



14to Congreso Internacional de Educación Superior Universidad 2024

Aislados de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento para el control de hongos fitopatógenos

Isolates of Plant Growth Promoting Rhizobacteria to control phytopathogen fungi

Autores: María de Jesús Díaz Carballo¹, Glenda García Pérez¹ y M. Sc. Yunel Pérez Hernández¹

¹ Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Matanzas, Cuba

Resumen

Las plagas de los cultivos constituyen una de las principales limitantes para alcanzar la máxima productividad y la seguridad alimentaria. El presente trabajo tuvo como objetivo seleccionar aislados de *Bacillus* spp. con potencialidades para el control de hongos fitopatógenos. Se utilizó para el estudio la colección aislados bacilares provenientes de la rizosfera de *Phaseolus vulgaris* L., pertenecientes al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Matanzas. Se evaluó el efecto antagonista de los aislados frente a *Aspergillus niger* y a HMB (hongo de micelio blanco), aislado previamente de semillas de *Sorghum bicolor* L., mediante el método de enfrentamiento dual. Se realizó una caracterización de los mejores aislados con relación a la producción de enzimas como β -1,3-glucanasas y/o quitinasas, proteasas, celulasas, β -mananasas, así como la producción de amonio, ácido indolacético y cianuro de hidrógeno. Los aislados con mayores porcentajes de inhibición frente a ambos hongos son Cu51 y TS96, los cuales son capaces de producir β -1,3-glucanasas y/o quitinasas, proteasas y β -mananasas de manera abundante, así como producir amonio y ácido indolacético. Estos resultados sugieren un uso potencial de estos aislados en el sector agropecuario, para el control de plagas fungosas y la promoción del crecimiento de los cultivos.

Palabras claves: agroecología, *Bacillus*, biopesticidas, BPCV.

Abstract

Crop pests are one of the factors that limit the maximal productivity and food security. The objective of the present work was to select isolates of *Bacillus* spp. with potentialities to control phytopathogen fungi. The bacilli isolate collection obtained from the rhizosphere of *Phaseolus vulgaris* L. was used for the screening work. This collection belongs to the Laboratory of Microbiology of the Faculty of Agronomy Sciences, University of Matanzas.

It was evaluated the antagonistic effect of the isolates against *Aspergillus niger* and a fungus previously isolated from seeds of *Sorghum bicolor* L., by using the dual culture method. The characterization of the best isolates was carried out regarding the production of enzymes such as: β -1,3-glucanases y/o chitinases, proteases, cellulases, β -mananases, as well as the production of ammonium, indolacetic acid and hydrogen cyanide. The isolates with the higher inhibition percentages against both fungi were Cu151 and TS96, which were able to produce abundantly β -1,3-glucanases y/o chitinases, proteases and β -mananases, as well as to produce ammonium and indolacetic acid. These results suggest the potential use of these isolates in the agriculture field, to control fungous pest and to promote crop growing.

Keywords: agroecology, *Bacillus*, biopesticides, PGPB.

Introducción

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) constituye junto al arroz la dieta básica del cubano. Representa una fuente importante de proteínas, fibras naturales y de minerales como el hierro, lo cual les confiere propiedades nutricionales frente a otros alimentos de origen vegetal y efectos beneficiosos en la prevención de enfermedades del corazón, digestivas y sobre la obesidad (Guzmán, 2002). Sin embargo, este cultivo es afectado por diversas plagas como las de origen fungoso, que destruyen las cosechas y tienen un impacto económico elevado.

En la agricultura moderna su utiliza indiscriminadamente cantidades elevadas de pesticidas químicos para el control de estas plagas. Sin embargo, esto provoca la contaminación de los suelos, el aire y el agua, lo que afecta negativamente los ecosistemas agroproductivos y ponen en riesgo la salud humana (Zahid *et al.*, 2015). Debido a esta situación, los científicos buscan nuevos productos para disminuir uso de estos insumos agrícolas contaminantes, por otros más amigables con el medio ambiente en función de desarrollar una agricultura agroecológica y sostenible.

