

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**DIVISIÓN DE INGENIERÍA**



**Aislamiento e identificación de bacterias endófitas radiculares de  
Gobernadora (*Larrea tridentata*)**

Por:

Daniela Alejandra Ascencio Alvarez

**TESIS**

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

Buenvista, Saltillo, Coahuila, México.  
Septiembre 2025

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**DIVISIÓN DE INGENIERÍA**

**Aislamiento e identificación de bacterias endófitas radiculares de  
Gobernadora (*Larrea tridentata*)**

Por:

Daniela Alejandra Ascencio Alvarez

**TESIS**

Que somete a la consideración del H. Jurado examinador como requisito para obtener el  
título de:

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

Aprobada por:

\_\_\_\_\_  
Dra. Sonia Noemi Ramírez Barrón  
Presidente

\_\_\_\_\_  
Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez  
Vocal

\_\_\_\_\_  
Dr. Valentín Robledo Torres  
Vocal

\_\_\_\_\_  
Dra. Lihua Wei  
Vocal



  
\_\_\_\_\_  
M.C. Sergio Sánchez Martín  
Coordinador de la División de  
Ingeniería

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México  
Septiembre 2025.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**DIVISIÓN DE INGENIERÍA**

**Aislamiento e identificación de bacterias endófitas radiculares de  
Gobernadora (*Larrea tridentata*)**

Por:

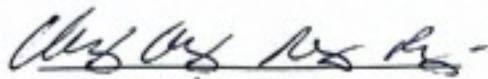
Daniela Alejandra Ascencio Alvarez

**TESIS**

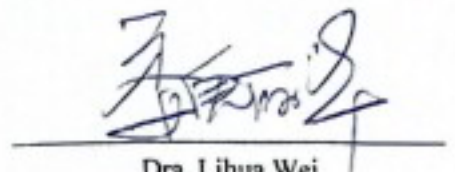
Presentada como requisito parcial para obtener título de:

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

Aprobada por el comité de asesoría:



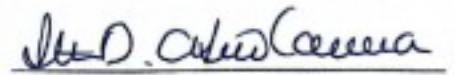
Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez  
Asesor Principal Interno



Dra. Lihua Wei  
Asesor Principal Externo



Dr. Valentín Robledo Torres  
Co-Asesor



Dra. Iveth Dalila Antonio Carmona  
Co-Asesor

Buнавista, Saltillo, Coahuila, México  
Septiembre 2025.

## AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por ponerme en este camino, por nunca desampararme y siempre estar conmigo en cada paso que doy. Porque puso en mí sueños que solo Él sabía que podía lograr. Gracias por no soltarme y no permitir que mis miedos me limitaran.

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, mi alma mater, por permitirme realizar mis estudios en su gloriosa institución y brindarme lo necesario para poder concluirlos. Porque sus puertas no se cierran jamás y se convirtió en un hogar al que puedo regresar. Por ser orgullosamente mi origen y el origen de todo lo que podré aportar en un futuro.

A mi asesor el **Dr. Miguel Ángel Perez Rodríguez** por abrirme las puertas a su conocimiento, transmitirme lo necesario y permitirme aprender muchísimo de él y de su laboratorio. Por tenerme paciencia en la elaboración de esta tesis. Por sembrar en mí la curiosidad hacia la investigación y darme la responsabilidad suficiente para alimentar esa curiosidad. Gracias por enseñarme. por guiarme en el camino y por su confianza.

A mi madre **Rosa Guadalupe Ascencio Alvarez**, por enseñarme a perseverar, a no rendirme. Por apoyarme a estudiar esta carrera y brindarme lo necesario para poder concluirla. A pesar de mis caídas ella nunca permitió que me quedara en el suelo. Por su paciencia y por creer en mí incluso cuando yo dudé de mí misma. Porque esta tesis no solo es mi esfuerzo y mi cansancio, también es el de ella por haber estado conmigo hasta la madrugada redactando, al estarme esperando en la puerta de la casa hasta que llegara después de un día largo de laboratorio.

A mi amiga **María Fernanda Delgado García** por siempre estar conmigo en todo momento, por ser mi compañera de clases, por haber estado no solo en situaciones académicas, sino también en situaciones personales. Porque me enseñó lo que significa paciencia y compañía. Por no solo acompañarme a comer a estanquillos y a tomar el “buitre”, sino también acompañarme a llorar por materias, a estar frustrada por las clases y a estar desesperada por exámenes. Por las horas de estudio y los repasos entre clases. Porque sin su compañía la universidad no hubiera sido la misma. Porque Dios la puso en mi camino como alguien que me apoyaría y me escucharía.

A **Valeriano Carrillo** por ser un pilar en el laboratorio y ayudarnos con nuestros experimentos. Por siempre estar disponible a guiarnos y a resolver todas las dudas que nos surgían. Por su amistad y su manera de enseñarnos a realizar procedimientos. Por ser una persona en quien se puede confiar, no solo para cosas del laboratorio, sino para la vida también.

A mi amigo y compañero **Eduardo Mata** por cruzar esta meta conmigo, por ser más que un compañero de tesis sino también una persona fundamental en la realización de ésta. Por siempre ayudarme a no desistir entre risas y comidas en los estanquillos. Porque desde el día 1 nos subimos a esta aventura y decidimos que la terminaríamos sí o sí.

A mi amiga y compañera **Angelica Alonso**, por ser paciente conmigo y enseñarme en el laboratorio cosas que todavía no dominaba. Porque entre risas y paciencia me enseñó y me tutoró durante el largo proceso de esta tesis.

A mi amigo **Vicente García** por haber estado en días largos en el laboratorio conmigo. Por hacer esos días menos pesados y verles el lado bueno. Porque fue una persona importante para mí en cuanto a confianza, me sacó de mi burbuja y me presentó a varios compañeros del laboratorio, haciendo que mis días no fueran tan largos.

A **Jesús Santiago Márquez** por haberme apoyado, por haber creído en mí y por convertirse en un gran amigo. Por motivarme y recordarme que puedo con todo lo que me proponga hacer. Gracias por siempre estar echándome porras y no permitir que desistiera.

## DEDICATORIA

A mi madre **Rosa Guadalupe Ascencio Alvarez:**

Te amo mamá, eres mi más grande motivación. Todo lo que hago es por y para ti. Este logro es tanto tuyo como mío. Siempre estaré orgullosa de tener una madre fuerte, valiente, resiliente, amorosa y trabajadora como tú. Gracias por no soltarme nunca y siempre creer en mí. Espero ser un orgullo para ti siempre y nunca decepcionarte. Le doy gracias a la vida por permitirme haber logrado esto contigo presente. Eres la dedicatoria de esta tesis y de las futuras que realizaré.

A mi tía **Ada Ascencio Alvarez †** y mi abuela **Juanita Alvarez Coronado †** :

Las amo, las extraño. Les dedico este esfuerzo porque además de ser mis ángeles en el cielo también fueron mi motivación. Sé que siempre me cuidan y me guían. Quisiera poder compartir este logro con ustedes en vida, pero sé que están conmigo en todo momento.

A mi prima **Sarabi Rodas Ascencio:**

Te amo, eres mi hermana, mi sol, mi admiración. Te dedico este logro y me alegra poder tenerte y en un futuro compartir más logros contigo si Dios lo permite. Gracias por no dejarme sola y por siempre ser un hombro para llorar.

A mi novio **Andrés Rangel Cantú:**

Te adoro. Fuiste parte de este proceso al escucharme, al apoyarme, al aconsejarme y al estarme alentando a no rendirme. Gracias por estar para mí y por ayudarme a recordar que el descanso también es bueno. Gracias por distraerme en mis días libres y brindarme tu amor.

A mis amigas **Fernanda Valdés Valdés, Flavia Lugo Espinosa, Regina Sánchez Fragozo, Hanny Gutiérrez Ledezma, Wendolyn Treviño Monjaras**, y a mi amigo **Rodrigo Nieto Flores**:

Los quiero muchísimo. Gracias por haber estado durante momentos o durante todo el proceso en la realización de esta tesis. Por creer en mi y por recordarme mi capacidad de lograr las cosas.

Gracias por la cálida amistad que me brindaron, este trabajo también es para ustedes.

## ÍNDICE GENERAL

I.	RESÚMEN .....	xiii
II.	INTRODUCCIÓN .....	1
III.	OBJETIVOS.....	2
3.1.	Objetivo general .....	2
3.2.	Objetivos específicos .....	2
IV.	HIPOTESIS .....	2
V.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
5.1.	Endófitas.....	3
5.1.1.	Definición de endófitas .....	3
5.1.2.	Importancia de las endófitas en las plantas .....	3
5.1.3.	Endófitas en la agricultura.....	4
5.2.	Caracterización molecular de microorganismos .....	9
5.2.1.	ARNr 16S.....	9
5.2.2.	Metodología de la identificación por 16S ribosomal.....	13
5.2.3.	Secuencias alternativas para la identificación.....	16
5.3.	Características morfológicas y microbiología.....	17
5.3.1.	Morfología.....	19
5.3.2.	Medios de cultivo .....	20
5.4.	<i>Larrea tridentata</i> (gobernadora).....	24
5.4.1.	Características botánicas .....	24
5.4.2.	Distribución.....	25
5.4.3.	Importancia ecológica .....	25
5.4.4.	Importancia económica .....	26
5.4.5.	Mecanismos de adaptación .....	27
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	28
6.1.	Sitio de muestreo .....	28
6.2.	Preparación de medio de cultivo.....	28
6.3.	Obtención de endófitas a partir de las raíces de <i>Larrea tridentata</i> .....	29

6.4. Aislamiento de endófitas de <i>Larrea tridentata</i> .....	30
6.5. Criopreservación de las colonias aisladas .....	31
6.6. Obtención de ADN bacteriano por HotSHOT .....	31
6.6.1. Amplificación de fragmentos 16s ribosomal .....	32
6.6.2. Electroforesis de los productos de PCR .....	34
6.7. Secuenciación y análisis de las secuencias.....	34
VII. RESULTADOS Y DISCUSION.....	36
7.1. Aislamiento, cultivo bacteriano y morfología de las colonias .....	36
7.2. Extracción de ADN por método de <i>HotSHOT</i> , amplificación del ADN y visualización del gel de agarosa.....	37
7.3. Análisis bioinformático de las secuencias 16S .....	40
7.3.1. Visualización y edición de secuencias en SnapGene .....	40
7.3.2. Alineamiento múltiple en MAFFT y creación de secuencia consenso en EMBOSS Cons .....	40
7.3.3. Análisis de alineamientos en BLAST e investigación taxonómica en NCBI. ....	41
7.4. Bacterias identificadas .....	42
7.4.1. <i>Peribacillus frigiditolerans</i> .....	42
7.4.2. <i>Metabacillus idriensis</i> .....	42
7.4.3. <i>Sinorhizobium meliloti</i> .....	43
7.4.4. <i>Bacillus subtilis</i> .....	43
7.4.5. <i>Neobacillus niacini</i> .....	44
7.4.6. <i>Streptomyces rimosus</i> .....	44
7.4.7. <i>Streptomyces erumpens</i> .....	44
7.4.8. <i>Staphylococcus epidermis</i> .....	45
7.4.9. <i>Bacillus mojavensis</i> .....	46
VIII. CONCLUSIONES .....	47
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fitorremediación asistida por microorganismos. ....	6
<b>Figura 2.</b> Estructura secundaria de ARNr 16S. ....	12
<b>Figura 3.</b> Identificación bacteriana mediante ARNr 16S. ....	16
<b>Figura 4.</b> Morfología de las colonias en placas de agar. ....	20
<b>Figura 5</b> Curva de crecimiento bacteriano. ....	21
<b>Figura 6.</b> Preparación de medio de cultivo. ....	24
<b>Figura 7.</b> Distribución natural de la gobernadora ( <i>Larrea tridentata</i> ). ....	25
Figura 8. <i>Larrea tridentata</i> en estado silvestre. ....	27
<b>Figura 9.</b> Ubicación de la muestra. ....	28
<b>Figura 10.</b> Proceso de extracción de endófitas. ....	30
<b>Figura 11.</b> Proceso de las diluciones seriadas. ....	31
<b>Figura 12.</b> Diagrama de flujo general del análisis bioinformático. ....	35
<b>Figura 13.</b> Amplificación de ADN. ....	39
<b>Figura 14.</b> Secuencias mostradas en SnapGene. ....	40

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Parámetros de preparación de medios de cultivo utilizados .....	29
<b>Tabla 2.</b> Parámetros para la solución de Lisis Alcalina y Solución de Neutralización.....	32
<b>Tabla 3.</b> Secuencia de los cebadores 27F y 1429F (Campos et al., 2018).....	32
<b>Tabla 4.</b> Componentes de la reacción de PCR .....	33
<b>Tabla 5.</b> Condiciones de amplificación para los cebadores 27F Y 1429R.....	33
<b>Tabla 6.</b> Biodiversidad de las bacterias .....	36
<b>Tabla 7.</b> Características visibles de las colonias seleccionadas .....	37
<b>Tabla 8.</b> Microorganismos identificados en la base de datos del NCBI .....	41

## I. RESÚMEN

*Larrea tridentata* es un arbusto perenne capaz de sobrevivir a ambientes muy áridos. En este estudio se buscó identificar las bacterias endófitas que están presente en las raíces de *L. tridentata*. Para esto se aislaron directamente de las raíces previamente lavadas con solución de Etanol al 70% y NaCl al 2%, siendo el producto macerado con solución salina al 0.8%. Fueron sembradas por medio de diluciones seriadas en medios selectivos: LB con Agar, Agar nutritivo, R2A y R2A con NaCl al 1.5%. Se caracterizaron morfológicamente y se identificaron por técnicas de HotSHOT y PCR. Los productos obtenidos fueron visualizados posteriormente en un gel de electroforesis. Se mandaron secuenciar y se lograron identificar endófitas de géneros como *Peribacillus*, *Metabacillus*, *Sinorhizobium*, *Bacillus*, *Neobacillus*, *Staphylococcus* y *Streptomyces*. Estos géneros podrían estar relacionados en procesos como fijación del nitrógeno, tolerancia al estrés abiótico y producción de fitohormonas. Los resultados nos señalan que la microbiota que se asocia en la planta *L. tridentata* tiene un papel importante en su adaptación a ambientes con condiciones extremas. Este estudio aporta información relevante a futuros trabajos sobre interacción planta-microorganismos en ecosistemas similares.

## II. INTRODUCCIÓN

Las endófitas tienen un papel importante en las plantas. Su estudio ha logrado relacionar estos microorganismos con actividades fisiológicas de sus hospederas, como promover su crecimiento, regular la producción de fitohormonas, su resistencia a enfermedades y a la respuesta al estrés (Alexander et al., 2013). Gracias a esto, se han tomado como ventaja por los beneficios que ha logrado en la agricultura, al incrementar la producción de cultivos con una gran importancia económica (Pérez C et al., 2009).

Para la caracterización molecular se utilizó el gen ARNr 16S, el cual ya ha sido manejado ampliamente en estudios de taxonomía y filogenia (Chavez Huingo & Rivera Jacinto, 2023). Este fragmento ha sido de gran importancia para el estudio en cualquier sector, principalmente en el agrícola (Terán Salazar, 2024).

La morfología obtenida se basó en el medio de cultivo que se utilizó para las colonias, sin embargo, eso también puede depender de factores ambientales y de factores genéticos (Fernández Olmos et al., 2010). Los medios utilizados en este proyecto fueron LB con agar, agar nutritivo, R2A y R2A con NaCl al 1.5%.

