



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

RESTABLECIMIENTO DE LOS INDICADORES DE
FERTILIDAD DE SUELO Y LA FUNCIONALIDAD DE
BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FÓSFORO EN
SUELOS RESTAURADOS MEDIANTE LA
FORMACIÓN DE ISLAS DE RECURSOS EN ZONAS
SEMIÁRIDAS EN B.C.S.

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Agricultura Sustentable)

P r e s e n t a

Violeta Iglesias Pretelín

La Paz, Baja California Sur, octubre de 2019.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10:00 horas del día 1 del mes de octubre del 2019, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Restablecimiento de los indicadores de fertilidad de suelo y la funcionalidad de bacterias solubilizadoras de fósforo en suelos restaurados mediante la formación de islas de recursos en zonas semiáridas en B.C.S."

Presentada por el alumno:

VIOLETA IGLESIAS PRETELÍN

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **AGRICULTURA SUSTENTABLE**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

 Dra. LUZ E. DE BASHAN Director de tesis	 Dra. BLANCA E. ROMERO LÓPEZ Co-tutor
 Dra. PAOLA MAGALLÓN SERVÍN Co-tutor	
 Dra. GRACIA ANDURO GÓMEZ Directora de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos	

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dra. Luz Estela González De Bashan (CIBNOR)

Directora de tesis

Dra. Blanca Estela Romero López (Bashan Institute of Science)

Tutora

Dra. Paola Magallón Servín (CIBNOR)

Tutora

Comité Revisor de Tesis

Dra. Luz Estela de González. de Bashan

Dra. Blanca Estela Romero López

Dra Paola Magallón Servín

Jurado del examen

Dra. Luz Estela de González. de Bashan

Dra. Blanca Estela. Romero López

Dra Paola Magallón Servín

Suplente

Dr. Macario Bacilio Jiménez

Resumen

En el desierto de Sonora, la presencia de islas de recursos favorecen el desarrollo de otras plantas, este fenómeno es característico del matorral sarcocaula en Baja California Sur. En el 2004, como estrategia para el control de la degradación del suelo, el Grupo de Microbiología Ambiental del CIBNOR inició un proyecto de restauración de suelos asistido por microorganismos benéficos en El Comitán, La Paz, Baja California Sur basado en el establecimiento del cardón (*Pachycereus pringlei*) en asociación con tres árboles de leguminosas: mezquite amargo (*Prosopis articulata*), palo verde (*Parkinsonia microphylla*) y palo junco (*Parkinsonia florida*), simulando islas de recursos. De las leguminosas sembradas individualmente o en asociación con el cardón, se encontró que el mezquite tuvo una mayor tasa de supervivencia, en comparación con las otras leguminosas. El presente trabajo comparó los indicadores de fertilidad y funcionalidad de bacterias solubilizadoras de fósforo (PRSB) del área restaurada bajo diferentes condiciones de islas de recursos (maduras y jóvenes, dependiendo de la edad del mezquite) y mezquites sembrados individualmente con suelos que permanecen degradados. Como indicadores de fertilidad, se midieron actividades enzimáticas y carbono de la biomasa microbiana. Se encontró mayor actividad β -glucosidasa y fosfatasa en el área restaurada únicamente con mezquites; sin embargo, los resultados fueron similares para el área sembrada bajo ambas islas de recursos (maduras y jóvenes), lo cual sugiere que la degradación de materia orgánica y mineralización de fósforo es similar en el área restaurada pero contrastante con el suelo degradado. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de carbono de la biomasa microbiana entre el área restaurada y el suelo degradado. Los resultados sugieren que los indicadores de fertilidad en las islas de recursos jóvenes son similares a la de islas maduras, por lo que se pueden observar un restablecimiento en las propiedades del suelo en el área restaurada. Asimismo, como aproximación de la funcionalidad de las bacterias solubilizadoras de roca fosfórica (phosphate rock solubilizing bacteria, PRSB), se midió su abundancia y capacidad de solubilización in vitro. Se encontraron más unidades formadoras de colonias (UFC) en las islas de recursos en comparación con el suelo bajo el dosel de los mezquites y suelo degradado. Se aislaron nueve cepas de bacterias de las islas de recursos, las cuales presentaron capacidad de solubilizar fósforo no lábil. Seis de las cepas pertenecen a la familia Enterobacteriaceae y el resto a Pseudomonadaceae. Las cepas bacterianas aisladas, al poseer capacidad de solubilización, pueden utilizarse potencialmente como bacterias promotoras de crecimiento vegetal en proyectos de restauración y/ productivos en la región.

Palabras clave: restauración de suelos, islas de recursos, indicadores de fertilidad, bacterias solubilizadoras de fósforo



Vo.Bo. Dra. Luz Estela González de Bashan

Summary

In the Sonoran Desert, the presence of resource islands favors the establishment of other plants, this phenomenon is common in the xerophytic scrubland. As a strategy for soil control degradation, in 2004 the CIBNOR's Environmental Microbiology Group started a project in soil degradation control assisted by beneficial microorganisms in Comitán, La Paz, Baja California Sur, which was based on the establishment of the giant cardon (*Pachycereus pringlei*) in association with three legumes trees: mesquite amargo (*Prosopis articulata*), yellow palo verde or foothill palo verde (*Parkinsonia microphylla*), and blue palo verde or palo junco (*Parkinsonia florida*), simulating resource islands formation. Of the legumes planted individually or in association with the cardon, it was found that mesquite had a higher survival rate, compared to the other legumes. The present study compared fertility indicators and functionality of phosphorus solubilizing bacteria (PRSB) in the restored area under different conditions of resource islands (mature and young, depending on the mesquite's age) and mesquites planted individually, with soil that remain degraded. As fertility indicators, enzymatic activity and microbial biomass carbon were measured. Greater β -glucosidase and phosphatase activity was found in the area restored only with mesquites; however, results were similar for the area planted under both resource islands (mature and young), this suggests that the degradation of organic matter and phosphorus mineralization is similar in the restored area but presented statistically significant differences with degraded soil. No differences were found in the carbon microbial biomass between the restored area and the degraded soil. The results suggest that fertility indicators in the young resource islands are similar to those of mature islands, hence the re-establishment in soil properties can be observed in the restored area. Moreover, as an approximation of the functionality of the phosphate rock solubilizing bacteria (PRSB), its abundance and capacity to solubilize phosphorus were measured *in vitro*. More colony forming units (CFU) were found in the resource islands compared to soil under the mesquites' canopy and degraded soil. Nine bacteria strains were isolated from the resource islands, which showed the ability to solubilize non-labile phosphorus. Six of these strains belong to Enterobacteriaceae family and the rest to Pseudomonadaceae. The isolated bacterial strains, having solubilization capacity, can potentially be used as plant growth promoting bacteria in restoration and / or productive projects in the region.

Keywords: soil restoration, resource islands, fertility indicators, phosphorus solubilizing bacteria



Vo.Bo. Dra. Luz Estela González de Bashan

Dedicatoria

A Magdiel, Elvia y Fernando

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgar la beca No. 635003 para realizar mis estudios de posgrado y al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) por permitirme llevar a cabo la Maestría en Ciencias en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales.

A mi comité tutorial, Dra. Luz E. de Bashan, Dra. Blanca E. Romero López y Dra. Paola Magallón Servín, por el apoyo brindado, contribuir a mi formación académica y ser un gran ejemplo en la investigación.

Al Grupo de Microbiología Ambiental quienes continúan con el legado que ha dejado el Dr. Yoav Bashan. A Manuel Moreno Legorreta, al Dr. Oskar A. Palacios López y a la Dra. Melissa López Vela por su asesoría y a mis compañeros de laboratorio, Valeria, Edgar, Jairo, Cristina y Salvador. También a las personas que estuvieron involucradas en el proyecto de restauración de suelo: Yoav Bashan, Luz E. de Bashan, Juan Pablo Hernández, Manuel Moreno y Blanca Romero.

A Patricia Hinojosa Baltazar del Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Comparada y Genómica Funcional por su ayuda y facilitación del equipo en la determinación de actividades enzimáticas; a Manuel Salvador Trasviña Castro y a Myriam Lizzeth Hernandez de Haro del Laboratorio de Edafología por compartir su conocimiento y facilitar reactivos para la cuantificación de carbono orgánico.

Al personal de posgrado, en especial a la Dra. Gracia Gómez Anduro, Directora de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos, a Tania Verónica Núñez Valdez, secretaria del Departamento de Control Escolar y a Horacio Sandoval Gómez, responsable del Laboratorio de Cómputo, gracias por el seguimiento dado en mis actividades académicas.

A mis compañeros de maestría, por sus consejos y risas compartidas.

Muchas gracias a todos.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	v
Lista de figuras	vii
Lista de tablas	viii
Abreviaturas	ix
1. INTRODUCCIÓN	2
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Generales	4
2.2. Análisis de actividades enzimáticas	6
2.2.1. Estudios relacionados con actividades enzimáticas	8
2.3. Cuantificación del carbono microbiano	8
2.3.1 Estudios relacionados con biomasa microbiana	9
2.4. Importancia de las bacterias solubilizadoras de fosfato	9
3. JUSTIFICACIÓN	12
4. HIPOTESIS	13
5. OBJETIVOS	14
5.1. Objetivo general	14
5.2. Objetivos particulares	14
6. MATERIAL Y MÉTODOS	15
6. 1. Sitio de estudio	15
6. 2. Muestreo y tratamiento previo del suelo	15
6. 3. Análisis de indicadores de fertilidad	18
6. 3. 1. Actividad β – glucosidasa	18
6. 3. 2. Actividad fosfatasa ácida y alcalina	19
6. 3. 3. Contenido de Carbono de la Biomasa Microbiana	20
6. 4. Comunidades de bacterias solubilizadoras de fosfato	22
6. 4. 1. Aislamiento de PRSB	22
6. 4. 2. Caracterización morfológica de las colonias de las PRSB	23
6. 4. 3. Extracción de DNA de las PRSB aisladas	23

6. 5. Capacidad de solubilización de las PRSB potenciales	25
6. 5. 2. <i>Cuantificación de P soluble</i>	26
6. 5. 3. <i>Conteo bacteriano de las PRSB potenciales</i>	26
6. 6. Análisis estadísticos	27
7. RESULTADOS	28
7.1 Análisis de indicadores de fertilidad biológica	28
7.1.1. <i>Actividad enzimática de fosfatasa alcalina y ácida</i>	28
7.1.2. <i>Actividad enzimática de β – glucosidasa</i>	30
7.1.3. <i>Contenido de Carbono de Biomasa Microbiana</i>	31
7.2. Recuento de bacterias cultivables totales y PRSB potenciales	32
7.2.1. <i>Conteo de Unidades Formadoras de Colonias</i>	32
7.3. Capacidad de solubilización de las PRSB potenciales	32
7.3.1. <i>Caracterización morfológica de las colonias de las PRSB aisladas</i>	33
7.3.2. <i>Identificación de los morfotipos aislados mediante 16S rDNA</i>	34
7.3.3. Capacidad de solubilización de las PRSB potenciales	36
8. DISCUSIÓN	40
8. 1. Efectos de los indicadores de fertilidad y funcionalidad de PRSB en el suelo restaurado y suelo degradado	40
8. 2. Diferencias en las condiciones de las islas de recursos (maduras y jóvenes)	43
9. CONCLUSIONES	46

Lista de figuras

Figura 1. Sitio experimental de reforestación con especies nativas en “El Comitán”, Baja California Sur.

Figura 2. Toma de muestra compuesta de suelo (A+B=muestra compuesta). Total de muestras compuestas por condición = 6.

Figura 3. Actividad fosfatasa ácida y alcalina ($\mu\text{g } p - \text{nitrofenol} \cdot \text{g}^{-1} \text{Peso Seco} \cdot \text{h}^{-1}$) en temporada húmeda. Media (n=6) \pm error estándar. Columnas con letra minúscula y mayúscula distinta representan diferencias estadísticamente significativas entre los sitios de muestreo para fosfatasa ácida y alcalina respectivamente, de acuerdo al análisis de Tukey ($P < 0.05$); letra minúscula distinta con guión debajo indica diferencias entre fosfatasa ácida y alcalina por sitio de muestreo conforme a la prueba t para variables dependientes. M, suelo de mezquite; IR-J, suelo de las islas de recursos jóvenes; IR-M, suelo de las islas de recursos maduras; NR, suelo no restaurado.

Figura 4. Actividad de $\beta - \text{glucosidasa}$ ($\mu\text{g } p - \text{nitrofenol} \cdot \text{g}^{-1} \text{Peso Seco} \cdot \text{h}^{-1}$) en temporada húmeda. Media (n=6) \pm error estándar. Columnas con letra distinta representan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo al análisis de Tukey ($P < 0.05$). M, suelo de mezquite; IR-J, suelo de las islas de recursos jóvenes; IR-M, suelo de las islas de recursos maduras; NR, suelo no restaurado.

Figura 5. Carbono de Biomasa Microbiana ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ suelo) en temporada húmeda. Media (n=6) \pm error estándar. M, suelo de mezquite; IR-J, suelo de las islas de recursos jóvenes; IR-M, suelo de las islas de recursos maduras; NR, suelo no restaurado.

Figura 6. Índice de solubilización (Z) = diámetro del halo / diámetro de la colonia. Se realizó la prueba para cada morfotipo aislado (n =3) en medio NBRIP – Hxa con un periodo de incubación de cinco días.

Figura 7. Árbol filogenético derivado de secuencias de 16S rDNA de las cepas aisladas de las islas de recursos del área restaurada y cepas de referencia; enraizado con dos secuencias (Xanthomonadaceae bacterium clone y *Gluconobacter sphaericus*) como grupo externo, los números de acceso en GenBank se indican entre paréntesis. El árbol fue construido por el método de máxima verosimilitud (1000 repeticiones de bootstraps) de Tamura y Nei (1993) en MEGA versión 7 (Kumar *et al.*, 2015).

Figura 8. Capacidad de solubilización de las cepas aisladas en medio líquido NBRIP-Hxa, las muestras se determinaron cada 24 horas durante cinco días. A) Fósforo soluble ($\text{mg P} \cdot \text{mL}^{-1}$); B) Proteínas ($\text{mg proteínas} \cdot \text{mL}^{-1}$); C) pH.

Figura 9. Actividad de Solubilización expresada como $\text{Log}_{10} (\text{mg P} \cdot \text{mg proteínas}^{-1})$ de las cepas aisladas del sitio restaurado. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) de acuerdo a la prueba Tukey

Lista de tablas

Tabla I. Conteo bacteriano total y solubilizadoras potenciales por condición.

Tabla II. Caracterización morfológica de las colonias de las cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato crecidas en medio NBRIP- Hxa.

Tabla III. Identificación de morfotipos aislados de las bacterias solubilizadoras de fosfato del sitio restaurado mediante amplificación del 16S rDNA.

Tabla IV. Conteos directos iniciales y finales de los morfotipos aislados.

Abreviaturas

Al: aluminio

ANOVA: Análisis de Varianza

C: carbono

Ca: calcio

CBM: carbono de la biomasa microbiana

BSA: albúmina de suero bovino

BSCM: bacteria solubilizadora aislada del suelo asociado a la rizósfera de cardón bajo la influencia del mezquite

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FDA: diacetato de fluoresceína

Fe: hierro

g: fuerza centrífuga relativa

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

IR-J: isla de recurso joven

IR- M: isla de recurso madura

K: potasio

M: mezquite

MUB: Modified Universal Buffer

N: nitrógeno

NBRIP : medio National Botanical Research Institute's phosphate

NBRIP-Hxa: medio NBRIP utilizando hidroxapatita como única fuente de P

NR: suelo no restaurado

P: fósforo

pb: pares de base

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PNG: *p*-Nitrofenil- β -D-glucósido

Po: fósforo orgánico

Pi: fósforo inorgánico

PGPB: bacteria promotora de crecimiento vegetal

PRSB: bacterias solubilizadoras de fosfato

PS: peso seco

THAM: Tris buffer

TSA: agar tripticasa de soya

TSB: caldo tripticasa de soya

UFC: unidades formadoras de colonias

UNCCD: Convención de las Naciones Unidas de Lucha Contra la Desertificación

Z: índice de solubilización

1. INTRODUCCIÓN

Se denomina isla de recurso al fenómeno donde un arbusto o conjunto de arbustos (plantas nodrizas) acumulan recursos útiles, principalmente nutrientes y agua, debajo de su dosel, estimulando la actividad microbiana y por lo tanto, mejoran las condiciones para el establecimiento y desarrollo de otras especies (García *et al.*, 2018). Este fenómeno es frecuente en ecosistemas áridos y semiáridos (Flores y Jurado, 2003); mas no se limitan únicamente en estos hábitats. Una asociación común de plantas que forma islas de recursos en los desiertos se da entre leguminosas y suculentas. Gracias a la disposición de partículas de suelo en el área de las raíces y a la provisión de sombra, nutrientes y materia orgánica a otras especies, es como la leguminosa contribuye al proceso de estabilización de suelos (Bashan y de-Bashan, 2010).

En Baja California Sur la riqueza biológica ha sido afectada por los cambios en el uso del suelo, un caso particular es el de los matorrales xerófilos del Estado, en donde los asentamientos humanos y producción agrícola han impactado las interacciones biológicas de poblaciones silvestres, la estructura y diversidad de las comunidades vegetales y pérdidas funciones a nivel microbiológico, donde se ven perjudicados procesos biológicos, como la formación y estabilidad del suelo (Arriaga, 2009; Santiago-León *et al.*, 2014). Asimismo, el clima adverso característico de la región y procesos de degradación del suelo y agua acentuados por prácticas inadecuadas de manejo de suelo, son factores que hacen vulnerable a Baja California Sur ante la desertificación (Álvarez *et al.*, 2014).

