

## Selección de aislados rizosféricos de *Bacillus* spp. con potencialidades para el desarrollo agropecuario e industrial



Trabajo de Diploma en opción al título de  
Ingeniero Agrónomo

Autor: Yadiel Rodríguez Reyes

Tutor: MSc. Yunel Pérez Hernández

Julio, 2018



*El ser humano necesita aferrarse a una esperanza, buscar  
en la propia ciencia una oportunidad de supervivencia,  
y es justo buscarla y ofrecérsela.*

*Fidel Castro*

### **Declaración de Autoridad**

Declaro que yo, **Yadiel Rodríguez Reyes**, soy el único autor de este Trabajo de Diploma, en calidad de lo cual autorizo a la Universidad de Matanzas a hacer uso del mismo con la finalidad que estime pertinente.

---

Firma

## **DEDICATORIA**

"Todas mis dedicatorias van dirigidas a dos personas fundamentales; a mi madre y a mi querida abuela que siempre las tengo presente para que la distancia nunca sea el olvido. Sus luces iluminan mi camino y no tropiezo porque me dan la mano para que siga siendo un mejor ser humano, no es en vano su lucha porque sea de bien y me dan su iré. Su protección me mantienen a salvo para seguir adelante con buen paso; esta razón de hoy no es mía sino de vosotras, por ser ustedes las estrellas."

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer antes que nada a toda mi familia y amigos por el apoyo, la confianza y la fe depositada.

A mi padre por ser el factor primordial responsable de este suceso en la guía, la constancia y la responsabilidad en mí.

A mi hermano por la fuerza que me brinda y a mi sobrina por ser una nueva motivación.

Reconocer el apoyo de mis tíos entre ellos: Leonardo, Jorge, J. Luis, Idania y mi incondicional tía Lupe que siempre está pendiente de mí; sean todos ustedes parte de esta obra maravillosa.

A mis primos Orlandito, Samantha, Dariel, Pilar, a los amigos de la universidad Dieguito, Damián y quien sino Luis Clark, “el grande”, el insuperable y leal amigo.

Gracias a mi tutor Yunel por aceptarme en este grupo de trabajo, por ser el único que siempre creyó que esto iba a terminar en una tesis; la gran ayuda en estos últimos meses para el armado, escritura y corrección del manuscrito. Siempre atento a cualquier detalle dedicado a su labor investigativa como buen profesional.

Gracias a las compañeras del laboratorio por la solidaridad en el trabajo de manera particular a: Yasmery, Loreta, las profesoras Ana Julia y Marlene por todas las sugerencias brindadas en función de mejorar el trabajo de tesis.

Más que nada agradecer a los que no creyeron, pero lo más importante estoy aquí en plena disposición de ayudar a todos; un beso grande a los que siempre estuvieron presentes.

## OPINIÓN DEL TUTOR

El estudiante Yadiel Rodríguez Reyes, quien hoy defiende el trabajo de Diploma titulado, “Selección de aislados rizosféricos de *Bacillus* spp. con potencialidades para el desarrollo agropecuario e industrial”, ha demostrado ser ejemplo de consagración y dedicación durante este período. Su responsabilidad y habilidades desarrolladas permitieron culminar los objetivos propuestos.

Las producciones agrícolas actuales en Cuba no abastecen las demandas de la población. En particular el frijol, uno de los productos básicos de nuestra dieta, no cubre las necesidades y por ello, se importan granos con el consiguiente gasto por este concepto. Entre las alternativas para mejorar los rendimientos del frijol, está el uso de sustancias bioestimuladoras del crecimiento o bacterias promotores del crecimiento vegetal (BPCV), que promueven el crecimiento de las raíces, aumentando la absorción de agua y sales minerales por la planta y incrementando la disponibilidad de nutrientes. La tecnología para la obtención de productos a base de BPCV es de bajo costo e impacto ambiental. Por estas razones, el trabajo que presenta el estudiante Yadiel Rodríguez Reyes posee una gran vigencia e importancia económica y social.

Los resultados de este trabajo tributan a un proyecto asociado a programa nacional, donde el estudiante contribuyó al desarrollo de las diferentes tareas planificadas. A partir de los resultados obtenidos se desarrollarán nuevas investigaciones con el objetivo de desarrollar un nuevo producto biofertilizantes para el cultivo del frijol en nuestra provincia, y su aporte y contribución ya son parte de esta obra.

Como tutor estoy satisfecho y agradecido por el desempeño del estudiante y acepto con responsabilidad los aciertos y desaciertos del trabajo.

Tutor:

---

MSc. Yunel Pérez Hernández

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo “seleccionar cepas de *Bacillus* spp. con potencialidades como biofertilizadores y estimuladores del crecimiento de *Phaseolus vulgaris* L.”. Para cumplir este objetivo se realizaron colecta de suelo rizosférico de cinco variedades de frijol presentes en los municipios Colón y Unión de Reyes de la provincia de Matanzas. Las muestras se cultivaron en medio Caldo Nutriente y posteriormente se eliminaron las formas vegetativas con calor. Se realizaron diluciones seriadas y se sembraron las muestras en medio Agar Nutriente. A los aislados se les determinó capacidad de producir ácido indolacético y solubilizar fosfatos y ácidos orgánicos. Se determinaron además las actividades amilolíticas y celulolíticas. Los datos se procesaron mediante ANOVA de clasificación simple. Como resultados se obtuvo una colección de *Bacillus* spp. proveniente de la rizosfera de *Phaseolus vulgaris* L., compuesta por 141 aislados Gram positivos esporulados con potencialidades para el desarrollo agropecuario e industrial. Se identificaron 9 aislados productores de concentraciones elevadas de ácido 3-indolacético superiores a  $150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , entre los que están Tcol4, Cul3 y cul20. Nueve aislados mostraron capacidad para solubilizar fosfato tricálcico con índice de potencia superiores a 100 %, entre los que destacan TS10, CN84, TCab6 y Cul57. Se identificaron nueve aislados con actividad amilolítica elevada y siete celulolíticos con índices de potencia por encima de 200 %, los cuales son fuentes potenciales para la producción de amilasas y celulasas, respectivamente, con usos potenciales en diferentes procesos industriales

# ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....   | 1  |
| 1.1. Problema e hipótesis científica.....  | 2  |
| 1.2. Objetivo general.....   | 2  |
| 1.3. Objetivos específicos.....  | 2  |
| <b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....   | 3  |
| 2.1. El frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....  | 3  |
| 2.1.1. Origen e importancia del frijol para la alimentación humana.....  | 3  |
| 2.1.2. Factores que afectan las producciones del frijol.....   | 4  |
| 2.1.3. Estrategias para elevar el rendimiento del frijol.....  | 5  |
| 2.2. Desarrollo de biofertilizantes y bioplaguicidas basados en el uso de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (RPCV)..... | 6  |
| 2.2.1. La rizofera y las rizobacterias.....  | 6  |
| 2.2.2. Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal .....  | 7  |
| 2.2.2.1. Mecanismos de acción directos de las RPCV.....  | 8  |
| 2.2.2.1.1. Fijación del nitrógeno.....   | 8  |
| 2.2.2.1.2. Solubilización de fosfatos.....   | 8  |
| 2.2.2.1.3. Producción de reguladores del crecimiento vegetal.....  | 10 |
| 2.2.2.2. Mecanismos de acción indirectos de las RPCV.....  | 13 |
| 2.2.2.2.1. Producción de sideróforos.....  | 13 |
| 2.2.2.2.2. Producción de antibióticos.....   | 14 |
| 2.2.3. Potencialidades del género <i>Bacillus</i> spp. como promotor del crecimiento vegetal..   | 15 |
| 2.2.4. Principales limitantes del uso de las RPCV.....   | 15 |
| 2.2.5. Otras aplicaciones de las RBPC .....  | 19 |
| 2.2.5.1. Las BPCP como agentes biorremediadores .....  | 19 |
| 2.2.5.2. Aplicaciones industriales de las enzimas microbianas.....   | 20 |
| <b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....   | 22 |
| 3.2. Aislamiento de los aislados bacterianos .....   | 23 |
| 3.2.1. Colecta de las muestras.....  | 23 |
| 3.2.2. Siembra en Caldo Nutriente.....   | 23 |
| 3.2.3. Diluciones seriadas y siembra en medio Agar Nutriente.....  | 24 |
| 3.2.4. Aislamiento de las colonias bacterianas.....  | 25 |
| 3.3. Identificación de los aislados de <i>Bacillus</i> Gram + productores de endosporas.....   | 27 |
| 3.4. Ensayos bioquímicos .....   | 27 |
| 3.4.1. Producción de ácido 3-indolacético (AIA).....   | 27 |
| 3.4.1.1. Determinación cualitativa de AIA.....   | 28 |
| 3.4.1.2. Determinación cuantitativa de AIA.....  | 28 |
| 3.4.2. Determinación cualitativa de la producción de ácidos orgánicos.....   | 28 |
| 3.4.3. Solubilización de fosfatos.....   | 29 |
| 3.4.4. Actividad amilolítica.....  | 29 |
| 3.4.5. Actividad celulolítica.....   | 29 |
| 2.5. Conservación de las cepas bacterianas.....  | 30 |
| 2.6. Procesamiento estadístico.....  | 30 |

|  |    |
|--|----|
| <b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....   | 31 |
| 4.1. Aislamiento de cepas de <i>Bacillus</i> spp. a partir de rizosfera de frijol..... | 31 |
| 4.2. Producción de ácido indolacético (AIA).....                                       | 32 |
| 4.2.1. Determinación cualitativa de la producción de AIA.....                          | 32 |
| 4.2.2. Determinación cuantitativa de la producción de AIA.....                         | 35 |
| 4.3. Producción de ácidos orgánicos.....   | 37 |
| 4.4. Capacidad de solubilización de fosfatos.....                                      | 39 |
| 4.5. Actividad celulolítica.....   | 43 |
| 4.6. Actividad amilolítica.....  | 45 |
| 4.5. Producción de enzimas con aplicaciones industriales.....                          | 42 |
| 4.6. Valoración económica.....   | 45 |
| <b>5. CONCLUSIONES</b> .....   | 48 |
| <b>6. RECOMENDACIONES</b> .....  | 49 |
| <b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....   | 50 |

## I. INTRODUCCIÓN

El aumento de la población mundial en los últimos años impulsó las producciones agrícolas, en función de satisfacer las demandas de alimentos (Hassen *et al.*, 2016). Para mantener niveles productivos altos se utilizan cantidades elevadas de fertilizantes y pesticidas químicos, los cuales contaminan el ambiente y afectan el equilibrio ecológico de los agroecosistemas. Por estas razones, es necesario reducir el uso de estos agroquímicos pero con el menor impacto en la productividad de los cultivos (Szilagyi-Zecchin *et al.*, 2016; Stamenković *et al.*, 2018).

Existen varias alternativas para reducir el uso de los fertilizantes químicos en los sistemas agrícolas. Por ejemplo, se pueden combinar técnicas como la rotación de cultivos y el manejo integrado de plagas para incrementar la productividad y la rentabilidad de los cultivos. Otra estrategia que se investiga actualmente es el uso de bioproductos a base de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (RPCV), los cuales tienen distintas funciones como la fertilización, la promoción del crecimiento de las plantas y el biocontrol de fitopatógenos, de una manera ecológicamente sostenible (Hassen *et al.*, 2016).

Los mecanismos básicos de las RPCV permiten incrementar la absorción de nutrientes, la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfatos y otros minerales y enfrentar el ataque de organismos fitopatógenos. Esto es posible debido a la producción de una grupo variado de metabolitos secundarios y enzimas como fitohormonas, sideróforos, antibióticos y enzimas hidrolíticas (Singh, 2018).

Los microorganismos estimuladores del crecimiento vegetal presentes en ecosistemas terrestres, además de las funciones como bioestimuladores, biofertilizantes y biocontroladores; pueden producir una gama variada de metabolitos y enzimas con diversas aplicaciones industriales. Tal es el caso de las enzimas amilasas y celulasas, que se utilizan comúnmente en diferentes procesos como la fabricación de alimentos, bebidas, alcohol, detergentes y en la industria textil (Acharya y Chaudhary, 2012; Singh *et al.*, 2016). Entre los diferentes grupos de RPCV, el género *Bacillus* spp. constituye una fuente importante de cepas con características promisorias, para el desarrollo de

productos agropecuarios que permitan incrementar los rendimientos agrícolas (Hauka *et al.*, 2016; Thakur *et al.*, 2017).

La actualización del modelo económico cubano exige la búsqueda urgente de eficiencia en el proceso de sustitución de importaciones, en especial de los alimentos básicos y otros componentes industriales, que pueden ser producidos en el territorio nacional, lo cual permite liberar la capacidad importadora para otros recursos que no se puedan producir internamente y garantizar un desarrollo local prospero, justo y sostenible.

A partir de lo expuesto anteriormente, se planteó como **problema científico** del presente trabajo: la necesidad de obtener aislados de *Bacillus* spp., con potencialidades para estimular el crecimiento y desarrollo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), que permita reducir el uso de fertilizantes químicos durante el proceso productivo de este cultivo.

Por estas razones se propuso como **objetivo general** de la presente investigación: seleccionar aislados rizosféricos de *Bacillus* spp. con potencialidades como biofertilizadores y bioestimuladores del crecimiento de *Phaseolus vulgaris* L. y de aplicación industrial.

Como **objetivos específicos** se plantearon los siguientes:

1. Aislar cepas de *Bacillus* spp. a partir de la rizofera de diferentes variedades de *Phaseolus vulgaris* L.
2. Identificar aislados con eficiencia elevada para la producción de ácido indolacético y para la solubilización de fosfatos.
3. Determinar las actividades amilolíticas y celulolíticas de los aislados bacterianos.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

#### 2.1.1. Origen e importancia del frijol para la alimentación humana

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los cultivos más antiguos. Investigaciones arqueológicas indican que se conocía por lo menos hace 5000 años antes de Cristo. Se considera que América Central es el centro de origen y diversidad de esta especie en el mundo (Apáez-Barrios *et al.*, 2013). El género *Phaseolus* agrupa a numerosas de especies, de las que solo cinco (*Phaseolus acutifolius*, *Phaseolus coccineus*, *Phaseolus lunatus*, *Phaseolus polianthus* y *P. vulgaris*) están domesticadas. *P. vulgaris* ocupa más del 85% de la superficie mundial dedicada este cultivo (Figura 1).



Figura 1. Sembrado de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Foto: autor.

Entre las distintas especies de leguminosas, *Phaseolus vulgaris* L. es la más importante para el consumo humano. El continente Americano representa una de las principales regiones productivas y de consumo en el mundo, con un estimado de un 30 % de la producción mundial de frijol. Estudios recientes realizados por la Comisión Económica para América Latina (CEPAL) refirieron a este cultivo, como un alimento tradicional para la región, una fuente importante de sustento económico para familias de bajos ingresos y un alimento de identificación cultural (CEPAL, 2014).

El grano representa una fuente importante de proteínas y de hierro, lo que le confiere propiedades nutricionales ventajosas frente a otros alimentos de origen vegetal. El contenido de proteínas en las semillas secas frijoles se encuentra en un rango entre 12 y 25 %, el cual es superior a otros granos como los cereales que sólo contienen entre 5 y 14 %. Además, los frijoles tienen un aporte energético similar al de los cereales, pero contienen además una pequeña parte de grasas, así como una variedad de vitaminas y minerales (Broughton *et al.*, 2003). Estas cualidades nutricionales le confieren a este cultivo efectos beneficiosos en la prevención de enfermedades del corazón, digestivas y la obesidad. Es por ello que instituciones médicas importantes a nivel mundial promueven su consumo, por lo que es un producto comercialmente atractivo a nivel mundial.

En Cuba, el frijol común se consume en forma de granos secos y se dedica exclusivamente al consumo humano. Se considera un alimento estratégico y constituye junto al arroz, la dieta básica de los cubanos, en la que el frijol aporta alrededor de la quinta parte de las proteínas totales consumidas (García, 2003).

### **2.1.2. Factores que afectan las producciones del frijol**

El cultivo de frijol constituye una prioridad para el sector agrícola cubano y aunque todos los años se dedican recursos y esfuerzos por incrementar los rendimientos, la producción de este grano está por debajo de las necesidades actuales; debido, principalmente, a la poca disponibilidad de insumos agrícolas el mercado, problemas fitosanitarios, uso de semillas inadecuadas (Ortiz *et al.*, 2006; Villalobos *et al.*, 2016), situaciones climáticas desfavorables, problemas tecnológicos, uso ineficiente de las tierras (Chailloux *et al.*, 1996) e incidencia de diferentes plagas como nemátodos, virus, bacterias y hongos fitopatógenos (Hernández-Ochandía *et al.*, 2018).

Los datos ofrecidos en 2016 indicaron que en Latinoamérica se cultivaron 6 060 273 hectáreas y se produjeron 5 486 093 toneladas (FAOSTAT, 2016). En Cuba se sembraron entre 2016 y 2017 más de 122 000 hectáreas de frijoles y se obtuvieron unas 253 470 toneladas (ONEI, 2016, 2017). Estos volúmenes

de producción resultaron insuficientes para cubrir la demanda nacional, que se suple con importaciones (Hernández-Ochandía *et al.*, 2018).

### 2.1.3. Estrategias para elevar el rendimiento del frijol

Una alternativa para incrementar la producción de frijol es el uso de estimuladores del crecimiento vegetal (López y Pouza, 2014; Peña *et al.*, 2017). Recientemente, con el objetivo de hacer más eficientes los sistemas productivos, distintas industrias agroquímicas disponen de complejos nutritivos que contienen micronutrientes, aminoácidos, y extractos vegetales; los cuales se denominan promotores de crecimiento vegetal (Peña *et al.*, 2016).

El uso de los bioestimuladores Biobrás 16 y QuitoMax en el cultivo del frijol variedad Delicias-364, mostró un efecto positivo sobre indicadores morfofisiológicos y económicos. La aplicación de Biobrás 16 (dosis 0,050 L.ha<sup>-1</sup>) y QuitoMax (0,100 L.ha<sup>-1</sup>) mejoró la altura de la planta, el número de flores y legumbres por planta, la longitud de las vainas, el número granos por legumbre, peso de 100 granos, el rendimiento y la incidencia de hongos fitopatógenos (Moreno *et al.*, 2018). De manera similar, la aplicación del biorregulador VIUSID agro® (1,0 L.ha<sup>-1</sup>) en el cultivo del frijol, incrementó el rendimiento en un 30,28% respecto al control (Peña *et al.*, 2017).