La gobernadora (*Larrea tridentata*) es considerada uno de los componentes más importantes de las zonas áridas y semiáridas de México. Una de las actividades más destacadas de *L. tridentata* ha sido su actividad microbiana evaluada contra patógenos y fitopatógenos. (Arteaga et al., 2005). Juega un papel importante dentro de la economía de México por su uso en la medicina alternativa para el tratamiento estomacal, de riñones, vesícula, tratamiento para cicatrización y para prevenir infecciones (Aranda Ledesma et al., 2024).

### **III. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo general**

Lograr identificar y caracterizar las bacterias que están presentes en la raíz de *Larrea tridentata* (Gobernadora) mediante el uso de técnicas de microbiología y moleculares.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Aislar las bacterias a partir de las raíces de *Larrea tridentata* en condiciones estériles de laboratorio.
- Identificar morfológicamente las bacterias observando directamente las placas para lograr una caracterización inicial basada en características visuales
- Determinar la caracterización genética con el uso de herramientas moleculares
- Clasificar taxonómicamente las bacterias obtenidas a partir de las raíces de *Larrea tridentata*.

### **IV. HIPÓTESIS**

Existen bacterias endófitas en las raíces de *Larrea tridentata*, cuya presencia está asociada a la capacidad de adaptación y resistencia a enfermedades y ambientes áridos.

## V. REVISIÓN DE LITERATURA

### 5.1. Endófitas

#### 5.1.1. Definición de endófitas

El término “Endófitas” proviene del griego “*endo*” que significa dentro, y “*phyton*” que significa planta (Gonzales Torrico et al., 2024). Las endófitas son microorganismos, principalmente hongos y bacterias, que habitan en los tejidos de las plantas durante su ciclo de vida sin causarles daño (Leonardo, 2013). Se ha encontrado que en todas las plantas hay presencia de diversas endófitas, las cuales pueden ser detectadas particularmente en diversos compartimentos de la planta, como en sus espacios intracelulares o en tejidos vasculares (Doncel M, 2016). Uno de los principales sitios de presencia de estas bacterias es en los puntos de emergencia de las raíces, en donde han sido observadas en el córtex de la raíz primaria y en las capas celulares de las raíces laterales. Al entrar por las raíces de las plantas, éstas utilizan enzimas degradadoras de polímeros de la pared celular como exoglucanasas y endoglucanasas. Pueden entrar de manera intercelular e intracelular para invadir los tejidos centrales (Leonardo, 2012).

#### 5.1.2. Importancia de las endófitas en las plantas

El incremento de la productividad de los cultivos se le ha relacionado con la presencia de endófitos en los tejidos de la planta. Estos microorganismos desempeñan un papel crucial en las actividades fisiológicas de sus hospederas influyendo en su resistencia a enfermedades y respuesta al estrés. También ayudan con la capacidad de fijación de nitrógeno (Alexander et al., 2013), entre otros procesos bioquímicos. La relación planta-endófitas se basa en la protección por parte del microorganismo en casos de estrés bióticos y abióticos en la síntesis de biomoléculas, mientras que la planta brinda hábitat para el desarrollo y reproducción dentro de los tejidos sin comprometer los recursos del hospedador en su crecimiento (Alvis Garcés, 2024). El crecimiento de la planta es

estimulado por el movimiento de nutrientes del suelo que brindan las bacterias gracias a la producción de reguladores de crecimiento, la protección hacia los fitopatógenos ya sea por su inhibición o por su control de estos. Estudios recientes, en angiospermas y gimnospermas, han demostrado que las endófitas se asocian a tejidos de plantas leñosas, las cuales producen agentes antiinflamatorios y metabolitos como antibióticos y metabolitos secundarios, incluyendo promotores de crecimiento vegetal, agentes antiinflamatorios, compuestos antitumorales y de control biológico (Leonardo, 2013).

La manera en la que las bacterias endófitas se distribuyen dentro de su hospedador se basa en la interacción de organismos como nematodos parásitos asociados a la planta, o por características propias de la hospedera (Leonardo, 2012). Aunque las endófitas suelen invadir por las raíces, estas pueden desplazarse a las partes aéreas de las plantas como las hojas, los tallos y las flores. Se conocen pocas las que tienen la capacidad de colonizar estas zonas por los requisitos fisiológicos necesarios, por lo que las bacterias localizadas en estos tejidos están adaptadas al nicho endófito (Alvis Garcés, 2024).

### **5.1.3. Endófitas en la agricultura**

Una alternativa de la agricultura tradicional es la agricultura sostenible (o bio-intensiva). Este tipo de agricultura combina los principios de la agricultura agroecológica, en donde el suelo tiene buena materia orgánica por lo que se encuentran en abundancia diversos microorganismos, como los endófitos (Gonzales Torrico et al., 2024).

El ser humano ha tomado ventaja en el uso de estos microorganismos, tomando en cuenta que ayudan al crecimiento de la planta, se han utilizado a beneficio de incrementar la producción de cultivos con importancia económica utilizándolos como fertilizantes. Esto ha logrado un

incremento en la producción. Cabe resaltar que el uso de estos organismos no daña ni contaminan al medio ambiente, lo cual se considera una gran alternativa (Pérez C et al., 2009).

Las endófitas desempeñan un papel importante en el desarrollo de plantas, la fitorremediación, la solubilización de fosfato, modulación del metabolismo de las plantas y señalización de fitohormonas que conduce a la adaptación del estrés biótico y abiótico ambiental (Castro del Ángel & Hernandez Castillo, 2021).

#### 5.1.3.1. Beneficios en las plantas

Estos microorganismos están tomando un papel protagónico en la agricultura gracias a la estimulación que dan al crecimiento de la planta por medio de la fijación y absorción de nutrientes, principalmente del fosforo y del nitrógeno. También, fortalecen la resistencia a sequias, salinidad y a patógenos (Gonzales Torrico et al., 2024).

Hay evidencia que resalta que las plantas y las endófitas pueden comunicarse entre sí, lo cual favorece la simbiosis. Señales químicas que producen las plantas pueden llegar a activar la expresión genética de endófitas. Además, la presencia de estas demuestra el aumento de capacidades fotosintéticas de las hospedantes, así como la relación hídrica.

#### 5.1.3.2. Fitorremediación

La fitorremediación es una función en donde trabajan en conjunto planta y microorganismos de la rizosfera (Delgadillo López & González Ramírez, 2011).

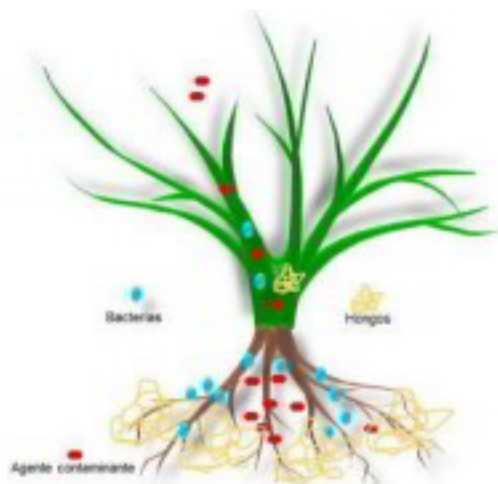
Estudios recientes han encontrado endófitas de *Populus* en técnicas de fitorremediación y el uso de *Burkholderia cepacia* G4 para incrementar la tolerancia de tolueno en las plantas. También han estado presentes *Methylobacterium populum* en la biodegradación de: 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina (HMX) y octahidro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine

(RDX), los cuales son contaminantes explosivos con presencia de un grupo nitro, que al liberarse al medio ambiente presentan riesgos tóxicos para el medio ambiente (Van et al., 2004).

Los suelos de todo el mundo están contaminados por la presencia de estos contaminantes, ya sea por actividades militares o por operaciones de fabricación. Es por ello por lo que se utilizan algunas especies de bacterias para la degradación de estos compuestos tóxicos, las cuales pueden eliminar o neutralizar los contaminantes. (Delgadillo López & González Ramírez, 2011).

Se demostró que *H. Frisingense* regula de manera positiva los receptores de etileno, lo cual conduce al crecimiento de raíces. También se sabe que produce ácido indolacético, lo que mantiene un equilibrio complejo entre el etileno y el IAA (Pérez C et al., 2009).

En la Figura 1. se muestra la manera en la que trabajan los microorganismos en la fitorremediación.



**Figura 1.** Fitorremediación asistida por microorganismos.

Fuente: Mendarte-Alquisira et al., 2021.

En investigaciones, se ha usado una cepa de *Burkholderia* conocida como G4, para descomponer tricloroetileno al transferirle el plásmido TOM (tolueno orto-monooxigenasa) en especies de árboles como álamos, sauces, eucaliptos o coníferas, sin embargo, no ayudó a las plantas a eliminar este químico, pero si a transpirar menos TCE (Tricloroetileno) (Kang et al., 2012).

#### 5.1.3.3. Endófitas en los cultivos

#### 5.1.3.3.1. Maíz

El maíz es el segundo cultivo alimenticio más importante en cuanto a fuente de energía y contenido de proteína en la nutrición del ser humano. Las endófitas tienen ventajas sobre otras poblaciones que colonizan de forma epífita. En el maíz, estos microorganismos tienen relación con el incremento de germinación, la altura de la planta, biomasa radical y aérea que va a mejorar el rendimiento del cultivo. También promueve la tolerancia al estrés por sequía, intervenido por el incremento de la biomasa de raíz, lo que mejora la absorción de agua y de nutrientes. Dentro de los géneros de bacterias que alberga este cultivo se encuentran principalmente: *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas geniculata*, *Pseudomonas hibiscola* y *Sinorhizobium meliloti* (Sánchez-Bautista et al., 2018).

#### 5.1.3.3.2. Frijol

La pudrición de la raíz y marchitez del frijol se da debido a hongos como *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*. La bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* induce la defensa bacteriana y resistencia para poder combatir estos patógenos. De manera indirecta, las bacterias endofíticas mejoran la salud de los cultivos al atacar las plagas y los patógenos por medio de enzimas hidrolíticas, limitación de nutrientes y cebar las defensas. Para esto, es necesario que las plantas colonicen la endosfera posterior a colonizar las raíces. La inducción de resistencia está asociada a las proteínas que tienen relación con la patogenia, como las proteínas antifúngicas que incluyen defensinas, tioninas, proteínas similares a la osmotina, a la taumatina, quitinasas, glucanasas, oxalato oxidasa y proteínas de transferencia de lípidos (Castro del Ángel & Hernandez Castillo, 2021).

#### 5.1.3.3.3. Yuca

Tienen efecto promotor de crecimiento en este cultivo de importancia económica. Participa principalmente *G. Diazotrophicus*, *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus subtilis* beneficiando el crecimiento, rendimiento y calidad de los tubérculos. Debido a que la yuca se considera un cultivo resistente a suelos pobres en nutrientes, son estos microorganismos los que incrementan la capacidad de desarrollo en este tipo de ambientes (González Rodríguez et al., 2015).

#### 5.1.3.3.4. Plátano

Las *Pseudomonas* y *Bacillus* participan como agentes de control biológico hacia *R. Similis* en condiciones de invernadero, generando resistencia a estos microorganismos para evitar que estos parásitos se alimenten de las raíces y cormos de este cultivo (Martinez Martinez, 2003).

#### 5.1.3.3.5 Trigo

A partir de este tipo de especies de plantas se han identificado especies de bacterias diazotróficas que tienen la capacidad de fijar el nitrógeno, reduciendo así el uso de biofertilizantes químicos. Como consecuencia, se utilizan menos cantidades de fertilizantes fosfatados los cuales son costosos y repercuten de manera negativa al medio ambiente (Pérez Cordero et al., 2014).

#### 5.1.3.4. Endófitas en productos comerciales

##### 5.1.3.4.1. ENDO-RICE *Inoculante*

Formulación líquida de una cepa pura de *Herbaspirillum* sobre un soporte acuoso a concentración de más de 100 millones de bacterias por mililitro. Esta cepa ha sido seleccionada por ser una promotora eficiente del crecimiento en plantas de arroz y haber mostrado efectos positivos en la producción.

*Hesbasírium* ejerce sobre el arroz a través de una serie de mecanismos, entre los que destaca la secreción de fitohormonas que estimulan al cultivo, permitiendo así un crecimiento mayor y un aumento en la capacidad de absorción de nutrientes y agua (Lage y Cía. S.A., 2010).

#### 5.1.3.4.2. BIO-N

Fertilizante a base de microorganismos aislados de la planta de talahib. Estas bacterias (*Herbaspirillum*) convierten el nitrógeno atmosférico para que los cultivos de arroz y maíz puedan utilizarlo, y mejore el crecimiento de brotes y el desarrollo de raíces (Biotech UPLB, 2023).

#### 5.1.3.4.3. NITROFIX

Biofertilizante a base de *Azospirillum brasilense*, el cual promueve el crecimiento y la nutrición vegetal a través de la fijación del nitrógeno. Se ha visto efectos positivos en cultivos como sorgo, maíz, caña de azúcar, arroz, girasol, tomate, pimentón, leguminosas, plátano, entre otros cultivos. También participa en la restauración de suelos degradados (Osorio, 2020).

#### 5.1.3.4.4. BIOESTIMULANTE

A base de *Bacillus megaterium*, se utiliza como agente promotor del cultivo. Contribuye a la fijación de nitrógeno. También sintetiza hormonas como auxinas, que promueve el crecimiento de las raíces y aumenta la absorción de nutrientes. Produce compuestos antimicrobianos y enzimas que inhiben el crecimiento de patógenos como hongos y bacterias.

Al introducir esta cepa en la rizosfera, promueve su colonización (Yakhin et al., 2017)

#### 5. 1.3.5. Especies reportadas como endófitas comunes

Particularmente *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* y *Pseudomonas geniculata* como especies muy comunes. Especies de *Bacillus firmus*, *Pseudomonas hibiscola* y *Sinorhizobium meliloti* como comunes. Y *Acinetobacter soli*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Burkholderia gladioli* como poco comunes (Sánchez-Bautista et al., 2018).

## **5.2. Caracterización molecular de microorganismos**

### **5.2.1. ARNr 16S**

#### 5.2.1.1. Qué es

El ARNr 16S es un polirribonucleótido que se ha utilizado ampliamente para estudios de filogenia y taxonomía. Tiene aproximadamente 1500 nucleótidos y es codificado por el gen *rrs*. Siendo una cadena sencilla, el ARNr 16S se pliega en una estructura secundaria alternando regiones (Chavez Huingo & Rivera Jacinto, 2023).

Dado que proviene de las subunidades pequeñas de los ribosomas se utiliza acrónimo SSU (small subunit), estos son altamente conservados y presentan regiones comunes a los demás organismos, pero con variaciones concentradas en zonas específicas. Fue propuesta por Carl Woese en la década de 1970 (Rodicio & Mendoza, 2004).

De manera general, para que sea considerada como marcador molecular es necesario que cumpla con las siguientes características

- i. Presentar variabilidad y divergencia genética a nivel especie.
- ii. Tener sitios conservados adyacentes que faciliten el diseño de iniciadores universales, para la amplificación por medio de PCR.
- iii. Una longitud apropiada para su fácil extracción y secuenciación.

(Valenzuela-González et al., 2015).

