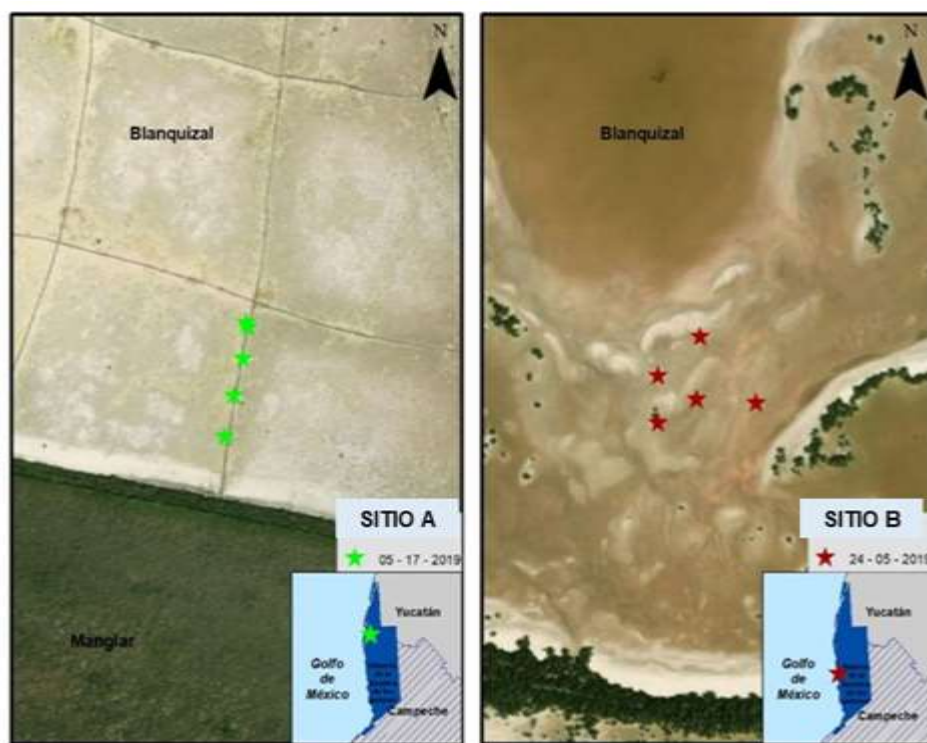
El muestreo se realizó en dos sitios con suelos salinos blanquizales dentro de la Reserva de la Biósfera de los Petenes (RBLP), localizada en la costa norte del estado de Campeche y al sureste del golfo de México con las coordenadas 20° 51' 29.88" N, 90° 19' 59.88" W. Los muestreos de suelo salino correspondiente a blanquizal se realizaron en el municipio de Calkiní, Campeche, México en mayo del 2019 a finales de la época de seca.

El primer sitio (A) de muestreo correspondió al suelo salino blanquizal ubicado en el ejido de Tankuché, Calkiní al cual se consideró como sitio perturbado ya que se han realizado actividades de restauración de manglar en la zona. El segundo sitio (B) de muestreo se realizó en el ejido de Nunkiní, Calkiní, considerado como sitio conservado, por ser una zona de difícil acceso y ausencia de actividades antropogénicas (Figura 15). Los muestreos en el primer sitio se realizaron por el método de zig zag debido a las condiciones del terreno, y en el segundo sitio se realizó utilizando el método cinco de oros. La toma de muestra de suelo blanquizal se realizó a una profundidad de 30 cm, en total en cada sitio se tomaron cinco sub-muestras tomando 1 kg suelo por cada sub-muestra. Cada sub-muestra se colocó en bolsas de polietileno estériles previamente etiquetadas y se transportaron a 4 °C al Laboratorio de Análisis de suelos, aguas y fisiología vegetal (LASAFV) del Colegio de Postgraduados, Campus Campeche. Las cinco sub-muestras de cada sitio se

homogenizaron para obtener una muestra compuesta representativa del sitio. Las muestras compuestas de cada sitio se dejaron secar de manera extendida por 72 h para su posterior análisis químico y microbiológico. Cada sitio se georreferenció mediante un navegador GPS portátil (GARMIN, eTrex 20x) y se determinó la temperatura y el porcentaje de humedad (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Sitios de muestreo y condiciones ambientales del suelo blanquizal

Sitio	Ejido/Municipio	Temperatura ( °C)	Humedad (%)	Coordenadas
<b>A (Perturbado)</b>	Tankuché, Calkiní	23±2	66	20°32'46.9" N 90°25'45.6"W
<b>B (Conservado)</b>	Nunkiní, Calkiní	27±5	38	20°15'40.7" N 90°28'31.0" W



**Figura 15.** Área de estudio de los suelos blanquizales ubicados en la Reserva de la Biósfera de los Petenes, Campeche, México, Google maps



### **5.1.2 Procesamiento y caracterización química de las muestras de suelo**

Una vez secas las muestras compuestas de cada sitio de suelo salino se procedió a fraccionar los terrones y a tamizarlas utilizando una malla #14; subsecuentemente se tomó por cada sitio 1 kg y se resguardó en refrigeración a 4 °C hasta su análisis microbiológico.

De igual forma, se destinó 0.5 kg para el análisis químico. Este análisis se realizó en el Laboratorio de Análisis de suelos, aguas y fisiología vegetal (LASAFV) del Colegio de Postgraduados, Campus Campeche. Los análisis se realizaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos.

### **5.1.3 Aislamiento y purificación de microorganismos**

El aislamiento se realizó mediante la técnica de diluciones decimales seriadas, se suspendió 1 g de suelo salino previamente tamizado en 9 mL de solución salina estéril al 25% en tubos cónicos de vidrio y se sometió a agitación con vórtex. A partir de esta solución se prepararon diluciones decimales seriadas de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-5}$ . Alícuotas (0.1 mL) de cada dilución se esparcieron con una espátula Drigalsky de vidrio estéril, en placas Petri con los medios Tripticasa de soya agar (TSA), medio de cultivo R2A y extracto de malta (EM) (con la adición de 0.5 M de NaCl) (Verma *et al.*, 2016; Bibi *et al.*, 2018). Este procedimiento se realizó por triplicado. Los cultivos se incubaron a  $25 \pm 3$  °C, y se realizó el monitoreo y conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) a las 24, 48 y 72 h.

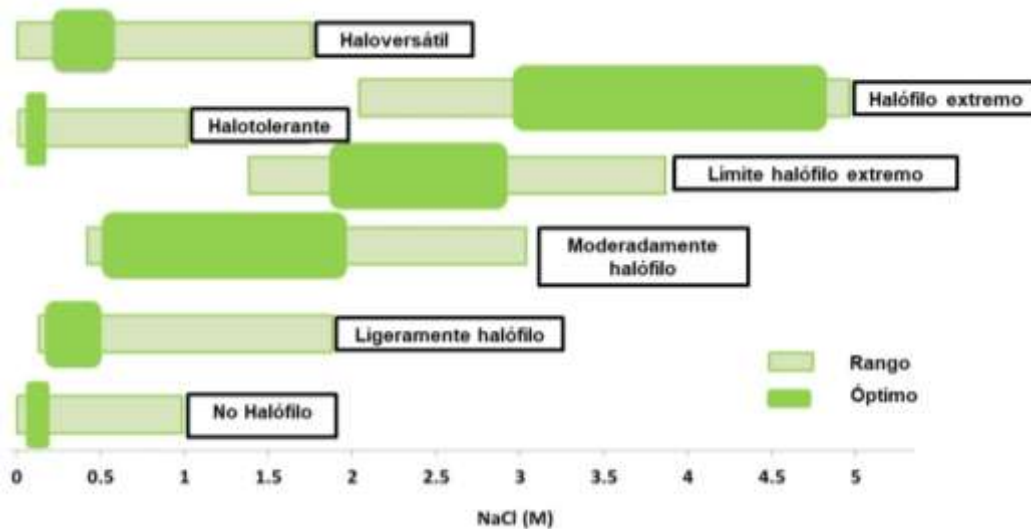
Los microorganismos se seleccionaron mediante la observación directa de las colonias bajo un estereoscopio, y se aislaron las bacterias con diferentes morfologías. La purificación de los microorganismos se realizó tomando una asada de las colonias bacterianas y se transfirió mediante la técnica de estría cruzada en los medios de su procedencia (TSA, R2A o EM). A partir de estos cultivos se realizaron subcultivos hasta obtener cultivos axénicos. Los aislados obtenidos se preservaron en 1 mL de glicerol estéril al 15% p/v en tubos de 1.5 mL y se almacenaron a -20 °C, para su posterior identificación molecular y ensayo de biofertilización *in vitro*.

#### **5.1.4 Caracterización fenotípica de los aislados**

Los aislados se caracterizaron de acuerdo a la descripción de las características macroscópicas de las colonias puras mediante taxonomía polifásica. Las características macroscópicas que se describieron fueron el tamaño, color, aspecto, forma, consistencia, bordes, elevación y superficie, así como la velocidad de crecimiento. De igual forma, los aislados fueron caracterizados microscópicamente por la tinción de Gram (Claus, 1992). Asimismo, se les realizó la prueba de catalasa (Hayward, 1960). Para ello se utilizaron cajas *Petri* estériles y se marcaron círculos en los cuales se realizó el frotis de una asada de los aislados bacterianos, y posteriormente, se adicionaron 20 µL del peróxido de hidrógeno al 30%, después de 1 min se procedió a la lectura donde el burbujeo indicó positivo a catalasa y el nulo burbujeo negativo a catalasa (Hayward, 1960).

### 5.1.5 Tolerancia de bacterias a altas concentraciones de cloruro de sodio (NaCl)

Para clasificar a los aislados según su capacidad de tolerancia a altas concentraciones de NaCl se seleccionó al medio de crecimiento Tripticasa soya agar (TSA) debido al gran número de aislados y a la velocidad de crecimiento que presentaban en este medio. Se evaluaron diferentes concentraciones de NaCl (0.5, 2 y 3 M) y se consideró que un aislado es capaz de tolerar NaCl tomando los datos de la máxima concentración de NaCl en la que los aislados bacterianos presentaron crecimiento después de aproximadamente 72 h de incubación. Esto permitió clasificar a los aislados como halotolerantes 0.5 M, halófilos moderados 2 M y halófilos extremos >3 M según la escala de clasificación descrita por Kushner (Figura 16).



**Figura 16.** Escala de clasificación de los microorganismos halófilos descrita por Kushner (1985).

## 5.2 Identificación mediante reconstrucción filogenética de bacterias halófilas aisladas

### 5.2.1 Identificación molecular

La identificación molecular se realizó con base en la secuenciación parcial del gen 16 S rRNA. Las bacterias se crecieron en los medios donde se aislaron por aproximadamente 24 a 72 h dependiendo de la velocidad de crecimiento de cada aislado. El DNA se extrajo con el método de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) al 2% de acuerdo a lo propuesto por Doyle & Doyle, (1990). La concentración de DNA se determinó por espectrofotometría mediante las lecturas de absorbancia ( $A_{260/280}$  y  $A_{260/230}$ ) utilizando un Nanodrop 2000C (Thermo Scientific, USA) y su integridad se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% suplementado con GelRed (Biotium, USA). Las bandas se visualizaron en un transiluminador UV 1000/26MXXpress (Vilber Lourmat, Germany) con el software Biodoc analyze. La amplificación y secuenciación del gen 16S se llevó a cabo con los iniciadores universales 8 F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492 R (5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3') (Eden *et al.*, 1991); y fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Weisburg *et al.*, 1991). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador C1000 (BIO-RAD, USA). La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 15  $\mu$ L conteniendo 0.18  $\mu$ L de 5U Taq DNA polimerasa (Promega, Lyon, Francia), 3  $\mu$ L de 5X Green GoTaq<sup>®</sup> reacción Buffer (Promega, USA), 0.6  $\mu$ L de 2.5 mM dNTPs, 0.18  $\mu$ L de 10 mM por cada oligonucleótido, 7.86  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O HPLC y 3.0  $\mu$ L de 20 ng DNA. El programa de amplificación consistió en un ciclo de 95 °C por 2 min,

seguido de 35 ciclos a 95 °C por 2 min, 59°C por 1 min, 72 °C por 1.5 min y finalmente una extensión por 5 min a 72 °C.

Los productos de PCR de aproximadamente 1500 pb, se limpiaron con EXO-SAP-IT (Affymetrix, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fragmentos se secuenciaron con los iniciadores 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') y 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3') en la compañía Macrogen mediante secuenciación capilar.

Para obtener las secuencias consenso para cada cepa, las secuencias de ambas hebras se ensamblaron y editaron usando el programa BioEdit versión v7.2.5 (Hall, 1999). Estas secuencias se analizaron con el algoritmo Blastn de BLAST/NCBI software (Altschul *et al.*, 1997) y en Ribosomal Database Project release 11 (<http://rdp.cme.msu.edu/>). Las secuencias obtenidas se compilaron en formato FASTA junto con las secuencias pertenecientes a la cepa de referencia. El alineamiento de las secuencias se realizó mediante el programa MAFFT v.7 de alineación múltiple de secuencias (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) (Kato *et al.*, 2002). Para la identificación molecular, se recortaron los extremos para analizar fragmentos con la misma longitud. La reconstrucción filogenética de todas las secuencias se realizó con el método inferencia Bayesiana usando el programa Mr. Bayes v3.2 (Ronquist *et al.*, 2012) utilizando el modelo de sustitución nucleotídica: GTR + I + G con 3,000,000 de generaciones que fueron muestreadas cada 1,000 generaciones. El 25% de los árboles resultantes se descartó como fase de “quemado”. Para la construcción de los arboles filogenéticos se consideraron a las cepas con accesión NR\_132707 de *Alkalilactibacillus ikkensis* GCM68 y

NR\_025555 *Halobacterium salinarum* 91-R6 como fuera de grupo, respectivamente. Los árboles se visualizaron en FigTree V1.4.4 (<https://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). Las secuencias generadas en el presente estudio se depositaron en la base de datos del NCBI-GenBank.

### **5.3 Evaluación del potencial de biofertilización *in vitro* de bacterias halófilas aisladas**

#### **5.3.1 Solubilización de fósforo**

La capacidad de solubilización de fósforo (P) de los aislados se determinó en el medio agar Pikoskaya como describe Ramírez *et al.* (2014) y púrpura de bromocresol. Se consideró positiva la solubilización de fosfato cuando el indicador púrpura de bromocresol viró a amarillo, evidenciando la formación del halo de solubilización. La siembra en el medio se realizó por triplicado. Las mediciones se realizaron, a las 12, 24 y 48 h, y para el cálculo para el índice de solubilización de P, se aplicó la fórmula de Corrales *et al.*,(2014):

$$\text{Solubilización de fósforo} = (\text{Colonia} + \text{zona halo}) / \text{diámetro de la colonia}$$

#### **5.3.2 Solubilización de potasio**

Para esta actividad cada una de las bacterias fueron crecidas en el medio Pikovskaya con algunas modificaciones como describe Velázquez-Gurrola *et al.* (2015). La siembra en el medio se realizó por triplicado. Se observó un halo sin coloración alrededor de la colonia indicando como positivo a la solubilización de potasio. Una caja con el medio sin inoculación con la bacteria se utilizó como control

negativo. Las mediciones se realizaron, a las 12, 24 y 48 h, y para el cálculo para el índice de solubilización de K, se aplicó la fórmula de Corrales *et al.*, (2014).

Solubilización de potasio= (Colonia+zona halo) / diámetro de la colonia

### **5.3.3 Fijación de nitrógeno**

La capacidad de fijación de Nitrógeno (N) de los aislados, se determinó usando el medio sólido Burk libre de N (Wilson & Knigh, 1952). Para ello la caja Petri con el medio se dividió en cuatro cuadrantes y los aislados se sembraron en forma de zig-zag desde la parte superior hasta la parte inferior. Este procedimiento se realizó por triplicado, el medio estéril sin inocular se utilizó como control negativo. Los cultivos se incubaron a  $25\pm 3$  °C y su crecimiento se observó a las 12, 24 y 48 h. Los aislados que crecieron en este medio selectivo se consideraron como positivos a la capacidad de fijación de N. Se evaluaron como (+++): alta fijación en 24 h, (++) : media fijación en 24 h, (+): baja fijación en 24 h.

### **5.3.4 Producción de ácidos orgánicos**

Esta actividad se determinó mediante la siembra de una asada de las colonias bacterianas en el medio Pikovskaya modificado con azul de bromotimol como indicador de pH y se incubó a 25 °C durante 24 h. Este procedimiento se realizó por triplicado, el medio estéril sin inocular se utilizó como control negativo. Se consideró como positivo a la producción de ácidos orgánicos al cambio de coloración del medio a amarillo (ácido) alrededor de la colonia, los aislados que no presentaron el cambio de coloración indicó la ausencia de producción de ácidos orgánicos (Ogale *et al.*, 2018). Las mediciones se realizaron, a las 12, 24 y 48 h, y

para el cálculo para el índice de producción de ácidos orgánicos, se aplicó la fórmula de Corrales *et al.*, (2014).