La introducción de especies y cultivares es otra de las vías rápidas para aumentar el espectro de variabilidad y productividad en los sistemas agrícolas, y es también una forma de incorporar genotipos y especies valiosas en los programas de mejoramiento vegetal con diversos fines (de la Fé *et al.*, 2016). En la agricultura actual, es necesario contar con variedades que expresen su máximo potencial productivo en las diferentes regiones y condiciones edafoclimáticas actuales de país (Kenneth, 2012).

Entre las alternativas que se manejan actualmente está el control biológico de plagas, la cual representa una herramienta importante dentro del campo de la agricultura sostenible, para reducir el impacto sobre el rendimiento de los cultivos (Patibanda y Ranganathswamy, 2018). El control biológico constituye una práctica que se utiliza en Asia y Oriente Medio desde hace miles de años y hoy está implementada en países en desarrollo y subdesarrollados, como uno de los

enfoques más sostenibles y efectivos para el manejo de las plagas (Brodeur *et al.*, 2017 y Hernández-Ochandía *et al.*, 2018).

Dentro del manejo agroecológico de plagas, el uso de Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV) constituye una vía para mejorar la productividad de las plantas e inducir la resistencia sistémica; lo cual contribuye a minimizar los efectos de fitopatógenos, entre otros beneficios (Supratim *et al.*, 2017). Dentro del grupo de BPCV, los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* son los más promisorios (Oliveira *et al.*, 2015).

## **2.2. Desarrollo de biofertilizantes y bioplaguicidas basados en el uso de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (RPCV)**

### **2.2.1. La rizosfera y las rizobacterias**

La rizosfera es la región del suelo que rodea a las raíces y a su vez, estas influyen sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo (Richardson *et al.*, 2009). La rizosfera se divide en tres zonas, la más interna denominada endorizosfera donde se encuentra la endodermis y las capas corticales de la raíz; la segunda, llamada rizoplano, representa la superficie de la raíz donde las partículas del suelo y los microorganismos se adhieren, y la zona más aleja de la planta, la ectorizósfera, constituye el suelo inmediatamente adyacente a la raíz.

En la rizosfera ocurren interacciones entre la planta, el suelo y la microfauna, las cuales pueden tener un efecto significativo en el crecimiento y desarrollo de las plantas y en el rendimiento de los cultivos. Las plantas pueden liberar compuestos orgánicos de diferente naturaleza como carbohidratos, aminoácidos, nucleótidos, flavonoides, enzimas, hormonas, lípidos y vitaminas a través de sus raíces, que crean un entorno dinámico que estimula el desarrollo de un gran número de microorganismos y la actividad de los mismos en el suelo (Denef *et al.*, 2009; Habibi *et al.*, 2014).

Las rizobacterias que colonizan fuertemente la rizosfera evolucionaron conjuntamente con las plantas, a través de interacciones que pueden tener efectos positivos, neutros o deléteros sobre el crecimiento vegetal. Estos efectos

dependen de factores como la especie de microorganismo y la planta en cuestión y de las prácticas de manejo aplicadas en el caso de los sistemas agroecológicos (Habibi *et al.*, 2014).

Los efectos negativos o deletéreos que generan estos microorganismos sobre las plantas, pueden estar relacionados con el retraso del crecimiento aéreo y radicular, debido a la secreción de fitotóxicas, fitohormonas o a la competencia por los nutrientes con otros microorganismos nativos (Siddiqui *et al.*, 2006). Las neutras son aquellas cuya presencia en la planta no afecta ni positiva ni negativamente el desarrollo de la misma (Vessey, 2003), mientras que los efectos positivos están asociados con un incremento en la productividad de los cultivos a través de un mejoramiento de la nutrición de la planta. Estas bacterias que ejercen un efecto positivo se denominan Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (RPCV) y fueron definidas por primera vez por Kloepper y Schroth (1978), para describir las bacterias del suelo que colonizan la rizosfera de las plantas, mejoran las características biológicas y químicas de cultivos hortícolas y estimulan su crecimiento (Perez-Montano *et al.*, 2014).

### **2.2.2. Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal**

Las RPCV incluyen un amplio grupo de géneros bacterianos como *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Burkholdaria*, *Rhizobium* y *Erwinia* (Habibi *et al.*, 2014), de los cuales, *Pseudomonas* y *Bacillus* son los utilizados mayormente para la producción de inoculantes bacterianos a nivel comercial (Gobelak *et al.*, 2015).

#### **2.2.2.1. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal**

Las rizobacterias promotoras del crecimiento influyen sobre el rendimiento de los cultivos y la resistencia a estreses abióticos y bióticos (García-Fraile *et al.*, 2015). Estas bacterias poseen diferentes mecanismos directos como la producción de sustancias que regulan el crecimiento, la fijación del nitrógeno y la solubilización de fosfatos y otros elementos, lo cual permite incrementar la absorción de agua, nutrientes y elementos esenciales, que tienen un efecto beneficioso sobre la fisiología de las plantas (Rojas-Tapias *et al.*, 2012; Owen *et al.*, 2015). Los

mecanismos indirectos están relacionados con la inhibición de patógenos a través de la producción de antibióticos y enzimas líticas (Abhilash *et al.*, 2016).

### **2.2.2.1. Mecanismos de acción directos de las RPCV**

#### **2.2.2.1.1. Fijación del nitrógeno**

Después de la fotosíntesis, la fijación del nitrógeno es el proceso biológico más importante en la naturaleza, el cual posibilita la circulación del nitrógeno en la biosfera (Wani *et al.*, 2016). La fijación biológica del nitrógeno atmosférico es un proceso mediante el cual algunas especies bacterianas, tanto simbióticas como no simbióticas, utilizan la enzima nitrogenasa para convertir el nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) en amoníaco (Denton *et al.*, 2009). La actividad de esta enzima depende de la concentración de oxígeno y de la disponibilidad de nitrógeno (Vijayabharathi *et al.*, 2016).

Las bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno de los géneros *Rhizobium* y *Frankia*, se asocian principalmente con leguminosas para formar nódulos, donde cada simbiote obtiene beneficios. Las plantas asimilan el nitrógeno en forma de compuestos orgánicos nitrogenados y las bacterias obtienen refugio y malato para las principales rutas del metabolismo, como el ciclo de Krebs (Szilagy-Zecchin *et al.*, 2016). Entre las especies no simbióticas fijadoras de nitrógeno se encuentran principalmente las que pertenecen a los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Bacillus*.

El uso de las RPCV constituye una alternativa viable en el sector agrícola, para reducir el uso de fertilizantes nitrogenados, ya que estos microorganismos pueden estimular el crecimiento de las plantas a través de la fijación biológica del nitrógeno (Pedraza, 2008).

#### **2.2.2.1.2. Solubilización de fosfatos**

La solubilización del fósforo se relaciona con la transformación de fosfatos orgánicos e inorgánicos insolubles o pocos solubles presentes en la rizosfera, a formas más solubles asimilables por la planta. El fósforo es uno de los elementos químicos esenciales para todos los organismos, ya que forma parte de diversas moléculas con funciones vitales como los ácidos desoxirribonucleicos (ADN) y

ribonucleicos (ARN), que participan en la conservación y expresión de la información genética; del trifosfato de adenosina (ATP) que constituye la forma química fundamental del metabolismo energético, así como de fosfolípidos presentes en las membranas biológicas. Afecta por tanto directa o indirectamente, la mayoría de los procesos metabólicos en las células, como por ejemplo la transducción de señales, la respiración, la biosíntesis macromolecular y la fotosíntesis (Anand *et al.*, 2016).

Aunque el fósforo es uno de los macronutrientes más importantes para la planta, la concentración de este elemento disponible para la planta es muy baja. Entre el 95 y el 99% del fósforo se encuentra presente en forma insoluble, inmovilizada o precipitada, por lo tanto, es difícil su absorción por las plantas, cuyas únicas formas asimilables son los iones  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$  (Gouda *et al.*, 2018).

Algunos microorganismos del suelo tienen la capacidad producir y secretar ácidos orgánicos, sideróforos o enzimas como fosfatasas, fitasas, fosfonatasas y liasas C-P, que permiten solubilizar porciones de fósforo insolubles presentes en el suelo (de Freitas *et al.*, 1997; Jayakumar y Tan, 2005). La producción y liberación a la rizosfera de estos ácidos orgánicos, provocan la acidificación del suelo y el incremento directo de la solubilidad de los fosfatos (Souza *et al.*, 2015; Basu *et al.*, 2017).

El mecanismo bioquímico de solubilización está relacionado con las propiedades de los grupos hidroxilos y carboxilos presentes en los ácidos orgánicos y otros compuestos como sideróforos e iones hidroxilos, que participan en la quelatación de los cationes metálicos ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) y que permiten la liberación de los grupos fosfatos a los que se encuentran unidos (Bhardwaj *et al.*, 2014).

Las enzimas, por otra parte, tienen funciones diferentes. Las fosfatasas participan en la desfosforilación de los grupos fosfoéster presentes en compuestos que forman la materia orgánica. Las fitasas catalizan el proceso de hidrólisis del ácido fítico, que libera de forma secuencial hasta seis grupos ortofosfatos libres, mientras que las fosfonatasas y las liasas C-P, participan en la ruptura del enlace carbono - fósforo de los organofosfonatos (Rodríguez *et al.*, 2006).

Algunas RPCV como *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Burkholderia* sp., *Rhizobium* sp. y *Flavobacterium* sp., entre otras (Tabla 1), tienen la capacidad de solubilizar algunos compuestos insolubles de fosfatos (Hassen *et al.*, 2016). En algunos casos, bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Serratia* pueden participar en la solubilización y mineralización al mismo tiempo (Gopalakrishnan *et al.*, 2014).

Tabla 1. Rizobacterias con capacidad de solubilizar fosfatos y otros minerales.

| Género / Especies   | Mineral  | Autores                             |
|---|--|-------------------------------------|
| <i>Sinorhizobium meliloti</i> , <i>Bacillus flexus</i> , <i>Bacillus megaterium</i> | Ca <sub>3</sub> (PO) <sub>2</sub> , hidroxiapatita | Ibarra-Galeana <i>et al.</i> (2017) |
| <i>Bacillus aryabhatai</i> y <i>B. subtilis</i>                                     | Óxido de zinc                                      | Mumtaz <i>et al.</i> (2017)         |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>P. putida</i> , <i>B. subtilis</i>               | Ca <sub>3</sub> (PO) <sub>2</sub>                  | Yadav <i>et al.</i> (2010)          |
| <i>B. cereus</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. pumilus</i>    | P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>                      | Thanh y Tram (2018)                 |
| <i>Bacillus</i> sp.   | Ca <sub>3</sub> (PO) <sub>2</sub>                  | Bhargavi y Tallapragada (2016)      |
| <i>Bacillus</i> sp., <i>Corynebacterium</i> sp., <i>Enterococcus</i> sp.            | Ca <sub>3</sub> (PO) <sub>2</sub>                  | Chinakwe <i>et al.</i> (2019)       |
| <i>Rhizobium</i> y <i>P. fluorescens</i>  | Ca <sub>3</sub> (PO) <sub>2</sub>                  | Samavat <i>et al.</i> (2012)        |

### 2.2.2.1.3. Producción de reguladores del crecimiento vegetal

Los microorganismos promotores del crecimiento de las plantas son capaces de producir fitohormonas que estimulan el crecimiento de los vegetales. El mecanismo de esta actividad se conoce como bioestimulación. Los principales grupos de fitohormonas estimuladoras del crecimiento en las plantas son las auxinas, las citoquininas y las giberelinas (Gopalakrishnan *et al.*, 2014).

## Auxinas

Las auxinas tienen una función fundamental en la modulación del desarrollo de las plantas. Aproximadamente, el 80 % de las RPCV pueden sintetizar ácido indolacético (AIA), el cual estimula la división, el alargamiento y la diferenciación celular (Mrkovački *et al.*, 2012; Stamenković *et al.*, 2018). Otras funciones fisiológicas importantes del ácido indolacético están relacionadas con la formación de raíces laterales en las plantas dicotiledóneas y las adventicias en las monocotiledóneas, con el incremento en grosor de las paredes celulares secundarias de las células xilemáticas, lo cual aumenta la absorción de agua y sales minerales (Hassen *et al.*, 2016; Vijayabharathi *et al.*, 2016).

El compuesto precursor del ácido indolacético es el aminoácido L-triptófano, el cual se encuentra en exudados de las raíces de las plantas en concentraciones diferentes, en dependencia del genotipo. La capacidad de promover el crecimiento de las RPCV puede requerir señalizaciones que sean efectivas desde la planta hospedera (Vacheron *et al.*, 2013). En la Figura 2 se muestra una representación esquemática de la síntesis de AIA a partir de L- triptófano.

## Giberelinas

Las giberelinas participan también en el proceso de división celular y en el alargamiento de los entrenudos (Figura 3). Algunos autores consideran que estas sustancias reguladoras aumentan la densidad de los pelos absorbentes y con ello mejoran también la absorción del agua y las sales minerales. Otras funciones importantes están relacionadas con la inducción del proceso de germinación y la prevención de la dormancia en las semillas y los bulbos y la inducción del fenómeno de la partenocarpia. La deficiencia de giberelinas provoca el enanismo de las plantas (Gopalakrishnan *et al.*, 2014). No obstante, los mecanismos mediante los cuales las giberelinas mejoran el crecimiento de las plantas no se conocen con claridad (Vijayabharathi *et al.*, 2016).

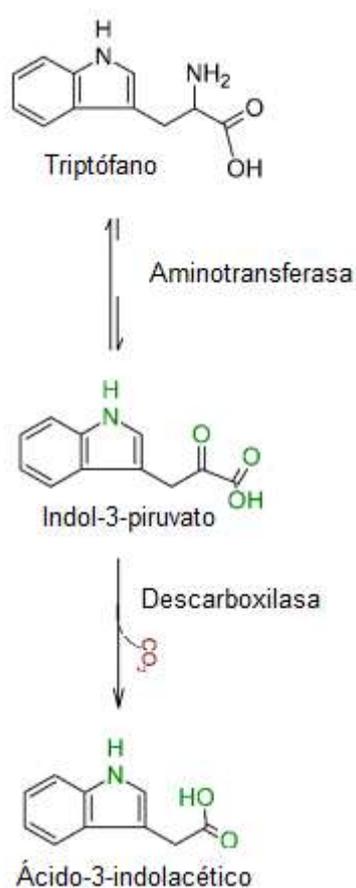


Figura 2. Esquematización general de la ruta de síntesis principal del ácido 3-indolacético.

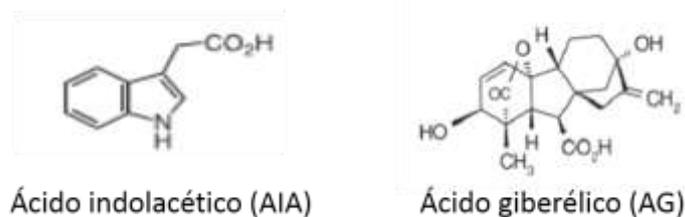


Figura 3. Estructura química de los reguladores del crecimiento ácido indolacético y el ácido giberélico. Fuente: Rodrigues *et al.* (2011).

### Citoquininas

Las citoquininas participan en el crecimiento vegetal ya que estimulan también la división celular y en algunos casos, el desarrollo de las raíces y los pelos absorbentes presentes en este órgano (Gopalakrishnan *et al.*, 2014). Además,

tienen funciones importantes en el crecimiento de los callos vegetales y contribuyen con la diferenciación de los brotes (Vijayabharathi *et al.*, 2016). El 90 % de los microorganismos de la rizosfera tiene la capacidad de producir citoquininas. Aproximadamente 30 compuestos del grupo de las citoquininas tienen un origen microbiano.

Varios grupos bacterianos tienen la capacidad de producir citoquininas, entre los que se encuentran *Bacillus* sp., *Azotobacter* sp. y *Pseudomonas* sp. En la Tabla 2 se muestran resultados importantes de especies bacterianas con actividad bioestimuladora.

Tabla 2. Bacterias productoras de reguladores del crecimiento vegetal.

| Género / especie                | Reguladores del crecimiento           | Autores                          |
|---------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| <i>Bacillus</i> spp.            | AIA (1-15 µg.mL <sup>-1</sup> )       | Thakur <i>et al.</i> (2017)      |
| <i>Pseudomonas</i> spp.         | AIA (2-11 µg.mL <sup>-1</sup> )       |                                  |
| <i>P. aeruginosa</i>            | AIA (35,36 µg.mL <sup>-1</sup> )      | Yadav <i>et al.</i> (2010)       |
| <i>P. putida</i>                | AIA (48,46 µg.mL <sup>-1</sup> )      |                                  |
| <i>B. subtilis</i>              | AIA (36,38 µg.mL <sup>-1</sup> )      |                                  |
| <i>Bacillus</i> sp. CaSUT007    | AIA (31,00 µg.mL <sup>-1</sup> )      | Buensanteai <i>et al.</i> (2013) |
| <i>Bacillus cereus</i>          | AIA (6,75 µg.mL <sup>-1</sup> )       | Thanh y Tram (2018)              |
| <i>Bacillus megaterium</i>      | AIA (4,94 µg.mL <sup>-1</sup> )       |                                  |
| <i>Bacillus subtilis</i>        | AIA (3,94 µg.mL <sup>-1</sup> )       |                                  |
| <i>Bacillus pumilus</i>         | AIA (5,59 µg.mL <sup>-1</sup> )       |                                  |
| <i>Bacillus megaterium</i>      | Giberelina (3,9 µg.mL <sup>-1</sup> ) | Gunes <i>et al.</i> (2015)       |
| <i>Bacillus megaterium</i>      | AIA (> 90 µg.mL <sup>-1</sup> )       |                                  |
| <i>B. megaterium</i> TV-91C     | Giberelina (215 µg.mL <sup>-1</sup> ) | Turan <i>et al.</i> (2014)       |
| <i>Pantoea agglomerans</i>      | Giberelina (216 µg.mL <sup>-1</sup> ) |                                  |
| <i>Bacillus subtilis</i> TV-17C | Giberelina (214 µg.mL <sup>-1</sup> ) |                                  |

### 2.2.2.2. Mecanismos de acción indirectos de las RPCV

Los mecanismos indirectos de estimulación del crecimiento son aquellos en los que las rizobacterias actúan fundamentalmente como agentes biocontroladores, para reducir enfermedades o proteger las plantas de la

degradación causada por suelos contaminados. Estos mecanismos están relacionados con la producción de sideróforos, compuestos antimicrobianos, enzimas líticas y inducción de la resistencia sistémica inducida (Siddiqui *et al.*, 2006).