La disposición de identificar y clasificar patógenos utilizando ARNr 16S ha sido de gran importancia en cualquier sector, principalmente en el agrícola, en donde la identificación temprana significa la diferencia entre pérdidas económicas o control de estos patógenos. Aunque existan características bioquímicas y fenotípicas, éstas no siempre ofrecen especificidad necesaria para un manejo efectivo de brotes (Terán Salazar, 2024).

#### 5.2.1.2. Qué fragmento se utiliza y qué características tiene

Se usan sus regiones hipervariables, ya sea para la identificación o clasificación de cultivos puros aislados, así como también estimar su diversidad bacteriana en muestras donde no se presenta un

cultivo mediante un enfoque metagenómico. Su principio se basa en la secuenciación de este fragmento, de marcadores específicos filogenéticos o de genes funcionales secuenciados, también conocido como metabarcoding (Chavez Huingo & Rivera Jacinto, 2023).

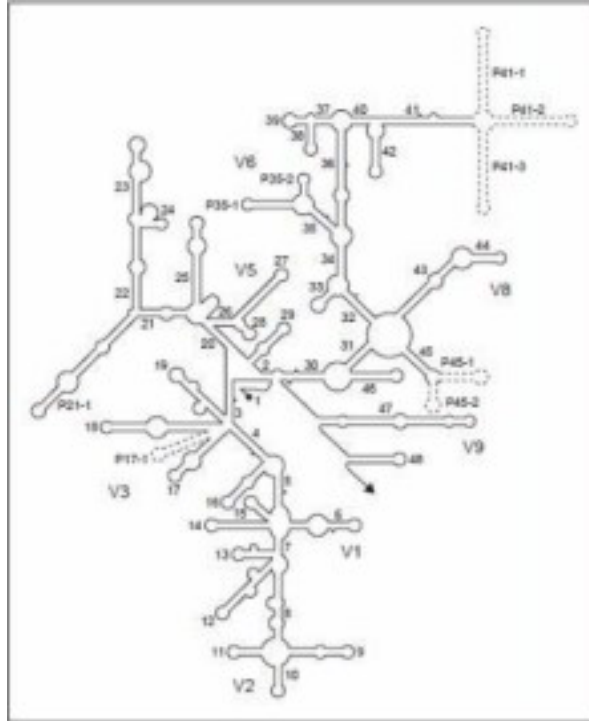
#### 5.2.1.2.1. Regiones hipervariables

Gracias a las técnicas de secuenciación masiva, se incrementaron los reportes acerca de la caracterización de bacterias con el gen ARNr 16S como marcador. No obstante, las secuencias corresponden a diferentes regiones y son parciales. Es por las discrepancias que se fomentó a estudiar distintas regiones variables, así como del gen completo (Valenzuela-González et al., 2015).

En un análisis de poblaciones microbianas de sedimentos, se empleó la región V3 como herramienta taxonómica en lugar de la secuencia completa, se pudo observar que la diversidad estimada fue menor y el número de OTU (unidades taxonómicas operativas), que no pudieron ser identificadas, aumentó de 8.6% a 34.6% (Miller et al., 2013).

En otro estudio, Huse et al. (2008), se analizaron muestras muy disímiles como de intestino humano y de chimeneas submarinas, demostrando que cada región del gen ARNr 16S aporta diferentes valores de diversidad microbiana: la región V3 registró 42 taxones, mientras que la región V6 registró 26 taxones.

En la Figura 2. podemos observar la estructura del gen ARNr 16S, hélices universales enumeradas del 1-48 en orden de aparición partiendo del extremo 5'. Las hélices específicas en procariontes son indicadas con P(a, b), donde "a" es el número de hélice universal precedente y "b" el número de serie. Las regiones variables se designan de V1-V9 (V4 exclusiva de eucariontes). Líneas discontinuas son regiones presentes en un número limitado de estructuras (Fernández Olmos et al., 2010).



**Figura 2.** Estructura secundaria de ARNr 16S.

Fuente: Fernández Olmos et al., 2010.

### 5.2.1.3. Qué organismos puede identificar

Para la identificación bacteriana, es importante en las bacterias con perfiles fenotípicos inusuales, bacterias de lento crecimiento y bacterias no cultivables. El mayor número de especies que se han descubierto han sido de géneros *Mycobacterium* y *Nocardia*. Las especies más caracterizadas han sido *Streptococcus sinensis*, *Laribacter hongkongensis*, *Clostridium hathewayi* y *Borrelia speilmanii* (Woo et al., 2008).

Actualmente la mayor parte de las bacterias pueden identificarse con facilidad por técnicas convencionales de microbiología, aislando el agente patógeno y basándose en características fenotípicas. Sin embargo, hay situaciones en donde se necesitará de mucho tiempo, y simplemente resultará difícil o imposible. Dentro de estas circunstancias el análisis del ARNr 16S presenta una ventaja de tiempo como de especificidad. El análisis de esta secuencia en grupos filogenéticos distintos ha revelado un hecho de gran importancia: una o más secuencias características presentes

se le denominan oligonucleótidos firma. Esto consta de una secuencia corta específica que aparece en la mayoría, sino es que, en todos los miembros de un grupo filogenético. Es gracias a esto que pueden utilizarse los oligonucleótidos firma para ubicar a una bacteria dentro de un grupo (Rodicio & Mendoza, 2004).

#### 5.2.1.4. Por qué se usa para clasificar organismos

Gracias a estos estudios se originó la división de procariontes en dos grupos: Eubacteria y Archeobacteria. Es desde su propuesta cuando el análisis 16S ha sido utilizado para establecer relaciones filogenéticas, causando impacto en la perspectiva de la evolución y, como consecuencia, en la clasificación e identificación de bacterias (Rodicio & Mendoza, 2004).

Conforme el paso del tiempo y dando entrada a nuevas investigaciones, se ha utilizado la secuenciación del gen ARNr 16S por ser una región conservada y establecer una relación filogenética entre las bacterias (Rodicio & Mendoza, 2004) incluso en perfiles fenotípicos que han variado a través del tiempo (Terán Salazar, 2024).

En la aplicación de estas metodologías y con ayuda de bases bioinformáticas como el NCBI, comparando las secuencias de una región, se ha logrado obtener una mayor especificidad en géneros y especies de bacterias. Aunque esta técnica molecular ha sido de gran aporte como complemento en estudios de filogenética y taxonomía, no ha sido explotada lo suficiente (Terán Salazar, 2024).

#### **5.2.2. Metodología de la identificación por 16S ribosomal**

Esta secuencia presenta características, por las cuales Woo la consideraba cronometro molecular definitivo (Woo et al., 2008), como su presencia en todas las bacterias actuales, siendo así una diana universal para identificación bacteriana. Su función ha permanecido constante junto con su

estructura durante un tiempo prolongado. Su tamaño largo (de 1500 nucleótidos) minimiza fluctuaciones estadísticas (Terán Salazar, 2024).

Este método molecular de identificación mediante la secuencia ADNr 16S consta de 3 etapas: amplificación del gen, determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón, y su análisis (Rodicio & Mendoza, 2004).

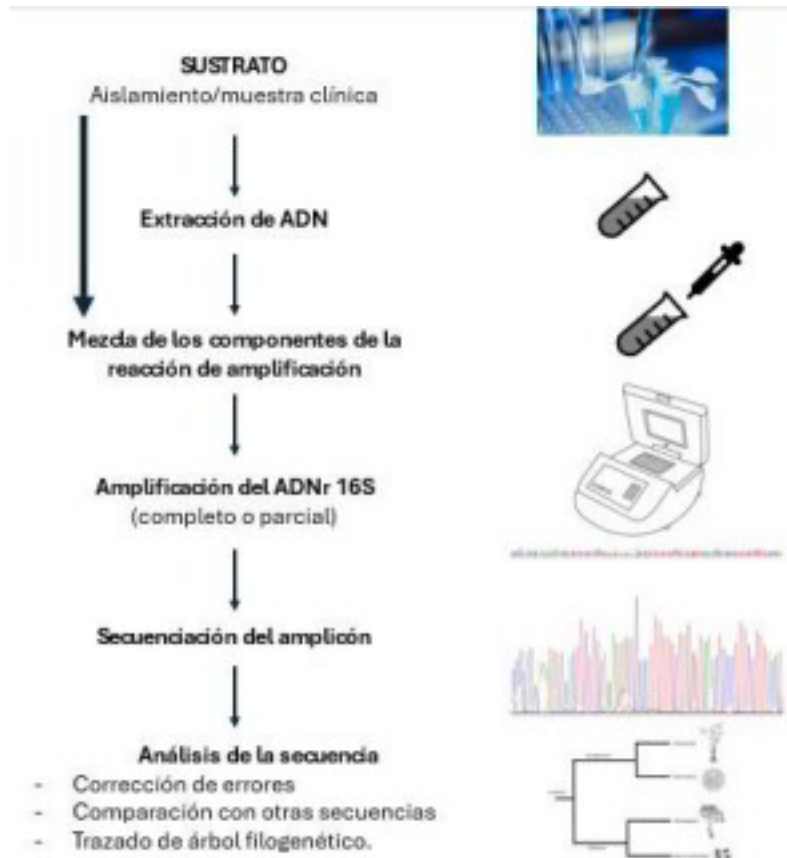
- i. Su amplificación se da en un termociclador por medio de PCR, se utiliza de sustrato al ADN purificado a partir de un cultivo puro del microorganismo a identificar. También la amplificación puede obtenerse a partir de la colonia aislada o del cultivo líquido. Se utilizan protocolos generales para la extracción de ADN bacteriano. Cuando buscamos amplificar el ADNr 16S completo se utilizan iniciadores diseñados con base a secuencias ya conservadas cerca de los extremos 5' y 3' del gen. Sin embargo, se ha descubierto que para que una identificación sea precisa no es necesaria una amplificación y posteriormente secuenciación del ADNr 16S completo. En estas circunstancias se utilizan oligonucleótidos que permiten la amplificación de fragmentos de menor tamaño, de preferencia los 500 pares de bases al extremo 5' del gen. De cualquier manera, se recomienda comprobar mediante electroforesis la presencia del fragmento, amplicón, del tamaño necesario (Rodicio & Mendoza, 2004).
- ii. En la determinación de la secuencia se realizan reacciones de secuenciación y análisis de los productos obtenidos por electroforesis. Se utiliza la secuenciación cíclica que utiliza un iniciador único por reacción y terminadores que interrumpirán la síntesis de forma aleatoria, lo cual facilitara la detección de fragmentos interrumpidos posteriormente. Se generan alrededor de 500 a 900 bases en un secuenciador automático dependiendo del capilar utilizado en la electroforesis. es por ello por lo que

para la obtención de la secuencia definitiva se requiere de electroferogramas y la alineación de la cadena forward con la reverse (Rodicio & Mendoza, 2004).

- iii. Durante el análisis de la secuencia se compara la secuencia con las secuencias de la base de datos, una de las más accesibles es NCBI (Rodicio & Mendoza, 2004).

También ha surgido una plataforma comercial llamada PLEX-ID (Abbott) que basa su metodología en el análisis directo y la identificación de microorganismos sobre muestras. Se ha tenido buenos resultados utilizando esta técnica incluso en bacteriemias polimicrobianas. Podría utilizarse como método cuantitativo (Bou et al., 2011).

Como se muestra en la Figura 3., el proceso de identificación bacteriana empieza desde el aislamiento de la muestra, extrayendo el ADN que queremos trabajar, se procede a agregar los reactivos necesarios para la amplificación, se amplifica, se analiza y se procede a hacer un árbol filogenético.



**Figura 3.** Identificación bacteriana mediante ARNr 16S.

Fuente: Rodicio & Mendoza, 2004.

### 5.2.3. Secuencias alternativas para la identificación

Ningún gen como ARNr 16S ha mostrado una amplia aplicación en la mayoría de los grupos taxonómicos. Si lo que deseamos es identificar una bacteria desconocida sin un conocimiento previo, el ARNr 16S es la mejor opción. Se considera que este gen es de los más certeros, sólidos y reproducibles, resolviendo el 90% aproximadamente de las identificaciones (Rodicio & Mendoza, 2004).

#### 5.2.3.1. REI 16S 23S

La región espaciadora intergénica, también conocida como REI, de los genes 16S y 23S también han sido utilizados con fines de identificación. Consta de 660 nucleótidos. Tiene variación dentro de varias especies y cepas de micoplasmas a diferencia del gen ARNr 16S (Cháidez Ibarra, 2024). El gen 23S ha sido utilizado en la detección de resistencia de agentes antimicrobianos que se asocian a mutaciones en una posición específica. Estas secuencias se distribuyen alternando segmentos altamente conservados y variables en el locus del gen. Es por esto, que este gen podría ser utilizado como una estrategia nueva de identificación de diversos géneros de bacterias por su capacidad de discriminar a través de la secuenciación (Cháidez Ibarra, 2024).

#### 5.2.3.2. Gen *rpoB*

Se utiliza mayormente en géneros *Mycobacterium*, como *Mycobacterium tuberculosis sensu stricto* causante de la tuberculosis. Este gen es altamente polimórfico, y sus mutaciones varían significativamente en cuanto al linaje microbiano (Orjuela Rodríguez Marcela, 2023).

Este gen codifica la subunidad beta de la ARN polimerasa, surge como un gen candidato al análisis filogenético e identificación de las bacterias estudiadas en aislamientos con una relación estrecha. Ha contribuido a refinar el análisis de bacterias, permitiendo el seguimiento de las mutaciones asociadas a la resistencia a la rifampicina. Esta secuencia tiene una eficiencia en el valor de hibridación ADN-ARN y en la identidad media de nucleótidos cuando se han relacionado taxonómicamente. Recientemente, se han desarrollado técnicas de identificación que van dirigidas al fragmento entre las posiciones 2300 y 3300 del gen *rpoB*, por los que se espera una alta utilidad en su uso para el descubrimiento de nuevas especies de bacterias (Bou et al., 2011).

### **5.3. Características morfológicas y microbiología**

Los microorganismos forman parte esencial de la vida en el planeta. Para tener comprensión sobre la función de los microorganismos en los nichos específicos es necesario identificar y cuantificar.

Detectar estos microorganismos permite conocer sobre la diversidad de la población en la muestra analizada. Además, este conocimiento puede resultar en la explotación de cepas o de metabolitos microbianos en procesos de biotecnología.

Al querer analizar una especie, es necesario saber el contexto ambiental en el que se encuentra, refiriéndose a que hay especies que coexisten en lugar y tiempo (consorcio). El crecimiento celular forma poblaciones, las cuales al estar metabólicamente relacionadas van a denominarse gremios, y su conjunto de ellas forman comunidades microbianas. Por lo tanto, las comunidades microbianas son poblaciones de células de diversas especies que interactúan entre sí, desarrollando actividades funcionales tanto para el interior de la comunidad como para su hospedero (De la Cruz Leyva & Zamudio Maya, 2014).

El análisis de estas comunidades nos permite saber sobre las funciones positivas o negativas de las poblaciones que la conforman.

La identificación y caracterización de cepas que se asocian a un cultivo son el primer paso para el estudio de estas mismas. Asignar nombres a las bacterias tiene como fundamento la taxonomía, ciencia que clasifica biológicamente y agrupa a los microorganismos según sus afinidades. Se utilizan caracteres como la morfología, fisiología, biología molecular, genética, entre otros. Principalmente se utilizan dos esquemas de clasificación: la fenotípica, en donde se toman en cuenta las características observables, y la filogenética, en donde tomamos en cuenta la relación evolutiva ancestral (Gobernado & López-Hontangas, 2003).

