

**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS- ICUAP**

**POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA**

**DIVERSIDAD GENÉTICA Y FILOGENIA DE BACTERIAS PERTENECIENTES  
AL GÉNERO *Bacillus*, TOLERANTES A CROMO, ASOCIADAS AL MEZQUITE  
(*Prosopis Laevigata*)**

**TESIS**

Que para obtener el grado de:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)**

Con opción en **BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA**

**PRESENTA**

**QFB. BERENICE CHUMACERO MORENO**

**DIRECTOR**

**D. C. JOSÉ ANTONIO MUNIVE HERNÁNDEZ**

**PUEBLA, PUE. DICIEMBRE 2019**

<b>1.</b>	<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
	2.1 Metales pesados.....	2
	2.2 Biorremediación suelos contaminados con de metales pesados.....	3
	2.2.1 Bacterias biorremediadoras y Fitorremediación.....	3
	2.3 Importancia de <i>Prosopis laevigata</i> en México.....	4
	2.4 El género <i>Bacillus</i> .....	5
	2.4.1 Características.....	5
	2.4.2 Taxonomía del género <i>Bacillus</i> .....	6
<b>3.</b>	<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>9</b>
<b>4.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>11</b>
<b>5.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>12</b>
	5.1 Objetivos general.....	12
	5.2 Objetivos específicos.....	12
<b>6.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>12</b>
	6.1 Prueba de nodulación.....	13
	6.2 Determinación de Ácido indol acético por el método de Glickman.....	13
	6.3 Determinación de solubilización de fosfatos.....	14
	6.4 Amplificación de los genes 16s rDNA y <i>rpoB</i> .....	14
	6.5 Análisis de secuencias nucleotídicas.....	15
	6.6 Caracterización bacteriana mediante Tinción de Schaeffer-Fulton.....	15
	6.7 Caracterización bacteriana mediante utilización de fuentes de carbono.....	15
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>16</b>
	7.1 Prueba de nodulación.....	16
	7.2 Pruebas de AIA y solubilización de fosfatos.....	18
	7.3 Amplificación de los genes 16s rDNA y <i>rpoB</i> .....	20
	7.3.1 Gen 16s rDNA.....	20
	7.3.2 Gen <i>rpoB</i> .....	25
	7.4 Tinción de Schaeffer-Fulton.....	28
	7.5 Caracterización fenotípica mediante utilización de carbohidratos.....	29
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>30</b>
<b>9.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>30</b>

<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>39</b>
10.1 Medios YM Y YMA.....	39
10.2 Medio Jensen libre de nitrógeno.....	39
10.3 Secuencias <i>16s rDNA</i> .....	39
10.4 Secuencias gen <i>rpoB</i> .....	40

## 1. RESUMEN

Los metales pesados son un grupo de elementos químicos que se encuentran de forma natural en el medio ambiente, algunos de ellos cumplen funciones importantes en los organismos vivos; sin embargo, debido a distintas actividades humanas su distribución y disponibilidad han cambiado provocando una problemática ambiental, contaminando los ecosistemas y afectando a los organismos vivos que ahí se desarrollan. Una de las alternativas para tratar esta problemática es el uso de tecnologías de biorremediación como la fitorremediación y la remediación microbiana para la remoción de metales pesados, que pueden utilizarse de manera individual o combinada, resultando de este último modo, más eficaz. Unas de las zonas más vulnerables y sensibles a la contaminación por metales pesados son las zonas áridas, que se extienden por gran parte de México, una de las plantas que es característica de estas zonas es la planta de *Prosopis laevigata*, la cual tiene la capacidad de crecer en condiciones adversas y puede utilizarse como biorremediadora, además, éstas plantas pueden estar asociadas con bacterias del género *Bacillus* que se han reportado como bioacumuladoras de metales pesados y promotoras de crecimiento vegetal, por lo que caracterizar especies del género *Bacillus* asociadas al mezquite resulta de gran importancia en el proceso de establecer técnicas biotecnológicas para la remoción de metales pesados, tales como el cromo, el cual es un contaminante inorgánico de gran impacto ambiental. Para lo anterior se trabajó con un total de 59 cepas bacterianas aisladas de nódulos de mezquite *Prosopis laevigata* de la región de Chietla, Puebla, se realizó la prueba de nodulación en plantas de *Macroptilium atropurpureum* y *Phaseolus vulgaris* utilizando las 59 bacterias aisladas y finalmente solo se trabajaron con 5 cepas que en trabajos anteriores se encontraron como las más tolerantes a cromo, se amplificó el gen ribosomal 16s rDNA, y el gen *rpoB*, las secuencias se analizaron por los métodos filogenéticos Neighbour Joining y Maximum Likelihood, las cepas se identificaron como *Bacillus velezensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* y *Bacillus inaquosus*.

Debido a que la prueba de nodulación sugiere de manera indirecta la fijación de nitrógeno realizada por las cepas, y dado el efecto de crecimiento prominente de las plantas inoculadas con las cepas en comparación con los controles, para complementar la caracterización bacteriana, también se realizó la búsqueda de producción de Ácido indolacético (AIA) de las 5 cepas más tolerantes a crecimiento en cromo, ya que es una de las fitohormonas más estudiadas y que se conoce, cumple un papel importante en el crecimiento de plantas en sitios contaminados con metales pesados; así como la solubilización de fosfatos que se ha demostrado tienen efecto en la movilización de metales y finalmente la caracterización mediante utilización de diferentes tipos de carbohidratos que es característica de cada género.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Metales pesados

El término metal pesado se refiere al grupo de elementos de densidad mayor a  $5 \text{ g cm}^{-3}$ , son componentes naturales del medio ambiente y algunos son esenciales para las plantas y los animales y deben estar presentes en cantidades adecuadas (Alloway, 2012). Algunos de estos metales tienen la función de ser micronutrientes y son esencialmente necesarios para diversas funciones fisiológicas de plantas y animales, como: (i) formar la estructura de proteínas y pigmentos (ii) procesos redox (iii) regulación de la presión osmótica (iv) mantenimiento del equilibrio iónico y (v) actuando como componente enzimático (Oves *et al.*, 2016).

Las fuentes naturales más importantes de estos elementos son la meteorización de los minerales, la erosión y la actividad volcánica, mientras que las fuentes antropogénicas dependen de actividades humanas como la minería, la fundición, la galvanoplastia, el uso de pesticidas y la descarga de fertilizantes fosfatados, así como los biosólidos (por ejemplo, estiércol de ganado, compost, y fangos de aguas residuales municipales), deposición atmosférica.

En la actualidad el uso indiscriminado de los metales pesados para fines humanos ha alterado sus ciclos geoquímicos y su equilibrio bioquímico, resultando en una liberación excesiva, contaminando los suelos, siendo las zonas áridas y ambientes acuáticos los más sensibles. La exposición prolongada y la mayor acumulación de tales metales, e incluso en concentraciones muy bajas pueden tener efectos nocivos para la salud humana para la biota acuática (Dixit *et al.*, 2015). Los principales elementos potencialmente tóxicos, son: As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn, Sb, Co y Ni (Tóth *et al.*, 2016). La toxicidad de estos metales depende en gran medida de sus formas, siendo la forma oxidada la más tóxica, además, debido a su naturaleza no biodegradable, logran acumularse en las células vivas, afectando las funciones normales de los seres vivos expuestos a ellos (Manceau, 2018). En humanos, la exposición a estos metales provoca efectos carcinogénicos, teratogénicos, mutagénicos, neurotóxicos, disruptores endocrinos e incluso pueden dañar el sistema inmunológico de los organismos (Mahurpawar, 2015). En las plantas perturban grupos esenciales de enzimas, destruyen la integridad de biomoléculas importantes, y modifican algunas macromoléculas, reemplazando iones metálicos esenciales y modificando los mecanismos de defensa antioxidantes como resultado de la producción de ROS (Sarwar *et al.*, 2017).

Una evaluación del riesgo ambiental debido a la contaminación del suelo por metales pesados es de particular importancia para las áreas agrícolas y no agrícolas porque los metales pesados persisten en los suelos durante mucho tiempo. Los estudios sobre la contaminación por metales pesados en suelos ayudan a desarrollar estrategias para proteger los entornos urbanos y la salud humana (Ungureanu *et al.*, 2017).

De los diferentes metales pesados, el cromo y sus diversas formas han mostrado un impacto más perjudicial sobre la actividad microbiana y la fertilidad del suelo, afectando el desarrollo general de las plantas a través de alteraciones en los tejidos, deteniendo las actividades fisiológicas y disminuyendo la biomasa (Ahemad, 2015). En las últimas décadas, la cantidad de cromo en los ecosistemas acuáticos y terrestres ha aumentado como consecuencia de diferentes actividades humanas. El cromo (VI) se encuentra, después del plomo, cadmio y mercurio entre los principales metales tóxicos (Saha *et al.*, 2010).

Para tratar esta problemática ambiental se ha recurrido a la utilización de métodos físicos y químicos de remoción de metales pesados, los cuales han resultado costosos y poco efectivos, la biorremediación es una tecnología ecológica alternativa, innovadora y eficiente para recuperar ambientes contaminados con metales pesados mediante el uso de los mecanismos biológicos inherentes de los microorganismos y las plantas (Ojuederie y Babalola, 2017). Algunos organismos han desarrollado diversas estrategias para su supervivencia en hábitats contaminados con metales pesados, adoptando diferentes mecanismos de desintoxicación, como la biosorción, la bioacumulación, la biotransformación que puede explotarse para la biorremediación *ex situ* o *in situ* (Mahar *et al.*, 2016).

## **2.2 Biorremediación de suelos contaminados con metales pesados**

### **2.2.1 Bacterias biorremediadoras y fitorremediación**

Las plantas y los microorganismos se utilizan para eliminar contaminantes tóxicos del medio ambiente ya que han resultado ser un método más efectivo de remoción de metales tóxicos porque es un proceso natural, respetuoso con el medio ambiente, tiene un bajo costo y una alta aceptación por parte del público.

La eficiencia de la fitorremediación puede mejorarse con la ayuda de bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR). Para optimizar este proceso, se necesitan nuevas asociaciones relevantes de microorganismos y plantas para optimizar el efecto sinérgico entre ambos (Lebeau *et al.*, 2008). Las bacterias transforman los metales en formas biodisponibles y solubles mediante la acción de sideróforos, ácidos orgánicos, biometilación y procesos redox. Las bacterias PGPR poseen rasgos que promueven el crecimiento, como es la solubilización de fósforo, la fijación de nitrógeno, el secuestro de hierro y fitohormonas, entre otros, lo cual influye positivamente en las plantas al mejorar el crecimiento y el desarrollo de las raíces, lo que aumenta la tolerancia de las plantas a diversas condiciones adversas. Además, las bacterias PGPR producen ácidos orgánicos de bajo peso molecular, por ejemplo, ácidos glucónico, oxálico y cítrico, que desempeñan un papel positivo en la movilización y solubilidad de los metales pesados. Estos ácidos orgánicos desempeñan un papel importante en formación de complejos de los metales pesados y aumentan su movilidad para la absorción de la planta (Ullah *et al.*, 2015).

Una vez que las raíces de la planta absorben un metal pesado específico, puede acumularse en los tejidos de la raíz (fitoinmovilización) o translocarse a las partes aéreas de la planta a través de los vasos del xilema. En el brote, los metales generalmente se acumulan en las vacuolas (orgánulos celulares con baja actividad metabólica). El mecanismo de fitoextracción tiene cinco pasos principales; movilización de metales en la rizosfera, captación de iones metálicos por las raíces de las plantas, translocación hacia partes aéreas de las plantas, secuestro de metales en los tejidos de las plantas y tolerancia a metales pesados. La tolerancia a metales pesados es un requisito previo para el proceso de fitorremediación, ya que cuanto más tolerante sea la planta al estrés metálico, mayor será la acumulación de metal en los tejidos vegetales con efectos adversos mínimos sobre la salud de la planta. El potencial de tolerancia al metal de una planta depende de mecanismos como la unión del metal a la pared celular, el transporte activo de iones metálicos a las vacuolas, la quelación de iones metálicos con proteínas y péptidos y la formación de complejos (Sarwar *et al.*, 2017).

Los microorganismos realizan la eliminación de metales pesados a través de los siguientes mecanismos: (A) Captación pasiva y activa de metales pesados por materiales biológicos. La absorción de metales pesados puede ser pasiva (rápida) a través de la adsorción en la superficie celular o cualquier componente extracelular como los polisacáridos, o alternativamente activa (lenta) mediante el secuestro de los metales pesados a través de la interacción con metalotioneínas (MT) en la célula. (B) Mecanismos de biosorción de metales pesados a través de (1) adsorción de la superficie celular, (2) precipitación extracelular, (3) acumulación intracelular a través de componentes especiales, como metalotioneínas (MT) o (4) acumulación intracelular en vacuolas. (C) Remediación de metales pesados a través de la formación de sideróforos, ayudado por el transporte de metal mediado por proteínas de membrana y la formación de complejos metálicos. (D) Producción de biosurfactantes, la precipitación de metales pesados tiene lugar a través de la sorción y la desorción en la matriz de metales pesados suelo-agua que conduce a la precipitación de metales pesados. Algunos de los géneros bacterianos reportados como buenos biorremediadores de metales pesados comprenden: *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Pseudomonas* y *Rhizobium* (Banik *et al.*, 2014).

En el caso específico de bacterias tolerantes a Cr se ha encontrado que diversas cepas que poseen mecanismos de resistencia a Cr (VI) como *E. coli*, *P. putida*, *Bacillus sp.*, *Shewanella sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Streptomyces sp.* tienen el operón chrBCAF, donde las proteínas ChrA y ChrB actúan como regulador sensible al cromato (Choudhary *et al.*, 2017).

### **2.3 Importancia de *Prosopis laevigata* en México**

Desde épocas remotas, el mezquite (*Prosopis spp*) ha constituido un recurso valioso para los habitantes de zonas áridas, quienes encontraron en él múltiples beneficios, ya que todas

las partes de la planta son susceptibles a ser utilizadas. Su utilización ha continuado a través de largo tiempo, representando para los indígenas, colonizadores y pioneros, uno de los recursos vegetales más útiles, ya que de él han obtenido: leña, carbón, goma, materiales de construcción, alimento forraje, néctar para la apicultura, herramientas de trabajo y uso medicinal (Cervantes, 2005). Esta es una planta perteneciente al grupo de las leguminosas, originaria de México y elemento característico de las zonas áridas de Norte América, aunque su distribución se ha extendido hasta algunas regiones áridas y semiáridas de Centro y Sudamérica. En México es abundante en los Estados del norte y centro, así como en las planicies costeras en donde se establece en condiciones áridas y semiáridas (Rodríguez *et al.*, 2014).

El mezquite se encuentra ampliamente distribuido en México ya que este posee una amplia extensión de zonas áridas y semiáridas (56 y 23 millones de hectáreas respectivamente) que en conjunto representan más de 40 % de la superficie total del territorio mexicano, estas zonas son apropiadas para el desarrollo agropecuario forestal basado en el cultivo del mezquite (Monroy y Ramírez, 2018).

En la actualidad, se le considera con potencial para forraje, material de construcción y combustible; sus comunidades proporcionan sitios para recreación humana, refugio de fauna silvestre, fuente de néctar para abejas y otros insectos; es importante también en la retención del suelo, ya que previene el proceso de desertificación (Meza y Osuna, 2003). La forma de vida arbórea indica disponibilidad de agua subterránea a poca profundidad, por lo que los campesinos lo utilizan como indicador de posibles fuentes de agua; la forma arbustiva se relaciona con manto freático profundo. La madera se puede utilizar para fabricar postes, durmientes, mangos de herramientas, muebles, pisos, arados, carretas y en algunos lugares, para el adoquinado de las calles (Rodríguez *et al.*, 2014). Por otra parte, esta leguminosa se considera de relevante importancia debido a su impacto ecológico ya que diversos estudios la han atribuido al control de erosión, mejora de la fertilidad del suelo y también es capaz de ser acumulador de cromo, cadmio, plomo y níquel en condiciones *in vitro*, destacando su potencial para fines de fitorremediación (Buendía *et al.*, 2012).