De acuerdo a la UNCCD (1994), la desertificación es un proceso de degradación del suelo en climas áridos y semiáridos que resulta de varios factores, incluyendo variaciones climáticas y actividades humanas. La degradación del suelo a su vez, conlleva a la reducción o pérdida de la productividad biológica que provoca impactos ecológicos, económicos y sociales (Cheng *et al.*, 2016). En términos más amplios, la desertificación implica la disminución en la calidad del suelo, en la capacidad de generar servicios ecosistémicos y la limitación en actividades productivas (Lal, 2014), lo cual ha afectado a

un quinto de las zonas áridas en el mundo, promoviendo la pérdida de la capacidad de infiltración, cobertura vegetal, regeneración natural del suelo, contenido de materia orgánica, fertilidad y estructura del suelo (FAO, 2007).

La restauración de la vegetación es una alternativa para reducir la degradación del suelo (Bacilio *et al.*, 2006). De esta manera, en el 2004 se inició un proyecto experimental de restauración de suelos mediante el establecimiento de especies nativas asistido por microorganismos benéficos en la “Reserva Ecológica y de Investigación Laura Arriaga”, área donde la vegetación fue desbrozada durante la década de los ochentas para la construcción de una carretera, plan que posteriormente fue abandonado. El proyecto buscó una estrategia para el control de la erosión mediante la simulación de la formación de islas de recursos (Bashan *et al.*, 2009). El cardón (*Pachycereus pringlei*) es una especie predominante en el desierto Sonorense (Bashan *et al.*, 2009) y tiene la capacidad de estabilizar suelos gracias a su sistema superficial de raíces (Carrillo-García *et al.*, 2000; Bacilio *et al.*, 2006). Por ello, se sembraron leguminosas en asociación con el cardón, de tal manera que simularan islas de recursos, y sembradas individualmente. Las leguminosas actuaron como plantas nodrizas permitiendo el establecimiento del cardón a través de la provisión de humedad, sombra y disponibilidad de nutrientes (Carrillo-García *et al.*, 2000). Las leguminosas utilizadas fueron mezquite amargo (*Prosopis articulata*), palo verde (*Parkinsonia microphylla*) y palo junco (*Parkinsonia florida*) (Bashan *et al.*, 2009).

Después de quince años del inicio del proyecto de restauración, el presente trabajo evaluó las propiedades biológicas del suelo a través de indicadores de fertilidad (Dick *et al.*, 1996) en el área restaurada mediante la determinación de las actividades enzimáticas de fosfatasa y β - glucosidasa y el contenido de carbono de la biomasa microbiana. Asimismo, se estudió la comunidad de bacterias solubilizadoras de fosfato (phosphate rock solubilizing bacteria, PRSB) en el sitio restaurado, las cuales son capaces de mejorar la absorción de fósforo de las plantas mediante el mecanismo de solubilización (Jakobsen *et al.*, 2005)

Se esperó que los indicadores de fertilidad y la comunidad de bacterias solubilizadoras de fosfato fueran más abundantes en el área restaurada mediante la formación de islas de

recursos. Se distinguieron islas de recursos maduras y jóvenes, las maduras fueron aquellas donde los mezquites utilizados como referencia crecieron naturalmente y contaban con un diámetro del tronco superior a 20 cm, medido a 50 cm del suelo; y jóvenes, considerando mezquites que se sembraron a partir del proyecto de restauración, es decir, cuentan con una edad de quince años y su diámetro del tronco es inferior a 20 cm. Se compararon las islas de recursos, maduras y jóvenes, con un el área restaurada con mezquite y un suelo que permanece degradado.

2. ANTECEDENTES

2.1. Generales

La inoculación de microorganismos benéficos y la aplicación de una limitada cantidad de composta ha resultado una alternativa para potenciar el establecimiento del cardón (Carrillo-García *et al.*, 2000). Por ello, en el proyecto de restauración de suelos implementado en el 2004, la siembra de las leguminosas, los cardones y la asociación cardón – leguminosa (la cual simuló la formación de islas de recursos), se realizó bajo cinco tratamientos: 1) inoculados con micorrizas del género *Glomus* sp. y especies nativas de hongos; 2) inoculados con bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPB), en específico *Azospirillum brasilense* y *Bacillus pumilus*; 3) adicionados con composta; 4) inoculados con PGPB, micorrizas y composta y; 5) inoculación o mejora con composta. Las PGPB son un grupo de bacterias que tienen la capacidad de promover el crecimiento de una planta huésped a través de diferentes mecanismos directos e indirectos; directamente al facilitar la adquisición de nutrientes o modulando los niveles de fitohormonas ante condiciones que limitan el crecimiento vegetal; e indirectamente, al disminuir efectos inhibitorios de agentes patógenos (Glick, 1995). Las micorrizas representan la asociación simbiótica de hongos y plantas; los hongos proveen nutrientes a la planta y ésta última proporciona a los hongos carbohidratos y un microhábitat (Camargo-Ricalde *et al.*, 2012).

De gran interés es el efecto que tienen las islas de recursos sobre el microbioma del suelo. La hipótesis de la isla de recursos predice que la distribución los recursos del suelo, como N, P y agua es en forma de parches en matorrales, ecosistemas característicos zonas áridas, por lo que los microorganismos estarán presentes donde se encuentren dichos recursos (Bashan y de-Bashan, 2010). García *et al.* (2017) evaluaron en “El Comitán, La Paz, Baja California Sur” mezquites que formaban islas de recursos y su influencia con diferentes factores (diversidad y abundancia de vegetación, características del suelo y funciones fisiológicas de microorganismos). En ese trabajo encontraron que la estructura bacteriana era similar en las islas de recursos y que el factor de mayor influencia en las islas de recursos es el aporte de la materia orgánica, la cual puede favorecer la actividad metabólica bacteriana, al degradar diferentes fuentes de carbono; también concluyeron que además de

parámetros nutricionales del suelo, la actividad metabólica en las islas de recursos está altamente correlacionada con las características edáficas. Por esta razón, estudios posteriores a la implementación del proyecto de restauración se basaron en los efectos de la formación de islas de recursos (cardón bajo la influencia del mezquite) y su comparación con áreas naturales, suelos no restaurados y el cardón sembrado individualmente.

Después de 61 meses del inicio del proyecto, el área sembrada con mezquite tuvo una tasa de supervivencia mayor en comparación con el palo verde y palo junco; asimismo, se encontró que el crecimiento del cardón fue mejor bajo el dosel de las leguminosas comparado con el cardón sembrado solo. No se esperaba que los tratamientos tuvieran un efecto a largo plazo, sino que aceleraran el proceso de establecimiento de las plantas; a su vez, la planta nodriza (leguminosa) después de varios años, tiene mayor efecto que los mismos tratamientos de inoculación y adición de composta (Bashan *et al.*, 2012).

En el 2013, se realizó una evaluación sobre la abundancia y diversidad de diazótrofos, organismos que transforman N_2 en amoníaco, el cual puede ser aprovechado por las plantas (Dobbelaere *et al.*, 2003); y la fijación potencial de nitrógeno (Lopez-Lozano *et al.*, 2016). Del área restaurada, se tomaron muestras de la rizósfera del cardón solo, mezquite solo y la isla de recursos con mejor desempeño (cardón – mezquite). Como control positivo, se tomaron muestras de la rizósfera de una isla de recursos en un área natural cercana al sitio restaurado. Asimismo, se recolectaron muestras de suelo bajo *Jatropha*, especie representativa de un área degradada aledaña al proyecto de restauración (Lopez-Lozano *et al.*, 2016). A través del gen *nifH* se cuantificó la abundancia de diazótrofos, y se encontró que hay menos organismos en el área degradada en comparación del área restaurada y natural; mientras que en estos últimos dos sitios no hubo diferencias estadísticamente significativas. También la abundancia de dichos organismos fue mayor en la isla de recursos en comparación con el cardón solo. Respecto a la fijación potencial de nitrógeno, ésta fue mayor en el área restaurada y demostró ser más elevada en las islas de recursos. La diversidad de las comunidades de diazótrofos, no mostró diferencias estadísticamente significativas en el área restaurada, degradada y natural (Lopez-Lozano *et al.*, 2016).

En el 2015 se realizó un recuento de las especies sembradas y se encontró que de las tres leguminosas plantadas individualmente, el mezquite tuvo una mayor tasa de supervivencia. Para el caso del cardón, la especie tuvo una tasa de supervivencia mayor al estar bajo la influencia con alguna de las tres leguminosas que plantado individualmente, por lo que la contribución de la leguminosa como planta nodriza fue evidente. Como medida para el control de la erosión, las leguminosas sembradas individualmente funcionan como estrategia a mediano largo mientras que la formación de islas de recursos es una mejor alternativa para efectos en la estabilización de suelo a largo plazo; asimismo, la inoculación de las leguminosas y el cardón en la etapa de siembra mejoró su establecimiento, una vez que las plantas se establecieron, su supervivencia dependió de las condiciones climáticas y por los minerales depositados en el sitio donde se encuentran (Moreno *et al.*, 2017).

2.2. Análisis de actividades enzimáticas

Las enzimas presentes en el suelo son catalizadores biológicos de reacciones específicas, las cuales dependen de diferentes factores como pH, temperatura, clima, propiedades edáficas, manejo del suelo y en algunos casos, la presencia de inhibidores (Pascual *et al.*, 1998). Las actividades enzimáticas son elementales en los ciclos de nutrientes, al mineralizar y transformar la materia orgánica, así como al involucrarse en reacciones que permiten la disponibilidad de nutrientes a las plantas (Kumar *et al.*, 2013). Por lo tanto, las actividades enzimáticas proporcionan información del manejo del suelo y el impacto sobre el medio ambiente (Kumar *et al.*, 2013). A su vez, la respuesta progresiva de las actividades enzimáticas puede indicar el grado de éxito en proyectos de restauración de suelos (Zhang *et al.*, 2015; Dick *et al.*, 1996). No obstante, la medición de actividades enzimáticas debe interpretarse con precaución; estas medidas representan la máxima actividad potencial y no la actividad enzimática actual presente en el suelo porque las condiciones de incubación se eligen para asegurar la óptima tasa de catálisis; asimismo, la concentración del sustrato está en exceso e incluso algunos sustratos son artificiales por lo que no se espera que se encuentren en el suelo de forma natural; respecto al pH y la temperatura, éstos son elegidos para permitir la tasa más alta de actividad enzimática y el volumen de la reacción es tal que permite la difusión del sustrato (Tabatabai, 1994; Alef y

Nannipieri, 1995).

La mineralización del P es el proceso donde el fósforo inorgánico (Pi), en forma de PO_4 (Dick *et al.*, 1996), es liberado a partir del fósforo orgánico (Po) del suelo. El origen de éste último es de restos de animales y plantas, sintetizado por los microorganismos del suelo. Las formas más comunes de Po incluyen principalmente inositol, fosfolípidos y ácidos nucleicos (Pierzynski *et al.*, 2005); asimismo, el Po constituye una reserva importante de P inmovilizado (Sharma *et al.*, 2013). Una vez que el Pi ha sido transformado, el Pi se encuentra disponible para las plantas. Se ha sugerido que la mineralización del Po puede ser controlada por la actividad fosfatasa extracelular y periplasmática, producida por las raíces de las plantas, micorrizas y microorganismos; la tasa de producción depende de la demanda de P en relación a la disponibilidad de fósforo inorgánico (Pi) en el suelo (Magid *et al.*, 1996, Condrón *et al.*, 2005; Olander y Vitousek, 2000). Además de estar presente en la transformación de P, la actividad fosfatasa está involucrada en el reciclaje de distintas formas de P que son aprovechados por las plantas y microorganismos; por ende, la fosfatasa afecta el ciclo biogeoquímico del suelo y la nutrición vegetal (Acosta-Martínez y Tabatabai, 2011).

Un tipo de fosfatasas son las fosfomonoesterasas que hidrolizan los fosfomonoésteres como β - glicerofosfato, fenilfosfato y *p*- nitrofenil fosfato, los cuales son compuestos orgánicos comunes en el suelo (Acosta-Martinez y Tabatabai, 2011; Rodríguez y Fraga, 1999). Las fosfomonoesterasas se clasifican en ácida y en alcalina según su actividad óptima a pH ácido y alcalino, respectivamente (Doran y Jones, 1996). La medición de ambas puede proporcionar información de la actividad fosfatasa total relacionada con reacciones hidrolíticas de las fosfomonoesterasas (Alef *et al.*, 1995). Derivado de lo anterior, se evaluó la actividad fosfatasa ácida y alcalina en el suelo del área restaurada como indicador potencial y representativo de la mineralización del P.

Por otra parte, los carbohidratos son importantes en el ciclo de vida de los microorganismos, al proporcionar fuentes de carbono y energía. Las enzimas que hidrolizan carbohidratos son de gran relevancia en la mineralización y degradación de compuestos

orgánicos, así como en la formación y desarrollo de materia orgánica y componentes estructurales de las plantas (Deng y Popova, 2011).

Finalmente, para evaluar la degradación de la materia orgánica se estudió la enzima β – glucosidasa, involucrada en la conversión de disacáridos y oligosacáridos a azúcares simples (Deng y Popova, 2011), en específico, limita la velocidad de reacción en la degradación de productos de la celulosa (Alef y Nannipieri, 1995a), es decir, su actividad es indicador potencial de la descomposición de materia orgánica. La actividad β – glucosidasa aumenta a mayor biomasa microbiana, lo cual puede reflejar la habilidad del suelo por desintegrar la materia orgánica y aumentar la disponibilidad de nutrientes (Stott *et al.*, 2010). Asimismo, la β – glucosidasa representa un indicador temprano de los cambios en el carbono orgánico del suelo (Acosta – Martínez *et al.*, 2003).

2.2.1. Estudios relacionados con actividades enzimáticas

En el desierto de Tengger, China a partir de 1950 se inició el proyecto de restauración de áreas desérticas mediante la implementación de barreras –entierre de paja en cuadrantes y plantación en años posteriores de especies arbustivas para evitar la movilización de arena (Zhang *et al.*, 2015). Se evaluaron algunas propiedades químicas del suelo incluyendo el contenido de nutrientes y actividades de deshidrogenasa, catalasa, α y β – glucosidasa, proteasa y fosfatasa para identificar los cambios en las propiedades del suelo en diferentes estadios del proyecto (Zhang *et al.*, 2015). La mayoría de las actividades enzimáticas, con excepción de la catalasa, incrementaron significativamente conforme el periodo de restauración fue en aumento (Zhang *et al.*, 2015). Este proyecto fomentó la transformación de dunas en un ecosistema desértico más estable con la formación de microhábitats (Zhang *et al.*, 2015).

2.3. Cuantificación del carbono microbiano

La biomasa microbiana es un indicador temprano de los cambios en las características del suelo. Su medición ha sido útil en estudios relacionados con la conservación de suelos. Cuando el suelo es fumigado con cloroformo, las membranas celulares de los microorganismos son lisiadas parcialmente. Después de un periodo de incubación, la

biomasa puede ser extraída, la cual proviene de la lisis microbiana y que es proporcional a la biomasa microbiana original (Joergensen y Brooks, 2005). El C de los microorganismos que fueron sometidos a la fumigación es fácilmente mineralizado a CO₂, por lo que la diferencia del CO₂ del suelo fumigado y no fumigado (control) es la medida del carbono de la biomasa microbiana (Alessi *et al.*, 2011).

2.3.1 Estudios relacionados con biomasa microbiana

Como antecedente, Ros *et al.* (2003) realizaron un trabajo de remediación de suelos agrícolas abandonados en Alcantarilla, España, una región semiárida con una precipitación anual promedio de 200–300 mm. El experimento se basó en la adición de mejoradores orgánicos provenientes de residuos orgánicos urbanos en el suelo perturbado. El suelo adicionado con estos mejoradores aumentó significativamente el carbono de la biomasa microbiana en 24 meses, debido a que la incorporación de material fácilmente degradable aumenta el contenido de carbono, el cual es una fuente de nutriente que promueve mayor actividad microbiana en el suelo mejorado en comparación con el sitio degradado. Como otro antecedente, Putthoff *et al.* (2006) llevaron a cabo un programa de restauración de pastizales en California, Estados Unidos, el cual se basó en la creación de comunidades vegetales perennes semejantes a los pastizales nativos previos al asentamiento de especies anuales exóticas. Se midió el contenido de carbono de la biomasa microbiana en el suelo desnudo donde estuvo sembrado especies exóticas, en suelo sembrado con especies exóticas y en suelo restaurado con pastos nativos. Se observó un mayor contenido de este indicador en el suelo restaurado en comparación con el suelo desnudo. A su vez, el carbono de biomasa microbiana en el suelo sembrado con especies exóticas y el suelo restaurado fue similar.

2.4. Importancia de las bacterias solubilizadoras de fosfato

El fósforo es el segundo macronutriente más importante para el crecimiento y desarrollo de las plantas, está involucrado en diferentes etapas de desarrollo vegetal como en la formación de raíces y tallos, formación de flor y semilla, maduración de cultivos y resistencia a enfermedades (Khan *et al.*, 2009). Metabólicamente, el P está relacionado con

los procesos de transferencia de energía, fotosíntesis, respiración, estructura de las células, entre otros (Sharma, *et al.*, 2013).

En el suelo, el P está presente como Po y Pi; sin embargo, solo una pequeña fracción se encuentra en una forma directamente disponible (H_2PO_4^- y HPO_4^{2-}) para que plantas y microorganismos lo puedan absorber (Doolette y Smernik, 2011). Una importante característica de la biogeoquímica del P es que únicamente el 1 % del P total del suelo es incorporado a la biomasa de las plantas en cada temporada de crecimiento, lo cual refleja la baja disponibilidad del P para la absorción de la planta (Blake *et al.*, 2000; Quiquampoix y Mousain, 2005; Jonas y Oburger, 2011) Más aún, el bajo contenido de P en el material parental, así como la alta reactividad del Pi que resulta de una fuerte retención del P en la matriz de suelo, son algunos de los factores de la baja disponibilidad de este elemento para las plantas (Jones y Oburger, 2011). Derivado de lo anterior, el P representa un factor limitante en el crecimiento vegetal (Rodríguez *et al.*, 2006).