Los caracteres tomados en cuenta para la caracterización fenotípica abordan desde el tamaño, forma, elevación, color márgenes, textura, opacidad. Esto también se fundamenta en el comportamiento de estas bacterias en los medios de cultivo (Gobernado & López-Hontangas, 2003).

Existen bacterias que bajo condiciones son capaces de tener pigmentos que caracterizan su especie, género o familia. En general las especies del género *Bacillus* no contienen pigmentos. Algunas cepas color rosa, amarillo, naranja, café o negro suelen ser asociadas con *B. Subtilis*. Estos pigmentos suelen ser consecuencia de presencia de melaninas, las cuales dan pigmentos cafés y negros. En medios de cultivos específicos suele haber incluso hasta 5 pigmentos diferentes no relacionados con la melanina, sino con la oxidación del manganeso (Gómez Martin, 2007).

### **5.3.1. Morfología**

Las características morfológicas de una colonia de bacterias van a depender del medio de cultivo en el que se desarrollen, pero también de factores ambientales y factores genéticos (Fernández Olmos et al., 2010).

Su forma puede ser circular (*Staphylococcus*), filamentosa o irregular (*Bacillus*). Sus bordes se clasifican en ondulados (*Bacillus*), lisos (*E. Coli*, *Proteus vulgaris*), o filamentosos (*Yersinia pestis*). La colonia puede presentar elevación plana, convexa, umbilicada (*S. pneumoniae*). Pueden tornarse de color verde (*P. aeruginosa*), amarillo (*S. aureus*), gris (*N. meningitidis*) (Caycedo Lozano et al., 2021).

En la Figura 4. se muestran algunos datos a considerar para la identificación morfológica de las colonias de bacterias que aislamos en medios de cultivos sólidos.



**Figura 4.** Morfología de las colonias en placas de agar.

Fuente: Ramírez Munguía, 2017

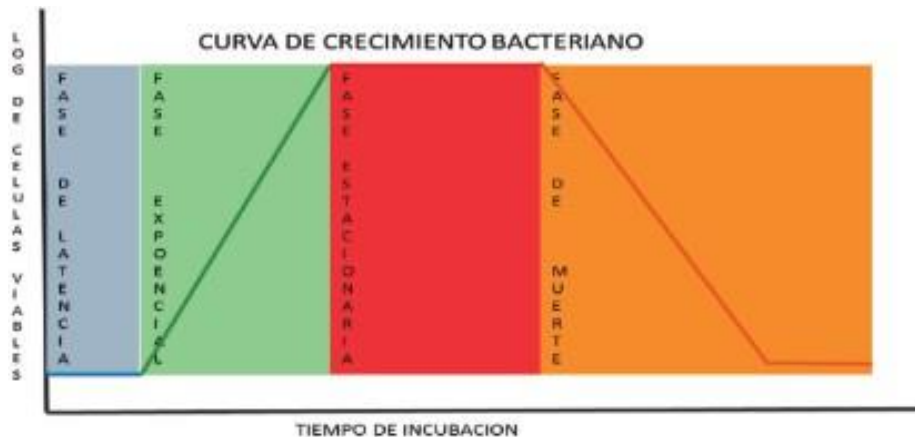
### 5.3.2. Medios de cultivo

El gran avance en el campo de la microbiología se debe a la observación de organismos macroscópicos que ocurren, los cuales se dan por microorganismos. Para descifrar estos microorganismos se ha ido descubriendo la optimización de condiciones para el cultivo de estos. Louis Pasteur en 1860 creó el primer medio de cultivo artificial líquido, resaltando la importancia de los nutrientes necesarios, los cuales debían ser provistos por este medio para su aislamiento. Sin embargo, Koch desarrolló el primer medio de cultivo sólido, en donde se lograba observar el crecimiento bacteriano (Gómez Martín, 2007).

El agar es el principal agente gelificante utilizado en medios de cultivo sólidos. Sin embargo, debemos tener en cuenta que algunas bacterias no crecen debido a su sensibilidad al oxígeno.

Los medios de cultivo deben de tener una serie de condiciones para que las bacterias puedan permanecer vivas y continúen su desarrollo, esto se resume a: agua, una fuente de carbono y de nitrógeno, y algunas sales minerales.

Existen diversos tipos de medio. Aquellos que permiten que una gran variedad de microorganismos crezca son conocidos como **medios generales**. Los medios que favorecen el crecimiento de determinados microorganismos sin inhibir el crecimiento de los demás, son conocidos como **medios de enriquecimiento**. Los **medios selectivos** inhiben el crecimiento de los demás microorganismos y se centra en el crecimiento de un microorganismo determinado. Y los **medios diferenciales** son los que se agregan propiedades de un determinado microorganismo (Garboza et al., 2011). En la Figura 5. podemos analizar las etapas de un crecimiento bacteriano.



**Figura 5** Curva de crecimiento bacteriano.

Fuente: Caycedo Lozano et al., 2021.

#### 5.3.1.1. Medio LB.

Conocido como medio Luria-Bertani, o caldo de Lisogenia (Garboza et al., 2011). Fue creado por Giuseppe Bertani. Contiene extracto de levadura que proporcionaran los nutrientes necesarios para que los microorganismos tengan un desarrollo óptimo. El cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico. También tiene triptona que es usada para proporcionar aminoácidos esenciales, como

péptidos o peptonas, a las bacterias que están en desarrollo. De igual manera contiene dextrosa, siendo esta una fuente de carbohidratos para obtener la energía y proporcionar el crecimiento de organismos aeróbicos y de organismos anaeróbicos.

Es el medio más utilizado para cultivar bacterias como *E. Coli* y otras especies por su alta presencia en nutrientes que permite en crecimiento de un gran número de cepas variadas (Garboza et al., 2011). Se utiliza ampliamente en áreas de microbiología molecular para preparar DNA plasmídico y proteínas recombinantes.

Es uno de los medios más comunes para mantener y cultivar cepas recombinantes de *E. Coli*, *Salmonella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* (Macwilliams & Liao, 2016).

#### 5.3.1.2. Medio R2A.

Fue desarrollado por Reasoner y Geldreich para el cultivo de bacterias provenientes de aguas tratadas. Es un medio que contiene bajas cantidades de nutrientes que, al asociarse a temperaturas bajas, beneficia la recuperación de bacterias estresadas y bacterias con tolerancia al cloro (*Pseudomonas*, *E. Coli*, *B. Subtilis*, *S. Aureus*, etc.). Al ser un medio de cultivo mínimamente nutritivo, se obtienen colonias de un tamaño menor (Garboza et al., 2011).

Contiene peptona proteasa e hidrolizado de caseína que brindan nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos para el crecimiento. Contiene dextrosa como carbohidrato fermentable, almidón para absorber productos tóxicos metabólicos y piruvato de sodio para la recuperación de células estresadas. Para equilibrar el pH se utiliza el fosfato dipotásico (NOM-201-SSA1-2015).

Este medio es recomendado para aislar bacterias heterótrofas aeróbicas y facultativas: *Estafilococo áureo*, *E. Coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* (Cherwell, 2020).

#### 5.3.1.3 Medio TSA

El agar de triptona y soya está compuesto de triptona, peptona de soya, cloruro de sodio y agar. Tiene un alto contenido nutritivo perfecto para microorganismos demandantes o no demandantes. El medio por sí solo es útil para cultivar cepas puras y mantenerlas viables, sin embargo, al combinarse con antibióticos resulta útil para aislar microorganismos anaerobios facultativos. Es utilizado en el diagnóstico de *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes*.

Para un buen desarrollo de bacterias son necesarios los aportes energéticos como los aminoácidos, las vitaminas, bases púricas y las bases pirimidinas. De tal forma, la triptona y la peptona de soya van a brindar estos nutrientes permitiendo un desarrollo pleno. Por otra parte, al agregar antibióticos, se convierte en un medio selectivo. Al agregarle extracto de levadura favorece el aislamiento de bacterias del género *Listeria*, mientras que al agregar cistina telurito es ideal para *Corynebacterium diphtheriae* (Ochoa Agudelo & Osorio Tobón, 2024).

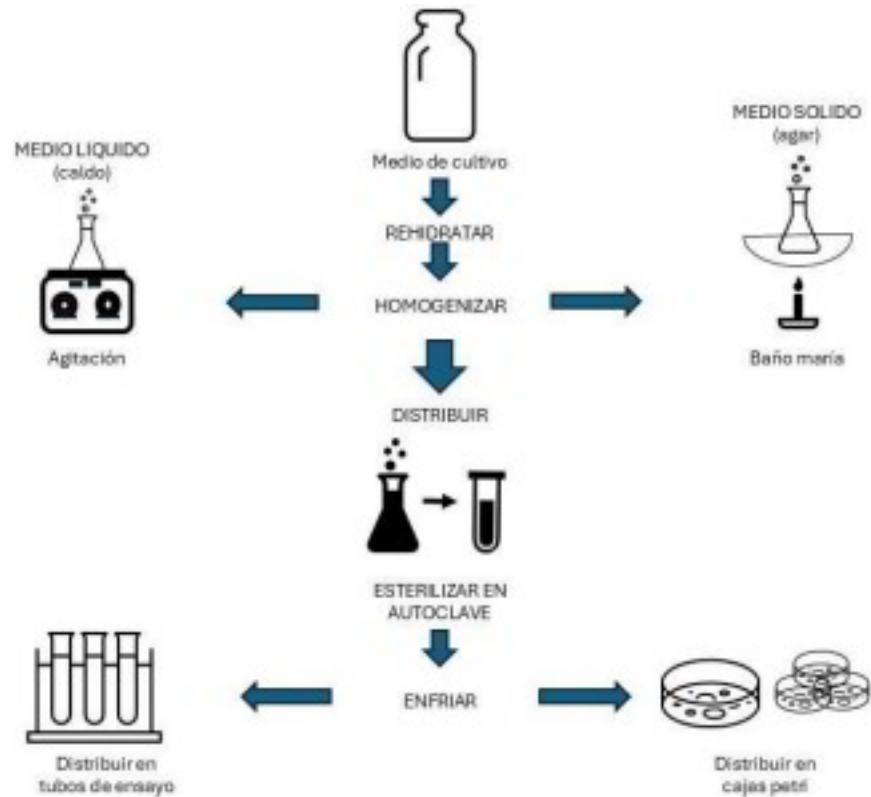
En este medio tienden a crecer especies exigentes como *Brucella*, *Corynebacterium*, *Listeria*, *Neisseria* y *Vibrio* (Caycedo Lozano et al., 2021).

#### 5.3.1.4. Agar nutritivo

Se usa para el análisis de alimentos, aguas, entre otros procedimientos sanitarios. Es un medio de cultivo no selectivo en donde la pleuripeptona y el extracto de carne se consideran la fuente de carbono, de nitrógeno y contribuyen a dar nutrientes para un buen desarrollo de las bacterias. Al igual que en los medios anteriores, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. Se utiliza agar como agente solidificante. Para microorganismos exigentes de nutrientes se puede suplementar con sangre ovina desfibrinada esterilizada (Rodríguez et al., 2024).

Este tipo de medio es adecuado para el crecimiento de *Salmonella*, *Pseudomonas*, *E. Coli*, *Yersinia*, *Shingella* (Biokar, 2022).

En la Figura 6. se observa de forma general la preparación de un medio de cultivo para tubos de ensayo y cajas Petri.



**Figura 6.** Preparación de medio de cultivo.

Fuente: Garboza et al., 2011.

#### **5.4. *Larrea tridentata* (gobernadora)**

##### **5.4.1. Características botánicas**

*Larrea tridentata* es un arbusto perenne perteneciente a la familia *Zygophyllaceae*. Llega a medir de 1 a 3 metros de altura, es ramificado y nudoso. Tiene hojas brillantes que son opuestas con dos foliolos asimétricos de 1cm. Sus hojas presentan una capa gruesa de resina secretada por una

epidermis glandular de estípulas. Presenta un tallo leñoso, inerme y nudoso. Tiene flores completas solitarias en las zonas axilares con cinco pétalos amarillos. Tiene un fruto en forma ovoide con pelos blancos, sedoso, que se torna café-rojizo con el paso del tiempo. Su semilla es café-negra, curvadas. Embrión en los cotiledones. Su raíz presenta sistema radical superficial de poca profundidad, llega a alcanzar gran distancia ocupando casi el total de espacio entre un arbusto y otro (Arteaga et al., 2005).

#### **5.4.2. Distribución**

Su distribución es abundante al norte de México y sur de Estados Unidos de América, abarcando estados de Baja California, Baja California Sur, Coahuila, Chihuahua, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Nuevo León, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas y Zacatecas (Arteaga et al., 2005), presente principalmente en zonas áridas y semiáridas. En la Figura 7. se observa la distribución geográfica de la gobernadora al norte de México y sur de Estados Unidos de América.



**Figura 7.** Distribución natural de la gobernadora (*Larrea tridentata*).

#### **5.4.3. Importancia ecológica**

La gobernadora es considerada el componente principal de la vegetación árida y semiárida del país (Arteaga et al., 2005). Tiene un potencial como producto de control de enfermedades en los cultivos que podría utilizarse en lugares donde abunda, cuidando no dañar las poblaciones de la planta. En la actualidad se está estudiando cómo utilizarla para implementar agroquímicos con menos repercusiones al medio ambiente (Rivera-Escareño et al., 2024).

Una de las propiedades destacables de la gobernadora es su actividad antimicrobiana, la cual se ha evaluado contra patógenos y fitopatógenos (Arteaga et al., 2005).

Presenta un efecto neto en el desplazamiento de otras especies, lo que impide la diversificación de la flora en donde se desarrolla. Tiene compuestos químicos en sus hojas que sirve como una estrategia anti herbívoros. Demanda suelos con drenaje que permitan la presencia de oxígeno para sus raíces. Resiste las sequias y tolera suelos arenosos, calizos y con baja concentración de fósforo (Arteaga et al., 2005).

#### **5.4.4. Importancia económica**

Esta planta tiene un papel importante dentro de la medicina tradicional para el tratamiento relacionado con el estómago, riñones, vesícula, presenta propiedades antimicrobianas y se ha llegado a utilizar para evitar infecciones y favorecer cicatrizaciones (Aranda Ledesma et al., 2024).

Contiene compuestos antioxidantes fenólicos como la NDGA (Nordihidroguaiaretico), el cual en exceso produce efectos contraproducentes hepáticos y renales (Raisuddin et al., 2011).

En cuanto a plantación comercial, se han concretado policultivos comerciales en USA para la producción de aceites, polifenoles solubles, Guta, hules, fibra para papel, xilosa, alcohol combustible, suplementos alimenticios de alta proteína, entre otros (Rivera-Escareño et al., 2024).

Ha sido utilizada en múltiples estudios por la amplia variedad que tienen sus extractos, como, por ejemplo: anticancerígenos, antivirales, antimicrobianos, tiene efectos positivos cardiovasculares y anti neurodegenerativos (Dominguez Chavarria, 2024).

#### **5.4.5. Mecanismos de adaptación**

De manera natural crece de forma separada y con las ramas abiertas. En cultivo crece con follaje más denso. Tiene una adaptación excelente para sobrevivir en el desierto por su metabolismo CAM (fijan el O<sub>2</sub> en la noche para disminuir la pérdida de agua en el día). Estas adaptaciones son gracias a su alta tolerancia protoplásmica a la desecación y a altas temperaturas (Arteaga et al., 2005). Podemos observar en la Figura 8. la gobernadora en estado silvestre creciendo en condiciones áridas y en suelos escasos de agua.