#### **2.2.2.2.1. Producción de sideróforos**

Los sideróforos son moléculas orgánicas de bajo peso molecular con alta capacidad para quelatar el hierro en forma de  $Fe^{3+}$ , como parte de sales e hidróxidos de baja solubilidad (Stamenković *et al.*, 2018). El hierro es un nutriente fundamental para el desarrollo y el crecimiento de las plantas; sin embargo, en presencia de oxígeno la mayoría de las partículas de hierro están solo parcialmente solubles y por tanto, no están completamente disponibles para los organismos vivos (Gopalakrishnan *et al.*, 2014). Los sideróforos bacterianos tienen un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas, ya que funcionan como una fuente de hierro lista para ser utilizada por las plantas (Hassen *et al.*, 2016).

De esta manera, la producción de sideróforos puede ser considerada como un mecanismo de acción directa sobre el crecimiento de las plantas; sin embargo, numerosos microorganismos productores de sideróforos al secretar estos compuestos pueden quelatar los iones de  $Fe^{3+}$  y evitar que sean absorbidos por patógenos como los hongos, que también producen estos compuestos pero con una menor afinidad por este elemento. Esto provoca un déficit de hierro en los organismos fitopatógenos que afecta el metabolismo, ya que este elemento es cofactor de enzimas importantes y forma parte de reacciones de oxidación - reducción que tienen lugar en procesos vitales como la respiración celular.

#### **2.2.2.2.2. Producción de antibióticos**

La producción de antibióticos es uno de los mecanismos más efectivos empleados por las RPCV, para suprimir las enfermedades asociadas a los cultivos provocadas por bacterias y hongos fitopatógenos. Muchas de estas bacterias con capacidad para sintetizar antibióticos también producen cianidas, que en la mayoría de los casos tienen un efecto sinérgico cuando se combinan con los antibióticos (Glick, 2015).

Los antibióticos son compuestos orgánicos de bajo peso molecular que permiten a la bacteria minimizar la competencia con otros microorganismos (Raaijmakers *et al.*, 2002). *Pseudomonas fluorescens* y las especies del género *Bacillus* tienen una función importante como agentes de biocontrol (Siddiqui, 2006). *B. subtilis* produce varias clases de antibióticos entre ellos: micobacilinas, iturinas, bacilomicinas, surfactinas, micosubtilinas, fungistatinas, subporinas, fenazinas, pioluteorinas, pirrolnitrinas, tropolonas, piocianinas, kanosamina y zwittermina A; los cuales, son supresores eficaces de patógenos de las plantas, como *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Laseptoriosis* y *Verticillium* (Kinsella *et al.*, 2009).

En estudios realizados por Pahari *et al.* (2017) con distintas especies de *Bacillus* se observó un efecto antagónico frente a diferentes fitopatógenos como *Rhizoctonia solani* (ITCC-186) y *Fusarium oxysporum* (ITCC-578). De manera similar, Karimi *et al.* (2012) evidenciaron un efecto biocontrolador de cepas de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeuroginosa* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, el cual se relacionó con la producción de metabolitos antifúngicos como cianuro de hidrógeno (HCN) y sideróforos.

### **2.2.3. Potencialidades del género *Bacillus* spp. como promotor del crecimiento vegetal**

Los microorganismos del género *Bacillus* spp. representan una variedad amplia de bacterias con características comunes como son: Gram positivas, aerobias estrictas o anaerobias facultativas y pertenecen al grupo de los formadores de endospora (BAFE). Esta última propiedad permite a estos microorganismos resistir condiciones climáticas adversas como temperaturas extremas, radiación ultravioleta, agentes oxidantes y corrosivos, sequías, lluvias fuertes, entre otras (Schulz *et al.*, 2006). Además, este género se considera una biofábrica para la producción de una gama amplia de moléculas biológicamente activas y potencialmente inhibitorias para el crecimiento de fitopatógenos (Ongena y Jacques, 2008).

Los microorganismos de este género son consideradas algunos de los mejores candidatos, para el desarrollo de productos biopesticidas y biofertilizantes

eficientes desde un punto de vista tecnológico, por su capacidad para producir esporas resistentes, lo que hace que los productos tengan larga vida de anaquel y su formulación y producción sea más fácil (Hamdache *et al.*, 2011). Entre ellos, se destacan las cepas de *B. subtilis* como los más utilizadas para la estimulación del crecimiento y el control de enfermedades cuando se aplica desde semillas hasta a plántulas (Kokalis-Burelle *et al.*, 2005) (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto positivo de inoculantes bacterianos en el crecimiento de las plantas.

| <b><i>Bacillus</i></b>  | <b>Especie vegetal</b>          | <b>Resultado</b>   | <b>Autores</b>                   |
|---|---------------------------------|--|----------------------------------|
| <i>Bacillus</i> spp. (cepas AvNB-1, AvNB-2 y AvNB-5)  | <i>Aloe vera</i> L.             | Incremento longitud de la planta   | Thakur <i>et al.</i> (2017)      |
| <i>B. subtilis</i>  | <i>Cicer arietinum</i> L.       | Incremento en longitud y peso seco de brote y raíz   | Yadav <i>et al.</i> (2010)       |
| <i>Bacillus subtilis</i> B28  | <i>Cicer arietinum</i> L.       | Aumento en la altura, peso fresco y seco de las plantas  | Karimil <i>et al.</i> (2012)     |
| <i>Bacillus</i> sp. CaSUT007  | <i>Manihot esculenta</i> Crantz | Aumento en longitud de brote y raíz  | Buensanteai <i>et al.</i> (2013) |
| <i>B. amyloliquefaciens</i> IN937a, <i>B. cereus</i> BS107, <i>B. pumilus</i> INR7, <i>B. subtilis</i> GB03 | <i>Kalanchoe daigremontiana</i> | Aumento en longitud de la planta, raíz y grosor del tallo  | Yong-Soon <i>et al.</i> (2015)   |
| <i>Bacillus megaterium</i> TV-91C, <i>Pantoea agglomerans</i> RK-92, <i>Bacillus subtilis</i> TV-17C        | <i>Brassica oleracea</i> L.     | Incremento en la longitud de la plántula, diámetro del tallo, peso fresco y seco de la raíz y el brote | Turan <i>et al.</i> (2014)       |

|   |  |   |                                       |
|---|--|---|---------------------------------------|
| <i>Bacillus megaterium</i><br>XTBG34                              | <i>Arabidopsis thaliana</i> L.                   | Incremento en peso fresco   | Zou <i>et al.</i> (2010)              |
| Consorcio <i>Rhizobium</i> + <i>Pseudomonas</i> + <i>Bacillus</i> | <i>Arachis hypogaea</i> L.                       | Aumento en la longitud, peso seco e índice de vigor en plántulas                                  | Mathivanan <i>et al.</i> (2014)       |
| <i>Bacillus megaterium</i><br>KBA-10                              | <i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>botrytis</i> | Aumento del peso fresco del brote, peso seco y longitud de la raíz                                | Ekinci <i>et al.</i> (2014)           |
| <i>Bacillus mycoides</i> T8 y <i>Bacillus subtilis</i> OSU-142    | <i>Cydonia oblonga</i> Miller                    | Aumento del rendimiento, número, peso, largo y ancho de los frutos                                | Arikan <i>et al.</i> (2013)           |
| <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>B. pumilus</i>                 | <i>Cuscuta campestris</i> Yunk.                  | Aumento de la germinación   | Sarić-Krsmanović <i>et al.</i> (2017) |
| <i>Bacillus subtilis</i> GIBI-200, <i>B. pumilus</i> GIBI-206     | <i>Rubus glaucus</i> Benth. cv. Thornless        | Similar número, longitud y grosor de ramas, en comparación con la fertilización mineral (control) | Robledo-Buriticá <i>et al.</i> (2018) |
| <i>Bacillus circulans</i> y <i>Bacillus polymyxa</i>              | <i>Spinacia oleracea</i> L.                      | Aumento de la altura de la planta, número de hojas y área foliar.                                 | Hauka <i>et al.</i> (2016)            |

#### 2.2.4. Principales limitantes del uso de las RPCV

Aunque numerosas investigaciones confirman el efecto beneficioso de las RPCV en las plantas, y existen abundantes trabajos de inoculantes con varias combinaciones de microorganismos (algunos disponibles en el mercado); los resultados no siempre son consistentes y en algunos casos inesperados (Shaikh y Sayyed, 2015; Abhilash *et al.*, 2016; Keswani *et al.*, 2016). La aplicación de

*Azospirillum brasilense* y *Azospirillum iraknse* al cultivo de trigo (*Triticum aestivum* L.), mostró en principio buenos resultados con relación al peso seco de las raíces y al número de brotes. Sin embargo, al final de la cosecha el rendimiento no alcanzó su potencial máximo debido a un déficit hídrico (Stamenković *et al.*, 2018).

La experiencia demuestra que los fertilizantes microbianos no son aceptados en una gran extensión por los productores agrícolas, debido a que no es fácil replicar su efecto en el campo. Es evidente que si el inoculante no es preparado o aplicado de la manera correcta, las propiedades útiles del fertilizante no se manifestarán (Mishra y Arora, 2016). Entre los factores observados que afectan la calidad de varios biofertilizantes disponibles en el mercado, están el número reducido de células viables, la baja colonización de las raíces por los microorganismos, la contaminación del inoculante que disminuye la confianza de estos productos y el potencial comercial (Vassilev *et al.*, 2015).

El manejo de estos productos requiere de atención y su uso inapropiado es la razón principal por la cual los buenos resultados, que se obtienen en condiciones de laboratorio, no pueden ser reproducidos en el campo, lo cual explica la dificultad de la comercialización de estos productos (Bashan *et al.*, 2014).

Algunos autores sugieren para el desarrollo de los biofertilizantes es necesario que se enriquezcan con diferentes metabolitos junto a los microorganismos, de acuerdo a los requerimientos de las plantas (Marks *et al.*, 2015). También se plantea que los biofertilizantes tendrán una mayor aplicación en el futuro, si se logra el desarrollo de materiales inertes que puedan incrementar la estabilidad del producto, su tiempo de vida y su efectividad en el suelo (Abhilash *et al.*, 2016).

Por otra parte, es importante destacar que la mayoría de los investigadores están enfocados principalmente en la caracterización de los microorganismos, que son apropiados para el cultivo de las plantas, así como la aplicación posterior en el sistema planta-suelo en condiciones controladas. Sin embargo, procesos importantes como la multiplicación de la masa y los procedimientos para las formulaciones se estudian en menor extensión, aun cuando tienen una importancia fundamental para la efectividad del producto (Vassilev *et al.*, 2015).

## 2.2.5. Otras aplicaciones de las RBPC

### 2.2.5.1. Las BPCP como agentes biorremediadores

Las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas tienen un efecto positivo sobre las características del suelo, y los consorcios se utilizan exitosamente en procesos como la biorremediación. De esta manera, los suelos pobres en nutrientes y contaminados se convierten en arables y disponibles para las producciones agrícolas.

Entre los microorganismos que hidrolizan de manera efectiva los hidrocarburos y los contaminantes basados en aceites están *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Nocardia* sp., *Acinetobacter* sp., *Flavobacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Arthrobacter* sp., *Corynebacterium* sp., *Mycobacterium* sp., etc. (Milić *et al.*, 2009; Beškoski *et al.*, 2011).

Algunos trabajos evidencian que varios microorganismos comunes considerados como promotores del crecimiento vegetal, como *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. y *Agrobacterium* sp., no solo mejoran el crecimiento, sino también reducen la entrada de metales pesados a las plantas (Ahemad, 2015; Ullah *et al.*, 2015). Por ejemplo, *Microbacterium* sp. previno exitosamente el efecto tóxico del cromo en el guisante (*Pisum sativum* L.), mediante la reducción de la disponibilidad de este metal pesado en el suelo (Soni *et al.*, 2014). Estudios con *Pseudomonas putida* también mostraron la capacidad de esta especie para degradar el naftaleno en suelo y proteger la semilla y la planta de posibles efectos letales (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

En trabajos similares se demostró la capacidad biorremediadora de cepas de *Bacillus megaterium* y *P. aeruginosa* aislados del arbusto *Suaeda nudiflora*. Los aislados se seleccionaron por su tolerancia a metales pesados como el zinc y el plomo. Las plantas de maíz inoculadas con los aislados mostraron un aumento en la altura de la planta del 20 %, longitud de la raíz (20 %) y peso seco (5 %) en comparación con las plantas control no inoculadas. Los resultados de este estudio evidenciaron una respuesta positiva del crecimiento del maíz en suelos contaminados con metales pesados, así como una acumulación significativa de zinc (587 mg.kg<sup>-1</sup>) y plomo (227 mg.kg<sup>-1</sup>) en las plantas (Jha *et al.*, 2017).

### 2.2.5.2. Aplicaciones industriales de las enzimas microbianas

Las enzimas son componentes vitales de los sistemas biológicos y se utilizan desde la antigüedad para la fabricación de alcoholes y otras bebidas (Singh *et al.*, 2016). Los microorganismos constituyen una fuente de enzimas con diferentes usos. Entre las enzimas de mayor utilidad están las amilasas, las celulasas, las lipasas, las proteasas, las xilanasas y las mananasas, entre otras, las cuales están disponibles para diversas aplicaciones comerciales. Entre estas enzimas, las amilasas son de las más versátiles con usos diversos en la producción de siropes, biocombustibles y ciclodextrinas de importancia farmacéutica (Tiwari *et al.*, 2015).

Las amilasas catalizan la hidrólisis del almidón en moléculas de azúcar de bajo peso molecular. En la naturaleza, el almidón es el polisacárido más abundante después de la celulosa, y la fuente primaria de carbono y energía accesible en la tierra. Este polímero es sintetizado por las plantas y se utiliza en las industrias alimenticia, textil, farmacéutica, del papel y del alcohol (Sharma y Satyanarayana, 2013).

En la industria alimenticia para la fabricación de panes y dulces, las amilasas se adicionan solas o en mezclas a la harina, para prolongar la calidad y el tiempo de duración de los productos horneados (Singh *et al.*, 2016). También se adicionan a la masa panadera para hidrolizar los polisacáridos en dextrinas que son fermentados por las levaduras (Sundarram y Murthy, 2014).

En la industria del detergente se utilizan las amilasas para catalizar la hidrólisis de los enlaces glucosídicos en las manchas de tinturas, y eliminar las gomas almidonosas que se combinan con otras tinturas y partículas de suciedad. Las  $\alpha$ -amilasas se emplean primariamente en los detergentes de las lavanderías y actualmente están incluidas en aproximadamente el 90 % de las formulaciones de detergente líquidos (Souza y Magalhães, 2010).

Con relación a la industria del papel, las  $\alpha$ -amilasas se aplican en principio para producir moléculas de almidón de alto peso molecular y baja viscosidad, a través de modificaciones del polímero presentes en las capas de papel. Este proceso

aumenta la suavidad y la fuerza del papel y con ello la calidad para la escritura (Gurung *et al.*, 2013).

Las celulasas también son enzimas importantes en diferentes industrias como la alimenticia para la extracción de jugos a partir de frutas y vegetales, la textil, la agropecuaria, en la fabricación de pulpa y papel, bioetanol a partir de desperdicios lignocelulósicos entre otras aplicaciones (Annamalaia *et al.*, 2013). Por estas razones, existe una demanda de nuevas fuentes de enzimas, más específicas y estables y por estas razones, muchos trabajos están dirigidos a la evaluación y caracterización de nuevos aislados productores de celulasas (Sohail *et al.*, 2009; Dhillona *et al.*, 2012).

### III. 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. Las etapas generales del trabajo se muestran en la Figura 4.

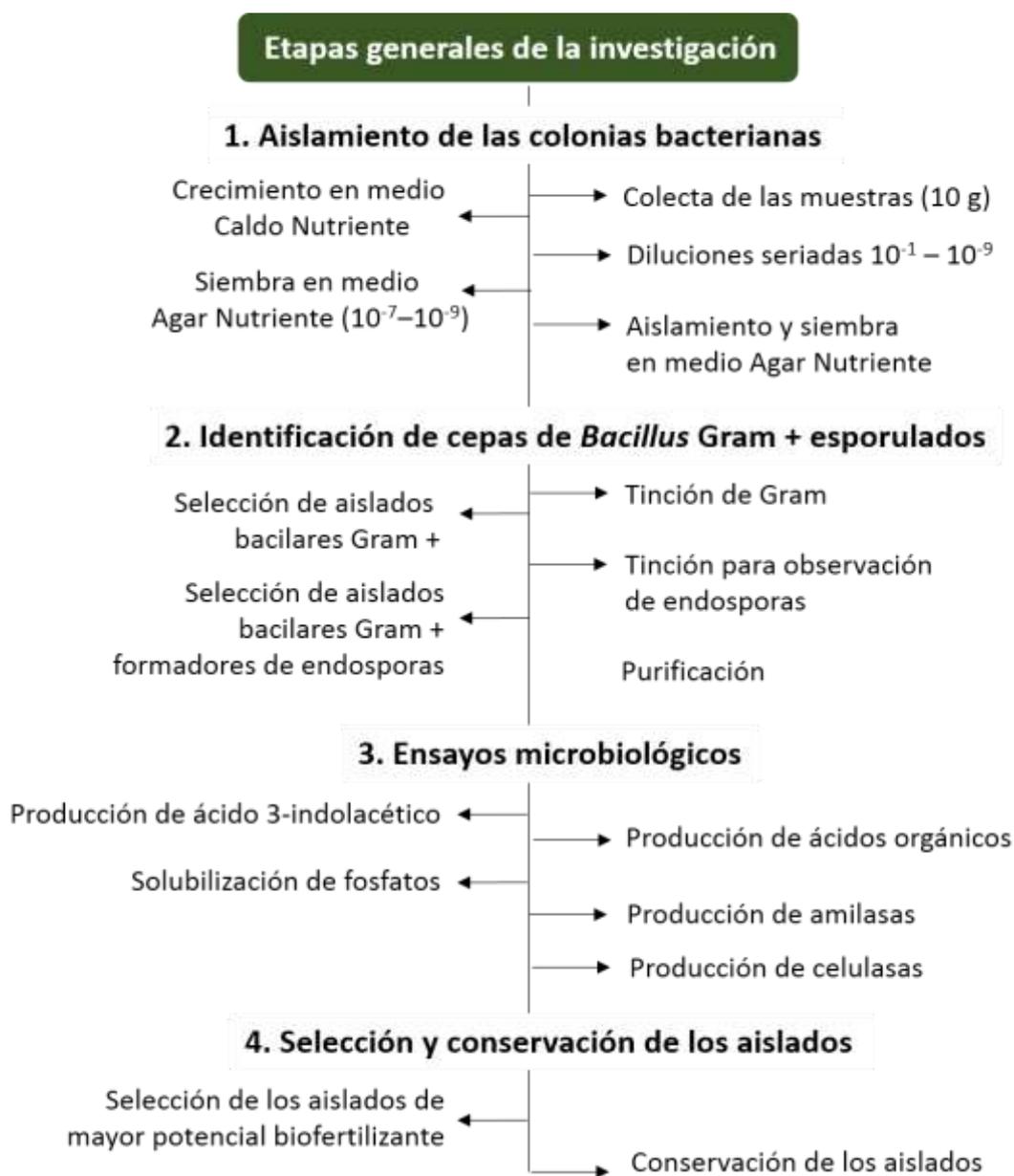


Figura 4. Etapas generales de la investigación.