## **2.4 El género *Bacillus***

### **2.4.1 Características**

Los integrantes del género *Bacillus* comprenden bacterias aerobias grampositivas, formadoras de esporas, con forma alargada, colonias fenotípicas y genotípicamente heterogéneas. Su hábitat natural comprende el suelo, el polvo, el agua y el medio ambiente, la mayoría no son patógenos, pero pueden llegar a contaminar algunos alimentos, algunas especies producen toxinas provocando diversas enfermedades en el ser humano y animales (Ahn *et al.*, 2006).

El tamaño de las células vegetativas oscila entre  $0.5 \times 1.2$ – $2.5 \times 10 \mu\text{m}$  y ocurre solo o en cadenas. La mayoría de los bacilos son móviles y expresan flagelos peritricos. Las colonias formadas por los bacilos son rugosas con un perímetro de forma irregular. Su temperatura

de crecimiento varía entre 4 °C y 50 °C con una temperatura óptima de 25 a 37 °C, algunas cepas termofílicas pueden crecer a 75 °C. Poseen una capa superficial cristalina de proteína o glucoproteínas llamadas capas S, que varían en pesos moleculares (40–200 kDa) entre las cepas. Algunos bacilos expresan cápsulas que consisten en homopolipéptidos de ácido D o L-glutámico o heteropolisacáridos (Bhunia, 2018).

Este grupo de bacterias representa microorganismos de gran importancia económica, médica, bioplaguicida, industrial, alimenticia y en la agricultura (Outtrup *et al.*, 2002), es uno de los géneros utilizados como biosorbente de metales pesados probados (Tabla 1) (Saha y Orvig 2010).

Tabla 1. Biomasa bacteriana biosorbente (Saha y Orvig 2010).

Name of bacteria	Sorption capacity (mg/g) (a) or removal efficiency(%) (b)
Active sludge bacteria	3.2 mg g <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>
<i>Aeromonas caviae</i>	284.44 (a)
<i>Aeromonas caviae</i>	124.46 (a)
<i>Bacillus circulans</i>	34.5 (a)
<i>Bacillus megaterium</i> (dead)	30.7 (a)
<i>Bacillus coagulans</i> (dead)	39.9 (a)
<i>Bacillus coagulans</i> (live)	23.8 (a)
<i>Bacillus licheniformis</i>	69.35 (a)
<i>Bacillus thuringiensis</i> (vegetative)	83.33 (a)
<i>Bacillus thuringiensis</i> (Spore-crystal mixture)	72.99 (a)
Biofilm of <i>E. coli</i> supported on carbon	97.70 (a)
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	95 (b)
<i>Chroococcus</i> sp. HH-11	21.36 (a)
<i>E. coli</i> ASU 7	64.36 (a)
<i>Nostoc muscorum</i>	22.92 (a)
<i>Nostoc calcicola</i> HH-12	12.23 (a)
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	86.20 (a)
<i>Pseudomonas</i> sp.	95 (a)
<i>Phormidium</i> sp.	24.3(a)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Bacillus subtilis</i>	1.44 (a)
<i>Staphylococcus xylosum</i>	143 (a)
<i>Zoogloea ramigera</i>	3.4 mg g <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>

#### 2.4.2 Taxonomía del género *Bacillus*

Las especies del género *Bacillus* pertenecen al Reino Bacteria; Filo Firmicutes; Clase Bacilli; Orden Bacillales y Familia Bacillaceae (Maughan y Van der Auwera, 2011).

El nombre de *Bacillus* fue establecido en 1872 por Ferdinand Cohn, estas bacterias por primera vez fueron agrupadas por su característica de crecer en filamentos. En 1876 Cohn y Koch identificaron dos de las tres especies reconocidas actualmente de este género: *B. subtilis* y *B. anthracis* gracias a la caracterización de las cepas productoras de esporas resistentes al calor (Claus y Fritze, 1989).

Para tener una clasificación más robusta, las secuencias del gen 16s rDNA se establecieron como un elemento clave más útil para inferir relaciones filogenéticas porque se encuentran presentes en todos los organismos y se consideró que los cambios en las secuencias de nucleótidos ocurrían de manera cronológica. De esta manera, varias especies de *Bacillus*

fueron reclasificadas en función de la alineación de la secuencia del 16S rDNA (Rössler *et al.*, 1991).

Desde 1986 el género *Bacillus* comenzó a abarcar una amplia variedad de especies fenotípicamente heterogéneas, las cuales muestran una amplia gama de requisitos nutricionales, diversidad fisiológica y metabólica y composición de bases de ADN característicos. Posterior a los cinco grupos clasificados inicialmente se describió una nueva organización de las especies reportada en 79 grupos que comprendían un mayor número reportado de especies del género (Priest *et al.*, 1988).

En la actualidad el estudio de la secuencia del gen 16S rDNA y las características fenotípicas no son suficientes para diferenciar las bacterias dentro de este género debido a su alta conservación. Para determinar las afiliaciones taxonómicas de las especies se han utilizado técnicas moleculares para evaluar la diversidad bacteriana basándose en la identificación del genoma (Porwal, 2009), el enfoque de Identidad de Nucleótido Promedio (ANI) (Kim *et al.*, 2017; Konstantinidis y Tiedje, 2005). La filogenia basada en la distancia del genoma, basado en la secuencia de todo el genoma (GBDP), el calculador de distancia genoma-genoma in silico (isDDH) (Colston *et al.*, 2014), el análisis de secuencia multi-locus (nMLSA), *gyrB* y *plcR*, polimorfismo de Longitud de Fragmento Ampliado (AFLP), son estándares de oro para la definición de la especie procariota, sin embargo estos enfoques aun no son capaces de llegar a una conclusión acorde y convincente, por lo tanto, hasta ahora, las relaciones filogenéticas y taxonómicas de *Bacillus* aún se encuentran bajo discusión intensa y controvertida (Liu *et al.*, 2015).

Se considera que el gen *rpoB* es el gen más adecuado para la identificación y discriminación filogenético a nivel de especies y subespecies del género *Bacillus*, según el tamaño del fragmento de *rpoB* se establece diferentes puntos de corte para la asignación de especie: 300-600 pb se corresponde con  $\geq 94\%$ ; 600-825 pb una similitud  $\geq 96\%$  (Bou *et al.*, 2011). Sin embargo, la utilización de la secuencia completa del gen *rpoB* en estudios taxonómicos, filogenéticos y evolutivos se ha informado muy eficiente para la clasificación (Sharma y Patil, 2011). La clasificación complementaria mediante la secuenciación de los genes *gyrB* y *recA* también se han aplicado para análisis filogenéticos e identificación de especies de *Bacillus*, aunque solo se han evaluado en pocas especies de *Bacillus* estrechamente relacionadas (Mohkam *et al.*, 2016; Logan y Vos, 2015).

Actualmente el número de especies del género *Bacillus* no se encuentran bien esclarecido, diversos autores reportan diferente número de especies clasificados es varios grupos, por ejemplo la Lista de nombres Procarióticos Standing in Nomenclature (LPSN, <http://www.bacterio.net>) reporta 377 especies en la actualidad, sin embargo también se ha descrito que la familia *Bacillaceae* consta de al menos 56 géneros y 545 especies, el género *Bacillus* contiene alrededor de 136 especies, que han sido delineadas en base a la secuencia del gen 16S rDNA y la relación ADN-ADN (Bhunja, 2018).

En las bases de datos de RDP/NCBI, de un total de 2611 secuencias de 16S rDNA individuales pertenecientes a las 175 especies diferentes del género *Bacillus*, solo 1586 se han identificado hasta el nivel de especie secuencias de *Bacillus anthracis* (153 cepas), *B. cereus* (211 cepas), *B. thuringiensis* (108 cepas), *B. subtilis* (271 cepas), *B. licheniformis* (131 cepas), *B. pumilus* (83 cepas), *B. megaterium* (47 cepas), *B. sphaericus* (42 cepas), *B. clausii* (39 cepas) y *B. halodurans* (36 cepas) se consideraron para generar especies - Marco específico y sondas como herramientas para su rápida identificación (Porwal *et al.*, 2009).

Estudios anteriores reportan que el género comprende más de 336 especies, las cuales, por su similitud genética pueden clasificarse en distintos grupos, siendo los más destacados: a) el grupo de *B. cereus*, asociado a patogenicidad, que incluye a *B. cereus-anthraxis-thuringiensis*; b) los bacilos ambientales que son caracterizados por su presencia en distintos hábitats, como el grupo de *Bacillus subtilis*, comprendido por *B. subtilis-licheniformis-pumilus*; c) el grupo de *B. clausii-halodurans*; y d) el grupo de *B. coahuilensis* (Alcaraz *et al.*, 2010). Sin embargo, diversos estudios han confirmado la naturaleza polifilética de la especie *B. cereus* y *B. thuringiensis* al demostrar su agrupamiento en múltiples clados "multiespecíficos", donde no se apoya la clasificación taxonómica actual de *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. anthracis*, y sugiere que la agrupación filogenética basada incluso a nivel del genoma central, no permite la identificación de estas especies. Así se definen ahora. Además, estudios anteriores de MLST han demostrado que la agrupación de aislados del grupo *B. cereus* no produce clados que sean compatibles con la designación de la especie (Kovac *et al.*, 2016).

Más recientemente se ha publicado de manera efectiva pero aún no válida, que el grupo de *Bacillus cereus* comprende 11 especies estrechamente relacionadas, incluidas las primeras especies descritas *B. anthracis*, junto con *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. pseudomycoides* y la recientemente identificada *B. gaemokensis*, *B. manliponensis*, *B. cytotoxicus*, *B. toyonensis*, *B. bingmayongensis* (Tres especies: *B. gaemokensis*, *B. manliponensis* y *B. bingmayongensis* (Liu, 2017).

El proceso de clasificación de especies sigue siendo un proceso continuo, ya que se han definido varios géneros nuevos a partir de organismos conocidos anteriormente, lo que explicaría el cambio de especies reportados de 2010 a la fecha, esta nueva clasificación organiza a especies anteriormente conocida como *Bacillus* en: *Amphibacillus*, *Filobacillus*, *Alicyclobacillus*, *Aneurinibacillus*, *Brevibacillus*, *Geobacillus*, *Gracibacillus*, *Paenibacillus*, *Salibacillus*, *Ureibacillus* y *Virgibacillus*. *B. kaustophilus*, *B. sterothermophilus*, *B. thermoglucosidasius* y *B. thermoleovorans* han sido transferidas al género recién creado *Geobacillus* (Goto *et al.*, 2000; Nazina *et al.*, 2001; Xu y Cote, 2003).

Existe un alto grado de similitud entre los genomas de la *B. methylotrophicus*, *B. velezensis*, *B. oryzicola*, y *B. vanillea*. Se realizó un análisis filogenético extendido basado en 66 genomas que presentan un alto grado de similitud con la cepa tipo de *B. amyloliquefaciens*, descartándose que pudieran distinguirse tres clados estrechamente vinculados que

incluyen un grupo formado por *B. methylotrophicus* y *B. velezensis*. La estrecha relación de los tres clados que consiste en representantes de *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis* y *B. siamensis* se validaron mediante la homología de la secuencia del gen *rpoB* y el análisis ANI, y dDDH y Con lo anterior se ha propuesto introducir el término "grupo operacional *B. amyloliquefaciens*" para subrayar su estrecha relación filogenómica (Adékambi, 2008).

Para agrupar el complejo de especies de *B. subtilis* se registraron los siguientes clados, que complementan los estudios anteriormente citados: clado I, consiste en *B. subtilis* incluyendo sus tres subespecies *subtilis*, *spizenii*, *yinaquosorum*, *B. tequilensis*, *B. vallismortis*, *B. mojavenensis* y *B. atrophaeus*, clado II que consiste en *B. siamensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis* y un complejo específico que consiste en *B. methylotrophicus*, y *B. amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum* (estudios que apoyan la clasificación anteriormente mencionada, clado III que consiste en *B. licheniformis* y especies relacionadas, y clado IV que consiste en *B. pumilus* (Dunlap, 2016; Hossain et al., 2015; Auch et al., 2010; Fan et al., 2017)

La organización de las especies de *Bacillus* más recientes basados en estudios de genoma completo y ANI clasifican 5 grupos dentro de los cuales se agrupan otras especies y estos corresponde a: *B. licheniformis*, *B. halodurans*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. aphaericus* y *B. cereus* (Mohkam et al., 2016).

### 3. ANTECEDENTES

Camargo et al. (2003) realizaron un estudio de bacterias resistentes al cromo (CRB) aisladas del suelo, encontrando que pueden usarse para reducir el Cr (VI) tóxico de ambientes contaminados. Su estudio evaluó la reducción in vitro de Cr (VI) utilizando un extracto libre de células (CFE) de suelo contaminado con dicromato. Un aislado, ES 29, que redujo sustancialmente Cr (VI) se identificó como *Bacillus* mediante homología de secuencia de gen 16S rDNA. El aislado redujo Cr (VI) en condiciones aeróbicas, utilizando NADH como donador de electrones y produjo una enzima reductora de Cr (VI) soluble. El aislado bacteriano redujo el 50% de Cr (VI) en 6 h.

Kathiravan et al. (2011) llevaron a cabo estudios cerca de Pallavaram, Tamil Nadu, India para la remediación ex situ de suelos contaminados con Cr(VI) utilizando *Bacillus sp.* aislado del ambiente contaminado del efluente de la curtiduría en modo discontinuo y continuo. Se investigó el efecto de varios parámetros operativos tales como el volumen de inóculo, el pH, la temperatura y la fuente de carbono/donador de electrones en la biorreducción de Cr(VI) y también se caracterizaron la enzima responsable de la reducción. El lixiviado del suelo se remedió con *Bacillus sp.* y se exploró el efecto de la temperatura, el pH y el volumen de inóculo en el rendimiento del proceso.

Ramirez y Benitez (2014) evaluaron el potencial de microorganismos nativos para transformar el Cr(VI) a formas menos tóxicas, verificando su eficiencia biorreductora. Para

este propósito, se aislaron microorganismos a partir de aguas residuales de una curtiembre en el municipio de El Cerrito, Valle del Cauca, Colombia y se seleccionaron utilizando el método de concentración mínima inhibitoria (CMI), entre 5-8000 ppm de Cr(VI). Se realizaron ensayos de biorreducción con la cepa más tolerante, en medio LB a 10, 30, 50 y 100 ppm de Cr(VI); dicha cepa fue identificada como *Bacillus cereus* B1, con capacidad de tolerar hasta 8000 ppm y remover el 100% del contaminante al cabo de 9, 34, 50 y 96 horas, cuando la concentración inicial de cromo fue de 10, 30, 50 y 100 ppm respectivamente. Estos resultados indicaron que *Bacillus cereus* B1 tiene la capacidad de reducir eficientemente el cromo hexavalente en solución y resistir altas concentraciones del metal.

Ahemad (2015) realizó un estudio de fitorremediación tóxica de Cr (VI), Fe y otros metales pesados por la combinación sinérgica de cepa nativa de *Bacillus cereus* y *Vetiveria zizanioides*. Demostró que la biorremediación de Cr (VI), Fe y otros metales pesados (HM) a través de la interacción planta-microbio es una de las estrategias viables debido a su alta eficiencia, bajo costo y naturaleza ecológica. En su trabajo se aisló, caracterizó y evaluó el potencial de las bacterias rizosféricas para potenciar el crecimiento y la acumulación de metales mediante la hiperacumulación de cromo en *V. zizanioides*. La cepa bacteriana aislada de los relaves de la mina se identificó como cepa de *Bacillus cereus* (T1B3) y mostró rasgos promotores del crecimiento de las plantas que incluyen 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa, ácido indol acético, producción de sideróforos, fijación de nitrógeno y solubilización de fosfatos. La capacidad de eliminación (mg/L) de la cepa T1B3 fue del 82% para Cr(VI) 92% para Fe, durante el ciclo de crecimiento activo en medio de extracto modificado con HM. Los resultados indicaron que la inoculación de *V. zizanioides* nativo con la cepa T1B3 mejora su eficacia de fitorremediación de HM.

