



POTENCIAL DE BACTERIAS ASOCIADAS A MELIPONINOS EN LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO DE LECHUGA (*Lactuca sativa* L.)

POTENTIAL OF BACTERIA ASSOCIATED WITH MELIPONINI BEES ON THE GROWTH OF LETTUCE (*Lactuca sativa* L.)

Paulina Janneth Pérez-Peralta^{1a}, Ronald Ferrera-Cerrato^{1b}, Alejandro Alarcón^{1c*}, Julián Delgadillo-Martínez^{1d}, Dulce Jazmín Hernández-Melchor^{1e} y Sandra Cortés-Pérez^{1f}

^{1a} Colegio de Postgraduados, Posgrado de Edafología, Carretera Federal México-Texcoco km 36,5, Montecillo. 56264, Texcoco, Estado de México, México
<https://orcid.org/0009-0002-9362-6581>

^{1b} Colegio de Postgraduados, Posgrado de Edafología, Carretera Federal México-Texcoco km 36,5, Montecillo. 56264, Texcoco, Estado de México, México
<https://orcid.org/0000-0001-5143-0172>

^{1c} Colegio de Postgraduados, Posgrado de Edafología, Carretera Federal México-Texcoco km 36,5, Montecillo. 56264, Texcoco, Estado de México, México
<https://orcid.org/0000-0002-7212-7751>

^{1d} Colegio de Postgraduados, Posgrado de Edafología, Carretera Federal México-Texcoco km 36,5, Montecillo. 56264, Texcoco, Estado de México, México
<https://orcid.org/0000-0003-4777-0494>

^{1e} Colegio de Postgraduados, Posgrado de Edafología, Carretera Federal México-Texcoco km 36,5, Montecillo. 56264, Texcoco, Estado de México, México
<https://orcid.org/0000-0003-0909-7040>

^{1f} Colegio de Postgraduados, Posgrado de Edafología, Carretera Federal México-Texcoco km 36,5, Montecillo. 56264, Texcoco, Estado de México, México
<https://orcid.org/0000-0002-3102-0173>

* Autor para correspondencia: aaalarconcp@gmail.com

RESUMEN

Ante el desafío de incrementar la producción de alimentos, los biofertilizantes a base de microorganismos emergen como alternativas biotecnológicas sostenibles que, mediante diversos mecanismos tales como la fijación de nitrógeno atmosférico (N₂), la solubilización de nutrientes como el fosfato y la secreción de hormonas como las auxinas, promueven el crecimiento vegetal. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la capacidad de 16 bacterias asociadas a los meliponinos para promover el crecimiento de lechuga (*Lactuca sativa* L.). Primero, se realizó una evaluación *in vitro* de su capacidad para fijar nitrógeno (N₂), solubilizar fosfato y producir auxinas. Luego, se llevó a cabo la inoculación de las 16 cepas en plántulas de lechuga, tanto vía foliar como radical. Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza de una vía y pruebas de diferenciación de medias (Tukey, $\alpha = 0,05$). De las 16 cepas, 87,2% de ellas mostraron eficiencia para solubilizar fosfato; 81,2% para fijar N; y 50% para producir auxinas. A los 35 días después de la germinación, los resultados indicaron que la inoculación foliar de *Bacillus sonorensis* favoreció significativamente la fluorescencia y el

contenido relativo de clorofila, así como también el peso seco de las plántulas (parte aérea y total). La aplicación radical de *Heyndrickxia acidicola* mejoró significativamente el área foliar, y el peso seco de la raíz, de la parte aérea y total de las plántulas. Se concluye que las bacterias *Bacillus sonorensis* y *H. acidicola* tienen potencial como promotores de crecimiento vegetal, por lo que representan una opción viable en la elaboración de biofertilizantes para promover el crecimiento de hortalizas como la lechuga.

Palabras clave: *Bacillus sonorensis*, *Heyndrickxia acidicola*, biofertilizantes, lechuga, abejas sin aguijón.

ABSTRACT

Facing the challenge for increasing food production, bacterial inoculants or biofertilizers emerge as sustainable biotechnological alternatives, which through diverse mechanisms like atmospheric nitrogen fixation (N_2), solubilization of nutrients such as phosphate, and secretion of hormones such as auxins, may promote plant growth. This study evaluated the ability of 16 bacteria associated with meliponini bees to promote growth in lettuce (*Lactuca sativa* L.). The ability to fix atmospheric nitrogen (N_2), solubilize phosphate and produce auxin was evaluated under *in vitro* conditions. Subsequently, the leaves and roots of lettuce seedlings were inoculated with the 16 strains. Data were subjected to a one-way analysis of variance and the mean comparison test (Tukey, $\alpha= 0.05$). Of the 16 strains, 87.2% showed efficiency for solubilizing phosphate; 81.2% for fixing N_2 ; and 50% for producing auxins. At 35 days after germination, the results indicated that leaf inoculation with *Bacillus sonorensis* significantly favored chlorophyll fluorescence and relative chlorophyll content, as well as seedling dry weight (aerial part and total). The root inoculation with *Heyndrickxia acidicola* significantly improved leaf area and dry weight of roots, aerial part and total. In conclusion, the bacteria *B. sonorensis* and *H. acidicola* have potential as plant growth promoters, and they represent a feasible option for the production of biofertilizers to promote the growth of vegetables such as lettuce.

Key words: *Bacillus sonorensis*, *Heyndrickxia acidicola*, biofertilizers, legumes, stingless bees.

INTRODUCCIÓN

Ante el rápido crecimiento demográfico, el cambio climático, el uso indiscriminado de fertilizantes y la contaminación ambiental, es fundamental garantizar la seguridad alimentaria, mediante el aumento de la productividad de los cultivos. La aplicación de microorganismos como biofertilizantes representa una de las estrategias excepcionalmente respetuosas con el ambiente y eficientes en la promoción del crecimiento vegetal. Tales efectos se logran a partir de diversos mecanismos como la fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato, potasio y otros micronutrientes como el zinc (Wickramasinghe et al., 2021), así como la producción de fitohormonas como el ácido indolacético (AIA), giberelinas y citoquininas (Kumar et al., 2022). En los últimos años, los biofertilizantes fijadores de nitrógeno han dominado el 80% del mercado global de los biofertilizantes, no obstante, representan una mínima fracción dentro de los agroquímicos sintéticos (Basu et al., 2021), por lo que resulta interesante la bioprospección de otros microorganismos con el potencial de formar parte de nuevos biofertilizantes.

La mayoría de los microorganismos ya

comercializados como biofertilizantes se clasifican ampliamente como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) o rizobacterias (O'Callaghan et al., 2022), dentro de este grupo se encuentra *Bacillus* spp., un género diverso de microorganismos que viven libremente en el suelo, habitantes de la superficie (rizosfera y filósfera) o parte interna de los tejidos (endófitos) de las plantas hospederas, capaces de promover el crecimiento vegetal e inducir resistencia al estrés por factores bióticos y abióticos (Lastochkina, 2021). Particularmente, la inoculación de diferentes especies como *Priestia megaterium*, *B. licheniformis*, *B. velezensis* y *B. subtilis* ha generado diversos efectos benéficos en el crecimiento de varias hortalizas, entre ellas la lechuga, tales como: el incremento de altura, la longitud y peso radical, el número y tamaño foliar, el contenido total de clorofila, la tasa fotosintética, así como el contenido mineral (N, P, K, Na, Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, entre otros); lo cual se ve reflejado en mejores rendimientos (Acurio-Vásquez et al., 2020; Benavides et al., 2023; Sarti et al., 2023).

Por su parte, los llamados meliponinos o abejas sin aguijón (ASA), son un grupo monofilético de abejas eusociales de tamaño pequeño, el cual abunda en las regiones tropicales y subtropicales

de todo el planeta, donde sobresalen los géneros *Melipona* y *Trigona* (Grüter y Grüter, 2020). Estos insectos son de importancia ecológica, económica y cultural, al ser de los principales polinizadores de las plantas silvestres y cultivadas (Costa-Neto y Dunkel, 2016). Especialmente, el género *Bacillus* ha sido identificado dentro del grupo de microorganismos asociados a las abejas meliponas, cumpliendo funciones a nivel fisiológico y ecológico, al regular el crecimiento, el desarrollo y el estado nutricional, la defensa contra patógenos, fermentación del polen, y la producción de miel, entre otros (Sinpoo et al., 2023; Alves et al., 2024). Sin embargo, no se conoce el papel de estos *Bacillus* como posibles biofertilizantes. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de las bacterias asociadas a las abejas meliponas para solubilizar fosfato, fijar nitrógeno (N_2), producir auxinas *in vitro*; y promover el crecimiento de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Las cepas bacterianas utilizadas en este experimento se aislaron de los productos de la abeja *Melipona beecheii* de Pucnachen, Yucatán, México (1 de mayo de 2018) (Tabla 1). Del geoprotopo provienen: *Bacillus safensis*, *Priestia megaterium* (antes *B. megaterium*), *Bacillus subtilis* y *Stenotrophomonas rhizophila*; de la miel: *Metabacillus niabensis*, *Bacillus* sp. (MLS1), *Pseudomonas jessenii* (MLS2), *P. jessenii* (MLS20), *P. jessenii* (MLS22), *Bacillus* sp. (MLS3) y *Bacillus altitudinis*; del polen: *Heyndrickxia acidicola* (antes *B. acidicola*), *Streptomyces californicus*, *Brevibacillus laterosporus* y *Bacillus sonorensis*.

Las semillas utilizadas en la prueba de efectividad biológica de los inóculos para promover el crecimiento fueron de lechuga italiana verde (*Lactuca sativa* L.) var. Starfighter de origen comercial.

Análisis molecular de las cepas bacterianas

Para realizar la identificación molecular se llevó a cabo la extracción de ADN a partir de las bacterias purificadas, se procedió a la extracción de ADN de acuerdo al método de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) al 2% (Tris-HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 2H₂O mM; CTAB 2%; NaCl 1,4 M) (Doyle y Doyle, 1990) con ligeras modificaciones. Los productos de DNA se verificaron por espectrofotometría, en un NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Scientific, EE.UU.), solamente se emplearon muestras con valores de las relaciones A260/A280 y A260/A230 de 1,8 a 2,0, para asegurar la integridad

y calidad de DNA. Se realizó la amplificación mediante PCR correspondiente a la subunidad pequeña 16S rDNA con los iniciadores 518F (CCAGCAGCCGCGGTAATACG), 800R (TACCAGGGTATCTAATCC). La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador C1000 Touch (BIO-RAD, EE.UU.). Los productos de la PCR se limpiaron con la enzima ExoSAP-IT (Affymetrix, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La secuenciación se llevó a cabo en la empresa Psomagen.