Producción de ácidos orgánicos= (Colonia+zona halo) / diámetro de la colonia

### **5.3.5 Análisis estadístico**

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los datos se denotaron como la media  $\pm$  desviación estándar. Los análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la prueba de Tukey se realizaron utilizando el Software Statistical Analysis (SAS<sup>®</sup>) versión 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.). Los resultados se consideraron estadísticamente significativos a  $p < 0.05$ .



## VI. RESULTADOS

### 6.1 Propiedades fisicoquímicas del suelo

Los suelos blanquizales de ambos sitios resultaron ser moderadamente alcalinos (sitio A (perturbado): pH= 8.1 y sitio B (conservado): pH= 8.3). Asimismo, el análisis estadístico indicó que existen diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre ambos sitios en cuanto a las propiedades fisicoquímicas. El sitio A presentó una mayor conductividad eléctrica (CE=67.05 dSm<sup>-1</sup>) típico de suelos salinos, contenido de humedad (H=66%), materia orgánica (M.O.=9.8%), y carbono orgánico (C.O.=5.7%), sin embargo, presentó un menor contenido de fósforo (P) en comparación con el sitio B (CE=63.45 dSm<sup>-1</sup>, H=38%, M.O.=7.4%, 10.7 mg/kg y C.O.=4.3%, respectivamente) (Cuadro 7).

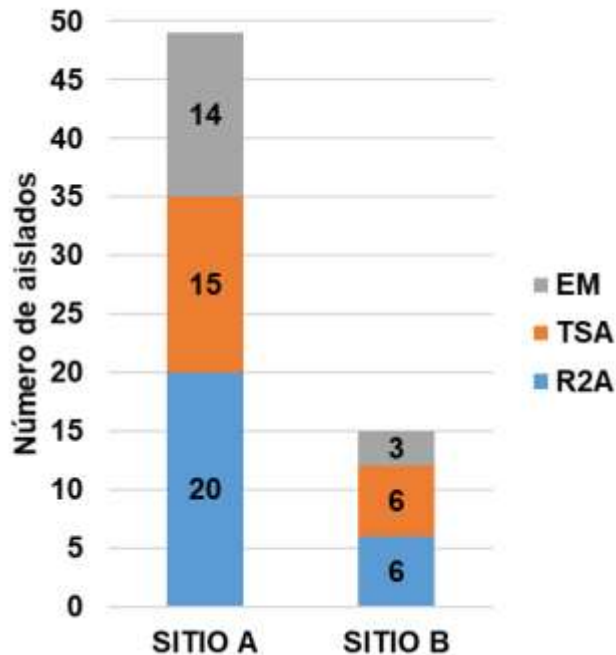
**Cuadro 7.** Propiedades fisicoquímicas de los suelos blanquizales colectados en dos sitios de la Reserva de la Biósfera de los Petenes

Propiedades de los suelos	Sitio A (Perturbado) Tankuché/Calkiní	Sitio B (Conservado) Nunkiní/Calkiní
pH	8.1±0.015b	8.3±0.01 <sup>a</sup>
CE (dSm <sup>-1</sup> )	67.05±0.55a	63.45±1.75b
H (%)	66±0a	38±0b
M.O (%)	9.8±0.15a	7.4±0.4b
P (mg/Kg)	9.25±0.25b	10.7±0.2 <sup>a</sup>
C.O (%)	5.7±0.1a	4.3±0.2b

Conductividad eléctrica (CE), Humedad (H), Materia orgánica (M.O), Fósforo (P) y Carbono orgánico (C.O)

## **6.2 Aislamiento y caracterización de bacterias halófilas en dos sitios de la Reserva de la Biósfera de los Petenes**

En total se obtuvieron 64 cepas bacterianas a partir de suelos salinos blanquizales (ambos sitios) de la RBLP, en base a sus características morfológicas. En el sitio Tankuché (A) considerado como perturbado se obtuvo un mayor número de aislados bacterianos (77%, n=49), en comparación con el sitio Nunkiní (B) considerado como el más conservado (23%, n=15). En ambos sitios (A y B) el medio R2A presentó el mayor número de aislados (41%, n=20 y 40%, n=6, respectivamente), seguido por el medio TSA (31%, n=15 y 40%, n=6, respectivamente) y, por último, el medio EM (29%, n=14 y 20%, n=3, respectivamente) (Figura 17). Además, los aislados resultaron mesófilos y neutrófilos, con un crecimiento óptimo a una temperatura de 25 a 28 °C y un pH de 7.2 a 8.0.



**Figura 17.** Número total de morfotipos aislados en los dos sitios de muestreo (A perturbado y B conservado) en relación al medio de cultivo. Extracto de Malta (EM), Tripticasa de soja agar (TSA) y medio R2A.

En general en cuanto a la caracterización microscópica de los 64 aislados obtenidos, el 97% mostró ser Gram-Positivas (n=62) y el 3% Gram-Negativas (n=2). Los resultados de la prueba de catalasa indicaron que el 92 % son aerobios resultando catalasa positiva (n=59) y el 8% anaerobios (n=5). Por su parte, de los 49 aislados que corresponden al sitio A el 96% de los aislados mostró ser Gram-positivas (n=47) y fue este sitio del cual se lograron aislar las dos colonias Gram-negativas. Los resultados de la prueba de catalasa indicaron que el 92% son aerobios resultando ser catalasa positiva (n=45) y el 8% anaerobios (n=4). Las características microscópicas de las colonias indican que el 94% presentó morfología de bacilos, el 4% estafilococos y el 2% estreptobacilos (Cuadro 8). A su vez, de los 15 aislados que corresponden al sitio B resultaron Gram-positivas (n=15)

La prueba de catalasa en los aislados en este sitio indican que el 93% son aerobios (n=14) y el 7% (n=1) anaerobio (Cuadro 9). El 93% mostró morfología colonial como bacilos y 7% como estafilococos (Cuadro 9).

**Cuadro 8.** Características macroscópicas y microscópicas de las cepas aisladas en el sitio A (Perturbado, Tankuché)

Microorganismo identificado	Tamaño de las colonias	Forma	Borde	Color	Elevación	Superficie	Consistencia	Morfología microscópica	CM*	Gram	Catalasa
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.281	Medianas	Irregular	Ondulado	Amarillo	Convexa	Rugoso	Cre moso	Bacilos	Rápido	+	+
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.285	Medianas	Circular	Entero	Blanco	Convexa	Liso	Cre moso	Bacilos	Rápido	+	+
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.282	Grandes	Irregular	Entero	Transpa rente oscuro	Convexa	Liso	Viscoso	Bacilos	Muy rápido	+	+
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.284	Medianas	Irregular	Ondulado	Blanco	Convexa	Liso	Denso	Bacilos	Rápido	+	+
<i>Bacillus licheniformis</i> CPO 4.274	Grandes	Irregular	Entero	Blanco	Convexa	Liso	Cre moso	Bacilos	Muy rápido	+	+
<i>Virgibacillus</i> sp. CPO 4.272	Grandes	Irregular	Entero	Transpa rente	Convexa	Liso	Cre moso	Bacilos	Rápido	+	+
<i>Virgibacillus</i> sp. CPO 4.270	Pequeñas	Irregular	Lobulado	Blanco	Plana	Rugoso	Viscoso	Bacilos	Lento	+	++
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.277	Medianas	Circular	Entero	Crema	Convexa	Liso	Cre moso	Bacilos	Rápido	+	+
<i>Bacillus licheniformis</i> CPO 4.302	Grandes	Irregular	Entero	Blanco	Elevada	Liso	Viscoso	Bacilos	Rápido	+	+
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.288	Grandes	Irregular	Lobulado	Blanco	Plana	Rugoso	Viscoso	Bacilos	Rápido	+	++
<i>Gracilibacillus phocaeensis</i> CPO 4.269	Medianas	Circular	Entero	Blanco	Convexa	Rugoso	Seco	Bacilos	Muy rápido	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> CPO 4.297	Grandes	Irregular	Entero	Blanco	Convexa	Liso	Muy viscoso	Bacilos	Rápido	+	++
<i>Bacillus stratosphericus</i> CPO 4.260	Grandes	Irregular	Lobulado	Crema	Plana	Rugoso	Viscoso	Bacilos	Rápido	+	+++

<i>Neobacillus drentensis</i> CPO 4.283	Grandes	Irregular	Lobulado	Transparente	Convexa	Liso	Viscoso	Bacilos	Muy rápido	+	+
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.294	Pequeñas	Puntiforme	Entero	Amarillo mostaza	Convexa	Liso	Cremoso	Bacilos	Rápido	+	+
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.257	Grandes	Irregular	Ondulado	Amarillo	Convexa	Liso	Viscosa/denso	Bacilos	Rápido	+	++
<i>Agrobacterium pusense</i> CPO 4.254	Grandes	Circular	Entero	Amarillo	Convexa	Liso	Cremoso	Bacilos	Rápido	-	++
<i>Bacillus stratosphericus</i> CPO 4.259	Grandes	Irregular	Entero	Blanco opaco	Convexa	Rugoso	Viscosa	Bacilos	Rápido	+	++++
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.279	Pequeñas	Puntiforme	Ondulado	Blanca	Convexa	Liso	Cremoso	Bacilos	Lento	+	++++
<i>Paenibacillus illinoisensis</i> CPO 4.307	Pequeñas	Irregular	Ondulado	Transparente translúcida	Plana	Rugoso	Cremoso	Bacilos	Lento	+	++
<i>Bacillus subtilis</i> CPO 4.276	Medianas	Circular	Entero	Amarillo	Convexa	Liso	Cremoso	Bacilos	Lento	+	++
<i>Metabacillus</i> sp. CPO 4.266	Grandes	Irregular	Filamentoso	Blanco	Convexa	Rugoso	Viscoso	Bacilos	Rápido	+	+++
<i>Bacillus stratosphericus</i> CPO 4.245	Medianas	Circular	Entero	Blanco	Convexa	Liso	Cremoso	Bacilos	Lento	+	-
<i>Bacillus subtilis</i> CPO 4.308	Pequeñas	Puntiforme	Entero	Transparente	Convexa	Liso	Cremoso	Bacilos	Lento	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> CPO 4.286	Pequeñas	Puntiforme	Lobulado	Blanca	Convexa	Rugoso	Cremoso	Bacilos	Lento	+	
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.295	Pequeñas	Puntiforme	Lobulado	Transparente	Convexa	Rugoso	Seco	Bacilos	Rápido	+	-

<i>Bacillus subtilis</i> CPO 4.292	Grandes	Irregular	Filamentoso	Amarillo	Convexa	Rugoso	Viscosa	Bacilos	Muy rápido	+	+++
<i>Neobacillus drentensis</i> CPO 4.261	Grandes	Irregular	Filamentoso	Blanco	Convexa	Rugoso	cremoso denso	Bacilos	Rápido	+	+++
<i>Bacillus licheniformis</i> CPO 4.251	Pequeñas	Puntiforme	Entero	Amarillento	Convexa	Liso	Cremoso	Bacilos	Rápido	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> CPO 4.264	Pequeñas	Puntiforme	Entero	Amarillento	Convexa	Liso	Cremoso	Bacilos	Lento	+	++
<i>Inquilinus</i> sp. CPO 4.252	Grandes	Irregular	Lobulado	Transparente translúcida	Convexa	Liso	Cremosa	Bacilos cortos	Muy rápido	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> CPO 4.263	Grandes	Rizoide	Filamentoso	Transparente	Plana	Rugoso	Seco	Bacilos	Rápido	+	++
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.293	Grandes	Irregular	Ondulado	Crema	Convexa	Liso	Cremoso	Bacilos	Lento	+	++++
<i>Bacillus stratosphericus</i> CPO 4.247	Pequeñas	Puntiforme	Entero	Amarilla	Convexa	Liso	Cremoso	Bacilos	Rápido	+	+++
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.300	Pequeñas	Irregular	Ondulado	Amarilla	Convexa	Rugoso	Cremoso	Bacilos	Rápido	+	++
<i>Bacillus sinesaloumensis</i> CPO 4.265	Grandes	Irregular	Lobulado	Crema	Plana	Rugoso	Seca	Bacilos	Lento	+	+++
<i>Bacillus stratosphericus</i> CPO 4.248	Medianas	Irregular	Lobulado	Transparente	Convexa	Liso	Cremoso	Bacilos	Rápido	+	+++
<i>Bacillus stratosphericus</i> CPO 4.249	Medianas	Circular	Ondulado	Rosada	Plana	Liso	Cremosa	Bacilos	Rápido	+	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CPO 4.289	Medianas	Puntiforme	Lobulado	Blanco	Convexa	Rugoso	Viscoso	Estafilococos	Rápido	+	++++

<i>Bacillus safensis</i> CPO 4.258	Grandes	Irregular	Ondulado	Rosado	Convexa	Rugoso	Cremosa	Bacilos	Rápido	+	+
<i>Priestia</i> sp. CPO 4.250	Medianas	Circular	Entero	Blanco opaco	Elevada	Liso	Viscosa/denso	Bacilos	Rápido	+	-
<i>Paenibacillus illinoisensis</i> CPO 4.304	Grandes	Irregular	Ondulado	Transparente translúcida	Convexa	Liso	Cremosa suave	Bacilos	Lento	+	+
<i>Streptomyces caeruleatus</i> CPO 4.273	Pequeñas	Circular	Entero	Blanco opaco	Convexa	Liso	Cremoso	Estreptobacilos	Muy rápido	+	+
<i>Bacillus stratosphericus</i> CPO 4.275	Pequeñas	Puntiforme	Entero	Blanco	Convexa	Liso	Viscoso	Bacilos	Rápido	+	+++
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.287	Grandes	Irregular	Entero	Crema	Plana	Liso	Viscoso	Bacilos	Rápido	+	+++
<i>Staphylococcus</i> sp. CPO 4.305	Pequeñas	Puntiforme	Entero	Crema	Convexa	Liso	Viscoso	Estafilococos	Rápido	+	++
<i>Bacillus subtilis</i> CPO 4.268	Pequeñas	Puntiforme	Entero	Blanco	Plana	Liso	Cremoso	Bacilos	Rápido	+	+++
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.290	Pequeñas	Puntiforme	Entero	Crema	Conexa	Liso	Viscoso	Bacilos	Rápido	+	+++
<i>Bacillus stratosphericus</i> CPO 4.256	Medianos	Irregular	Ondulado	Amarillento	Elevado	Rugoso	Cremoso	Bacilos	Lento	+	+

\*Crecimiento de las colonias en el medio Trypticase soya agar tomando como muy rápido: 12 h, rápido: 24 h, lento: 48 h;

**Tinción Gram** +: respuesta positiva, -: respuesta negativa; **Catalasa** +++: alta producción, ++: media producción, +: baja producción



**Cuadro 9.** Características macroscópicas y microscópicas de las cepas aisladas en el sitio B (Conservado, Nunkiní)

Microorganismo identificado	Tamaño de las colonias	Forma	Borde	Color	Elevación	Superficie	Consistencia	Morfología microscópica	CM*	Gram	Catalasa
<i>Metabacillus</i> sp. CPO 4.301	Pequeñas	Circular	Entero	Amarillo	Elevada	Lisa	Viscoso/seco	Bacilos	Lento	+	+
<i>Bacillus safensis</i> CPO 4.262	Pequeñas	Irregular	Ondulado	Transparente	Elevada	Rugosa	Seco	Bacilos	Lento	+	+
<i>Staphylococcus</i> sp. CPO 4.299	Grandes	Irregular	Filamentosos	Transparente	Convexa	Rugosa	Seco	Estafilococos	Lento	+	+
<i>Neobacillus drentensis</i> CPO 4.303	Pequeñas	Puntiforme	Lobulado	Transparente	Convexa	Rugosa	Cremoso	Bacilos aislados	Rápido	+	+
<i>Neobacillus drentensis</i> CPO 4.246	Pequeñas	Irregular	Filamentosos	Rosado	Convexa	Rugosa	Viscosa	Bacilos	Rápido	+	+
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.296	Pequeñas	Puntiforme	Ondulado	Amarillo	Elevada	Rugosa	Viscoso	Bacilos	Lento	+	+
<i>Paenibacillus illinoisensis</i> CPO 4.253	Pequeñas	Puntiforme	Entero	Amarillo	Elevada	Rugosa	Viscoso	Bacilos	Rápido	+	+
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.298	Pequeñas	Circular	Ondulado	Blanco	Elevada	Rugosa	Viscoso	Bacilos	Rápido	+	+