Khan *et al.* (2015) Evaluaron el efecto de la inoculación de bacterias en el crecimiento de las plantas, específicamente *Prosopis juliflora* la cual se caracteriza por un crecimiento distinto y profuso incluso en suelos nutricionalmente pobres y condiciones de estrés ambiental. Su estudio se realizó para aislar y caracterizar las bacterias resistentes al Cr de la rizosfera y la endosfera de *P. juliflora* que crecen en el suelo contaminado con efluentes de tenería. Se aislaron un total de 5 y 21 cepas bacterianas de la rizosfera y la endosfera, respectivamente, y se demostró que toleran hasta 3000 mg l<sup>-1</sup> de Cr. Estos aislamientos también mostraron tolerancia a otros metales pesados tóxicos, como Cd, Cu, Pb y Zn, y alta concentración (174 g l<sup>-1</sup>) de NaCl. Además, la mayoría de las cepas bacterianas aisladas mostraron una o más actividades promotoras del crecimiento de las plantas. El análisis filogenético del gen 16S rDNA mostró que las especies predominantes incluían *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Aerococcus*. Realizando el primer informe que analiza las comunidades bacterianas de rizo y endofitas asociadas con *P. juliflora* que crecen en el suelo contaminado con efluentes de tenería.

Ramírez *et al.* (2019) iniciaron el estudio de cepas aisladas de nódulos de *Prosopis laevigata*, en la región de Chietla, Puebla, obteniendo cepas resistentes a altas concentraciones de Cr(VI) (Tabla2).

Tabla 2. Cepas aisladas de nódulos de mezquite expuesta a diferentes concentraciones de Cr, todas ellas resistieron hasta 10 000 ppm de Cr (Ramírez *et al.*, 2019).

Cepa	10,000 ppm	10,500 ppm	11,000 ppm	11,500 ppm	12,000 ppm	13,000 ppm
LEM1054	$2 \times 10^3$	$1 \times 10^3$	-	-	-	-
LEM1080	$6 \times 10^6$	$4 \times 10^3$	-	-	-	-
LEM1083	$1 \times 10^6$	$2 \times 10^3$	$4 \times 10^3$	$2 \times 10^3$	-	-
LEM1085	$2 \times 10^3$	-	-	-	-	-
LEM1088	$2 \times 10^{11}$	$3 \times 10^{11}$	$1 \times 10^{11}$	$18 \times 10^{10}$	$14 \times 10^{10}$	$6 \times 10^{10}$

Tomando en cuenta los resultados encontrados también se evaluó la capacidad de remoción de Cr (VI) de la cepa LEM1088, la cual fue la cepa más tolerante a este metal (Figura 1)

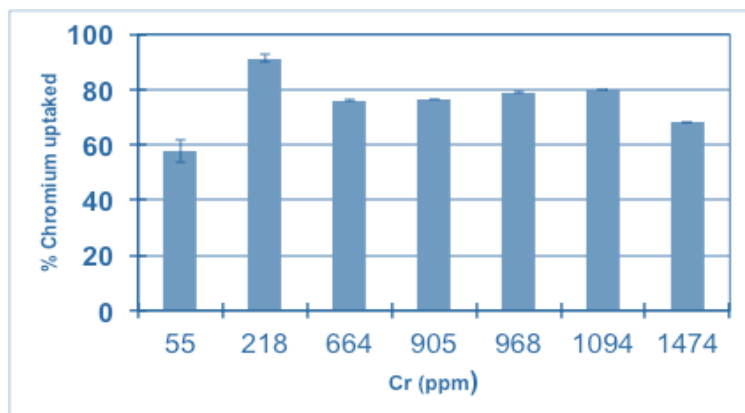


Figura 1. Porcentaje de cromo (VI) captado por LEM1088 después de 7 horas de exposición a diferentes concentraciones de Cr (VI). LEM1088 es capaz de absorber más del 91% de cromo ambiental (VI) a 218 ppm (Ramírez *et al.*, 2019).

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Los metales pesados forman parte natural del medio ambiente, sin embargo, en la actualidad, su acumulación provocada por distintas actividades ha causado diversas afecciones en ambientes acuáticos y terrestres y en especial en zonas áridas las cuales son

las áreas más sensibles y dañadas, provocando un problema ambiental a nivel mundial. Una de las alternativas para la remoción de estos metales del suelo es el uso de plantas fitorremediadoras como *Prosopis laevigata*, la cual tiene la capacidad de crecer en condiciones adversas como lo son las zonas áridas. La biorremediación puede ser apoyada con la utilización de bacterias del género *Bacillus*, (bioacumuladoras de metales pesados y promotoras de crecimiento vegetal), por lo que el identificar las especies de *Bacillus* asociadas al mezquite resulta de gran importancia en el proceso de establecer técnicas biotecnológicas para la recuperación de suelos contaminados con metales pesados.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

Analizar la diversidad genética y la filogenia de bacterias pertenecientes al género *Bacillus*, tolerantes a cromo, asociadas al mezquite (*Prosopis laevigata*).

### **5.2 Objetivos específicos**

1. Analizar la capacidad de nodulación de las cepas
2. Analizar la capacidad de las cepas de *Bacillus* para solubilizar fosfatos y producir de ácido indol acético.
3. Identificar a nivel de especie, a las bacterias aisladas de nódulos de mezquite en el estado de Puebla mediante análisis de secuencias de genes 16S rDNA y *rpoB*.
4. Caracterizar a las bacterias aisladas de nódulos de mezquite en el estado de Puebla mediante pruebas fenotípicas (utilización de fuentes de carbono).

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

Las cepas bacterianas a identificar, fueron tomadas de la colección perteneciente al laboratorio de Ecología Molecular Microbiana del Instituto de Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, obtenidas de un trabajo previo, las cuales se aislaron de la planta *Prosopis laevigata*, siendo un total de 59 cepas; en una región semiárida de Puebla contaminada con metales pesados (Ramírez *et al.*, 2019).

Las cepas se cultivaron en medio agar extracto de levadura manitol (YMA) sólido y líquido (YM) (anexo 1) (Hamaki *et al.*, 2005) en constante agitación a 28°C.

### **6.1 Prueba de nodulación en *Macroptilium atropurpureum***

Se realizaron ensayos de nodulación con las 59 cepas bacterianas in vitro, utilizando la leguminosa *Macroptilium atropurpureum*, la cual es utilizada como planta modelo para pruebas de nodulación por su alta interacción con la mayoría de los géneros de rizobia (Ezura *et al.*, 2000). Las semillas se esterilizaron sumergiéndolas en etanol al 70% durante 10 minutos, se enjuagaron con agua estéril, después se sumergieron en cloro por 20 minutos y se enjuagaron nuevamente con agua estéril, se escarificaron con ácido sulfúrico concentrado durante 20 minutos y finalmente se enjuagaron con agua estéril. Las semillas se colocaron en placas con agar agua a 28 grados durante 72 horas. Cada una de las semillas con raíces emergentes se colocaron en tubos de 200 mL con medio Jensen libre de nitrógeno (anexo 2) (Vargas *et al.*, 2000). Tres días después cada plántula en el medio Jensen fue inoculada con cada una de las 59 cepas provenientes de un cultivo fresco de 24 horas de crecimiento y por triplicado. Se utilizaron tres controles positivos que consistieron en las plántulas colocadas en el medio Jensen con fuente de nitrógeno y sin inoculación de bacterias y tres controles negativos que consistieron en las plántulas colocadas en el medio Jensen libre de nitrógeno y sin inoculación de bacterias. El ensayo de nodulación también se realizó en *Phaseolus vulgaris* por quintuplicado debido al efecto de crecimiento observado en las plantas de *M. atropurpureum* dado por las bacterias, evaluándose los parámetros de tamaño de tallo, raíz y peso seco de la misma.

En los siguientes experimentos solo se procedió a trabajar con las 5 cepas más tolerantes a crecimiento en Cr que fueron las cepas LEM1054, LEM1080, LEM1083, LEM1085 y LEM1088.

### **6.2 Determinación de Ácido Indo Acético por el método de Glickman**

Cada cepa se inoculó en caldo YM adicionado con 2.5 mM de triptófano / litro de medio (0.5 g), por triplicado, se incubó por 48 horas a 28 °C. Se preparó el reactivo de Salkowski (FeCl<sub>3</sub> 12g por litro de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7.9 M) se cubrió con aluminio y se coló en hielo para enfriar. Se centrifugó el cultivo bacteriano y se tomaron 500 µl del sobrenadante, el cual fue colocado en una celda espectrofotométrica y se agregaron 500 µl de reactivo de Salkowski. Las celdas se cubrieron con parafilm y se mezcló, se incubaron 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro a 540 nm, tomando como blanco el medio sin inocular más el reactivo de Salkowski. Se realizó la curva de calibración a partir de concentraciones conocidas de AIA (0.0003, 0.0005, 0.0007, 0.0009, 0.001, 0.002, 0.003, 0.004, 0.005, 0.006, 0.007, 0.008, 0.009, 0.01 mg/mL), para la determinación de la concentración de las muestras (Glickmann & Dessaux, 1995).

### 6.3 Determinación de solubilización de fosfatos

Cada cepa se inoculó a partir de placas de YMA en tubos de caldo YM adicionado con  $\text{Ca}_3\text{PO}_4$  por triplicado, se incubaron por 48 horas. Se preparó el reactivo de solubilización de fosfatos (125 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5 N + 37.5 mL de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  + 75 mL de  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$  0.1 M), aforados a 250 mL de agua. Después de las 48 horas de incubación, los cultivos se centrifugaron a 13 000 rpm y se tomaron 500  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y se colocaron en una celda espectrofotométrica, posteriormente se agregaron 400  $\mu\text{L}$  de reactivo de solubilización de fosfatos, las celdas se cubrieron con parafilm y se agitaron para mezclar, se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente, posterior a eso se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 842 nm, tomando como blanco el medio sin inocular más el reactivo de solubilización de fosfatos. Finalmente se realizó la curva de calibración a partir de concentraciones conocidas de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.004, 0.005, 0.006, 0.007, 0.008, 0.009, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 mg/mL) para la determinación de la concentración de las muestras (Chen *et al.*, 2006; Murphy y Riley, 1958).

### 6.4 Amplificación de los genes *16s rDNA* y *rpoB*

Para conocer la filogenia de las bacterias con las que se trabajó se amplificaron los genes ribosomal *16s rDNA* y *rpoB*, mediante el siguiente procedimiento: la extracción de DNA se realizó con la ayuda del Wizard Genomic DNA Purification Kit de Promega siguiendo las instrucciones del fabricante, la amplificación de los genes se realizó con Master Mix (Thermo scientific) la mezcla de reacción para la PCR consistió en un total de 25  $\mu\text{L}$ , la cual contenía 12.5  $\mu\text{L}$  de Master mix, 9  $\mu\text{L}$  de agua inyectable, 1.25  $\mu\text{L}$  de los primers forward y reverse del gen correspondiente (Tabla 3) y 1  $\mu\text{L}$  de DNA purificado; posterior a esto se realizó la electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TAE (tris-acetato-EDTA) de los productos de PCR, se purificaron con la ayuda de kit Jena Bioscience siguiendo las instrucciones del fabricante y finalmente se mandaron a secuenciar a la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Cuernavaca, Morelos.

Tabla 3. Primers y condiciones de PCR

PRIMER	SECUENCIA (5'-3').	CONDICIONES DE PCR	GEN	TAMAÑO	REFERENCIAS
<b>UN27F</b>	TAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	3' 95°C, x26 (30"	<i>16S rDNA</i>	1200 pb	Wang <i>et al.</i> , 2007; Wernegreen y Riley, 1999; Willems <i>et al.</i> , 2003
<b>UN1392 R</b>	CAGGGGCGGTGTGTACA	94°C, 1' 57°C, 1'10" 72°C, 10' 72°C), 20°C.			
<b>RPOBF</b>	ATCGAAACGCCTGAAGGTCCAAACA	3' 95°C, x 35 (20"	b-subunit	1200 pb	Mohkam <i>et al.</i> , 2016
<b>RPOBR</b>	T ACACCCTTGTTACCGTGACGACC	95°C, 30" 55°C, 90" 72°C) 72°C), 5' 72°C	of RNA pol ( <i>rpoB</i> )		

## **6.5 Análisis de secuencias nucleotídicas**

El empalme de las secuencias forward y reverse se realizó en el programa Bioedit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999), en el cual se genera un archivo FASTA que se maneja en el editor de texto para la revisión de las secuencias de las muestras mandadas a secuenciar. Posterior a esto las secuencias fueron alineadas con ayuda del programa CLUSTAL X (Larkin *et al.*, 2007) y los archivos de alineamiento fueron importados al programa Bioedit para la obtención de archivos en formato fasta, los cuales se trabajaron en el programa GeneDoc (Nicholas, 1997) para que estos archivos se exportaran al programa DNAsp para generar archivos con formato mega, los cuales se procesaron finalmente para generar los árboles filogenéticos mediante la utilización de algoritmos Neighbor Joining (Saitou y Nei, 1987) y Maximum Likelihood (Tucker y Lewis, 1973). Las secuencias de los genes ribosomal 16s y *rpoB* de las cepas de referencia para realizar el análisis filogenético se descargaron de la base de datos NCBI, se descargaron 3 secuencias de cada especie de *Bacillus* reportados para llevar a cabo el alineamiento.

## **6.6 Caracterización bacteriana mediante tinción de Schaeffer-Fulton**

Para la visualización de endosporas producidas por *Bacillus* se realiza la tinción de Schaeffer-Fulton, para ello, es posible utilizar cultivos viejos ya que la bacteria se encuentra esporulando por las condiciones de escasas de nutrientes en el medio (Kloepper *et al.*, 2017). Se coloca una gota de agua en un portaobjetos y se toma una pequeña asada, se frota en el portaobjetos y se fija la muestra con calor con ayuda del mechero, se cubre con verde de malaquita y se calienta bajo el mechero, produciendo emisión de vapores sin dejar que el colorante hierva para evitar la formación de cristales, lo anterior por cinco minutos, se enjuaga con agua, se coloca la safranina por un minuto y finalmente se vuelve a enjuagar con agua y se deja secar para visualizar en el microscopio con objetivo de inmersión (Schaeffer y Fulton, 1993).

## **6.7 Caracterización bacteriana mediante utilización de fuentes de carbono**

Para realizar este ensayo se partió de un cultivo fresco de 24 horas, se tomó una asada del cultivo y se colocó en agua inyectable hasta alcanzar una densidad de 2 en las escala de Mc Farland (que corresponde a una absorbancia de 0.32 - 0.4 a una longitud de onda de 625 nm en el espectrofotómetro), se adicionaron 10 µL de esta dilución 2 Mc Farland y se agregaron al medio comercial 50 CHB/E para *Bacillus*, se agitó la muestra en el vortex y se procedió a inocular las galerías API BioMérieux (CH 50 para la identificación de *Bacillus*) con ayuda de una pipeta, las galerías se incubaron 48 horas y las lecturas se hicieron a las 24 y 48 horas.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Prueba de nodulación

El objetivo de esta prueba fue buscar bacterias del grupo rhizobia capaces de nodular raíces de leguminosas, sin embargo no hubo nodulación en la planta de *Macroptilium atropurpureum* dada por ninguna de las 59 cepas bacterianas, sin embargo la mayoría de las plantas lograron crecer y desarrollarse cuando no hubo fuente de nitrógeno en comparación con los controles negativos, cuyas plántulas no tenían fuente de nitrógeno ni inoculación bacteriana por lo que probablemente se trabajó con bacterias fijadoras de vida libre o asociadas a raíces que también son capaces de fijar nitrógeno (Wang *et al.*, 2017) ya que poseen la enzima nitrogenasa, la cual cataliza la conversión del  $N_2$  a  $NH_4^+$  (De Brujin, 2015).