La identificación por medio de BLAST (Basic Local Alignment Search Tools) consideró las secuencias de ambas hebras, las cuales se ensamblaron y editaron con el software Geneious Prime Alignment Editor v7.2.6. Se realizó el ensamble de secuencias utilizando ambos fragmentos de cada muestra considerando aquellos que presenten una calidad aceptable en sus cromatogramas, para asegurar que la identificación resultante en su posterior BLAST en la base de datos del GenBank fue acertada. Se creó una secuencia consenso para cada una de las cepas, las que se compararon con las secuencias depositadas en la base de datos del BLAST del "National Center for Biotechnology Information" (NCBI) con la opción BLAST_nucleotide 2.2.29.

Para el análisis filogenético fue necesario descargar las "secuencias tipo" de la base de datos del "List of Prokaryotic Names" del "Leibniz Institute DSMZ" (Parte et al., 2020), que contiene las secuencias 16S de todas las especies de cada género reconocidas oficialmente por la comunidad europea. Se realizó el alineamiento de cada muestra con las demás especies "tipo" de su género para corroborar o corregir a nivel especie su identificación del BLAST, y se analizó con más detalle aquellas zonas en las que se tienen picos no bien definidos en su cromatograma y se decidió con el alineamiento más apropiado. Posteriormente se volvió a realizar el alineamiento e identificación. Las secuencias consenso se compilaron en un formato FASTA. El alineamiento múltiple de secuencias "tipo" con la secuencia problema se efectuó con la opción MAFFT v7.475 (2020). Los procedimientos de máxima verosimilitud (ML) e inferencia bayesiana (BI) se implementaron utilizando el software raxmlGUI (Silvestro y Michalak, 2012) y MrBayes (Ronquist et al., 2012), respectivamente. Se elaboró la reconstrucción filogenética se mediante estadística bayesiana con las muestras utilizando el programa Mr. Bayes (Huelsenbeck y Ronquist, 2001), que utiliza inferencia bayesiana en filogenias, puede emplear distintos modelos de sustitución nucleotídica y genera un archivo consenso del árbol bayesiano con las mejores probabilidades con una desviación estándar <0,01.



Tabla 1. Características de las especies bacterianas identificadas en las cepas de los géneros *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*, incluyendo los números de acceso en el GenBank, obtenidos por análisis filogenético. Las cepas y secuencias obtenidas en esta investigación están en negrita. *Especies con previo registro en el GenBank.

Table 1. Characteristics of the bacterial species identified in the strains of the genera *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* and *Stenotrophomonas*, including GenBank accession numbers, obtained by phylogenetic analysis. Strains and sequences obtained in this research are in bold. *Species previously registered in the GenBank.

Cepa	BLAST	Cobertura de la secuencia	Identidad (%)	Filogenia	Fuente de aislamiento	Número de accesión
GPC1	<i>Bacillus safensis</i> strain CPO MNS19-Y14 16S ID: OP897614.1	100%	100%	<i>Bacillus safensis</i>	Geopropoleo	PP661227
GRC3	<i>Priestia megaterium</i> strain 59 16S ID: MF457542.1	100%	99.73%	<i>Bacillus megaterium</i>	Geopropoleo	PP661228
MCS27.2	<i>Metabacillus niabensis</i> strain CPO MCS27.1-Y62 16S ID: OP897599.1	99%	99.86%	<i>Bacillus niabensis</i>	Miel sin maduración	PP661234
MLS1*	<i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain CPO MLS1-Y5 16S rRNA ID: OP897605.1	100%	100%	<i>Bacillus</i> sp.	Miel sin maduración	OP897605.1
MLS2	<i>Pseudomonas jessenii</i> strain AP3_16 16S rRNA ID: MF498772.1	98%	99.9%	<i>Pseudomonas jessenii</i>	Miel sin maduración	PP661229
MLS20	<i>Pseudomonas jessenii</i> 16S rRNA ID: LN995697.1	100%	100%	<i>Pseudomonas jessenii</i>	Miel sin maduración	PP661230
MLS22	<i>Pseudomonas jessenii</i> strain AP3_16 16S rRNA ID: MF498772.1	100%	100%	<i>Pseudomonas jessenii</i>	Miel sin maduración	PP661231
MLS3*	<i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain CPO MLS3-Y51 16S rRNA ID: OP897606.1	100%	100%	<i>Bacillus</i> sp.	Miel sin maduración	OP897606.1
PEC2.2*	<i>Bacillus acidicola</i> strain CPO PEC2.2-Y60 16S RNA ID: OP897622.1	100%	100%	<i>Bacillus acidicola</i>	Polen con maduración	OP897622.1
PES1.2	<i>Streptomyces californicus</i> strain CPO PES4 16S ID: OP897629.1	100%	100%	<i>Streptomyces californicus</i>	Polen sin maduración	PP661235
PES10a*	<i>Brevibacillus laterosporus</i> strain CPO PES10a-Y56 16S rRNA ID: OP897624.1	100%	100%	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	Polen sin maduración	OP897624.1
PES9	<i>Bacillus altitudinis</i> strain J54 16S RNA ID: MN148770.1	100%	100%	<i>Bacillus altitudinis</i>	Miel sin maduración	PP661346
PLC1	<i>Bacillus sonorensis</i> strain SRM101395, complete genome ID: CP021920.1	99%	100%	<i>Bacillus sonorensis</i>	Polen sin maduración	PP661233
YM1	<i>Bacillus subtilis</i> strain ZIM3 16S rRNA ID: MT539995.1	100%	100%	<i>Bacillus subtilis</i>	Geopropoleo	PP661232
YM4	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> strain BL2-2 chromosome, complete ID: CP088000.1	100%	99.9%	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	Geopropoleo	PP661345

Para los procedimientos de ML, se realizó un análisis de arranque rápido con 1.000 repeticiones y en el análisis se consideró el modelo de sustitución de nucleótidos GTR + I + G. Para BI, se realizaron dos análisis paralelos con cuatro algoritmos Monte Carlo de cadena de Markov, los análisis se detuvieron hasta alcanzar una desviación estándar de frecuencias divididas (SDSF) $<0,01$ y se muestrearon los árboles cada 1.000 iteraciones. Los modelos de sustitución se seleccionaron previamente utilizando el software jModelTest (Darriba et al., 2012) y se implementaron en BI. El primer 25% de los árboles generados se descartaron y con los árboles restantes se calculó la probabilidad posterior (PP). Los árboles fueron visualizados y editados en FigTree versión 1.4.4 (Rambaut, 2018) y las secuencias obtenidas en este estudio (Tabla 1) se depositaron en la base de datos GenBank.

Evaluación de la capacidad cualitativa de la fijación de N_2 , y capacidad cuantitativa de la solubilización de fosfatos y producción de auxinas

La prueba para determinar la capacidad para fijar nitrógeno N_2 de las bacterias asociadas a las meliponas, se realizó en medio NFB semisólido y libre de N con azul de bromotimol. Las cepas se inocularon por separado y se incubaron a 28° C durante seis días; el viraje de color verde esmeralda a azul de las muestras inoculadas se consideró como positivo (Almaraz-Suarez et al., 2020). La cuantificación de la capacidad para solubilizar fosfato *in vitro* se realizó mediante la obtención del cultivo bacteriano en medio Pikovskaya líquido y la reacción de las muestras con vanadato de amonio (NH_4VO_3) y molibdato de amonio [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$] seguido de la lectura en un espectrofotómetro (Synergy 2, Biotek®, USA) a 420 nm. La cantidad de fosfato solubilizado se estimó a partir de una curva estándar de 0 a 100 $\mu g mL^{-1}$ de KH_2PO_4 ($r^2=0,9950$) (Días et al., 2009). La capacidad para producir auxinas se cuantificó según el método colorimétrico (Almaraz-Suarez et al., 2020). Para ello, cada cepa se cultivó en medio líquido Luria-Bertani, a 28° C por 48 h, y se adicionó el reactivo de Salkowski; al cabo de 30 min se tomaron lecturas de absorbancia a 530 nm en un espectrofotómetro (Synergy 2, Biotek®, USA); asimismo, se preparó una curva de 0 a 100 $\mu g mL^{-1}$ de ácido indolacético (AIA) ($r^2=0,9954$).

Evaluación de la capacidad de crecimiento de plantas de lechuga inoculadas con bacterias asociadas a meliponinos

El experimento se llevó a cabo en un invernadero del Colegio de Postgraduados, Texcoco, Estado de México, con temperaturas

promedio de 33°C/14°C (día/noche), intensidad luminosa de 137 $\mu mol m^{-2}s^{-1}$, humedad relativa de 31% durante el día y 87% durante la noche, y un fotoperiodo de 11,5 h.

Las semillas de lechuga italiana verde fueron desinfectadas con 6% de hipoclorito de sodio (NaClO) durante un minuto; se retiró el exceso con agua destilada, y luego dos semillas se colocaron en un recipiente de plástico de 60 cc de capacidad y con un sustrato estéril (121°C, 3 h) de mezcla de perlita-vermiculita, 1:1 v/v. Tras la aparición de hojas verdaderas, a cada planta se le aplicó directamente 1 mL de inóculo con carga de 12×10^8 UFC mL^{-1} . Tanto vía foliar con un aspersor y sin ningún tipo de adherente (en el haz y envés de las hojas) como en raíz (en la base del tallo) con una jeringa, por separado. Al grupo de plántulas control sólo se les aplicó 1 mL de agua destilada estéril y fueron colocados por la tarde-noche para evitar la evaporación de los 7 inóculos por calor. El riego fue directo y se realizó a diario o dependiendo de las condiciones ambientales con solución nutritiva Jensen (pH 5,5) reducida en N (Delgadillo-Martínez et al., 2020).

A los 35 días después de la emergencia de las plántulas, y posterior a la cosecha, se evaluó el peso seco de raíz, de la parte aérea y el total (con balanza analítica) después del secado de las plántulas a 70°C por 72 h. Previo a la cosecha se midió la fluorescencia de la clorofila tras mantener las hojas en oscuridad por 20 min (Fluorómetro OS30p, Opti-Sciences, USA); el contenido relativo de clorofila se midió con SPAD 502 Plus (Minolta, USA), y el área foliar con un integrador de área foliar (LI-COR model 3100, USA).

Diseño experimental y análisis estadístico

El análisis cuantitativo de la solubilización de fosfato y de la producción de auxinas se realizó en un experimento completamente al azar, que incluyó 16 tratamientos con 3 repeticiones cada uno. Los datos se sometieron a un análisis de varianza de una vía y a la prueba de comparación de medias (Tukey, $\alpha=0,05$).