Entre las estrategias para alcanzar este propósito está el desarrollo de productos a base de Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (RPCV). Estos microorganismos promueven el crecimiento y desarrollo de los cultivos, a partir de varios mecanismos bioquímicos basados en la producción de reguladores del crecimiento, potenciar la nutrición mineral y en el control de fitopatógenos (Moreno *et al.*, 2018). Estos mecanismos están relacionados con la producción de fitohormonas, la solubilización de fosfatos, la producción de sideróforos, así como la secreción de antibióticos y enzimas líticas que tienen un efecto antagónico y biocontrolador de patógenos (Thanh y Tram, 2018).

Bacillus es uno de los géneros más utilizados con este propósito, debido a su crecimiento fácil en medios de cultivos, la capacidad de producir endosporas resistentes a diversas condiciones desfavorables lo que, a su vez, facilita las formulaciones estables de los productos. Además, están demostradas las propiedades de este género como BPCV en diferentes especies vegetales (Robledo-Buriticá *et al.*, 2018). El presente trabajo tuvo como objetivo seleccionar aislados de *Bacillus* spp. con potencialidades para el control de hongos fitopatógenos.

Materiales y métodos

La investigación se desarrolló en los laboratorios del Centro de Estudios Biotecnológicos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, de la Universidad de Matanzas. Para el estudio se utilizó una colección de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal aisladas de la rizosfera de *Phaseolus vulgaris* L., de Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

Enfrentamiento dual de las cepas a hongos

Los hongos *Aspergillus niger* y HMB (hongo de micelio blanco) aislado de semillas de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) se rejuvenecieron en medio agar Saboreau. De manera similar, los aislados se cultivaron en medio Agar Nutriente durante 24 h a 37°C. Posteriormente, se inoculó el medio Agar Saboreau con 100 µL de células de turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de MacFarland con el uso de un hisopo estéril. En el centro de las placas Petri (9 cm de diámetro) se colocó un disco de agar con micelio en activo crecimiento vegetativo con ayuda de un asa estéril. Las placas se colocaron a 30°C durante siete días.

El porcentaje de inhibición se calculó mediante la fórmula (Lemessa y Zeller, 2007):

$$PICR = \left(\frac{R1 - R2}{R1} \right) * 100$$

Donde,

R1: diámetro de crecimiento micelial del hongo en ausencia del aislado.

R2: diámetro de crecimiento micelial en presencia del aislado.

Ensayos bioquímicos y bioquímicos

Producción de β-1,3-glucanasas y quitinasas

Se disolvieron 4,0 g L⁻¹ de levadura panadera y 16 g L⁻¹ de agar en agua destilada y el medio se esterilizó a 121 °C durante 20 min. Los aislados se sembraron en placas Petri con el medio de cultivo. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h. La presencia de una zona clara alrededor de las colonias indicó la producción de β-1,3-glucanasa y/o quitinasa (Gaye, 2016).

Producción de proteasas

La actividad proteolítica se realizó de acuerdo al método de Marhofer *et al.* (1995). Los aislados fueron sembrado en placas Petri con medio de cultivo compuesto por 15 g L⁻¹ de leche descremada, 0,5 g L⁻¹ de extracto de levadura, 15 g L⁻¹ de agar. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h.

Producción de celulasas

Los aislados bacterianos se sembraron en medio de cultivo compuesto por: NaCl 0,1 %, KH₂PO₄ 0,3 %, K₂HPO₄ 0,6 %, MgSO₄ 0,12 %, peptona 0,5 %, extracto de levadura 0,3 %, suplementado con carboximetil celulosa (1,0 %) y agar 15 g.L⁻¹. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h y la actividad celulolítica se determinó mediante la tinción del medio de cultivo con una solución de Rojo Congo (0,5 %).

Producción de β-mananasas

Se determinó mediante el método descrito por Matos *et al.* (2021). La siembra de los aislados bacterianos frescos se realizó en Medio Mínimo (MM) suplementado con grano de algarrobo (LBG, por sus siglas en inglés) (0,5%) y agar 15 g L⁻¹. Los aislados bacterianos se sembraron en la superficie del medio con ayuda de un asa y las placas se incubaron a 37 °C durante 72 h. Se realizaron tres repeticiones para cada aislado bacteriano. Para el revelado de los halos de hidrólisis se adicionaron 5 mL de la disolución de rojo congo (0,5%) a cada placa Petri.