Las lecturas de los nódulos se hicieron semanalmente, los controles negativos que contenían la plántula de *Macroptilium atropurpureum* en el medio Jensen libre de nitrógeno y sin inoculación de cepas bacterianas, murieron después de la primera semana, resultado que se esperaba ya que la plántula, al igual que la mayoría de los seres vivos requieren de una fuente de nitrógeno para poder vivir (Galloway y Cowling, 2002) por lo que, al no tener una fuente y no encontrarse con bacterias fijadoras de nitrógeno, la plántula entró en proceso de senescencia, por otra parte los controles positivos que consistía en plántulas en medio Jensen adicionado con nitrógeno lograron crecer, sin embargo su crecimiento fue menor en comparación con las plantas inoculadas con las cepas LEM1054, LEM1080, LEM1083, LEM1085 y LEM1088 (Figura 2). Estas cepas pueden ser fijadores de nitrógeno de vida libre, además de promover el crecimiento vegetal, ya que se evaluó el mismo efecto en *Phaseolus vulgaris*, bajo las mismas condiciones ocupadas en la prueba de nodulación en *M. atropurpureum*, pero por quintuplicado; encontrándose que efectivamente estas 5 cepas ayudaron al crecimiento de la planta y aumentaron el desarrollo de tallo y raíz en comparación con los controles positivos (Figura 3), esto concuerda con diversos estudios donde se ha reportado que la capacidad endofítica de *Bacillus* es un requisito biológico para la supervivencia en la naturaleza de distintas plantas, además de ser un potencial bioinoculante para mejorar la biomasa de los cultivos (Gágne *et al.*, 2015). En la figura 4 se puede observar mejor el efecto cuantitativo de crecimiento de *P. vulgaris* desarrollado con ayuda de las cepas en cuanto a tamaño dado en cm, comparado con los controles; en la figura 5 se observa el mismo efecto de crecimiento, pero tomando en cuenta el peso seco de tallo y raíz, algunas de las fitohormonas que pudieran estar implicadas en el desarrollo de la planta son auxinas, giberelinas, etileno, ácidos absicisicos y citoquininas principalmente, ya que estas se encuentran implicadas en diversos procesos de desarrollo como la señalización nutricional, la ramificación y expansión de las hojas, la producción de clorofila, el crecimiento de las raíces, así como la promoción de la germinación de las semillas (Goswami *et al.*, 2016).

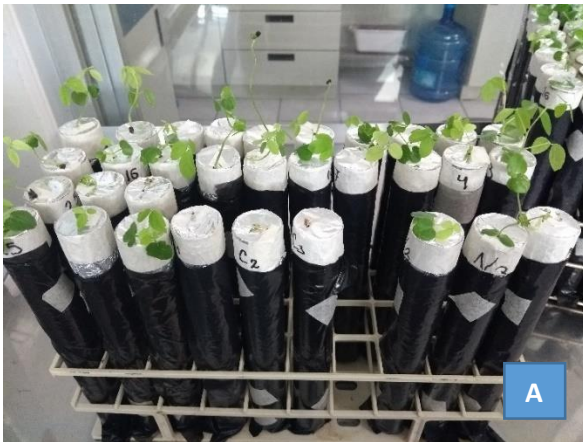


Figura 2. Ensayos de nodulación en plantas de *M. atropurpureum* A) 15 días después de la inoculación todas las plantas se desarrollaron con excepción de los controles negativos. B) Plantas de *M. atropurpureum* 30 días después de la inoculación, no hubo nodulación en los ensayos por triplicado. En la figura se muestra que las cepas 31 y 17 estimularon más el desarrollo de las raíces de las plantas en comparación con los controles positivos. Controles positivos: N2, controles negativos C2.



Figura 3. Plantas de *Phaseolus vulgaris* 30 días después de la inoculación con la cepa LEM 1083. Crecimiento prominente de las raíces en plantas inoculadas en comparación con los controles positivos. Controles positivos: N2, controles negativos C2.

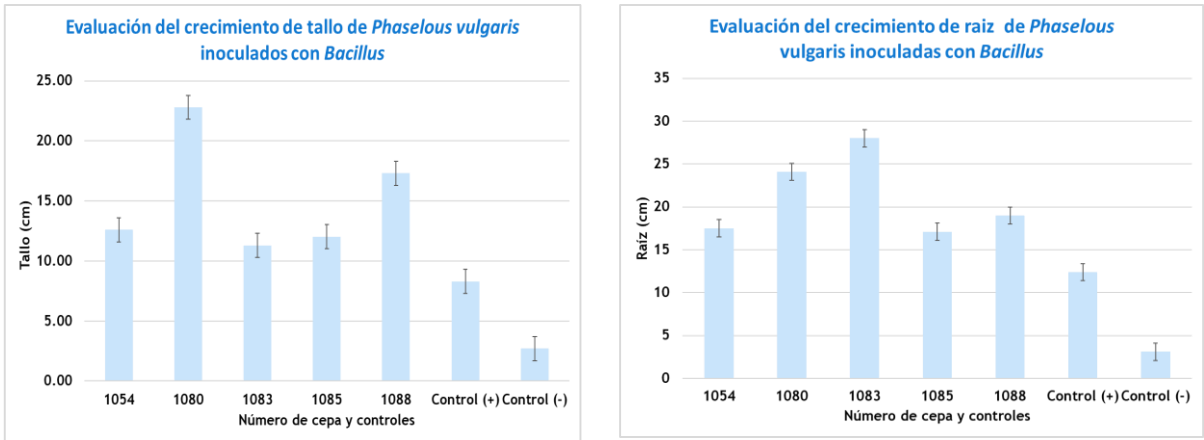


Figura 4. Evaluación cuantitativa de crecimiento en cm de tallo y raíz de *P. vulgaris* inoculadas con las cepas de *Bacillus*. La cepa LEM1080 estimuló más el crecimiento del tallo, en cuanto al tamaño de raíz la cepa LEM1083 fue la que generó un mayor crecimiento, los ensayos se realizaron por quintuplicado.

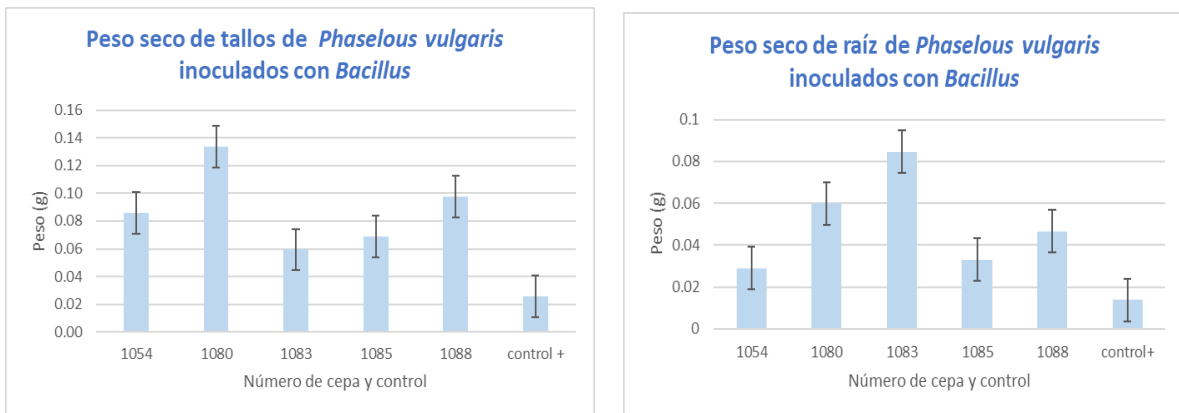


Figura 5. Evaluación cuantitativa de crecimiento (peso seco de tallo y raíz en g) de *P. vulgaris* inoculadas con las cepas de *Bacillus*. Todas las cepas generaron mayor peso tanto de raíz como de tallos en las plantas en comparación con el control.

## 7.2 Pruebas de producción de Ácido Indol Acético y solubilización de fosfatos

Existen diversos estudios que reportan la producción de AIA y solubilización de fosfatos de distintos géneros bacterianos que se conocen por su capacidad para estimular el desarrollo de las plantas (Tabla 4 y 5). Para asegurar la confiabilidad de los datos, las pruebas se realizaron por triplicado y se utilizó como control negativo a *Escherichia coli* para la prueba de AIA y como control positivo de solubilización de fosfatos a *Azospirillum brasilense*. En la cuantificación del primer parámetro se encontró que la cepa LEM1054 fue la mayor productora de AIA en comparación con algunos reportados como *Bacillus megaterium*, por

otra parte, la cepa que mostró una menor producción fue la LEM1088, la biosíntesis de AIA, dada por la mayoría de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal procede de la utilización de L-triptófano como precursor, el cual se secreta en los exudados de la raíz, *Bacillus* lo produce mediante la vía triptamina (Cherif *et al.*, 2016; Goswami *et al.*, 2016); no existió una relación de producción de AIA con el crecimiento de tallo y raíz de *P. vulgaris*, por ejemplo la cepa LEM1080 que benefició el tamaño de tallo y raíz, no produjo una mayor cantidad de AIA como la cepa LEM1054 por lo que los mecanismos de crecimiento vegetal pudieran ser a través de otros mecanismos como la fijación de nitrógeno o producción de otras fitohormonas (Iyer *et al.*, 2017). a

Tabla 4. Prueba de producción de AIA

Cepa	AIA µg/ml	Referencia
LEM1054	5.7	
LEM1080	2.3	
LEM1083	2.4	
LEM1085	2.5	
LEM1088	0.9	
<i>Bacillus megaterium</i>	4.8	Zahid. (2015)
<i>Burkholderia sp.</i>	2.8	Saravanan <i>et al.</i> (2009)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2.9	Zahid. (2015)
<i>Serratia sp.</i>	1.2	Yasmin <i>et al.</i> (2016)

La solubilización de fosfatos es un proceso importante en la rizósfera ya que las bacterias que participan, ayudan a que el fósforo se encuentre disponible para que pueda ser aprovechada por las plantas circundantes e incluso para otros organismos (Haile *et al.*, 2016), las plantas solo pueden absorber el fosfato soluble, es decir en forma de fosfato mono y dibásico (Goswami *et al.*, 2016). Se encontró que la cepa LEM1088 fue la mejor solubilizadora de fosfatos y se acerca a otros géneros reportados como buenos solubilizadores (Tabla 5). Solo una cepa, la LEM1083 fue la que dio como resultado una menor solubilización; por otra parte, no se encontró una correlación de esta prueba con la promoción de crecimiento de raíz y tallo en *P. vulgaris* por lo que la solubilización de fosfatos probablemente no es el mecanismo que ayuda al desarrollo de las plantas, en este caso de *P. vulgaris*. Los mecanismos que se han descrito como responsables de la solubilización de fosfato son la disminución de pH del suelo por la producción de ácidos orgánicos, los organismo que habitan en la rizosfera utilizan los azúcares de exudados de raíz, produciendo ácidos orgánicos, los cuales actúan como buenos quelantes de los cationes divalentes de Ca<sup>2+</sup> que acompañan la liberación de fosfatos de los compuestos fosfáticos insolubles (Goswami *et al.*, 2016; Gouda *et al.*, 2018), en el caso de *Bacillus* se ha reportado que el ácido 2- cetoglucónico es el implicado en la solubilización de este mineral (Iyer *et al.*, 2017); otros mecanismos que pudieran estar implicados consisten en la

producción de protones (normalmente asociada a la asimilación de  $\text{NH}_4 + \gamma/\text{o}$  a los procesos respiratorios) y a la mineralización del fosfato orgánico por la fosfatasa ácida (Patiño y Sanclemente, 2014; Sharma *et al.*, 2011).

Tabla 5. Prueba de solubilización de fosfatos

Cepa	Solubilización de fosfatos $\mu\text{g/ml}$	Referencia
LEM1054	31	
LEM1080	11	
LEM1083	9	
LEM1085	16	
LEM1088	42	
<i>Bacillus sp</i>	28	Shahid <i>et al.</i> (2017)
<i>Serratia sp.</i>	44	Behera <i>et al.</i> (2017)
<i>Acinetobacter sp.</i>	54	Zhang <i>et al.</i> (2017)
<i>Pseudomonas fluorocens</i>	32	Goswami <i>et al.</i> (2013)
<i>Azospirillum brasilense</i>	63	

### 7.3 Amplificación de los genes *16s rDNA* Y *rpoB*

#### 7.3.1 Gen *16s rDNA*

Para la caracterización filogenética se amplificó el gen *16s rDNA*, de las 5 cepas más tolerantes a cromo (LEM1054, LEM1080, LEM1083, LEM1085, LEM1088), obteniéndose productos de 1200 pb que se mandaron a secuenciar y se analizaron para realizar el árbol general donde se agruparon todas nuestras cepas (Figura 6), se encontró que las cepas pertenecen al género de *Bacillus*, de acuerdo con los resultados anteriores en la prueba de nodulación, se ha reportado que efectivamente algunas especies de este género presentan actividad nitrogenasa (Tejera *et al.*, 2011), además, distintos estudios demostraron que este género pertenece al grupo de bacterias promotoras de crecimiento vegetal y ayudan al crecimiento de *P. vulgaris* ya que son capaces de producir distintas enzimas benéficas para el desarrollo de las plantas (Torres *et al.*, 2017; Mokrani *et al.*, 2018).

El árbol generado del gen ribosomal *16s* se comprimió en distintos grupos representativos dentro de los cuales existen otras especies, dos de las cepas se alinearon dentro del grupo de *B. subtilis* (LEM1083) y *B. cereus* (LEM1088) (Figura 7 y 8).

Continuando con el análisis de secuencias ribosomales, se encontró que la cepa LEM1088 podría tratarse de *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. wiedmannii*, o *B. toyonensis* (Figura 8), para la diferenciación de las dos primeras especies la secuenciación de este gen y de genes de mantenimiento no es certera ya que estas dos especies se encuentran estrechamente relacionadas por lo que la caracterización se realiza con ayuda de la secuencia del genoma completo u otros parámetros (Liu *et al.*, 2015; Okinaka y Keim, 2016).

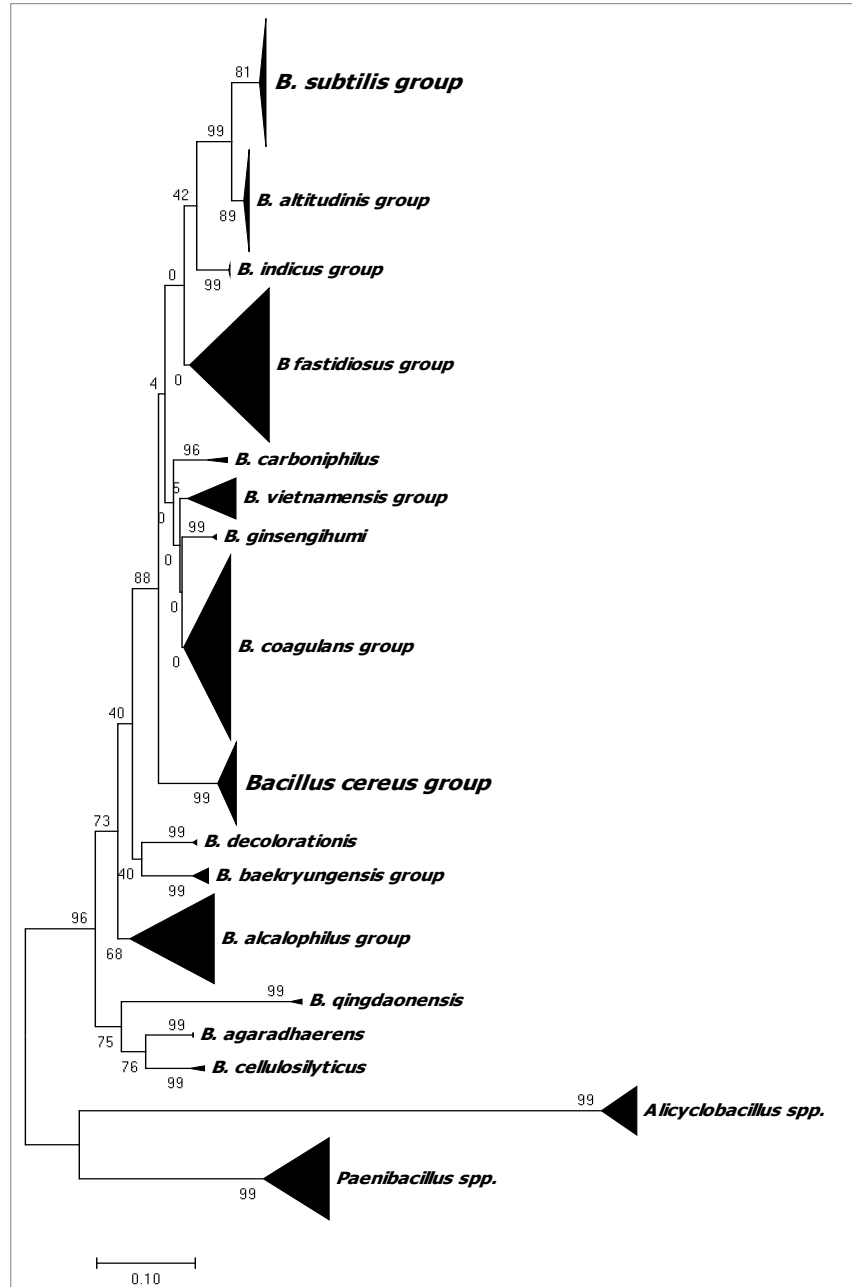


Figura 6. Análisis filogenético molecular por el método de máxima verosimilitud. Árbol filogenético basado en secuencias del gen ribosomal 16s de todas las especies reportadas e identificadas del género *Bacillus*. El árbol se comprimió en distintos grupos dentro de los cuales se encuentran otras especies de este género. Las cepas LEM1054, LEM1080, LEM1083, LEM1085 y LEM1088 se agruparon dentro del grupo de *B. subtilis* y *B. thuringiensis* donde se encuentran otras especies de este género altamente relacionadas. Se utilizó a *Paenibacillus spp.* como grupo externo. La historia evolutiva se infirió utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de Jukes-Cantor (Jukes y Cantor, 1969). Se muestra el árbol con el logaritmo probable más alto (-15771.0014). El porcentaje

de árboles en los que los taxones asociados se agrupan se muestra junto a las ramas. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos Neighbor-Join y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el enfoque de máxima verosimilitud compuesta (MCL), y luego seleccionando la topología con un valor de probabilidad de registro superior. Se utilizó una distribución Gamma discreta para modelar las diferencias de velocidad evolutiva entre los sitios (5 categorías (+ G, parámetro = 0.1858)). El árbol se dibuja a escala, con longitudes de rama medidas en el número de sustituciones por sitio. El análisis incluyó 378 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contienen vacíos y datos faltantes. Hubo un total de 1146 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 (Kumar y Tamura, 2016).