En cuanto a la evaluación de la capacidad de promoción de crecimiento vegetal, cada tipo de inoculación (foliar y radical) consistió de 17 tratamientos cada uno, contemplando la inoculación individual de las 16 cepas más el tratamiento control, con 10 repeticiones cada uno, distribuidos en un diseño experimental completamente al azar. Los datos se sometieron a un análisis de varianza de una vía y prueba de comparación de medias (Tukey, $\alpha=0,05$). El programa utilizado para el análisis de los datos fue SAS versión 9.4 (SAS Institute Inc., 2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis molecular de las cepas bacterianas

El análisis filogenético de la región del 16S ribosomal consistió en 11 secuencias y 1 557 caracteres, incluidos los huecos. Se utilizó *Streptomyces californicus*_AY999837_1 como grupo externo. En este análisis, se ejecutaron 1.000.000 de interacciones con el modelo Hasegawa-Kishino-Yano implementado, generando 2 002 árboles, de los cuales 1 502 se utilizaron para calcular la probabilidad posterior (PP). La filogenia de la región de ADNr 16S delimitó con precisión los cuatro géneros *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas* propuestos por Cohn (1872), Waksman y Henrici (1943), Migula (1894) y Palleroni y Bradbury (1993). Las cepas obtenidas en este estudio se agruparon con cuatro clados que se visualizan claramente en el árbol filogenético. El primero de estos clados lo conforma el género *Bacillus*, que está conformado por dos evidentes subgrupos, el primero de ellos lo estructura *B. safensis* y *B. altitudinis* que son especies recientes y que tienen un ancestro común que recién divergió. Dentro de este primer subgrupo encontramos a *B. subtilis* y *B. sonorensis* que son especies que están más relacionados filogenéticamente, que con otras especies de *Bacillus* de este clado. El segundo subgrupo está estructurado por *B. megaterium* y *B. niabensis*, también con un ancestro común reciente.

El segundo clado está constituido por *Streptomyces californicus* y el tercer clado formado por las secuencias de *Pseudomonas jessenii*; finalizando con el último grupo estructurado por las secuencias de la especie *Stenotrophomonas rhizophila*. Las cepas MLS2, MLS20 y MLS22 forman una polinomia (donde fue imposible distinguirlas como diferentes especies), pero son un taxón hermano con *Pseudomonas jessenii*. El mismo caso para la cepa YM4, PES1.2 y MCS27.2., que también son taxones hermanos de *Stenotrophomonas rhizophila*, *Streptomyces californicus* y *Bacillus niabensis*, respectivamente (Fig. 1). Con respecto a las especies restantes, éstas tienen una probabilidad de 1, por lo que se puede decir que pertenecen a las especies *Bacillus safensis* (GPC1), *B. altitudinis* (PES9), *B. subtilis* (YM1) y *B. sonorensis* (PLC1). Todas las especies mencionadas han sido reportadas como habitantes del tracto digestivo de la abeja *Melipona beecheii* (datos no publicados). Sin embargo, la mayoría de los aislamientos fueron identificados mediante análisis BLAST de la región del ADNr 16S (Tabla 1; Fig. 1).

Evaluación de la capacidad cualitativa de la fijación de N₂ y capacidad cuantitativa de la solubilización de fosfatos y producción de auxinas

La prueba *in vitro* para conocer la capacidad para fijar N₂ mostró que las cepas con respuesta positiva fueron: *B. safensis*, *P. megaterium*, *B. subtilis*, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Bacillus* sp. (MLS1), *B. altitudinis*, *Brevibacillus laterosporus*, *B. sonorensis*, *P. jessenii* (MLS2), *P. jessenii* (MLS20), *P. jessenii* (MLS22), *H. acidicola* y *S. californicus*; en tanto que las bacterias con reacción negativa a esta prueba fueron GRF1, *Bacillus* sp. (MLS3), y *Metabacillus niabensis* (Tabla 2). Respecto a *P. jessenii* (MLS2), no hay reportes en la literatura sobre su capacidad para promover el crecimiento vegetal; sin embargo, el género *Pseudomonas* representa a rizobacterias incluidas en biofertilizantes y aplicadas en diversos cultivos, y que tienen otras cualidades como la fijación de N₂, la solubilización de fosfatos, y la producción de AIA (Singh et al., 2022). El trabajo *in vitro* de Wang et al. (2020) corrobora el efecto positivo de *B. subtilis* para fijar N₂ en aislamientos obtenidos de raíces, tallos y hojas de la planta medicinal *Rehmannia glutinosa*; mientras que *B. sonorensis* y *P. jessenii* (MLS22) no mostraron la capacidad para fijar N₂, aunque los resultados de la presente investigación indican lo opuesto.

Por su parte, las bacterias *Priestia megaterium*, *B. subtilis* y *Brevibacillus* sp., han sido reportadas como endófitas en nódulos de leguminosas, no necesariamente simbióticas, con capacidad de fijar N₂ (Muresu et al., 2022). Asimismo, la capacidad para fijar N₂ de *B. subtilis* (Tabla 2) ha sido efectiva en cepas provenientes de vainas de *Manihot ampotony* y *Tsy taitra*, dos híbridos de plantas de vainilla (Lalanne-Tisné et al., 2023). En tanto que la respuesta positiva de *S. rhizophila*, para fijar N₂ se sustenta en el estudio del suelo de bosque tropical y asociado a la leguminosa *Tephrosia purpurea* L. (Tang et al., 2020; Vijayalakshmi y Senthilkumar, 2024). No se encontraron reportes sobre el potencial de la fijación de N₂ por parte de *S. californicus* y *H. acidicola* (Tabla 2), por lo que se debe indagar minuciosamente sobre sus capacidades como promotoras del crecimiento vegetal.

Las cepas *Bacillus* sp. (MLS3) (1,87 µg mL⁻¹), *Brevibacillus laterosporus* (1,68 µg mL⁻¹) y *P. jessenii* (MLS22) (1,52 µg mL⁻¹) presentaron la mayor solubilización de fosfatos, aunque fueron estadísticamente diferentes entre ellas (Tabla 2). Le siguieron las cepas *H. acidicola*, *B. safensis*, y *P. jessenii* (MLS20) con 1,42, 1,35 y 119 µg mL⁻¹, respectivamente. Las cepas que presentaron valores menores a la unidad, fueron *B. altitudinis* con 0,69 µg mL⁻¹, *M. niabensis* con 0,55 µg mL⁻¹ y el resto de las cepas bacterianas.

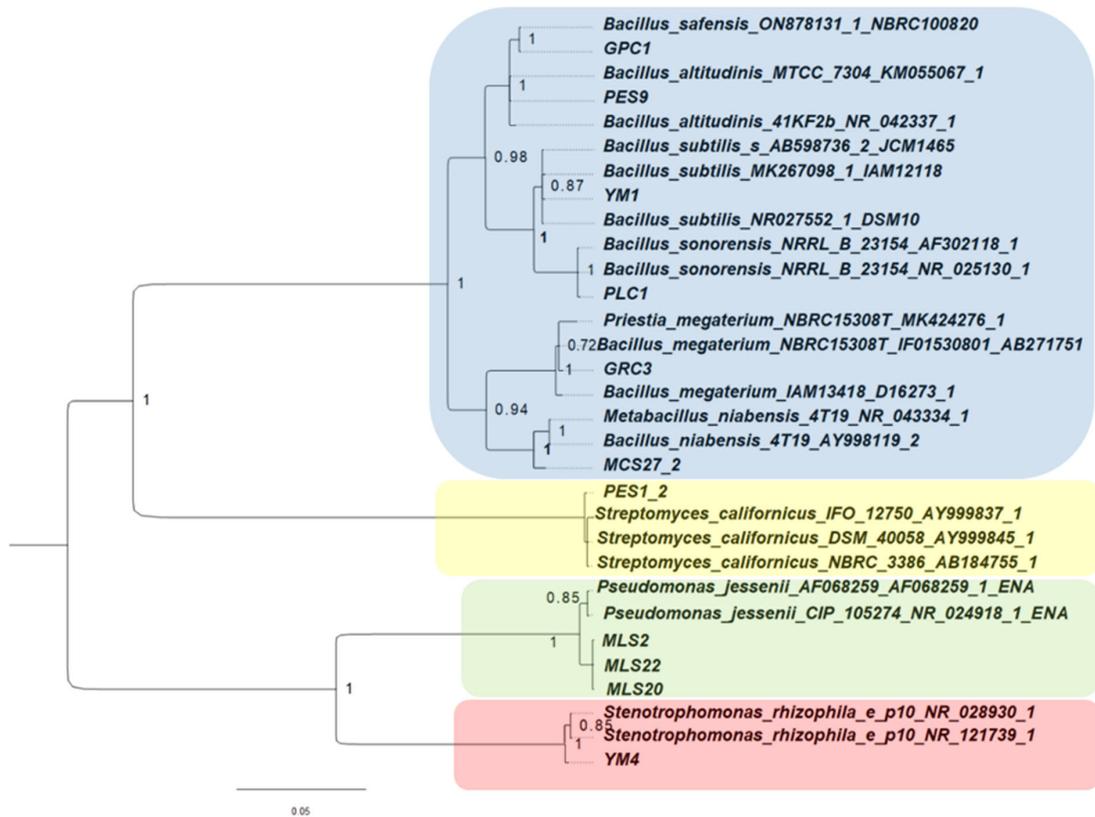


Fig. 1. Árbol filogenético bayesiano reconstruido con especies de los géneros *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*, utilizando las secuencias de la región de ADN ribosomal 16SSU. Las probabilidades posteriores se indican en los nodos. Se utilizó la secuencia de *Streptomyces_californicus_AY999837_1* como grupo externo. La barra de escala indica las sustituciones esperadas por sitio.

Fig. 1. Bayesian phylogenetic tree reconstructed with species from the genera *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* and *Stenotrophomonas*, using the 16SSU ribosomal DNA sequencing. Posterior probabilities are indicated at the nodes. The sequence of *Streptomyces_californicus_AY999837_1* was used as outgroup. The scale bar indicates the expected substitutions per site.

La respuesta favorable de *P. megaterium* en la solubilización de fosfato (Tabla 2), se ratifica en el estudio de Wickramasinghe et al. (2021) donde a partir de aislados de la rizosfera de plantas de arroz se obtuvieron aislamientos efectivos. Esta bacteria ha logrado satisfacer las necesidades nutricionales de las plantas, y es componente de algunos biofertilizantes (Raimi et al., 2020).

Wang et al. (2020) identificaron a *B. subtilis* como un microorganismo solubilizador de fosfato (MSP), aislado de raíz, tallo y hojas de *Rehmannia glutinosa* Libosch, resultado similar a lo obtenido en el presente trabajo. En relación con *H. acidicola* no hay reportes de esta bacteria como solubilizadora de fosfatos, por lo que es importante continuar con la exploración de sus capacidades fisiológicas, ya que los *Bacillus* representan un grupo importante capaz de

hidrolizar compuestos de fósforo orgánicos e inorgánicos, a partir de compuestos insolubles (Kalayu, 2019).