El Pi en el suelo se encuentra principalmente insoluble en depósitos minerales y es común que se encuentre asociado a óxidos de Fe, Al y Mn. (Rodríguez y Fraga, 1999; Rodríguez *et al.*, 2006) mientras que el Po, como se ha descrito anteriormente, está asociado a la materia orgánica. Para transformar el fósforo insoluble, tanto orgánico como inorgánico, las bacterias solubilizadoras de fosfato mediante procesos de mineralización y solubilización (Rodríguez y Fraga, 1999) facilitan la absorción de P asimilable a las raíces de las plantas (Sharma *et al.*, 2013).

La producción de ácidos orgánicos por parte de los microorganismos es reconocido como el principal mecanismo de solubilización de P inorgánico; los ácidos orgánicos quelan los cationes, principalmente iones de Fe, Al y Ca adheridos al fosfato mineral, mediante sus grupos hidroxilos y carboxilos, provocando la acidificación del medio extracelular y la subsecuente liberación de fósforo (Zaidi, *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2013). Un resultado del fenotipo característico de bacterias Gram negativas que disuelven fosfatos de calcio, es la producción de ácido glucónico y 2- cetoglucónico en el espacio periplasmático vía de la oxidación directa de glucosa (Goldstein, 1996; Zhao *et al.*, 2014); no obstante, otros ácidos

como el ácido láctico, isobutírico, glicólico, oxálico, malónico y succínico también han sido reportados en diferentes cepas (Rodríguez y Fraga, 1999).

Illmer y Schinner (1992) no encontraron correlación entre la disminución del pH y la cantidad de P solubilizado, sugiriendo que la producción de ácidos orgánicos no es el único mecanismo de solubilización de P. La producción de sustancias quelantes por parte de los microorganismos y ácidos inorgánicos como sulfhídrico, carbónico y nítrico, así como la liberación de enzimas y consecuente acidificación en medio que contiene lecitina, y la asimilación de cationes y excreción de H^+ , han sido considerados como otros mecanismos de solubilización (Rodríguez y Fraga, 1999; Hopkins y Whiting, 1916; Zhu *et al.*, 2011; Alori *et al.*, 2017).

Se ha encontrado que cepas de los géneros *Pseudomonas* (Wang *et al.*, 2010; Tani *et al.*, 2011), *Bacillus* (Zayed, 2012; David *et al.*, 2014), *Rhizobium* (Tajini *et al.*, 2012), *Burkholderia* (Mamta *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2014), *Agrobacterium* (Belimov *et al.*, 1995), *Enterobacter* (Kim *et al.*, 1998; Chung *et al.*, 2005) y *Flavobacterium* (Barea *et al.*, 1976) tienen la capacidad de solubilizar compuestos inorgánicos fosfatados (Rodríguez y Fraga, 1999).

En este trabajo se evaluaron algunos indicadores de fertilidad y se buscó conocer la funcionalidad de la comunidad de bacterias solubilizadoras de fosfato cultivables en el área restaurada mediante la formación de islas de recursos y sembrada únicamente con mezquite para contrastar los resultados con un suelo degradado, de tal manera que se determinara si existen cambios en las propiedades del suelo derivado del proyecto de restauración.

3. JUSTIFICACIÓN

La restauración de suelos erosionados a través del establecimiento de islas de recursos asistido por microorganismos es una alternativa para promover la revegetación del ecosistema y mejorar la fertilidad del suelo, promoviendo un dinamismo en el microbioma y su capacidad de aumentar la materia orgánica y disponibilidad de nutrientes. Asimismo, esta alternativa fomenta cambios en las propiedades del suelo tales como evitar la pérdida de nutrientes, aumentar la capacidad de filtración y la aireación en el suelo.

El desierto de Sonora, en Baja California Sur es vulnerable a la erosión del suelo por causas naturales y cambios de uso de suelo derivados principalmente por asentamientos urbanos y prácticas inadecuadas en la producción agrícola, promoviendo de esta manera la degradación del suelo. El proyecto de restauración de suelos en El Comitán, iniciado por el Grupo de Microbiología Ambiental del CIBNOR en 2004, representa una estrategia para la restauración del ecosistema. Asimismo, puede potencialmente representar un mecanismo de mitigación en áreas que han sido abandonadas después de su explotación.

El análisis de algunos indicadores de fertilidad y una aproximación a la comunidad de bacterias solubilizadoras de fosfato en el área restaurada pueden proporcionar información sobre la actividad microbiana del suelo y su impacto en el ciclo de nutrientes. Asimismo, las cepas aisladas que presenten actividad de solubilización pueden estudiarse más adelante para aplicarse en futuros proyectos de restauración y/o producción en la región.

4. HIPOTESIS

Si el fenómeno de islas de recursos modifica favorablemente las condiciones biológicas y fisicoquímicas del suelo, entonces, se espera encontrar un efecto diferencial en el restablecimiento de los indicadores de fertilidad de suelo y la abundancia y funcionalidad de bacterias solubilizadoras de fósforo en comparación con suelos degradados.

4.1. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Es posible que la formación de islas de recursos como estrategia de restauración de suelos modifique la fertilidad y promueva la funcionalidad de comunidades bacterianas solubilizadoras de fosfatos?

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Comparar los indicadores de fertilidad y funcionalidad de bacterias solubilizadoras de fósforo en suelos bajo diferentes condiciones de islas de recursos con suelos que permanecen degradados.

5.2. Objetivos particulares

- a. Cuantificar y comparar las actividades fosfatasa y b-glucosidasa, así como el carbono de biomasa microbiana como indicadores de la fertilidad en suelos con diferentes condiciones de islas de recursos y suelos que permanecen degradados
- b. Aislar e identificar bacterias solubilizadoras de fósforo como una aproximación de la funcionalidad de estas bacterias en suelos con diferentes condiciones de islas de recursos y suelos que permanecen degradados.
- c. Cuantificar la capacidad de solubilización in vitro de fuentes de fósforo no lábiles en las bacterias solubilizadoras.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6. 1. Sitio de estudio

Se trabajó en un área sujeta a restauración desde el 2004 dentro de la “Reserva Ecológica y de Investigación Laura Arriaga”, ubicada a 17 km al noreste de La Paz, Baja California Sur (24° 07' 31.91" al norte, 110° 25' 41.80" al oeste) la cual cuenta con una superficie de 2000 m² y se encuentra sobre una planicie costera aluvial derivada del granito erosionado de la Sierra de la Laguna (Maya y Guzmán, 1998). La vegetación es matorral sarcocaulé (León de la Luz *et al.*, 2000) en el cual abundan plantas con tallos carnosos y también predominan las leguminosas. La precipitación promedio anual de la región es de 180 mm, la cual proviene principalmente de las lluvias tropicales de verano (León de la luz *et al.*, 1996). La sequía prolongada, la escasez hídrica, las altas temperaturas y la elevada irradiación solar del desierto son los principales factores que impactan en el crecimiento y desarrollo de la vegetación (Flores y Jurado, 2003).

6. 2. Muestreo y tratamiento previo del suelo

La evaluación de los indicadores de fertilidad y funcionalidad de PRSB en el área restaurada se basó en la comparación de diferentes formas de asociación cardón – mezquite que forman islas de recursos presentes en el sitio experimental. Las islas de recursos se clasificaron en maduras y jóvenes (Anexo 1): se considera isla de recursos madura cuando el diámetro del tronco del mezquite que formaba la asociación era igual o mayor a 20 cm (medida tomada 50 cm arriba del suelo), e isla de recursos joven, cuando los mezquites en asociación con el cardón que fueron plantados a partir del proyecto de restauración, es decir, poseen 15 años de edad. A su vez, ambas islas (maduras y jóvenes) fueron contrastadas con el área restaurada únicamente con el mezquite y un área degradada dentro del sitio experimental.

Se consideraron cuatro condiciones para los indicadores de fertilidad y comunidad de bacterias solubilizadoras de fosfato: 1) suelo bajo las islas de recursos maduras, donde los mezquites crecieron naturalmente y sus edades son superiores a quince años 2) suelo debajo de las islas de recursos jóvenes, considerando mezquites que fueron plantados en el 2004;

3) suelo donde únicamente se encuentra plantados mezquites; y 4) suelo de un área degradada. Esta última área, anteriormente fue restaurada mediante la siembra de palo junco, sin embargo, las plantas no prosperaron, por lo tanto, ésta área representa una superficie que continúa degradada.

Para la toma de las muestras del suelo asociado a la rizósfera de las plantas en estudio, en la condición 1, se recolectó suelo proveniente del área señalizada como “cardón y palo verde”, área donde se encuentran los mezquites silvestres maduros, es decir, mezquites establecidos y desarrollados de maneta natural previo a la implementación del proyecto de restauración (Fig.1). Las áreas para las muestras de suelo para las condiciones 2 y 3, están señalizadas como “cardón y mezquite” y “mezquite”, respectivamente (Fig.1). Para la condición 4, se tomaron muestras de suelo sin vegetación aleatorias dentro del sitio señalizado como “palo junco”.

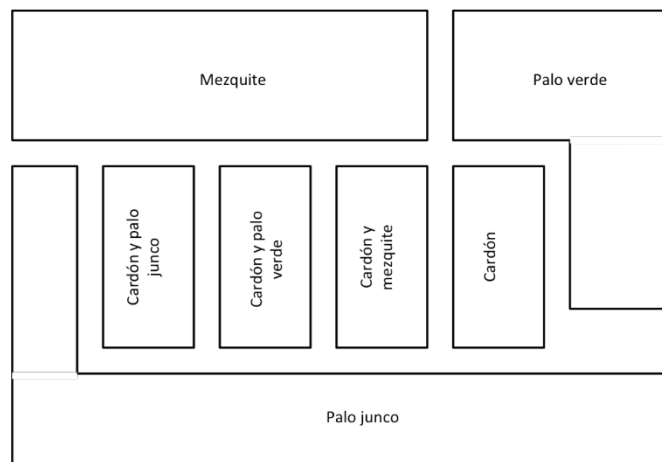


Figura 1. Sitio experimental de reforestación con especies nativas en “El Comitán”, Baja California Sur.

Para determinar las actividades enzimáticas y carbono de la biomasa microbiana, se seleccionaron aleatoriamente seis cardones para las condiciones 1 y 2 en las áreas antes descritas (Fig. 1). En cada cardón, se midieron 30 cm a partir de la planta y se tomó un primer punto de muestra de suelo utilizando una pala jardinera sin rebasar una profundidad

de 15 cm. Un segundo punto de suelo se tomó del extremo contrario del primer punto de muestra (Fig. 2). Ambos puntos se mezclaron para formar una muestra compuesta. Para la condición 3, se realizó el mismo procedimiento excepto en vez de cardones, se seleccionaron mezquites al azar. Total de muestras compuestas por condición = 6.

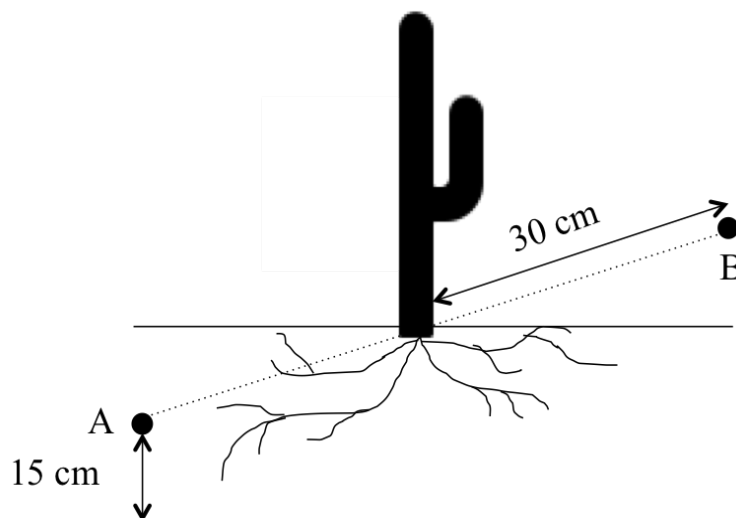


Figura 3. Toma de muestra compuesta de suelo (A+B=muestra compuesta). Total de muestras compuestas por condición = 6.

Para el aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfato, en la condición 1, se seleccionaron tres mezquites silvestres maduros. Una vez que fueron seleccionados, se recolectaron muestras de suelo alrededor de un cardón aleatorio bajo el dosel del mezquite y un segundo cardón al azar fuera del dosel del mezquite. La toma de muestras del suelo se realizó de la misma forma descrita para los indicadores de fertilidad (Fig. 2). En la condición 2, se seleccionaron aleatoriamente tres mezquites sembrados a partir del 2004 y se tomaron las muestras de suelo de la misma forma que en la condición 1. Para la condición 3, se recolectaron muestras compuestas de seis mezquites siguiendo los pasos de la Fig. 2. El total de muestras compuestas fueron: tres muestras compuestas de suelo para las islas de recursos (maduras y jóvenes) dentro del dosel de mezquite respectivamente; tres muestras compuestas de suelo fuera del dosel de mezquite para las islas de recursos

(maduras y jóvenes) respectivamente; seis muestras compuestas para suelo debajo de los mezquites; y seis muestras compuestas de suelo para el área degradada.

Las muestras de suelo se transportaron al laboratorio en una hielera y permanecieron a 4°C hasta su análisis. Previo al análisis de indicadores de fertilidad, el suelo se tamizó con una malla de 2 mm. La colecta de muestras de suelo para los indicadores de fertilidad se llevó a cabo en noviembre de 2018 y para la comunidad de bacterias solubilizadoras de fosfato se realizaron en febrero de 2019, ambos muestreos estuvieron dentro de los meses pertenecientes a la temporada húmeda de la región.

6. 3. Análisis de indicadores de fertilidad

Se cuantificó la actividad enzimática β – glucosidasa y el carbono de biomasa microbiana como aproximación a la degradación de materia orgánica; para determinar la mineralización de fosfato se midió la actividad fosfatasa..

6. 3. 1. Actividad β – glucosidasa

Para la determinación de la potencial actividad de β – glucosidasa, se siguió la metodología de Eivazi y Tabatabai (1988). Este método está basado en la determinación del *p* – nitrofenol liberado después de la incubación del suelo con *p* – nitrofenil- β -D-glucosidasa (Deng y Popova, 2011).

A un tubo Corning, conteniendo 1 g de suelo, se agregaron 0.2 mL de tolueno, se mezclaron y se dejó asentar la mezcla por 15 minutos en la campana de extracción. Después se agregaron 4 mL de modified universal buffer (MUB) (Anexo 2) y 1 mL de la solución *p*-Nitrofenil- β -D-glucósido (PNG) (50 mM), se tapó, mezcló e incubó a 37°C (VWR Unstirred Water Bath 89032-200) por una hora. Posteriormente, se agregaron 1 mL de CaCl₂ (0.5 M) y 4 mL de THAM (Trizma base ® Sigma – Aldrich) (1000 mM, pH 12), se mezcló el contenido y se filtró la suspensión. Para determinar la cantidad de *p*-nitrofenol liberado, se midió la absorbancia a 405 nm en el espectrofotómetro de microplacas Thermo Scientific Varioskan ® Flash. Se agregaron 300 μ L del filtrado a un pozo de la microplaca (Greiner CELLSTAR® 96 pozos, fondo plano) por cada muestra y por triplicado. Para la

curva de calibración, se diluyó 1 mL de la solución estándar de *p* – nitrofenol ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de agua desionizada) en agua desionizada, se aforó a 100 mL y se mezcló vigorosamente. Se agregaron 0, 1, 2, 3, 4 y 5 mL de la solución estándar diluida (contienen 0, 100, 200, 300, 400 y 500 nmol de *p* – nitrofenol) con agua en tubos Corning, se ajustó el volumen de la solución a 5 mL en cada tubo con la misma agua y se agregaron el CaCl_2 (0.5 M) y THAM (1000 mM, pH 12), como se ha descrito previamente. Finalmente, los controles llevan el mismo procedimiento, pero se agregó la solución PNG al final de la reacción. Cuando el color amarillo de los filtrados era muy intenso, se diluyó 1:1 con MUB y THAM hasta que la lectura de la absorbancia estuviera dentro de la curva de calibración. La actividad enzimática se expresó en $\mu\text{mol } p\text{-nitrofenol } \text{g}^{-1} \text{ suelo } \text{h}^{-1}$.

$$\text{Actividad } \beta\text{-glucosidasa } (\mu\text{g } p\text{-Nitrofenol } \text{g}^{-1} \text{ PS } \text{h}^{-1}) = \frac{C \times v}{PS \times PM \times t} \quad (1)$$

Donde C es la concentración de *p* – nitrofenol medida ($\mu\text{g mL}^{-1}$ del filtrado), PS es el peso seco de 1 g de suelo, *v* es el volumen total de la suspensión del suelo, PM es el peso de la muestra (1 g) y *t* es el tiempo de incubación en horas (1 h).

6. 3. 2. Actividad fosfatasa ácida y alcalina

Para esta actividad enzimática se consideró la metodología descrita por Tabatabai y Bremner (1969) y Eivazi y Tabatabai (1977), la cual se basa en la liberación de *p*-nitrofenol tras la incubación del suelo con *p* – nitrofenil fosfato (Acosta-Martínez y Tabatabai, 2011).

En un tubo Corning, se agregó 1 g de suelo, 0.2 mL de tolueno, 4 mL de MUB (Anexo 2) (pH 6.5 para el ensayo de fosfatasa ácida o pH 11 para el ensayo de fosfatasa alcalina), 1 mL de la solución de PNG (0.05 M) hecha con el MUB correspondiente y se agitó el tubo por unos segundos. Se tapó el tubo y se incubó a 37 °C (VWR Unstirred Water Bath 89032-200) por una hora. Después de la incubación, se agregaron 1 mL de la solución de CaCl_2 (0.5 M) y 4 mL de la solución de NaOH (0.5 M), se mezcló el contenido y filtró. Un control se realizó para cada muestra de suelo, se llevó a cabo el mismo procedimiento, pero

la solución PNG se agregó después de adicionar el CaCl_2 (0.5 M) y NaOH (0.5 M) (inmediatamente antes de filtrar la suspensión del suelo). Se midió la intensidad del color amarillo del filtrado en el espectrofotómetro de microplacas Thermo Scientific Varioskan® Flash a 410 nm, al agregar 300 μL del sobrenadante a un pozo de la microplaca (Greiner CELLSTAR® 96 pozos, fondo plano), este procedimiento se realizó por triplicado para cada muestra. Si la intensidad del color del filtrado excedía los 50 μg de la solución estándar de *p* – nitrofenol, una alícuota del filtrado se diluyó con agua hasta que la lectura estuviera dentro de los límites de la curva de calibración.