### 3.2. Aislamiento de los aislados bacterianos

#### 3.2.1. Colecta de las muestras

La colecta de las muestras se realizó a partir del suelo rizosférico de tres variedades diferentes de frijol, presentes en localidades pertenecientes a los municipios Colón y Unión de Reyes de la provincia de Matanzas (Tabla 4). Se utilizó para el muestreo un diseño en forma de bandera inglesa (Figura 5A) y se colectaron muestras de 11 sitios diferentes en cada área de siembra. El material se colectó en frascos plásticos de 50 mL esterilizados, con ayuda de una espátula también estéril (Figura 5B). Las muestras se trasladaron hacia el laboratorio para su inoculación en medio Caldo Nutriente.

Tabla 4. Variedades de frijol y localidades seleccionadas para la colecta de suelo rizosférico.

| Localidad                           | Variedad                      | Ubicación                                  |
|-------------------------------------|-------------------------------|--|
| Sabanilla, Municipio Unión de Reyes | Tomeguín 93                   | Latitud: 22.701064<br>Longitud: -80.866073 |
| Cabezas, Municipio Unión de Reyes   | Tomeguín 93                   | Latitud: 22.694812<br>Longitud: -80.876006 |
| Cabezas, Municipio Unión de Reyes   | Cul 156                       | Latitud: 22.844198<br>Longitud: -81.543115 |
| Río Piedra, Municipio Colón         | Cuba Cueto 259 - negro T-1567 | Latitud: 22.840800<br>Longitud: -81.676077 |
| Casa de Visita, Municipio Colón     | Tomeguín 93                   | Latitud: 22.842907<br>Longitud: -81.663286 |

#### 3.2.2. Siembra en Caldo Nutriente

Con el objetivo de incrementar la población bacteriana presente en las muestras colectadas, se inocularon 10 g de cada muestra en 100 mL de medio Caldo Nutriente contenidos en erlenmeyers de 250 mL. Las suspensiones se incubaron en agitación (130 rpm) a 37 °C, durante 72 h (Figura 6A). Posteriormente, los medios de cultivo se colocaron en baño María a 80 °C durante 12 minutos para eliminar todas las formas vegetativas y comenzar el proceso de aislamiento a partir de endosporas resistentes a estas condiciones (Figura 6B).



Figura 5. Colecta de suelo rizosférico de plantas de frijol. A: esquema de la toma de muestras en forma de bandera inglesa ( $\Delta$ : puntos de colecta). B: frascos con muestras de suelo rizosférico de la variedad Tomeguín 93 Sabanilla, Unión de Reyes. C: vista panorámica del sembrado de frijoles donde se tomaron las muestras.

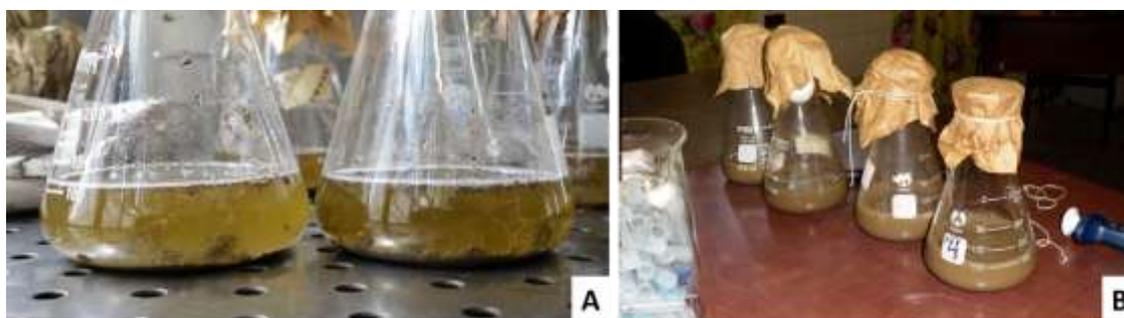


Figura 6. Siembra en Caldo Nutriente de las muestras de suelo rizosférico. A: erlenmeyers con las muestras inmediatamente después de la inoculación. B: medio de cultivo posterior a las 72 h de inoculación.

### 3.2.3. Diluciones serias y siembra en medio Agar Nutriente

Posterior al choque térmico se realizaron a cada muestra diluciones seriadas ( $10^{-1}$  y  $10^{-9}$ ) en solución de cloruro de sodio (0,9 %) (Figura 7).



Figura 7. Diluciones seriadas de las suspensiones microbianas.

Se tomaron alícuotas de 100  $\mu$ L de las diluciones  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-9}$  y se transfirieron a placas Petri de 9 cm de diámetro con medio Agar Nutriente. Las soluciones fueron esparcidas por toda la superficie de la placa con la ayuda de una espátula de Drigalski. Cada dilución de las diferentes muestras se sembró por triplicado. Las placas se colocaron en una incubadora marca Boxun a 37 °C durante 72 h.

#### **3.2.4. Aislamiento de las colonias bacterianas**

Con ayuda de un asa calibrada se tomaron muestras de colonias con morfologías diferentes y se sembraron en tubos de ensayo sobre cuñas de medio Agar Nutriente (Figura 8). Los aislados se identificaron numéricamente a partir de la variedad y la localidad de procedencia (Tabla 5). Las muestras se colocaron para su crecimiento en similares condiciones al acápite anterior.

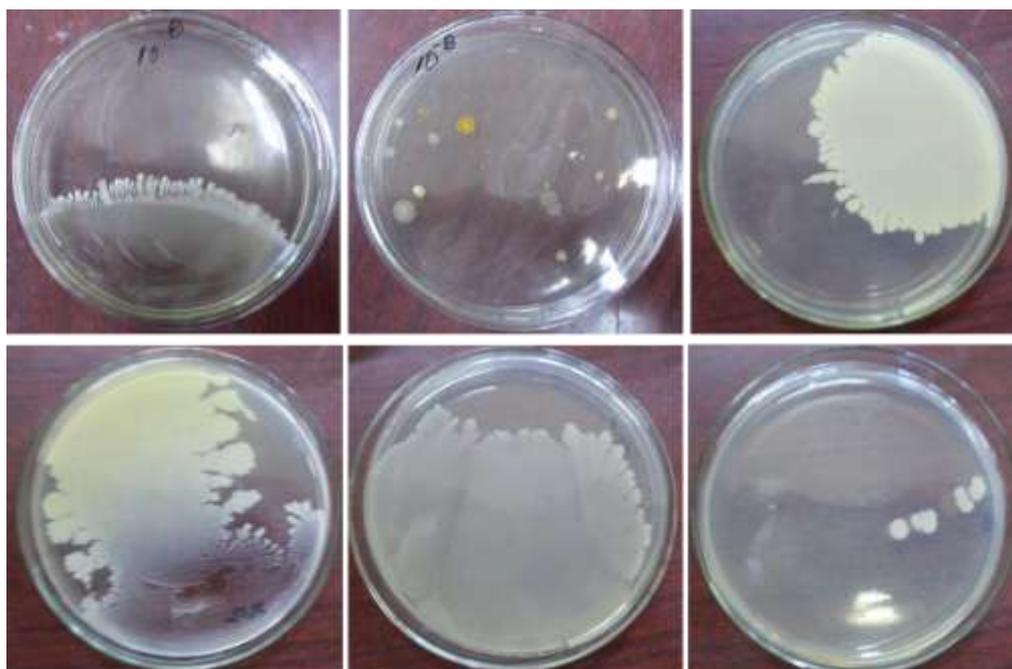


Figura 8. Colonias provenientes de la rizosfera de la variedad Tomeguín de la localidad de Sabanilla, Unión de Reyes.

Tabla 5. Identificación de los aislados bacterianos según la variedad y la localidad.

| Nombre de los aislados | Descripción  |
|------------------------|--|
| TS 1,2...n             | Aislados de la variedad Tomeguín 93 de la localidad Sabanilla del municipio Unión de Reyes |
| TCab 1,2...n           | Aislados de la variedad Tomeguín 93 de la localidad Cabezas del municipio Unión de Reyes   |
| Cul 1,2...n            | Aislados de la variedad Cul de la localidad Cabezas del municipio Unión de Reyes           |
| CN 1,2...n             | Aislados provenientes de la variedad Cuba Cueto 259 - negro T- 1567 del municipio Colón    |
| TCol 1,2...n           | Aislados de la variedad Tomeguín 93 del municipio Colón                                    |

### 3.3. Identificación de las cepas de *Bacillus* Gram + productoras de endosporas

Posterior a las 24 h de crecimiento se realizó una tinción de Gram a todos los aislados, para identificar los que presentan morfología bacilar y son Gram positivos. A las colonias que mostraron estas características se le realizó una tinción verde de Malaquita a las 72 h de incubación para la observación de endosporas. Los aislados que cumplieron estos requisitos fueron purificados en placas Petri con medio Agar Nutriente, mediante la técnica de siembra por agotamiento (Figura 9).

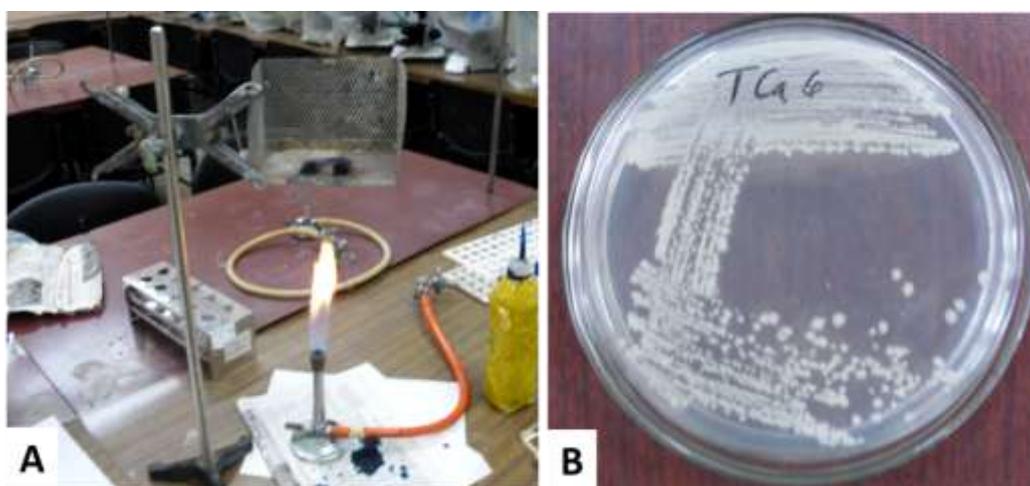


Figura 9. Tinción de endospora (A) y purificación del aislado TCab 6 (B).

### 3.4. Ensayos bioquímicos

#### 3.4.1. Producción de ácido 3-indolacético (AIA)

La producción de ácido indolacético se determinó con el método de Loper y Schroth (1986). Se inoculó un asa calibrada de cada aislado bacteriano en 10 mL de Caldo Nutriente suplementado con L-triptófano ( $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), contenido en erlenmeyers de 25 mL de volumen con. Los medios de cultivo se colocaron en condiciones de agitación (130 rpm), oscuridad y  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 48 h. Posteriormente, las suspensiones celulares se centrifugaron en una centrífuga a 6 000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se colectó para la determinación

cualitativa y cuantitativa de ácido 3-indolacético. Se utilizó como control negativo el medio de cultivo sin inóculo.

#### **3.4.1.1. Determinación cualitativa de AIA**

Se colocaron alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  de los sobrenadantes correspondientes a los crecimientos bacterianos obtenidos, en placas de 96 pocillos y se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  del reactivo Salkoswki (ácido perclórico  $\text{HClO}_4$  3,48  $\text{mol.L}^{-1}$  y  $\text{FeCl}_3$  10  $\text{mmol.L}^{-1}$ ). Este reactivo permite determinar la presencia de grupos indol en las soluciones que contengan entre otros compuestos, tejidos vegetales y extractos de cultivos microbianos. El desarrollo de una coloración entre rosado y rojo fucsia indicó la presencia de grupos indol presumibles como compuestos auxínicos (Celis y Gallardo, 2008).

#### **3.4.1.2. Determinación cuantitativa de AIA**

A los aislados evaluados como positivos mediante el ensayo cualitativo, se les cuantificó colorimétricamente la concentración de esta auxina por la técnica de Salkoswki. Primeramente se realizó una curva de calibración a partir de una solución de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de AIA con concentraciones de 5, 10, 20, 40, 60 y 80  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Se mezclaron 0,5 mL de cada una de las soluciones patrón y de los sobrenadantes bacterianos, con 0,5 mL del reactivo de Salkowski. Las mezclas se dejaron reposar por 30 minutos a temperatura ambiente y se realizaron las lecturas de absorbancias a 530 nm en un espectrofotómetro UV/VIS (ULTROSPEC, 2000). Con los valores obtenidos de la curva patrón, se obtuvo la ecuación que relaciona la concentración de AIA con la absorbancia. Las mediciones se realizaron por triplicado (Sánchez-García, 2013).

#### **3.4.2. Determinación cualitativa de la producción de ácidos orgánicos**

La capacidad de producir ácidos orgánicos se determinó mediante la inoculación de los aislados bacterianos en erlenmeyers de 25 mL de volumen, que contenían 10 mL medio de cultivo compuesto por glucosa (5  $\text{g.L}^{-1}$ ),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (5,0  $\text{g.L}^{-1}$ ) y peptona (5,0  $\text{g.L}^{-1}$ ), pH 7,3. Los inóculos se incubaron en agitación (130 rpm) a 37 °C, durante 48 h. Posteriormente se colocaron alícuotas de 200  $\mu\text{L}$  de cada cultivo bacteriano en placas de 96 pocillos y se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  del indicador

rojo metilo (0,02 %). El cambio instantáneo del color amarillo del medio de cultivo a rojo, indicó la formación de ácidos orgánicos (Trivedi *et al.*, 2013).

### 3.4.3. Solubilización de fosfatos

La capacidad de solubilizar fosfatos inorgánicos por los aislados bacterianos se determinó en medio Agar Pikovskaya (1948) compuesto por: glucosa (10,0 g.L<sup>-1</sup>), Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (5,0 g.L<sup>-1</sup>), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5 g.L<sup>-1</sup>), KCl (0,2 g.L<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,1 g.L<sup>-1</sup>), MnSO<sub>4</sub> (0,002 g.L<sup>-1</sup>), FeSO<sub>4</sub> (0,002 g.L<sup>-1</sup>), extracto de levadura (0,5 g.L<sup>-1</sup>) y Agar (15,0 g.L<sup>-1</sup>). Los aislados se sembraron en placas Petri con el medio de cultivo y se incubaron a 37 °C durante siete días. La eficiencia de solubilización (ES) se determinó mediante la fórmula siguiente:

$$ES (\%) = \frac{(Z - C)}{C} * 100$$

Donde,

Z: diámetro del halo claro alrededor de la colonia.

C: diámetro de la colonia bacteriana.

### 3.4.4. Actividad amilolítica

Se determinó según el método de Karnwal (2011). Los aislados bacterianos se sembraron en medio compuesto por: NaCl 0,1 %, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,3 %, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,6 %, MgSO<sub>4</sub> 0,12 %, peptona 0,5 % y extracto de levadura 0,3 %, suplementado con almidón soluble (1,0 %) y agar 15 g.L<sup>-1</sup>. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h. La actividad amilolítica se observó mediante la tinción del medio de cultivo con la solución yodada de Gram (2% de yodo y 0,2 % de yoduro de potasio). La presencia de un halo de hidrólisis (zona clara) alrededor de la colonia indicó producción de enzimas amilasas. La capacidad de producir estas enzimas se evaluó cualitativamente: - (ausencia), + (bajo), ++ (medio), +++ (alto).

### 3.4.5. Actividad celulolítica

Los aislados bacterianos se sembraron en medio compuesto por: NaCl 0,1 %, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,3 %, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,6 %, MgSO<sub>4</sub> 0,12 %, peptona 0,5 % y extracto de levadura 0,3 %, suplementado con carboximetil celulosa (1,0 %) y agar 15 g.L<sup>-1</sup>.

Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h. La actividad celulolítica se determinó mediante la tinción del medio de cultivo con una solución de Rojo Congo (0,5 %). La presencia de un halo de hidrólisis alrededor de la colonia indicó producción de enzimas celulolíticas. El índice de potencia se determinó mediante la fórmula descrita en el acápite 3.4.4.

## **2.5. Conservación de las cepas bacterianas**

Las cepas bacterianas que mostraron un resultado positivo a las diferentes pruebas realizadas se conservaron en medio Caldo Nutriente con glicerol al 10% a - 33°C.