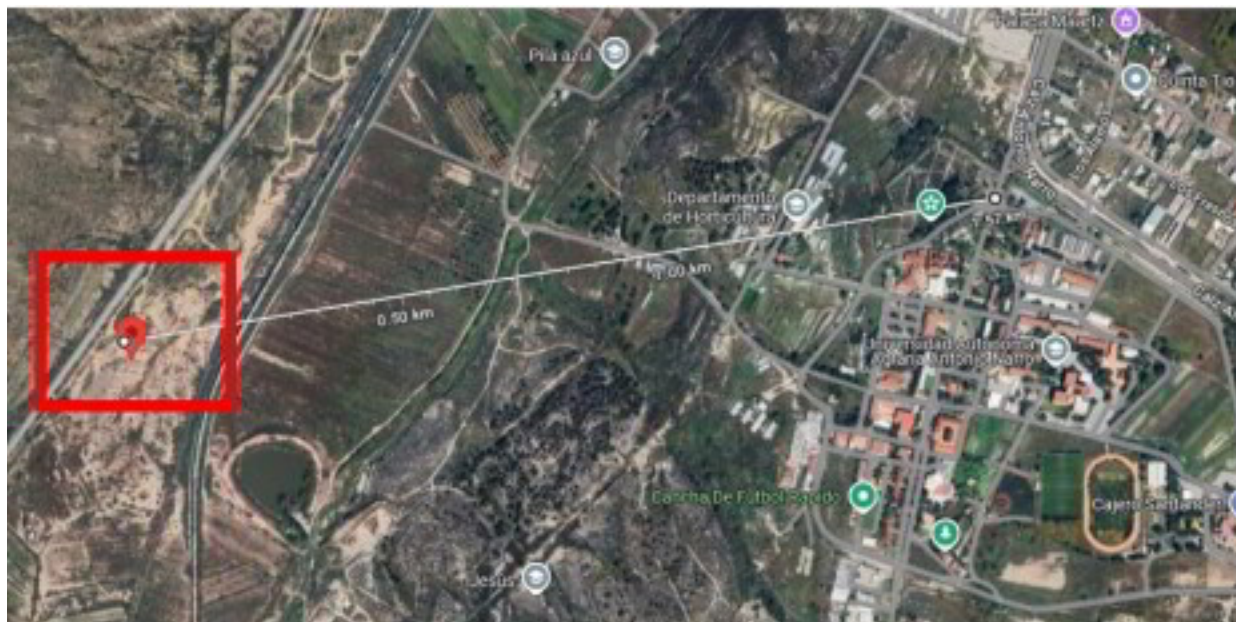
**Figura 8.** Larrea tridentata en estado silvestre.

Fuente: Rivera-Escareño et al., 2024.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Sitio de muestreo

Se obtuvo una muestra de gobernadora a 1.57 km de distancia de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en Saltillo Coahuila (Coordenadas: 25.3551283,-101.0481053). Se muestran en la Figura 9.



**Figura 9.** Ubicación de la muestra.

Fuente: <https://www.google.com.mx/map>

La muestra fue almacenada a 4 °C durante un periodo de 24 horas antes de su procesamiento.

### 6.2. Preparación de medio de cultivo

Se trabajó con los medios: Agar nutritivo, LB, R2A y R2A Agar + NaCl 1.5%. De acuerdo con protocolos de elaboración (Tabla 1), se tomaron las medidas correspondientes para elaborar el medio pesando los reactivos en la balanza analítica y midiendo el agua destilada en probetas, vaciándose en frascos para su mezcla y esterilización en la autoclave a 121 °C aproximadamente durante 20 minutos aproximadamente

**Tabla 1.** Parámetros de preparación de medios de cultivo utilizados

<b>Medio de cultivo</b>	<b>Parámetros para 1 L</b>
Agar LB	20g de medio LB +15g de Agar
Agar nutritivo	23g de Agar Nutritivo
R2A	18.2g de R2A
R2A + NaCl 1.5%	18.2g de R2A+ 15g de NaCl

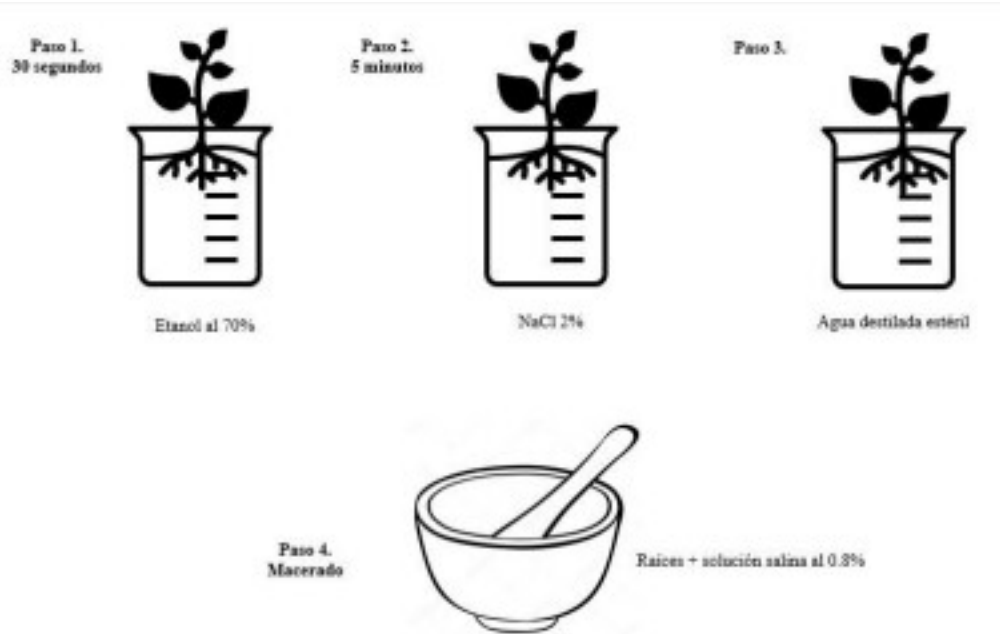
Después de la esterilización el medio fue vaciado en las cajas Petri de polipropileno estéril, en una campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad. Se dejó gelificar 15 minutos aproximadamente y posterior a eso se sellaron.

### **6.3. Obtención de endófitas a partir de las raíces de *Larrea tridentata***

Se realizó el aislamiento de endófitas utilizando las soluciones de Etanol al 70% y NaCl al 2%. En la Figura 10 se observa de manera general el proceso de extracción.

- i. Se esterilizaron las raíces en solución de etanol al 70% agitándolas por 30 segundos.
- ii. Se pasó a la solución de NaCl 2% agitándose por 5 minutos.
- iii. Se enjuagó la raíz con agua destilada estéril.
- iv. Se maceró la raíz junto con solución salina al 0.8%.

(Bokhari et al., 2019).



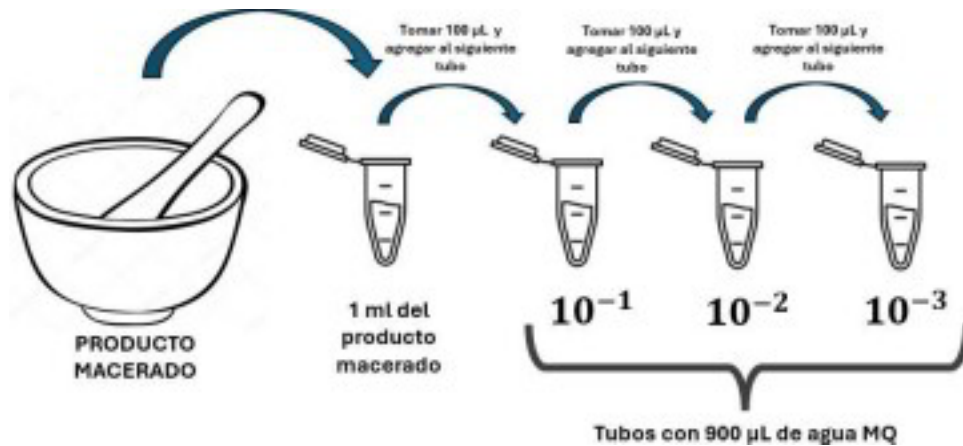
**Figura 10.** Proceso de extracción de endófitos.

A partir del producto macerado, se tomó un volumen de 1 mL. Se realizaron diluciones seriadas partiendo de la dilución inicial tomando 100 uL diluyéndolos en 900 uL, así hasta  $10^{-3}$ . Se sembraron todas las diluciones (incluyendo la 0) con perlas de vidrio en los medios correspondientes, sembrando 2 repeticiones de cada medio y dilución.

#### **6.4. Aislamiento de endófitos de *Larrea tridentata*.**

En condiciones de esterilidad se realizaron diluciones seriadas de la 0 a la  $10^{-3}$  a partir del producto macerado. Se diluyeron 100  $\mu$ L en 900  $\mu$ L de agua ultrapura estéril obteniendo un volumen de 1 mL. Se sembraron todas las diluciones (incluyendo la 0) con perlas en los medios correspondientes, sembrando 2 repeticiones de cada medio y dilución.

En la Figura 11. se explica de manera general el proceso de diluciones seriadas.



**Figura 11.** Proceso de las diluciones seriadas.

Se sellaron dentro de la campana para evitar contaminación. Se incubaron en una cámara climática Ecoshel modelo CH-250 a 27°C de 24 a 36 horas.

### 6.5. Criopreservación de las colonias aisladas

Utilizamos esta técnica de conservación biológica para poder mantener viables las colonias de bacterias. Se crecieron las colonias en 700 µL de medio LB líquido por 24 horas y se mantuvieron en agitación a 600 rpm. En la campana de flujo laminar se extrajo directamente 200 µl de cultivo. Se le agregaron 200 µl de glicerina y se vortexearon para homogenizarse. Se incubaron en un ultracongelador a una temperatura de -81°C. Posteriormente se sembró para confirmar la viabilidad de las muestras.

### 6.6. Obtención de ADN bacteriano por HotSHOT

Para simplificar la extracción de ADN genómico, se realizó la técnica de *HotSHOT*. Para lo cual, se picó la colonia directamente de la placa y se diluyó en 20 µl de agua ultrapura estéril en un tubo microtubo estéril de 1.5 mL, después se tomaron 10 µl de esa dilución y se pasó a un microtubo estéril de 200 µL. Se utilizó solución de lisis alcalina (Tabla 2.) agregando 50µl al tubo con la colonia diluida y se incubó en un termociclador a 95°C de 30 minutos a 1 hora. Al salir del termociclador, agregar 50µl de solución de neutralización (Tabla 2.). Mantener a 4°C.

**Tabla 2.** Parámetros para la solución de Lisis Alcalina y Solución de Neutralización.

	<b>Componentes</b>	<b>Volumen</b>	<b>Volumen final</b>
Lisis Alcalina	NaOH 100mM	1.25 mL	5 mL aforado con H2O ultrapura estéril
	EDTA 10mM	0.1 mL	
Solución de neutralización	Tris-HCl	0.0315 g	5 mL
	H2O ultrapura estéril	5 mL	

### 6.6.1. Amplificación de fragmentos 16s ribosomal

Para amplificar los fragmentos 16s ribosomal, se realizó reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Tabla 4.), para lo cual se diluyó 1:10 el producto de *HotSHOT* en agua libre ultrapura estéril. Se utilizaron los cebadores 27F y 1429F (Tabla 3.) y la mezcla comercial GoTaq® Green Master Mix de Promega (Cat:M712). En la tabla 5 se muestran las condiciones de la amplificación utilizadas en los respectivos cebadores utilizados.

**Tabla 3.** Secuencia de los cebadores 27F y 1429F (Campos et al., 2018).

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>TM</b>
27F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	60°C
1429R	5'-GTTTACCTTGTTACGACTT3-3	52°C

**Tabla 4.** Componentes de la reacción de PCR.

<b>Componentes</b>	<b>Volumen</b>
ADN	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	2 $\mu$ L
Primer Forward (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
Primer Reverse (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
2x PCR Master Mix	5 $\mu$ L
<b>Volumen final</b>	<b>10 <math>\mu</math>L</b>

**Tabla 5.** Condiciones de amplificación para los cebadores 27F Y 1429R.

<b>Pasos</b>	<b>Temperatura °C</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización	94	5 min	1 ciclo
Desnaturalización	94	30 seg	
Alineamiento	56	30 seg	35 ciclos
Extensión	72	30 seg	
Extensión	72	10 min	1 ciclo

### 6.6.2. Electroforesis de los productos de PCR

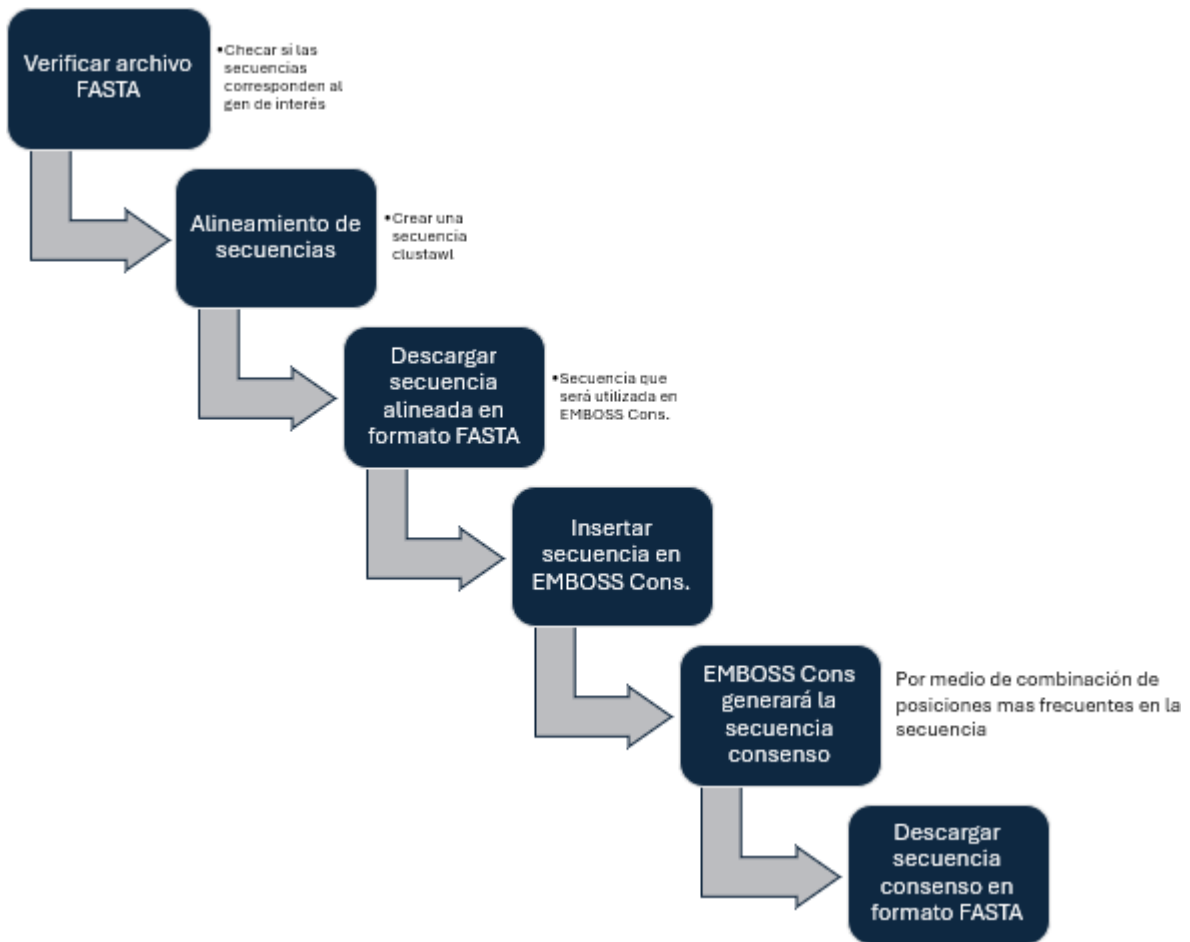
Se utilizó como marcador de peso molecular de 1 kpb (kilo pares de bases), se cargaron 4  $\mu$ L de muestra con 2  $\mu$ L de buffer de carga y se corrió en un gel de electroforesis al 0.8% de concentración a 80V.