<i>Bacillus stratosphericus</i> CPO 4.278	Pequeñas	Circular	Entero	Blanco	Elevada	Lisa	Viscoso	Bacilos aislados	Lento	+	+
<i>Gracilibacillus</i> sp. CPO 4.267	Pequeñas	Irregular	Lobulado	Blanco	Plano	Rugoso	Cremoso	Bacilos	Rápido	+	++
<i>Bacillus stratosphericus</i> CPO 4.255	Pequeñas	Irregular	Lobulado	Blanco	Convexa	Rugoso	Cremoso	Bacilos aislados	Lento	+	++
<i>Bacillus stratosphericus</i> CPO 4.306	Medianos	Circular	Entero	Amarille nta	Convexa	Lisa	Viscoso/seco	Bacilos aislados	Lento	+	-
<i>Bacillus subtilis</i> CPO 4.291	Medianos	Circular	Entero	Naranja	Convexa	Lisa	Viscoso	Bacilos	Rápido	+	++
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.280	Pequeñas	Puntifor me	Entero	Blanco	Plano	Liso	Viscoso	Bacilos	Lento	+	++
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.271	Pequeñas	Puntifor me	Entero	Blanco	Convexa	Liso	Viscoso	Bacilos	Rápido	+	+

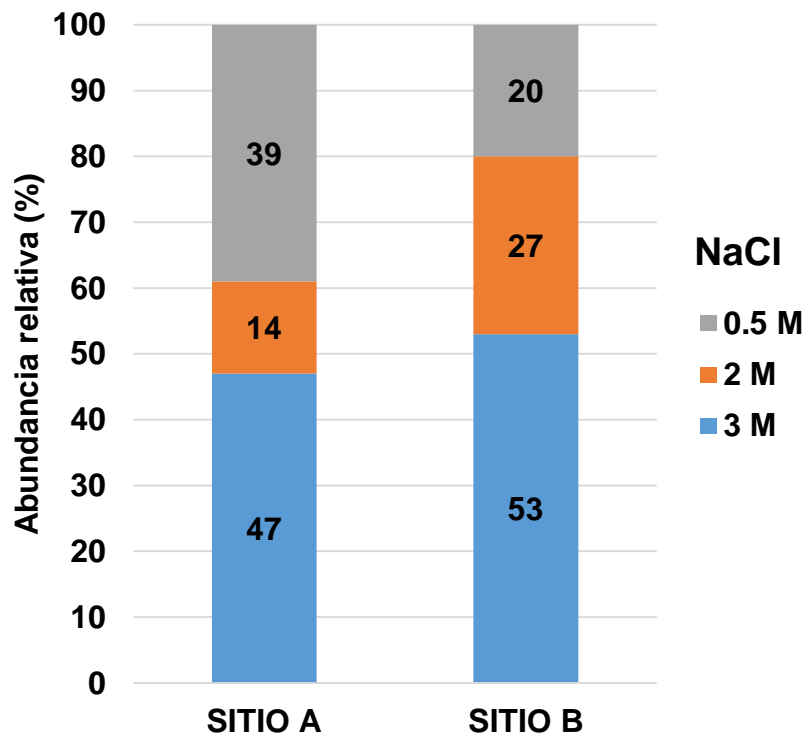
---

\*Crecimiento de las colonias en el medio Trypticase soya agar tomando como muy rápido: 12 h, rápido: 24 h, lento: 48 h;

**Tinción Gram** +: respuesta positiva, -: respuesta negativa; **Catalasa** +++: alta producción, ++: media producción, +: baja producción.

### 6.3 Tolerancia de bacterias a altas concentraciones de cloruro de sodio (NaCl)

En cuanto a la tolerancia a la salinidad del total de los aislados, el 35% de los aislados ( $n=23/64$ ) mostraron ser halotolerantes (crecimiento en la concentración 0.5 M), el 17% ( $n=11$ ) halófilos moderados (crecimiento en la concentración 2 M) y el 48% ( $n=31$ ) halófilos extremos (crecimiento en la concentración de 3 M). En tanto que en el sitio A, el 39% ( $n=19/49$ ) mostraron ser halotolerantes, el 14% ( $n=7$ ) halófilos moderados y el 47% ( $n=23$ ) halófilos extremos. En el sitio B el 20% ( $n=3/15$ ) mostraron ser halotolerantes, el 27% ( $n=4$ ) halófilos moderados y el 53% ( $n=8$ ) halófilos extremos (Figura 18).



**Figura 18.** Abundancia relativa de aislados en ambos sitios muestreo (A: perturbado y B: conservado), crecidos con diferentes concentraciones de NaCl. El número en las barras indica el porcentaje del total de aislados por sitio.

#### 6.4 Identificación molecular de los microorganismos aislados

En la identificación mediante la secuenciación del gen 16S rRNA de los 64 aislados microbianos a partir de suelos salinos blanquizales de la RBLP, se identificó la presencia de 11 géneros diferentes pertenecientes a *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Gracilibacillus*, *Inquillus*, *Paenibacillus*, *Metabacillus*, *Neobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*, *Virgibacillus* y *Priestia*. Las cepas bacterianas se agruparon dentro de tres principales filos, Firmicutes (95%, n=61) resultando ser el grupo más dominante, incluyendo microorganismos de los géneros, *Bacillus* (72%, n=44), *Paenibacillus* (5%, n=3), *Metabacillus* (3%, n=2), *Neobacillus* (7%, n=4), *Staphylococcus* (5%, n=3), *Gracilibacillus* (3%, n=2), *Virgibacillus* (3%, n=2) y *Priestia* (2%, n=1). Seguido del filo Proteobacteria (3%, n=2) representada por dos géneros, *Inquillus* y *Agrobacterium*, respectivamente. Y finalmente, una sola cepa bacteriana del filo Actinobacteria (2%, n=1) identificada en el género *Streptomyces*. Los Firmicutes se agruparon en tres familias Bacillaceae, Staphylococcaceae y Paenibacillaceae. Los Proteobacteria en dos familias Rhodospirillales y Rhizobiales y una sola cepa bacteriana del grupo Actinobacteria en la familia Streptomycetaceae. El resultado del análisis de secuenciación y los aislados bacterianos filogenéticos más cercanos se presentan en el (Cuadro 10).

**Cuadro 10.** Identificación molecular de cepas bacterianas halófilas/halotolerantes aisladas de suelos salinos blanquizales de la Reserva de la Biósfera de los Petenes.

Sitio	Clave aislado	Microorganismo identificado	Número de accesoión GenBank NCBI	Ribosomal Database Project/NCBI	Similitud
Sitio A Perturbado, Tankuché	CPO 4.281	<i>Bacillus</i> sp.	MW429747	<i>Bacillus</i> sp. A3-30; JF900030	0.978
	CPO 4.285	<i>Bacillus</i> sp.	MW429751	<i>Bacillus</i> sp. 1324(2012); JN645973	0.973
	CPO 4.282	<i>Bacillus</i> sp.	MW429748	<i>Bacillus</i> sp. A3-30; JF900030	0.978
	CPO 4.284	<i>Bacillus</i> sp.	MW429750	<i>Bacillus</i> sp. A3-30; JF900030	0.978
	CPO 4.274	<i>Bacillus licheniformis</i>	MW429740	<i>Bacillus licheniformis</i> ; YW1257; AF516177	1.000
	CPO 4.272	<i>Virgibacillus</i> sp.	MW429738	<i>Virgibacillus</i> sp. CU42; DQ643161	0.991
	CPO 4.270	<i>Virgibacillus</i> sp.	MW429736	<i>Virgibacillus</i> sp. B1-21; EU435360	0.986
	CPO 4.277	<i>Bacillus</i> sp.	MW429743	<i>Bacillus</i> sp. RIC12-Oh014; KC535085	0.978
	CPO 4.302	<i>Bacillus licheniformis</i>	MW429768	<i>Bacillus licheniformis</i> ; YW1257; AF516177	1.000
	CPO 4.288	<i>Bacillus</i> sp.	MW429754	<i>Bacillus</i> sp. MHS002; DQ993324	1.000
	CPO 4.269	<i>Gracilibacillus phocaeensis</i>	MW429735	LT934503 <i>Gracilibacillus phocaeensis</i> Marseille P3801 <sup>T</sup>	1.000
	CPO 4.297	<i>Bacillus subtilis</i>	MW429763	<i>Bacillus subtilis</i> ; C-3; AB110598	1.000

CPO 4.260	<i>Bacillus stratosphericus</i>	MW429726	<i>Bacillus stratosphericus</i> (T); type strain:41KF2a; AJ831841	1.000
CPO 4.283	<i>Neobacillus drentensis</i>	MW429749	AB681783 <i>Neobacillus drentensis</i> NBRC	1.000
CPO 4.294	<i>Bacillus</i> sp.	MW429760	<i>Bacillus</i> sp. 1324(2012); JN645973	0.973
CPO 4.257	<i>Bacillus</i> sp.	MW429723	<i>Bacillus</i> sp. CNJ842 PL04; DQ448790	0.959
CPO 4.254	<i>Agrobacterium pusense</i>	MW429720	FJ969841 <i>Agrobacterium pusense</i> NRCPB10	1.000
CPO 4.259	<i>Bacillus stratosphericus</i>	MW429725	<i>Bacillus stratosphericus</i> ; DN14_7A9; KP769446	1.000
CPO 4.279	<i>Bacillus</i> sp.	MW429745	<i>Bacillus</i> sp. A3-30; JF900030	0.978
CPO 4.307	<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	MW429773	<i>Paenibacillus illinoisensis</i> (T); JCM 9907; AB073192	0.969
CPO 4.276	<i>Bacillus subtilis</i>	MW429742	<i>Bacillus subtilis</i> ; C-3; AB110598	1.000
CPO 4.266	<i>Metabacillus</i> sp.	MW429732	AY998119 <i>Metabacillus niabensis</i> 4T19	1.000
CPO 4.245	<i>Bacillus stratosphericus</i>	MW429711	<i>Bacillus stratosphericus</i> (T); type strain:41KF2a; AJ831841	1.000
CPO 4.308	<i>Bacillus subtilis</i>	MW429774	<i>Bacillus subtilis</i> ; C-3; AB110598	1.000
CPO 4.286	<i>Bacillus subtilis</i>	MW429752	<i>Bacillus subtilis</i> ; C-3; AB110598	1.000
CPO 4.295	<i>Bacillus</i> sp.	MW429761	<i>Bacillus</i> sp. 1324(2012); JN645973	0.973
CPO 4.292	<i>Bacillus subtilis</i>	MW429758	<i>Bacillus subtilis</i> ; C-3; AB110598	1.000

CPO 4.261	<i>Neobacillus drentensis</i>	MW429727	AB681783 <i>Neobacillus drentensis</i> NBRC	1.000
CPO 4.251	<i>Bacillus licheniformis</i>	MW429717	<i>Bacillus licheniformis</i> ; YW1257; AF516177	1.000
CPO 4.264	<i>Bacillus subtilis</i>	MW429730	<i>Bacillus subtilis</i> ; C-3; AB110598	1.000
CPO 4.252	<i>Inquilinus</i> sp.	MW429718	<i>Inquilinus</i> sp. RB35; DQ512800	0.980
CPO 4.263	<i>Bacillus subtilis</i>	MW429729	<i>Bacillus subtilis</i> ; C-3; AB110598	1.000
CPO 4.293	<i>Bacillus</i> sp.	MW429759	<i>Bacillus</i> sp. RIC12-Oh014; KC535085	0.978
CPO 4.247	<i>Bacillus stratosphericus</i>	MW429713	<i>Bacillus stratosphericus</i> ; DN14_7A9; KP769446	1.000
CPO 4.300	<i>Bacillus</i> sp.	MW429766	<i>Bacillus</i> sp. 1324(2012); JN645973	0.973
CPO 4.265	<i>Bacillus sinesaloumensis</i>	MW429731	LT671591 <i>Bacillus sinesaloumensis</i> Marseille P3516 <sup>T</sup>	1.000
CPO 4.248	<i>Bacillus stratosphericus</i>	MW429714	<i>Bacillus stratosphericus</i> ; LAMA 927; KC583210	1.000
CPO 4.249	<i>Bacillus stratosphericus</i>	MW429715	<i>Bacillus stratosphericus</i> ; DN14_7A9; KP769446	1.000
CPO 4.289	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MW429755	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ; RW35; EU419922	1.000
CPO 4.258	<i>Bacillus safensis</i>	MW429724	AF234854 <i>Bacillus safensis</i> FO-036b	1.000
CPO 4.250	<i>Priestia</i> sp.	MW429716	MN456843 <i>Priestia megaterium</i> ATCC 12872	0.990
CPO 4.304	<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	MW429770	<i>Paenibacillus illinoisensis</i> (T); JCM 9907; AB073192	0.969

	CPO 4.273	<i>Streptomyces caeruleatus</i>	MW429739	GQ329712 <i>Streptomyces caeruleatus</i> GIMN4.002	0.750
	CPO 4.275	<i>Bacillus stratosphericus</i>	MW429741	NR_042336 <i>Bacillus stratosphericus</i> 41KF2a	1.000
	CPO 4.287	<i>Bacillus</i> sp.	MW429753	<i>Bacillus</i> sp. CH2; KC442367	0.973
	CPO 4.305	<i>Staphylococcus</i> sp.	MW429771	<i>Staphylococcus</i> sp. NIPHL090904/B4; AY748913	1.000
	CPO 4.268	<i>Bacillus subtilis</i>	MW429734	<i>Bacillus subtilis</i> ; C-3; AB110598	1.000
	CPO 4.290	<i>Bacillus</i> sp.	MW429756	<i>Bacillus</i> sp. 1324(2012); JN645973	0.973
	CPO 4.256	<i>Bacillus stratosphericus</i>	MW429722	NR_042336 <i>Bacillus stratosphericus</i> 41KF2a	1.000
<b>Sitio B</b>	CPO 4.301	<i>Metabacillus</i> sp.	MW429767	AY998119 <i>Metabacillus niabensis</i> 4T19	1.000
<b>Conservado,</b>	CPO 4.262	<i>Bacillus safensis</i>	MW429728	AF234854 <i>Bacillus safensis</i> FO-036b	1.000
<b>Nunkiní</b>	CPO 4.299	<i>Staphylococcus</i> sp.	MW429765	<i>Staphylococcus</i> sp. NIPHL090904/B4; AY748913	1.000
	CPO 4.303	<i>Neobacillus drentensis</i>	MW429769	AB681783 <i>Neobacillus drentensis</i> NBRC	1.000
	CPO 4.246	<i>Neobacillus drentensis</i>	MW429712	AB681783 <i>Neobacillus drentensis</i> NBRC	1.000
	CPO 4.296	<i>Bacillus</i> sp.	MW429762	<i>Bacillus</i> sp. 1324(2012); JN645973	0.973
	CPO 4.253	<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	MW429719	<i>Paenibacillus illinoisensis</i> (T); JCM 9907; AB073192	0.969



CPO 4.298	<i>Bacillus</i> sp.	MW429764	<i>Bacillus</i> sp. 1324(2012); JN645973	0.973
CPO 4.278	<i>Bacillus</i> <i>stratosphericus</i>	MW429744	NR_042336 <i>Bacillus</i> <i>stratosphericus</i> 41KF2a	1.000
CPO 4.267	<i>Gracilibacillus</i> sp.	MW429733	<i>Gracilibacillus</i> sp. BH235; AY762980	1.000
CPO 4.255	<i>Bacillus</i> <i>stratosphericus</i>	MW429721	<i>Bacillus stratosphericus</i> (T); type strain:41KF2a; AJ831841	1.000
CPO 4.306	<i>Bacillus</i> <i>stratosphericus</i>	MW429772	NR_042336 <i>Bacillus</i> <i>stratosphericus</i> 41KF2a	1.000
CPO 4.291	<i>Bacillus subtilis</i>	MW429757	<i>Bacillus subtilis</i> ; IP; DQ452512	1.000
CPO 4.280	<i>Bacillus</i> sp.	MW429746	<i>Bacillus</i> sp. A3-30; JF900030	0.978
CPO 4.271	<i>Bacillus</i> sp.	MW429737	<i>Bacillus</i> sp. MB-12; AF326361	0.962