Producción de cianuro de hidrógeno (HCN)

Se utilizó el método de Lorck (1948) para determinar la capacidad de producción de cianuro de hidrógeno de los aislados bacterianos. El medio Agar Nutriente se suplementó con 4,4 g L⁻¹ de glicina y se autoclavó a 121 °C durante 20 min. Los aislados se sembraron por estrías en placas Petri con la ayuda de un asa de siembra. Posteriormente se humedeció una capa de papel de filtro Whatman No. 1, en una solución compuesta por carbonato de sodio (Na₂CO₃) al 2% y ácido pícrico 0,5 %. El papel humedecido se colocó en la tapa superior de la placa Petri y posteriormente se selló con para-film. Las placas Petri fueron incubadas a 37 °C durante cuatro días. El cambio de coloración de amarillo a naranja-rojizo indicó la producción de cianuro de hidrógeno. Se utilizó como control una placa Petri con medio de cultivo sin inocular.

Producción de ácido 3-indolacético (AIA)

La producción de ácido indolacético se determinó con el método de Sánchez-García (2013). Los aislados bacterianos (un asa de siembra llena) se inocularon en Erlenmeyers de 25 mL de volumen con 10 mL de Caldo Nutriente suplementado con L-triptófano (500 µg mL⁻¹). Los medios de cultivo se colocaron en condiciones de agitación (130 rpm), oscuridad y 37 °C durante 48 h. Posteriormente, el medio de cultivo se centrifugó y se colectó el sobrenadante. La producción de AIA se cuantificó a través de una curva patrón de AIA. La absorbancia se determinó a 530 nm en un espectrofotómetro UV/VIS (ULTROSPEC, 2000).

Producción de amonio

La prueba para la producción de amonio de los aislados se realizó en agua peptona según el procedimiento descrito por Cappuccino y Sherman (1992). Se tomó un asa de los cultivos bacterianos rejuvenecidos, y se inocularon en tubos de ensayo que contenían 10 mL de agua peptona. Los cultivos se colocaron en una incubadora a 37 ± 2 °C durante 72 h. Posteriormente se adicionó a cada tubo de ensayo 0,5 mL del reactivo de Nessler. El cambio de coloración de pardo claro a amarillo intenso indicó la producción de amonio en el medio de cultivo. Los aislados se clasificaron en altos (+++), moderados (++) , bajos (+) y no productores (-) de amonio de forma no paramétrica, en dependencia de la intensidad de la coloración desarrollada en el medio.

Procesamiento estadístico

Todas las actividades bioquímicas se determinaron por triplicado. Los datos fueron procesados según paquete Statgraphic plus 5.1 sobre WINDOW. Se determinó el ajuste a una Distribución Normal mediante la prueba de Bondad de Ajuste Kolmogorov-Smirnov y la Homogeneidad de Varianza mediante las Pruebas de Bartlett. Se realizó la Prueba

de Kruskal-Wallis y la Prueba de Rangos Múltiples de Student-Newman-Kwels (SNK) ($P \leq 0,05$) para la comparación entre los aislados.

Resultados y discusión

Actividad antagonista de los aislados frente a hongos

La actividad antifúngica de los mejores aislados frente a *Aspergillus niger* y a HMB se observa en las Figuras 1 (A y B) y 2 (A y B). Con relación a *Aspergillus niger*, los aislados Cul51 y TS96 mostraron los porcentajes de inhibición más elevados por encima de un 90%, sin diferencias entre estos. Los aislados CN65 y TCab6 mostraron un menor efecto, con porcentajes de 33,92 y 24,38, respectivamente.