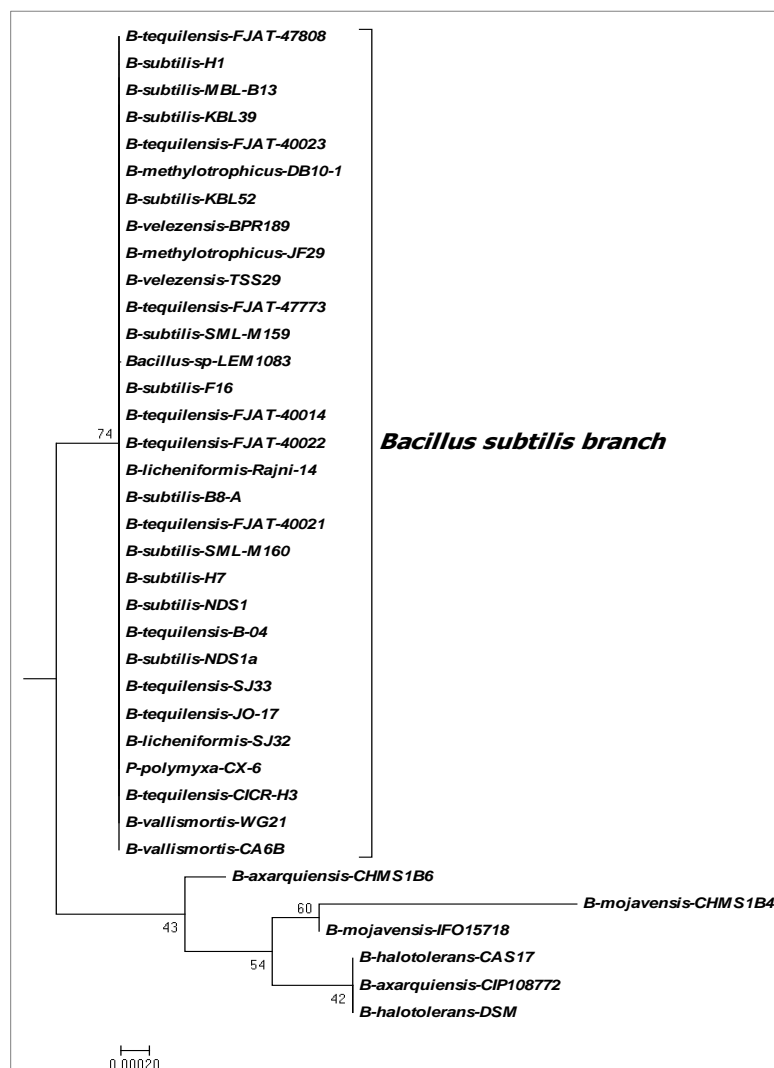


Figura 7. Análisis filogenético molecular por el método de máxima verosimilitud Rama abierta del grupo de *B. subtilis* del árbol filogenético basado en secuencias del gen ribosomal 16s de todas las especies reportadas e identificadas del género *Bacillus*, en este

grupo se clasificó la cepa LEM1083, las especies a las que puede pertenecer son: *B. tequilensis*, *B. subtilis*, *B. methylotrophicus*, *B. velezensis*, *B. licheniformis*, y *B. vallismortis*, las cuales se encuentran altamente relacionadas y no se diferencian entre ellas. La historia evolutiva se infirió utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de Jukes-Cantor (Jukes y Cantor, 1969). Se muestra el árbol con el logaritmo probable más alto (-15771.0014). El porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agrupan se muestra junto a las ramas. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos Neighbor-Join y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el enfoque de máxima verosimilitud compuesta (MCL), y luego seleccionando la topología con un valor de probabilidad de registro superior. Se utilizó una distribución Gamma discreta para modelar las diferencias de velocidad evolutiva entre los sitios (5 categorías (+ G, parámetro = 0.1858)). El árbol se dibuja a escala, con longitudes de rama medidas en el número de sustituciones por sitio. El análisis incluyó 378 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contienen vacíos y datos faltantes. Hubo un total de 1146 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 (Kumar y Tamura, 2016).

Con el análisis de los genes ribosomales no es posible diferenciar entre especies de los diferentes grupos de *Bacillus* ya que existen varias especies dentro de estos cluster que se encuentran altamente relacionadas, el grado de similitud entre *Bacillus subtilis* y sus especies es  $\geq 99\%$  para el nivel de secuencia del gen 16S rDNA (Alina et al., 2015); para la cepa LEM1083 (Figura 7), las especies a las que pudiera pertenecer son *B. tequilensis*, *B. subtilis*, *B. methylotrophicus*, *B. velezensis* o *B. vallismortis*.

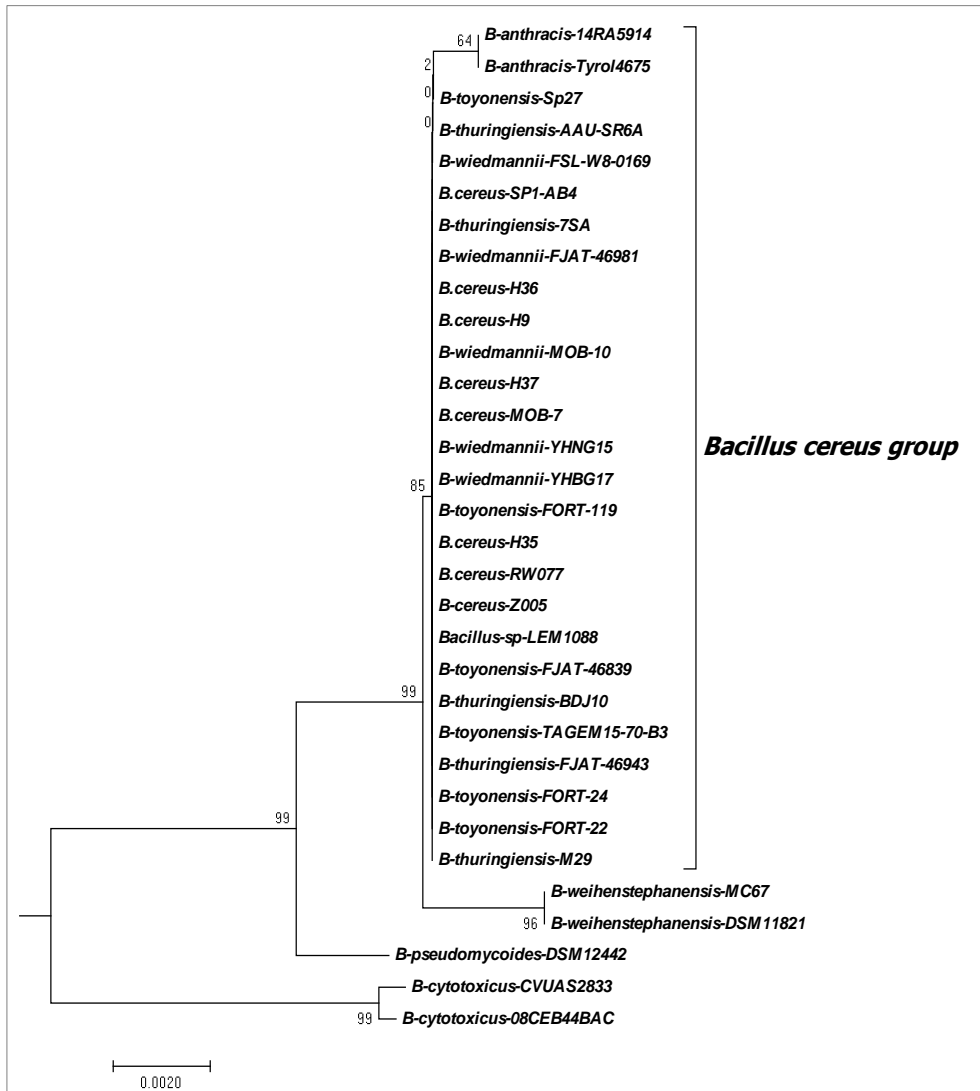


Figura 8. Análisis filogenético molecular por el método de máxima verosimilitud. Rama abierta del grupo de *B. cereus* del árbol filogenético basado en secuencias del gen ribosomal 16s de todas las especies reportadas e identificadas del género *Bacillus*, en este grupo se clasificó la cepa LEM1088, las especies a las que pudiera pertenecer son *B. thuringiensis*, *B. wiedmannii*, *B. cereus*, y *B. toyonensis* las cuales se encuentran altamente relacionadas y no se diferencian entre ellas. Otra especie altamente relacionada es *B. anthracis*, sin embargo esta se agrupó en otro clado por lo que nuestra cepa de interés no pertenece a esta especie.

La historia evolutiva se infirió utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de Jukes-Cantor (Jukes y Cantor, 1969). Se muestra el árbol con el logaritmo probable más alto (-15771.0014). El porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agrupan se muestra junto a las ramas. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos Neighbor-Join y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el enfoque de máxima verosimilitud.

compuesta (MCL), y luego seleccionando la topología con un valor de probabilidad de registro superior. Se utilizó una distribución Gamma discreta para modelar las diferencias de velocidad evolutiva entre los sitios (5 categorías (+ G, parámetro = 0.1858)). El árbol se dibuja a escala, con longitudes de rama medidas en el número de sustituciones por sitio. El análisis incluyó 378 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contienen vacíos y datos faltantes. Hubo un total de 1146 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 (Kumar y Tamura, 2016).

### **7.3.2 Gen *rpoB***

Para poder identificar las cepas de *Bacillus* a nivel de especie se recurrió a la amplificación del gen de mantenimiento *rpoB*, que codifica para la subunidad B de la DNA polimerasa ya que se ha reportado es de gran ayuda para la diferenciación entre especies de este género (Mohkam *et al.*, 2016), se obtuvieron productos de 1200 pb. las cuales se mandaron a secuenciar y se analizaron para la generación del árbol filogenético mostrado en la figura 8, este gen ayudó a clasificar e identificar a las cepas LEM1083, la cual mostró un mejor crecimiento de la raíz de *P. vulgaris* como *B. subtilis*; LEM1085 que mostró un mejor crecimiento del tallo de *P. vulgaris* y LEM1080 como *B. inaquosus* y finalmente LEM1054 que solubilizó una mayor cantidad de fosfatos como *B. velezensis*, sin embargo, no se pudo diferenciar a que especie pertenecía la cepa LEM1088, ya que ésta se agrupo dentro del cluster de las especies de *B. cereus* y *B. thuringiensis* (Figura 9) pero se puede asegurar que no se trata de la especie de *B. anthracis*, ya que esta especie se agrupo en otro cluster, por lo que se continuó con la caracterización de esta cepa .

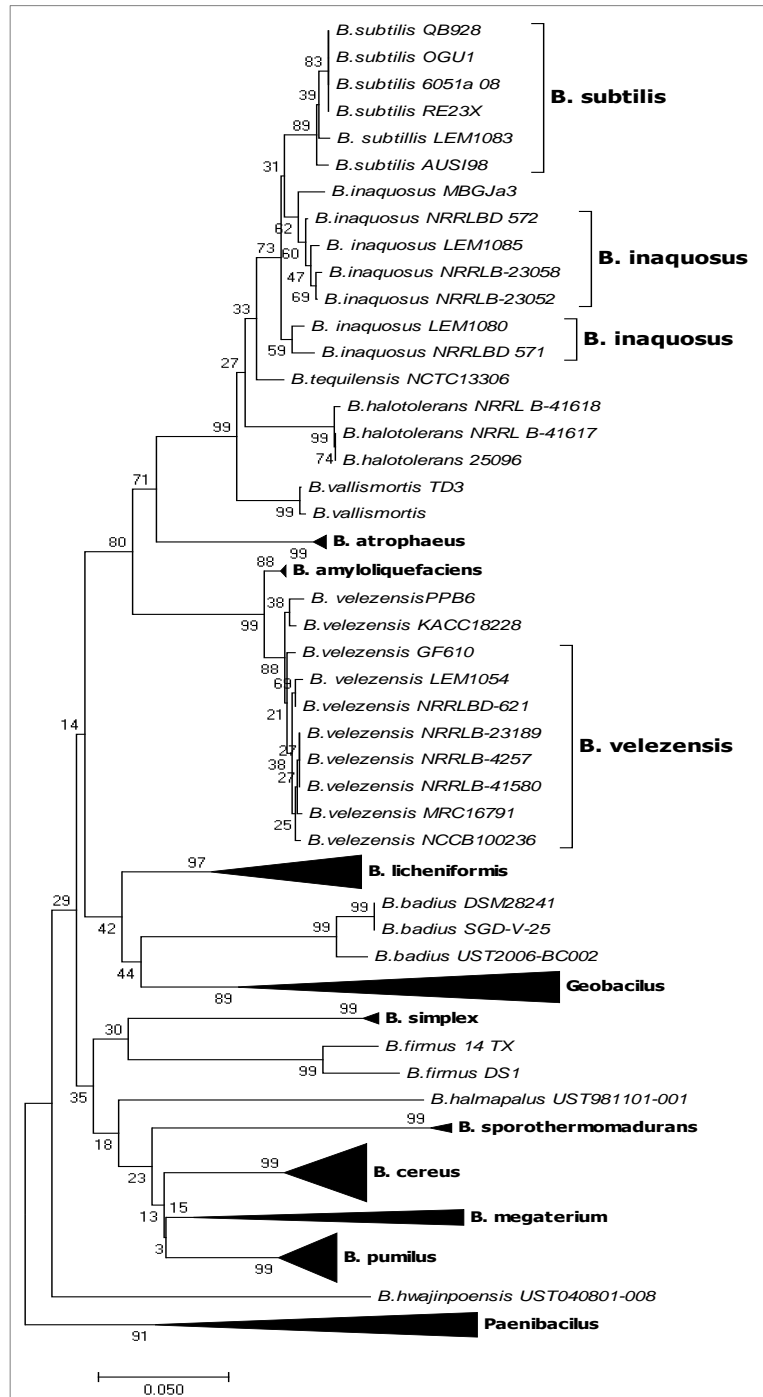


Figura 8. Relaciones evolutivas de taxones.