Por su parte, la producción de auxinas fue positiva en ocho cepas, *S. rhizophila* mostró el valor significativamente más alto (0,068 $\mu\text{g mL}^{-1}$), y el resto de las cepas tuvieron valores bajos o no detectables de AIA (Tabla 2). Sin embargo, los resultados demuestran la capacidad real de las bacterias para producir índoles en ausencia de triptófano, el cual es precursor del AIA, pero que no se aplicó en la prueba de la presente investigación. En este sentido diversas cepas asociadas a *S. rhizophila* han sido efectivas en la producción de fitohormonas al producir entre 6,85 y 11,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA, provenientes de la rizosfera de la planta medicinal "Sharpunkha" (Vijayalakshmi y Senthilkumar, 2024). Asimismo,

Tabla 2. Capacidad para solubilizar fosfato, fijar N₂ y producir auxinas de las bacterias asociadas a los meliponinos.**Table 2. Capacity to solubilize phosphate, fix N₂, and produce auxins of bacteria associated with meliponini bees.**

	Cepas bacterianas	Solubilización de fosfato (µg mL ⁻¹)	Fijación de nitrógeno (N ₂)	Producción de auxinas (µg mL ⁻¹)
1	<i>B. safensis</i>	1,35 ± 0,01 e	+	0,007 ± 0,001 cd
2	<i>Priestia megaterium</i>	0,22 ± 0,00 k	+	Nd
3	GRF1	0,42 ± 0,00 i	-	Nd
4	<i>Bacillus subtilis</i>	0,51 ± 0,01 i	+	Nd
5	<i>Stenotrophomonas. rhizophila</i>	0,53 ± 0,01 i	+	0,068 ± 0,003 a
6	<i>Bacillus</i> sp. (MLS1)	0,51 ± 0,01 i	+	0,014 ± 0,001 c
7	<i>Bacillus</i> sp. (MLS3)	1,87 ± 0,01 a	-	Nd
8	<i>Bacillus altitudinis</i>	0,69 ± 0,01 g	+	Nd
9	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	1,68 ± 0,02 b	+	0,009 ± 0,00 cd
10	<i>Bacillus sonorensis</i>	nd	+	Nd
11	<i>Metabacillus niabensis</i>	0,55 ± 0,02 h	-	0,007 ± 0,002 cd
12	<i>Pseudomonas jessenii</i> (MLS2)	0,33 ± 0,01 j	+	Nd
13	<i>Pseudomonas jessenii</i> (MLS20)	1,19 ± 0,01 f	+	0,032 ± 0,003 b
14	<i>P. jessenii</i> (MLS22)	1,52 ± 0,03 c	+	Nd
15	<i>Heyndrickxia acidicola</i>	1,42 ± 0,02 d	+	0,036 ± 0,001 b
16	<i>Streptomyces californicus</i>	nd	+	0,011 ± 0,003 cd

nd: no detectable. Medias ± error estándar con letras distintas indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, P ≤ 0.05).

B. laterosporus es de las especies incluidas en algunos biofertilizantes, y capaces de producir AIA (Raimi et al., 2020). Al respecto, al inocular *B. laterosporus* AMCC100017 en *Malus robusta*, se aumentó el contenido de triptófano en los exudados de la raíz, por lo que se estimuló el crecimiento vegetal (Wang et al., 2022). Contrario a nuestros resultados, *H. acidicola* se ha reportado como no productora de AIA (Mahmoud et al., 2021).

Evaluación de la capacidad de crecimiento de plantas de lechuga inoculadas con bacterias asociadas a meliponinos

La inoculación de las 16 cepas fue eficiente en ambos tipos de inoculación, ya que todas las cepas bacterianas incrementaron significativamente el contenido relativo de clorofila (unidades SPAD) de las plántulas con respecto al control (Tabla 3). En contraste, las plántulas de lechuga que mostraron los valores más bajos en las lecturas SPAD fueron aquellas inoculadas con las cepas *B. safensis* y *P. jessenii* (MLS2). Por su parte, la inoculación en el sistema radical con *M. niabensis* aumentó significativamente las unidades SPAD en 27; por el contrario, el mínimo efecto en esta

variable se observó con *B. altitudinis*.

Por lo anterior, se deduce el buen funcionamiento de las plantas, a nivel de fotosíntesis, ya que la detección de los pigmentos foliares como la clorofila ha sido correlacionada con la actividad fotosintética (Wenneck et al., 2021), la cual mejoró particularmente, al inocular de manera foliar, las cepas *B. sonorensis*, *H. acidicola* y *S. californicus*, y de manera radical a la cepa *M. niabensis*. Al respecto, Pattani et al. (2023), corroboran el efecto benéfico de la inoculación de *B. sonorensis* en el aumento de la clorofila en plantas de tomate. No obstante, los reportes que confirmen el resto de los resultados positivos al inocular *H. acidicola*, *S. californicus* y *M. niabensis* son limitados o desconocidos, lo cual resulta interesante retomar para estudios posteriores.

En cuanto a la evaluación de la eficiencia del fotosistema II (PSII), la cual se asocia a la medición de la fluorescencia de la clorofila *a*, aun cuando los valores fueron constantes en todos los tratamientos, se destaca la inoculación foliar con *B. sonorensis*, ya que produjo el aumento significativo de este parámetro (Tabla 3). Por su parte, en la inoculación radical, la aplicación de *P. jessenii* (MLS22) estimuló significativamente la

Tabla 3. Efecto en las variables fisiológicas de plántulas de lechuga inoculadas con Bacterias asociadas a los meliponinos, después de 35 días de crecimiento.

Table 3. Effect on physiological variables of lettuce seedlings inoculated with bacteria associated with meliponini bees, after 35 days of growth.

Tratamiento	Contenido relativo de Clorofila (unidades SPAD)		Fluorescencia de la clorofila (u.a)	
	IR	IF	IR	IF
Control	13,90 ± 0,92 c	13,66 ± 0,93 c	0,75 ± 0,02 cd	0,75 ± 0,02 bc
<i>B. safensis</i>	23,75 ± 2,27 ab	21,13 ± 0,90 b	0,77 ± 0,0 abcd	0,78 ± 0,01 ab
<i>P. megaterium</i>	24,03 ± 1,02 ab	22,37 ± 1,17 ab	0,72 ± 0,01 d	0,72 ± 0,02 c
GRF1	22,00 ± 1,65 ab	24,12 ± 1,47 ab	0,76 ± 0,0 bcd	0,75 ± 0,01 abc
<i>B. subtilis</i>	23,68 ± 1,60 ab	23,24 ± 1,89 ab	0,76 ± 0,01 bcd	0,77 ± 0,00 abc
<i>S. rhizophila</i>	23,97 ± 0,94 ab	22,61 ± 1,79 ab	0,76 ± 0,01 abcd	0,76 ± 0,00 abc
<i>Bacillus</i> sp. (MLS1)	24,08 ± 1,64 ab	24,81 ± 1,48 ab	0,77 ± 0,00 abc	0,76 ± 0,01 abc
<i>Bacillus</i> sp. (MLS3)	23,48 ± 1,05 ab	22,95 ± 0,77 ab	0,76 ± 0,01 bcd	0,78 ± 0,00 ab
<i>B. altitudinis</i>	21,62 ± 1,10 b	23,15 ± 1,39 ab	0,77 ± 0,0 abc	0,77 ± 0,01 abc
<i>Br. laterosporus</i>	23,27 ± 1,09 ab	23,85 ± 1,24 ab	0,8 ± 0,00 ab	0,79 ± 0,00 ab
<i>B. sonorensis</i>	23,81 ± 1,47 ab	25,92 ± 1,66 a	0,8 ± 0,01 ab	0,80 ± 0,00 a
<i>M. niabensis</i>	27,00 ± 1,37 a	23,1 ± 1,07 ab	0,78 ± 0,01 abc	0,79 ± 0,01 ab
<i>P. jessenii</i> (MLS2)	22,92 ± 1,1 ab	20,61 ± 0,40 b	0,79 ± 0,01 abc	0,79 ± 0,01 ab
<i>P. jessenii</i> (MLS20)	24,86 ± 2,09 ab	22,68 ± 1,84 ab	0,79 ± 0,01 abc	0,77 ± 0,00 abc
<i>P. jessenii</i> (MLS22)	24,02 ± 1,45 ab	23,72 ± 0,93 ab	0,81 ± 0,01 a	0,78 ± 0,00 ab
<i>H. acidicola</i>	25,53 ± 1,1 ab	25,03 ± 1,28 a	0,8 ± 0,01 abc	0,79 ± 0,00 ab
<i>S. californicus</i>	23,64 ± 0,63 ab	26,22 ± 0,73 a	0,77 ± 0,0 abcd	0,78 ± 0,00 ab

IF= Inoculación Foliar; IR: Inoculación Radical. Medias ± error estándar con letras distintas indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$). $n = 10$.

eficiencia del PSII (fluorescencia de la clorofila *a*).

En conjunto, el contenido relativo de clorofila y la fluorescencia de la clorofila *a*, indican el funcionamiento del PSII, de los complejos de antenas captadoras de luz y del transporte de electrones (Kalaji et al., 2016); ya que, únicamente cuando la inoculación de *B. sonorensis* o *P. jessenii* se realizó de manera foliar o radical, los valores fueron estadísticamente diferentes con respecto a las plantas control.

Contrario a los resultados obtenidos en la presente investigación, Pajuelo et al. (2023) no tuvieron efectos evidentes en la eficiencia de la fotoquímica del PSII al inocular bacterias como *B. subtilis* y *P. megaterium* en consorcio con *Pseudomonas gessarfi*, aun cuando estas bacterias mostraron efectos positivos en la germinación y en el crecimiento de la especie suculenta *Mesembryanthemum crystallinum*. Para el caso de la aplicación de bacterias del género *Bacillus*, Jing et al. (2020) demostraron que la combinación de las cepas *Bacillus subtilis* + *B. mucilaginosus* fue efectiva en la promoción del crecimiento y en características fisiológicas como la fluorescencia de la clorofila y la actividad fotoquímica del PSII de plantas de espinaca. De manera similar, la

inoculación de *Bacillus* en plantas de soya, en el mejoramiento de los valores de la fluorescencia de la clorofila, se han correlacionado con el restablecimiento de la condición fisiológica normal de la planta ante un estrés abiótico (Khan et al., 2020).