## **2.6. 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 (Sigarroa, 1985). En los casos en que los datos cumplieron los requisitos exigidos se procesaron mediante ANOVA de clasificación simple o multifactorial y la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey HSD ( $P \leq 0,05$ ). Los datos que no cumplieron con estas premisas fueron comparados mediante la Prueba de Kruskal-Wallis y la Prueba de Rangos Múltiples de Student-Newman-Kwels (SNK) ( $P \leq 0,05$ ).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Aislamiento de cepas de *Bacillus* spp. a partir de rizosfera de frijol

El aislamiento de colonias bacterianas a partir de la rizosfera de distintas variedades de frijol, en los municipios de Colón y Unión de Reyes en la provincia de Matanzas, permitió obtener un total de 437 colonias, de las cuales el 32,27 % correspondieron a aislados de *Bacillus* Gram+ con capacidad de esporular. En la Tabla 6 y en la Figura 10 se muestran los resultados del proceso de aislamiento por variedad y localidad.

Tabla 6. Resultados del aislamiento de cepas bacterianas de la rizosfera de frijol.

| Aislados | Formas bacilares | Cocos | Otros | BNE | BE  | BE (%) | Total |
|----------|------------------|-------|-------|-----|-----|--------|-------|
| CN       | 58               | 31    | 6     | 30  | 28  | 29,47  | 95    |
| TCol     | 36               | 32    | 4     | 9   | 27  | 37,50  | 72    |
| TS       | 61               | 82    | 6     | 23  | 38  | 25,50  | 149   |
| TCab     | 26               | 20    | 7     | 11  | 15  | 28,30  | 53    |
| Cul      | 39               | 24    | 5     | 6   | 33  | 48,53  | 68    |
| Total    | 220              | 189   | 28    | 79  | 141 | 32,27  | 437   |

BNE: bacilos no esporulados, BE: bacilos esporulados

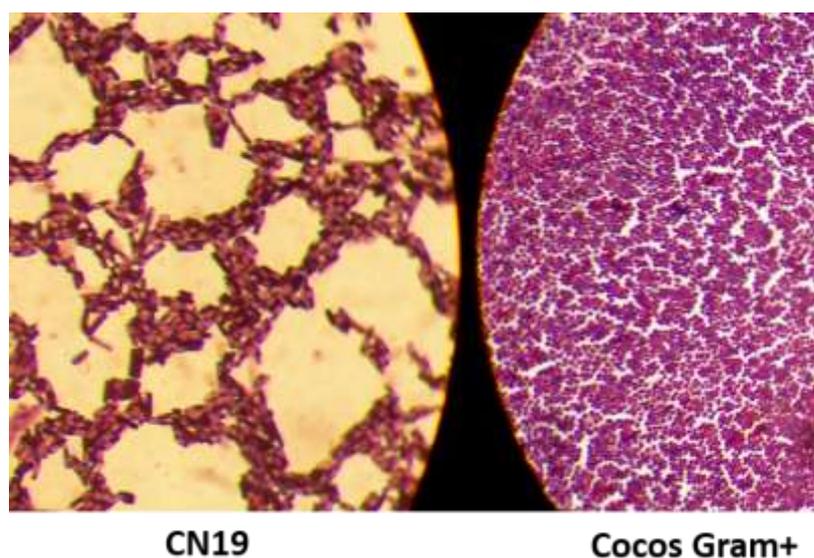


Figura 10. Tinción de Gram de aislados bacterianos de la variedad Cuba Cueto 259 - negro T- 1567 del municipio Colón.

## 4.2. Producción de ácido indolacético (AIA)

### 4.2.1. Determinación cualitativa de la producción de AIA

La producción de la auxina natural AIA constituye una de las pruebas fundamentales, para evaluar las potencialidades que poseen las cepas microbianas como agentes bioestimuladores del crecimiento vegetal. La figura 11 muestra el porcentaje de aislados positivos al ensayo por variedad/localidad y las figuras 12 y 13 el resultado visual cualitativo. El porcentaje total de aislados productores de AIA fue de 77,63 %, lo cual coincide con diferentes autores quienes refirieron que aproximadamente el 80 % de las rizobacterias son capaces de producir y liberar AIA a la rizosfera (Patten y Glick, 1996).

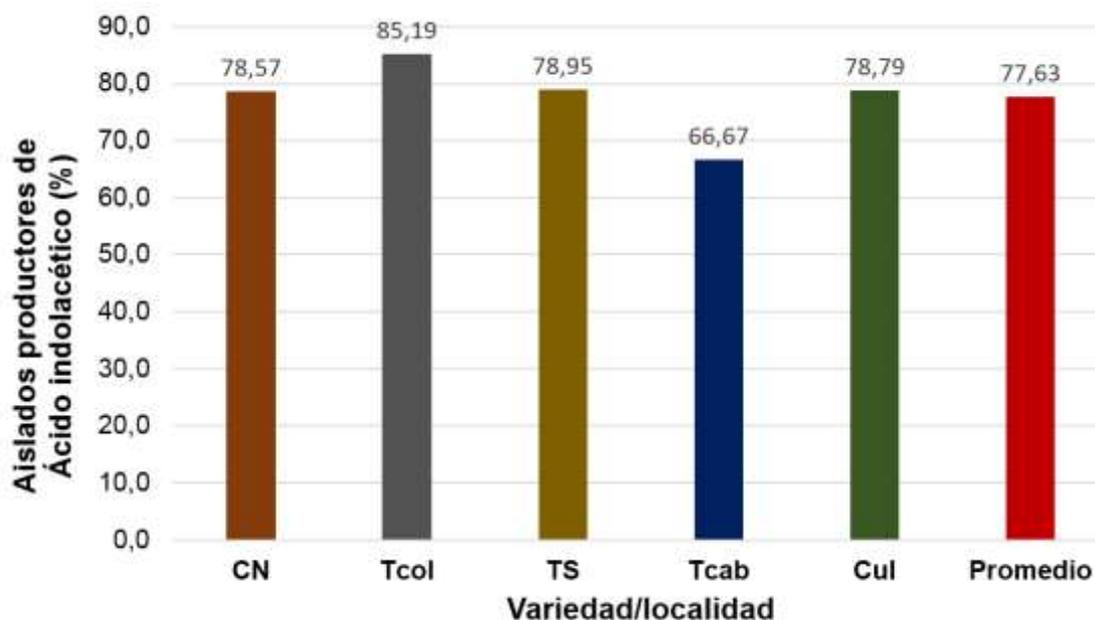


Figura 11. Aislados de bacilos productores de ácido indolacético.

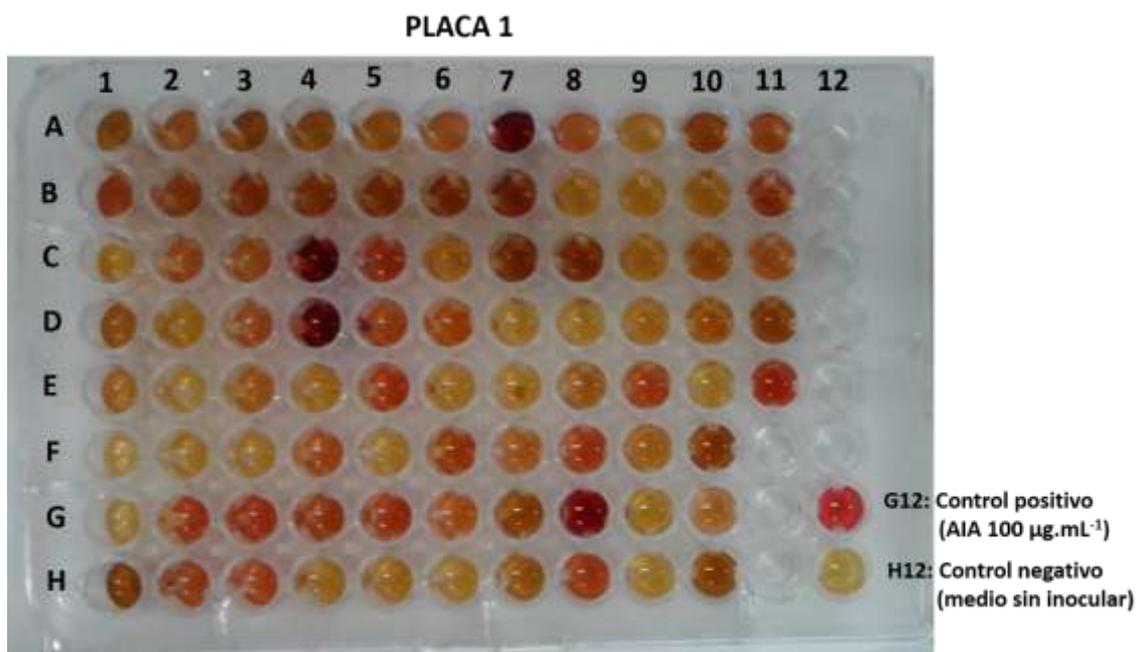


Figura 12. Determinación cualitativa de la producción de AIA. A1:Tcol54, A2:Tcol21, A3:Tcol53, A4:Tcol56, A5:Tcol72, A6:Tcol10, A7:Tcol4, A8:Tcol12, A9:TS148, A10:TS139, A11:CN19, B1:TS119, B2:TS123, B3:TS149, B4:TS124, B5:TS139, B6:TS142, B7:TS147, B8:TS148, B9:TS47, B10:TS68, B11:CN20, C1:TS96, C2:TS97, C3:TS98, C4:TS99, C5:TS104, C6:TS105, C7:TS110, C8:TS112, C9:TS114, C10:TS115, C11:CN72, D1:TS48, D2:TS52, D3:TS68, D4:TS70, D5:TS74, D6:TS81, D7:TS83, D8:TS84, D9:TS91, D10:TS95, D11:CN78, E1:TS3, E2:TS7, E3:TS10, E4:TS13, E5:TS15, E6:TS33, E7:TS34, E8:TS35, E9:TS46, E10:TS47, E11:CN61, F1:CN7, F2:CN43, F3:CN84, F4:CN87, F5:CN39, F6:CN56, F7:Tcol9, F8:Tcol17, F9:Tcol35, F10:Tcol64, G1:CN65, G2:CN66, G3:CN69, G4:CN85, G5:CN95, G6:CN72, G7:Tcol59, G8:Tcol34, G9:Tcol63, G10:Tcol8, **G12:control+**, H1:CN49, H2:CN52, H3:CN59, H4:CN93, H5:CN92, H6:CN94, H7:Tcol40, H8:Tcol49, H9:Tcol39, H10:Tcol62, **H12:control-**.

Como se puede observar, los medios de cultivo que desarrollaron mayor coloración correspondieron a las cepas Tcol4, Tcol34, TS99, TS70, CN61, Tcab9, Cul1, Cul3, Cul20, Cul26, Cul36, Cul37, Cul61 y Cul65. Al comparar la intensidad de la coloración entre estos medios de cultivos y el control positivo (AIA 100 µg.mL<sup>-1</sup>), se evidencia que los medios contienen una concentración superior de compuestos orgánicos con grupos indol presumibles como AIA, los cuales se oxidaron por la acción del ácido perclórico. Por el contrario, otros medios de cultivos no manifestaron cambios de coloración o desarrollaron muy poca intensidad con relación al control, lo que indica ninguna o poca producción auxínica.

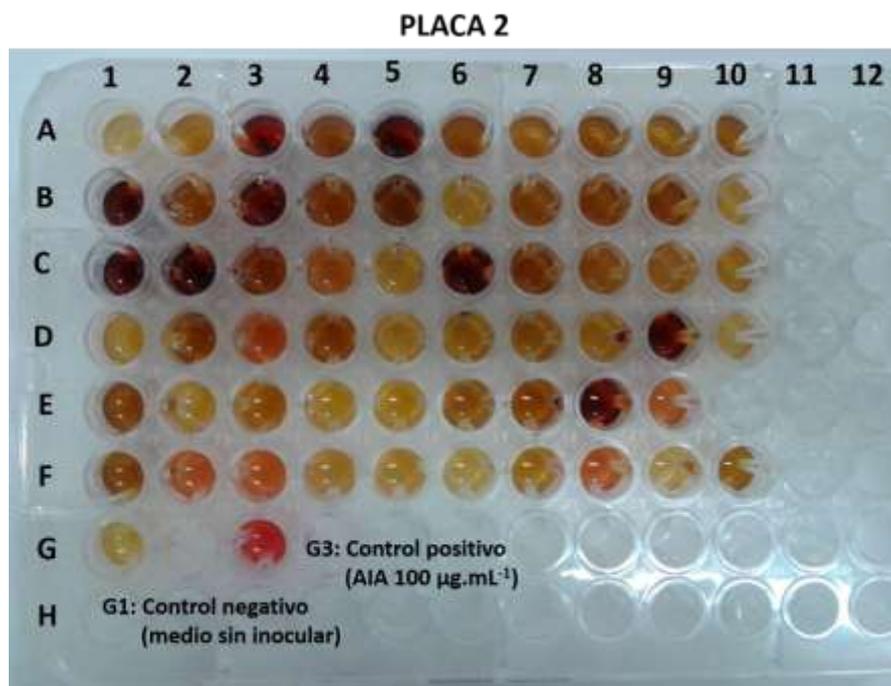


Figura 13. Determinación cualitativa de la producción de AIA. A1:Cul18, A2:Cul19, A3:Cul20, A4:Cul22, A5:Cul26, A6:Cul30, A7:Cul31, A8:Cul32, A9:Cul33, A10:Cul35, B1:Cul36, B2:Cul39, B3:Cul1, B4:Cul6, B5:Cul50, B6:Cul51, B7:Cul7, B8:Cul9, B9:Cul16, B10:Cul17, C1:Cul3, C2:Cul37, C3:Cul53, C4:Cul65, C5:Cul59, C6:Cul61, C7:Cul62, C8:Cul63, C9:Cul21, C10:Cul54, D1:Tcab6, D2:Tcab7, D3:Tcab17, D4:Tcab2, D5:Tcab4, D6:Tcab18, D7:Tcab15, D8:Cul60, D9:Cul65, D10:Cul57, E1:Tcab23, E2:Tcab76, E3:Tcab1, E4:Tcab20, E5:Tcab10, E6:Tcab19, E7:Tcab8, E8:Tcab9, E9:Tcol69, F1:CN12, F2:CN13, F3:CN71, F4:CN79, F5:CN64, F6:Tcol6, F7:Tcol58, F8:Tcol22, F9:Tcol57, F10:Tcol68, **G1:control-**, **G3:control+**.

#### 4.2.2. Determinación cuantitativa de la producción de AIA

A partir del ensayo cualitativo se eliminaron las cepas que no produjeron cambios de coloración con relación al control negativo y se determinó la concentración de AIA en el sobrenadante de los cultivos bacterianos. La tabla 7 muestra los 50 aislados que produjeron las mayores concentraciones de AIA.

Las concentraciones de AIA obtenidas en la presente investigación son superiores a los referidos por otros autores en aislados rizosféricos de *Arachis hypogea* L. (Thakur y Parikh, 2018) y *Piper nigrum* L. (Thanh y Tram, 2018), donde se obtuvieron valores que no superaron los 20 µg.mL<sup>-1</sup>. En otros trabajos relacionados se refirieron valores de 36,38 µg.mL<sup>-1</sup> de AIA con *Bacillus subtilis* y la adición de 200 µg.mL<sup>-1</sup> de L-triptófano al medio de cultivo (Yadav *et al.*, 2010).

Estudios de optimización de la producción de AIA con diferentes concentraciones de L-triptófano y tiempos de crecimiento bacteriano, se obtuvo un máximo de 127,56  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Choudhury *et al.*, 2017).

Tabla 7. Concentración de ácido indolacético de los 50 mejores aislados rizosféricos estudiados.

|    | <b>Cepa</b> | <b>AIA (<math>\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}</math>)</b> |    | <b>Cepa</b> | <b>AIA (<math>\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}</math>)</b> |
|----|-------------|--|----|-------------|--|
| 1  | Tcol 4      | 293,65 <sup>a</sup> $\pm$ 13,21                          | 26 | CN 95       | 42,02 <sup>klmn</sup> $\pm$ 0,59                         |
| 2  | Cul 3       | 276,76 <sup>ab</sup> $\pm$ 7,68                          | 27 | Tcol 22     | 41,82 <sup>lmn</sup> $\pm$ 0,25                          |
| 3  | Cul 20      | 265,05 <sup>b</sup> $\pm$ 3,36                           | 28 | Tcol 64     | 39,39 <sup>lmn</sup> $\pm$ 0,37                          |
| 4  | Cul 26      | 227,43 <sup>c</sup> $\pm$ 8,19                           | 29 | TS 46       | 38,28 <sup>lmn</sup> $\pm$ 0,97                          |
| 5  | Cul 61      | 204,01 <sup>cd</sup> $\pm$ 2,38                          | 30 | Tcol 49     | 37,47 <sup>lmn</sup> $\pm$ 0,51                          |
| 6  | Cul 55      | 198,60 <sup>de</sup> $\pm$ 9,52                          | 31 | TS 15       | 37,29 <sup>lmn</sup> $\pm$ 0,72                          |
| 7  | TS 99       | 182,61 <sup>def</sup> $\pm$ 3,53                         | 32 | CN 94       | 36,84 <sup>lmn</sup> $\pm$ 0,81                          |
| 8  | TS 70       | 176,76 <sup>ef</sup> $\pm$ 7,79                          | 33 | Tcab 17     | 36,17 <sup>lmn</sup> $\pm$ 1,49                          |
| 9  | Tcol 34     | 158,51 <sup>fg</sup> $\pm$ 4,34                          | 34 | Tcab 7      | 35,18 <sup>lmn</sup> $\pm$ 1,05                          |
| 10 | Cul 36      | 143,67 <sup>gh</sup> $\pm$ 18,47                         | 35 | TS 142      | 34,48 <sup>lmn</sup> $\pm$ 0,67                          |
| 11 | Cul 37      | 140,05 <sup>hi</sup> $\pm$ 5,86                          | 36 | Tcab 2      | 34,18 <sup>mn</sup> $\pm$ 0,40                           |
| 12 | Tcab 9      | 116,85 <sup>i</sup> $\pm$ 8,19                           | 37 | TS 124      | 32,29 <sup>mn</sup> $\pm$ 0,56                           |
| 13 | Cul 1       | 109,86 <sup>j</sup> $\pm$ 1,64                           | 38 | Cul 53      | 32,65 <sup>mn</sup> $\pm$ 0,90                           |
| 14 | Tcab 9      | 68,87 <sup>jk</sup> $\pm$ 1,34                           | 39 | TS 74       | 32,16 <sup>mn</sup> $\pm$ 0,89                           |
| 15 | CN 61       | 65,78 <sup>kl</sup> $\pm$ 0,60                           | 40 | CN 78       | 32,11 <sup>mn</sup> $\pm$ 0,72                           |
| 16 | Tcol 17     | 59,61 <sup>kl</sup> $\pm$ 0,47                           | 41 | Tcol 56     | 31,95 <sup>mn</sup> $\pm$ 0,35                           |
| 17 | CN 69       | 58,73 <sup>klm</sup> $\pm$ 1,55                          | 42 | TS 81       | 30,94 <sup>mn</sup> $\pm$ 0,29                           |
| 18 | TS 147      | 54,91 <sup>klmn</sup> $\pm$ 0,83                         | 43 | TS 149      | 30,87 <sup>mn</sup> $\pm$ 0,31                           |
| 19 | CN 43       | 54,14 <sup>klmn</sup> $\pm$ 0,87                         | 44 | Tcol 53     | 30,87 <sup>mn</sup> $\pm$ 0,87                           |
| 20 | Cul 50      | 50,27 <sup>klmn</sup> $\pm$ 0,68                         | 45 | Tcol 62     | 30,67 <sup>mn</sup> $\pm$ 0,33                           |
| 21 | CN 85       | 48,78 <sup>klmn</sup> $\pm$ 0,49                         | 46 | Cul 9       | 30,38 <sup>mn</sup> $\pm$ 1,05                           |
| 22 | CN 59       | 46,50 <sup>klmn</sup> $\pm$ 0,65                         | 47 | CN 12       | 29,75 <sup>mn</sup> $\pm$ 0,97                           |
| 23 | TS 104      | 44,64 <sup>klmn</sup> $\pm$ 1,57                         | 48 | TS 119      | 29,70 <sup>n</sup> $\pm$ 0,92                            |
| 24 | TS 110      | 43,85 <sup>klmn</sup> $\pm$ 0,66                         | 49 | Tcol 72     | 29,03 <sup>n</sup> $\pm$ 0,55                            |
| 25 | CN66        | 43,35 <sup>klmn</sup> $\pm$ 0,86                         | 50 | Cul 16      | 28,89 <sup>n</sup> $\pm$ 1,66                            |

Letras diferentes indican diferencias significativas según Prueba de Tukey HSD ( $P \leq 0,05$ ).