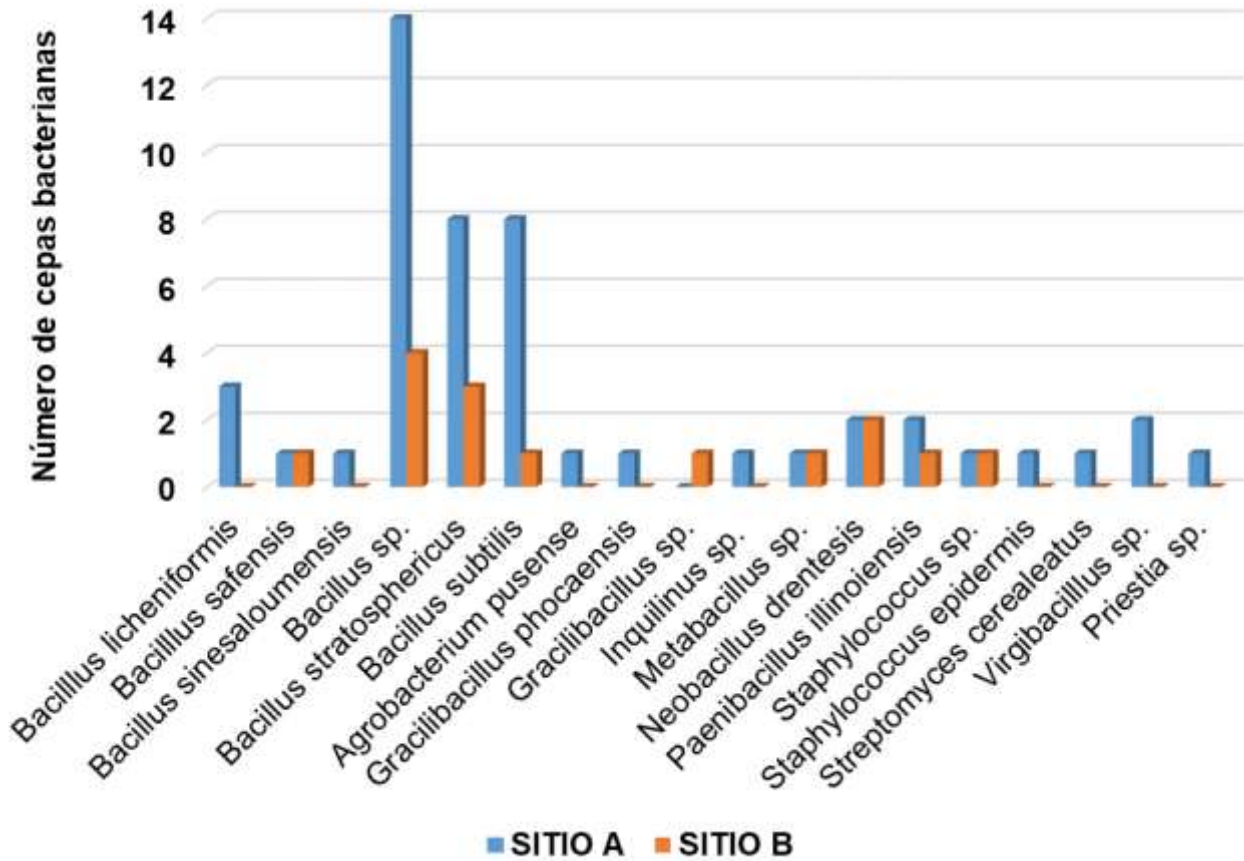
---

Las asociaciones filogenéticas generales de las cepas aisladas determinaron que el género dominante en este estudio resultó *Bacillus* (n=58/64) (Figura 19 y Figura 20). Las especies más frecuentemente encontradas correspondieron a especies aun no descritas de *Bacillus* sp. (28%, n=18) (CPO 4.257, CPO 4.277, CPO 4.279, CPO 4.281, CPO 4.282, CPO 4.284, CPO 4.285, CPO 4.287, CPO 4.288, CPO 4.290, CPO 4.293, CPO 4.294, CPO 4.295, CPO 4.300, CPO 4.271, CPO 4.280, CPO 4.296 y CPO 4.298), seguida por *Bacillus stratosphericus* (17%, n=11) (CPO 4.245, CPO 4.247, CPO 4.248, CPO 4.249, CPO 4.256, CPO 4.259, CPO 4.260, CPO 4.275, CPO 4.255, CPO 4.278 y CPO 4.306) y por *Bacillus subtilis* (14%, n=9) (CPO 4.263, CPO 4.264, CPO 4.268, CPO 4.276, CPO 4.286, CPO 4.291, CPO 4.292, CPO 4.297 y CPO 4.308) (Figura 19). Entre las especies menos frecuentemente se encuentran *Bacillus licheniformis* (5%, n=3) (CPO 4.251, CPO 4.274 y CPO 4.302), *Paenibacillus illinoisensis* (5%, n=3) (CPO 4.253, CPO 4.304 y CPO 4.307), *Bacillus safensis* (3%, n=2) (CPO 4.258 y 4.262), *Virgibacillus* sp. (3%, n=2) (CPO 4.270 y 4.272), *Bacillus sinesaloumensis* (2%, n=1) (CPO 4.265), *Gracilibacillus phocaeensis* (2%, n=1) (CPO 4.269) y *Gracilibacillus* sp. (2%, n=1) (CPO 4.267) (Figura 20).

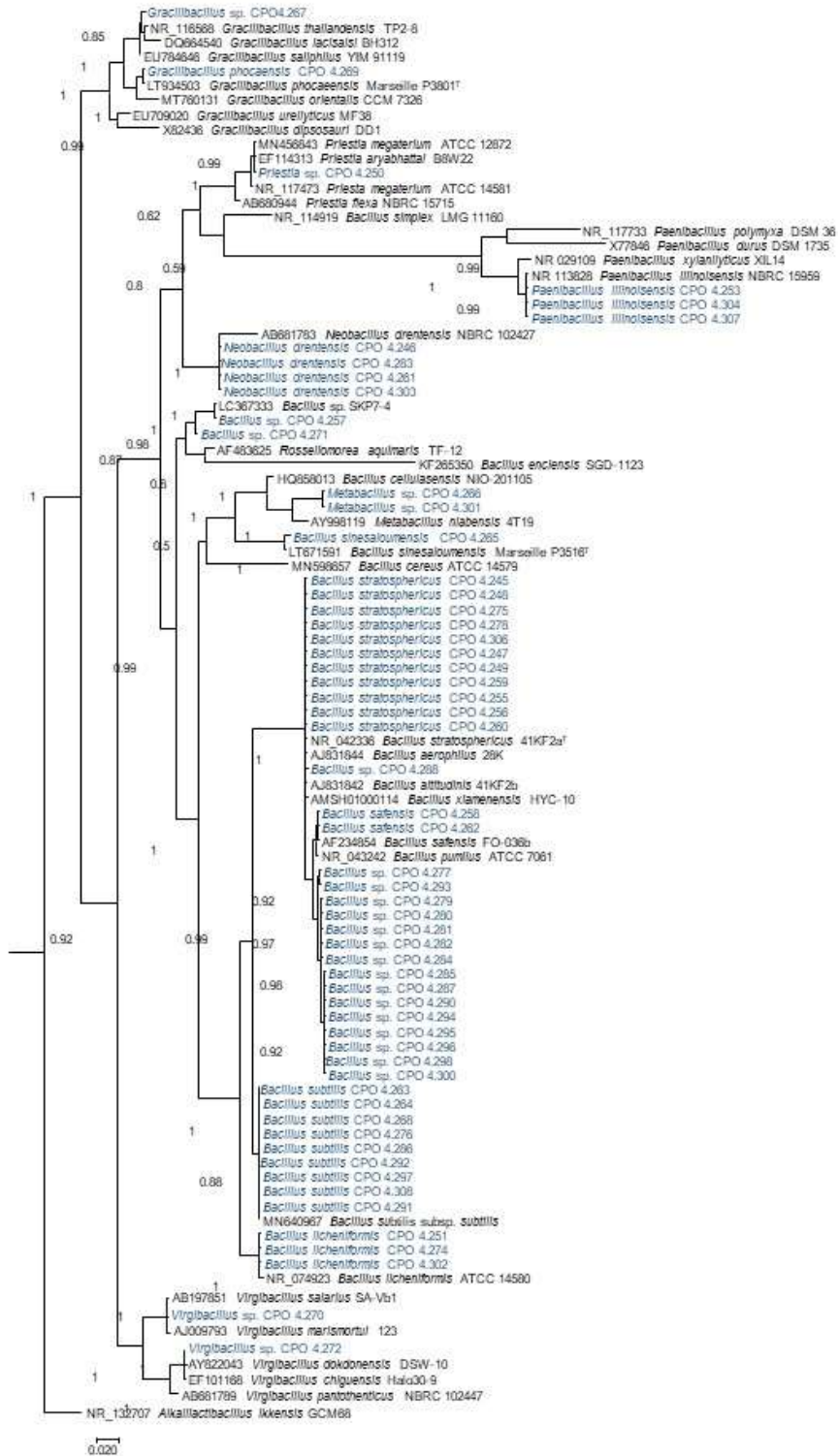
En este estudio se encontró a las especies *Neobacillus drentensis* (6%, n=4) (CPO 4.246, CPO 4.283, CPO 4.261 y CPO 4.303), *Metabacillus* sp. (3%, n=2) (CPO 4.266 y CPO 4.301) y *Priestia* sp. (2%, n=1) (CPO 4.250), las cuales fueron recientemente reclasificados dentro del género *Bacillus* (Figura 20).

De igual forma, se encontraron otros géneros diferentes a *Bacillus* y estas se agruparon, en Gram positivas (segundo árbol filogenético) entre las que encuentra

*Streptomyces caeruleatus* (CPO 4.273), *Staphylococcus epidermis* (CPO 4.289) y *Staphylococcus* sp. (CPO 4.299 y 4.305), y en las Gram negativas a *Inquilinus* sp. (CPO 4.252) y *Agrobacterium pusense* (CPO 4.254) (Figura 21).

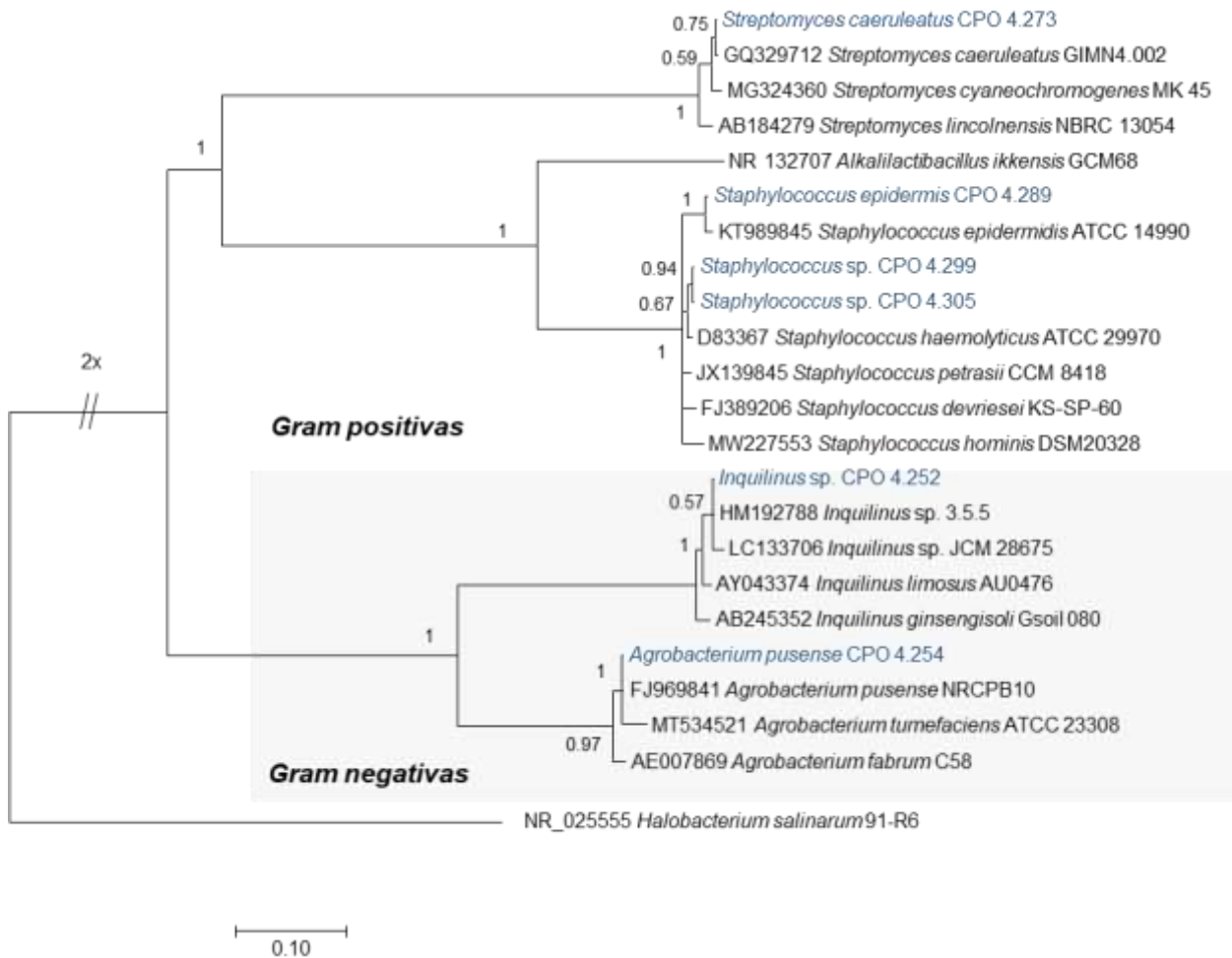


**Figura 19.** Frecuencia de las cepas bacterianas encontradas en dos sitios (A: perturbado y B: conservado) de la Reserva de la Biósfera de los Petenes.



**Figura 20.** Construcción del árbol filogenético de las bacterias correspondientes al género dominante *Bacillus* basado en la secuenciación del gen 16S rDNA por

método inferencia bayesiana. La cepa NR\_132707 *Alkalilactibacillus ikkensis* GCM68, se consideró fuera de grupo.



**Figura 21.** Construcción del árbol filogenético de las bacterias que no correspondieron al género *Bacillus*, basado en la secuenciación del gen 16S rRNA por método inferencia bayesiana. La cepa NR\_025555 *Halobacterium salinarum*91-R6, se consideró fuera de grupo.

## 6.5 Potencial biofertilizante de los aislados obtenidos

En general, todos los aislados presentaron una o múltiples actividades de promoción del crecimiento vegetal (PGPB), con excepción de la cepa bacteriana *Neobacillus drentensis* CPO 4.303 aislada del sitio B la cual resultó negativa para

las cuatro actividades evaluadas en este trabajo (Figura 23). Por otra parte, 13 cepas bacterianas resultaron positivas a todas las actividades evaluadas, 10 en el sitio A y estas correspondieron a *Bacillus* sp. (CPO 4.282, CPO 4.284, CPO 4.294), *Bacillus licheniformis* (CPO 4.302), *Bacillus stratosphericus* (CPO 4.245, CPO 4.248, CPO 4.249), *Bacillus subtilis* (CPO 4.286, CPO 4.292) y *Neobacillus drentensis* (CPO 4.261) lo que corresponde al 20% del total aislado; y por su parte el sitio B un total de 3, y estas correspondieron a *Bacillus* sp. (CPO 4.296, CPO 4.298) y *Bacillus stratosphericus* (CPO 4.306), lo que equivale al 5% del total aislado (Figura 23 y Cuadro 11).

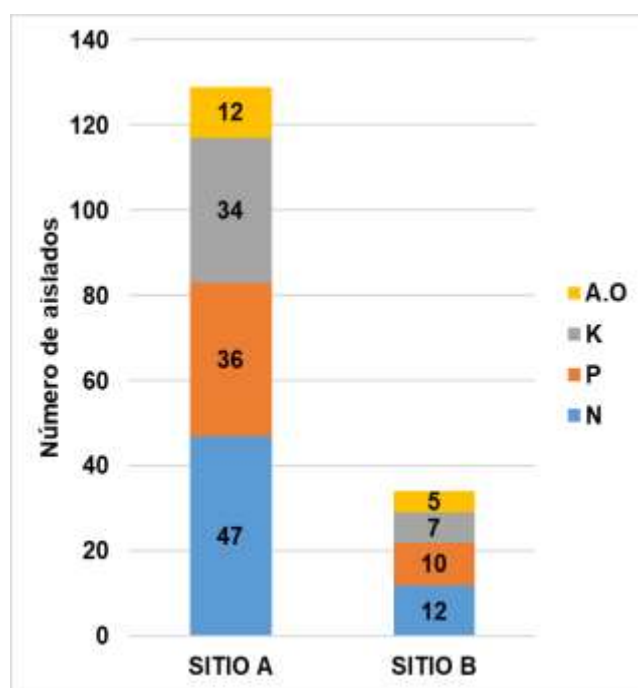
En general, de las 64 cepas bacterianas se observó una mayor predominancia en su capacidad de fijación de nitrógeno con el 92% (n=59/64). El sitio A presentó un mayor número de cepas con esta actividad (n=47), en comparación con el sitio B (n=12) (Figura 22). En el sitio A, las cepas bacterianas con mayor actividad (+++) resultaron (n=15) entre las cuales se encuentran 14 cepas bacterianas del género *Bacillus* (CPO 4.282, CPO 4.284, CPO 4.274, CPO 4.294, CPO 4.257, CPO 4.295, CPO 4.261, CPO 4.252, CPO 4.293, CPO 4.265, CPO 4.248, CPO 4.275, CPO 4.287 y CPO 4.268) y una del género *Staphylococcus* (CPO 4.305). A su vez, en el sitio B las cepas bacterianas con mayor actividad resultaron (n=2) entre los cuales se encuentran los géneros *Bacillus* (CPO 4.262) y *Staphylococcus* (CPO 4.299) (Cuadro 11).