Respecto al área foliar de las plántulas de lechuga, se presentó una estimulación significativa al inocular *P. jessenii* (MLS22) al inocularla de manera foliar (25,72 cm²); no obstante, presentaron valores estadísticamente similares a los obtenidos en los tratamientos donde se aplicaron *B. sonorensis*, *H. acidicola*, *M. niabensis* y *S. californicus*, con valores de 24,48; 23,80; 23,58 y 24,26 cm², respectivamente (Fig. 2A). La inoculación radical con *H. acidicola* estimuló significativamente el área foliar de las plántulas al obtener 26,03 cm², seguido por *P. jessenii* (MLS20) (23,67 cm²), GRF1 (23,26 cm²), *P. jessenii* (MLS2) (22,18 cm²), *B. sonorensis* (21,60 cm²), y *B. laterosporus* (21,67 cm²) (Fig. 2B).

El peso seco de la raíz aumentó significativamente al aplicar, tanto de manera foliar como radical, la bacteria *H. acidicola* al presentar 10,66 y 9,44 mg, respectivamente (Figs. 3A y 3B). Cuando la inoculación fue foliar, se observaron

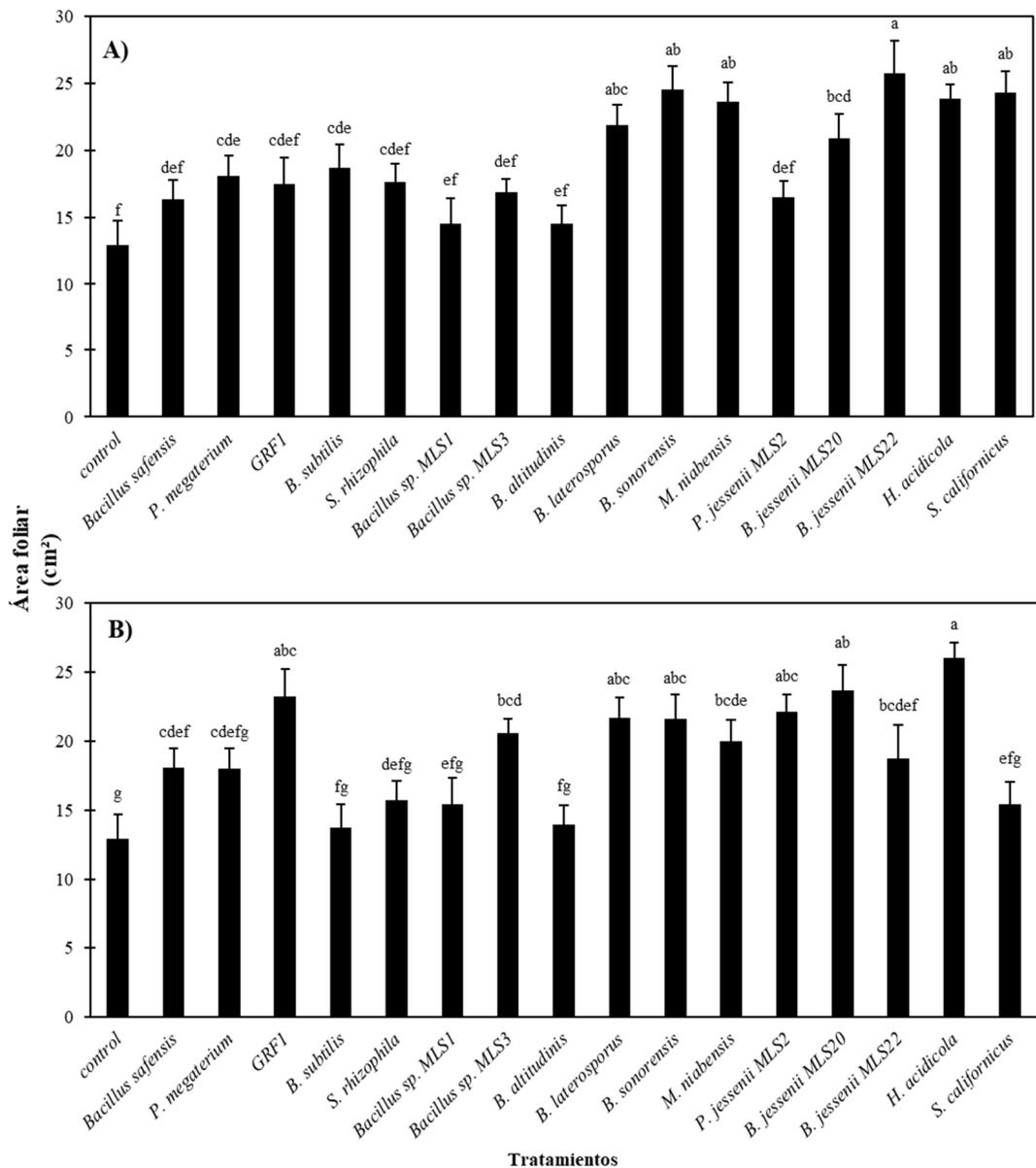


Fig. 2. Efectos de la inoculación foliar (A) y radical (B) con cepas bacterianas asociadas a meliponinos en el área foliar en plántulas de lechuga (*Lactuca sativa* L. var. Starfighter). Medias ± error estándar en cada gráfica con letras distintas indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$). $n = 10$.

Fig. 2. Effects of leaf (A) and root (B) inoculation with meliponini bee-associated bacterial strains on leaf area in lettuce (*Lactuca sativa* L. var. Starfighter) seedlings. Means ± standard error in each graph with different letters indicate significant statistical differences (Tukey, $P \leq 0.05$). $n = 10$.

efectos similares al tratamiento control (2,4 mg) al inocular las cepas *P. megaterium*, *B. subtilis* y *B. altitudinis* (Fig. 3A). Asimismo, *Stenotrophomonas rhizophila* y *B. altitudinis* inoculadas en raíz, presentaron valores significativamente menores respecto al control (3,94 mg) (Fig. 3B).

El peso seco de la parte aérea tuvo un incremento significativo con la aplicación foliar de *B. sonorensis* y *S. californicus* (Fig. 4A). No obstante, el efecto contrario se observó cuando se inocularon las cepas *Bacillus sp.* (MLS1), *B. safensis*, *Bacillus sp.* (MLS3) y *B. altitudinis*. De

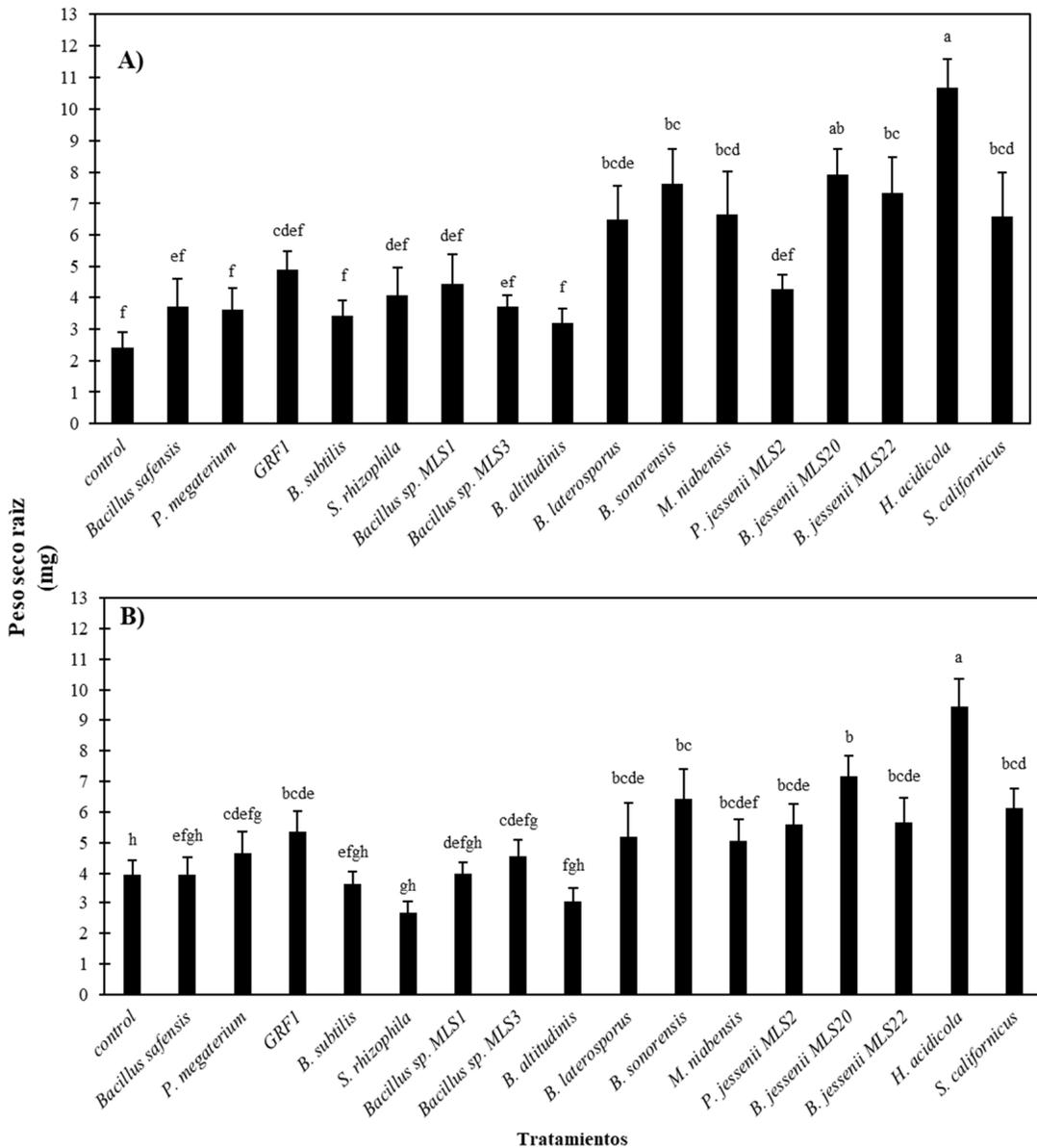


Fig. 3. Efectos de la inoculación foliar (A) y radical (B) con cepas bacterianas asociadas a meliponinos en el peso seco de raíz en plántulas de lechuga (*Lactuca sativa* L. var. Starfighter). Medias \pm error estándar en cada gráfica con letras distintas indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$). $n = 10$.

Fig. 3. Effects of leaf (A) and root (B) inoculation with meliponini bee-associated bacterial strains on root dry weight in lettuce (*Lactuca sativa* L. var. Starfighter) seedlings. Means \pm standard error in each graph with different letters indicate significant statistical differences (Tukey, $P \leq 0.05$). $n = 10$.

forma similar, la inoculación de *H. acidicola* y de *P. jessenii* (MLS20) en el sistema radical, estimuló significativamente el peso seco de la parte aérea (Fig. 4B).