Para la curva de calibración, se diluyó 1 mL de la solución estándar de *p* – nitrofenol (revisar β – glucosidasa) con agua, se aforó a 100 mL y se mezcló vigorosamente. Se pipetearon 0, 1, 2, 3, 4 y 5 mL de la alícuota de la solución estándar diluida en tubos Corning (contienen 0, 10, 20, 30, 40 y 50 μg de *p* – nitrofenol respectivamente), se ajustó el volumen a 5 mL agregando agua destilada y se siguió el procedimiento antes descrito después de la incubación de las muestras.

La cantidad de *p* –nitrofenol liberado por mililitro del filtrado se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad fosfatasa } (\mu\text{g } p\text{-Nitrofenol } g^{-1} PS h^{-1}) = \frac{C \times v}{PS \times PM \times t} \quad (2)$$

Donde C es la concentración de *p* – nitrofenol medida ($\mu\text{g mL}^{-1}$ del filtrado), PS es el peso seco de 1 g de suelo, *v* es el volumen total de la suspensión del suelo, PM es el peso de la muestra (1 g) y *t* es el tiempo de incubación en horas (1 h).

6. 3. 3. Contenido de Carbono de la Biomasa Microbiana

El método fumigación – extracción es comúnmente utilizado para la medición de la CBM. La metodología a utilizar ha sido descrita por Vance *et al.* (1987) y modificada por Joergensen y Brooks (2005); se basa en el principio de la fumigación del suelo mediante cloroformo, el efecto es la ruptura parcial de las membranas celulares de los

microorganismos del suelo. Derivado de lo anterior, una parte de la BM puede ser extraída del suelo fumigado y proceder al cálculo del contenido de carbono de biomasa microbiana.

Para esta técnica, se tomaron 50 g de suelo húmedo, de los cuales, 25 g se sometieron a fumigación con cloroformo libre de etanol (muestra fumigada) y los otros 25 g no se incubaron con CHCl_3 (muestra no fumigada). Para la muestra fumigada, en un vaso de precipitados de 50 mL, se pusieron los 25 g de suelo, posteriormente, el vaso se introdujo en un desecador junto con 25 mL de cloroformo, cal sodada y un pañuelo húmedo. Para provocar la atmósfera de CHCl_3 , se agregaron perlas de borosilicato al vaso con cloroformo, de esta manera se promovió una rápida ebullición del solvente. Una vez que comenzó a bullir, se retiró el aire del desecador para formar un vacío y propiciar la atmósfera de CHCl_3 . Se incubó la muestra de suelo en el desecador en la oscuridad por 24 h a 25°C . Después de este periodo, se extrajo el cloroformo remanente repetidamente con la bomba de vacío (seis repeticiones por dos minutos). La muestra no fumigada se puso a incubar a temperatura ambiente en un segundo desecador. Posteriormente, se procedió a extraer la muestra de suelo con 100 mL de K_2SO_4 (0.5 M, relación 4:1 de la solución extractante : suelo), se agitó a 175 rpm por 1 h. Se repitió la extracción con la muestra no fumigada. Los extractos de la muestra fumigada y no fumigada se centrifugaron por 10 minutos a 6000 rpm (Hermle Z 200A Centrifuge) y después se filtraron con papel Whatman No. 41 y se almacenaron a -20°C .

El contenido de la biomasa microbiana de C de la muestras fumigadas y no fumigadas se midió a través de la digestión u oxidación del dicromato de potasio (Vance *et al.*, 1987) la cantidad de dicromato residual fue calculado con su titulación al cambiar de un color violeta a verde oscuro. Para ello, se mezclaron 2 mL de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (66.7 mM), 10 mL de H_2SO_4 y 8 mL del extracto del suelo (muestra fumigada y no fumigada) en un vaso de precipitados de 250 mL, se agitó ligeramente por unos segundos y dejar enfriar por 30 min. Después, se agregaron 25 mL de agua destilada y 5 mL de H_3PO_4 . Para el “hot blank”, se realizó el mismo procedimiento antes descrito pero sin el extracto de suelo, en vez se agregaron 8 mL de K_2SO_4 (0.5 M). Para el “cold blank”, únicamente se agregaron los reactivos de la digestión: 2 mL de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y 10 mL de una mezcla de H_2SO_4 , se agitó

ligeramente por unos segundos y se dejó enfriar por 30 min. Después, se agregaron 25 mL de agua destilada y 5 mL de H₃PO₄. Finalmente, los blancos y las muestras fumigadas y no fumigadas se sometieron a la titulación con sulfato de amonio ferroso hexahidratado ((NH₄)₂Fe(SO₄)₂ · 6H₂O, 0.033 M) utilizando como solución indicadora, 5 gotas de ferroína.

Para el cálculo del C orgánico extraíble para la muestra fumigada y no fumigada se utilizó la siguiente fórmula:

$$C (\mu\text{g g}^{-1} \text{ suelo}) = \frac{(HB - S) \times N \times E \times VD \times (VK + SW) \times 1000}{CB \times VS \times PS} \quad (3)$$

Donde HB es el consumo del “Hot Blank”, S es el consumo de la muestra (mL), N es la normalidad del K₂Cr₂O₇, E es 3 (conversión de Cr(+VI) a Cr(+III)), VD es el volumen agregado de K₂Cr₂O₇ (mL), VS es el volumen de la muestra (mL), VK es el volumen del K₂SO₄, CB es el consumo del “Cold Blank”, SW es la cantidad de agua en la muestra (mL) y PS es el peso seco de la muestra (g).

Finalmente, para obtener el contenido de Carbono de la Biomasa Microbiana (CBM) se utilizó la siguiente ecuación:

$$CBM = \frac{C_{\text{orgánico extraíble fumigado}} - C_{\text{orgánico extraíble no fumigado}}}{k_{EC}} \quad (4)$$

Donde k_{EC} es 0.38 (Vance *et al.*, 1987).

6. 4. Comunidades de bacterias solubilizadoras de fosfato

6. 4. 1. Aislamiento de PRSB

Las PRSB de la rizósfera fueron aisladas al mezclar 2 g de segmentos frescos de raíz (aproximadamente 0.5 a 1 cm de longitud) en 20 mL de solución salina (NaCl 0.85% [p/v]) y se prepararon diluciones seriadas (1:10) hasta 10⁻⁴. Posteriormente, se plaqueó en un medio de doble capa de NBRIP agar (National Botanical Research Institute’s phosphate growth medium) (Magallón, 2013; Nautiyal, 1990). Para 1 L de este medio, se adicionan 10

g de glucosa, 5 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.25g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 g de KCl, 0.1 g de $(NH_4)_2SO_4$ y 15 g de agar, el pH se ajustó a 7 con KOH (1 N). Se vertieron 15 mL de NBRIP agar sin fuente de fósforo en una caja de Petri de 9 cm. Una vez solidificado, se adicionó la segunda capa de 15 mL de NBRIP agar con $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de fosfato tricálcico y en lugar de agar al 1.5%, se utilizó al 1%. La doble capa reduce el tiempo de incubación y mejora la evaluación visual del halo de solubilización (Magallón, 2013). Se realizaron cuatro replicas por muestra (seis muestras por condición; total de placas = 96). Las placas se dejaron incubando por 5 días a 28°C . Después del periodo de incubación se procedió al conteo de bacterias totales y de bacterias potenciales de solubilizadoras de fosfato (cultivables) que presentaran la formación de un halo.

Aquellas bacterias que fueron aisladas y capaces de solubilizar fosfato tricálcico, se sembraron al menos 3 veces en el medio de doble capa de NBRIP. Para no sobrestimar la capacidad de solubilización, las bacterias aisladas posteriormente fueron sembradas en NBRIP utilizando hidroxiapatita ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) como única fuente de P (NBRIP-Hxa). Se dieron varios pases en este medio hasta obtener las cepas puras.

6. 4. 2. Caracterización morfológica de las colonias de las PRSB

Para la caracterización morfológica de las bacterias solubilizadoras de fosfato, se siguió la metodología descrita por Pérez *et al.* (2007). El medio que se utilizó para la caracterización morfológica y el índice de solubilización ($Z = \text{diámetro del halo} / \text{diámetro de la colonia}$) de los morfotipos aislados fue NBRIP-Hxa.

6. 4. 3. Extracción de DNA de las PRSB aisladas

La metodología utilizada para la extracción de DNA está basada en Neumann *et al.* (1992) modificada por Cheng y Jiang (2006). Un mL de la suspensión celular se centrifugó a 8000 g por 2 min (Eppendorf Centrifuge 5410) y se descartó el sobrenadante. Se lavó el pellet (x2) con 400 μL de STE buffer (100 mM de NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH 8) y se centrifugó a 8000 g por 2 min y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 200 μL de TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH 8) pero en este caso, se utilizó como solución de rehidratación EDTA. Se agregaron 100 μL de Tris saturado con

fenol (pH 8), se tapó el tubo Eppendorf con parafilm y se pasó por el vórtex durante 60 s para lisar las células. Se centrifugó a 13,000 g por 5 min a 4°C para separar la fase acuosa de la fase orgánica. Después, 160 µL de la fase acuosa superior se transfirieron cuidadosamente a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se adicionaron 40 µL de la solución de rehidratación de DNA y se mezclaron con 100 µL de cloroformo. Se centrifugó a 13,000 g por 5 min. El lisado debe ser purificado por extracción con cloroformo hasta que la interfase blanca no esté presente. Por lo tanto, se repitió la transferencia de la fase acuosa y la posterior adición de la solución de rehidratación de DNA y cloroformo hasta que la interfase no se visualizara. Finalmente, 100 µL de la fase acuosa se transfirieron a un nuevo tubo y se guardó el DNA a -20°C.

Para la electroforesis, las condiciones del gel (agarosa al 1.5%) para cada pozo fueron las siguientes: 2 µL de SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain , 2 µL de 1 kb para la escalera y 4 µL de la muestra. Se dejó corriendo el gel a 100 V durante una hora y para su fotodocumentación se utilizó el Bio- Rad Gel Doc XR+.

6. 4. 4. Amplificación de 16S rDNA para la identificación de las PRSB aisladas

Se utilizó el kit GoTaq® G2 DNA Polymerase para la amplificación del 16S rDNA de cada morfotipo aislado. Se realizaron cinco reacciones por morfotipo, adicionando 62.5 µL de G2 (Hot Start), 42.5 µL de MilliQ Water y 10 µL de primer 16SFull en un tubo Eppendorf de 2 mL para el Master Mix. Se agregaron 23 µL de este último en 5 tubos Eppendorf de 200 µL y posteriormente se agregaron 2 µL de agua para el blanco y 2 µL de DNA para los cuatro tubos restantes. El PCR fue realizado en el termociclador Eppendorf AG 22331 Hamburg, Germany. Las condiciones de PCR fueron: 95 °C (2 min), seguido por 30 ciclos de 95 °C (1 min), 60 °C (45 s), 72 °C (20 s), y un ciclo adicional de 72 °C (5 min) para terminar la elongación.

Para la electroforesis, se preparó gel de agarosa al 1.5% y se adicionaron en cada pozo 2 µL de SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain, 4 µL de DNA y 2 µL de 100 pb para la escalera. Se corrió el gel a 100 V por una hora y para la fotodocumentación se utilizó el Bio- Rad Gel Doc XR+.

Los productos de PCR de cada cepa se mandaron a secuenciar a GENEWIX®. La revisión y el análisis de las secuencias obtenidas se llevo a cabo mediante el programa Geneious y se utilizó la base de datos de Gen Bank para la asignación de identidad. Posteriormente, se construyó el árbol filogenético con el método de máxima verosimilitud en MEGA7.

6. 5. Capacidad de solubilización de las PRSB potenciales

Se sembraron las nueve cepas aisladas en TSA al 100% por 24 horas y se tomó una asada de cada una de ellas para el inóculo, el cual se dejó incubando por la noche en matraces de 250 mL con 100 mL de TSB al 10%. Después de aproximadamente 10 horas, se tomaron 20 mL del inóculo, se centrifugaron por 10 min a 2400 g (IEC HN-SII Centrifuge) y se realizaron dos lavados con NaCl al 0.85% para cada matraz. El botón celular se resuspendió y ajustó la DO_{600nm} a 0.4 con solución salina, lo cual equivale aproximadamente a 1×10^8 UFC (Unidades Formadoras de Colonias) $\cdot mL^{-1}$. Posteriormente se procedió al conteo de células bacterianas iniciales y se incorporó 1 mL de la suspensión ajustada en un matraz de 125 mL con 50 mL de NBRIP – Hxa líquido y se dejó a 28 °C en la incubadora New Brunswick Scientific INNOVA 43 por cinco días consecutivos. El análisis de cuantificación de proteínas, pH y fósforo soluble de cada cepa y control (sin inocular) se realizó por triplicado. Cada 24 horas se tomaron 2 mL del medio NBRIP – Hxa de las muestras y controles, se centrifugaron por 10 min (Eppendorf Centrifuge 5410) y se separó el pellet del sobrenadante. El pellet se utilizó para la medición de proteínas y el sobrenadante para la cuantificación de fósforo soluble y pH. Para este último indicador, se utilizó el potenciómetro ThermoScientific ORION STAR A211.

6. 5. 1. Cuantificación de proteínas

Se siguió la metodología de Bradford (1976). Brevemente, se adicionaron 100 μL de agua desionizada estéril al pellet, se pasó por el vórtex y se dejó en el ultracongelador a $-80^{\circ}C$ (Thermo Scientific Forma 88000 Series Ultra- Low Temperature Freezer) por 20 min y después en el termoblock (Eppendorf Thermomixer R) por 10 min a $90^{\circ}C$ para romper la membrana celular y promover la liberación de proteínas. Del pellet, se tomaron 5 μL y se colocaron en el pozo de una microplaca (Greiner CELLSTAR® 96 pozos, fondo plano) , se

adicionaron 250 μL del reactivo Bradford (Sigma – Aldrich), se agitó suavemente la microplaca por 30 s y se leyó en el espectrofotómetro Thermo Scientific Varioskan® Flash a 595 nm después de cinco min. El análisis de cada muestra se realizó por triplicado. Para la curva de calibración, se realizaron diluciones seriadas utilizando BSA (Bovine Serum Albumine) con una concentración de 1.4 a 0.09 mg mL^{-1} .

6. 5. 2. Cuantificación de P soluble

La cuantificación de P soluble se realizó según los principios de la metodología descrita por Fiske y Subbarow (1925) adaptada para microplaca. Debido a que las muestras estaban altamente concentradas, se consideró un factor de dilución de 1/40. Para el llenado en la microplaca (Greiner CELLSTAR® 96 pozos, fondo plano), se tomaron 100 μL del sobrenadante y se mezclaron con 100 μL de ácido tricloroacético al 5.5% [p/v]. Después de 10 min de incubación, se agregaron 100 μL del reactivo de color. Para éste último, se mezclaron 40 mL de molibdato de amonio al 1.5% [p/v] en ácido sulfúrico al 5.5% [v/v] y se incorporaron 10 mL de sulfato ferroso al 2.7% [p/v] en agua destilada. El fosfomolibdato producido se midió a 700 nm en el espectrofotómetro (Thermo Scientific Varioskan® Flash). Para la curva de calibración, se realizaron diluciones seriadas de KH_2PO_4 con una concentración de 40 a 0.6 mg mL^{-1} .

Para finalizar el bioensayo de capacidad de solubilización, se calculó la actividad de solubilización ($\text{mg de P} \cdot \text{mg proteínas}^{-1}$), la cual es la relación del fósforo soluble y la cantidad de proteínas de cada morfotipo aislado.

6. 5. 3. Conteo bacteriano de las PRSB potenciales

Los conteos directos de células bacterianas al inicio y final del experimento se hicieron por la técnica de diacetato de fluoresceína (FDA). Se preparó un buffer de fosfato (pH 7) con 2.7 g de K_2HPO_4 en 100 mL (solución A) y 3.5 g de KH_2PO_4 en 100 mL (solución B). Se mezclaron 16 mL de la solución A y 84 mL de la solución B. Para el reactivo principal, se mezclaron 125 μL de FDA con 12.8 mL del buffer antes descrito. Posteriormente, se tomó 1 mL de suspensión bacteriana previamente lavada con solución salina, se centrifugó por 30 s, se descartó el sobrenadante. Después, 250 μL del reactivo principal fueron

adicionados al botón celular, se pasó por el vórtex durante 30 s y se dejó reposando por 30 s. Finalmente, se centrifugó una vez más durante 30 s, se decantó, y 500 μL del buffer fueron agregados. Se agitó por última vez en vórtex por 30 s. Para la cuantificación celular bacteriana, se pusieron 20 μL en un portaobjetos y las bacterias fueron contadas en un microscopio Olympus BX41. La siguiente fórmula se utilizó para reportar el número de células bacterianas:

$$\text{Células bacterianas mL}^{-1} = BO \times 53711 \times FD \times 20 \mu\text{L} \times 50 \text{ mL} \quad (5)$$

Donde BO son el número de bacterias observadas y FD es el factor de dilución usado.

6. 6. Análisis estadísticos

Se realizaron pruebas de normalidad y homocedasticidad a los resultados obtenidos, en caso de no cumplir con los supuestos, los datos fueron transformados a \log_{10} y se repitieron las pruebas de normalidad. Posteriormente, se realizó Análisis de Varianza de una vía bajo un nivel de significancia de $P < 0.05$. Para datos no paramétricos se llevó a cabo la prueba de Kruskal Wallis. En el caso de la actividad fosfatasa ácida y alcalina, se realizó una comparación de medias independientes mediante la prueba t – student. Finalmente, si los resultados presentaron diferencias estadísticamente significativas, se realizaron pruebas de comparaciones múltiples de Tukey; para datos no paramétricos se llevó a cabo la prueba de Dunn’s. Los análisis estadísticos se procesaron en STATISTICA 8.0. y los gráficos se elaboraron en SigmaPlot 12.0.