### 6.7. Secuenciación y análisis de las secuencias

Un total de 11 productos de PCR fueron enviados para su secuenciación en el Laboratorio de Servicios Genómicos del CINVESTAV del Instituto Politécnico Nacional, se secuenciaron bidireccionalmente con los cebadores 1429R y 27F. Las muestras enviadas a secuenciar se obtuvieron a partir de los medios LB, Agar Nutritivo, R2A y R2A con NaCl al 1.5%.

- I. Las secuencias obtenidas fueron visualizadas en el software SnapGene (*SnapGene / Software Para La Biología Molecular Cotidiana*, 2025).
- II. Para el alineamiento de las secuencias se utilizó el programa MAFFT (*MAFFT - Un Programa de Alineamiento de Secuencias Múltiples*, 2025) que nos permite alinear varias secuencias ajustando la dirección de secuencias de nucleótidos de acuerdo con la primera secuencia para una mejor precisión. Nos arrojará los resultados en formato CLUSTAL.
- III. Los alineamientos fueron descargados formato FASTA, el cual se utilizó en el programa EMBOSS Cons (*EMBOSS Cons < EMBL-EBI*, 2025) para obtener una secuencia consenso (secuencia construida a partir de la unión de las 2 primeras secuencias utilizadas).
- IV. La secuencia consenso fue alienada por medio de la herramienta BLAST en el NCBI (*BLAST: Herramienta Básica de Búsqueda de Alineación Local*, 2025). Utilizando la herramienta de alineación de nucleótidos se pegó la secuencia consenso. Se tomó en cuenta el **Porcentaje de Identificación** (>99%), **Longitud de la accesión**, **Query Cover** (porcentaje de alineamiento entre las secuencias), **E. Value** (número de coincidencias,

entre más bajo mejor coincidencia) y la **Accession** (número de acceso que identifica el registro de alguna secuencia de manera única).



**Figura 12.** Diagrama de flujo general del análisis bioinformático.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSION

### 7.1. Aislamiento, cultivo bacteriano y morfología de las colonias

A las 24 horas después de la siembra, se obtuvieron múltiples colonias con características morfológicas variables entre sí, lo cual sugiere presencia de distintos tipos de bacterias. En la Tabla 6 se observa el número de colonias obtenidas en cada medio de cultivo, así como los grupos morfológicos.

**Tabla 6.** Biodiversidad de las bacterias.

MEDIO	DILUCIONES				TOTAL	TOTAL # DE GRUPOS MORFOLOGICOS
	0	-1	-2	-3		
LB	7	2	0	0	9	2
Agar Nutritivo	46	6	0	0	52	5
R2A	36	6	0	0	42	1
R2A + NaCl	8	0	0	0	8	2
<b>TOTAL</b>	97	14	0	0		

Las colonias mostraron una diversidad en cuanto a los bordes, el color, la forma y la opacidad. En la Tabla 7 se muestran las morfologías características.

**Tabla 7.** Características visibles de las colonias seleccionadas.

Medio de cultivo	COLONIA	MORFOLOGÍA			
		color	forma	margen	opacidad
Agar Nutritivo	EA1	beige	circular	liso	opaca
	EA4	beige	irregular	ondulado	opaca
	EA5	blanco	circular	liso	opaca
	EA7	beige	circular	liso	semi traslucida
	EA12	blanco	irregular	ondulado	semi traslucida
LB con Agar	EL1	beige	circular	liso	opaca
	EL2	blanco	circular	liso	semi traslucida
R2A + NaCl 1.5%	EN2	-	-	-	-
	EN3	blanco	irregular	lobulado	semi traslucida
	EN5	blanco	circular	liso	opaca
R2A	ER2	blanco	irregular	ondulado	translucida

## 7.2. Extracción de ADN por método de *HotSHOT*, amplificación del ADN y visualización del gel de agarosa.

El método *HotSHOT* (Hot Sodium Hydroxide and Tris) se ha utilizado por su rapidez, su accesibilidad en precio y que puede llevarse a cabo en placas de 96 pocillos, lo cual lo hace apto si buscamos un genotipado de alto rendimiento. Se ha comparado en otros experimentos el ADN de *HotSHOT* con otros ADN preparado con diferentes métodos y se ha confirmado que el método *HotSHOT* producía los productos de PCR más limpios. Se ha analizado que 26 de 1079 reacciones

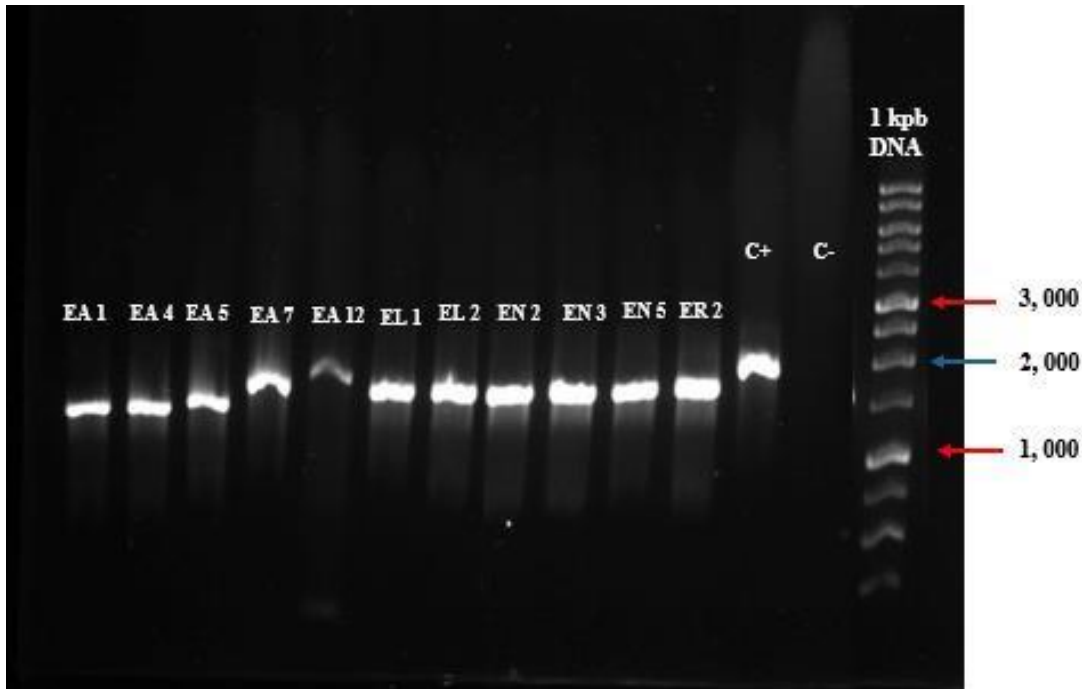
han fallado con ADN preparado con métodos tradicionales, mientras que el ADN HotSHOT solo 9 de 1011 fallaron (Truett et al., 2000).

En trabajos previos se ha documentado el uso de esta técnica para extraer ADN de las comunidades microbianas endófitas de plantas para poder garantizar muestras libres de contaminación por microorganismos presentes en las epífitas (Ruiz-Pérez & Zambrano, 2017).

Aún con la accesibilidad de esta técnica, su bajo costo y su rápido procedimiento, presenta desventajas como almacenamiento limitado (se llega a degradar el ADN después de cierto tiempo de almacenamiento) y ciertas impurezas en el ADN que pueden perjudicar la secuenciación (Truett et al., 2000).

En este estudio la extracción de ADN por medio de esta técnica permitió obtener ADN total de las muestras procesadas. En la Figura 13 se observan los resultados de la PCR utilizando los cebadores 1429R y 27F. Estos cebadores son de uso universal principalmente en estudios de genética microbiana amplificando regiones del gen 16S RNAr. Son de aproximadamente 1400 pares de bases, lo cual cubre casi toda la longitud del gen 16S RNAr. Se utilizan en la filogenia e identificación bacteriana, secuencia Sanger y PCR convencional (Frank et al., 2008).

Las bandas presentaron un tamaño aproximado de 1,400 a 1,500 pares de bases utilizando como referencia el marcador de peso molecular de 1 kpb. No se observaron bandas múltiples en los productos por lo que se sugiere que hubo una buena extracción de ADN.

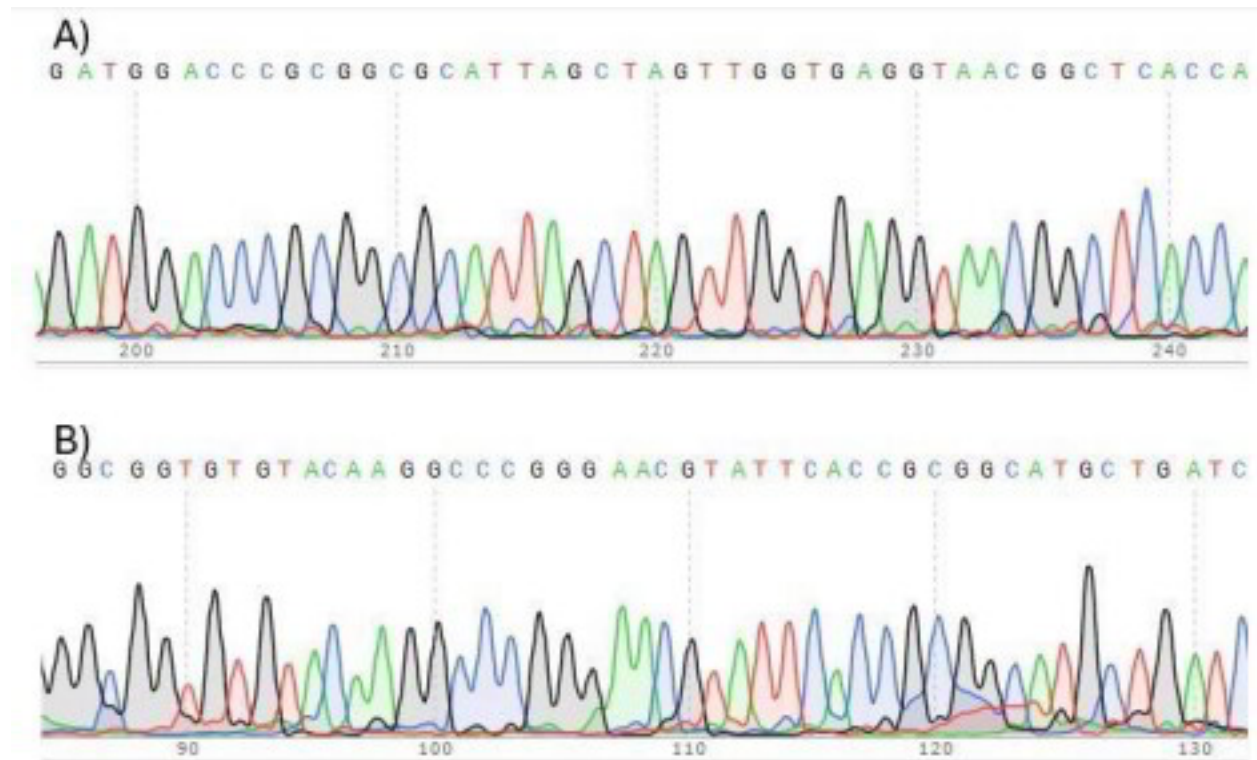


**Figura 13.** Amplificación de ADN.

Se ha mostrado una consistencia en el tamaño de bandas en diferentes estudios previos de bacterias endófitas, en donde se identifican cepas de endófitas como *S. maltophilia*, *B. subtilis* y *P. aeruginosa* las cuales mostraron tamaños de 1500 a 2000 pb (Selim & Essa, 2016). También se ha mencionado el tamaño de ese amplicón en cepas identificadas de *Bacillus tequilensis* y *Bacillus subtilis* presentando un tamaño consistente de 1400 a 1600 pb (Inggraini et al., 2021).

### 7.3. Análisis bioinformático de las secuencias 16S

#### 7.3.1. Visualización y edición de secuencias en SnapGene



**Figura 14.** Secuencias mostradas en SnapGene.

En la Figura 14. se puede observar un ejemplo de secuencias extraídas (A. Secuencia Forward de bacteria EN3. B. Secuencia Reverse de bacteria EA12) a partir de SnapGene. Buscamos fragmentos relativamente limpios y sin empalme para poder tener un mejor resultado a la hora de alinear las secuencias en MAFFT.

#### 7.3.2. Alineamiento múltiple en MAFFT y creación de secuencia consenso en EMBOSS Cons

Se obtuvieron las secuencias consenso de cada una de las bacterias por medio de alineamientos múltiples. Esto nos permitió alinear las secuencias con base en los fragmentos coincidentes entre las dos secuencias resultantes (se secuenció bidireccionalmente con los cebadores 1429R y 27F), la secuencia consenso construida con base a cada alineamiento resultó en fragmentos de alrededor de 1400 pb, lo cual coincide con la literatura previamente publicada.

### 7.3.3. Análisis de alineamientos en BLAST e investigación taxonómica en NCBI.

En la Tabla 8. se muestran las bacterias identificadas junto con los parámetros tomados en cuenta para la identificación de los microorganismos. Las secuencias coincidieron con bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Rhizobium* lo cual nos permitió una identificación confiable basada en el mayor porcentaje de identidad obtenido de cada una.

En especies y géneros identificados con la ayuda del gen 16S se ha tomado en cuenta un porcentaje de identidad mayor a >95% y/o >98,75% (Beye et al., 2018).