Por su parte, el peso seco total de las plántulas tuvo un incremento significativo cuando se inocularon de manera foliar las

bacterias *B. sonorensis* (48,76 mg) y *S. californicus* (47,15 mg) siendo similares entre sí, aunque también presentaron resultados semejantes los tratamientos con *P. jessenii* (MLS22) (43,59 mg) y *H. acidicola* (37,01) (Fig. 5A). En tanto que, cuando se inoculó *H. acidicola* en el sistema radical, se logró la estimulación significativa de esta variable

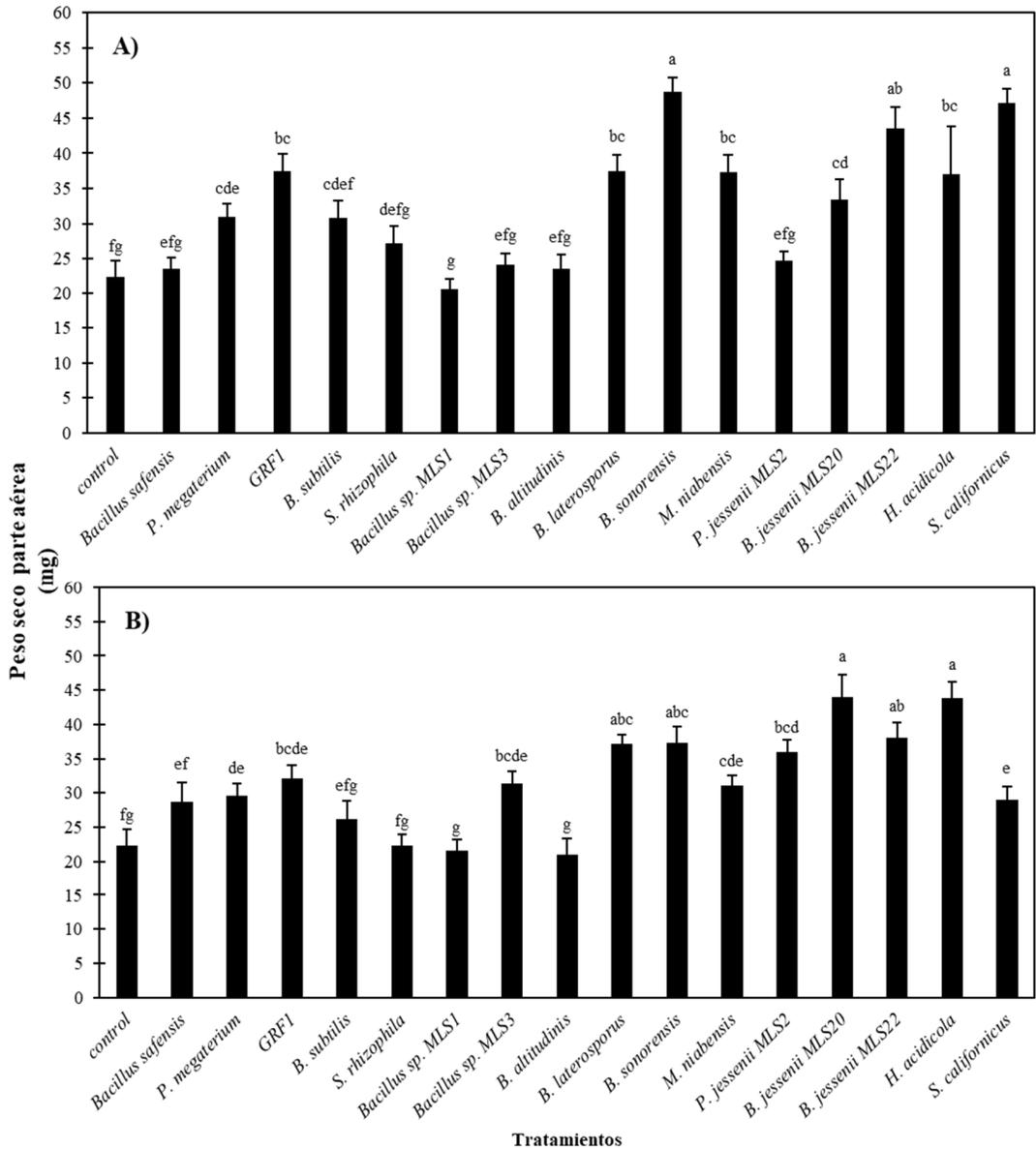


Fig. 4. Efectos de la inoculación foliar (A) y radical (B) con cepas bacterianas asociadas a meliponinos en el peso seco de la parte aérea en plántulas de lechuga (*Lactuca sativa* L. var. Starfighter). Medias \pm error estándar en cada gráfica con letras distintas indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$). $n = 10$.

Fig. 4. Effects of leaf (A) and root (B) inoculation with meliponini bee-associated bacterial strains on shoot dry weight in lettuce (*Lactuca sativa* L. var. Starfighter) seedlings. Means \pm standard error in each graph with different letters indicate significant statistical differences (Tukey, $P \leq 0.05$). $n = 10$.

con 43,76 mg (Fig. 5B).

En general, la principal estimulación del crecimiento de las plántulas de lechuga se observó al inocular a *B. sonorensis* y *H. acidicola*, ya sea de manera foliar o radical, al aumentar su biomasa total en 56,38 y 53,43%, respectivamente. Este efecto benéfico se asocia a diferentes mecanismos como la fijación de N_2

y la producción de fitohormonas por parte de *B. sonorensis*, así como a la capacidad para fijar N_2 , solubilizar fósforo y producir auxinas (AIA) por *H. acidicola* (Tabla 2). En relación a *S. californicus* y su respuesta semejante a *B. sonorensis* en el aumento del peso seco de la parte aérea y total al ser inoculada de manera foliar, no se encontraron reportes en lechuga que confirmen

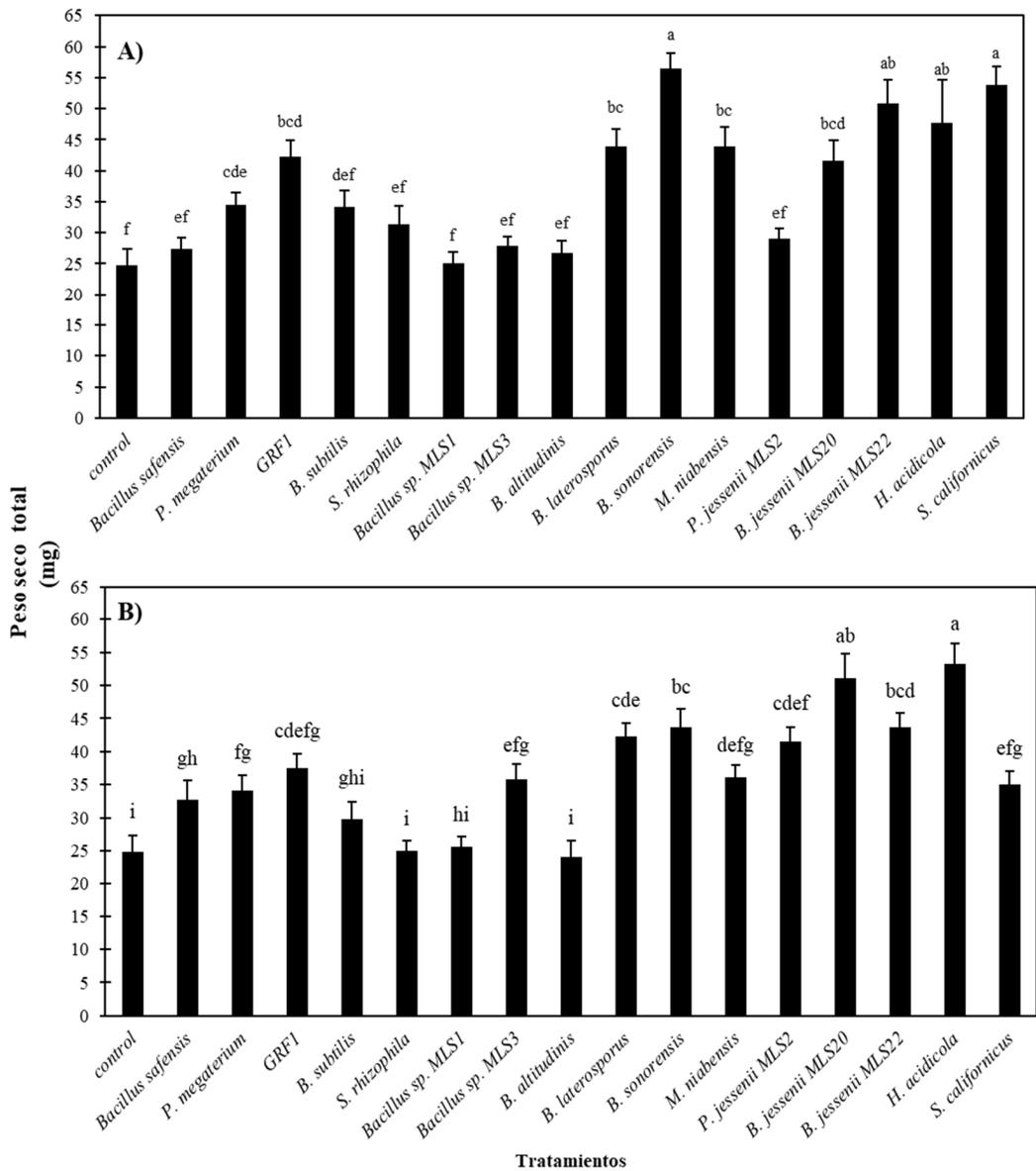


Fig. 5. Efectos de la inoculación foliar (A) y radical (B) con cepas bacterianas asociadas a meliponinos en el peso seco total en plántulas de lechuga (*Lactuca sativa* L. var. Starfighter). Medias \pm error estándar en cada gráfica con letras distintas indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$). $n = 10$.

Fig. 5. Effects of leaf (A) and root (B) inoculation with meliponini bee-associated bacterial strains on total dry weight in lettuce (*Lactuca sativa* L. var. Starfighter) seedlings. Means \pm standard error in each graph with different letters indicate significant statistical differences (Tukey, $P \leq 0.05$). $n = 10$.

su efectividad. Sin embargo, las actinobacterias del género *Streptomyces* poseen alto potencial en la producción de alimentos, debido a su capacidad de producción de antibióticos, metabolitos, enzimas, sideróforos y fitohormonas como el AIA (Kitwetch, et al., 2023; Nazari et al., 2023).