7. RESULTADOS

7.1 Análisis de indicadores de fertilidad biológica

Como indicadores de fertilidad, se realizó la medición de la potencial actividad fosfatasa (alcalina y ácida), β – glucosidasa y contenido de carbono de biomasa microbiana. Se encontró mayor actividad enzimática en el área restaurada en comparación con el sitio degradado. Para el contenido de C de biomasa microbiana, se presentó una tendencia similar a pesar de que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. A continuación, se presentan los resultados a detalle.

7.1.1. Actividad enzimática de fosfatasa alcalina y ácida

La mayor actividad fosfatasa alcalina se reportó en el sitio del mezquite con una media de $1070.26 \mu\text{g } p - \text{Nitrofenol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ peso seco} \cdot \text{h}^{-1}$; sin embargo, se obtuvo un resultado similar en el suelo debajo de las islas de recursos maduras. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre estos sitios y el suelo degradado (no restaurado) (Fig 3).

De igual manera, el sitio con mayor actividad de fosfatasa ácida se encontró en el suelo con mezquite, lo cual representa una diferencia de 112% respecto al suelo degradado. A su vez, la actividad enzimática en el suelo perteneciente a las islas de recursos maduras fue mayor que en las islas jóvenes con una diferencia del 42.03% (media 879.52 y $574.08 \mu\text{g } p - \text{nitrofenol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ peso seco} \cdot \text{h}$, respectivamente).

Respecto a la diferencia entre ambas fosfatasas por sitio de muestreo, únicamente se encontró diferencias significativas en el suelo no restaurado ($P = 0.000147$).

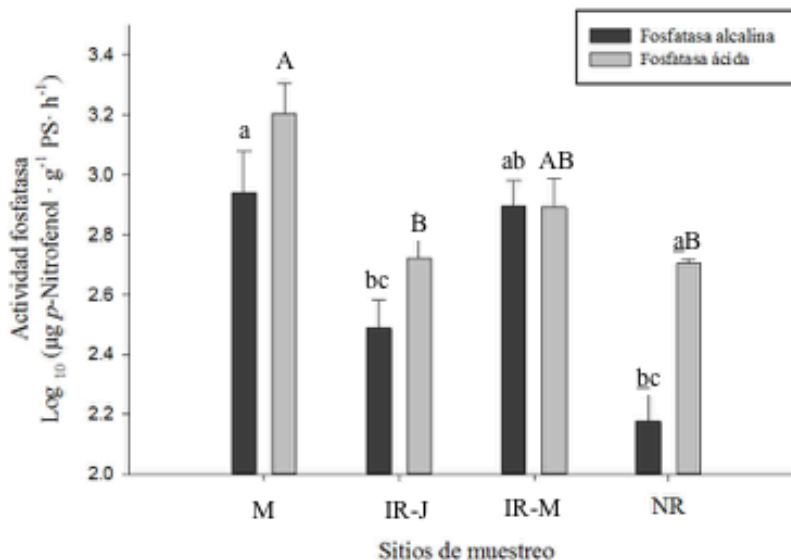


Figura 4. Actividad fosfatasa ácida y alcalina ($\mu\text{g } p\text{-nitrofenol} \cdot \text{g}^{-1} \text{Peso Seco} \cdot \text{h}^{-1}$) en temporada húmeda. Media ($n=6$) \pm error estándar. Columnas con letra minúscula y mayúscula distinta representan diferencias estadísticamente significativas entre los sitios de muestreo para fosfatasa ácida y alcalina respectivamente, de acuerdo al análisis de Tukey ($P < 0.05$); letra minúscula distinta con guión debajo indica diferencias entre fosfatasa ácida y alcalina por sitio de muestreo conforme a la prueba t para variables dependientes. M, suelo de mezquite; IR-J, suelo de las islas de recursos jóvenes; IR-M, suelo de las islas de recursos maduras; NR, suelo no restaurado.

7.1.2. Actividad enzimática de β – glucosidasa

La actividad β – glucosidasa en el suelo restaurado con mezquite tuvo una mayor actividad. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P = 0.0000002$) entre esta última condición ($397.48 \mu\text{g } p\text{-nitrofenol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ peso seco} \cdot \text{h}^{-1}$) y el suelo no restaurado ($33.58 \mu\text{g } p\text{-nitrofenol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ peso seco} \cdot \text{h}^{-1}$). Respecto al suelo bajo las islas de recursos (maduras y jóvenes) y el suelo bajo el mezquite, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. A pesar de ello, se observó una mayor actividad en las islas jóvenes que en la maduras con una diferencia del 32.96% (media 245.72 y 176.19 $\mu\text{g } p\text{-Nitrofenol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ peso seco} \cdot \text{h}^{-1}$, respectivamente) (Fig. 4).

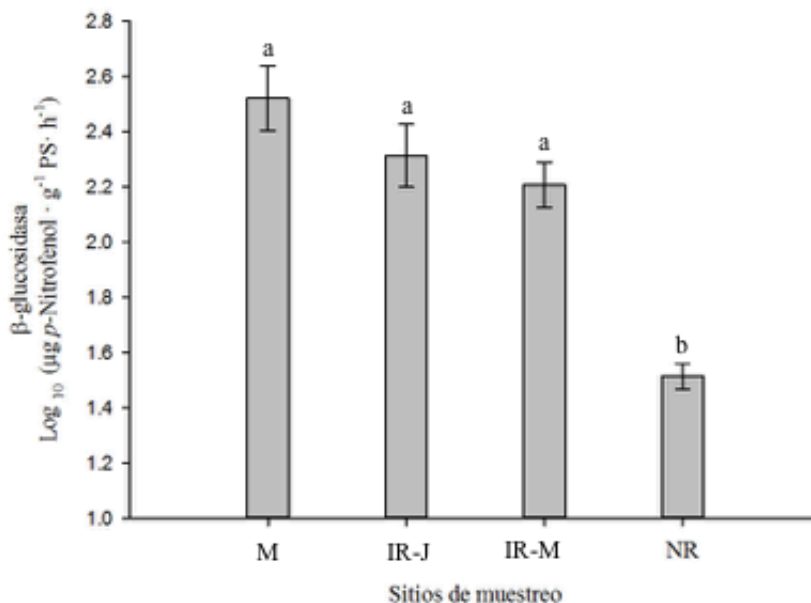


Figura 5 Actividad de β - glucosidasa ($\mu\text{g } p\text{-nitrofenol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Peso Seco} \cdot \text{h}^{-1}$) en temporada húmeda. Media ($n=6$) \pm error estándar. Columnas con letra distinta representan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo al análisis de Tukey ($P < 0.05$). M, suelo de mezquite; IR-J, suelo de las islas de recursos jóvenes; IR-M, suelo de las islas de recursos maduras; NR, suelo no restaurado.

7.1.3. Contenido de Carbono de Biomasa Microbiana

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$) para el carbono de la biomasa microbiana entre las condiciones. Sin embargo, se observa una tendencia que el indicador es mayor en el suelo restaurado con mezquite que en el resto de las condiciones (Fig. 5).

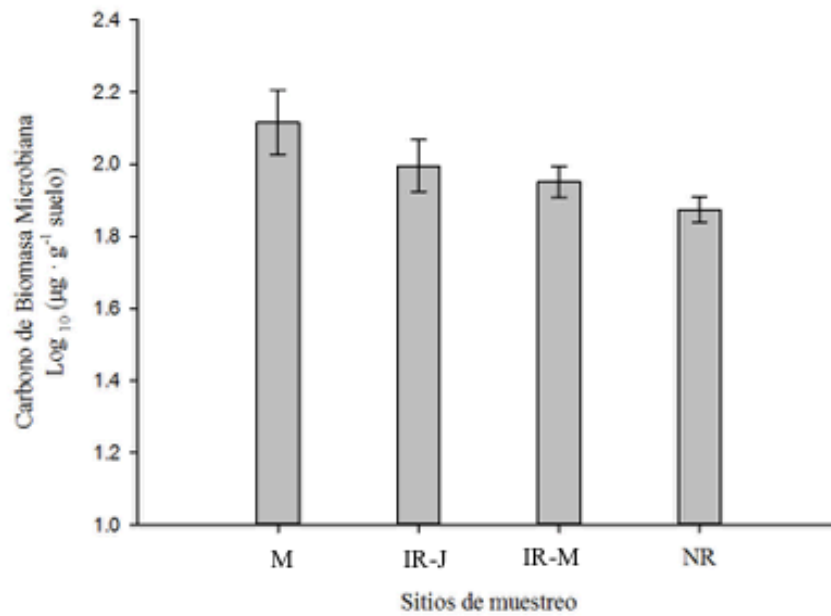


Figura 6. Carbono de Biomasa Microbiana ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ suelo) en temporada húmeda. Media ($n=6$) \pm error estándar. M, suelo de mezquite; IR-J, suelo de las islas de recursos jóvenes; IR-M, suelo de las islas de recursos maduras; NR, suelo no restaurado.

7.2. Recuento de bacterias cultivables totales y PRSB potenciales

Después de realizar la toma de muestras de suelo, se procedió al aislamiento de las potenciales bacterias solubilizadoras de fosfato en las cuatro condiciones descritas previamente. Para este ensayo fue importante la diferencia de UFC en las islas de recursos (maduras y jóvenes) dentro del dosel con el resto de las condiciones, a continuación, los resultados.

7.2.1. Conteo de Unidades Formadoras de Colonias

Para el conteo bacteriano total, se encontró una mayor cantidad de UFC en las islas de recursos maduras (dentro y fuera del dosel) (Tabla I), así como en las islas jóvenes dentro del dosel; a su vez estos conteos contrastaron con las UFC obtenidas del sitio no restaurado. Por otro lado, en el conteo para las bacterias solubilizadoras de fosfato potenciales, se encontraron mayores UFC en las islas maduras y jóvenes dentro del dosel y en el mezquite amargo.

Tabla I. Conteo bacteriano total y solubilizadoras potenciales por condición.

Condición		UFC mL ⁻¹ TOTALES	UFC mL ⁻¹
			SOLUBILIZADORAS POTENCIALES
1. Islas de recursos maduras (IR-M)	Dentro dosel	$1.66 \cdot 10^6 \pm 0.75^a$	$2.63 \cdot 10^5 \pm 0.48^A$
	Fuera dosel	$9.48 \cdot 10^5 \pm 2.74^{ab}$	$1.55 \cdot 10^5 \pm 0.44^{BC}$
2. Islas de recursos jóvenes (IR-J)	Dentro dosel	$1.19 \cdot 10^6 \pm 0.30^a$	$1.58 \cdot 10^5 \pm 0.53^{ABC}$
	Fuera dosel	$4.24 \cdot 10^5 \pm 2.27^{bcd}$	$1.63 \cdot 10^5 \pm 1.07^{BC}$
3. Mezquite amargo (M)		$5.45 \cdot 10^5 \pm 2.64^{bc}$	$2.04 \cdot 10^5 \pm 0.67^{AB}$
4. Suelo no restaurado (NR)		$1.94 \cdot 10^5 \pm 1.88^d$	$6.96 \cdot 10^4 \pm 6.2^C$

Medias ($n_{(C-M)} = 12$; $n_{(M \text{ y } NR)} = 24$) \pm desviación estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones ($P < 0.05$) de acuerdo a la prueba de Dunn's.

7.3. Capacidad de solubilización de las PRSB potenciales

Se aislaron nueve morfotipos del área restaurada, las cuales procedían de las islas de recursos, algunas de ellas también estuvieron presentes en la condición de suelo bajo el mezquite; no obstante, ninguna se presentó en el suelo no restaurado. Su caracterización

morfológica, identificación molecular y capacidad de solubilización se presentan a continuación.

7.3.1. Caracterización morfológica de las colonias de las PRSB aisladas

En los nueve morfotipos, se nombró el número de cepa con las siglas “BSCM” seguido del número en orden ascendente, dichas siglas representan que las bacterias solubilizadoras fueron aisladas del suelo asociado a la rizósfera del cardón bajo la influencia del mezquite. Los resultados del índice de solubilización no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los morfotipos aislados (Tabla II). No obstante, se observa que BSCM-1, BSCM-5 y BSCM-6 tuvieron el mejor desempeño en este indicador.

Tabla V. Caracterización morfológica de las colonias de las cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato crecidas en medio NBRIP- Hxa.

No. de cepa	Características Morfológicas *	Gram	Forma	Índice de solubilización (Z)
BSCM-1	BC, Mn, C, Cú, E	–	Bacilo	2.94±0.31
BSCM-2	BC, F, C, El, E	–	Bacilo	1.98±0.06
BSCM-3	SC, F, C, Cx, E	–	Bacilo	1.98±0.07
BSCM-4	BC, F, C, El, E	–	Coco	2.1±0.14
BSCM-5	BC, F, C, El, E	–	Bacilo	2.76±0.08
BSCM-6	AC, F, C, El, E	–	Bacilo	2.65±0.23
BSCM-7	BC, Mn, C, Cú, E	–	Bacilo	2.03±0.04
BSCM-8	AC, F, C, El, E	–	Bacilo	1.98±0.02
BSCM-9	Bl, R, C, Cú, E	–	Bacilo	2.27±0.13

Media (n=3) ± desviación estándar. *Morfología de la colonia: C, circular; E, margen entero; Cú/ El/ Cx, cúpula, elevada, convexa; BC/ SC/ AC/ BL, blanca cremosa, sin color, amarilla cremosa, blanca; Mn/ F/ R, mantecosa, friable, rígida.

La Fig. 6 muestra la formación del halo, el cual está relacionado con la producción de ácidos orgánicos. Para este experimento, cada cepa se sembró por triplicado en medio sólido NBRIP –Hxa, después de cinco días de incubación a 28°C, se determinó el índice de solubilización.

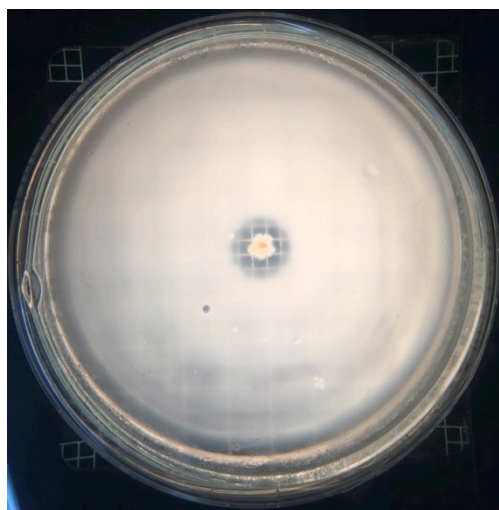


Figura 7. Índice de solubilización (Z) = diámetro del halo / diámetro de la colonia. Se realizó la prueba para cada morfotipo aislado ($n = 3$) en medio NBRIP – Hxa con un periodo de incubación de cinco días.

7.3.2.. Identificación de los morfotipos aislados mediante 16S rDNA

Se identificaron las nueve cepas aisladas, de las cuales, seis pertenecen a la familia Enterobacteriaceae y tres a Pseudomonadaceae. Para cada una de ellas, el porcentaje de identidad con la cepa de referencia fue mayor al 98.5%. La identidad de las bacterias se ilustra en la Fig. 7, se observa una clara separación entre la familia Enterobacteriaceae y Pseudomonadaceae; asimismo, las cepas aisladas son similares a las cepas reportadas por GenBank, por lo cual permite confirmar su identificación.

Tabla III. Identificación de morfotipos aislados de las bacterias solubilizadoras de fosfato del sitio restaurado mediante amplificación del 16S rDNA.

ID de la cepa	Longitud de la secuencia (pb)	Cepa de referencia	No. de acceso	% de identidad con la cepa de referencia
BSCM-1	1450	<i>Cronobacter sakazakii</i> (E632)	EF059857	99.9
BSCM-2	1449	<i>Enterobacter cloacae</i> (BIA146)	KU161288	100
BSCM-3	1448	<i>Enterobacter</i> sp. (SA187)	KY194757	99.6
BSCM-4	1455	<i>Enterobacter hormaechei</i> (STY31)	HQ220153	98.6
BSCM-5	1443	<i>Pseudomonas monteilii</i> (S30)	KT380616	99.8
BSCM-6	1442	<i>Pseudomonas putida</i> (P-1017-1)	HQ324912	99.8
BSCM-7	1448	<i>Cronobacter muytjensii</i> (Jor77)	FJ906905	99.9
BSCM-8	1445	<i>Pseudomonas putida</i> (JS1014)	KX507138	99.8
BSCM-9	1452	<i>Pantoea septica</i> (IHB-B1545)	KF475883	99.7

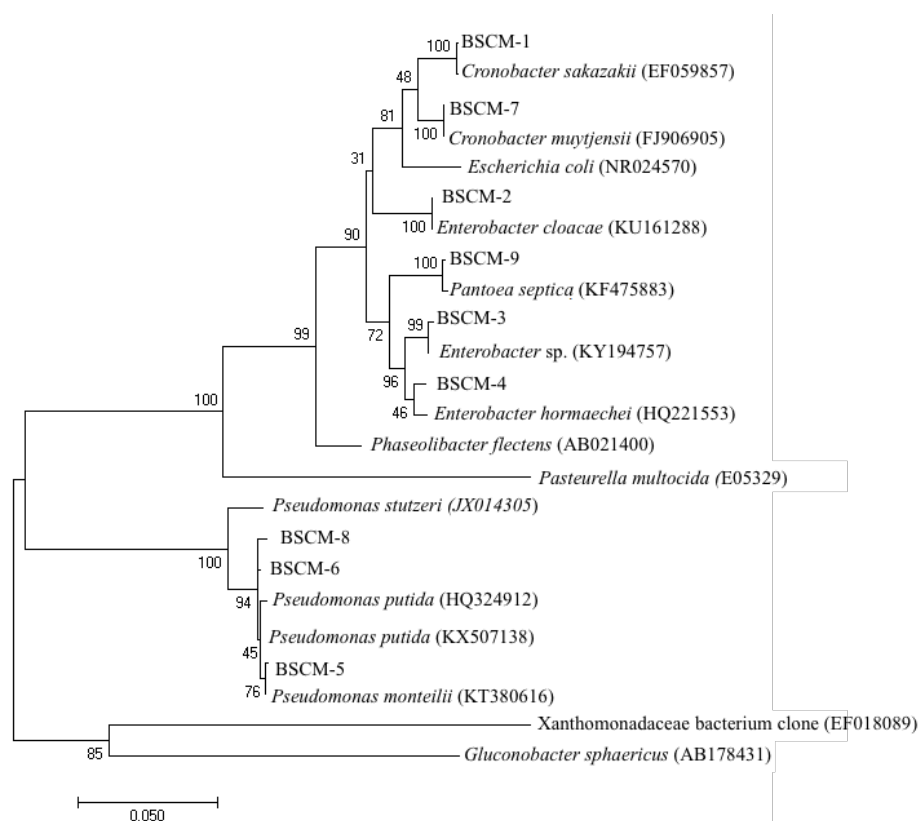


Figura 7. Árbol filogenético derivado de secuencias de 16S rDNA de las cepas aisladas de las islas de recursos del área restaurada y cepas de referencia; enraizado con dos secuencias (*Xanthomonadaceae bacterium clone* y *G. sphaericus*) como grupo externo, los números de acceso en GenBank se indican entre paréntesis. El árbol fue construido por el método de máxima verosimilitud (1000 repeticiones de bootstraps) de Tamura y Nei (1993) en MEGA versión 7 (Kumar et al., 2015).