Arbol filogenético basado en el análisis de secuencias del gen de mantenimiento *rpoB* de todas las especies de *Bacillus* reportadas. Se muestra la rama abierta del grupo de *B. subtilis*, dentro del cual la diferenciación de especies mediante el análisis de este gen es mas certera para la identificación de *B. subtilis* donde se agrupó la cepa LEM1083; *B. inaquosus*, donde se agruparon las cepas LEM1085 y LEM1080 y *B. velezensis*, donde se agrupó la cepa LEM1054. La historia evolutiva se infirió usando el método de unión de vecinos (Saitou y

Nei, 1987). Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama = 3.51942862. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque (100 repeticiones) se muestran junto a las ramas (Felsenstein, 1985). El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud compuesta (Tamura y Kumar, 2004) y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis incluyó 151 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contienen espacios vacíos y datos faltantes. Hubo un total de 390 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 (Kumar y Tamura, 2016).

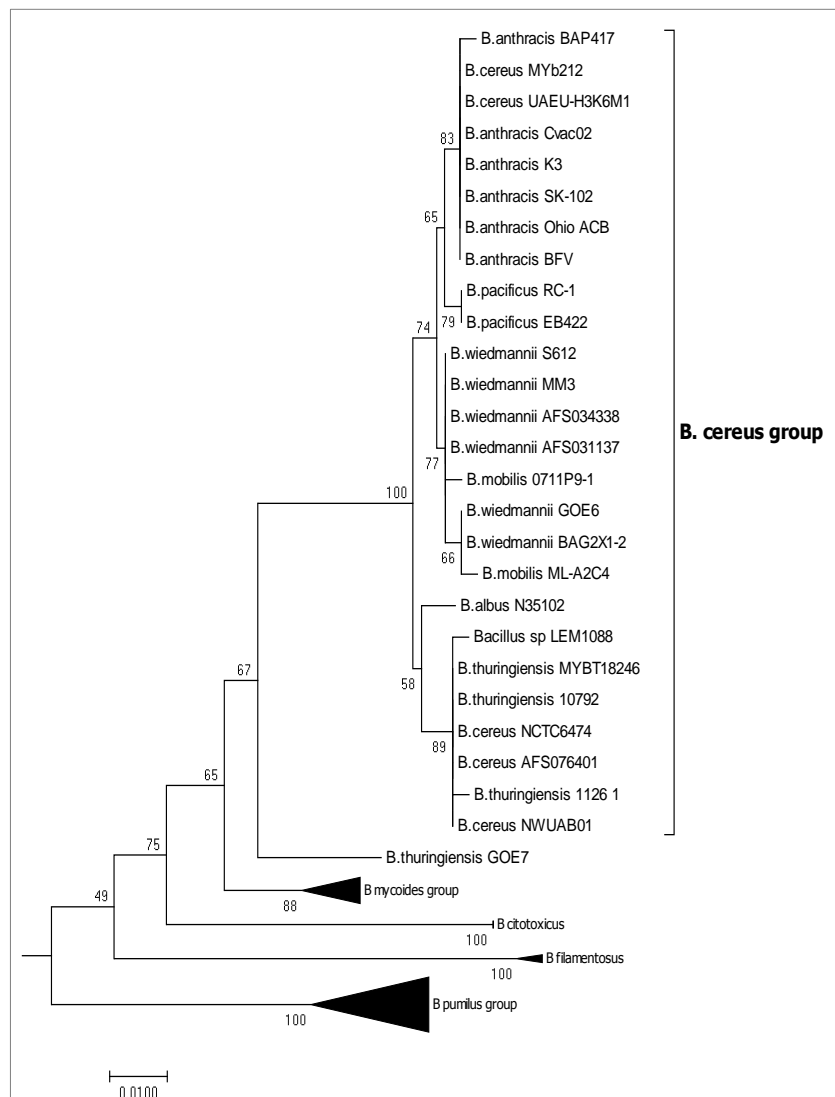


Figura 9. Relaciones evolutivas de taxones.

Arbol filogenético basado en el análisis de secuencias del gen de mantenimiento *rpoB* de todas las especies de *Bacillus* reportadas. Se muestra la rama abierta del grupo de *B. cereus*,

para la diferenciación de especies de este grupo el análisis de este gen no fue certero, la cepa LEM1088 se agrupó dentro del clado de *B. thuringiensis* y *B. cereus* las cuales se encuentran altamente relacionadas y no es posible diferenciar entre esas dos especies. La historia evolutiva se infirió usando el método de unión de vecinos (Saitou y Nei, 1987). Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama = 3.51942862. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque (100 repeticiones) se muestran junto a las ramas (Felsenstein, 1985). El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud compuesta (Tamura y Kumar, 2004) y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis incluyó 151 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contienen espacios vacíos y datos faltantes. Hubo un total de 390 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 (Kumar y Tamura, 2016).

#### **7.4 Tincion de Schaeffer-Fulton**

Para la diferenciación entre las especies de *B. cereus* y *B. thuringiensis* la tinción de Schaeffer-Fulton con verde de malaquita es de gran utilidad ya que se ha demostrado que las esporas producidas por *B. cereus* se forman al centro de la bacteria, en cambio la producción de esporas de *B. thuringiensis* se da a los extremos de la bacteria (Deng *et al.*, 2015; Morales *et al.*, 2017), por lo anterior se recurrió a realizar la esporulación de las cepas para realizar y así poder observar la posición de las esporas, especialmente a la cepa LEM1088 que no pudo ser diferenciada con el análisis del gen *rpoB*, se encontró que las esporas de esta bacteria se encontraban en el centro (Figura 10), se tiñeron de color verde claro, mientras las bacterias en color rojo, gracias a esta prueba se pudo clasificar a la cepa LEM1088 como *B. cereus*.

Con fines biotecnológicos la producción de endosporas de *Bacillus* es un proceso fisiológico importante porque puede realizarse una formulación de la bacteria Gram-positiva esporulante que es resistente a la desecación, por lo que puede ser utilizada para formular productos en polvo estables y secos como biofertilizantes, por ejemplo, existen productos que contienen a las bacterias y son utilizados como solubilizadores de fosfatos (Kamilova *et al.*, 2015; Goswami *et al.*, 2016).

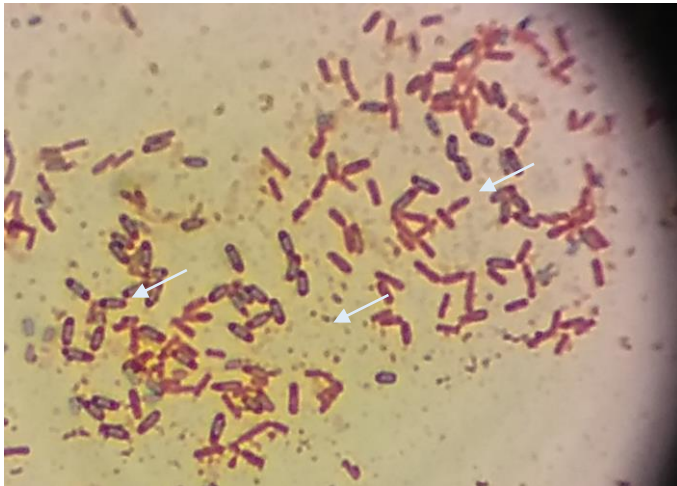


Figura 10. LEM1088 Tinción de Schaeffer-Fulton. Endosporas en color verde flechas) céntricas.

### 7.5 Caracterización fenotípica mediante utilización de carbohidratos

Para completar la caracterización de las cepas de *Bacillus* se realizó la asimilación de 49 carbohidratos, con la ayuda de las galerías API CH 50, en los inicios de clasificación de este género, esta era una prueba comúnmente utilizada para distinguir entre especies (Gordon, 1973), en los resultados mostrados en la tabla 6 podemos observar en la parte superior las especies bien caracterizadas en cuanto a asimilación de carbohidratos y en la parte inferior el patrón de utilización de fuentes de carbono de las cepas LEM1054, LEM1080, LEM1083, LEM1085 y LEM1088, la asimilación de carbohidratos de las cepas es correspondiente al género *Bacillus* sin embargo no es posible confirmar una especie ya que el patrón de asimilación es similar pero varía en la ocupación de distintas fuentes de carbohidratos (Fürch *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 1998).

Tabla 6. Utilización de carbohidratos característicos del género *Bacillus*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49					
API 50 CHB	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXYL	ADO	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	SOR	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMD	GLYG	XLT	GEN	TUR	LYX	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	ZKG	SKG					
B. anthracis	49	1	0	1	99	1	0	0	0	0	100	79	2	0	0	0	1	0	1	0	0	99	0	79	97	33	71	99	1	1	99	99	1	1	1	51	84	0	1	1	0	1	0	1	0	1	14	0	2					
B. cereus 1	74	1	1	1	99	1	0	0	1	8	100	99	26	0	1	0	1	1	1	1	3	97	30	99	99	88	88	100	3	1	55	99	1	1	2	83	77	1	3	2	1	0	0	1	0	1	47	0	1					
B. cereus 2	11	0	0	0	77	1	0	0	0	3	100	99	1	0	45	0	0	0	0	0	0	99	0	43	68	24	2	100	10	0	74	97	0	0	0	65	63	0	0	1	0	0	0	1	0	0	20	11	0					
B. circulans	48	0	18	96	80	98	0	1	68	94	100	97	97	1	42	1	20	89	20	32	64	84	99	96	100	99	99	99	92	92	99	99	52	50	96	99	92	26	98	85	1	1	1	21	21	10	61	0	8					
B. coagulans	71	0	4	47	66	52	1	1	1	98	100	100	98	1	0	1	9	28	38	4	66	100	71	76	83	76	76	100	66	100	95	98	1	1	61	95	23	0	61	61	0	0	0	1	57	0	61	0	0					
B. firmus	41	0	0	4	20	7	0	0	0	1	88	50	11	0	40	0	1	66	2	0	2	63	1	4	55	1	11	92	1	1	77	58	1	0	1	48	3	0	1	0	0	1	0	0	0	0	7	0	0					
B. lentus	40	0	1	50	55	10	0	0	10	55	95	95	95	0	32	17	1	60	17	1	35	82	65	82	98	75	75	88	82	55	82	82	25	30	75	75	55	0	50	40	0	10	0	0	4	0	1	0	0					
B. lichenif.	90	1	1	99	97	87	0	1	1	75	100	100	99	8	8	1	69	99	92	1	99	62	99	99	100	99	99	100	44	26	99	99	50	1	44	99	87	1	60	75	1	91	1	1	1	1	39	0	0					
B. megater	80	1	1	87	86	76	1	1	1	82	100	99	28	1	0	1	55	97	39	3	30	87	73	80	97	84	83	99	76	90	98	99	60	49	89	94	95	11	81	73	0	1	0	1	11	0	4	0	1					
B. mycoide	20	0	0	1	98	1	1	0	0	28	100	99	4	0	14	0	1	4	1	0	1	99	12	80	77	80	31	98	20	1	57	98	1	1	1	99	99	0	0	4	1	0	0	0	0	0	12	0	0					
B. pumilus	72	1	1	88	97	65	0	0	0	49	99	100	99	1	45	1	11	99	2	37	27	64	62	98	100	99	99	35	14	15	99	0	1	0	15	1	1	1	67	31	3	90	1	1	0	0	0	1	1	0				
B. smithii	89	0	0	36	97	97	0	0	0	36	100	100	75	0	1	0	2	100	2	0	89	0	0	2	24	10	24	100	0	10	54	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24	0	10	0	0					
B. sub/amy	77	0	0	84	91	56	0	0	0	12	95	98	87	1	1	1	65	95	86	0	83	29	70	80	100	86	97	98	23	48	90	88	58	0	62	78	79	1	52	60	0	0	1	1	1	0	7	0	0					
LEM 1054	+			+	+	+					+		+				+	+	+		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
LEM 1080	+			+	+	+					+	+	+				+	+	+		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
LEM 1083	+			+	+	+					+	+	+				+	+	+		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
LEM 1085	+			+	+	+					+	+	+				+	+	+		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
LEM 1088	+			+	+	+					+	+	+				+	+	+		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

## 8. CONCLUSIONES

1. El Género *Bacillus* es un endófito de la leguminosa *Prosopis laevigata*.
2. Las cepas identificadas como *Bacillus* aisladas de nódulos de *Prosopis laevigata* pueden ser clasificadas como pertenecientes a PGRP, al producir sustancias como AIA, solubilizar fosfatos y ser capaces de fijar nitrógeno.
3. Las cepas de *Bacillus* aisladas de *Prosopis laevigata* fueron identificadas como pertenecientes a las especies de *Bacillus subtilis*, *Bacillus inaquosus*, *Bacillus velezensis* y *Bacillus cereus*

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Adékambi, T., Shinnick, T. M., Raoult, D., & Drancourt, M. (2008). Complete *rpoB* gene sequencing as a suitable supplement to DNA–DNA hybridization for bacterial species and genus delineation. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(8), 1807-1814.

Ahemad, M. (2015). Enhancing phytoremediation of chromium-stressed soils through plant-growth-promoting bacteria. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13(1), 51-58.

Ahn, Y. S., Kim, Y. S., & Shin, D. H. (2006). Isolation, identification, and fermentation characteristics of *Bacillus* sp. with high protease activity from traditional cheonggukjang. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 38(1), 82-87.

Alcaraz, L. D., Moreno-Hagelsieb, G., Eguiarte, L. E., Souza, V., Herrera-Estrella, L., & Olmedo, G. (2010). Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics. *BMC genomics*, 11(1), 332.

Alina, S. O., Constantinescu, F., & Petruța, C. C. (2015). Biodiversity of *Bacillus subtilis* group and beneficial traits of *Bacillus* species useful in plant protection. *Rom Biotechnol Lett*, 20, 10737-10750.

Alloway, B. J. (Ed.). (2012). Heavy metals in soils: trace metals and metalloids in soils and their bioavailability (Vol. 22). Springer Science & Business Media.

Auch, A. F., Jan, M., Klenk, H. P., & Göker, M. (2010). Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. *Standards in Genomic Sciences*, 2(1), 117.

Banik, S., Das, K., Islam, M., and Salimullah, M. (2014). Recent advancements and challenges in microbial bioremediation of heavy metals contamination. *JSM Biotechnol. Biomed. Eng.* 2, 1035.

- Behera, B. C., Yadav, H., Singh, S. K., Mishra, R. R., Sethi, B. K., Dutta, S. K., & Thatoi, H. N. (2017). Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia sp.* isolated from mangrove soil of Mahanadi river delta, Odisha, India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 169-178.
- Bhunia, A. K. (2018). *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*. In *Foodborne Microbial Pathogens* (pp. 193-207). Springer, New York, NY.
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601-608.
- Buendía-González, L., Estrada-Zúñiga, M. E., Orozco-Villafuerte, J., Cruz-Sosa, F., & Vernon-Carter, E. J. (2012). Somatic embryogenesis of the heavy metal accumulator *Prosopis laevigata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 108(2), 287-296.
- Camargo, F. A. O., Okeke, B. C., Bento, F. M., & Frankenberger, W. T. (2003). In vitro reduction of hexavalent chromium by a cell-free extract of *Bacillus sp.* ES 29 stimulated by Cu 2+. *Applied microbiology and biotechnology*, 62(5-6), 569-573.
- Cervantes, M. (2005). El Mezquite (*Prosopis spp.*). En M. C. Cervantes, *Plantas de importancia económica en las zonas áridas y semiáridas de México* (págs. 53-62). México: Instituto de Geografía, UNAM.
- Cherif-Silini, H., Silini, A., Yahiaoui, B., Ouzari, I., & Boudabous, A. (2016). Phylogenetic and plant-growth-promoting characteristics of *Bacillus* isolated from the wheat rhizosphere. *Annals of microbiology*, 66(3), 1087-1097.
- Chen, Y. P., Rekha, P. D., Arun, A. B., Shen, F. T., Lai, W. A., & Young, C. C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied soil ecology*, 34(1), 33-41.
- Choudhary, M., Kumar, R., Datta, A., Nehra, V., & Garg, N. (2017). Bioremediation of heavy metals by microbes. In *Bioremediation of Salt Affected Soils: An Indian Perspective* (pp. 233-255). Springer, Cham.
- Claus, D., y Fritze, D. (1989). Taxonomía del bacilo. *Bacillus* (pp. 5-26). Springer, Boston, MA.
- Colston, S. M., Fullmer, M. S., Beka, L., Lamy, B., Gogarten, J. P., & Graf, J. (2014). Bioinformatic genome comparisons for taxonomic and phylogenetic assignments using *Aeromonas* as a test case. *MBio*, 5(6), e02136-14.
- De Bruijn, F. J. (2015). Biological nitrogen fixation. In *Principles of Plant-Microbe Interactions* (pp. 215-224). Springer, Cham.