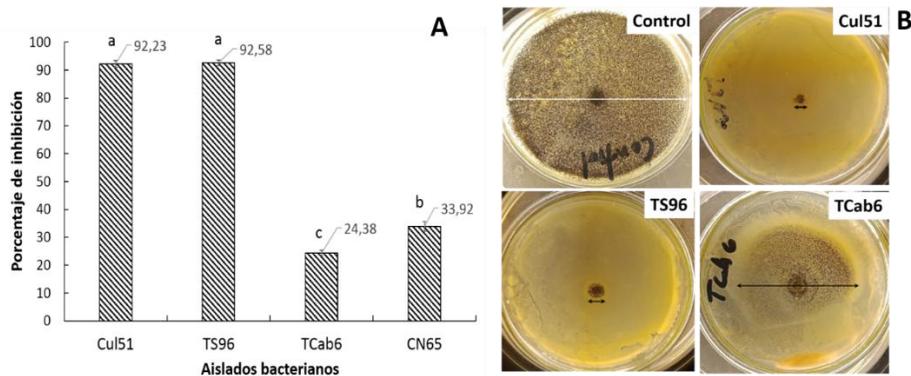


Figura 1. Actividad antagonista de los mejores aislados bacterianos frente a *Aspergillus niger*. A: porcentajes de inhibición de los mejores aislados. B: fotografía del crecimiento del hongo en presencia del aislado bacteriano. Letras distintas indican diferencias significativas entre aislados según Prueba de Newman Keuls ($p < 0,05$).

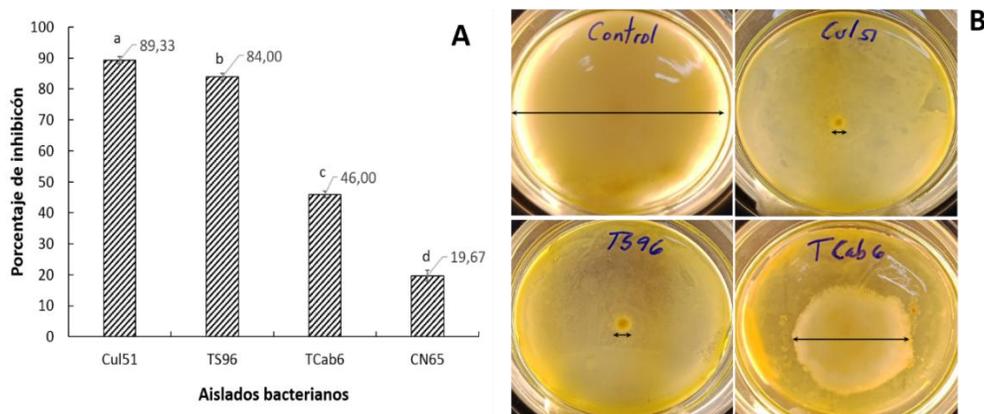


Figura 2. Actividad antagonista de los mejores aislados bacterianos frente al hongo HB aislado de semillas se *S. bicolor*. A: porcentajes de inhibición de los mejores aislados. B: fotografía del crecimiento del hongo en presencia del aislado bacteriano. Letras distintas indican diferencias significativas entre aislados según Prueba de Newman Keuls ($p < 0,05$).

En el caso de HMB, los mejores resultados también se observaron con los aislados Cul51 (89%) y TS96 (84%), seguido de TCab6 y CN65, respectivamente. Estos resultados coinciden con otros estudios que demuestran las potencialidades del género *Bacillus* como antagonistas de distintos hongos. En estudios realizados por Przemieniecki *et al.* (2018) con la cepa *Bacillus* SPA9, relacionada estrechamente con *Bacillus subtilis*, se observaron propiedades antagónicas *in vitro* frente a *Fusarium culmorum*, *F. oxysporum* y *Monographella nivalis*. Los análisis microbiológicos mostraron una fuerte actividad quitinolítica y celulolítica, que se asociaron con características antifúngicas. Los aislados además de la actividad de enzimas líticas que inhiben el crecimiento de la pared celular, también pueden presentar otros mecanismos antagonistas como la producción de antibióticos, bacteriosinas y sideróforos, que de manera sinérgica pueden inhibir el crecimiento de los hongos (Sabaté *et al.*, 2018).

Propiedades bioquímicas de los aislados

En la Tabla 1 se muestra la producción de 1,3- β -glucanasa/quitinasas, proteasas y cianuro de hidrógeno por los aislados seleccionados con actividad antagonista de hongos, en distintos medios de cultivo. Los aislados Cul51 y TS97 produjeron estas enzimas de manera abundante, mientras que ninguno de los aislados sintetizó cianuro de hidrógeno.

Tabla 1. Producción de 1,3- β -glucanasa/quitinasas, proteasas y cianuro de hidrógeno por los aislados seleccionados con actividad antagonista de hongos.