7.3.3. Capacidad de solubilización de las PRSB potenciales

En los conteos inicial y final no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las cepas aisladas. Sin embargo, se observa una tendencia que las cepas BSCM-7 (*Cronobacter muytjensii*) y BSCM-8 (*Pseudomona putida*) presentan un mayor número de células · mL⁻¹ en comparación con el resto de los morfotipos aislados (Tabla IV).

Tabla IV. Conteos directos iniciales y finales de los morfotipos aislados.

No. cepa	Conteo inicial	Conteo final
	No. células · mL ⁻¹	No. células · mL ⁻¹
BSCM-1	5.10 · 10 ⁷ ± 0.38	8.24 · 10 ¹² ± 0.41
BSCM-2	6.18 · 10 ⁷ ± 0.38	9.49 · 10 ¹² ± 0.82
BSCM-3	7.25 · 10 ⁷ ± 1.14	9.76 · 10 ¹² ± 0.94
BSCM-4	7.79 · 10 ⁷ ± 1.14	9.13 · 10 ¹² ± 0.54
BSCM-5	7.52 · 10 ⁷ ± 0.00	1.00 · 10 ¹³ ± 0.16
BSCM-6	8.33 · 10 ⁷ ± 1.17	8.86 · 10 ¹² ± 0.97
BSCM-7	9.13 · 10 ⁷ ± 1.14	1.03 · 10 ¹³ ± 0.19
BSCM-8	9.13 · 10 ⁷ ± 0.00	1.09 · 10 ¹³ ± 0.11
BSCM-9	8.59 · 10 ⁷ ± 0.76	9.49 · 10 ¹² ± 1.57

Media (n=3) ± desviación estándar. Conteos utilizaron la técnica FDA. Factor de dilución inicial = 1; Factor de dilución final = 1.00E+05.

Por otro lado, en el bioensayo para la determinación de la capacidad de solubilización (Fig.8), se observó una tendencia similar de las cepas aisladas en la cantidad de fósforo soluble y el pH. Se encontró un aumento significativo de la cantidad de P soluble a las 48 horas del experimento en los nueve morfotipos; la cepa que solubilizó más fósforo a las 120 horas fue la BSCM-9 (*Pantoea septica*) (723.91 mg P · mL⁻¹) mientras que la cepa BSCM-7 (*Cronobacter muytjensii*) obtuvo el rendimiento más bajo (511.81 mg P · mL⁻¹), lo cual representa una diferencia del 34.33%. A las 24 horas, se obtuvo el pico más bajo de pH durante los cinco días del bioensayo; las cepas aisladas mantuvieron un pH de ≈ 4 de las 24 a las 120 horas.

En la evaluación de la actividad de solubilización (relación de la cantidad de P soluble y proteínas), se reportaron comportamientos similares entre las cepas; no obstante, se encontró que la cepa BSCM-2 (*Enterobacter cloacae*) (900.65 mg P · mg proteínas⁻¹) tiene

una mayor actividad y BSCM-3 (*Enterobacter* sp.) y BSCM-5 (*Pseudomonas monteilii*) la actividad más baja (408.92 y 417.00 mg P · mg proteínas⁻¹respectivamente) (Fig.9).

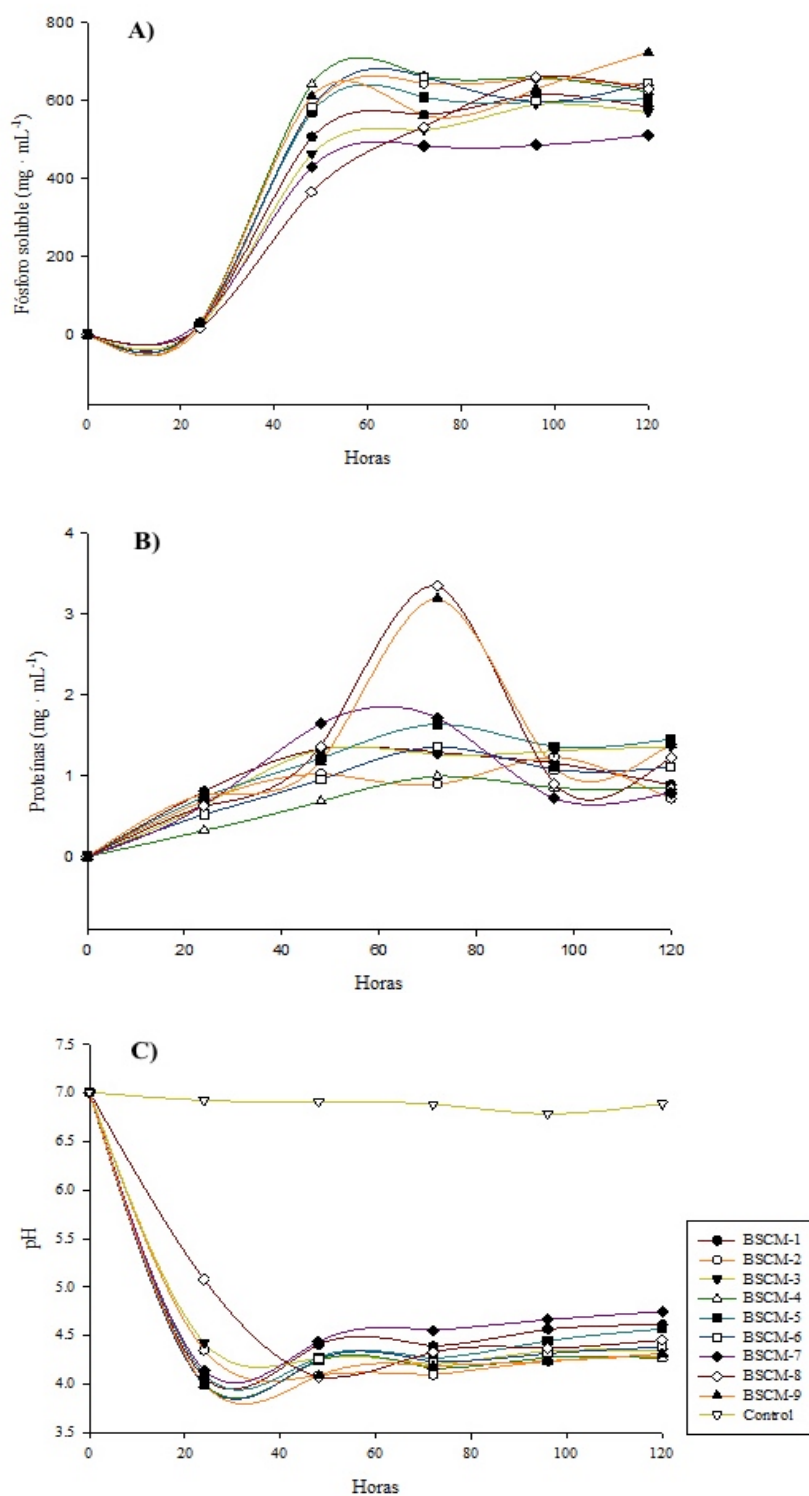


Figura 8. Capacidad de solubilización de las cepas aisladas en medio líquido NBRIP-Hxa, las muestras se determinaron cada 24 horas durante cinco días. A) Fósforo soluble ($\text{mg P} \cdot \text{mL}^{-1}$); B) Proteínas ($\text{mg proteínas} \cdot \text{mL}^{-1}$); C) pH.

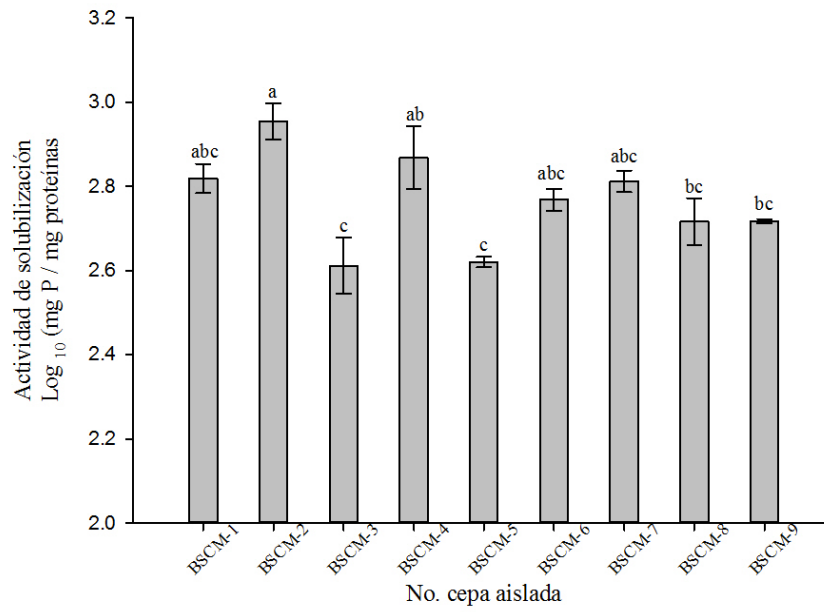


Figura 9. Actividad de Solubilización expresada como $\text{Log}_{10} (\text{mg P} \cdot \text{mg proteínas}^{-1})$ de las cepas aisladas del sitio restaurado. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) de acuerdo a la prueba Tukey.

8. DISCUSIÓN

8. 1. Efectos de los indicadores de fertilidad y funcionalidad de PRSB en el suelo restaurado y suelo degradado

Para los indicadores de fertilidad, el suelo asociado a la rizósfera del mezquite presentó mayor actividad potencial fosfatasa y β - glucosidasa en comparación con el resto de las condiciones; no obstante, no se observó gran diferencia con las islas de recursos (maduras y jóvenes), mientras que con el suelo no reforestado, la diferencia si fue significativa. Por otro lado, para el carbono de la biomasa microbiana a pesar de no encontrar diferencias estadísticamente significativas, se observó una tendencia similar al de las actividades enzimáticas. La presencia de vegetación posee la capacidad de modificar las propiedades del suelo al aumentar la retención del agua, proteger contra las altas temperaturas y crear micrositios para los microorganismos, promoviendo a su vez un mayor dinamismo en los ciclos de los nutrientes del suelo (Belsky *et al.*, 1989; Cross y Schlesinger, 1999; Pan *et al.*, 2014). Más aún, de gran relevancia es la participación de las islas de recursos. El suelo que cubre a las islas de recursos representa un sustrato de crecimiento superior a suelos sin la presencia de especies vegetales el cual provee los elementos necesarios para el establecimiento de especies (Carrillo-García *et al.*, 2000).

El mezquite influye positivamente en la actividad microbiana y por lo tanto, en los ciclos de nutrientes donde las actividades enzimáticas juegan un papel importante. Ciertas características de los microorganismos del desierto permiten su adaptación en ambientes hostiles; por ejemplo, se conoce que los microorganismos que habitan en las raíces superficiales del género *Prosopis*, están adaptados a las fluctuaciones de recursos y generalmente se caracterizan por un crecimiento y reproducción acelerado (Jenkins *et al.*, 1987). La abundancia de estos microorganismos en un modelo de isla de recursos está altamente relacionada con la concentración de recursos disponibles (Herman *et al.*, 1995). A su vez, la vegetación mantiene un control estricto sobre los nutrientes limitantes (N, P, K), los cuales se ha demostrado que están más concentrados bajo la vegetación (Cross y Schlesinger, 1999).

El contenido de materia orgánica del mezquite puede estar relacionado por la presencia de determinados componentes de sus hojas, semillas y goma (secretada en su corteza), que a su vez pueden mejorar la actividad microbiana en el suelo debajo de su dosel (Ruiz *et al.*, 2008). Las hojas del mezquite aportan materia orgánica al suelo a través de su descomposición, este proceso se conforma por dos fases. En la primera fase (lábil), el 70% del carbono inicial conformado por compuestos solubles (Pérez-Suárez *et al.*, 2012), se libera en forma de CO₂; mientras que la segunda fase (recalcitrante), se lleva a cabo la descomposición de la fracción resistente (pared celular y componentes estructurales) (Tarafdar, 1999). En esta segunda fase participan las enzimas que degradan las fibras vegetales, entre ellas la β - glucosidasa, quien está relacionada con la hidrólisis de celobiosa (disacárido) y cadenas cortas de oligosacáridos (ambos productos de la celulosa) a glucosa (Tarafdar, 1999).

La fijación de N a través del mezquite puede mejorar la mineralización y disponibilidad de P (Olander y Vitousek, 2000). Venterink (2011) encontró una mayor actividad fosfatasa en leguminosas que en plantas no leguminosas al adicionar una cantidad limitada de P y exceso de N, sin limitar las dosis de otros nutrientes. Basado en estos resultados, concluyó que, al inducir la limitación de P, ya sea reduciéndolo o aumentando N, se estimula la actividad de la fosfatasa. López – Lozano *et al.* (2016), en un estudio sobre la fijación potencial de nitrógeno del proyecto de restauración en El Comitán, encontraron que el contenido de nitratos fue mayor en el área restaurada mediante las islas de recursos jóvenes en comparación con un área degradada, lo cual puede sugerir que el mezquite provee de formas disponibles de N, lo cual sugiere que puede promover la actividad fosfatasa.

Considerando que la intrusión salina en los suelos es característico en la región de estudio (Cariño *et al.*, 2012), se esperaría que la salinidad tuviera un efecto sobre la actividad fosfatasa alcalina, no obstante, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ambas fosfatasas, incluso se observó ligeramente mayor actividad fosfatasa ácida en las cuatro condiciones. El pH es una de las propiedades químicas más importantes del suelo al afectar la disponibilidad de nutrientes y la composición y diversidad de los microorganismos; asimismo, es determinante en las actividades enzimáticas (Dick *et al.*,

2000). Velderrain-Algara *et al.* (2010) llevaron a cabo análisis del suelo en la Reserva Laura Arriaga en El Comitán, misma reserva donde se encuentra el sitio experimental de restauración; el pH que registraron fue de 8.6 ± 0.54 en suelo bajo la presencia de vegetación y en suelo descubierto fue de 8.59 ± 0.34 , lo cual indica que los suelos en la Reserva son alcalinos. Este pH reportado representa un valor intermedio que puede favorecer a ambas fosfatasas, el pH óptimo para la fosfatasa alcalina es de 11 y para fosfatasa ácida es de 6.5 (Acosta- Martínez y Tabatabai, 2000), lo cual puede explicar porque no se encontraran diferencias entre ellas.

El material disponible para los microorganismos representa una posible explicación del porque no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el carbono de biomasa microbiana. Gran proporción del carbono en el suelo es recalcitrante y no disponible, por lo tanto, la biomasa microbiana puede estar más influenciada por el carbono orgánico presente en el momento que en carbono absoluto (Wardle, 1992). Más aún, en un estudio sobre los cambios en las propiedades del suelo en un proyecto de revegetación natural en Loess Plateau, China, se encontró en el sitio restaurado con la especie nativa *Platykladus orientalis*, un menor contenido de carbono de biomasa microbiana que en sitios con diferentes tiempos de abandono (1 a 50 años), lo cual indica que en determinados casos la recuperación de la vegetación puede llevar más tiempo para que los efectos en la biomasa microbiana sean evidentes (Zhu *et al.*, 2010).

Como aproximación a la estructura de las comunidades bacterianas en el área restaurada, se llevó a cabo con el conteo total de bacterias cultivables y de solubilizadoras de fosfato potenciales, los cuales pueden indicar la diferencia que existe en el manejo de los suelos (Lovell *et al.*, 1995). En general, se encontró que en los dos conteos hubo diferencia significativa en las condiciones con presencia de vegetación que con el suelo no restaurado. En ecosistemas áridos, los nutrientes son escasos y distribuidos en parches; no obstante, se ha encontrado que la cantidad de nutrientes es mayor en el suelo bajo el dosel de arbustos (García-Moya y McKell, 1970). Aguilera *et al.* (1999) examinaron la abundancia de microorganismos dentro y fuera del dosel de *Adesmia bedwellii*, el cual crece en el desierto costero de Chile, y encontraron mayor UFC en el suelo debajo de su dosel que en suelos

entre los arbustos de la especie en estudio; y en temporada húmeda que en temporada seca. Con estos resultados, concluyeron que los microorganismos varían espacialmente y de acuerdo a la temporada, reflejando que la disponibilidad de nutrientes y la humedad en el suelo son factores de relevancia que controlan la actividad microbiana en este ecosistema.