**Tabla 8.** Microorganismos identificados en la base de datos del NCBI.

COLONIA	GENERO	ESPECIE	QUERY	E	PER.	ACC.	ACCESSION
			COVER	VALUE	IDENT	LENG	
EA1	<i>Peribacillus</i>	<i>frigoritolerans</i>	100%	0	99.30%	1368	<a href="#">MT320254.1</a>
EA4	<i>Bacillus</i>	-	100%	0	96.36%	1413	<a href="#">MT357197.1</a>
EA5	<i>Metabacillus</i>	<i>idriensis</i>	100%	0	99.77%	1410	<a href="#">PP053280.1</a>
EA7	<i>Sinorhizobium</i>	<i>meliloti</i>	91%	0	93.72%	1406	<a href="#">JQ666188.1</a>
EA12	<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	99%	0	97.20%	4391522	<a href="#">CP120587.1</a>
EL1	<i>Neobacillus</i>	<i>niacini</i>	91%	0	95.37%	1457	<a href="#">MW487425.1</a>
EL2	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermis</i>	100%	0	99.21%	1372	<a href="#">CP090912.1</a>
EN2	<i>Streptomyces</i>	<i>erumpens</i>	99%	0	97.65%	9011975	<a href="#">EU741210.1</a>
EN3	<i>Bacillus</i>	<i>mojavensis</i>	100%	0	99.71%	1423	<a href="#">KJ756335.1</a>
EN5	<i>Streptomyces</i>	<i>erumpens</i>	100%	0	99.53%	1497	<a href="#">NR_114917.1</a>
ER2	<i>Metabacillus</i>	<i>idriensis</i>	93%	0	95.66%	1442	<a href="#">MF581437.1</a>

## **7.4. Bacterias identificadas**

### **7.4.1. *Peribacillus frigoritolerans***

Es una bacteria grampositiva. Tiene numerosos beneficios en las plantas en donde promueven el crecimiento y las ayudan a protegerse contra las plagas y enfermedades. En animales (principalmente gatos, caballos y ovejas) se ha probado que protege contra la infección letal por *S. aureus* (Zhou et al., 2025).

Ya ha sido identificada como una bacteria endófito en diversas plantas, como la cepa Q2H1 que ha sido aislada de la papa (raíces) que presenta genes relacionados con promover el crecimiento vegetal, la síntesis del AIA en el metabolismo del triptófano, fijación de nitrógeno, entre otros (Wang et al., 2022).

En cuanto a los beneficios de la aplicación en la agronomía, se ha encontrado un estudio donde buscan probar el efecto de *P. frigoritolerans* en el crecimiento de hojas de canola. Contribuye a solubilizar fósforo, producir fitohormonas como AIA (ácido indolacético) y en la fijación de nitrógeno (Świątczak et al., 2023).

### **7.4.2. *Metabacillus idriensis***

Es una bacteria grampositiva. Se ha estudiado su producción de carotenoides con propiedades antioxidantes y antimicrobianas.

En la planta *Dodonaea viscosa* actúa como productor de amoníaco, cianuro de hidrogeno y solubilización del fosfato. Aumenta las longitudes de raíces de la misma planta. (Adeleke et al., 2021).

En la industria textil se ha utilizado como tinte amarillo para prendas gracias a la producción de carotenoides, el cual al ser extraído se usa para producir este color de tinte.

Hasta el momento no existen estudios científicos que la cataloguen como endófito.

#### **7.4.3. *Sinorhizobium meliloti***

Actualmente conocida como *Ensifer meliloti* es una bacteria gramnegativa utilizada en la agricultura para aumentar fertilidad del suelo, ayuda a convertir nitrógeno atmosférico en nitrógeno amoniacal que utiliza la planta, establece una interacción con leguminosas de forma simbiótica formando nódulos en sus raíces. En *Medicago sativa* se ha encontrado principalmente este micro simbiote. También sirven para aumentar la biomasa de las plantas a través de producción de sideróforos y de la producción de fitohormonas (principalmente de ácido indolacético, que es una característica resaltable en géneros *Ensifer*) (Toro Ipanaqué et al., 2020). *Sinorhizobium meliloti* ha sido estudiada ampliamente gracias a su capacidad de simbiosis fijadora de nitrógeno y secreción de flavinas en leguminosas. Los FL secretados por bacterias mejoran el crecimiento de la col y lechuga, el rendimiento y los índices fisiológicos (Ajeethan et al., 2023).

#### **7.4.4. *Bacillus subtilis***

Esta bacteria se encuentra ampliamente en el ambiente. Se ha estudiado y utilizado esta bacteria por ser muy beneficiosa para las plantas, entre los beneficios está su efectividad en promover el desarrollo y los inductores de resistencia a tipos de estrés en las plantas. Se utiliza principalmente para disminuir el uso de fertilizantes químicos que dañan los cultivos (González-León et al., 2022). En la cebolla actúa como productor de AIA (ácido indolacético), la síntesis de ACC (ácido amino ciclopropano carboxilo) para la maduración del fruto y el crecimiento en ambientes estresantes. También suprime el crecimiento de micelios de hongos patógenos (Adeleke et al., 2021). Se ha reportado como una endófita en varias especies de cultivos, aisladas de raíces, hojas, tallos y semillas. Es segura para su uso en el desarrollo de productos fitosanitarios en la industria alimentaria. Tiene la capacidad de inducir el crecimiento y el rendimiento del cultivo aun en

condiciones de estrés. Regula la fotosíntesis, la disminución del daño oxidativo y osmótico causado por estrés, y la regulación de hormonas vegetales (Lubyanova et al., 2023).

#### **7.4.5. *Neobacillus niacini***

Es una bacteria que forman esporas que puede presentar tinción gram variable. Debido a la capacidad de metabolizar niacina forma parte un papel importante en el ciclo del nitrógeno y una gran utilidad en la biotecnología futura. Estudios recientes han reportado que se ha trabajado con esta bacteria para la biosíntesis de nanopartículas de óxido de plata eficientemente, esto gracias a una cepa aislada de hojas de *Lycium shawii* (El-Sapagh et al., 2024a).

Si ha sido identificada como una bacteria endófito. Se ha estudiado su cepa AUMC-B524 para su síntesis de nanopartículas antimicrobianas y anticancerígenas (El-Sapagh et al., 2024b).

#### **7.4.6. *Streptomyces rimosus***

Se encuentra en el suelo y en ambientes acuáticos. Es conocido como el estreptomiceto mejor caracterizado por su producción de oxitetraciclina y antibióticos tetraciclínicos. Se usa en el tratamiento de infecciones bacterianas.

Desde 1950 se ha aplicado el desarrollo de procedimientos in vitro de manipulación genética de *S. rimosus* al estudio de inestabilidad genética y a clonación molecular y caracterización de genes relacionados en la síntesis de oxitetraciclina (Petković et al., 2006).

Ha sido identificada como endófito anteriormente en estudios donde hablan del control biológico contra enfermedades fúngicas en *Salvia miltiorrhiza* (Sa et al., 2022).

Este género tiene dominancia en producir ivermectina, tetraciclina, estreptomina, nistanina, entre otras. Tienen un papel importante en la protección de plantas contra patógenos gracias a sus metabolitos secundarios (Chen et al., 2018).

#### **7.4.7. *Streptomyces erumpens***

Este género es ampliamente utilizado por sus capacidades antibióticas que han sido explotadas en la industria farmacéutica. También se ha visto que tiene la capacidad de producir enzimas industriales utilizadas para diversos propósitos: como la enzima amilopululanasa (AP) la cual se ha utilizado en industrias de procesos alimentarios y destilería, como la conversión de almidón en azúcares (Kar et al., 2012).

No hay estudios que avalen que es una endófito, sin embargo, existen más especies de este género que han sido documentadas como endófitas.

#### **7.4.8. *Staphylococcus epidermis***

Bacteria grampositiva. Es la especie de *Staphylococcus* coagulasa negativa común en la epidermis humana. En entornos como piel o mucosa suele ser inofensiva. Puede emerger como patógeno en pacientes masculinos con diagnóstico de uretritis. Muestra resistencia nula o muy disminuida a antibióticos como ciprofloxacina, norfloxacina, amikacina, gentamicina, amoxicilina, entre otras (Cecilia García-Mariño et al., 2023).

Aunque se conozca más en el ámbito médico como un patógeno presente en la microbiota humana, si ha sido identificada como una endófito.

Se han aislado 54 cepas de las semillas del arroz, en las cuales 13 fueron identificadas como endófitas de la especie *Staphylococcus*, y a partir de ellas 4 fueron *S. epidermis* endófitas del arroz (Chaudhry & Patil, 2016).

Se han encontrado datos donde existe un aumento de defensa y resistencia inducida por la cepa de la endófito en conjunto con *B. tequilensis* y *B. siamensis*. También se menciona regulación positiva de mecanismos en relación con el estrés abiótico: metabolismo de grasas, hormonales y glicosil inositol fosforilceramida (esta última siendo un receptor de Na, el cual interviene en la entrada de Ca en las plantas en condiciones de estrés salino) (Liang et al., 2024).

#### **7.4.9. *Bacillus mojavensis***

Se ha investigado ampliamente como una endófita que ayuda al control biológico. Por ejemplo, la cepa UTF-33 se ha utilizado como inhibidor del hongo del arroz por su fuerte efecto inhibidor (Zhang et al., 2023).

También la cepa MTC-8 se ha estudiado por su significativo control hacia el añublo del arroz, *Rhizoctonia solani*, *Ustilagoideae virens* y *Bipolaria maydis*. En posteriores estudios se ha dado a conocer que el mecanismo de esta cepa inhibe el compuesto aislado y demuestra la capacidad de supresión de esporas, interrupción de la integridad de la membrana celular e inducir la expresión génica. En general tiene efectos muy beneficiosos sobre la inmunidad de las plantas, el crecimiento, y la resistencia hacia este hongo (Ze et al., 2024).

En general, a pesar de haber utilizado el gen ARNr 16S como marcador molecular para la identificación bacteriana, el cual, ha sido utilizado anteriormente en diversas investigaciones mostrando buenos resultados, se vieron dificultades que pudieron limitar la eficiencia de los resultados. Un principal obstáculo fue la pureza de las secuencias obtenidas además de un tamaño insuficiente para poder obtener una identificación taxonómica precisa o esperada.

Aunque el gen ARNr 16S ha demostrado tener una alta eficacia y se ha utilizado ampliamente en proyectos similares previos, es importante hacer énfasis en que no se exenta de limitantes como: regiones conservadas que no permiten discriminar a nivel especie, la presencia de contaminación y la posible mezcla de ADN que puede afectar la calidad de éste.

Incluso artículos mencionan que la secuencia ARNr 16S no muestra una buena discriminación a nivel especie (Loong et al., 2016). También se combina con la desventaja de las bases de datos (como el NCBI), en donde no se encuentran aún muchas referencias de bacterias identificadas recientemente por lo que podría arrojar resultados de “especie no identificada”.

## VIII. CONCLUSIONES

Las bacterias obtenidas a partir de las raíces de *L. tridentata*, por medio de herramientas de microbiología y técnicas moleculares, coinciden en su mayoría al ser endófitas. Esto nos sugiere que las comunidades bacterianas que alberga *Larrea tridentata* han favorecido a la planta principalmente al participar en procesos muy importantes como fijación de nitrógeno, producción de fitohormonas, promover el crecimiento y su supervivencia en condiciones ambientales muy adversas.

Además, se demuestra en este trabajo el potencial biotecnológico a futuro, ya que gracias a estas bacterias podremos buscar alternativas ecológicas, por ejemplo, a una restauración de suelos áridos y en sistemas agrícolas donde predomina el estrés hídrico y el suelo presente baja fertilidad, lo cual limitan directamente el crecimiento vegetal.

A pesar de que se utilizó el gen ARNr 16S como marcador molecular para poder identificar las bacterias, se presentaron limitaciones como la pureza de las secuencias, su tamaño y la base de datos utilizada, lo cual dificultó el trabajo al momento de identificar taxonómicamente las bacterias. Aunque las ventajas son consistentes en estudios previos también son sólidas las desventajas al señalar que, si bien este gen es ampliamente utilizado, no va a permitirse siempre una resolución adecuada (más precisamente a nivel especie). Esto se toma en cuenta a la hora de interpretar los resultados y se sugiere el uso de más métodos de identificación en futuras investigaciones

Sin embargo y, en resumen, este trabajo aporta conocimiento acerca de la microbiota asociada con *Larrea tridentata* y se puede seguir explorando para evaluar su funcionalidad ecológica y su uso en la biotecnología agrícola.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adeleke, B. S., Babalola, O. O., & Glick, B. R. (2021). Plant growth-promoting root-colonizing bacterial endophytes. In *Rhizosphere* (Vol. 20). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100433>
- Ajeethan, N., Yurgel, S. N., & Abbey, Lord. (2023). Role of Bacteria-Derived Flavins in Plant Growth Promotion and Phytochemical Accumulation in Leafy Vegetables. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(17). <https://doi.org/10.3390/ijms241713311>
- Alexander, C., Cristo, C., & Leonardo Biol, C. A. (2013). Diversidad de bacterias endófitas asociadas a cultivo de arroz en el departamento de Córdoba-Colombia. In *Rev. Colombiana cienc. Anim* (Vol. 5, Issue 1).
- Alvis Garcés, M. F. (2024). *Caracterización de bacterias endófitas de Passiflora ligularis* [Desarrollo de proyecto, Escuela de ciencias básicas, Universidad de La Salle]. [malvis56@unisalle.edu.co](mailto:malvis56@unisalle.edu.co)
- Aranda Ledesma, N. E., Romeo Rojas Molina, Claudia Lizeth Robledo Jiménez, & Guillermo Cristian Guadalupe Martínez Ávila. (2024). Fitoquímicos antioxidantes: el caso de *Jatropha dioica*, *Flourensia cernua*, *Larrea tridentata*, *Turnera diffusa* and *Euphorbia antisiphylitica*. *Tectzapic. Revista Académico-Científica*, Vol. 10, Número 1., 55–68. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=9764440>
- Arteaga, S., Andrade-Cetto, A., & Cárdenas, R. (2005). *Larrea tridentata* (Creosote bush), una planta abundante en los desiertos de México y Estados Unidos. *Revista de Etnofarmacología*, 98(3), 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.02.002>.
- Beye, M., Fahsi, N., Raoult, D., & Fournier, P. E. (2018). Careful use of 16S rRNA gene sequence similarity values for the identification of *Mycobacterium* species. *New Microbes and New Infections*, 22, 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.12.009>
- Biokar. (2022). *Technical data sheet: NutrientAgra 2%*. [www.biokar-diagnostics.com](http://www.biokar-diagnostics.com)
- BLAST: herramienta básica de búsqueda de alineación local.* (2025). <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Bokhari, A., Essack, M., Lafi, F. F., Andres-Barrao, C., Jalal, R., Alamoudi, S., Razali, R., Alzubaidy, H., Shah, K. H., Siddique, S., Bajic, V. B., Hirt, H., & Saad, M. M. (2019). Bioprospecting desert plant *Bacillus* endophytic strains for their potential to enhance plant stress tolerance. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54685-y>

- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 29, Issue 8, pp. 601–608). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Campos, P., Borie, F., Cornejo, P., López-Ráez, J. A., López-García, Á., & Seguel, A. (2018). Phosphorus acquisition efficiency related to root traits: Is mycorrhizal symbiosis a key factor to wheat and barley cropping? *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.00752>
- Castro del Ángel, E., & Hernandez Castillo, F. D. (2021). Bacterias endófitas y su efecto en la inducción de resistencia sistémica en el cultivo de frijol contra *Rhizoctonia solani* y *Fusarium Oxysporum*. *Revista de Ciencias Biológicas y de La Salud*, Vol. XXIII, Numero 3, 167–174. <http://biotecnia.unison.mx>
- Caycedo Lozano, L., Corrales Ramírez, L. C., & Trujillo Suárez, D. M. (2021). Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química. *Nova*, 19(36), 49–94. <https://doi.org/10.22490/24629448.5293>
- Cecilia García-Mariño, K. I., Margarita Expósito-Boue, L. I., & Antonio Gan-Fong, L. I. (2023). *Staphylococcus epidermidis* productor de biofilm como causa de uretritis en el sexo masculino. <http://www.revinfcientifica.sld.cu/index.php/ric/article/view/4032>
- Cháidez Ibarra, M. A. (2024). *Identificación y ocurrencia molecular de Mycoplasma gallisepticum y Mycoplasma synoviae en aves domésticas* [Universidad Autónoma de Sinaloa]. [dgbuas@uas.edu.mx](mailto:dgbuas@uas.edu.mx)
- Chaudhry, V., & Patil, P. B. (2016). Genomic investigation reveals evolution and lifestyle adaptation of endophytic *Staphylococcus epidermidis*. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep19263>
- Chavez Huingo, M., & Rivera Jacinto, M. A. (2023). *Diversidad bacteriana cultivable y no cultivable de agua y sedimento en el drenaje ácido de la mina Michiquilla y Cajamarca* [Universidad Nacional de Cajamarca]. <https://repositorio.unc.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14074/y>
- Chen, Y., Zhou, D., Qi, D., Gao, Z., Xie, J., & Luo, Y. (2018). Growth promotion and disease suppression ability of a *Streptomyces* sp. CB-75 from banana rhizosphere soil. *Frontiers in Microbiology*, 8(JAN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02704>