La segunda actividad con mayor número de cepas positivas correspondió a la actividad solubilizadora de fósforo (P) con el 72% (n=46). El sitio A presentó el mayor número de los aislados con esta actividad (n=36) en comparación con el sitio

B (n=10) (Figura 22). Los resultados del análisis estadístico, indicaron diferencias estadísticas significativas entre las cepas bacterianas de ambos sitios, la cepa bacteriana *Bacillus subtilis* (CPO 4.286) presentó el mayor índice de solubilización de fósforo (ISP) ( $5.6 \pm 0.25$  mm) (Figura 23), sin embargo, no se observó diferencia estadística significativa con respecto a *Bacillus* sp. (CPO 4.284, CPO 4.298), *B. licheniformis* (CPO 4.251, CPO 4.302), *B. subtilis* (CPO 4.268), *B. safensis* (CPO 4.262), *Neobacillus drentensis* (CPO 4.261), *Bacillus* sp. (CPO 4.257) e *Inquilinus* sp. (CPO 4.252). El resto de las cepas presentó un menor (ISP) (Cuadro 11).

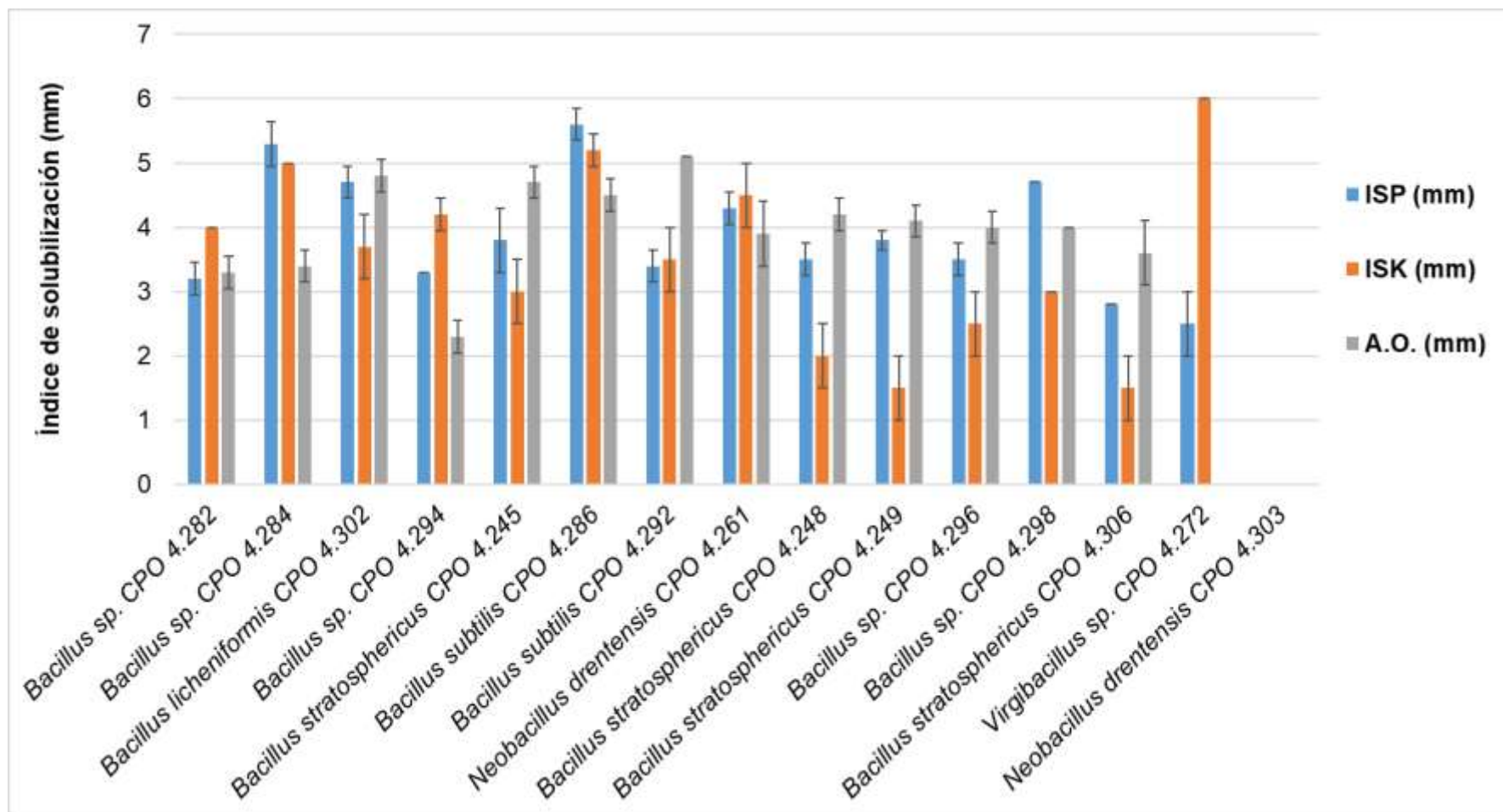
En cuanto a la actividad solubilizadora de potasio (K) el 63% del total de los aislados (n=41) presentaron esta actividad. El sitio A presentó un mayor número de aislados con esta actividad (n=34), en comparación con el sitio B (n=7) (Figura 22). Los resultados del análisis estadístico, indicaron diferencias estadísticas significativas entre las cepas bacterianas de ambos sitios, la cepa bacteriana *Virgibacillus* sp. (CPO 4.272) presentó el mayor índice de solubilización de K (ISK) ( $6 \pm 0$  mm) (Figura 23), sin embargo, no se observó diferencia estadística significativa con respecto a *Bacillus* sp. (CPO 4.281, CPO 4.282, CPO 4.2824, CPO 4.277, CPO 4.294, CPO 4.279, CPO 4.295, CPO 4.257), *B. licheniformis* (CPO 4.251, CPO 4.274, CPO 4.302, CPO 4.251) *B. subtilis* (CPO 4.308, CPO 4.292), *Agrobacterium pusense* (CPO 4.254), *B. stratosphericus* (CPO 4.255, CPO 4.259, CPO 4.275), *B. infantis* (CPO 4.283, CPO 4.261), *B. safensis* (CPO 4.262 y CPO 4.258), *Priestia* sp. (CPO 4.250), *Bacillus* sp. (CPO 4.281), *Gracilibacillus phocaeensis* (CPO 4.269) y *Streptomyces caeruleatus* (CPO 4.273). El resto de las cepas presentó un menor (ISK) (Cuadro 11).

La producción de ácidos orgánicos resultó la actividad menos presentada por las cepas obtenidas en este estudio con un 27% del total (n=17). El sitio A presentó el mayor número de cepas (n=12) en comparación con sitio B (n=5) (Figura 22). Los resultados del análisis estadístico, indicaron diferencias estadísticas significativas entre las cepas bacterianas de ambos sitios, la cepa bacteriana *B. subtilis* (CPO 4.292) presentó la mayor producción de ácidos orgánicos (5.1±0 mm) (Figura 23), sin embargo, no se observó diferencia estadística significativa con respecto a *B. licheniformis* (CPO 4.302) y *B. stratosphericus* (CPO 4.245). El resto de las cepas presentaron una menor actividad (Cuadro 11).



**Figura 22.** Número de cepas bacterianas que presentaron las actividades promotoras del crecimiento vegetal evaluadas. Producción de ácidos orgánicos (A.O.) Solubilización de potasio y fósforo (K y P). Fijación de nitrógeno (N).





**Figura 23.** Cepas bacterianas que resultaron positivo a las cuatro actividades evaluadas y que presentaron mejor índice de solubilización con excepción de CPO 4.303 quién resultó negativo para las actividades evaluadas en este estudio. ISP = índice de solubilización de fósforo, ISK = índice de solubilización de potasio. A.O.: producción de ácidos orgánicos.

**Cuadro 11.** Evaluación de las actividades de las cepas bacterianas aisladas de dos sitios de suelos salinos blanquizales

Sitios	Microorganismo identificado	Solubilización		A.O.	Fijación de N
		ISP (mm)	ISK (mm)		
Sitio A Perturbado,	<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.281	0.8 ±1.44 o	5.5 ±0.5 ab	-	++
	<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.285	-	-	-	++
Tankuché	<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.282	3.2 ±0.25 efghijklmn	4 ±0 abcdefg	3.3 ±0.25 fg	+++
	<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.284	5.3 ±0.35 abc	5 ±0 abc	3.4 ±0.25 efg	+++
	<i>Bacillus licheniformis</i> CPO 4.274	3 ±0 hijklm	3.5 ±0.5 abcdefgh	-	+++
	<i>Virgibacillus</i> sp. CPO 4.272	2.5 ±0.5 klmn	6 ±0 a	-	++
	<i>Virgibacillus</i> sp. CPO 4.270	-	4.5 ±0.5 abcde	-	+
	<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.277	2.7 ±0.25 jklmn	3.7 ±2.25 abcdefgh	-	++
	<i>Bacillus licheniformis</i> CPO 4.302	4.7 ±0.25 abcde	3.7 ±0.5 abcdefgh	4.8 ±0.25 abcd	++
	<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.288	3 ±1.75 ghijklmn	-	4.3 ±2.5 cdef	++
	<i>Gracilibacillus phocaeensis</i> CPO 4.269	3.6 ±0.25 defghijklm	4.2 ±0.25 abcdef	-	++
	<i>Bacillus subtilis</i> CPO 4.297	-	-	-	+
	<i>Bacillus stratosphericus</i> CPO 4.260	-	-	-	++
<i>Neobacillus drentensis</i> CPO 4.283	-	4.2 ±0.25 abcdef	-	++	

<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.294	3.3 ±0 efghijklmn	4.2 ±0.25 abcdef	2.3 ±0.25 g	+++
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.257	4.6 ±0.25 abcdefg	3.5 ±0.5 abcdefgh	-	+++
<i>Agrobacterium pusense</i> CPO 4.254	-	-	-	+
<i>Bacillus stratosphericus</i> CPO 4.259	2.2 ±0.25 lmno	4.2 ±0.75 abcdef	-	-
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.279	2.5 ±0.25 klmn	4.7 ±1.25 abcd	-	++
<i>Paenibacillus illinoisensis</i> CPO 4.307	2.5 ±0.5 klmn	-	-	+
<i>Bacillus subtilis</i> CPO 4.276	-	-	-	+
<i>Metabacillus</i> sp. CPO 4.266	-	-	-	+
<i>Bacillus stratosphericus</i> CPO 4.245	3.8 ±0.5 bcdefghijk	3 ±0.5 bcdefgh	4.7 ±0.25 abcde	+
<i>Bacillus subtilis</i> CPO 4.308	-	4.5 ±1.5 abcde	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> CPO 4.286	5.6 ±0.25 a	5.2 ±0.25 ab	4.5 ±0.25 cde	+
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.295	3 ±0.5 hijklmn	3.7 ±0.25 abcdefgh	-	+++
<i>Bacillus subtilis</i> CPO 4.292	3.4 ±0.25 efghijklmn	3.5 ±0.5 abcdefgh	5.1 ±0 a	+
<i>Neobacillus drementensis</i> CPO 4.261	4.3 ±0.25 abcdefghij	4.5 ±0.5 abcde	3.9 ±0.5 cdef	+++
<i>Bacillus licheniformis</i> CPO 4.251	5.1 ±0.25 abcd	4.5 ±1.5 abcde	-	++

<i>Bacillus subtilis</i> CPO 4.264	-	-	4.6 ±2.5 bcde	++
<i>Inquiliinus</i> sp. CPO 4.252	4.6 ±0.25 abcdef	4.5 ±0.5 abcde	-	+++
<i>Bacillus subtilis</i> CPO 4.263	-	-	-	++
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.293	2.8 ±0.25 jklmn	-	-	+++
<i>Bacillus stratosphericus</i> CPO 4.247	3.8 ±0.25 bcdefghijk	2.2 ±1.75 defgh	-	++
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.300	3.7 ±1.5 defghijklm	-	-	++
<i>Bacillus sinesaloumensis</i> CPO 4.265	3.3 ±0 efghijklmn	2.5 ±0 bcdefgh	-	+++
<i>Bacillus stratosphericus</i> CPO 4.248	3.5 ±0.25 efghijklmn	2 ±0.5 efgh	4.2 ±0.25 cdefg	+++
<i>Bacillus stratosphericus</i> CPO 4.249	3.8 ±0.15 cdefghijkl	1.5 ±0.5 gh	4.1 ±0.25 defgh	++
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CPO 4.289	-	-	-	+
<i>Bacillus safensis</i> CPO 4.258	3.9 ±0 bcdefghijk	4 ±0 abcdefg	-	+
<i>Priestia</i> sp. CPO 4.250	2 ±0 no	4 ±1 abcdefg	-	++
<i>Paenibacillus illinoisensis</i> CPO 4.304	2.2 ±0.5 mno	-	-	++

	<i>Streptomyces caeruleatus</i> CPO 4.273	2.2 ±0 mno	4 ±2 abcdefg	-	++
	<i>Bacillus stratosphericus</i> CPO 4.275	3.5 ±0 efghijklmn	3.5 ±0.5 abcdefgh	-	+++
	<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.287	2.6 ±0.5 klmn	-	-	+++
	<i>Staphylococcus</i> sp. CPO 4.305	3.1 ±0.15 fghijklmn	1.5 ±0 gh	-	+++
	<i>Bacillus subtilis</i> CPO 4.268	5.3 ±0 ab	3 ±0 bcdefgh	-	+++
	<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.290	3 ±0 hijklmn	-	-	++
	<i>Bacillus stratosphericus</i> CPO 4.256	-	-	-	+
<b>Sitio B</b>	<i>Metabacillus</i> sp. CPO 4.301	2 ±0 no	-	3.5 ±0 defg	+
<b>Conservado,</b>	<i>Bacillus safensis</i> CPO 4.262	4.5 ±0.5 abcdefgh	3.5 ±0.5 abcdefgh	-	+++
<b>Nunkiní</b>	<i>Staphylococcus</i> sp. CPO 4.299	3.9 ±0.25 bcdefghijk	-	-	+++
	<i>Neobacillus drentensis</i> CPO 4.303	-	-	-	-
	<i>Neobacillus drentensis</i> CPO 4.246	-	-	-	+
	<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.296	3.5 ±0.25 efghijklmn	2.5 ±0.5 cdefgh	4 ±0.25 cdef	+
	<i>Paenibacillus illinoisensis</i> CPO 4.253	-	-	-	+
	<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.298	4.7 ±0 abcde	3 ±0 bcdefgh	4 ±0 cdef	+
	<i>Bacillus stratosphericus</i> CPO 4.278	2.9 ±0 ijklmn	1.7 ±0.25 fgh	-	-

<i>Gracilibacillus</i> sp. CPO 4.267	3.7 ±0.25 defghijklm	-	-	++
<i>Bacillus stratosphericus</i> CPO 4.255	3 ±0 hijklmn	3.5 ±0.5 abcdefgh	-	+
<i>Bacillus stratosphericus</i> CPO 4.306	2.8 ±0 jklmn	1.5 ±0.5 gh	3.6 ±0.5 defg	++
<i>Bacillus subtilis</i> CPO 4.291	-	-	-	++
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.280	-	-	2.2 ±1.25 g	+
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.271	3.6 ±0 defghijklm	3 ±0 bcdefgh	-	+

+++ : alta en 24 h, ++ : media en 24 h, + : baja en 24 h; - : respuesta negativa, ISP = índice de solubilización de fósforo, ISK = índice de solubilización de potasio. A.O.: producción de ácidos orgánicos. \*Medias de Tukey. Letras iguales dentro de cada columna no son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ )

## VII. DISCUSIÓN

En la Reserva de la Biósfera de los Petenes (RBLP) las características del suelo están estrechamente relacionadas con las perturbaciones antropogénicas, fenómenos naturales (Torrescano-Valle *et al.*, 2019) y su vulnerabilidad se debe principalmente a su estrecha relación con el mar a través del drenaje subterráneo en suelos predominantemente kársticos (Hernández-Montilla *et al.*, 2016). Los resultados de nuestro estudio con relación a los análisis fisicoquímicos realizados en los suelos salinos blanquiazales, muestran diferencias significativas en el sitio A (perturbado) donde se observó una mayor conductividad eléctrica, contenido de materia orgánica, carbono orgánico y porcentaje de humedad en comparación con el sitio B (conservado). Este último sitio, se caracterizó por presentar un mayor contenido de fósforo. Esto puede explicarse, ya que se ha documentado que los suelos alcalinos están relacionados con la absorción positiva y disponibilidad de nutrientes, principalmente fósforo (Ibarra-Villarreal *et al.*, 2021). Por otro lado, en contraste con nuestros resultados se ha reportado para los suelos salinos de Cuatro Ciénegas, Coahuila bajo contenido de fósforo ( $P=4 \text{ mg/kg}^{-1}$ ) (Souza & Eguiarte, 2018; Romero Fernández *et al.*, 2019), así como baja conductividad eléctrica ( $CE=2-3.8 \text{ dSm}^{-1}$ ) no obstante, los valores de pH obtenidos en nuestro estudio coinciden con lo reportado para los suelos salinos de la cuenca de cuatro Ciénegas, Coahuila (Delgado-García *et al.*, 2018; Romero-Fernández *et al.*, 2019). Sin embargo, para las muestras de suelo de los lagos de Sayula y San Marcos, Jalisco la conductividad eléctrica presentó mayores intervalos de  $CE=36-148 \text{ dSm}^{-1}$  así como mayor pH, alrededor de  $pH=9.9-10.0$ , que es típico de suelos salino-sódicos,

lo cual es congruente con la naturaleza de los sitios y está relacionado con el origen de los suelos (Delgado-García *et al.*, 2018).