Las diferencias observadas pueden estar asociadas con factores genotípicos como la especie bacteriana en cuestión, el medio de cultivo empleado, el tiempo y condiciones de crecimiento y la concentración de L-triptófano utilizada, el cual es un precursor del AIA (Buensanteai *et al.*, 2013).

La obtención de aislados de *Bacillus* spp. productores de AIA en la presente investigación, sugiere un uso potencial de estos como agentes bioestimuladores del crecimiento en cultivos agrícolas, ornamentales y en trabajos de cultivo *in vitro* de plantas, ya que esta fitohormona estimula procesos biológicos importantes como la división, el alargamiento y la diferenciación celular (Ahemad y Kibret, 2014). En estudios realizados con una cepa de *Bacillus subtilis* productora de AIA, se estimuló el proceso de germinación y crecimiento de plántulas de trigo (*Triticum aestivum* L.) y fabas (*Vicia faba* L.), así como el peso fresco y seco de estos cultivos (Yousef, 2018).

De manera similar, el uso de otras RPCV del género *Bacillus* sp. productoras de AIA, incrementó la longitud, la masa y el rendimiento del tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.) (Mena-Violante y Olalde-Portugal, 2007); el número de raíces laterales y pelos absorbentes en *Triticum aestivum* L. (Fatima et al., 2009), el peso fresco y seco de la raíces y la parte aérea de la cebolla (*Allium cepa* L.) (Araujo et al., 2005) y el desarrollo radicular de la soya (*Glycine max* L.) (Reetha et al., 2014).

Por otra parte, el ácido indolacético puede actuar también como un mecanismo de biocontrol, relacionado con la inhibición de la germinación de esporas y el crecimiento del micelio en hongos fitopatógenos (Uneo, 2004).

Aunque existen numerosas evidencias de la función estimulante del crecimiento de los aislados productores de AIA, es necesario analizar el efecto de estas sustancias sobre procesos como la germinación, el crecimiento vegetativo y la reproducción de las plantas, ya que existen resultados contradictorios en dependencia de diferentes factores como la especie de microorganismos, las condiciones del medio de cultivo y la concentración de los reguladores del crecimiento. Vrbničanin et al. (2011) observaron una respuesta positiva en la germinación de *Ambrosia artemisiifolia* L. con el uso de *Bacillus pumilus*, mientras que la aplicación de *Bacillus licheniformis* inhibió este proceso en la misma especie.

### 4.3. Producción de ácidos orgánicos

La figuras 14 y 15 muestran el resultado de la producción de ácidos orgánicos por los aislados bacterianos. Los aislados obtenidos de la rizosfera de la variedad Cul evidenciaron la mayor capacidad de producir ácidos orgánicos, mientras que no se observaron aislados de la variedad Tomeguín 93 con la característica de acidificar el medio de cultivo (Figura 15).

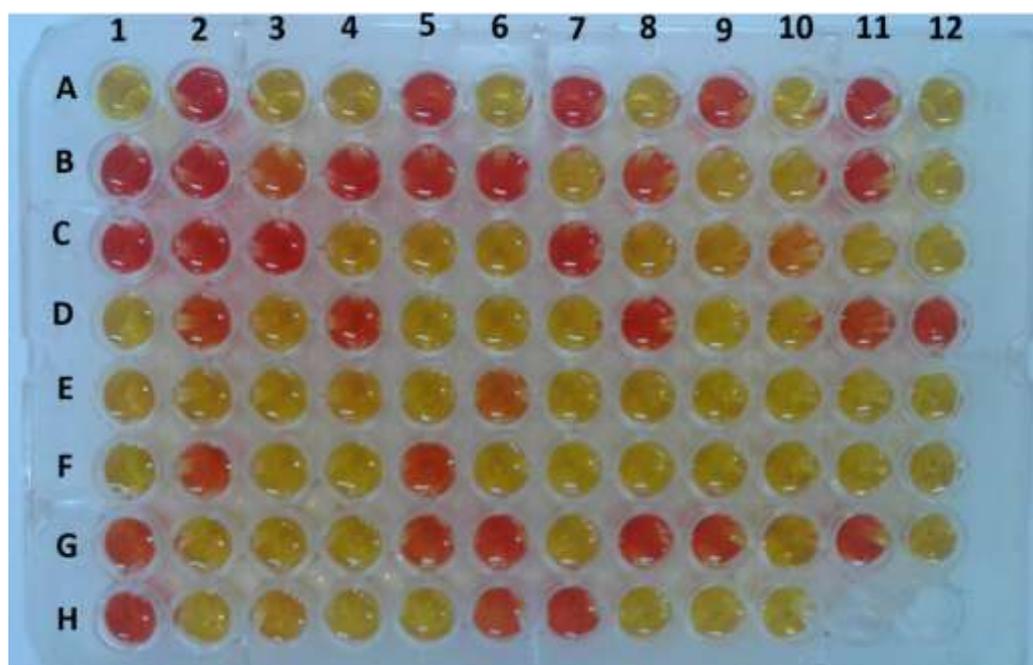


Figura 14. Producción de ácidos orgánicos por los aislados bacterianos. Los pocillos de color rojo representan las cepas seleccionadas como positivas a la producción de ácidos orgánicos con el uso del indicador rojo metilo. A1:Cul17, **A2:Cul62**, A3:Cul26, A4:Cul30, **A5:Cul7**, A6:Cul20, **A7:Cul31**, A8:Cul54, **A9:Cul3**, A10:Cul32, **A11:Cul22**, A12:Cul1, **B1:Cul6**, **B2:Cul35**, **B3:Cul53**, **B4:Cul21**, **B5:Cul9**, **B6:Cul36**, B7:Cul51, **B8:Cul50**, B9:Cul61, B10:Cul19, **B11:Cul37**, B12:Cul18, **C1:Cul33**, **C2:Cul16**, **C3:Cul63**, C4:Cul39, C5:CN49, C6:CN56, **C7:CN84**, C8:CN20, C9:CN52, **C10:CN93**, C11:CN71, C12:CN66, D1:CN69, **D2:CN92**, D3:CN72, **D4:CN64**, D5:79, D6:CN87, D7:CN12, **D8:CN78**, D9:CN19, D10:CN13, **D11:CN65**, **D12:CN59**, E1:CN73, E2:CN39, E3:CN61, E4:CN43, E5:CN7, **E6:Tcol39**, E7:Tcol58, E8:Tcol54, E9:Tcol34, E10:Tcol17, E11:Tcol69, E12:Tcol48, F1:Tcol72, **F2:Tcol53**, F3:Tcol63, F4:Tcol59, **F5:Tcol21**, F6:Tcol12, F7:Tcol64, F8:Tcol8, F9:Tcol4, F10:Tcol68, F11:Tcol62, F12:Tcol56, **G1:Tcol8**, G2:Tcol4, G3:Tcol57, G4:Tcol49, **G5:Tcol22**, **G6:Tcol40**, G7:Tcol10, **G8:Tcab1**, **G9:Tcab10**, **G10:Tcab8**, G11:Tcab18, G12:Tcab4, **H1:Tcab19**, H2:Tcab17, H3:Tcab15, H4:Tcab2, H5:Tcab6, **H6:Tcab9**, **H7:Tcab7**.

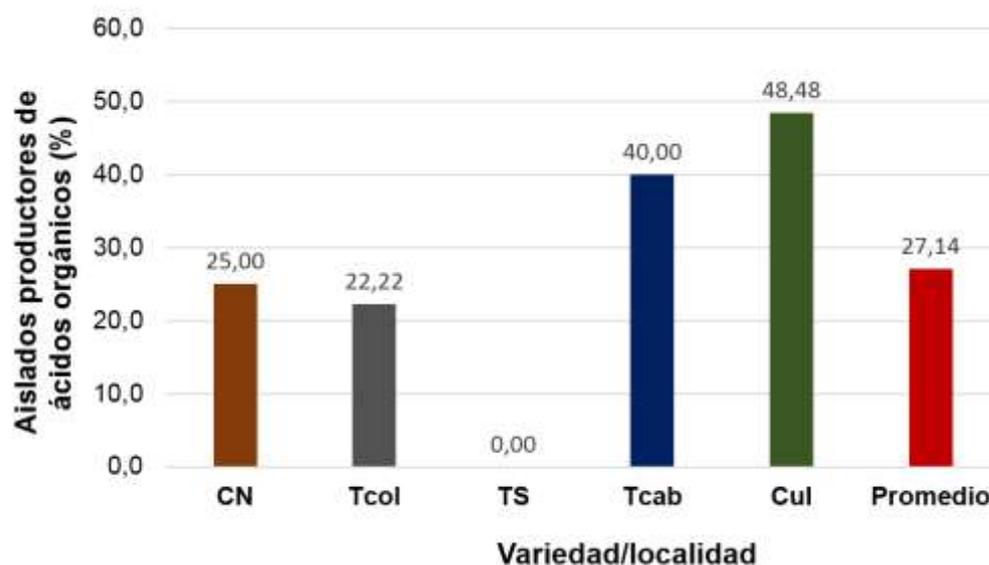


Figura 15. Producción de ácidos orgánicos por los aislados bacterianos analizados.

Este resultados coincide con los referidos por Gunes *et al.* (2015) y Shahzad *et al.* (2017), quienes observaron la producción de ácidos orgánicos por diferentes cepas de *Bacillus* sp. Entre los principales estuvieron los ácidos láctico, cítrico, malónico, málico, succínico, acético y propiónico, etc. Otros autores también observaron la producción de ácidos orgánicos por aislados rizosféricos de *Bacillus* spp. (Bharucha *et al.*, 2013). Los ácidos orgánicos como el cítrico, el fórmico y el oxálico, constituyen elementos relacionados con vías metabólicas de las plantas y potencian el crecimiento vegetal (Rayavarapu y Padmavathi, 2016).

Este resultado es importante ya que las RPCV pueden secretar diferentes tipos de ácidos orgánicos que actúan como agentes quelantes de los cationes calcio y otros metales como el hierro y el aluminio. De esta forma se libera el fósforo insoluble, lo que aumenta la disponibilidad de este elemento para los microorganismos y las plantas (Kaur *et al.*, 2016). Por otra parte, en estudios realizados con tres cepas de *Bacillus* spp. se observó la secreción de cantidades notables de ácido gálico al medio de cultivo, el cual fue relacionado con la capacidad antagónica de estas bacterias frente a los hongos fitopatógenos *Alternaria* spp., *Fusarium* spp. y *Bipolaris* spp. (Singh *et al.*, 2017). Estudios similares con diferentes ácidos orgánicos producidos por *Bacillus*

*amyloliquefaciens* RWL-1 tuvieron un efecto antagónico frente a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Shahzad *et al.*, 2017).

#### 4.4. Capacidad de solubilización de fosfatos

La capacidad de solubilizar fosfatos constituye uno de los criterios más importantes para discriminar entre las cepas bacterias con potencialidades como biofertilizantes. La Figura 16 muestra el porcentaje de aislados solubilizadores de fosfatos por variedad/localidad. Los mayores valores se obtuvieron en la variedad Tomeguín 93 de Sabanilla (28 %) y Cuba Cueto Negro de Colón (25 %). El porcentaje general entre los diferentes aislados fue de 16,03 %.

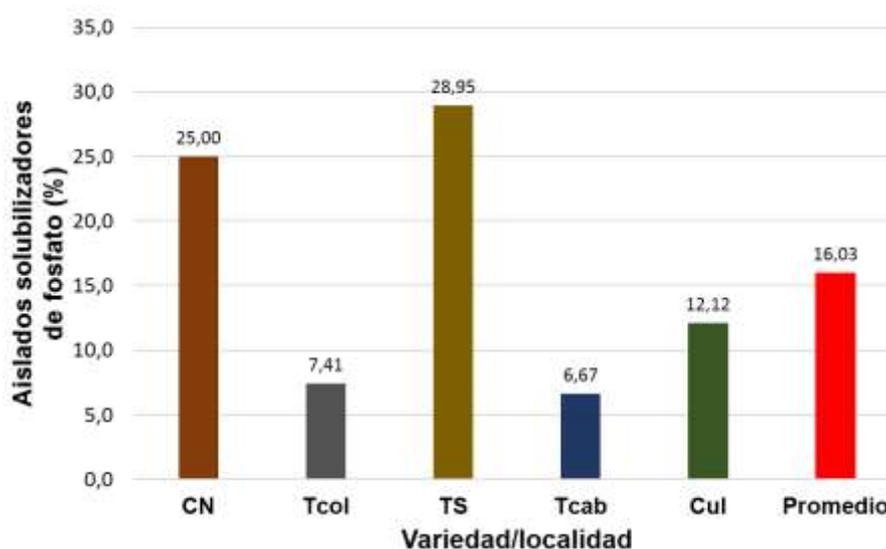


Figura 16. Porcentaje de aislados bacterianos con capacidad de solubilizar fosfato tricálcico por variedad/localidad.

Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Karuppiah y Rajaram (2011) en aislamientos rizosféricos realizados en distintas regiones cultivadoras de arroz (*Oryza sativa* L.). En estos trabajos se obtuvieron un total de 63 aislados de *Bacillus* spp., de los cuales el 12,7 % exhibieron propiedades promotoras del crecimiento al tener la capacidad de producir AIA y solubilizar fosfato.

El cálculo del índice de potencia entre los distintos aislados permitió identificar aquellos con mejores características como biofertilizantes (Tabla 8, Figura 17). Los valores más elevados correspondientes a los aislados TS10 (236,11 %), CN84 (185,40 %), TCab6 (183,44 %) y Cul57 (155,76 %).

Tabla 8. Aislados bacterianos que mostraron capacidad para solubilizar el fosfato tricálcico.

| Cepa   | Actividad (IP%) ± EE           | Cepa   | Actividad (IP%) ± EE           |
|--------|--------------------------------|--------|--------------------------------|
| TS10   | 236,11 <sup>a</sup> ± 21,69    | TS114  | 71,21 <sup>defghi</sup> ± 6,12 |
| CN84   | 185,40 <sup>b</sup> ± 31,73    | Cul54  | 69,49 <sup>defghi</sup> ± 2,99 |
| TCab6  | 183,44 <sup>b</sup> ± 29,79    | CN65   | 55,46 <sup>efghi</sup> ± 10,34 |
| Cul57  | 155,76 <sup>bc</sup> ± 22,42   | CN85   | 49,14 <sup>efghi</sup> ± 4,37  |
| CN13   | 129,07 <sup>cd</sup> ± 19,23   | TS148  | 42,59 <sup>fghi</sup> ± 14,40  |
| TS84   | 121,00 <sup>cd</sup> ± 6,17    | TS96   | 40,48 <sup>fghi</sup> ± 9,52   |
| CN95   | 111,11 <sup>cde</sup> ± 11,11  | Cul51  | 36,06 <sup>ghi</sup> ± 2,36    |
| TS112  | 103,57 <sup>cdef</sup> ± 9,25  | CN64   | 25,76 <sup>hi</sup> ± 2,98     |
| CN69   | 97,98 <sup>defg</sup> ± 14,64  | TCol39 | 24,44 <sup>hi</sup> ± 8,88     |
| TCol40 | 86,90 <sup>defgh</sup> ± 7,24  | TS15   | 22,41 <sup>hi</sup> ± 1,44     |
| TS34   | 76,59 <sup>defghi</sup> ± 3,52 | TS13   | 13,33 <sup>i</sup> ± 6,66      |
| Cul18  | 73,29 <sup>defghi</sup> ± 6,34 | TS48   | 12,00 <sup>i</sup> ± 1,12      |

Letras diferentes indican diferencias según Prueba de Student Newman Keuls (P≤0,05).

IP: índice de potencia, EE: error estándar.