- Deng, C., Slamti, L., Raymond, B., Liu, G., Lemy, C., Gominet, M., ... & Lereclus, D. (2015). Division of labour and terminal differentiation in a novel *Bacillus thuringiensis* strain. *The ISME journal*, 9(2), 286.
- Dixit, R., Malaviya, D., Pandiyan, K., Singh, U., Sahu, A., Shukla, R. & Paul, D. (2015). Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: an overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability*, 7(2), 2189-2212.
- Dunlap, C. A., Saunders, L. P., Schisler, D. A., Leathers, T. D., Naeem, N., Cohan, F. M., & Rooney, A. P. (2016). *Bacillus nakamurai* nov., a black-pigment-producing strain. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(8), 2987-2991.
- Ezura, H., Nukui, N., Yuhashi, K. I., & Minamisawa, K. (2000). In vitro plant regeneration in *Macroptilium atropurpureum*, a legume with a broad symbiont range for nodulation. *Plant Science*, 159(1), 21-27.
- Fan, B., Blom, J., Klenk, H. P., & Borriss, R. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* Form an "Operational Group *B. amyloliquefaciens*" within the *B. subtilis* species complex. *Frontiers in microbiology*, 8, 22.
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Fürch, T., Wittmann, C., Wang, W., Franco-Lara, E., Jahn, D., & Deckwer, W. D. (2007). Effect of different carbon sources on central metabolic fluxes and the recombinant production of a hydrolase from *Thermobifida fusca* in *Bacillus megaterium*. *Journal of biotechnology*, 132(4), 385-394.
- Gagné-Bourque, F., Mayer, B. F., Charron, J. B., Vali, H., Bertrand, A., & Jabaji, S. (2015). Accelerated growth rate and increased drought stress resilience of the model grass *Brachypodium distachyon* colonized by *Bacillus subtilis* B26. *PLoS One*, 10(6), e0130456.
- Galloway, J. N., & Cowling, E. B. (2002). Reactive nitrogen and the world: 200 years of change. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 31(2), 64-72.
- Glickmann, E., & Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(2), 793-796.
- Gordon, R. E., Haynes, W. C., Pang, C. H. N., & Smith, N. R. (1973). The genus *Bacillus*. *US Department of Agriculture handbook*, (427), 109-26.
- Goswami, D., Thakker, J. N., & Dhandhukia, P. C. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1127500.

- Goswami, D., Vaghela, H., Parmar, S., Dhandhukia, P., & Thakker, J. N. (2013). Plant growth promoting potentials of *Pseudomonas spp.* strain OG isolated from marine water. *Journal of plant interactions*, 8(4), 281-290.
- Goto, K., Omura, T., Hara, Y., & Sadaie, Y. (2000). Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*. *The Journal of general and applied microbiology*, 46(1), 1-8.
- Gouda, S., Kerry, R. G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H. S., & Patra, J. K. (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological research*, 206, 131-140.
- Hall, T. A. (1999, January). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, No. 41, pp. 95-98). [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000..
- Haile, D., Mekbib, F., & Assefa, F. (2016). Isolation of Phosphate Solubilizing Bacteria from White Lupin (*Lupinus albus* L.) Rhizosphere Soils Collected from Gojam, Ethiopia. *J Fertil Pestic*, 7(172), 2.
- Hamaki, T., Suzuki, M., Fudou, R., Jojima, Y., Kajiura, T., Tabuchi, A., & Shibai, H. (2005). Isolation of novel bacteria and actinomycetes using soil-extract agar medium. *Journal of bioscience and bioengineering*, 99(5), 485-492.
- Hossain, M. J., Ran, C., Liu, K., Ryu, C. M., Rasmussen-Ivey, C. R., Williams, M. A., & Kloepper, J. W. (2015). Deciphering the conserved genetic loci implicated in plant disease control through comparative genomics of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*. *Frontiers in plant science*, 6, 631.
- Iyer, B., Rajput, M. S., & Rajkumar, S. (2017). Effect of succinate on phosphate solubilization in nitrogen fixing bacteria harbouring chick pea and their effect on plant growth. *Microbiological research*, 202, 43-50.
- Jukes T.H. and Cantor C.R. (1969). Evolution of protein molecules. In Munro HN, editor, *Mammalian Protein Metabolism*, pp. 21-132, Academic Press, New York.
- Kathiravan, M. N., Karthick, R., & Muthukumar, K. (2011). Ex situ bioremediation of Cr (VI) contaminated soil by *Bacillus sp.*: batch and continuous studies. *Chemical engineering journal*, 169(1-3), 107-115.
- Kamilova, F., Okon, Y., de Weert, S., & Hora, K. (2015). Commercialization of microbes: manufacturing, inoculation, best practice for objective field testing, and registration. In *Principles of plant-microbe interactions* (pp. 319-327). Springer, Cham.
- Khan, M. U., Sessitsch, A., Harris, M., Fatima, K., Imran, A., Arslan, M., ... & Afzal, M. (2015). Cr-resistant rhizo- and endophytic bacteria associated with *Prosopis juliflora* and their

potential as phytoremediation enhancing agents in metal-degraded soils. *Frontiers in plant science*, 5, 755.

Kim, Y., Koh, I., Lim, M. Y., Chung, W. H., & Rho, M. (2017). Pan-genome analysis of *Bacillus* for microbiome profiling. *Scientific reports*, 7(1), 10984.

Kloepper, J. W., Fadamiro, H. Y., Ngumbi, E. N., & Nangle, K. W. (2017). *U.S. Patent No. 9,615,583*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Konstantinidis, K. T., & Tiedje, J. M. (2005). Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(7), 2567-2572.

Kovac, J., Miller, R. A., Carroll, L. M., Kent, D. J., Jian, J., Beno, S. M., & Wiedmann, M. (2016). Production of hemolysin BL by *Bacillus cereus* group isolates of dairy origin is associated with whole-genome phylogenetic clade. *BMC genomics*, 17(1), 581.

Kumar S., Stecher G., and Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., ... & Thompson, J. D. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *bioinformatics*, 23(21), 2947-2948.

Lebeau, T., Braud, A., & Jézéquel, K. (2008). Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: a review. *Environmental Pollution*, 153(3), 497-522.

Liu, Y., Lai, Q., Göker, M., Meier-Kolthoff, J. P., Wang, M., Sun, Y., ... & Shao, Z. (2015). Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Scientific reports*, 5, 14082.

Liu, Y., Lai, Q., Du, J., & Shao, Z. (2017). Genetic diversity and population structure of the *Bacillus cereus* group bacteria from diverse marine environments. *Scientific reports*, 7(1), 689.

Logan, N. A., & Vos, P. D. (2015). *Bacillus*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-163

Mahar, A., Wang, P., Ali, A., Awasthi, M. K., Lahori, A. H., Wang, Q., & Zhang, Z. (2016). Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: A review. *Ecotoxicology and environmental safety*, 126, 111-121.

Manceau, A. (2018). 7 Quantitative Speciation of Heavy Metals. *Applications of Synchrotron Radiation in Low-Temperature Geochemistry and Environmental Science*, 49, 341.

Mahurpawar, M. (2015). Effects of heavy metals on human health. *Int. J. Res. Granthaalayah*, 1(7).

Maughan, H., & Van der Auwera, G. (2011). *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(5), 789-797.

Meza, S. R., E. Osuna. L., 2003. Estudio dasométrico del mezquite en la zona de las pocitas, BCS. Folleto Técnico No. 3. Centro de Investigación Regional del Noroeste Campo Experimental Todos Santos. INIFAP. La Paz, B.C.S. México. 56 p.

Mohkam, M., Nezafat, N., Berenjian, A., Mobasher, M. A., & Ghasemi, Y. (2016). Identification of bacillus probiotics isolated from soil rhizosphere using *16S rRNA*, *recA*, *rpoB* gene sequencing and RAPD-PCR. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 8(1), 8-18.

Mokrani, S., Belabid, L., Bedjaoui, B., & Nabti, E. (2018). Growth Stimulation of *Phaseolus vulgaris* Plantules by Strain *Bacillus amyloliquefaciens* Hla Producer of Beneficial Agricultural Enzymes. *JOJ Horti Arboric. 2018a*, 2(1), 555581.

Monroy-Ata, A., & Ramírez-Saldívar, K. Y. (2018). Relación entre sucesión ecológica vegetal y hongos micorrizógenos arbusculares en un matorral xerófilo en el centro de México. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 21, 13-29.

Morales-Barrón, B. M., Vázquez-González, F. J., Gonzalez Fernandez, R., DE LA MORA COVARRUBIAS, A. N. T. O. N. I. O., Quiñonez Martínez, M., Díaz-Sanchez, A., & Valero-Galván, J. (2017). Evaluation of antagonist capacity of bacillales strains isolated from vermicompost leachate on phytopatogenic fungi. *Producto de investigación ICB*.

Murphy, J., & Riley, A. J. (1958). A single-solution method for the determination of soluble phosphate in sea water. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 37(1), 9-14.

Nazina, T. N., Tourova, T. P., Poltarau, A. B., Novikova, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A. E., & Ivanov, M. V. (2001). Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenuatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(2), 433-446.

Nicholas, K. B. (1997). Genedoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>.

- Ojuederie, O., & Babalola, O. (2017). Microbial and plant-assisted bioremediation of heavy metal polluted environments: A review. *International journal of environmental research and public health*, 14(12), 1504.
- Okinaka, R. T., & Keim, P. (2016). The phylogeny of *Bacillus cereus* sensu lato. In *The Bacterial Spore: from Molecules to Systems* (pp. 239-251). American Society of Microbiology.
- Outtrup, H., Jorgensen, S. T., Berkeley, R., Heyndrickx, M., Logan, N., & De Vos, P. (2002). The importance of *Bacillus* species in the production of industrial enzymes. Applications and systematics of *Bacillus* and relatives. *Microbiology*, 206-218.
- Oves, M., Saghir Khan, M., Huda Qari, A., Nadeen Felemban, M., & Almeelbi, T. (2016). Heavy metals: biological importance and detoxification strategies. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, 7(2), 1-15.
- Patiño-Torres, C. O., & Sanclemente-Reyes, O. E. (2014). Phosphate-solubilizing microorganisms (PSM): a biotechnological alternative solution for a sustainable agriculture. *Entramado*, 10(2), 288-297.
- Priest, F. G., Goodfellow, M., & Todd, C. (1988). A numerical classification of the genus *Bacillus*. *Microbiology*, 134(7), 1847-1882.
- Porwal, S., Lal, S., Cheema, S., & Kalia, V. C. (2009). Phylogeny in aid of the present and novel microbial lineages: diversity in *Bacillus*. *PLoS One*, 4(2), e4438.
- Ramírez Ramírez, A., & Benítez-Campo, N. (2014). Tolerancia y Reducción de Cromo (Vi) por *Bacillus cereus* B1, Aislado de Aguas Residuales de una Curtiembre. *Revista De Ciencias*, 17(2), 51-63. doi:10.25100/rc.v17i2.486
- Rodriguez, E., Rojo, G., Ramirez, B., Martinez, R., Cong, M., Medina, S., & Piña, H. (2014). ANÁLISIS TÉCNICO DEL ÁRBOL DEL MEZQUITE (*Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. ex Willd.) EN. Ra Ximhai, 173-193.
- Rössler, D., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Lin, C., Mcgill, T. J., Wisotzkey, J. D. & Fox, G. E. (1991). Phylogenetic diversity in the genus *Bacillus* as seen by 16S rRNA sequencing studies. *Systematic and applied microbiology*, 14(3), 266-269.
- Saha, B., & Orvig, C. (2010). Biosorbents for hexavalent chromium elimination from industrial and municipal effluents. *Coordination Chemistry Reviews*, 254(23-24), 2959-2972.
- Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.

- Saravanan, V. S., Fu, Q., Hu, H., & Sa, T. (2009). Characterization of plant growth-promoting traits of free-living diazotrophic bacteria and their inoculation effects on growth and nitrogen uptake of crop plants. *J Microbiol Biotechnol*, 19, 121322.
- Sarwar, N., Imran, M., Shaheen, M. R., Ishaque, W., Kamran, M. A., Matloob, A., & Hussain, S. (2017). Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: modifications and future perspectives. *Chemosphere*, 171, 710-721.
- Schaeffer, A. B., & Fulton, M. D. (1933). A simplified method of staining endospores. *Science*, 77(1990), 194-194.
- Shahid, M., Hameed, S., Tariq, M., Zafar, M., Ali, A., & Ahmad, N. (2015). Characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria for enhanced sunflower growth and yield-attributing traits. *Annals of microbiology*, 65(3), 1525-1536.
- Sharma, S., Kumar, V., & Tripathi, R. B. (2011). Isolation of phosphate solubilizing microorganism (PSMs) from soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 1(2), 90-95.
- Sharma, V., & Patil, P. B. (2011). Resolving the phylogenetic and taxonomic relationship of *Xanthomonas* and *Stenotrophomonas* strains using complete *rpoB* gene sequence. *PLoS currents*, 3.
- Tamura K., Nei M., and Kumar S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101:11030-11035.
- Tejera-Hernández, B., Rojas-Badía, M. M., & Heydrich-Pérez, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 42(3).
- Torres, M. J., Brandan, C. P., Sabaté, D. C., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., & Audisio, M. C. (2017). Biological activity of the lipopeptide-producing *Bacillus amyloliquefaciens* PGPBacCA1 on common bean *Phaseolus vulgaris* L. pathogens. *Biological control*, 105, 93-99.
- Tóth, G., Hermann, T., Da Silva, M. R., & Montanarella, L. (2016). Heavy metals in agricultural soils of the European Union with implications for food safety. *Environment international*, 88, 299-309.
- Tucker, L. R., & Lewis, C. (1973). A reliability coefficient for maximum likelihood factor analysis. *Psychometrika*, 38(1), 1-10.
- Ullah, A., Heng, S., Munis, M. F. H., Fahad, S., & Yang, X. (2015). Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: a review. *Environmental and Experimental Botany*, 117, 28-40.

- Ungureanu, T., Iancu, G. O., Pintilei, M., & Chicoş, M. M. (2017). Spatial distribution and geochemistry of heavy metals in soils: a case study from the NE area of Vaslui county, Romania. *Journal of Geochemical Exploration*, 176, 20-32.
- Vargas, M. A., Mendes, I. C., & Hungria, M. (2000). Response of field-grown bean (*Phaseolus vulgaris*) to *Rhizobium* inoculation and nitrogen fertilization in two Cerrados soils. *Biology and Fertility of Soils*, 32(3), 228-233.
- Wang, D., Xu, A., Elmerich, C., & Ma, L. Z. (2017). Biofilm formation enables free-living nitrogen-fixing rhizobacteria to fix nitrogen under aerobic conditions. *The ISME journal*, 11(7), 1602.
- Wang, L., Lee, F., Tai, C & Kasai, H. (2007). Comparison of *gyrB* gene sequences, 16s rRNA gene sequences and DNA–DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *Inter. Journal of System. and Evol. Microbiol.* 57:1846-1850.
- Wernegreen, J. & Riley, M. (1999). Comparison of the evolutionary dynamics of symbiotic and housekeeping loci: a case for the genetic coherence of rhizobial lineages. *Mol. Evol. Biol.* 16:98-113.
- Willems, A., Fernández-López, M., Muñoz-Adelantado, E., Goris, J., De Vos, P., Martínez-Romero, E., Toro, N. & Gillis, M. (2003). Description of new *Ensifer* strains from nodules and proposal to transfer *Ensifer adhaerens* Casida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adhaerens* comb. nov. Request for an Opinion. *Inter. Jour. of System. and Evol. Microbiol.* 53:1207-1217.
- Xu, D., & Côte, J. C. (2003). Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S–23S ITS nucleotide sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(3), 695-704.
- Yasmin, S., Zaka, A., Imran, A., Zahid, M. A., Yousaf, S., Rasul, G., ... & Mirza, M. S. (2016). Plant growth promotion and suppression of bacterial leaf blight in rice by inoculated bacteria. *PloS one*, 11(8), e0160688.
- Zahid, M. (2015). Isolation and identification of indigenous plant growth promoting rhizobacteria from Himalayan region of Kashmir and their effect on improving growth and nutrient contents of maize (*Zea mays* L.). *Frontiers in microbiology*, 6, 207.
- Zhang, J., Wang, P., Fang, L., Zhang, Q. A., Yan, C., & Chen, J. (2017). Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from mushroom residues and their effect on tomato plant growth promotion. *Polish journal of microbiology*, 66(1), 57-65.