Por otro lado, en cuanto a la diversidad microbiana aislada en los sitios en RBLP, el mayor número de los aislados cultivables se detectó en el blanquizar obtenido del sitio A en comparación con el sitio B, esto puede deberse al arrastre de microorganismos ocasionados por las perturbaciones antropogénicas (reforestación de manglar) realizadas en el sitio A (perturbado). En ambos sitios se encontró un alto porcentaje de aislados (>47%) considerados como halófilos extremos (crecimiento a 3 M de NaCl), lo que sugiere la capacidad de estas cepas bacterianas para hacer frente a una alta concentración del sal y los hace interesantes para futuros estudios (Delgado-García *et al.*, 2018).

La filogenia de los aislados indicó una gran cantidad de cepas clasificadas como *Bacillus* sp. sin ninguna especie asignada, asimismo, que los ambientes salinos son fuente de nuevas especies del género *Bacillus*, ya que estas bacterias pueden tolerar rangos extremos de pH, temperatura, salinidad y estrés por humedad (Yadav *et al.*, 2015). De igual forma, en este estudio se encontraron especies que fueron reclasificadas dentro del género *Bacillus* y entre ellos se encuentra *Metabacillus*, *Neobacillus* y *Priestia* (Patel & Gupta, 2020; Gupta *et al.*, 2020). El análisis de la diversidad bacteriana reveló que existen diferencias en los géneros y especies encontradas entre sitios (A y B). Las especies *Priestia* sp., *Bacillus licheniformis*, *Bacillus sinesaloumensis*, *Agrobacterium pusense*, *Gracilibacillus phocaeensis*, *Inquilinus* sp. *Staphylococcus* sp., *Streptomyces caeruleatus* y *Virgibacillus* sp mostraron ser exclusivamente del sitio A. A su vez, la cepa bacteriana *Gracilibacillus*



sp. se encontró exclusivamente en el sitio B. Estas diferencias podrían estar asociadas a las propiedades fisicoquímicas de los sitios.

En México, se han reportado previamente bacterias halófilas aisladas de ambientes salinos como la cuenca de cuatro Ciénegas, Coahuila (Delgado-García *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2020), así como el Lago de Texcoco (Maheshwari & Saraf, 2015; Delgado-García *et al.*, 2018) entre las que se encuentra *Halobacillus* sp., *Halomonas* sp., *Salinibacter* sp., *Micrococcus* sp., *Gracilibacillus* sp. y *Bacillus* sp. sin embargo, no se han realizado estudios sobre su capacidad biofertilizante, por lo que cabe mencionar que éste es el primer reporte sobre el aislamiento de bacterias halófilas/halotolerantes en los suelos blanquizales de la RBLP y que además evalúa su potencial en actividades promotoras del crecimiento vegetal.

En el estudio actual, los miembros del filo Firmicutes del género *Bacillus* comprendieron el 91% (n=58) de las 64 cepas bacterianas obtenidas. Esto puede explicarse debido a que el género *Bacillus* está presente de forma natural en el suelo, y previamente se ha reportado previamente a éste género con gran predominancia en suelos salinos (Masmoudi *et al.*, 2019; Etesami & Glick, 2020; Orhan & Demirci, 2020), debido a su capacidad para sobrevivir a diversas condiciones ambientales mediante rasgos estructurales y metabólicos, como la producción de estructura de pared celular multicapa, secreción de antibióticos, enzimas extracelulares y formación de endosporas (Díaz-Rodríguez *et al.*, 2019; Ibarra-Villarreal *et al.*, 2021). En la última década ha habido varios estudios sobre los efectos beneficiosos del género *Bacillus* y se ha reportado como una bacteria

halófila/halotolerante capaz de estimular el crecimiento de las plantas en condiciones de salinidad (Zhu *et al.*, 2018; Albdaiwi *et al.*, 2019).

En cuanto al potencial promotor de crecimiento vegetal *in vitro* de las 58 cepas bacterianas de *Bacillus* que resultaron positivos en este estudio, la cepa bacteriana *Neobacillus drentensis* (CPO 4.303) no presentó ninguna capacidad de biofertilización de las actividades evaluadas en este estudio. Se ha reportado que el mecanismo que utiliza el género *Bacillus* es la secreción de fosfatasas y ácidos orgánicos que acidifican el ambiente circundante para facilitar la conversión del fosfato inorgánico en fosfato disponible para las plantas (Radhakrishnan *et al.*, 2017). Asimismo, Se ha reportado que la absorción de K disminuye en las plantas dañadas por salinidad, mientras que los tratamientos con *Bacillus* aumenta este macronutriente en plantas bajo este tipo de estrés (Radhakrishnan *et al.*, 2017). Por lo que, estos resultados indican el gran potencial de las cepas bacterianas del género halotolerante *Bacillus* para promover el crecimiento de las plantas en futuros estudios.

Otro género con capacidad biofertilizante es *Paenibacillus* (Kumar & Verma, 2018). En este trabajo, las cepas (CPO 4.253, CPO 4.304 y CPO 4.307) de la especie *Paenibacillus illinoisensis* presentaron actividad solubilizadora de P y fijadora de N. De igual forma, las cepas bacterianas *Gracilibacillus* sp. (CPO 4.267) y *Gracilibacillus phocaeensis* (CPO 4.269) presentaron capacidad de solubilización de P y fijación de N. Al igual que nuestros resultados, se ha documentado que este género posee múltiples actividades PGPB tales como fijación de N, sideróforos y producción de AIA (Albdaiwi *et al.*, 2019; Orhan & Demirci, 2020). Ambas cepas

pertenecientes al género *Virgibacillus* (CPO 4.270 y CPO 4.272) presentaron capacidad de solubilización de K y fijación de N. Este género previamente se ha reportado ser como una bacteria halotolerante capaces de reducir el estrés salino en plantas de trigo y además fijar N (Torbaghan *et al.*, 2017; Orhan & Demirci, 2020).

Asimismo, el género *Priestia* (CPO 4.250) mostró actividad solubilizadora de P y K, y fijadora de N, este género fue actualmente reclasificado por lo que este es el primer reporte de la capacidad biofertilizante del género. De igual manera, los miembros del género *Staphylococcus*, *Staphylococcus* sp. (CPO 4.299 y CPO 4.305) y *Staphylococcus epidermis* (CPO 4.289), presentaron actividad fijadora de N. Recientemente, se ha reportado a las cepas *Staphylococcus* sp. y *Staphylococcus succinus* con potencial de fijación de nitrógeno (Orhan & Demirci, 2020). Asimismo, estudios previos reportan que los miembros del género *Staphylococcus* puede tolerar altas concentraciones de sal (Akram *et al.*, 2016) y presentar propiedades promotoras del crecimiento de las plantas (producción AIA y sideróforos, solubilización de fósforo y actividad ACC desaminasa) (Zhou *et al.*, 2015; Etesami & Glick, 2020; Orhan & Demirci, 2020).

En este estudio se encontró una sola cepa bacteria perteneciente al filo Proteobacteria, encontrado exclusivamente en el sitio A, correspondiente a *Agrobacterium pusense* (CPO 4.254), que ha demostrado previamente ser halotolerante además de su capacidad de fijar N (Beltrán, 2015; Sharma *et al.*, 2016). Otro género aislado en este filo y en el mismo sitio es *Inquillinus* sp. (CPO 4.252). Esta cepa mostró capacidad de solubilizar P y K, así como fijar N. Actualmente, no existen reportes de su actividad como biofertilizante. Por lo tanto,

es el primer reporte de esta actividad en el género. Sin embargo, previamente se ha reportado a *Inquilinus limosus* como una bacteria antagonista de *Phytium ultimum* y *Phytophthora capsici*, esta cepa bacteriana endófito fue aislada de manglares en un estudio realizado en Arabia Saudita (Bibi *et al.*, 2018).

En este estudio solo un miembro del filo Actinobacteria fue aislado y este correspondió a *Streptomyces caeruleatus* (CPO 4.273). Esta cepa presentó actividad solubilizadora de P, solubilizadora de K y fijación de N. Previamente, se ha reportado como uno de los géneros halotolerantes más dominantes en la literatura y con una variedad de características promotoras del crecimiento vegetal (Subramaniam *et al.*, 2016; Etesami & Glick, 2020).

En general, de las 64 cepas aisladas en ambos sitios, el 20% (n=13) presentaron todas las actividades evaluadas. Los resultados encontrados muestran el gran potencial biofertilizante de las bacterias halófilas/halotolerantes de la RBLP. Por lo tanto, los ambientes hipersalinos son sitios idóneos para la búsqueda de cepas con potencial biofertilizante para cultivos en condiciones de salinidad.

## VIII. CONCLUSIONES

Las 64 bacterias halófilas/halotolerantes, aisladas de suelos salinos blanquizales de la Reserva de la Biósfera de los Petenes se encontraron distribuidos en 11 géneros diferentes: *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Gracilibacillus*, *Inquilinus*, *Paenibacillus*, *Metabacillus*, *Neobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*, *Virgibacillus* y *Prestia*. De los cuales solamente seis géneros fueron identificados en ambos sitios de suelos blanquizales: *Bacillus*, *Metabacillus*, *Neobacillus*, *Gracilibacillus*, *Paenibacillus* y *Staphylococcus*. El género dominante resultó ser *Bacillus*. Este es el primer reporte de aislamiento de bacterias halotolerantes/halófilas de suelos salinos blanquizales de la RBLP, en Campeche, y que además evalúa el potencial biofertilizante. De las cepas bacterianas aisladas en ambos sitios, 13 presentaron simultáneamente potencialidades promotoras del crecimiento vegetal al fijar N, solubilizar fósforo y potasio y producir ácidos orgánicos. Las cepas bacterianas más promisorias corresponden a *Bacillus subtilis* CPO 4.286, *Bacillus licheniformis* CPO 4.302, *Bacillus* sp. 4.284 y *Neobacillus drentensis* CPO 4.261. Estos resultados proporcionan fuentes potenciales y novedosas, de bacterias halófilas/halotolerantes como candidatas prometedoras de agentes con posibilidad para su aplicación en una agricultura sostenible.

## IX. PERSPECTIVAS

- Se recomienda evaluar los aislados que no resultaron positivos con otros medios (líquidos) y pruebas de crecimiento vegetal como ácido-indol-acético (AIA), producción de sideróforos, amoníaco, ácido abscísico (ABA) y aminociclopropano-1-carboxilato (ACC)-desaminasa.
- Por otra parte, realizar evaluaciones en cuanto a su potencial de antagonismo contra hongos fitopatógenos en cultivos de importancia económica en el estado de Campeche.
- Asimismo, evaluar las bacterias promisorias en condiciones de invernadero comparando con cepas de referencias correspondientes al potencial de las actividades evaluadas y en un futuro realizar un experimento en campo sobre algún cultivo de importancia económica en el estado de Campeche bajo condiciones de estrés salino.
- Finalmente, estudiar los metabolitos secundarios producidos por las bacterias halófilas/halotolerantes para una mayor prospección en el área agrícola.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad, P. (2016). Plant metal interaction: emerging remediation techniques 4(5) 334-335 Elsevier; United States of América. <https://doi.org/978-0-12-803158-2>
- Akram, M., Shahid, M., Tariq, M., Azeem, M., Javed, M., Saleem, S., & Riaz, S. (2016). Deciphering *Staphylococcus sciuri* SAT-17 mediated anti-oxidative defense mechanisms and growth modulations in salt stressed maize (*Zea mays* L.). *Frontiers in Microbiology*, 7(867), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00867>
- Albdaiwi, R. N., Khyami-Horani, H., Ayad, J. Y., Alananbeh, K. M., & Al-Sayaydeh, R. (2019). Isolation and characterization of halotolerant plant growth promoting rhizobacteria from durum wheat (*Triticum turgidum* subsp. durum) cultivated in saline areas of the dead sea region. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 10(1639), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01639>
- Altschul, F., Madden, T., SchÄffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389–3402. <https://doi.org/10.1080/14620316.2005.11511891>
- Amjres, H., Béjar, V., Quesada, E., Carranza, D., Abrini, J., Siquin, C., Ratiskol, J., Collic-Jouault, S., & Llamas, I. (2015). Characterization of haloglycan, an exopolysaccharide produced by *Halomonas stenophila* HK30. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.052>
- Archana, G., Buch, A., & Naresh, K. (2012). Microorganisms in sustainable agriculture and biotechnology. Pivotal role of organic acid secretion by rhizobacteria in plant growth promotion, (3)1–829. Springer, India. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-2214-9>
- Atieno, M., Herrmann, L., Nguyen, H. T., Phan, H. T., Nguyen, N. K., Srean, P.,

- Than, M. M., Zhiyong, R., Tittabutr, P., Shutsrirung, A., Brău, L., & Lesueur, D. (2020). Assessment of biofertilizer use for sustainable agriculture in the Great Mekong Region. *Journal of Environmental Management*, 275(11130), 0301–4797. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111300>
- Ayala-Pérez, L., Vasco-Villa, O., & Sosa-López, A. (2014). Evaluación de las asociaciones en la Reserva de la Biósfera de los Petenes. *Biología y Química*, 9(1), 33–43.
- Ayangbenro, A., & Babalola, O. (2020). Reclamation of arid and semi-arid soils: The role of plant growth-promoting archaea and bacteria. *Current Plant Biology*, 100173. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2020.100173>
- Bano, A., & Fatima, M. (2009). Salt tolerance in *Zea mays* (L). following inoculation with *Rhizobium* and *Pseudomonas*. *Biology and Fertility of Soils*, 45(4), 405–413. <https://doi.org/10.1007/s00374-008-0344-9>
- Beltrán, M. (2015). Phosphate solubilization as a microbial strategy for promoting plant growth. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 15(1), 101. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol15\\_num1\\_art:401](https://doi.org/10.21930/rcta.vol15_num1_art:401)
- Bensidhoum, L., Bessai, S., & Nabti, E. (2019). Restoration of plant growth under saline soil by halotolerant plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). In M. Kumar, H. Etesami, & V. Kumar (Eds.), *Saline soil-based agriculture by halotolerant microorganisms* (pp. 23–51). Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-8335-9>
- Bensidhoum, Leila, & Nabti, E. (2019). Plant Growth-Promoting Bacteria for Improving Crops Under Saline Conditions. 329–352. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-18975-4\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-030-18975-4_14)
- Bhattacharyya, P., & Jha, D. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327–1350. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>
- Bibi, F., Strobel, G., Naseer, M., Yasir, M., Khalaf Al-Ghamdi, A., & Azhar, E. (2018).