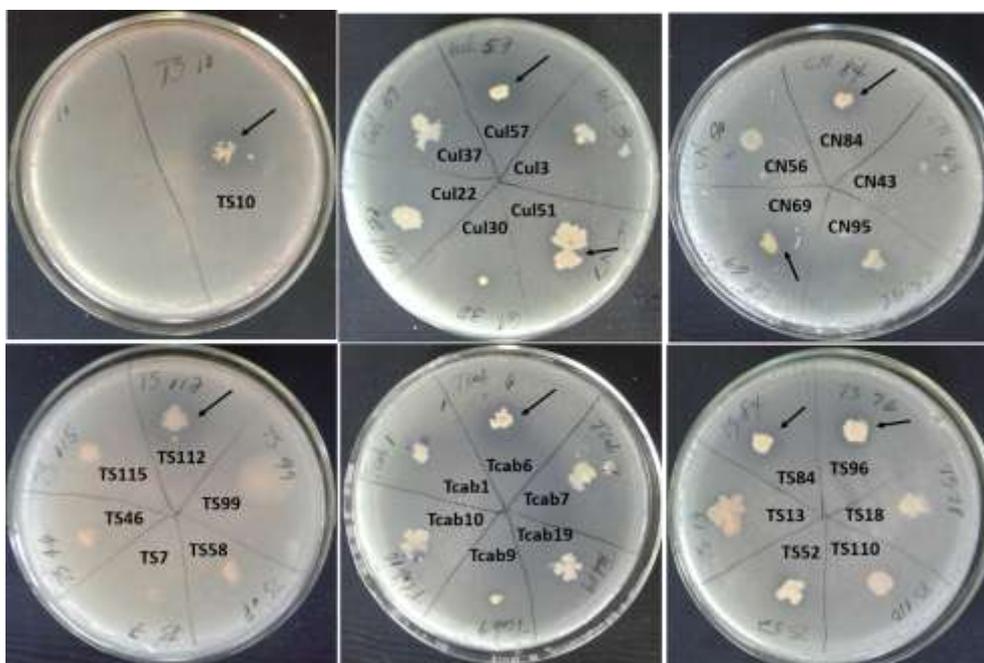


Figura 17. Aislados solubilizadores de fosfato. Las flechas señalan los halos claros alrededor de las colonias que indican la actividad solubilizadora de fosfato.

Estos resultados concuerdan con los observados por Thakur y Parikh (2018) quienes obtuvieron dos aislados rizosféricos con eficiencias elevadas: GH1 (289,26 %) y GSB 13 (243,36 %). El género *Bacillus* se encuentra dentro de los que pueden solubilizar eficientemente los complejos de fósforo no disponibles, en iones fosfatos disponibles para las plantas (Goldstein, 2001, Dar *et al.*, 2018).

Estos resultados pueden estar asociados con la capacidad de las cepas de producir ácidos orgánicos al medio de cultivo, los cuales disminuyen el pH y solubilizan el fósforo que se encuentra de forma no disponible. Al comparar los aislados que tienen la capacidad de solubilizar fosfato y producir ácidos orgánicos simultáneamente, se pudo observar una coincidencia del 17 % aproximadamente (Tcol39, Tcol40, CN64 y CN65). Esto puede estar relacionado con el medio de cultivo utilizado en ambas pruebas. Es posible que en el medio Pikovskaya empleado para determinar la capacidad solubilizadora de fosfatos, la presencia de fosfato tricálcico insoluble y un mayor tiempo de cultivo (siete días), pudieron inducir la síntesis de ácidos orgánicos en las bacterias y en consecuencia, la solubilización del fosfato tricálcico, como un mecanismo selectivo para incorporar este elemento esencial a las células microbianas. Además, la solubilización puede estar relacionada con la secreción de otras sustancias quelatadoras de cationes e iones hidroxilos, que participan también en la solubilización del fosfato insoluble (Sharma *et al.*, 2013).

Los aislados observados con una actividad solubilizadora de fosfatos elevada, pueden constituir agentes potenciales para incrementar el crecimiento, el desarrollo y la productividad de los cultivos. En trabajos realizados con aislados de *Bacillus* spp. solubilizadores de fosfatos, se obtuvo un aumento de los rendimientos en cultivos diferentes como *Fragaria* sp. (Pırlak y Köse, 2009), *Pelargonium graveolens* L. Hérit (Kumar *et al.*, 2010). La aplicación de inóculos de *Bacillus* spp. solubilizadores de fosfatos también incrementaron el contenido de clorofilas en *Raphanus sativus* L. (Mohamed y Gomaa, 2012), *Solanum tuberosum* L. (Dawwam *et al.*, 2013) y *Brassica juncea* L. (Kang *et al.*, 2014), así como la eficiencia fotosintética en *Capsicum chinense*, debido al aumento en la velocidad de transporte electrónico a nivel de membranas tilacoidales y el intercambio gaseoso (Samaniego-Gámez *et al.*, 2016).

El hecho de obtener aislados con diferentes propiedades biológicas, sugiere la posibilidad de utilizar los mejores aislados productores de AIA y solubilizadores de fosfatos, para realizar consorcios con el objetivo de potenciar el crecimiento de las plantas. El estudio de varios consorcios donde participan cepas de especies diferentes de *Bacillus* o combinaciones con otros géneros, demuestran la efectividad de los mismos para incrementar el crecimiento y el desarrollo de los cultivos (Monenech, 2006; Ordookhani, 2010).

El análisis conjunto entre los diferentes aislados para determinar aquellos con buenas propiedades como productores de AIA y solubilizadores de fosfatos, mostró que entre los 20 mejores aislados para cada indicador, no hubo coincidencias. Por esta razón, es importante considerar la posibilidad de realizar consorcios entre los aislados promisorios para potenciar el crecimiento y desarrollo de las plantas. El empleo de consorcios entre cepas o especies distintas con características diferentes como BPCV, indican resultados favorables para incrementar el crecimiento de los cultivos (Monenech, 2006; Ordookhani, 2010).

#### **4.5. Actividad celulolítica**

La Figura 18 y la Tabla 9 muestran los resultados de la actividad celulolítica de los aislados bacterianos. El mayor porcentaje de aislados de *Bacillus* spp. productores de celulasa se observó en aquellos obtenidos a partir de la rizosfera de la variedad Cul156 (54,55 %), mientras que el valor más bajo se obtuvo en la variedad Cuba Cueto 259 - negro T- 1567 (17,86 %).

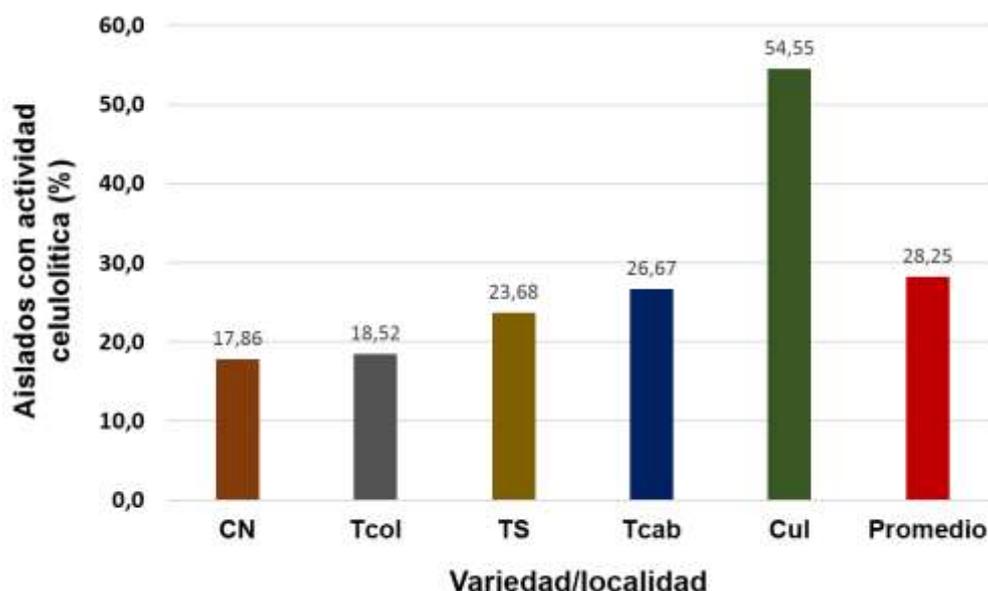


Figura 18. Porcentaje de aislados bacterianos con actividad celulolítica por variedad/localidad.

Los cinco aislados con mayores índices de potencia correspondieron a Tcab10 (255,76), Tcol36 (225,28), Tcab19 (219,84), Cul36 (216,67) y Cul62 (213,33), entre los cuales no se observaron diferencias significativas (Tabla 9, Figura 19).

Tabla 9. Resultados de la actividad celulolítica de los aislados bacterianos.

|    | Cepa    | Actividad (IP %) ± EE          |    | Cepa    | Actividad (IP %) ± EE        |
|----|---------|--------------------------------|----|---------|------------------------------|
| 1  | Tcab 10 | 255,76 <sup>a</sup> ± 12,24    | 21 | CN 69   | 77,84 <sup>hij</sup> ± 1,83  |
| 2  | Tcol 36 | 225,28 <sup>ab</sup> ± 14,43   | 22 | Cul 3   | 58,96 <sup>hij</sup> ± 16,66 |
| 3  | Tcab 19 | 219,84 <sup>abc</sup> ± 16,96  | 23 | Tcol 30 | 69,19 <sup>hij</sup> ± 5,70  |
| 4  | Cul 36  | 216,67 <sup>abc</sup> ± 1,51   | 24 | Cul 3   | 58,96 <sup>ij</sup> ± 3,33   |
| 5  | Cul 62  | 213,33 <sup>abc</sup> ± 11,61  | 25 | TS 84   | 57,94 <sup>ij</sup> ± 23,37  |
| 6  | Cul 33  | 208,33 <sup>abcd</sup> ± 13,01 | 26 | Cul 40  | 53,33 <sup>ij</sup> ± 6,66   |
| 7  | TS 112  | 201,67 <sup>abcde</sup> ± 2,57 | 27 | TS 33   | 48,48 <sup>ij</sup> ± 10,79  |
| 8  | Cul 7   | 197,44 <sup>bcdef</sup> ± 4,07 | 28 | Cul 30  | 47,31 <sup>ij</sup> ± 11,17  |
| 9  | CN 78   | 193,33 <sup>cdef</sup> ± 4,06  | 29 | TS 13   | 37,40 <sup>j</sup> ± 13,67   |
| 10 | Tcol 69 | 163,76 <sup>cdef</sup> ± 12,27 | 30 | Tcol 40 | 35,71 <sup>j</sup> ± 4,55    |
| 11 | Cul 35  | 155,33 <sup>defg</sup> ± 2,00  | 31 | TS 83   | 35,58 <sup>j</sup> ± 7,14    |
| 12 | Cul 53  | 153,33 <sup>defg</sup> ± 6,80  | 32 | TS 114  | 33,13 <sup>j</sup> ± 24,15   |

|    |         |                               |    |        |                            |
|----|---------|-------------------------------|----|--------|----------------------------|
| 13 | CN 59   | 152,58 <sup>defg</sup> ± 9,56 | 33 | Cul 17 | 31,72 <sup>j</sup> ± 1,82  |
| 14 | Tcol 39 | 148,52 <sup>efg</sup> ± 16,89 | 34 | Tcab 6 | 31,21 <sup>j</sup> ± 20,77 |
| 15 | Cul 31  | 147,22 <sup>efg</sup> ± 11,00 | 35 | Cul 59 | 27,17 <sup>j</sup> ± 22,42 |
| 16 | Tcab 1  | 144,25 <sup>efg</sup> ± 24,00 | 36 | Cul 18 | 23,10 <sup>j</sup> ± 3,15  |
| 17 | Cul 16  | 120,59 <sup>fgh</sup> ± 4,41  | 37 | Cul 51 | 17,32 <sup>j</sup> ± 19,18 |
| 18 | CN 65   | 106,94 <sup>fghi</sup> ± 8,63 | 38 | TS 34  | 14,63 <sup>j</sup> ± 12,40 |
| 19 | Cul 1   | 104,17 <sup>fghi</sup> ± 2,77 | 39 | TS 95  | 14,07 <sup>j</sup> ± 4,41  |
| 20 | CN 64   | 99,33 <sup>fghi</sup> ± 5,30  |    |        |                            |

Letras diferentes indican diferencias según Prueba de Student Newman Keuls ( $P \leq 0,05$ ).

IP: índice de potencia, EE: error estándar.



Figura 19. Actividad celulítica de los aislados bacterianos. A: aislados de la variedad Cul156, B: aislados de la variedad Tomeguín 93 de Sabanilla y C: aislados de la variedad Cuba Cueto Negro.

Estos resultados coinciden con otros autores que refieren que el género *Bacillus* es productor de enzimas celulasas, de uso en diferentes procesos industriales (Sadhu y Maiti, 2013; Reetha *et al.*, 2014; Ladeira *et al.*, 2015; Menendez *et al.*, 2015).

Los aislados que manifestaron actividad celulolítica constituyen agentes con potencialidades para el desarrollo de distintas industrias y procesos tecnológicos, como la obtención de bioetanol (Lynd *et al.*, 2008), detergentes (Adrio y Demain, 2014), la producción de pulpa y papel y en la industria de alimentos para la clarificación de vinos y elaboración de jugos (Singh *et al.*, 2015). También se utilizan en la producción de alimentos para el consumo

animal, principalmente en conjunto con hemicelulasas y pectinasas (Menendez *et al.*, 2015).

Las celulasas se pueden utilizar además para la obtención de quitosana, la cual se emplea con distintos fines en la medicina como por ejemplo, para la fabricación de hilos quirúrgicas, la reconstrucción de huesos, la producción de pieles artificiales, anticoagulantes y como agentes anticancerígenos y antidiabéticos (Rinaudo, M. 2006; Pillai *et al.*, 2009). Sin embargo, es necesario realizar otros ensayos bioquímicos para determinar algunos parámetros importantes relacionados con las propiedades enzimáticas y estabilidad al pH y a la temperatura (Rinaudo *et al.*, 2006; Ladeira *et al.*, 2015).

#### **4.6. Actividad amilolítica**

Los aislados obtenidos de la rizosfera de las variedades Cul y Tcab mostraron los mayores porcentajes de actividad amilolítica, con 51,52 y 46,67 %, respectivamente. El porcentaje de aislados con menor actividad amilolítica se correspondió a las cepas obtenidas de la variedad Tomeguín 93 de Sabanilla (Figura 20).

Los aislados con las mayores producciones de enzimas amilasas correspondieron a los obtenidos de la variedad Cul (Cul30, Cul54, Cul63, Cul62, Cul6 y Cul16). Otras cepas que mostraron una actividad amilolítica elevada fueron CN59, Tcab10 y Tcab19 (Tabla 10). En el caso de los aislados TCab6, Cul17, Cul18, Cul51, TS47, TS48, TS13 y TS33, no fue posible determinar si producen amilasas ya que secretan una sustancia cerosa hidrofóbica, que cubre todo el medio de cultivo en la placa Petri y evita la tinción del medio (Figura 21).

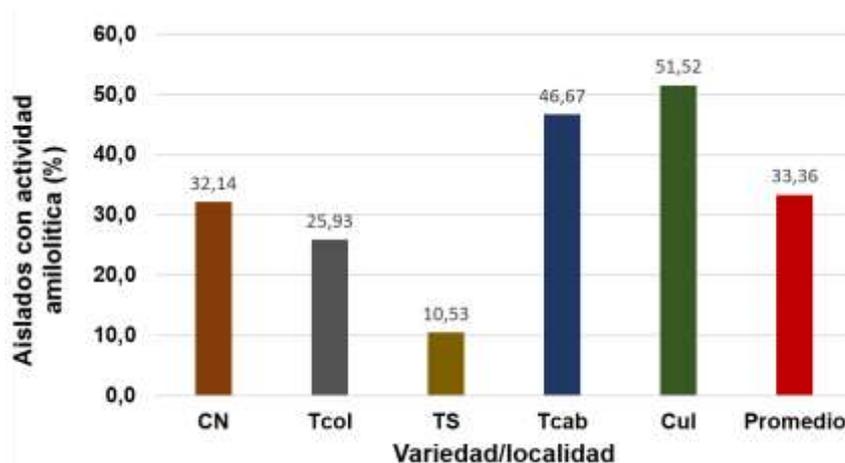


Figura 20. Porcentaje de aislados bacterianos con actividad amilolítica por variedad/localidad.

Tabla 10. Aislados bacterianos que mostraron actividad amilolítica.

| Cepa   | Actividad | Cepa   | Actividad | Cepa  | Actividad |
|--------|-----------|--------|-----------|-------|-----------|
| CN59   | +++       | Cul2   | ++        | Cul37 | +         |
| TCab10 | +++       | TCab20 | ++        | Cul19 | +         |
| TCab19 | +++       | Cul33  | +         | Cul39 | +         |
| Cul30  | +++       | TCab17 | +         | Cul53 | +         |
| Cul54  | +++       | TCab1  | +         | TS74  | +         |
| Cul63  | +++       | Tcol22 | +         | TS104 | +         |
| Cul62  | +++       | Tcol69 | +         | TS115 | +         |
| Cul6   | +++       | Tcol6  | +         | TS7   | +         |
| Cul16  | +++       | Tcol51 | +         | TCab6 | NI        |
| CN64   | ++        | Tcol53 | +         | Cul17 | NI        |
| CN69   | ++        | Tcol54 | +         | Cul18 | NI        |
| CN92   | ++        | Tcol21 | +         | Cul51 | NI        |
| CN13   | ++        | CN93   | +         | TS47  | NI        |
| CN78   | ++        | CN95   | +         | TS48  | NI        |
| TCab18 | ++        | CN61   | +         | TS13  | NI        |
| Cul59  | ++        | TCab23 | +         | TS33  | NI        |
| Cul61  | ++        | Cul35  | +         |       |           |
| Cul1   | ++        | Cul36  | +         |       |           |

Actividad: +++ alta, ++ moderada, + baja. NI: no identificado.

La presencia de actividad amilasa en aislados de *Bacillus* spp. concuerda con otros trabajos donde se utilizan especies de este género para la obtención de  $\alpha$ -amilasa con fines industriales (Souza y Magalhães, 2010; Benjamin *et al.*, 2013).