- Cherwell. (2020). *Media Type-R2A (Reasoner's 2A)* (Patent +44 (0) 1869 355 500). <https://www.cherwell-labs.co.uk/growth-media-type-r2a-agar?>
- De la Cruz Leyva, M. C., & Zamudio Maya, M. (2014). Importancia y estudios de las comunidades microbianas en los recursos y productos pesqueros. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 2(4), 99–115. era@ujat.mx
- Delgadillo López, A. E., & González Ramírez, C. A. (2011). Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14(2), 597–612. ccastro@uady.mx
- Dominguez Chavarria, J. A. (2024). *Evaluación del efecto anticancerígeno “IN VITRO” de análogos del ácido meso-hidroguaiarético y aporte al mecanismo de acción de los compuestos más activos* [Tesis de maestría]. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Doncel M, A. (2016). Actividad in vitro de bacterias endófitas promotoras de crecimiento asociadas con pasto colosoana en el municipio de Corozal, Sucre. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 8(s), 351–360. <https://doi.org/10.24188/recia.v8.n0.2016.391>
- El-Sapagh, S. H., El-Zawawy, N. A., Elshobary, M. E., Alquraishi, M., Zabed, H. M., & Nouh, H. S. (2024a). Harnessing the power of *Neobacillus niacini* AUMC-B524 for silver oxide nanoparticle synthesis: optimization, characterization, and bioactivity exploration. *Microbial Cell Factories*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02484-0>
- El-Sapagh, S. H., El-Zawawy, N. A., Elshobary, M. E., Alquraishi, M., Zabed, H. M., & Nouh, H. S. (2024b). Harnessing the power of *Neobacillus niacini* AUMC-B524 for silver oxide nanoparticle synthesis: optimization, characterization, and bioactivity exploration. *Microbial Cell Factories*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02484-0>
- EMBOSS*                      *Cons*                      <                      *EMBL-EBI*.                      (2025). [https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/emboss\\_cons?type=dna&matrix=EDNAFULL](https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/emboss_cons?type=dna&matrix=EDNAFULL)
- Fernández Olmos, A., García de la Fuente, C., & Saéz Nieto, J. A. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. In E. Cercenado & Cantón Rafael (Eds.), *Procedimientos de Microbiología Química* (Issue 37, pp. 3–28). EIMC.
- Frank, J. A., Reich, C. I., Sharma, S., Weisbaum, J. S., Wilson, B. A., & Olsen, G. J. (2008). Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2461–2470. <https://doi.org/10.1128/AEM.02272-07>

- Garboza, F., Frontado, R., & Noguera, N. (2011). Uso de medios alternativos a base de hidrolizado de caseína y extracto de *Aspergillus niger* y su efecto sobre la expresión genética de una cepa de *Escherichia coli*. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, *31*, 138–143.
- Gobernado, M., & López-Hontangas, J. L. (2003). Identificación bacteriana. In *Enferm Infecc Microbiol Clin* (Vol. 21, Issue 2).
- Gómez Martin, A. M. (2007). Caracterización de un pigmento naranja producido por una cepa nativa de *Bacillus* spp. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, *38*(1), 55–61. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181221557006>
- Gonzales Torrico, E. M., Cortes Gumucio, C., Blanco Cáceres, R., & Loayza Aguilar, J. (2024). Microorganismos endófitos una evaluación de su importancia en la agricultura ecológica. *LATAM Revista Latinoamericana de Ciencias Sociales y Humanidades*, *5*(3). <https://doi.org/10.56712/latam.v5i3.2107>
- González Rodríguez, L., Mayra, H., Rodríguez Cheang, A. J., & Rojas Badía, M. M. (2015). Influencia de diferentes factores en el crecimiento de bacterias endófitas de caña de azúcar. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *17*(2), 149–155. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54293>
- González-León, Y., Ortega-Bernal, J., Anducho-Reyes, M. A., & Mercado-Flores, Y. (2022). *Bacillus subtilis* y *Trichoderma*: Características generales y su aplicación en la agricultura. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, *25*. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.520>
- Inggraini, M., Nurfajriah, S., Priyanto, J. A., & Ilsa, N. A. (2021). Antimicrobial susceptibility and molecular species identification of clinical carbapenem-resistant bacteria. *Biodiversitas*, *22*(2), 555–562. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220206>
- Kang, J. W., Khan, Z., & Doty, S. L. (2012). Biodegradation of trichloroethylene by an endophyte of hybrid poplar. In *Applied and Environmental Microbiology* (Vol. 78, Issue 9, pp. 3504–3507). <https://doi.org/10.1128/AEM.06852-11>
- Kar, S., Ray, R. C., & Mohapatra, U. B. (2012). Purification, characterization and application of thermostable amylopullulanase from *Streptomyces erumpens* MTCC 7317 under submerged fermentation. *Annals of Microbiology*, *62*(3), 931–937. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0330-6>
- Lage y Cía. S.A. (2010). *Endo Rice Inoculante*. [www.lageycia.com](http://www.lageycia.com)

- Leonardo, A. (2012). Bacterial endophytes: an alternative biological control in *Burkholderia glumae* rice in Colombia. In *Rev. Colombiana cienc. Anim* (Vol. 4, Issue 1).
- Leonardo, A. (2013). Bacterias endófitas: un nuevo campo de investigación para el desarrollo del sector agropecuario. In *Rev. Colombiana cienc. Anim* (Vol. 5, Issue 2).
- Liang, Q., Tan, D., Chen, H., Guo, X., Afzal, M., Wang, X., Tan, Z., & Peng, G. (2024). Endophyte-mediated enhancement of salt resistance in *Arachis hypogaea* L. by regulation of osmotic stress and plant defense-related genes. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1383545>
- Loong, S. K., Khor, C. S., Jafar, F. L., & AbuBakar, S. (2016). Utility of 16S rDNA Sequencing for Identification of Rare Pathogenic Bacteria. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 30(6), 1056–1060. <https://doi.org/10.1002/jcla.21980>
- Lubyanova, A. R., Allagulova, C. R., & Lastochkina, O. V. (2023). The Effects of Seed Pretreatment with Endophytic Bacteria *Bacillus subtilis* on the Water Balance of Spring and Winter Wheat Seedlings under Short-Time Water Deficit. *Plants*, 12(14). <https://doi.org/10.3390/plants12142684>
- Macwilliams, M. P., & Liao, M.-K. (2016). *Luria Broth (LB) and Luria Agar (LA) Media and Their Uses Protocol*. [www.asmscience.org](http://www.asmscience.org)
- MAFFT - un programa de alineamiento de secuencias múltiples. (2025). <https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>
- Martinez Martinez, L. L. (2003). *Bacterias endófitas del plátano y su efecto en el desarrollo de las plantas*. [Tesis de Doctorado]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mendarte-Alquisira, C., Alarcón, A., & Ferrera-Cerrato, R. (2021). Fitorremediación: Alternativa biotecnológica para recuperar suelos contaminados con DDT. Una revisión. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 24. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2021.326>
- Ochoa Agudelo, S., & Osorio Tobón, J. F. (2024). Efecto del plomo y producción de pioverdinas en cepas del orden Pseudomonadales. *10° Encuentro Internacional de Grupos y Semilleros de Investigación En Ciencias Básicas y Aplicadas*, 60–72. <https://www.researchgate.net/publication/387951591>

- Orjuela Rodriguez Marcela. (2023). *Eficacia diagnóstica in silico de técnicas moleculares de uso clínico en Mycobacterium tuberculosis para latinoamerica*. [Tesis de Mestría]. Universidad de Caldas.
- Osorio, W. (2020). *Nitrofix*® Laboratorio de Salud del Suelo. [www.biofertilizar.com](http://www.biofertilizar.com)
- Pérez C, A., Rojas, J., & Vale, M. H. (2009). Biología y perspectiva de microorganismos endófitos asociados a plantas. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, 286–301. <https://doi.org/10.24188/recia.v1.n2.2009.372>
- Pérez Cordero, A., Tuberquia Sierra, A., & Amell Jimenez, D. (2014). *Actividad in vitro de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos*.
- Petković, H., Cullum, J., Hranueli, D., Hunter, I. S., Perić-Concha, N., Pigac, J., Thamchaipenet, A., Vujaklija, D., & Long, P. F. (2006). Genetics of *Streptomyces rimosus*, the Oxytetracycline Producer. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(3), 704–728. <https://doi.org/10.1128/membr.00004-06>
- Raisuddin, S., Rahman, S., Ansari, R. A., Rehman, H., & Parvez, S. (2011). Nordihydroguaiaretic acid from creosote bush (*Larrea tridentata*) mitigates 12-O-tetradecanoylphorbol-13-Acetate-Induced inflammatory and oxidative stress responses of tumor promotion cascade in mouse skin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 1. <https://doi.org/10.1093/ecam/nep076>
- Ramírez Munguía, V. (2017). *Morfología colonial y guía de observación*.
- Rivera-Escareño, D., Garcia-Flores, D. A., Ortega-Amaro, A., Loera-Alvarado, G., & Cadena-Iñiguez, J. (2024). Gobernadora (*Larrea tridentata*), planta del semidesierto con alto potencial de aprovechamiento. *Agro-Divulgación*, 4(1). <https://doi.org/10.54767/ad.v4i1.289>
- Rodicio, M. del R., & Mendoza, C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. In *Enferm Infecc Microbiol Clin* (Vol. 22, Issue 4). <http://www.springer-ny.com/bergeysoutline/>
- Rodriguez, L., Herrera, R., & Bernal, B. (2024). *Caracterización funcional de microorganismos de montaña y sus efectos en el rendimiento de Eryngium Foetidum*.
- Ruiz-Pérez, C., & Zambrano, M. (2017). Endophytic Microbial Community DNA Extraction from the Plant Phyllosphere. *BIO-PROTOCOL*, 7(4). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.2142>
- Sa, R., He, S., Han, D., Liu, M., Yu, Y., Shang, R., & Song, M. (2022). Isolation and identification of a new biocontrol bacteria against *Salvia miltiorrhiza* root rot and optimization of culture

- conditions for antifungal substance production using response surface methodology. *BMC Microbiology*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02628-5>
- Sánchez-Bautista, A., De León-García de Alba, C., Aranda-Ocampo, S., Zavaleta-Mejía, E., Nava-Díaz, C., Goodwin, P. H., & Leyva-Mir, S. G. (2018). Bacterias endófitas de la raíz en líneas de maíces tolerantes y susceptibles a sequía. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1710-3>
- Selim, H., & Essa, A. M. (2016). *Antagonistic Effect of Endophytic Bacteria Against Some Phytopathogens*. <https://www.researchgate.net/publication/295856751>
- SnapGene | Software para la biología molecular cotidiana*. (2025). <https://www.snapgene.com/>
- Terán Salazar, N. A. (2024). *Aislamiento y análisis del código de barras moleculares 16S de bacterias patógenas asociadas a las enfermedades del camarón Litopenaeus vannamei*.
- Toro Ipanaqué, S., Calderón Jiménez, M., & Zavaleta Verde, D. (2020). *Phenotypic characteristics of Ensifer meliloti y Ensifer medicae (Rhizobiaceae) isolated from Medicago sativa L. (Fabaceae) in agricultural areas of Trujillo, Perú*. <https://doi.org/10.22497/arnaldoa.273.27305>
- Truett, G. E., Heeger, P., Mynatt, R. L., Truett, A. A., Walker, J. A., & Warman, M. L. (2000). Preparation of PCR-quality mouse genomic dna with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *BioTechniques*, 29(1), 52–54. <https://doi.org/10.2144/00291bm09>
- Valenzuela-González, F., Casillas-Hernández, R., Villalpando, E., & Vargas-Albores, F. (2015). El Gen ARNr 16s en el estudio de comunidades microbianas marinas. In *Ciencias Marinas* (Vol. 41, Issue 4, pp. 297–313). Universidad Autonoma de Baja California. <https://doi.org/10.7773/cm.v41i4.2492>
- Van, B., Yoon, J. M., & Schnoor, J. L. (2004). Biodegradation of Nitro-Substituted Explosives 2,4,6-Trinitrotoluene, Hexahydro-1,3,5-Trinitro-1,3,5-Triazine, and Octahydro-1,3,5,7-Tetranitro-1,3,5-Tetrazocine by a Phytosymbiotic Methylobacterium sp. Associated with Poplar Tissues (Populus deltoides × nigra DN34). *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 508–517. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.508-517.2004>
- Wang, Y., Zhao, Q., Sun, Z., Li, Y., He, H., Zhang, Y., Yang, X., Wang, D., Dong, B., Zhou, H., Zhao, M., & Zheng, H. (2022). Whole-genome analysis revealed the growth-promoting mechanism of endophytic bacterial strain Q2H1 in potato plants. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1035901>

- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Teng, J. L. L., Tse, H., & Yuen, K. Y. (2008). Then and now: Use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. In *Clinical Microbiology and Infection* (Vol. 14, Issue 10, pp. 908–934). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02070.x>
- Yakhin, O. I., Lubyantsev, A. A., Yakhin, I. A., & Brown, P. H. (2017). Biostimulants in plant science: A global perspective. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 7). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02049>
- Ze, M., Ma, F., Zhang, J., Duan, J., Feng, D., Shen, Y., Chen, G., Hu, X., Dong, M., Qi, T., & Zou, L. (2024). Beneficial effects of *Bacillus mojavensis* strain MTC-8 on plant growth, immunity and disease resistance against *Magnaporthe oryzae*. *Frontiers in Microbiology*, *15*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1422476>
- Zhang, Y., Yang, Y., Zhang, L., Zhang, J., Zhou, Z., Yang, J., Hu, Y., Gao, X., Chen, R., Huang, Z., Xu, Z., & Li, L. (2023). Antifungal mechanisms of the antagonistic bacterium *Bacillus mojavensis* UTF-33 and its potential as a new biopesticide. *Frontiers in Microbiology*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1201624>
- Zhou, C. K., Liu, Z. Z., Peng, Z. R., Luo, X. Y., Zhang, X. M., Zhang, J. G., Zhang, L., Chen, W., & Yang, Y. J. (2025). M28 family peptidase derived from *Peribacillus frigoritolerans* initiates trained immunity to prevent MRSA via the complosome-phosphatidylcholine axis. *Gut Microbes*, *17*(1), 2484386. <https://doi.org/10.1080/19490976.2025.2484386>