	Cul51	TS96	TCab6	CN65
Producción de 1,3- β -glucanasas/quitinasas	+++	+++	+	++
Producción de proteasas	+++	+++	++	++
Producción de cianuro de hidrógeno	-	-	-	-

Clasificación: (+++) altos productores, (++) moderados, (+) bajos, (-) no productores.

Estos resultados concuerdan con otros trabajos donde se evidenció la capacidad del género *Bacillus* (cepas de *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis* y *B. tequilensis*) en la producción de enzimas quitinasas (Dar *et al.*, 2018) y proteasas (Majumdar y Chakraborty, 2017). Los datos obtenidos también están en concordancia con otros estudios de bioprospección donde se evidenciaron las potencialidades de *Bacillus* spp. para producir quitinasas (Dar *et al.*, 2018). La actividad quitinolítica y/o β -1,3-glucanolítica mostrada por varios de los aislados estudiados, indican un uso potencial de éstos como agentes biocontroladores, debido a la capacidad que tienen estas enzimas de inhibir el crecimiento de las hifas de los hongos fitopatógenos, ya que pueden provocar la lisis o modificaciones a las paredes celulares de estos organismos (Haldar y Sengupta, 2015).

La actividad lítica de estas enzimas se debe a que las quitinasas (endo y exoquitinasas) degradan la quitina, un polímero lineal insoluble de β -1,4-N-acetilglucosamina, el cual constituye el componente fundamental de las paredes celulares de los hongos. Las β -

glucanasas, por otra parte, pueden actuar mediante dos mecanismos, las exo β -glucanasas hidrolizan la cadena de β -glucano por sucesivos cortes que provocan la liberación de residuos de glucosa en el extremo no reductor de la cadena; mientras que las endo- β -glucanasas rompen los β -enlaces aleatoriamente a lo largo de la cadena, con la consiguiente producción de oligosacáridos pequeños (Pitson *et al.*, 1993).

En estudios similares realizados por Karimil *et al.* (2012) con la cepa *Bacillus subtilis* B28 productora de proteasas, se observó un efecto antagónico frente a *Fusarium oxysporum* f. sp ciceris, y además, incrementó varios indicadores morfológicos y fisiológicos como la altura y el peso fresco y seco en plantas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.).

Producción de amonio, celulasas y β -mananasas

En la Tabla 2 se muestran los resultados con relación a la producción de amonio, celulasas y β -mananasas. Como se puede observar, los aislados que mostraron el efecto antagonista frente a hongos, también tienen la capacidad de producir estas sustancias en distintas proporciones y tienen un valor para el desarrollo agropecuario.

Tabla 2. Producción de amonio y enzimas celulasas y β -mananasas por los aislados con mayor actividad antifúngica.

	Cu51	TS96	TCab6	CN65
Producción de amonio	++	++	++	++
Producción de celulasas	+	++	+	++
Producción de β -mananasas	+++	+++	++	+

Clasificación: (+++) altos productores, (++) moderados, (+) bajos, (-) no productores.

Estos resultados son importantes porque indican que los aislados evaluados tienen otros mecanismos que promueven el crecimiento de las plantas, ya que el amonio puede ser utilizado por los vegetales para su crecimiento y desarrollo, al ser una de las formas asimilables por los vegetales. La comprensión de estos procesos es fundamental para el desarrollo de una agricultura sostenible, ya que mejora el manejo de los residuos de cosecha y los fertilizantes naturales, como el estiércol tanto en estado sólido como líquido. A su vez, estos contribuyen a reducir la cantidad de fertilizantes químicos que se aplican a los cultivos y con ello, el riesgo de contaminar las aguas subterráneas (Grzyb *et al.*, 2021).

La capacidad de producir celulasas tiene una función ecológica esencial, ya que estas enzimas degradan los compuestos celulósicos que provienen de las plantas y cultivos muertos, o desechos de la industria alimenticia, lo que promueve el reciclaje de nutrientes. La producción β -mananasas por los aislados sugiere un uso de estos aislados para el desarrollo agropecuario, ya que estas enzimas tienen la capacidad de hidrolizar los residuos complejos de manano que están presente en fibras vegetal en azúcares simple. De esta forma, es posible incorporar este alimento a la nutrición de los animales monogástricos. En la actualidad, estos aislados se utilizan en trabajos de fermentación en fase sólida para mejorar la calidad nutricional del alimento animal (Mairizal *et al.*, 2019).