- Halophytes-associated endophytic and rhizospheric bacteria: diversity, antagonism and metabolite production. *Biocontrol Science and Technology*, 28(2), 192–213. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1434868>
- Canfora, L., Lo Papa, G., Vittori Antisari, L., Bazan, G., Dazzi, C., & Benedetti, A. (2015). Spatial microbial community structure and biodiversity analysis in “extreme” hypersaline soils of a semiarid Mediterranean area. *Applied Soil Ecology*, 93, 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.04.014>
- Chakraborty, U., Roy, S., Chakraborty, A., Dey, P., & Chakraborty, B. (2011). Plant growth promotion and amelioration of salinity stress in crop plants by a salt-tolerant bacterium. *Recent Research in Science and Technology*, 3(11), 61–70.
- Chan-Keb, C. A., Agraz-Hernández, C. M., Muñoz-Salazar, R., Posada-Vanegas, G., Osti-Sáenz, J., Castellano, J. E. R., Conde-Medina, K. P., & Vega-Serratos, B. E. (2018). Ecophysiological response of *Rhizophora* mangrove to the variation in hydrochemistry during five years along the Coast of Campeche, México. *Diversity*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/d10010009>
- Chen, G. Q., & Patel, M. K. (2012). Plastics derived from biological sources: Present and future: A technical and environmental review. *Chemical Reviews*, 112(4), 2082–2099. <https://doi.org/10.1021/cr200162d>
- Choudhary, D. K. (2012). Microbial rescue to plant under habitat-imposed abiotic and biotic stresses. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(5), 1137–1155. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4429-x>
- Choudhary, Varma, A., & Tuteja, N. (2016). Plant-Microbe Interaction: An Approach to Sustainable Agriculture. In *Plant-Microbe Interaction: An Approach to Sustainable Agriculture*. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-2854-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-10-2854-0_4)
- Christian, J., & Waltho, J. (1962). Solute concentrations within cells of halophilic and non-halophilic bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-3002\(62\)90453-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-3002(62)90453-5)
- Cinco-Castro, S., & Herrera-Silveira, J. (2020). Vulnerability of mangrove

- ecosystems to climate change effects: The case of the Yucatan Peninsula. *Ocean and Coastal Management*, 192, 105196. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2020.105196>
- Clark, N. E., Boakes, E. H., McGowan, P. J. K., Mace, G. M., & Fuller, R. A. (2013). Protected Areas in South Asia Have Not Prevented Habitat Loss: A Study Using Historical Models of Land-Use Change. *PLoS ONE*, 8(5), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065298>
- Claus, D. (1992). A standardized gram staining procedure. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8(4), 451–452. <https://doi.org/10.1007/BF01198764>
- CONANP. (2018). 100 años de conservación en México: Áreas Naturales Protegidas. Semarnat-Conanp, 634. <https://www.conanp.gob.mx/pdf/100AñosConservación.pdf>
- Corrales, L., Sánchez, L., Arévalo, Z., & V., M. (2014). *Bacillus*: a genus of bacteria that exhibits important phosphate solubilizing abilities. *Nova*, 12(22), 165–178. <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v12n22/v12n22a06.pdf>
- DasSarma, S. (2006). Extreme halophiles are models for astrobiology. *Microbe*, 1(3), 120–126. <https://doi.org/10.1128/microbe.1.120.1>
- De Souza, R., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. P. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, 38(4), 401–419. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>
- Delgado-Baquerizo, M., Maestre, F. T., Reich, P. B., Jeffries, T. C., Gaitan, J. J., Encinar, D., Berdugo, M., Campbell, C. D., & Singh, B. K. (2016). Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems. *Nature Communications*, 7, 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms10541>
- Delgado-Baquerizo, M., Oliverio, A. M., Brewer, T. E., Benavent-gonzález, A., Eldridge, D. J., Bardgett, R. D., Maestre, F. T., Singh, B. K., & Fierer, N. (2018). Bacteria Found in Soil. *Science*, 359, 320–325.

<https://doi.org/10.1126/science.aap9516>

- Delgado-García, M., Contreras-Ramos, S. M., Rodríguez, J. A., Mateos-Díaz, J. C., Aguilar, C. N., & Camacho-Ruíz, R. M. (2018). Isolation of halophilic bacteria associated with saline and alkaline-sodic soils by culture dependent approach. *Heliyon*, 4(11). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00954>
- Di Donato, P., Fiorentino, G., Anzelmo, G., Tommonaro, G., Nicolaus, B., & Poli, A. (2011). Re-use of vegetable wastes as cheap substrates for extremophile biomass production. *Waste and Biomass Valorization*, 2(2), 103–111. <https://doi.org/10.1007/s12649-011-9062-x>
- Díaz-Rodríguez, A., Parra-Cota, F., Santoyo, G., & Santos-Villalobos, S. (2019). Chlorothalonil tolerance of indole producing bacteria associated to wheat (*Triticum turgidum* L.) rhizosphere in the Yaqui Valley, Mexico. *Ecotoxicology*, 28(5), 569–577. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02053-x>
- DOF. (2013). Ley general del equilibrio ecológico y protección del medio ambiente. Diario Oficial de La Federación, 17. <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2012.01.001>
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). Chloroplast DNA phylogenetic affinities of newly described species in Glycine (Leguminosae : Phaseoleae). *Systematic Biology*, 15(3), 466–471.
- Eden, P., Schmidt, T., Blakemore, R., & Pace, N. (1991). Phylogenetic analysis. *Methods of Biochemical Analysis*, 43, 323–358. <https://doi.org/10.1201/b10765-3>
- Egamberdieva, D., Davranov, K., Wirth, S., Hashem, A., & Abd\_Allah, E. (2017). Impact of soil salinity on the plant-growth – promoting and biological control abilities of root associated bacteria. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(7), 1601–1608. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.07.004>
- Egamberdieva, D., Wirth, S. J., Shurigin, V. V., Hashem, A., & Abd Allah, E. F. (2017). Endophytic bacteria improve plant growth, symbiotic performance of

chickpea (*Cicer arietinum* L.) and induce suppression of root rot caused by *Fusarium solani* under salt stress. *Frontiers in Microbiology*, 8(1887), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01887>

Elbers, J. (2011). Las áreas protegidas de América Latina América Latina: Situación actual y perspectivas para el futuro (E. Jorg (ed.)). [www.iucn.org/sur](http://www.iucn.org/sur)

Etesami, H., & Alikhani, H. A. (2019). Halotolerant Plant Growth-Promoting Fungi and Bacteria as an Alternative Strategy for Improving Nutrient Availability to Salinity-Stressed Crop Plants. In *Saline Soil-based Agriculture by Halotolerant Microorganisms*. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-8335-9\\_5](https://doi.org/10.1007/978-981-13-8335-9_5)

Etesami, H., & Beattie, G. A. (2018). Mining halophytes for plant growth-promoting halotolerant bacteria to enhance the salinity tolerance of non-halophytic crops. *Frontiers in Microbiology*, 9(FEB). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00148>

Etesami, H., & Glick, B. R. (2020). Halotolerant plant growth–promoting bacteria: Prospects for alleviating salinity stress in plants. *Environmental and Experimental Botany*, 178. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104124>

Etesami, H., & Noori, F. (2019). Saline Soil-based Agriculture by Halotolerant Microorganisms. *Saline Soil-Based Agriculture by Halotolerant Microorganisms*, 1–22. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-8335-9>

FAO. (2016). The h state of the world’s land and water resources for food and agriculture managing systems at risk.

García-Bañuelos, P., Rovito, S. M., & Pineda, E. (2019). Representation of Threatened Biodiversity in Protected Areas and Identification of Complementary Areas for Their Conservation: Plethodontid Salamanders in Mexico. *Tropical Conservation Science*, 12(351). <https://doi.org/10.1177/1940082919834156>

Geldmann, J., Manica, A., Burgess, N. D., Coad, L., & Balmford, A. (2019). A global-level assessment of the effectiveness of protected areas at resisting anthropogenic pressures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(46), 23209–23215.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1908221116>

- Ghosh, S., Gnaim, R., Greiserman, S., Fadeev, L., Gozin, M., & Golberg, A. (2019). Macroalgal biomass subcritical hydrolysates for the production of polyhydroxyalkanoate (PHA) by *Haloferax mediterranei*. *Bioresource Technology*, 271, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.108>
- Giri, B., & Varma, A. (2019). Microorganisms in Saline Environments: Strategies and Functions (S. Biology (ed.)). [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-18975-4\\_19](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-18975-4_19)
- González-Hernández, J. C., & Peña, A. (2002). Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (levadura halófila). *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 44(3–4), 137–156.
- Gupta, B., & Huang, B. (2014). Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *International Journal of Genomics*, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2014/701596>
- Gupta, R., Patel, S., Navneet, S., & Shu, C. (2020). Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it o. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(11), 5753–5798. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004475?TRACK=RSS>
- Gutiérrez-Ayala, L. V., Torrescano-Valle, N., & Islebe, G. A. (2012). Reconstrucción paleoambiental del holoceno tardío de la reserva los petenes, Península de Yucatán, México. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, 29(3), 749–763.
- Halffter, G. (2011). Reservas de la Biosfera: Problemas y Oportunidades en México. *Acta Zoológica Mexicana* (N.S.), 27(1), 177–189. <https://doi.org/10.21829/azm.2011.271743>
- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and

analysis program for Windows 95/98/ NT. Nucleic Acids Symposium Series.

Hayat, K., Zhou, Y., Menhas, S., Bundschuh, J., Hayat, S., Ullah, A., Wang, J., Chen, X., Zhang, D., & Zhou, P. (2020). *Pennisetum giganteum*: An emerging salt accumulating/tolerant non-conventional crop for sustainable saline agriculture and simultaneous phytoremediation. *Environmental Pollution*, 265, 114876. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114876>

Hayward, A. (1960). A method for characterizing *Pseudomonas solanacearum*. *Nature*, 186(4722), 405–406. <https://doi.org/10.1099/00221287-63-3-379>

Hernández-Montilla, M., Martínez-Morales, M., Vanegas, G., & De Jong, B. (2016). Assessment of hammocks (Petenes) resilience to sea level rise due to climate change in Mexico. *PLoS ONE*, 11(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162637>

Hernández, M., Cisneros, R., Ortega, J., Márquez, C., Reyes, J., Murillo Amador, B., Hernández Montiel, L., Nieto-Garibay, A., & Rueda-Puente, E. (2016). Mitigating the effect of chloride salts and sulfáticas germination of *Salicornia bigelovii* (Torr.) by beneficial bacteria in vitro. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7, 923–934.

Ibarra-Villarreal, A., Gándara-Ledezma, A., Godoy-Flores, A., Herrera-Sepúlveda, A., Díaz-Rodríguez, A., Parra-Cota, F., & Santos-Villalobos, S. (2021). Salt-tolerant *Bacillus* species as a promising strategy to mitigate the salinity stress in wheat (*Triticum turgidum* subsp. durum). *Journal of Arid Environments*, 186(104399), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2020.104399>

Ilangumaran, G., & Smith, D. L. (2017). Plant growth promoting rhizobacteria in amelioration of salinity stress: A systems biology perspective. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01768>

Íñiguez, L., Jiménez, C., Sosa, J., & Ortega-Rubio, A. (2014). Categories of natural protected areas in Mexico and a proposal for their effectiveness evaluation. *Investigación y Ciencia*, (60), 65–70.

- Jamil, A., Riaz, S., Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2011). Gene expression profiling of plants under salt stress. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 30(5), 435–458. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.605739>
- Jiang, H., Qi, P., Wang, T., Wang, M., Chen, M., Chen, N., Pan, L., & Chi, X. (2018). Isolation and characterization of halotolerant phosphate-solubilizing microorganisms from saline soils. *3 Biotech*, 8(11), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1485-7>
- Kalayu, G. (2019). Phosphate solubilizing microorganisms: Promising approach as biofertilizers. *International Journal of Agronomy*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4917256>
- Kanekar, P., Kanekar, S., Kellkar, A., & Dhakephalkar, P. (2012). Halophiles- Taxonomy, Diversity, Physiology and Applications. In *Microorganisms in Environmental Management: Microbes and Environment* (Vol. 9789400722). <https://doi.org/10.1007/978-94-007-2229-3>
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. I., & Miyata, T. (2002). MAFFT: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30(14), 3059–3066. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>
- Koller, M. (2019). Polyhydroxyalkanoate biosynthesis at the edge of water activity- haloarchaea as biopolyester factories. *Bioengineering*, 6(2), 1–33. <https://doi.org/10.3390/bioengineering6020034>
- Koyoc-Ramírez, L. G., Mendoza-Vega, J., Pérez Jiménez, J. C., & Torrescano Valle, N. (2015). Efectos de la perturbación antrópica en petenes de selva en Campeche, México. *Acta Botanica Mexicana*, 1(110), 89. <https://doi.org/10.21829/abm110.2015.189>
- Kumar, A., & Verma, J. P. (2018). Does plant—Microbe interaction confer stress tolerance in plants: A review? *Microbiological Research*, 207(0), 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.11.004>
- Kumar, M., Etesami, H., & Kumar, V. (2019). Saline Soil- based Agriculture by

Halotolerant Microorganisms. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-13-8335-9>

Kumari, S., Vaishnav, A., Jain, S., Varma, A., & Choudhary, D. (2015). Bacterial-Mediated Induction of Systemic Tolerance to Salinity with Expression of Stress Alleviating Enzymes in Soybean (*Glycine max* L. Merrill). *Journal of Plant Growth Regulation*, 34(3), 558–573. <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9490-0>

Kushner, D. (1985). Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria (A. Press (ed.)). *Microbial life in extreme environments*.

Lamz, A., & González, M. (2013). Salinity as a problem in agriculture: plant breeding an immediate solution review. *Cultivos Tropicales*, 34(4), 31–42. <http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v34n4/ctr05413.pdf>

Li, L., Li, L., Wang, X., Zhu, P., Wu, H., & Qi, S. (2017). Plant growth-promoting endophyte *Piriformospora indica* alleviates salinity stress in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 119, 211–223. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.08.029>

List, R., Rodríguez, P., Pelz-Serrano, K., Benítez-Malvido, J., & Lobato, J. M. (2017). La conservación en México: exploración de logros, retos y perspectivas desde la ecología terrestre. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 88, 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2017.10.007>

Liu, C., Baffoe, D. K., Zhan, Y., Zhang, M., Li, Y., & Zhang, G. (2019). Halophile, an essential platform for bioproduction. *Journal of Microbiological Methods*, 166(June), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105704>

Maheshwari, D., & Saraf, M. (2015). Halophiles: Biodiversity and sustainable exploitation. *Halophiles: Biodiversity and Sustainable Exploitation*, 379–400. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-14595-2>

Mallick, I., Bhattacharyya, C., Mukherji, S., Dey, D., Sarkar, S. C., Mukhopadhyay, U. K., & Ghosh, A. (2018). Effective rhizoinoculation and biofilm formation by



- arsenic immobilizing halophilic plant growth promoting bacteria (PGPB) isolated from mangrove rhizosphere: A step towards arsenic rhizoremediation. *Science of the Total Environment*, 610–611, 1239–1250. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.234>
- Margesin, R., & Schinner, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5(2), 73–83. <https://doi.org/10.1007/s007920100184>
- Maróti, G., & Kondorosi, É. (2014). Nitrogen-fixing *Rhizobium*-legume symbiosis: Are polyploidy and host peptide-governed symbiont differentiation general principles of endosymbiosis? *Frontiers in Microbiology*, 5(326), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00326>
- Masmoudi, F., Abdelmalek, N., Tounsi, S., Dunlap, C. A., & Trigui, M. (2019). Abiotic stress resistance, plant growth promotion and antifungal potential of halotolerant bacteria from a Tunisian solar saltern. *Microbiological Research*, 229(May), 126331. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126331>
- McGenity, T. J., Gemmell, R. T., Grant, W. D., & Stan-Lotter, H. (2000). Origins of halophilic microorganisms in ancient salt deposits. *Environmental Microbiology*, 2(3), 243–250. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2000.00105.x>
- Meena, V. S., Maurya, B. R., Verma, J. P., Aeron, A., Kumar, A., Kim, K., & Bajpai, V. K. (2015). Potassium solubilizing rhizobacteria (KSR): Isolation, identification, and K-release dynamics from waste mica. *Ecological Engineering*, 81, 340–347. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.04.065>
- Mevarech, M., Frolov, F., & Gloss, L. M. (2000). Halophilic enzymes: Proteins with a grain of salt. *Biophysical Chemistry*, 86(2–3), 155–164. [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(00\)00126-5](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(00)00126-5)
- Mishra, J., & Arora, N. K. (2018). Secondary metabolites of fluorescent pseudomonads in biocontrol of phytopathogens for sustainable agriculture. *Applied Soil Ecology*, 125, 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.12.004>