8. 2. Diferencias en las condiciones de las islas de recursos (maduras y jóvenes)

Si bien no se encontró una diferencia significativa en la potencial actividad fosfatasa entre los suelos de las islas de recursos maduras y jóvenes, se observó una tendencia de mayor actividad en las islas maduras. Los resultados pueden estar relacionados con la capacidad de absorción y almacenaje de nutrientes del sistema radicular del cardón, el cual aumenta progresivamente con su tamaño (Niklas *et al.*, 2002). La edad actual de los cardones sembrados es de quince años; considerando que la longevidad de la cactácea puede ser de cientos de años, los organismos en estudio son jóvenes, por lo que tienen el potencial de aumentar paulatinamente la eficiencia en la absorción de nutrientes con el paso de los años y por lo tanto, las actividades enzimáticas (Bashan *et al.*, 1995). No obstante, el no encontrar diferencias significativas en ambas islas, es un resultado positivo ya que refleja el grado de restablecimiento de la actividad asociada a la mineralización de Po en el suelo bajo las islas de recursos jóvenes.

Las islas de recursos maduras mostraron más UFC (totales y solubilizadoras potenciales) que el resto de las condiciones, ¿de qué manera la edad del mezquite afecta la comunidad bacteriana? Las plantas pueden controlar y moldear la estructura de la comunidad microbiana mediante la liberación de componentes químicos, como los exudados de la raíz, los cuales afectan selectivamente a poblaciones microbianas específicas (Bais *et al.*, 2006; Hartmann *et al.*, 2009). La cantidad y composición química de los exudados, dependen en gran medida de la etapa de desarrollo de la planta (Haichar *et al.*, 2008). Mediante Ilumina MiSeq, Na *et al.* (2018) detectaron los perfiles de las comunidades rizobacterianas a través de la pirosecuenciación del 16S rRNA de la leguminosa *Caragana liouana* con diferentes años de vida (1, 8, 14, 31 y 40 años), se observó un mayor número de taxa en la rizósfera de las plantas con mayor edad que las jóvenes, lo cual sugiere que gradualmente las plantas maduras pueden establecer sus comunidades microbianas en la rizósfera a través de efectos

directos (p. ej. composición química de los exudados) e indirectos (p. ej. disponibilidad de nutrientes y propiedades del suelo); dicha selección podría estimular el rendimiento y supervivencia de la planta.

La presencia de granos fosfáticos al noroeste de la Bahía de La Paz ha sido reportada por Choumiline *et al.* (2019), la erosión de roca sedimentaria marina y el transporte de partículas provenientes de “El Mogote” pueden ser posibles causas de su presencia. Los granos fosfáticos encontrados en esta región son abundantes en capas de fosforitas y areniscas fosfáticas (Choumiline, 2009; Fischer *et al.*, 1995). No obstante, para que el P presente en estos granos se encuentren disponibles para las plantas, se requieren de este PRSB para la liberación de ortofosfatos, forma de fósforo inorgánico asimilable por las plantas (Goldstein *et al.* 1999). Como acercamiento a la funcionalidad de la comunidad de bacterias solubilizadoras de fosfato, se cuantificó la capacidad solubilización de fuentes de P no lábiles en las cepas aisladas del área restaurada. Se aislaron nueve cepas presentes provenientes de las islas de recursos maduras y jóvenes, de las cuales ninguna estuvo presente en el suelo no restaurado.

De las nueve cepas aisladas, seis de ellas pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, mientras que el resto pertenecen a Pseudomonadaceae. Bacterias pertenecientes a ambas familias han sido reportadas como solubilizadoras de fosfato (Sharma *et al.*, 2013). Khan *et al.* (2009) mencionan que *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Enterobacter* son géneros eficientes de solubilizadoras que aumentan la disponibilidad de P y promueven un mejor crecimiento y producción de cultivos. Chung *et al.* (2005) aislaron e identificaron grupos bacterianos con capacidad de solubilización de suelo rizosférico de varios cultivos en Corea, las cepas aisladas pertenecieron a una única familia: Enterobacteriaceae. A pesar de haber encontrado dos familias predominantes, esto nos proporciona información sobre la comunidad de bacterias solubilizadoras de fosfato en el sitio restaurado. Las poblaciones de este grupo de bacterias dependen de gran manera de las propiedades del suelo así como del manejo del mismo (Khan *et al.*, 2009), en este caso, la presencia de estas bacterias puede estar correlacionada con la formación de las islas de recursos en el área restaurada.

De acuerdo con O'Hara et al. (1989), *Enterobacter hormaechei* es una cepa Gram-negativa, fermentativa y en forma de bacilo, las cuales son características generales de la familia Enterobacteriaceae. No obstante, la cepa aislada BSCM-4 identificada como *Enterobacter hormaechei*, presentó forma de coco. Las poblaciones bacterianas bajo estrés nutricional reaccionan para adecuar su metabolismo celular y fisiología ante condiciones estresantes (Cefalí et al., 2002). De acuerdo con Kjelleberg et al. (1993), uno de los comportamientos observados bajo inanición nutricional en Gram-negativas es la reducción de tamaño y conversión de la morfología celular de bacilo a coco. Una posible causa al cambio de forma puede que el medio NBRIP en el que se creció esta cepa no es el más adecuado para satisfacer sus necesidades nutricionales.

Se evaluó la habilidad de solubilizar hidroxapatita en las nueve cepas aisladas mediante el índice de solubilización; no obstante, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los morfotipos aislados. Babana y Antoun (2006) observaron que tras repetidos subcultivos de los aislados en medio sólido, la clarificación del halo se fue perdiendo. No obstante, para no sobrestimar la habilidad de solubilización, se cuantificó el fósforo inorgánico liberado tras la incubación de las bacterias en NBRIP- Hxa líquido (Bashan et al., 2013), de esta forma se determinó la actividad de solubilización. Las cepas BSCM-2 (*Enterobacter cloacae*) y BSCM-4 (*Enterobacter hormaechei*) presentaron mayor actividad de solubilización. La formación del halo en medio sólido, la disminución de pH y la liberación de fósforo soluble indican que los morfotipos aislados tienen capacidad de solubilización (Rodríguez et al., 2004). No obstante, la liberación de ácidos orgánicos no es el único mecanismo de solubilización de fósforo.

Illmer y Schiner (1992) infirieron que la liberación de H^+ a cambio de la absorción de cationes, como NH_4^+ o la traslocación de H^+ a la ATPasa; así como la producción de quelantes por parte de los microorganismos constituyen vías alternas de solubilización de fósforo. Debido a lo anterior, se requiere profundizar si la producción de ácidos orgánicos es el principal mecanismo de solubilización de las cepas aisladas, el estudio de los genes asociados a la ruta de oxidación directa de glucosa puede ayudar a elucidar si la producción de ácidos orgánicos es el principal mecanismo de solubilización (Rodríguez et al., 2006).

9. CONCLUSIONES

- Los indicadores de fertilidad y la funcionalidad de PRSB proveen una medida potencial de actividad microbiana del suelo. En el suelo restaurado mediante la formación de islas de recursos (maduras y jóvenes) y el suelo bajo el dosel de mezquite, se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los indicadores de fertilidad, abundancia y fertilidad de PRSB en comparación con un sitio degradado, lo cual sugiere restablecimiento de las condiciones biológicas y fisicoquímicas del suelo.
- En general, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los indicadores de fertilidad de las islas de recursos maduras y jóvenes, por lo que la aproximación a la degradación de la materia orgánica y mineralización de fósforo puede ser similar en ambos sitios, indicando de esta manera la efectividad del proyecto de restauración basado en la simulación de islas de recursos mediante la asociación cardón – mezquite.
- Entre el suelo bajo el dosel de los mezquites y ambas islas de recursos, los indicadores de fertilidad tampoco fueron altamente diferentes; sin embargo, la restauración de suelos mediante la plantación de mezquite es una estrategia a mediano plazo, mientras que las islas de recursos representan una alternativa de restauración de suelos a largo plazo por la capacidad del cardón de estabilizar suelos en zonas áridas y semiáridas al proveer condiciones favorables para la sucesión natural de las especies.
- Se encontraron más UFC totales y solubilizadoras potenciales en las islas de recursos (maduras y jóvenes) donde los cardones presentan influencia directa del mezquite, es decir, bajo su dosel. La abundancia de bacterias en este suelo sugiere una mayor actividad microbiana derivada del fenómeno de isla de recurso.
- Como acercamiento a la funcionalidad de PRSB, se encontraron nueve cepas aisladas de las islas de recursos dentro del área de restauración, las cuales presentaron capacidad de solubilización. Futuras investigaciones pueden ser de utilidad para conocer si tienen potencial como bacterias de crecimiento vegetal en

proyectos de restauración o incluso en producción agrícola de la región. Los morfotipos aislados pertenecen a las familias Enterobacteriaceae y Pseudomonadaceae, su abundancia puede indicar que su rápido crecimiento es favorecido bajo las condiciones del suelo en las que se encuentran.

-

Perspectivas

- Es conveniente continuar con estudios de actividades enzimáticas y carbono de biomasa microbiana para analizar la evolución en los cambios de las propiedades del suelo en el sitio restaurado. Asimismo, es recomendable realizar análisis físico-químicos del suelo para conocer si existe una correlación entre el contenido de nutrientes y los indicadores de fertilidad biológica.
- Se requieren de otras técnicas para tener una mejor aproximación de la estructura de las comunidades bacterianas de solubilizadoras de fosfato en el área restaurada. A su vez, para conocer si la producción de ácidos orgánicos es el principal mecanismo de solubilización para las cepas aisladas, se requieren de estudios relacionados a los genes asociados a la oxidación de la glucosa a ácido glucónico.

10. LITERATURA CITADA

Acosta – Martínez, V., M. A. Tabatabai. 2011. Phosphorus Cycle Enzymes. En: Dick, R. P. (ed.). *Methods of Soil Enzymology*. Soil Science Society of America. Novena edición. Madison. pp. 161-183

Acosta – Martínez, V., M. A. Tabatabai. 2000. Enzyme activities in a limed agricultural soil. *Biol. Fertil. Soils*. 31: 85-91

Acosta – Martínez, V., T. Zobeck, T. Gill. 2003. Enzyme activities and microbial community structure in semiarid agricultural soils. *Biol. Fertil. Soils*. 38: 216-227

Aguilera, L. E., J. R. Gutiérrez, P. L. Meserve. 1999. Variation in soil microorganisms and nutrients underneath and outside the canopy of *Adesmia bedwellii* (Papilionaceae) shrubs in arid coastal Chile following drought and above average rainfall. *J. Arid Environ*. 42: 61-70

Alef, K., P. Nannipieri. 1995. Enzymes Activities. En: Alef, K. y P. Nannipieri (eds.). *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. Primera edición. Londres. pp. 311-312

Alef, K., P. Nannipieri. 1995a. Enzymes Activities: β -Glucosidase Activity. En: Alef, K. y P. Nannipieri (eds.). *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. Primera edición. Londres. pp. 350-352

Alef, K., P. Nannipieri, C. Trazar – Cepeda. 1995. Enzymes Activities: Phosphatase Activity. En: Alef, K. y P. Nannipieri (eds.). *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. Primera edición. Londres. pp. 335-344

Alessi, D., D. Walsh, J. Fein. 2011. Uncertainties in determining microbial biomass C using the chloroform fumigation-extraction method. *Chem. Geol*. 280: 58-64

Alori, E.T., B.R. Glick, O.O. Babalola. 2017. Microbial phosphorus solubilization and its potencial for use in sustainable agriculture. *Front. Microbiol*. 8:971

Álvarez, Y., E. Troyo, A. Nieto, F. Beltrán, B. Murillo, A. Cruz, J. Navejas. 2014. Vulnerabilidad hidroclimática y degradación del suelo en regiones agrícolas semiáridas. *Terra Lationam*.32:47-58

Arriaga, L. 2009. Implicaciones del cambio de uso de suelo en la biodiversidad de los matorrales xerófilos: un enfoque multiescalar. *Inv. Amb*. 1: 6-16

- Bacilio, M., J.P. Hernandez, Y. Bashan. 2006. Restoration of giant cardon cacti in barren desert soil amended with common compost and inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Biol. Fertil. Soils*. 42: 112-119
- Babana, A-H., H. Antoun. 2006. Biological system for improving the availability of Tilemsi phosphate rock for wheat (*Triticum aestivum* L .) cultivated in Mali. *Nutr. Cycl. Agroecosys*. 76: 285-295
- Bais, H. P., T. L. Weir, L. G. Perry, S. Gilroy, J. M. Vivanco. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Plant Biol*. 57: 233-266
- Barea, J.M., E. Navarro, E. Montoya. 1976. Production of plant growth regulators by rhizosphere phosphate-solubilizing bacteria. *J. Appl. Bact*. 40: 129-134
- Bashan, Y., L. de-Bashan. 2010. Microbial Populations of Arid Lands and their Potential for Restoration of Deserts. En: Dion, P. (ed.). *Soil Biology and Agriculture in the Tropics*. Springer. Alemania. Primera edición. pp. 109-137
- Bashan, Y., A. A. Kamnev, L. de-Bashan. 2013. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biol. Fertil. Soils*. 49: 465-479
- Bashan, Y., B. Salazar, M. Moreno. 2012. Restoration of eroded soil in the Sonoran Desert with native leguminous trees using plant growth-promoting microorganisms and limited amounts of compost and water. *J. Environ. Manage*. 102: 26-36
- Bashan, Y., B. Salazar, M. E. Puente, M. Bacilio, R. Linderman. 2009. Enhanced establishment and growth of giant cardon cactus in an eroded field in the Sonoran Desert using native legume trees as nurse plants aided by plant growth-promoting microorganisms and compost. *Biol. Fertil. Soils*. 45: 585-594
- Bashan, Y., G. Toledo, G. Holguin. 1995. Flat top decay syndrome of the giant cardon cactus (*Pachycereus pringlei*): description and distribution in Baja California Sur, Mexico. *Can. J. Bot*. 73: 683-692
- Belimov A.A., A.P. Kojemiakov, C.V. Chubarliyeva. Interaction between barley and mixed cultures of nitro- gen fixing and phosphate-solubilizing bacteria. *Plant Soil*. 173:29–37
- Belsky, A. J., R. G. Amundson, J. M. Duxbury, S. J. Riha, A. R. Ali. 1989. The effects of trees on their physical , chemical and biological environments in a semi-arid Savanna in Kenya. *J. Appl. Ecol*. 26: 1005-1024

- Blake L., S. Mercik, M. Koerschens, S. Moskal, P.R. Poulton, K.W. Goulding, A. Weigel, D.S. Powelson. 2000. Phosphorus content in soil, uptake by plants and balance in three European long-term field experiments. *Nutr Cycl Agroecosys* 56:263–275
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Bradshaw, A. 2002. An Ecological Perspective. En: Wong, M. y A. Bradshaw (eds.). *The Restoration and Management of Derelict Land: Modern Approaches*. World Scientific Publishing. Singapore. Pp. 1-6
- Camargo-Ricalde, S. L., N. M. Montaña, C. J. De la Rosa, S. A. Montaña. 2012. Micorrizas: una gran unión debajo del suelo. *RDU*. 13: 1067-6079
- Cariño, M., L. Castorena, Y. Maya, J. Wurl, J. Urciaga, A. Breceda. 2012. Transformación de los ecosistemas áridos para su uso agrícola en Baja California Sur, México. Un análisis desde la historia ambiental. *Historia Agraria*. 56: 82-112
- Carrillo-García, A., Y. Bashan, E. Díaz, G. J. Bethlenfalvay. 2000. Effects of resource-island soils, competition, and inoculation with *Azospirillum* on survival and growth of *Pachycereus pringlei*, the giant cactus of the Sonoran desert. *Restor. Ecol.* 8: 65-73
- Cefalí, E., S. Patanè, A. Arena, G. Saitta, S. Guglielmino, S. Capello, M. Nicolò, M. Allegrini. 2002. Morphologic variations in bacteria under stress conditions : near- field optical studies. *Scanning*. 24: 274-283
- Cheng, H-R., N. Jiang. 2006. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnol. Lett.* 28: 55-59
- Cheng, L. B. Wu, C. Yin, Y. Bao, L. Gong. 2016. Estimation of the costs of desertification in China: A critical review. *Land Degrad. Dev.* 29: 975:983
- Choumiline, K. 2009. Aplicación de métodos estadísticos multivariados en la determinación de las fuentes de aporte de sedimentos, estudio del caso de la Laguna de La Paz, B.C.S., México. Tesis (Licenciatura en Geología). La Paz, México. Universidad Autónoma de Baja California Sur. 27-28 p.
- Choumiline, K., L. Godinez, N. Nikolaeva, Derkachev, N. 2009. Evaluation of contribution sources for the sediments of the La Paz Lagoon, based on statistical treatment of the mineralogy of their heavy fraction and surrounding rock and drainage basin characteristics. *Bol. Soc. Geol. Mex.* 61: 97-109

- Chung, H., M. Park, M. Madhaiyan, S. Seshadri, J. Song, H. Cho, T. Sa. 2005. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. *Soil Biol. Biochem.* 37: 1970-1974
- Condon, L., B. Turner, B. Cade-Menun. 2005. Chemistry and Dynamics of Soil Organic Phosphorus. En: Sims, J. y A. Sharpley (eds.). *Phosphorus: Agriculture and Environment*. Soil Science Society of America. Madison. pp. 87-121
- Cooper, P. 1972. Aryl sulphatase activity in Northern Nigerian soils. *Soil Biol. Biochem.* 4: 333-337
- Cross, A. F., W. H. Schlesinger. 1999. Plant regulation of soil nutrient distribution in the northern Chihuahuan Desert. *Plant Ecol.* 145: 11-25
- David, P., R. S. Raj, R. Linda, S.B. Rhema. 2014. Molecular characterization of phosphate solubilizing bacteria (PSB) and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) from pristine soils. *Int. J. Innov. Sci. Eng. Technol.* 1: 317-324.
- Deng, S., I. Popova. 2011. Carbohydrate Hydrolases. En: Dick, R. P. (ed.). *Methods of Soil Enzymology*. Soil Science Society of America. Novena edición. Madison. pp. 185-209
- Dick, R., D. Breakwell, R. Turco. 1996. Soil Enzyme Activities and Biodiversity Measurements as Integrative Microbiological Indicators. En: Doran, J. y A. Jones (eds.) *Methods for Assessing Soil Quality*. Soil Science Society of America. Madison. pp. 247-271
- Dick, W. A., L. Cheng, P. Wang. 2000. Soil acid and alkaline phosphatase activity as pH adjustment indicators. *Soil Biol. Biochem.* 32: 1915-1919
- Dobbelaere, S., J. Vanderleyden, Y. Okon. (2003). Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit. Rev. Plant Sci.* 22: 107-149
- Doolette, A. y R. Smernik. 2011. Soil Organic Phosphorus Speciation Using Spectroscopic Techniques. En: Bünemann, E., Frossard, A. Oberson (eds.). *Phosphorus in Action: Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling*. Springer. Nueva York. pp. 3-36
- FAO. 2007. Las tierras áridas en el mundo. En: *Secuestro de carbono en tierras áridas*. pp. 9-19
- Fischer R., C. Galli-Olivier, A. Gidde, T. Schwennicke. 1995. The El Cien Formation of southern Baja California, Mexico: Stratigraphic precisions. *Newsl. Stratigr.* 32: 137-161
- Fiske, C. H., Y. Subbarow. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66: 375-400