En el trabajo de Wang et al. (2020) la bacteria

B. sonorensis no se considera como fijadora de N_2 , pero fue capaz de producir AIA, lo cual ha sido reportado por Oliva et al. (2023). Respecto a *H. acidicola*, y su influencia positiva en las variables de crecimiento de la lechuga se debe a su capacidad para fijar N_2 , solubilizar fosfato y producir AIA (Tabla 2); sin embargo, no existen

estudios previos que lo corroboren. Mahmoud et al. (2021) evaluaron la capacidad de producir auxinas por *H. acidicola*, no obstante, el resultado reportado fue negativo.

La inoculación foliar de *B. sonorensis* en plántulas de lechuga destacó al aumentar el peso seco de la parte aérea y el peso seco total; de forma similar; esta bacteria también fue eficiente para promover la altura, el volumen radical y el peso seco de la raíz y la parte aérea de plantas de haba (Yamuna et al., 2018). Sin embargo, los casos donde se menciona a *Bacillus* spp. como bacterias promotoras del crecimiento vegetal, han sido a través de la evaluación de sus efectos cuando se aplican en la raíz, sitio donde generalmente son aplicados los biofertilizantes. En comparación con la inoculación radical, es probable que la respuesta estimulante en el crecimiento de las plántulas de lechuga por la inoculación foliar de *B. sonorensis*, se asocie al éxito de su establecimiento en la filósfera e, incluso, como endófito de las plántulas de lechuga, así como ocurre con otros microorganismos (Kumar et al., 2023).

En particular, la filósfera comprende toda la parte aérea de las plantas y es dominada por las hojas (filoplano), y comprende un ambiente oligotrófico con recursos limitados, expuesto a la desecación y a altos niveles de radiación, entre otros factores adversos que condicionan la sobrevivencia de microorganismos (Stone et al., 2018; Vorholt et al., 2012). Así, *B. sonorensis* al ser inoculado en las hojas de las plantas de lechuga, pudo haber tolerado dichos factores, y así promover el crecimiento vegetal. Además, los microorganismos de la filósfera también son capaces de aumentar la disponibilidad de nutrientes (P, K, Zn, por ejemplo) y liberar distintas hormonas, incluidas citoquininas, zeatina, ácido giberélico y auxinas que mejoran la resistencia hacia patógenos, y al estrés abiótico (Sivakumar et al., 2020; Kumar et al., 2023).

Respecto a los *Bacillus* en la filósfera, se ha demostrado que la tasa de supervivencia de estas bacterias es mayor en comparación con otros géneros bacterianos. Tal es caso de los microorganismos identificados en la filósfera del maíz de zonas áridas con alta capacidad para fijar N_2 , entre los que destacan *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. paralicheniformis*, *B. licheniformis*, *M. niabensis* y *P. megaterium* (Abadi et al., 2021). Asimismo, el establecimiento de los microorganismos en la filósfera se asocia con su capacidad para formar agregados bacterianos inmersos en sustancias poliméricas extracelulares, por lo que es común su establecimiento en las depresiones formadas en la unión de las células epidérmicas de las hojas, a lo largo de la venación y/o en la base de los tricomas (Vorholt

et al., 2012). Por lo anterior, es probable que el resultado favorable de la inoculación de *B. sonorensis* y *H. acidicola* en el crecimiento de las plántulas de lechuga se haya logrado a través de su establecimiento como endófitos, en la filósfera o de la rizosfera de la lechuga, al crear las condiciones semejantes al polen (del cual proceden ambas bacterias aplicadas en este estudio) y a los sitios de reserva en el nido de las abejas sin aguijón. Los sitios de almacenamiento del polen tienen un ambiente cálido, húmedo, ácido y nutritivo, por lo que funciona como reservorio natural de microorganismos (Menezes et al., 2018; de Paula et al., 2021).

CONCLUSIONES

La capacidad para fijar N_2 , solubilizar fosfatos y producir auxinas por parte de las bacterias asociadas a los meliponinos, exponen su potencial para inducir el crecimiento vegetal. Particularmente, la efectividad de *B. sonorensis* y *H. acidicola* sobre plántulas de lechuga, demuestra su potencial para ser utilizadas como biofertilizantes, capaces de promover el crecimiento mediante los mecanismos fisiológicos mencionados.

El resultado positivo de la inoculación foliar de *B. sonorensis* en el crecimiento de las plántulas probablemente se relaciona con el éxito de su establecimiento en la filósfera, ejerciendo desde ese ambiente su capacidad para inducir el crecimiento de lechuga; sin embargo, se requiere profundizar más en el tema, para describir los mecanismos por los cuales las cepas *B. sonorensis* y *H. acidicola* se establecen tanto en raíz como en hoja, y con ello, ejercer sus efectos benéficos.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT-México) por el apoyo financiero otorgado a P.J. Pérez-Peralta durante sus estudios de doctorado. Esta investigación fue financiada mediante el proyecto SEP-CONAHCYT 257847. Al Laboratorio de Bioprocesos del Colegio de Postgraduados, Campus Campeche por la donación de las cepas bacterianas utilizadas en este estudio.

Contribución de los autores:

Participación activa en la revisión bibliográfica: P.J.P-P., R.F-C.

Participación activa en la elaboración de la metodología: P.J.P-P., R.F-C., D.J.H-M., A.A.

Participación activa en la discusión de los resultados: P.J.P-P., D.J.H-M., A.A., J. D-M.

Análisis molecular de las cepas y elaboración

de árbol filogenético: P.J.P-P; S.C-P.

Revisión y aprobación de la versión final del artículo: P.J.P-P., A.A. R.F-C., D.J.H-M, J. D-M.

LITERATURA CITADA

- Abadi, V. A. J. M., M. Sepehri, H. A. Rahmani, H. K. Dolatabad, M. Shamshiripour, and B. Khatabi. 2021. Diversity and abundance of culturable nitrogen-fixing bacteria in the phyllosphere of maize. *Journal of Applied Microbiology* 131(2): 898-912. Doi: 10.1111/jam.14975
- Acurio Vásconez, R. D., J. E. Mamarandi Mossot, A. G. Ojeda Shagñay, E. M. Tenorio Moya, V. P. Chiluisa Utreras and I. D. L. A. Vaca Suquillo. 2020. Evaluation of *Bacillus* spp. As plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in broccoli (*Brassica oleracea* var. italica) and lettuce (*Lactuca sativa*). *Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 21(3): e1465. Doi: 10.21930/rcta.vol21_num3_art:1465
- Almaraz-Suarez, J. J., D. Y. Pineda-Mendoza y C. Heredia-Acuña. 2020. Métodos prácticos para el estudio de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. p. 227-240. In Ferrera-Cerrato, R., J. Delgadillo-Martínez, A. Alarcón, J. Alvarado-López, J. Pérez-Moreno and J. J. Almaraz-Suarez (eds.). *Microbiología aplicada a la agricultura y agroecosistemas Principios y técnicas para su investigación*. Biblioteca Básica de Agricultura, Estado de México, México.
- Alves, V. F., L. T. Chaul, G. C. Bueno, I. Reinecke, T. C. Silva, P. V. Brito, and E. C. De Martinis. 2024. Associated bacterial microbiota of honey and related products from stingless bees as novel sources of bioactive compounds for biotechnological applications. *Current Opinion in Food Science* 55: 101122. Doi: 10.1016/j.cofs.2023.101122
- Basu, A., P. Prasad, S. N. Das, S. Kalam, R. Z. Sayyed, M. S. Reddy, and H. El Enshasy. 2021. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: Recent developments, constraints, and prospects. *Sustainability* 13(3): 1140. Doi: 10.3390/su13031140
- Benavides, H. S., D. Uribe-Velez, and H. Restrepo-Díaz. 2023. Evaluation of brassinosteroids and plant growth-promoting bacteria on the growth and yield of *Lactuca sativa* L. under soilless cultivation conditions. *Journal of Plant Nutrition* 46(18): 4438-4453. Doi: 10.1080/01904167.2023.2232390
- Bric, J. M., R. M. Bostock, and S. E. Silverstone. 1991. Rapid in situ assay for indoleacetic Acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 535-53. Doi: 10.1128/aem.57.2.535-538.1991.
- Cohn, F. 1875. Untersuchungen über Bakterien. In: Cohn F (eds), *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* 1 (Heft 2), Max Müller, Breslau. 127-224.
- Costa-Neto, E. M. and F. V. Dunkel. 2016. P. 29-60. Insects as food: history, culture, and modern use around the world. In: Dossey, T., J. A. Morales-Ramos y M. G. Rojas (eds) *Insects as sustainable food ingredients*. Academic Press, Estados Unidos. Doi: 10.1016/B978-0-12-802856-8.00002-8
- Darriba, D., G. L. Taboada, R. Doallo, and D. Posada. 2012. JModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8): 772.
- De Paula, G. T., C. Menezes, M. T. Pupo, and C. A. Rosa. 2021. Stingless bees and microbial interactions. *Current Opinion in Insect Science* 44: 41-47. Doi: 10.1016/j.cois.2020.11.006
- Delgadillo-Martínez, J., M. Aguirre-Zamora y R. Ferrera-Cerrato. 2020. P. 67-89. Técnicas de estudio de fijadores de nitrógeno atmosférico. In Ferrera-Cerrato, R., J. Delgadillo-Martínez, A. Alarcón, J. Alvarado-López, J. Pérez-Moreno and J. J. Almaraz-Suarez (eds) *Microbiología aplicada a la agricultura y agroecosistemas Principios y técnicas para su investigación*. Biblioteca Básica de Agricultura, Estado de México, México.
- Días, A. C., F. E. Costa, F. D. Andreote, P. T. Lacava, M. A. Teixeira, L. C. Assumpção, W. L. Araujo, J. L. Azevedo, and I. S. Melo. 2009. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 25:189-195. Doi:10.1007/s11274-008-9878-0
- Doyle, J.J., and J. L. Doyle. 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Grüter, C., and C. Grüter. 2020. P. 43-86. Evolution and diversity of stingless bees. *Stingless Bees: Their behaviour, ecology and evolution*. In: C. Grüter (ed) *Stingless Bees. Fascinating Life Sciences*. Springer, Cham. Doi: 10.1007/978-3-030-60090-7_2
- Huelsenbeck, J.P., and F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.