- Mohammadipanah, F., Hamed, J., & Dehghani, M. (2015). Halophiles: Biodiversity and sustainable exploitation. In Halophiles: Biodiversity and Sustainable Exploitation. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-14595-2>
- Mokashe, N., Chaudhari, B., & Patil, U. (2018). Operative utility of salt-stable proteases of halophilic and halotolerant bacteria in the biotechnology sector. *International Journal of Biological Macromolecules*, 117(2018), 493–522. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.217>
- Nastran, M., & Pirnat, J. (2012). Stakeholder participation in planning of the protected natural areas: Slovenia. *Sociologija i Prostor*, 50(2), 141–164. <https://doi.org/10.5673/sip.50.2.1>
- Newmark, W. D. (2008). Isolation of African protected areas. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 6(6), 321–328. <https://doi.org/10.1890/070003>
- Nicolaus, B., Kambourova, M., & Oner, E. T. (2010). Exopolysaccharides from extremophiles: From fundamentals to biotechnology. *Environmental Technology*, 31(10), 1145–1158. <https://doi.org/10.1080/09593330903552094>
- Noori, F., Etesami, H., Najafi Zarini, H., Khoshkholgh-Sima, N. A., Hosseini Salekdeh, G., & Alishahi, F. (2018). Mining alfalfa (*Medicago sativa* L.) nodules for salinity tolerant non-rhizobial bacteria to improve growth of alfalfa under salinity stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 162, 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.092>
- Numan, M., Bashir, S., Khan, Y., Mumtaz, R., Shinwari, Z. K., Khan, A. L., Khan, A., & AL-Harrasi, A. (2018). Plant growth promoting bacteria as an alternative strategy for salt tolerance in plants: A review. *Microbiological Research*, 209, 21–32. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.02.003>
- Ogale, S., Yadav, K., & Navale, S. (2018). Screening of endophytic bacteria from the pharmacologically important medicinal plant *Gloriosa superba* for their multiple plant growth promoting properties. *The Pharma Innovation*, 7(1), 208–214.
- Oliva, M., Montiel, S., García, A., & Vidal, L. (2014). Local perceptions of wildlife use

- in Los Petenes Biosphere Reserve, Mexico: Maya subsistence hunting in a conservation conflict context. *Tropical Conservation Science*, 7(4), 781–795. <https://doi.org/10.1177/194008291400700414>
- Oren, A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 56–63. <https://doi.org/10.1038/sj/jim/7000176>
- Oren, A. (2008). Microbial life at high salt concentrations: Phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems*, 4(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-4-2>
- Oren, A. (2010). Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environmental Technology*, 31(8–9), 825–834. <https://doi.org/10.1080/09593330903370026>
- Orhan, F. (2016). Alleviation of salt stress by halotolerant and halophilic plant growth-promoting bacteria in wheat (*Triticum aestivum*). *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(3), 621–627. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.04.001>
- Orhan, F., & Demirci, A. (2020). Salt Stress Mitigating Potential of Halotolerant/Halophilic Plant Growth Promoting. *Geomicrobiology Journal*, 37(7), 663–669. <https://doi.org/10.1080/01490451.2020.1761911>
- Pandit, A. S., Joshi, M. N., Bhargava, P., Shaikh, I., Ayachit, G. N., Raj, S. R., Saxena, A. K., & Bagatharia, S. B. (2015). A snapshot of microbial communities from the Kutch: one of the largest salt deserts in the World. *Extremophiles*, 19(5), 973–987. <https://doi.org/10.1007/s00792-015-0772-z>
- Pastor, J. M., Salvador, M., Argandoña, M., Bernal, V., Reina-Bueno, M., Csonka, L. N., Iborra, J. L., Vargas, C., Nieto, J. J., & Cánovas, M. (2010). Ectoines in cell stress protection: Uses and biotechnological production. *Biotechnology Advances*, 28(6), 782–801. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.06.005>
- Patel, S., & Gupta, R. (2020). A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of

- Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 70(1), 406–438. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003775>
- Paul, D., & Lade, H. (2014). Plant-growth-promoting rhizobacteria to improve crop growth in saline soils: A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 34(4), 737–752. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0233-6>
- Qin, Y., Druzhinina, I., Pan, X., & Yuan, Z. (2016). Microbially Mediated Plant Salt Tolerance and Microbiome-based Solutions for Saline Agriculture. *Biotechnology Advances*, 34(7), 1245–1259. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.005>
- Quillaguamán, J., Guzmán, H., Van-Thuoc, D., & Hatti-Kaul, R. (2010). Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: Current potential and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), 1687–1696. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2397-6>
- Radhakrishnan, R., Hashem, A., & Abd-Allah, E. (2017). *Bacillus*: A biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments. *Frontiers in Physiology*, 8(667), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00667>
- Ramadoss, D., Lakkineni, V., Bose, P., Ali, S., & Annapurna, K. (2013). Mitigation of salt stress in wheat seedlings by halotolerant bacteria isolated from saline habitats. *SpringerPlus*, 2(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-6>
- Ramírez., N., Serrano., J. A., & Sandoval., H. (2006). Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37, 56–71.
- Roberts, M. (2006). Characterization of organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. In *Solutes of Halotolerant and Halophilic Organisms* 35(5) 615–647. Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(05\)35026-4](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(05)35026-4)
- Romero-Fernández, J., Arias-Mota, R., & Mendoza-Villarreal, R. (2019). Isolation

and selection of solubilizing phosphate soil fungi native to Coahuila state, Mexico. *Acta Botanica Mexicana*, 126(1390), 1–16. <https://doi.org/10.21829/ABM126.2019.1390>

Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3), 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>

Rosano, M. C. (2011). Cap 4: Los ecosistemas de Campeche y sus recursos microbianos. <https://www.researchgate.net/publication/264970483>

Roy, P. D., Torrescano-Valle, N., Islebe, G. A., & Gutiérrez-Ayala, L. V. (2017). Late Holocene hydroclimate of the western Yucatan Peninsula (Mexico). *Journal of Quaternary Science*, 32(8), 1112–1120. <https://doi.org/10.1002/jqs.2988>

Sadeghi, A., Karimi, E., Dahaji, P. A., Javid, M. G., Dalvand, Y., & Askari, H. (2012). Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of *Streptomyces* under saline soil conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1503–1509. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0952-7>

Sadfi-Zouaoui, N., Essghaier, B., Hannachi, I., Hajlaoui, M., & Boudabous, A. (2007). First report on the use of moderately halophilic bacteria against stem canker of greenhouse tomatoes caused by *Botrytis cinerea*. *Annals of Microbiology*, 57(3), 337–339. <https://doi.org/10.1007/BF03175069>

Saghafi, D., Delangiz, N., Lajayer, B. A., & Ghorbanpour, M. (2019). An overview on improvement of crop productivity in saline soils by halotolerant and halophilic PGPRs. *3 Biotech*, 9(7), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1799-0>

Sedlacek, P., Slaninova, E., Koller, M., Nebesarova, J., Marova, I., Krzyzanek, V., & Obruca, S. (2019). PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances. *New Biotechnology*, 49(May 2018), 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.10.005>

- SEMARNAT. (2012). Informe de la Situación del Medio Ambiente en Mexico. Compendio de Estadísticas Ambientales. Indicadores Clave y de Desempeño Ambiental. In Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (2012th ed., p. 361). <http://www.semarnat.gob.mx>
- Setati, M. E. (2010). Diversity and industrial potential of hydrolaseproducing halophilic/halotolerant eubacteria. *African Journal of Biotechnology*, 9(11), 1555–1560. <https://doi.org/10.5897/ajb10.051>
- Shah, G., Jan, M., Afreen, M., Anees, M., Rehman, S., Daud, M. K., Malook, I., & Jamil, M. (2017). Halophilic bacteria mediated phytoremediation of salt-affected soils cultivated with rice. *Journal of Geochemical Exploration*, 174, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2016.03.011>
- Sharma, S., Kulkarni, J., & Jha, B. (2016). Halotolerant rhizobacteria promote growth and enhance salinity tolerance in peanut. *Frontiers in Microbiology*, 7(OCT), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01600>
- Shen, Kang, Y. J., Wang, H. L., Zhang, X. S., & Zhao, Q. X. (2012). Effect of Plant Growth-promoting Rhizobacteria (PGPRs) on plant growth, yield, and quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) under simulated seawater irrigation. *Journal of General and Applied Microbiology*, 58(4), 253–262. <https://doi.org/10.2323/jgam.58.253>
- Shen, W., Ni, Y., Gao, N., Bian, B., Zheng, S., Lin, X., & Chu, H. (2016). Bacterial community composition is shaped by soil secondary salinization and acidification brought on by high nitrogen fertilization rates. *Applied Soil Ecology*, 108, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.08.005>
- Sinha, R., & Khare, S. K. (2013). Characterization of detergent compatible protease of a halophilic *Bacillus* sp. EMB9: Differential role of metal ions in stability and activity. *Bioresource Technology*, 145, 357–361. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.024>
- Smardon, R., & Faust, B. (2006). Introduction: International policy in the biosphere

- reserves of Mexico's Yucatan peninsula. *Landscape and Urban Planning*, 74(3–4), 160–192. <https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2004.09.002>
- Souza, V., & Eguiarte, L. (2018). In the Beginning, There Was Fire: Cuatro Ciénegas Basin (CCB) and the Long History of Life on Earth. In *Natural History and Microbiology* (pp. 21–33). Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-93423-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-93423-5_2)
- Souza, Valeria, Segura, A., & Foster, J. (2020). Astrobiology and Cuatro Ciénegas Basin as an Analog of Early Earth. <http://www.springer.com/series/15841>
- Staal, M., Rabouille, S., & Stal, L. J. (2007). On the role of oxygen for nitrogen fixation in the marine cyanobacterium *Trichodesmium* sp. *Environmental Microbiology*, 9(3), 727–736. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01195.x>
- Subramaniam, G., Arumugam, S., & Rajendran, V. (2016). Plant growth promoting actinobacteria: A new avenue for enhancing the productivity and soil fertility of grain legumes. In *Plant Growth Promoting Actinobacteria: A New Avenue for Enhancing the Productivity and Soil Fertility of Grain Legumes*. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-0707-1>
- Tank, N., & Saraf, M. (2010). Salinity-resistant plant growth promoting rhizobacteria ameliorates sodium chloride stress on tomato plants. *Journal of Plant Interactions*, 5(1), 51–58. <https://doi.org/10.1080/17429140903125848>
- Thatoi, H., Mishra, R. R., & Behera, B. C. (2020). Biotechnological potentials of halotolerant and halophilic bacteria from mangrove ecosystems. In *Biotechnological Utilization of Mangrove Resources*. INC. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819532-1.00020-2>
- Thombre, R. S., Shinde, V. D., Oke, R. S., Dhar, S. K., & Shouche, Y. S. (2016). Biology and survival of extremely halophilic archaeon *Haloarcula marismortui* RR12 isolated from Mumbai salterns, India in response to salinity stress. *Scientific Reports*, 6(25642), 6–15. <https://doi.org/10.1038/srep25642>
- Torbaghan, M. E., Lakzian, A., Astaraei, A. R., Fotovat, A., & Besharati, H. (2017).

- Salt and alkali stresses reduction in wheat by plant growth promoting haloalkaliphilic bacteria. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 17(4), 1058–1073. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162017000400016>
- Toro-Ramírez, A., Sosa-López, A., Ayala-Pérez, L. A., Pech, D., Hinojosa-Garro, D., & Del Río-Rodríguez, R. (2017). Abundancia y diversidad de la ictiofauna en la Reserva de la Biósfera Los Petenes, Campeche, México: Asociaciones con los ciclos nictimerales y las épocas climáticas. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 45(2), 311–321. <https://doi.org/10.3856/vol45-issue2-fulltext-7>
- Torrescano-Valle, N., Islebe, G., & Roy, P. (2019). The Holocene and Anthropocene Environmental History of Mexico. In *A Paleoecological Approach on Mesoamérica*. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-31719-5>
- Turner, T. R., Ramakrishnan, K., Walshaw, J., Heavens, D., Alston, M., Swarbreck, D., Osbourn, A., Grant, A., & Poole, P. S. (2013). Comparative metatranscriptomics reveals kingdom level changes in the rhizosphere microbiome of plants. *ISME Journal*, 7(12), 2248–2258. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.119>
- UNESCO, (2016). Lima Action Plan for UNESCO ' s Man and the Biosphere ( MAB ) Programme and its World Network of Biosphere Reserves (2016-2025). 1–11. [http://www.unesco.org/fileadmin/MULTIMEDIA/HQ/SC/pdf/Lima\\_Action\\_Plan\\_en\\_final.pdf](http://www.unesco.org/fileadmin/MULTIMEDIA/HQ/SC/pdf/Lima_Action_Plan_en_final.pdf)
- Upadhyay, S., & Singh, D. (2015). Effect of salt-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria on wheat plants and soil health in a saline environment. *Plant Biology*, 17(1), 288–293. <https://doi.org/10.1111/plb.12173>
- Upadhyay, S., Singh, J., & Singh, D. (2011). Exopolysaccharide-producing plant growth-promoting rhizobacteria under salinity condition. *Pedosphere*, 21(2), 214–222. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(11\)60120-3](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(11)60120-3)
- Verma, P., Yadav, A. N., Khannam, K. S., Kumar, S., Saxena, A. K., & Suman, A. (2016). Molecular diversity and multifarious plant growth promoting attributes of



- Bacilli associated with wheat (*Triticum aestivum* L.) rhizosphere from six diverse agro-ecological zones of India. *Journal of Basic Microbiology*, 56(1), 44–58. <https://doi.org/10.1002/jobm.201500459>
- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & De los Santos-Villalobos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1), 95–130. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
- Wang, Y., Yin, J., & Chen, G. Q. (2014). Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities. *Current Opinion in Biotechnology*, 30, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.06.001>
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). Weisburg 1991. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
- Wilson, P., & Knigh, S. (1952). *Experiments in bacterial physiology* (3rd ed.). Burgess Publishing Co.
- Yadav, A. N., Verma, P., Kumar, M., Pal, K. K., Dey, R., Gupta, A., Padaria, J. C., Gujar, G. T., Kumar, S., Suman, A., Prasanna, R., & Saxena, A. K. (2015). Diversity and phylogenetic profiling of niche-specific Bacilli from extreme environments of India. *Annals of Microbiology*, 65(2), 611–629. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0897-9>
- Zahedi, H. (2016). Growth-Promoting Effect of Potassium-Solubilizing Microorganisms on Some Crop Species. *Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture* (pp. 1–331). <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2776-2>
- Zamora-Crescencio, P., Mas, J.-F., Rico-Gray, V., Domínguez-Carrasco, M. del R., Villegas, P., Gutiérrez-Báez, C., & Barrientos-Medina, R. C. (2015). Composición y estructura arbórea de petenes en la Reserva de la Biosfera de

- Los Petenes, Campeche, México. *Polibotánica*, 0(39), 1–19.  
<https://doi.org/10.18387/polibotanica.39.1>
- Zavaleta, A. (2006). Potencial biotecnológico de los microorganismos extremófilos. *Ciencia e Investigación*, 9(2), 12–29.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.15381/ci.v9i2.5952>
- Zhang, W., Li, Y. X., Niu, Y., Zhang, F., Li, Y. B., & Zeng, R. J. (2020). Two-stage enrichment of hydrogen-oxidizing bacteria as biofertilizers. *Chemosphere*, xxxx, 128932. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128932>
- Zhao, S., Liu, J. J., Banerjee, S., Zhou, N., Zhao, Z. Y., Zhang, K., Hu, M. F., & Tian, C. Y. (2020). Biogeographical distribution of bacterial communities in saline agricultural soil. *Geoderma*, 361(114095), 1–18.  
<https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.114095>
- Zhou, W., Qin, S., Lyu, D., & Zhang, P. (2015). Soil sterilisation and plant growth-promoting rhizobacteria promote root respiration and growth of sweet cherry rootstocks. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 61(3), 361–370.  
<https://doi.org/10.1080/03650340.2014.935346>
- Zhu, F., Qu, L., Hong, X., & Sun, X. (2011). Isolation and characterization of a phosphate-solubilizing halophilic bacterium *Kushneria* sp. YCWA18 from Daqiao saltern on the coast of yellow sea of China. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.  
<https://doi.org/10.1155/2011/615032>
- Zhu, J., Li, M., & Whelan, M. (2018). Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review. *Science of the Total Environment*, 612, 522–537. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.095>
- Zhuang, X., Han, Z., Bai, Z., Zhuang, G., & Shim, H. (2010). Progress in decontamination by halophilic microorganisms in saline wastewater and soil. *Environmental Pollution*, 158(5), 1119–1126.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.01.007>