- Flores, J., E. Jurado. 2003. Are nurse-protégé interactions more common among plants from arid environments? *J. Veg. Sci.* 14: 911-916
- Garcia, D. E., B. López, L. de- Bashan, A. M. Hirsch, M. Maymon, Y. Bashan. 2018. Functional metabolic diversity of the bacterial community in undisturbed resource island soils in the southern Sonoran Desert. *Land Degrad. Dev.* 29: 1467-1477
- García-Moya, E., C. M. McKell. 1970. Contribution of shrubs to the nitrogen economy of a desert-wash plant community. *Ecology.* 51: 81-88
- Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41: 109-117
- Goldstein, A. H. 1996. Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by Gram-negative bacteria. En: Torriani- Gorini, A., E. Yagil, S. Silver (eds.). *Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular Biology.* ASM Press. Washington D.C. pp. 197-203
- Goldstein, A. H., K. Braverman, N. Osorio. 1999. Evidence for mutualism between a plant growing in a phosphate-limited desert environment and a mineral phosphate solubilizing (MPS) rhizobacterium. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30: 295-300
- Hartmann, A., M. Schmid, D. van Tuinen, G. Berg. 2009. Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil.* 321: 235-257
- Herman, R. P., K. R. Provencio, J. Herrera-Matos, R. J. Torrez. 1995. Resource islands predict the distribution of heterotrophic bacteria in Chihuahuan Desert soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1816-1821
- Hopkins C.G., A. L. Whiting. 1916. Soil bacteria and phosphates. III. *Agric. Exp. Stn. Bull.* 190:395-406.
- Illmer, P., F. Schinner. 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 24: 389-395
- Jakobsen, I., M. Legget, A. Richardson. 2005. Rhizosphere Microorganisms and Plant Phosphorus Uptake. En: Sims, J. y A. Sharpley (eds.). *Phosphorus: Agriculture and Environment.* Soil Science Society of America. Segunda edición. Madison. pp. 437-494.
- Jenkins, M. B., R. A. Virginia, W. M. Jarrel. 1987. Rhizobial ecology of the woody legume mesquite (*Prosopis glandulosa*) in the Sonoran Desert. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 36-40
- Joergensen, R., P. C. Brooks. 2005. Quantification of Soil Microbial Biomass by Fumigation-Extraction. En: Margensin, R., F. Schinner. *Manual of Soil Analysis:*

Monitoring and Assessing Soil Bioremediation. Springer. Quinta edición. Berlín. pp. 281-294

Jones, D.L. y E. Oburger. 2011. Solubilization of Phosphorus by Microorganisms. En: Bünemann, E., Frossard, A. Oberson (eds.). Phosphorus in Action: Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling. Springer. Nueva York. pp. 3-36

Kim, K. Y., D. Jordan, G.A. McDonald. 1998. *Enterobacter agglomerans*, phosphate solubilizing bacteria, and microbial activity in soil: effect of carbon sources. Soil Biol. Biochem. 30: 995-1003

Khan, A. G. Jilani, M. S. Akhtar, S. M. Saqlan, M. Rasheed. 2009. Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. J. Agric. Biol. Sci. 1: 48-58

Kjelleberg, S., K. Flärdh, T. Nyström, D.J.W. Moriarty. 1993. Growth limitation and starvation of bacteria. En Ford, T. (ed.). Aquatic Microbiology: An Ecological Approach. Primera edición. Blackwell Scientific Publications. Boston. pp. 289-320 Kolter

Kumar, S., S. Chaudhuri, S. Maiti. 2013. Soil dehydrogenase enzyme activity in natural and mine soil -A Review. Middle East J. Sci. Res. 13: 898-906

Kumar, S., G. Stecher, K. Tamura. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol. Biol. Evol. 33:1870-1874

Lal, R. 2014. Desertification and Soil Erosion. En: Freedman, B. (ed.). Global Environmental Change. Springer. Primera Edición. Dordrecht. pp. 369-378

León de la Luz, R. Coria, M. Cruz. 1996. Fenología floral de una comunidad arido-tropical de Baja California Sur, México. Acta Botánica Mexicana. 35: 45-64

León de la Luz, J., R. Coria, M. Cruz. 1996. Fenología floral de una comunidad arido-tropical de Baja California Sur, México. Acta Botánica Mexicana. 35: 45-64

León de la Luz, J., J., Pérez, A. Breceda. 2000. A transitional xerophytic tropical plant community of the Cape Region, Baja California. J. Veg. Sci. 11: 555-564

Lopez-Lozano, N., M. Carcaño-Montiel, Y. Bashan. 2016. Using native trees and cacti to improve soil potential nitrogen fixation during long-term restoration of arid lands. Plant Soil. 403: 317-329

Lovell, R. D., S. C. Jarvis, R. D. Bardgett. 1995. Soil microbial biomass and activity in long-term grassland: Effects of management changes. Soil Biol. Biochem. 27: 969-975

Magallón, P. 2013. Development of an inoculant of phosphate rock- solubilizing bacteria to improve maize growth and nutrition. Tesis (Doctorado en Microbiología Alimentaria). Universidad de Laval. 28 p.

Magid, L., H. Tiessen, L. Condon. 1996. Dynamics of Organic Phosphorus in Soils under Natural and Agricultural Ecosystems. En: Piccolo, A. (ed.). Humic Substances in Terrestrial Ecosystems. Elsevier. Amsterdam. pp. 429-466

Mamta, R. P., V. Pathania, A. Gulati, B. Singh, R.K. Bhanwra, R. Tewari. 2010. Stimulatory effect of phosphate-solubilizing bacteria on plant growth, stevioside and rebaudioside-A contents of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Appl. Soil Ecol. 46: 222–229

Maya, G., J. Guzmán. 1998. Recursos terrestres y suelo. En: Fundación Mexicana para la Educación Ambiental (ed.). Diagnóstico ambiental de Baja California Sur. Primera Edición. Ciudad de México. pp. 165-242

Moreno, M., L. de-Bashan, J-P. Hernández, B. López, Y. Bashan. 2017. Success of long-term restoration of degraded arid land using native trees planted 11 years earlier. Plant Soil. 421: 83-92

Na, X., X. Li, Z. Zhang, M. Li, P. Kardol, T. T. Xu, M. Wang, X. Cao, F. Ma. 2018. Bacterial community dynamics in the rhizosphere of a long-lived, leguminous shrub across a 40-year age sequence. J. Soils Sediments. 18: 76-84

Nautiyal, C. R. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiol. Lett. 170: 265-270

Neumann, B., A. Pospiech, H. Schairer. 1992. Rapid isolation of genomic DNA from Gram-negative bacteria. Trends Genet. 8: 332-333

Niklas, K. J., F. Molina-Freiner, C. Tinoco-Ojanjuren, D. Paolillo. 2002. The biomechanics of *Pachycereus pringlei* root systems. Am. J. Bot. 89: 12-21

O' Hara, C., A. Steigerwalt, B. C. Hill, J. J. Farmer, G. R. Fanning, D. J. Brenner. 1989. *Enterobacter hormaechei*, a new species of the family Enterobacteriaceae formerly known as Enteric Group 75. J. Clin. Microbiol. 27: 2046-2049

Olander, L., P. Vitousek. 2000. Regulation of soil phosphatase and chitinase activity by N and P availability. Biogeochemistry. 49: 175-190

Padilla, F. y F. Pugnaire. 2006. The role of nurse plants in the restoration of degraded environments. Front. Ecol. Environ. 4: 196-202

- Pan Y-X., X-P. Wang, X-R. Li, Y-F. Zhang, R. Hui, H. Zhang. 2014. The influence of *Caragana korshinskii* shrub on soil and hydrological properties in a revegetation- stabilized desert ecosystem. *Hydrolog. Sci. J.* 59: 1925-1934
- Pascual, J. A., T. Hernández, C. Garcia, M. Ayuso. 1998. Enzymatic activities in an arid soil amended with urban organic wastes: Laboratory experiment. *Bioresour. Techno.* 64: 131-138
- Pérez-Suárez, M., J. T. Arredondo-Moreno, E. Hubber-Sannwald. 2012. Early stage of single and mixed leaf-litter decomposition in semiarid forest pine-oak: the role of rainfall and microsite. *Biogeochem.* 108: 245-258
- Pérez, E., M. Sulbarán, M. M. Ball, L. A. Yarzabal. 2007. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. *Soil Biol. Biochem.* 39: 2905-2914
- Pierzynski, G., R. McDowell, J.T. Sims. 2005. Chemistry Cycling, an Potential Movement of Inorganic Phosphorus in Soils. En: Sims, J. y A. Sharpley (eds.). *Phosphorus: Agriculture and Environment (Tomo II)*. Soil Science Society of America. Segunda edición. Madison. pp. 53-86
- Potthoff, M., K. L. Steenwerth, L. E. Jackson, R. E. Drenovsky, K. M. Scow, R. G. Joergensen. 2006. Soil microbial community composition as affected by restoration practices in California grassland. *Soil Biol. Biochem.* 38: 1851-1860
- Pugnaire, F., F., Hasse, P. Puigdefábregas. 1996. Facilitation between higher plant species in a semiarid environment. *Ecol. Soc. Am.* 77: 1420-1426
- Pujol, C. J., C. I. Kado. 1999. *gdhB*, a gene encoding a second quinoprotein glucose dehydrogenase in *Pantoea citrea*, is required for pink disease of pineapple. *Microbiology.* 145: 1275-1226
- Quiquampoix, H. y D. Mousain. 2005. Enzymatic hydrolysis of organic phosphorus. En: Turner, B.L., E. Frossard, D.S. Baldwin (eds.). *Organic phosphorus in the environment*. CABI. Wallingford. pp. 89-112
- Rodríguez, H., T. González, Y. Bashan. 2004. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Sci. Nat.* 91: 552-555
- Rodríguez, H. R. Fraga, Y. Bashan. 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant Soil.* 287: 15-21

- Rodríguez, H., R. Fraga. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* 17: 319-339
- Ros, M., M. T. Hernandez, C. García. 2003. Soil microbial activity after restoration of a semiarid soil by organic amendments. *Soil Biol. Biochem.* 35: 463-469
- Ruiz, T. G., S. R. Zaragoza, R. F. Cerrato. 2008. Fertility islands around *Prosopis laevigata* and *Pachycereus hollianus* in the drylands of Zapotlán, Salinas, México. *J. Arid Environ.* 72: 1202-1212
- Santiago-León, F., G. Tena-González, M. Lagunas-Vasques, L. F. Beltrán-Morales, A. Ortega-Rubio. 2014. Diagnosis of Degraded Areas and Proposals for Ecological Restoration in Baja California Sur. En: Wehncke, E.V., J. R. Lara-Lara, S. E. Álvarez-Borrego, E. Ezcurra (eds.). *Conservation Science in Mexico's Northwest Ecosystem Status and Trends in the Gulf of California*. INECC-SEMARNAT. Primera Edición. Ciudad de México. pp. 391-406
- Sharma S. B., R. Z. Sayyed, M. H. Trivedi, T. A. Gobi. 2013. Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus.* 2: 1-14
- Singh, K., B. Singh, R. R. Singh. 2012. Changes in physico-chemical , microbial and enzymatic activities during restoration of degraded sodic land: Ecological suitability of mixed forest over monoculture plantation. *Catena.* 96: 57-67
- Stott, D., S. Andrews, M. Liebig, B. Wienhold, D.L. Karleon. 2010. Evaluation of β -Glucosidase Activity as a Soil Quality Indicator for the Soil Management Assessment Framework. *SSSAJ.* 74: 107-119
- Tabatabai, M. A. 1994. Soil Enzymes. En: Bottomley, P. S., J. S. Angle, R.W. Weaver (eds.). *Methods of Soil Analysis. Part 2. Microbiological and Biochemical Properties*. Soil Science Society of America. Segunda edición. Madison. pp. 775-833
- Tajini, F., M. Trabelsi, J.J. Drevon. 2012. Combined inoculation with *Glomus intraradices* and *Rhizobium tropici* CIAT899 increases phosphorus use efficiency for symbiotic nitrogen fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Saudi J. Biol. Sci.* 19: 157–163
- Tani, A., M. Akita, H. Murase, K. Kimbara. 2011. Culturable bacteria in hydroponic cultures of moss *Racomitrium japonicum* and their potential as biofertilizers for moss production. *J. Biosci. Bioeng.* 112: 32–39
- Tarafdar, J. C. 1999. Analysis of Tree Leaf Decomposition in Arid Soils. En: Linkens, H., J. Jackson. *Analysis of Plant Waste Materials*. Primera edición. Berlín. Pp. 153-179

UNCCD (United Nations Convention to Combat Desertification).1994. Elaboration of an international convention to combatdesertification in those countries experiencing serious droughtand/or desertification, particularly in Africa.

Vance, E. D., P. C. Brookes, D. S. Jenkinson. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.* 19: 703-707

Velderrain-Algara, L., León de la Luz, J., Maya-Delgado, Y. 2010. Estructura de la vegetación en montículos de la bahía de la Paz, Baja California Sur, México. *Polibotánica.* 29:67-90

Venterink, H. 2011. Legumes have a higher root phosphatase activity than other forbs, particularly under low inorganic P and N supply. *Plant Soil.* 347: 137-146

Wang, S.-L., W. Hsu, T. Liang. 2010. Conversion of squid pen by *Pseudomonas aeruginosa* K187 fermentation for the production of *N*-acetyl chitooligosaccharides and biofertilizers. *Carbohydr. Res.* 345: 880–885

Wardle, D. A. 1992. A comparative assessment of factors which influence microbial biomass carbon and nitrogen levels in soil. *Biol. Rev.* 77: 321-358

Zaidi, A., M. Khan, M. Ahemad, M. Oves. 2009. Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta Microbiol Imm. H.* 56: 263-284

Zayed, M. S. 2012. Improvement of growth and nutritional quality of *Moringa oleifera* using different biofertilizers. *Ann. Agric. Sci.* 57: 53–62

Zhao, K., P. Penttinen, X. Zhang, X. Ao, M. Liu, X. Yu, Q. Chen. 2014. Maize rhizosphere in Sichuan, China, hosts plant growth promoting *Burkholderia cepacia* with phosphate solubilizing and antifungal abilities. *Microbiol. Res.* 169. 76-82

Zhang, Y. L., L. J. Chen, X. H. Chen, M. L. Tan, Z. H. Duan, Z. J. Wu, X. J. Li, X. H. Fan. 2015. Response of soil enzyme activity to long-term restoration of desertified land. *Catena.* 133: 64-70

Zhu, B., Z. Li, P. Li, G. Liu, S. Xue. 2010. Soil erodibility, microbial biomass, and physical – chemical property changes during long-term natural vegetation restoration: a case study in the Loess Plateau, China. *Ecol. Res.* 25: 531-541

Zhu, F., L. Qu, X. Hong, X. Sun. 2011. Isolation and characterization of a phosphate solubilizing halophilic bacterium *Kushneria* sp. YCWA18 from Daqiao Saltern on the coast of yellow sea of China. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2011

ANEXOS

Anexo 1. Diámetros del tronco del mezquite medido a 50 cm de la base del tronco

Diámetro Islas de Recursos maduras (cm)	Diámetro Islas de Recursos jóvenes (cm)
Mezquite 1: 20.6612	Mezquite 4: 18.7802
Mezquite 2: 20.0534	Mezquite 5: 18.828
Mezquite 3: 26.7379	Mezquite 6: 16.2337

Anexo 2. Modified Universal Buffer (MUB)

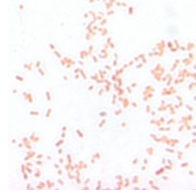
Reactivo	g·L⁻¹
Tris	12.1
Ácido maleico	11.6
Ácido cítrico	14
Ácido bórico	6.3

Agregar 488 mL de NaOH (1 N) y aforar a 1 L con agua desionizada. Almacenar a 4 °C.

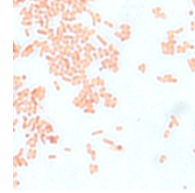
**Anexo 3. Tinción Gram de las cepas aisladas del suelo asociado a la rizósfera de cardón –
mezquite en el área restaurada**



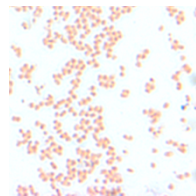
BSCM-1
(Cronobacter sakazakii)



BSCM-2
(Enterobacter cloacae)



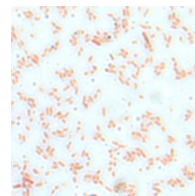
BSCM-3
(Enterobacter sp.)



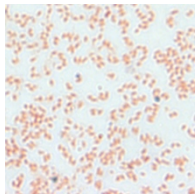
BSCM-4
(Enterobacter hormaechei)



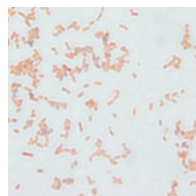
BSCM-5
(Pseudomonas monteilii)



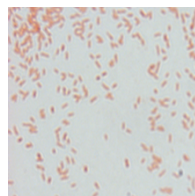
BSCM-6
(Pseudomonas putida)



BSCM-7
(Cronobacter muytjensii)



BSCM-8
(Pseudomonas putida)



BSCM-9
(Pantoea septica)