- Jing, Q., H. Zhang, J. Wang, and Y. Yang. 2020. Effects of microbial fertilizer on the growth, physiology, and chlorophyll fluorescence response of spinach seedlings. doi:10.21203/rs.3.rs-31406/v1
- Kalayu, G. 2019. Phosphate solubilizing microorganisms: Promising approach as biofertilizers. *International Journal of Agronomy* 2019 (4917256); 1-7. doi:10.1155/2019/4917256
- Kalaji, H. M., A. Jajoo, A. Oukarroum, M. Brestic, M. Zivcak, I. A. Samborska, M. D. Cetner, I. Łukasik, V. Golrsev, and R. J. Ladle. 2016. Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. *Acta Physiologiae Plantarum* 38(102): 1-11. Doi: 10.1007/s11738-016-2113-y
- Khan, M. A., S. Asaf, A. L. Khan, R. Jan, S. M. Kang, K. M. Kim, and I. J. Lee. 2020. Thermotolerance effect of plant growth-promoting *Bacillus cereus* SA1 on soybean during heat stress. *BMC Microbiology* 20(1): 1-14. Doi: 10.1186/s12866-020-01822-7
- Kitwetch, B., P. Rangseekeaw, Y. Chromkaew W. Pathom-Aree, and S. Srinuanpan. 2023. Employing a plant probiotic actinomycete for growth promotion of lettuce (*Lactuca sativa* L. var. longifolia) cultivated in a hydroponic system under nutrient limitation. *Plants* 12(22): 3793. Doi: 10.3390/plants12223793
- Kumar, S., Diksha, S. S. Sindhu, R. Kumar, A. Kumari, and A. Panwar. 2023. Harnessing phyllosphere microbiome for improving soil fertility, crop production, and environmental sustainability. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 1-46. Doi: 10.1007/s42729-023-01397-y
- Kumar, S., S. S. Sindhu, and R. Kumar. 2022. Biofertilizers: An ecofriendly technology for nutrient recycling and environmental sustainability. *Current Research in Microbial Sciences*, 3, 100094. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100094>
- Lalanne-Tisné, G., B. Barral, A. Taibi, Z. K. Coulibaly, P. Burguet, F. Rasoarahona, Quinton, L., J. C. Meile, H. Boubakri, and H. Kodja. 2023. Exploring the phytobeneficial and biocontrol capacities of endophytic bacteria isolated from hybrid vanilla pods. *BioRxiv*, 529991. Doi: 10.1101/2023.02.24.529991
- Lastochkina, O.V. 2021. Adaptation and tolerance of wheat plants to drought mediated by natural growth regulators *Bacillus* spp.: Mechanisms and practical importance. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologia (Agricultural Biology)* 56: 843-867. Doi: 10.15389/agrobiol.2021.5.843eng
- Mahmoud, H., S. Eapen, F. Al-Bajjali, A. Al-Qattan, and L. Jose. 2021. *Litoribacterium kuwaitense* gen. nov., sp. Nov., isolated from a Kuwait tidal flat. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 71(4). Doi: 10.1099/ijsem.0.004792
- Menezes, C., A. Vollet-Neto, F. A. F. L. Contrera, G. C. Venturieri, and V. L. Imperatriz-Fonseca. 2013. The role of useful microorganisms to stingless bees and stingless beekeeping. p. 153-171. In: P. Vit, S. Pedro and D. Roubik (eds) *Pot-Honey: A legacy of stingless bees*. Springer, New York, NY, USA. Doi: 10.1007/978-1-4614-4960-7_10
- Menezes C., C. R. Paludo and M. T. Pupo. P. 253-262. A review of the artificial diets used 425 as pot-pollen substitutes. In: P. Vit, S. Pedro and D. Roubik (eds) *Pot-pollen in Stingless Bee Melittology* Vit. Springer. 2018:253-262.
- Migula, W. 1894. Über ein neues system der bakterien. *Arbeiten aus dem bakteriologischen*
- Muresu, R., A. Porceddu, G. Concheri, P. Stevanato, and A. Squartini, 2022. Legumes of the Sardinia Island: Knowledge on symbiotic and endophytic bacteria and interactive software tool for plant species determination. *Plants* 11: 1521. Doi: 10.3390/plants11111521
- Nazari, M. T., V. A. Schommer, J. C. A. Braun, L. F. dos Santos, S. T. Lopes, V. Simon, B. S. Machado, V. Ferrari, L. M. Colla, and J. S. Piccin. 2023. Using *Streptomyces* spp. As plant growth promoters and biocontrol agents. *Rhizosphere* 27: 100741. Doi:10.1016/j.rhisph.2023.100741
- O'Callaghan, M., R. A. Ballard, and D. Wright. 2022. Soil microbial inoculants for sustainable agriculture: Limitations and opportunities. *Soil USE Management* 38(3): 1340-1369. Doi: 10.1111/sum.12811
- Oliva, G., L. Di Stasio, G. Vigliotta, F. Guarino, A. Ciatelli, and S. Castiglione. 2023. Exploring the potential of four novel halotolerant bacterial strains as plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) under saline conditions. *Applied Sciences* 13(7): 4320. Doi:10.3390/app13074320
- Pajuelo, E., N. J. Flores-Duarte, S. Navarro-Torre, I. D. Rodríguez-Llorente, E. Mateos-Naranjo, S. Redondo-Gómez, and J. A. Carrasco López. 2023. Culturomics and circular agronomy: Two sides of the same Coin for the design of a tailored biofertilizer for the semi-halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plants* 12(13): 2545. doi: 10.3390/plants12132545.

- Palleroni, N.J., and J.F. Bradbury. 1993. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *International Journal of Systematic Bacteriology*. (43), 606-609. doi: org/10.1099/00207713-43-3-606.
- Parte, A.C., J. Sardá Carbasse, J. P. Meier-Kolthoff, L. C. Reimer, and M. Göker. 2020. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (70): 5607-5612. doi: 10.1099/ijsem.0.004332
- Pattani, V., J. Kaneriyi, K. Joshi, D. Gandhi, and G. Sanghvi. 2023. Effect of growth-promoting bacterial consortia on overall growth of tomato plants. *Applied Biochemistry and Microbiology* 59(4): 511-521. doi: 10.1134/S0003683823040105
- Raimi, A., A. Roopnarain, G. J. Chirima and R. Adeleke. 2020. Insights into the microbial composition and potential efficiency of selected commercial biofertilisers. *Heliyon* 6(7). doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04342
- Rambaut, A. 2018. Figtree ver 1.4.4. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh.
- Ronquist, F., M. Teslenko, P. van der Mark, D. L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M. A. Suchard, and J. P. Huelsenbeck. 2012. MrBayes 3.2: Inferencia filogenética bayesiana eficiente y elección de modelo en un gran espacio modelo. *Sistema. Biol.* 61:539-542.
- Sarti, G. C., M. E. Galelli, S. Arreghini, J. A. E. Cristóbal-Miguez, J. A. Curá, and A. Paz-González. 2023. Inoculation with biofilm of *Bacillus subtilis* promotes the growth of *Lactuca sativa*. *Sustainability* 15(21):15406. doi: 10.3390/su152115406
- SAS. 2013. Software: the SAS System for Windows version 9.4. Statistical Analysis System Institute Inc., Cary, NC 25513, Carolina del Norte, EUA.
- Silvestro, D., and I. Michalak. 2012. raxmlGUI: una interfaz gráfica para RAxML. *Org. Diversos. Evolución.* 12:335-337.
- Singh, P., R. K. Singh, Y. Zhou, J. Wang, Y. Jiang, N. Shen, Y. Wang, L. Yang, and M. Jiang. 2022. Unlocking the strength of plant growth promoting *Pseudomonas* in improving crop productivity in normal and challenging environments: a review. *Journal of Plant Interactions* 17(1): 220-238. doi: 10.1080/17429145.2022.2029963
- Sinpoo, C., A. In-On, N. Noirungsee, K. Attasopa, P. Chantawannakul, V. Chaimanee, P. Phokasem, T.C. Ling, W. Purahong, and T. Disayathanoowat. 2023. Microbial community profiling and culturing reveal functional groups of bacteria associated with Thai commercial stingless worker bees (*Tetragonula pagdeni*). *Plos one* 18(3): e0280075. doi: 10.1371/journal.pone.0280075
- Sivakumar, N., R. Sathishkumar, G. Selvakumar, R. Shyamkumar, and K. Arjunekumar. 2020. Phyllospheric microbiomes: Diversity, ecological significance, and biotechnological applications. *Plant microbiomes for sustainable agriculture* 113-172. doi: 10.1007/978-3-030-38453-1_5
- Stone, B. W., E. A. Weingarten, and C. R. Jackson. 2018. The role of the phyllosphere microbiome in plant health and function. *Annual Plant Reviews* 1: 1-24. doi: 10.1002/9781119312994.apr0614
- Tang, A., A. O. Haruna, N. M. A Majid, and M. B. Jalloh. 2020. Potential PGPR properties of cellulolytic, nitrogen-fixing, phosphate-solubilizing bacteria in rehabilitated tropical forest soil. *Microorganisms* 8(3): 442. doi: 10.3390/microorganisms8030442
- Vijayalakshmi, K., and G. Senthilkumar. 2024. Identification and characterization of *Stenotrophomonas rhizophila* isolated from rhizosphere soil of *Tephrosia purpurea* L. (Green manure crop) of Tamil Nadu. *Research Journal of Agricultural Sciences* 15: 60-67.
- Vorholt, J. A. 2012. Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology* 10(12): 828-840. doi: 10.1038/nrmicro2910.
- Waksman, S.A., and Henrici, A.T. 1943. The nomenclature and classification of the actinomycetes. *Journal of Bacteriology*. 46:337-341. doi:org/10.1128/jb.46.4.337-341.
- Wang, S., B. Ji, X. Su, W. Li, C. Dong, S. Chen, Y. Zhu, and W. Feng. 2020. Isolation of endophytic bacteria from *Rehmannia glutinosa* Libosch and their potential to promote plant growth. *The Journal of General Applied Microbiology* 66: 279-288. doi: 10.2323/jgam.2019.12.001
- Wang, X., J. Zhang, X. Wang, J. An, C. You, B. Zhou, and Y. Hao. 2022. The growth-promoting mechanism of *Brevibacillus laterosporus* AMCC100017 on apple rootstock *Malus robusta*. *Horticultural Plant Journal* 8(1): 22-34. doi: 10.1016/j.hpj.2021.11.005

- Wenneck, G.S., V. Villa, R. Saath, R. Rezende, G.L. Pereira, and B.M.C. Mondanez. 2021. Pigmentos foliares na cultura da ervilha: relação entre índice SPAD e conteúdo de clorofila. *Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas*, 15(3): 391-400. doi: 10.18011/bioeng2021v15n3p391-400
- Wickramasinghe, W. R. K. D. W. K. V., D. Girija, and K. S. Gopal. 2021. Native multiphasic plant growth promoting rhizobacteria consortia for growth and yield of rice. *Research Journal of Agricultural Sciences*, 12(2): 601–606.
- Yamuna, J., D. J. Bagyaraj, and R. Ashwin. 2018. Response of field bean to inoculation with PGPR *Bacillus sonorensis* and AM fungus *Funneliformis mosseae*. *Journal of Soil Biology and Ecology* 38: 104-111.