El ácido indolacético constituye una auxina natural producida por las plantas y una amplia gama de microorganismos del suelo. La producción de ácido indolacético por los aislados evaluados se observa en la Figura 3. TS96 mostró la mayor producción de este regulador del crecimiento, seguido de Cul51, CN65 y TCab6, en ese orden. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores, quienes plantean que el 80% de las especies de *Bacillus* tienen la capacidad de producir esta auxina (Patten y Glick, 1996).

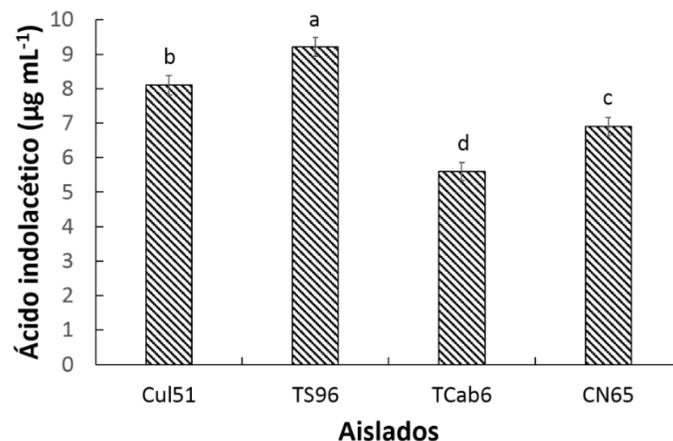


Figura 3. Producción de ácido indolacético por los aislados bacterianos de actividad antifúngica. Letras diferentes indican diferencias según Prueba de Newman Keuls ($p < 0,05$).

Las diferencias observadas con relación a la concentración de AIA pueden estar relacionadas con la especie bacteriana, así como el medio de cultivo empleado, el tiempo de crecimiento y la concentración de L-triptófano utilizado como precursor de la síntesis de esta auxina (Buensanteai *et al.*, 2013). La capacidad de producir AIA se considera un mecanismo promotor del crecimiento vegetal, ya que el mismo puede inducir el desarrollo radicular, la germinación y el crecimiento vegetal (Yousef, 2018).

Conclusiones

Los aislados Cul 51 y TS96 poseen una actividad antifúngica elevada frente a *Aspergillus niger* y a frente a HMB, lo que indica las potencialidades de estas bacterias en el control de hongos fitopatógenos. La producción elevada de enzimas β -1,3-glucanasas/quitinasas y proteasas, constituyen mecanismos bioquímicos por los cuales estos aislados ejercen su actividad antifúngica. La capacidad de producir otras enzimas como celulasas, β -mananasas y compuestos como amonio y AIA, indican que estos aislados tienen un valor para el desarrollo de un producto biopesticida, que estas sustancias tienen un efecto en la promoción del crecimiento vegetal y constituyen mecanismo de las RPCV.

Referencias bibliográficas

Buensanteai, N., Sompong, M., Thamnu, K., Athinuwat, D., Brauman, A. and Plassard, C. 2013. The plant growth promoting bacterium *Bacillus* sp. CaSUT007 produces