## 10. ANEXOS

### 10.1 Medios YM Y YMA

Manitol.....	10g
Extracto de levadura.....	1g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.66g
Glutamato de sodio.....	0.5g
NaCl.....	0.05g
Solución T (MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O 10 g/L).....	10mL
Solución U (CaCl <sub>2</sub> 40 g/L.....	1mL
Solución V (FeCl <sub>3</sub> •6H <sub>2</sub> O 4 g/L).....	1mL
Agar para YMA (medio sólido).....	18g
Agua destilada.....	1L

### 10.2 Medio Jensen libre de nitrógeno

Solución P (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 20g/L, MgSO <sub>4</sub> 20g/L).....	10mL
Solución Q (NaCl 20g/L).....	10mL
Solución R (CaHPO <sub>4</sub> 50 g/L).....	20 mL
Solución D (FeCl <sub>3</sub> 4 g/L).....	10 mL
Oligoelementos (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 2.26 g, MnSO <sub>4</sub> •4H <sub>2</sub> O 2.03 g/L, ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O 0.22 g/L, CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O 0.08 g/L, Na <sub>2</sub> Mo <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O 0.09 g/L).....	1mL
Agua destilada.....	1L
Agar para medio sólido.....	18g

\*Para controles positivos con fuente de nitrógeno agregar 0.5 g de KNO<sub>3</sub> ó 0.5 g de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>

### 10.3 Secuencias gen 16s rDNA

>LEM1083

```
AGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGG
GAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGCGCATTAG
CTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTA
CGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTG
TTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACG
TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTC
ATTGAAAAGTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCACTGGCGAA
GGCGACTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGC
TAAGTGTAGGGGTTTCCGCCCTTAGTCTGCGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGA
CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTYGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTCTGACAATCTAGAGATAGG
ACGTCCCTTCGGGGCAGAGTACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTG
ATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTTAAGGTGACTGCCGTTGACAAACCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGA
CCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTC
TGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGC
```

>LEM1088

GAGTAACACGTTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACYGCATGGTTTCAAATTGAA  
AGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGATTAGCTAGTTGGTGAAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAG  
AGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTACGGTACCTAA  
AACGCCGCGTGAAGTGAAGGCTTTCGGGTGTAATACTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAA  
CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGT  
TTCTTAAGTCTGATGTAAAGCCACGGCTCAACCGTGAGGGTCTTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAAGAGAAAGTGAATCCATGTGT  
AGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGGAAAGCGTGGGAGCAAA  
CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTCTAAGTGTAGAGGGTTCCGCCCTTATGCTGAAGTTAACGATTAAGCACTCC  
GCCTGGGAGTACGGCCCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACCGGAAG  
AACCTTACCAGGTCTGACATCCTCTGAAAACCTAGAGATAGGGCTTCTCTTCCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGT  
TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGATCTTGTCCATCATTAAAGTGGGCACTTAAAGTGAAGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGT  
GGGGAAGTGGGATGACGTCAAATCATGCCCCATTGACCTGGCTACACACGTGCTACAATGGACGTTACAAGAGCTGCAAGACCGCGAG  
GTGGAGCTAATCTATAAAACGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGCTGGAATCGTAGTAAATCGCG

## 10.4 Secuencias gen *rpoB*

>LEM1054 *rpoB*

GTAACACGCTTTGGTTTTCATTGAGACGCCATACCGCCGCTGATCCTGAAACAGGAAAAGTAAACGCTAGAATCGACTACCTGACTGCTGATGAAGA  
GGATAACTATGTCTGAGCCCAAGCGAATGCTAAGCTGAGCGATGACGGTCTTTCTTGGATGACAGCATCGTAGCCGCTTTCAGAGGGGAAAACACC  
GTTGTAGCCCGCAACCGCTGGATTACATGGACGTATCTCTAAACAGGTTGTATCTGCTGCGACAGCATGTATCCGTTCTTGAAACAGTACTCG  
AACCGCCCTCATGGGAGCGAATGCGAGCGTCAGGCTGTGCCTTGTATGACGCGGAAAGCTCCGATCGTGGAAACGGGTATGGAATACGTATCCG  
GTAAAGACTCCGCTGACGCGTTATTTGTAACACCCCTGGTATCGTTGACGGGTGGAAGCGAAAAACGATGGGTGCGCCGCTATGAARAAATTGA  
CGGCCAAAAAGTAAAAGGCAACCTGGATAAGTACAGCTTGTCTGAAATTTGCCGCTCAACCAAGGTACGTGCTACAACAGCGTCCGATCGTCAAGT  
TCGGCGATGAAGTAGTCAAAGGAGAAATCCTTGTGACGGACCTTCAATGGAGCTTGGTGAAGTGTCTCGGCCCAACGTAATGGTGGCTTCATG  
ACATGGGATGTTACAACATGAGGATGCCATCATCATGAGTGAACGCTTGTGAAAGATGATGTATACACATCTATTACATTGAAGAATATGAATCA  
GAAGCACGTGATACAAGCTTGGGCCGGAAGAGATCACCCGTGATATCCAAACGTAGGGGAAGACGCGCTTCCGCAATCTTGTGACCCGCGGAATTA  
TCCGATTCGGTGGGAAAGTCAACGACGAGACCTTCTCGTAGGTAAGTAAACGCTAAAGGTGTAAGTGAAGTACGCTTACGGTGAAGAACGCTTCTGAT  
GCGATCTTGGGAAAAAGCGCGTGAAGTCCGTGATCTTCTCCGTGTGCCTCACGGCGCGCGGAATTATCCACGACGTTAAAGTCTTCAACCG  
TGAAGACGGCGACGAACCTTCTCCGGGAGTGAACAGCTTGTACGCGTATATATCGTCTAGAAACGTAAGA

>LEM1080 *rpoB*

AAGTAAACCGTTTTGGTTTTATCGAAACGCCATATCGCCGCTTGTACCTGAAACAGGGAAGGTAAGTGGCAGAATCGATTACTTAACTGCTGATGAA  
GAGGATAACTATGTTGTCGCTCAAGCGAACGCTCGTCTTGTATGACGAAGGCGGATTTATTGATGACAGCATCGTAGCCGCTTTCGCGGGGAGAACAC  
CGTCTTCCAGAAACCGTGTGACTACATGGATGATCGCCTAAGCAGGTTGTTTCTGCTGCGACAGCATGTATCCGTTCTAGAAAACGATGACTC  
CAACCGTGCCTCATGGGAGCGAACATGCAGCGTCAAGGCTGTGCCTTGTATGACGCGGAAAGCACCATTCTGTTGTTACTGGTATGGAATACGTATCAG  
GTAAGACTCTGGTCCGCTGTTATTTGTAACACCCCTGGTATCGTTGAAACGCTAGAAAGCGAAAAATGTCTGGGTTCCGCTTATGAAGAAGTAGAC  
GGTCAAAAAGTAAAAGGAAACCTGGATAAATACAGCTGCTGAAATTTGCCGCTCAACCAAGGTACGTGCTACAACAGCGTCCGATCGTAAAGTGT  
CGCGATGAAGTGGTAAAAGGAGAAATCCTTGTGACGGTCTTATGAGCTTGGTGAACCTGCACTTGGCCGTAACGTAATGGTGGCTTCATGA  
CATGGGATGGCTACAACATGAGGATGCCATCATCATGAGTGAACGCTTGTGAAGGATGATGTTTATACATCTATCCACATTGAAGAATACGAATCA  
GAAGCACGTGATACGAACTTGGACCTGAAGAATCACTCGCATATTCCAACGTCGGTGAAGATGCGCTTCCGCAATCTTGTGACCCGCGGAATCAT  
CCGATTTGGGCGGAAGTAAAAGACGAGATCTTCTTGGTAAAGTAAACGCTAAAGGTGTAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGT  
CCATCTTGGTGAAGAACCCGCGAGGTTCTGATACTTCTTCTGTTGCTCACGGCGCGCGGAATTATCCACGACGTTAAAGTCTTCAACCGT  
AAGATGGAGACGAACCTTCTCCGGGTGTTAAACAGTTAGTACGCGTATATATCGTCTAGAAACGTAAGA

>LEM1083 *rpoB*

AAGTAAACCGTTTTGGCTTTATTGAAACGCCATATCGCCGCTTGTACCTGAAACAGGGAAGGTAAGCGGCAAGTACGATTACTTAACTGCTGATGAA  
GAGGATAACTATGTTGTCGCTCAAGCGAATGCTGCTTGTATGACGAAGGCGCCTTTATTGATGACAGCATCGTAGCTGTTCCGCGGGGAGAACAC  
CGTTGTTCCAGAAATCGTGTAGACTACATGGATGATCGCCTAAGCAGGTTGTATCTGCTGCGACAGCATGTATCCGTTCTTAGAAAACGATGACTC  
CAACCGTGCCTCATGGGAGCGAACATGCAGCGTCAAGGCTGTGCCTTGTATGACGCGGAAAGCGCCATTGTTGGAAGTGGTATGGAATACGTATCAG  
GAAAAGACTCTGGTCCGCTGTTATTTGTAACACCCCTGGTATCGTTGAAACGCTAGAAAGCGAAAAACGTTGGGTTCCGCTTATGAAGAAGTAGAC  
GGTCAAAAAGTAAAAGGAAACCTGGATAAATACAGCTGCTGAAATTTGCCGCTCAACCAAGGTACGTGCTACAACAGCGTCCGATCGTAAAGTGT  
CGCGATGAAGTGGTAAAAGGAGAAATCCTTGTGACGGTCTTCTATGGAGCTTGGTGAACCTGCACTTGGCCGTAACGTAATGGTGGCTTCATGA  
CATGGGATGGCTACAACATGAGGATGCCATCATCATGAGTGAACGCTAGTGAAGGATGATGTTTATACATCTATCCACATTGAAGAATACGAATCA  
GAAGCACGTGATACGAACTTGGACCTGAAGAATCACTCGCATATTCCAACGTCGGTGAAGATGCGCTTCCGCAATCTTGTGACCCGCGGAATCAT  
CCGATTTGGGCGGAAGTAAAAGACGAGATCTTCTTGGTAAAGTAAACGCTAAAGGTGTAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGT  
CCATCTTGGGCGAAGTAAAAGACGAGGTTCTGATACTTCTTCTGTTGCTCACGGCGCGCGGAATTATCCACGACGTTAAAGTCTTCAACCGT  
AAGACGGAGACGAACCTTCTCCAGGTGTTAAACAGTTAGTACGCGTATATATCGTCTAGAAACGTAAGA

>LEM1085 *rpoB*

CATCTTATGSAAAGTAAACCGTTTTGGTTTTATCGAAACGCCATATCGCCGTGTTGACCCTGAAACAGGGAAGGTAACGGCAGAATCGATTAAC  
TGCTGATGAAGAGGATAACTATGTTGTCGCTCAAGCGAACGCTCGTCTTGATGACGAAGGCGGATTTATTGATGACAGCATCGTAGCCCGTTCCCGG  
GGGAGAACACCGTCGTTCCAGAAACCGTGTGGACTACATGGATGATCGCCTAAGCAGGTTGTTCTGCTGCGACAGCATGTATCCCGTTCCTAGAA  
AACGATGACTCCAACCGTCCCCTCATGGGAGCGAACATGCAGCGTCAGGCTGTGCCTTTGATGCAGCCGGAAGCACCATTGTTGGTACTGGTATGGA  
ATACGTATCAGGTAAGACTCTGGTGCCGCTGTTATTTGTAACACCCTGGTATTGTTGAACGCGTAGAAGCGAAAAATGTCTGGGTTCCGCCGTTATGA  
AGAAGTAGATGGTCAAAAAGTAAAAGGAAACCTGGATAAATACAGCCTGCTGAAATTTGTCGCTCTAACCAAGGTACGTGCTACAACCAGCGTCCGA  
TCGTAAGTGTCCGCGATGAAGTGGTAAAAGGAGAAATCCTTGCTGACGGTCTCTATGGAGCTTGGTGAACCTTGCACTTGGCCGTAACGTAATGGTC  
GGCTTCATGACATGGGATGGCTACAACATGAGGATGCCATCATCATGAGTGAACGCTTGTGAAGGATGATGTTTATACATCTATCCACATTGAAGA  
ATACGAATCAGAAGCACGTGATACGAAACTTGGACCTGAAGAAATCACTCGCGATATTCCAACGTCGGTGAAGATGCGCTTCGCAATCTTGATGACC  
GCGGAATCATCCGTATTGGGGCGGAAGTAAAAGACGGAGATCTTCTTGGTAAAGTAAACGCCTAAAGGCGTAACCTGAACTGACTGCAGAAGAACG  
CCTGCTTACGCCATCTTGGTAAAAAGCCCGGAGGTTCTGATACTTCTTCTGTTGCTCACGGCGGCGGCGGAATTATCCACGACGTTAAAGT  
CTTCAACCGTGAAGACGGAGACGAACTTCTCCAGGCGTAAACCAGTTGGTACGCGTATATATCGTCAGAAACGTAAGATC

>LEM1088 *rpoB*

AAAGTAAATGAGTTTGGTTTCATTGAAACACCATATCGTCGTGTTGACCAGAACTGGTCTTGTAAACAGGG  
CATGTTGATTATTTAACAGCAGATGAAGAAGATAACTATGTTGTAGCCCAAGCGAATATGAAATTATCTGATGAAGGTGAATCCTAAGTGAAGATAC  
GTAGCTCGTTCCGTGGTGAACATTGTCAAAATAGAGAACGCATCGACTACATGGATGTATCTCCAAAACAAGTAGTGTCCGCGAGCGACAGCTTG  
TATCCGTTCTTAGAAAACGATGACTCTAACCGCGCACTTATGGGAGCGAACATGCAACGTCAGGCGGTTCCGTTAATGAATCCGGAATCTCCGATTGT  
AGGTACAGGTATGGAGTACGTATCAGCAAAAGACTCAGGTGCTGCAGTAATCTGTAACATCCTGGTGTGTTGAGCGCGTAGAAGCACGTGAAGTTT  
GGGTACGTCGCTATGTAGAAGTTGACGGTCAAACAGTAAAAGGCGACTTAGATCGCTACAAAATGCAAAAATTCATTGTTCTAACCAAGGAACCTGT  
TACAACCAACGTCCTAATCGTAAAGTGTGAAATGAAGTTGAAAAGGTGAAATCCTTGCAGGATGGTCTTCTATGGAATTAGGTGAACTAGCACTTGG  
ACGTAACGTGCTTGTGGCTTCATGACTTGGGACGGTTATAACTACGAGGATGCGATCATCATGAGTGAAGCGCTTGTAAAAGATGATGTGTACTTTC  
TATTCATATTGAAGAATATGAATCAGAAGCTCGTGATACGAAGCTTGGACCAGAAGAAATTACACGTGACATTCCAAATGTTGGGGAAGACGCATTAC  
GTAACCTTGACGAGCGCGTATCATTGCGTGGTGTGCTGAAGTAAAAGATGGAGATTTACTTGTGGTAAAGTAAACCTAAAGGTGAACAGAATTA  
ACAGCTGAAGAACGTCTATTACATGCTATCTTGGAGAAAAAGCGGTGAAGTACGTGATACATCACTACGTGTACCACACGGTGGTGGCGGTATTAT  
CTTAGACGTAAAAGTATTAACCGTGAAGATGGCGATGAATTGCCACCAGGCGTGAATCATACTTGTATGTGCATATATCG