- phytohormone and extracellular proteins for enhanced growth of cassava. *African Journal of Microbiology Research*. 7 (42): 4949-4954.
- Cappuccino, J. G. y Sherman, N. 1992. Biochemical activities of microorganisms. In: *Microbiology, A Laboratory Manual*. The Benjamin / Cummings Publishing Co. California, USA.
- Dar, G.H., Sofi, S., Padder, S.A. and Kabli, A.A. 2018. Molecular characterization of rhizobacteria isolated from walnut (*Juglans regia*) rhizosphere in Western Himalayas and assessment of their plant growth promoting activities. *Biodiversitas*. 19 (2): 712-719.
- Gaye, R. 2016. Plant growth-promoting bacteria from Western Australian soils. Tesis en opción al título de Doctor en Ciencias. Universidad de Murdoch, Australia.
- Grzyb, A., Wolna-Maruwka, A. y Niewiadomska, A. 2021. The Significance of Microbial Transformation of Nitrogen Compounds in the Light of Integrated Crop Management. <https://doi.org/10.3390/agronomy11071415>.
- Guzmán, S. 2002. Calidad alimentaria y potencial nutracéutico del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agricultura Técnica en México*. 28 (2): 159-173.
- Haldar, S. and Sengupta, S. 2015. Plant-microbe cross-talk in the rhizosphere: insight and biotechnological potential. *Open Microbiol J*. 9: 1–7.
- Lemmesa F., Zeller W. 2007. Screening rhizobacteria for biological control of *R. solanacearum* in Ethiopia. *Biol. Control* 42: 336-344.
- Lorck, H. 1948, Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Plant Physiology*, 1: 142–146.
- Mairizal, F., Manin, E. y Hendalia. 2019. The Effect of Giving Probiotics and Palm Kernel Meal Subjected to Enzymatic Hydrolysis with Mannanase on Broiler Growth Performance. *Pakistan Journal of Nutrition*, 18: 997-1003. DOI: 10.3923/pjn.2019.997.1003.
- Majumdar, S. and Chakraborty, U. 2017. Optimization of protease production from plant growth promoting *Bacillus amyloliquefaciens* showing antagonistic activity against phytopathogens. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 8(2): 635-642.
- Matos, M. M., Valdivia, A., Rodríguez, Z., Boucourt, R., Brizuela, M. A., Portilla, Y., Ramírez, H. L. (2018). Production of xylanases by *Bacillus subtilis* E44 under submerged fermentation conditions. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 52 (3): 1–8.
- Moreno, A., García, V., Reyes, J.L., Vásquez, J. y Cano, P. 2018. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 20 (1): 68-83.
- Patten, C.L. and Glick, B.R. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*. 42: 207-220.
- Pitson, S.M., Seviour, R. J. and McDougall, B.M. 1993. Noncellulolytic fungal pglucanases: their physiology and regulation. *Enzyme Microb. Techno*. 15:178-192.

- Przemieniecki, S.W., Kurowski, T.P., Damszel, M., Krawczyk, K. and Karwowska, A. 2018. Effectiveness of the *Bacillus* sp. SP-A9 strain as a biological control agent for spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Agr. Sci. Tech.* 20: 609-619.
- Robledo-Buriticá, J., Aristizábal-Loaiza, J.C., Ceballos-Aguirre, N. and Cabra- Cendales, T. 2018. Influence of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on blackberry (*Rubus glaucus* Benth. cv. thornless) growth under semi-cover and field conditions. *Acta Agron.* 67 (2): 258-263.
- Sabaté, D.C., Pérez, C., Petroselli, G., Erra-Balsells, R. and Audisio, M.C. 2018. Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary on common bean by native lipopeptide-producer *Bacillus* strains. *Microbiological Research.* 211: 21–30.
- Sánchez-García, C. 2013. Purificación de ácido indolacético obtenido a partir de una fermentación microbiana y su evaluación *in vitro* en *Spathiphyllum wallisii* var. Chopin. Tesis de Ingeniero en Ciencia y Tecnología de alimentos. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. División de Ciencia Animal. Departamento de Ciencia Y Tecnología de Alimentos, México.
- Thanh, D.T.N. and Tram, D.T.T. 2018. Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacteria in black pepper (*Piper nigrum* L.) cultivated in Chon Thanh and LocNinh districts of BinhPhuoc Province, Vietnam. *International Journal of Innovations in Engineering and Technology* (IJJET). 10 (1): 1-10. <http://dx.doi.org/10.21172/ijiet.101.01>.
- Yousef, N.M.H. 2018. Capability of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) for producing indole acetic acid (IAA) under extreme conditions. *European Journal of Biological Research.* 8 (4): 174-182.
- Zahid, M., Abbasi, M.K., Hameed, S. and Rahim, N. 2015. Isolation and identification of indigenous plant growth promoting rhizobacteria from Himalayan region of Kashmir and their effect on improving growth and nutrient contents of maize (*Zea mays* L.). *Front Microbiol.* 6, 207. doi:10.3389/fmicb.2015.00207.