Los aislados amilolíticos identificados pueden constituir fuentes de estas enzimas amilasas con aplicaciones en la producción de bebidas y licores, para la licuefacción del mosto con el objetivo de reducir la viscosidad y mejorar la filtración de las cervezas (Hofemeister *et al.*, 1986), clarificar de jugos (Sivaramakrishnan *et al.*, 2006), potenciar la calidad de los detergentes (Tester y Karkalas, 2002), incrementar la suavidad y la fortaleza en la fabricación del papel (Mobini-Dehkordi y Javan, 2012), así como otras aplicaciones importantes como incrementar la calidad del alimento animal mediante el aumento de la digestibilidad (Marc *et al.*, 2002), para la detección analítica de oligosacáridos (Gupta *et al.*, 2003), para la producción de nanopartículas de oro (Kalishwaralal *et al.*, 2010) y en la biorremediación mediante la degradación de desechos que contienen almidón.

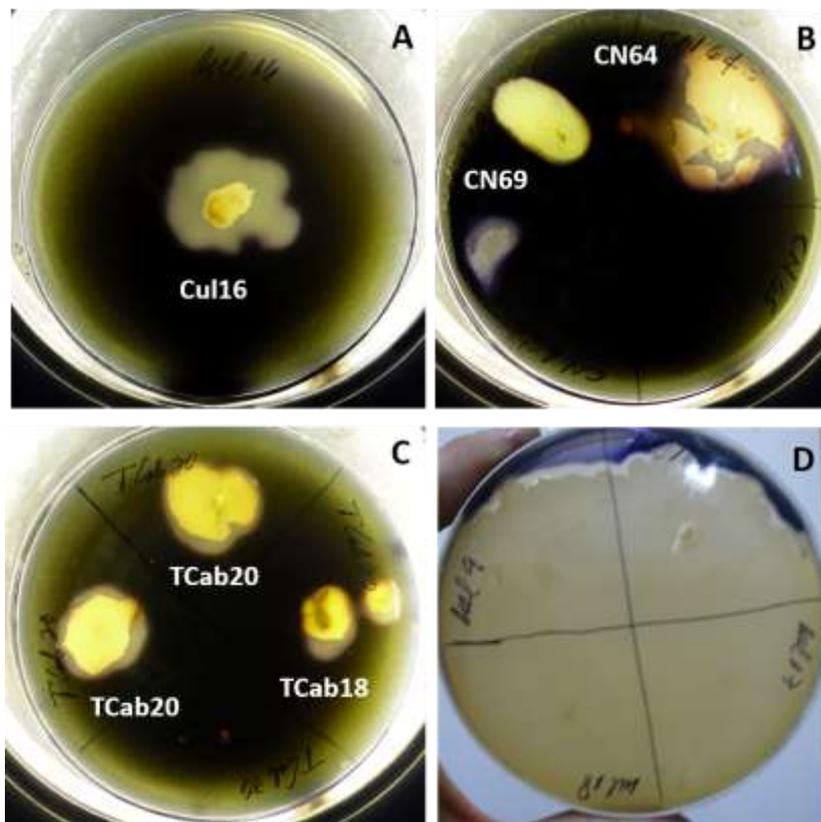


Figura 21. Actividad amilolítica de aislados bacterianos. La placa D muestra los aislados Cul17 y Cul18 que producen sustancias cerosas.

## V. CONCLUSIONES

- Se obtuvo una colección de *Bacillus* spp. proveniente de la rizosfera de *Phaseolus vulgaris* L., compuesta por 141 aislados Gram positivos esporulados con potencialidades para el desarrollo agropecuario e industrial.
- Se identificaron 9 aislados productores de concentraciones elevadas de ácido 3-indolacético superiores a  $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , entre los que están Tcol4, Cul3 y cul20.
- Nueve aislados mostraron capacidad para solubilizar fosfato tricálcico con índice de potencia superiores a 100 %, entre los que destacan TS10, CN84, TCab6 y Cul57.
- Se identificaron nueve aislados con actividad amilolítica elevada y siete celulolíticos con índices de potencia por encima de 200 %, los cuales son fuentes potenciales para la producción de amilasas y celulasas, respectivamente, con usos potenciales en diferentes procesos industriales.

## VI. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio de optimización de la producción de ácido indolacético con los aislados mejores productores de esta auxina.
- Determinar la capacidad de solubilización de fosfatos de los aislados con otras fuentes de fosfato insolubles.
- Profundizar en estudios de caracterización de las enzimas celulasas y amilasas producidas por los aislados (estabilidad al pH y a la temperatura).
- Evaluar el efecto de los mejores aislados productores de AIA y solubilizadores de fosfatos, en la germinación, crecimiento vegetativo y reproducción del frijol.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abhilash, P.C., Dubey, R.K., Tripathi, V., Gupta, V.K. and Singh, H.B. 2016. Plant growth-promoting microorganisms for environmental sustainability. *Trends Biotechnol.* 34 (11): 847-850. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.05.005>.
- Acharya, S. and Chaudhary, A. 2012. Bioprospecting thermophiles for cellulase production: a review. *Brazilian Journal of Microbiology.* 43 (3): 844-856.
- Adrio, J.L. and Demain, A.L. 2014. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules* 4: 117–139
- Ahemad, M. 2015. Enhancing phytoremediation of chromium-stressed soils through plant-growth-promoting bacteria. *J Genet Eng Biotechnol.* 13 (1): 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2015.02.001>
- Ahemad, M. and Kibret, M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *J. King Saud Univ. Sci.* 26 (1): 1-20.
- Anand, K., Kumari, B. and Mallick, M.A. 2016. Phosphate solubilizing microbes: an effective and alternative approach as bio-fertilizers. *Int. J. Pharm. Sci.* 8 (2): 37–40.
- Annamalaia, N., Rajeswarib, M. V., Elayarajab, S. and Balasubramanian, T. 2013. Thermostable, haloalkaline cellulase from *Bacillus halodurans* CAS 1 by conversion of lignocellulosic wastes. *Carbohydr. Polym.* 94. 409. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.066>
- Apáez-Barrios, P., Escalante, J.A. y Rodríguez, M.T. 2013. Producción de vaina verde en frijol chino y tipo de espaldera en clima cálido. *Revista Chapingo Serie Horticultura.* 19 (1): 129-140.
- Araujo, F., Henning, A. and Hungria, M. 2005. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. *World J. Microbiol Biotechnol.* 21: 1639-1645.
- Arikan, Ş., İpek, M. and Pirlak, L. 2013. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and fruit quality of quince. *International Conference on Agriculture and Biotechnology.* 60 (19): 97-100. DOI: 10.7763/IPCBE.
- Bashan, Y., de-Bashan, L.E., Prabhu, S.R. and Hernandez, J.P. 2014. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant Soil* 378 (1-2): 1-33. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>.
- Basu, S., Rabara, R. and Negi, S. 2017. Towards a better greener future - An alternative strategy using biofertilizers. I: Plant growth promoting bacteria. *Plant Gene.* 12: 43-49. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2017.07.004>.
- Benjamin, S., Smitha, R.B., Jisha, V.N., Pradeep, S., Sajith, S., Sreedevi, S., Priji, P., Unni, K.N., Sarath- Josh, M.K. 2013. A monograph on amylases

- from *Bacillus* spp. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 4: 227-241. <http://dx.doi.org/10.4236/abb.2013.42032>.
- Beškosi, V.P., Gojgić-Cvijović, G., Milić, J., Ilić, M., Miletić, S., Šolević, T. and Vrić, M.M. 2011. Ex situ bioremediation of a soil contaminated by mazut (heavy residual fuel oil) - A field experiment. *Chemosphere*. 83 (1): 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.01.020>
- Bhardwaj, D., Ansari, M.W., Sahoo, R.K. and Tuteja, N. 2014. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial Cell Factories*. 13 (66): 1-10.
- Bhargavi, V.G.R. and Tallapragada, P. 2016. *Bacillus* sp. as potential plant growth promoting rhizobacteria. *International Journal of Advanced Life Sciences*. 9 (1): 29-36.
- Bharucha, U.D., Patel, K.C. and Trivedi, U.B. 2013. In vitro screening of isolates for its plant growth promoting activities from the rhizosphere of Alfalfa (*Medicago sativa*)'. *J. Microbiol. Biotech. Res*. 3: 79 – 88.
- Brodeur, J., Abram, P.K., Heimpel, G.E., Messing, R.H. 2017. Trends in biological control: Public interest, international networking and research direction. *BioControl*. 16pp. DOI 10.1007/s10526-017-9850-8.
- Broughton, W.J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P. and Vanderleyden, J. 2003. Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. *Plant and Soil*. 252:55-128.
- 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.
- 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.
- Celis, L. y Gallardo, I. 2008. Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético y giberelinas) en cultivos microbianos. Tesis de Microbiólogo Agrícola y Veterinario. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- CEPAL, 2014. Evaluación del sector agropecuario en Centroamérica y República Dominicana, 1990-2014. Comisión Económica para América Latina y el Caribe, (LC/MEX/L.1175). México. DF.
- Chinakwe, E.C., Ibekwe, V.I., Nwogwugwu, U.N., Ofoegbu, J., Mike-Anosike, E., Nwachukwu, I.N., Adeleye, S. and Chinakwe, P.O. 2019. Evaluation of plant growth promoting potentials exhibited by rhizobacteria associated with beans plant. *Malaysian Journal of Sustainable Agriculture (MJSA)*. 3 (1): 20-22.
- Choudhury, P., Jawed, A. and Saha, P. 2017. Optimization of phytostimulatory potential in *Bacillus toyonensis* isolated from tea plant rhizosphere soil

- of Nilgiri Hills, India." *International Journal of Engineering Science Invention (IJESI)*. 6 (11): 13-18.
- Dar, G.H., Sofi, S., Padder, S.A., Aisha-Kabli, 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.
- Dawwam, G.E., Elbeltagy, A., Emara, H.M., Abbas, I.H. and Hassan, M.M. 2013. Beneficial effect of plant growth promoting bacteria isolated from the roots of potato plant. *Annals of Agricultural Sciences, Cairo*. 58: 195-201. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aosas.2013.07.007>.
- de Freitas, J.R., Banerjee, M.R. and Germida, J.J., 1997. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biology and Fertility of Soils*. 24: 358-364.
- de la Fé, C.F., Lamz, A., Cárdenas, R.M. y Hernández, J. 2016. Respuesta agronómica de cultivares de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) de reciente introducción en Cuba. *Cultivos Tropicales*. 37 (2): 102-107.
- Denef, K., Roobroeck, D., Wadu, M., Lootens, P. and Boeckx P. 2009. Microbial community composition and rhizodeposit-carbon assimilation in differently managed temperate grassland soils. *Soil Biology & Biochemistry*. 41: 144-153.
- Denton, M.D., Pearce, D.J., Ballard, R.A., Hannah, M.C., Mutch, L.A., Norng, S., Slattery, J.F. 2009. A multi-site field evaluation of granular inoculants for legume nodulation. *Soil Biology and Biochemistry*. 41: 2508-2516.
- Dhillona, G.S., Kaura, S., Brara, S.K. and Vermac, M. 2012. Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and hemicellulase bioproduction through solid-state fermentation. *Ind. Crop. Prod.* 38 6. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.12.036>
- Ekinci, M., Turan, M., Yildirim, E., Güneú, A., Kotan, R. and Dursun, A. 2014. Effect of plant growth promoting rhizobacteria on growth, nutrient, organic acid, amino acid and hormone content of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) transplants. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*. 13 (6): 71-85.
- Fatima, Z., Saleemi, M., Zia, M., Sultan, T., Aslam, M., Riaz-ur-Rehman, and Chaudhary, M.F. 2009. Antifungal activity of plant growth-promoting rhizobacteria isolates against *Rhizoctonia solani* in wheat. *Afr J Biotechnol*. 8: 219-225.
- García, A. 2003. Sustitución de importaciones de alimentos en Cuba: necesidad vs. posibilidad. Dallas, Texas, EE. UU. LASA. p 45.
- Garcia-Fraile, P., Menendez, E. and Rivas, R. 2015. Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. *AIMS Bioeng* 2 (3): 183-205. <https://doi.org/10.3934/bioeng.2015.3.183>.
- Glick, B.R. 2015. Beneficial plant-bacterial interactions. Springer Int Publ, Cham, Switzerland. pp: 1-28. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-13921-0>.

- Goldstein, A.H. Bioprocessing of Rock Phosphate Ore: Essential Technical Considerations for the Development of a Successful Commercial Technology. New Orleans, USA: IFA technical conference. 2001.
- Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Varshney, R.K., Gowda, C.L.L. and Krishnamurthy, L. 2014. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech.* 5 (4): 355-377.
- Gouda, S., Kerry, R.G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H.S. and Patra, J.K. 2018. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research.* 206: 131–140. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.016>. Consulta: mayo, 2019.
- Grobelak, A., Napora, A. and Kacprzak, M. 2015. Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth. *Ecological Engineering.* 84: 22-28.
- Gunes, A., Karagoz, K., Turan, M., Kotan, R., Yildirim, E., Cakmakci, R. and Sahin, F. 2015. Fertilizer efficiency of some plant growth promoting rhizobacteria for plant growth. *Research Journal of Soil Biology.* 7 (2): 28-45.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K. and Chauhan, B. 2003. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochem.* 38: 1599 - 1616.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S. and Rai, V. 2013. A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries, medicine and beyond. *Biomed. Res. Int.*, 1-18. doi:10.1155/2013/329121.
- Habibi, S., Djedidi, S., Prongjunthuek, K., Mortuza, M.F., Ohkama-Ohtsu, N., Sekimoto, H. and Yokoyama, T. 2014. Physiological and genetic characterization of rice nitrogen fixer PGPR isolated from rhizosphere soils of different crops. *Plant and Soil.* 379: 51-66.
- Hamdache, A., Lamarti, A., Aleu, J. and Collado, I. 2011. Non-peptide Metabolites from the genus *Bacillus*. *Journal of natural products.* 74: 893-899.
- Hassen, A.I., Bopape, F.L. and Sange, r L.K. 2016. Microbial inoculants as agents of growth promotion and abiotic stress tolerance in plants. In: *Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity*; Singh D Singh H, Prabha R (eds.). pp: 23-36. Springer, New Delhi. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5_2)
- Hauka, F.I.A., Moslam, T.M., Ghanem, Kh.M. and El-Shahat, M.M. 2016. Impact of some plant growth promoting rhizobacteria "pgpr" on organically cultivated spinach plants (*Spinacia oleracea* L.). *J. Agric. Chem. and Biotechn., Mansoura Univ.* 7 (9): 235 – 240.
- Hernández-Ochandía, D., Rodríguez, M.G. y Holgado, R. 2018. Nemátodos parásitos que afectan *Phaseolus vulgaris* L. en Latinoamérica y Cuba: especies, daños y tácticas evaluadas para su manejo. *Revista de Protección Vegetal.* 33 (3): 1-17.

- Hofemeister, J., Kurtz, A., Borriss, R. and Knowles, J. 1986. The beta-glucanase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* shows extensive homology with that of *Bacillus subtilis*. *Gene*. 49: 177-187.
- Jayakumar, P. and Tan, T. 2005. Phosphorus solubilization by ectomycorrhizal *Pisolithus tinctorius* in pure culture and in association with *Acacia mangium*. 39: 125-130.
- Jha, Y., Subrmanian, R.B. and Mishra, K.K. 2017. Role of plant growth promoting rhizobacteria in accumulation of heavy metal in metal contaminated soil. *Emer Life Sci Res*. 3 (1): 48-56.
- Kalishwaralal, K., Gopalram, S., Vaidyanathan, R., Deepak, V., Pandian, S.R.K. and Gurunathan, S. 2010. Optimization of  $\alpha$ -amylase production for the green synthesis of gold nanoparticles. *Colloid. Surf. B. Interf.* 77: 174-180. 10.1016/j.colsurfb.2010.01.018.
- Kang, S.M., Radhakrishnan, R., You, Y.H., Joo, G.J., Lee, I.J., Lee, K.E. and Kim, J.H. 2014. Phosphate solubilizing *Bacillus megaterium* mj1212 regulates endogenous plant carbohydrates and amino acids contents to promote mustard plant growth. *Indian Journal of Microbiology, India*. 54: 427-433. <http://dx.doi.org/10.1007/s12088-014-0476-6>
- Karnwal, A. 2011. Screening and optimization of extracellular amylase production from plant growth promoting rhizobacteria. *Annals Food Science and Technology*. 12 (2): 135-141.
- Karupiah, P. and Rajaram, S. 2011. Exploring the Potential of Chromium Reducing *Bacillus* sp. and there Plant Growth Promoting Activities. *Journal of Microbiology Research*: 1(1): 17-23. DOI: 10.5923/j.microbiology.20110101.04.
- Kaur, H., Kaur, J. and Gera, R. 2016. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Boon to Agriculture. *Int. J. Cell Sci. Biotechnol.* 5: 17-22.
- Kenneth, V.A. 2012. Evaluation of six fresh green bean varieties for pod quality and yield. Gladstone Road Agricultural Centre Crop *Research Report*. (9): 3-7.
- Keswani, C., Bisen, K., Singh, V., Sarma, B.K. and Singh, H.B. 2016. Formulation technology of biocontrol agents: Present status and future prospects. In: *Bioformulations: for sustainable agriculture*; Arora NK, Mehnaz S, Balestrini R (eds.). pp: 35-52. Springer, New Delhi. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2779-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2779-3_2).
- Kinsella, K., Schulthess, C.P., Morris, T.F., Stuart, J.D. 2009. Rapid quantification of *Bacillus subtilis* antibiotics in the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry*. 41: 374-379.
- Kloepper, J.W. and Schroth, M.N. 1978. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. Proceedings of the fourth International Conference on Plant Pathogenic Bacteria 2, pp. 879-892.
- Kokalis-Burelle, N., Kloepper, J. and Reddy, M. 2005. Plant growth-promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous rhizosphere microorganisms. *Applied Soil Ecology*. 31: 91-100.

- Kumar, R., Prakash, O., Alam, M. and Dikshit, A. 2010. Influence of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on the productivity of *Pelargonium graveolens* L. Herit. *Recent Research in Science and Technology*. 2(5): 53-57.
- Ladeira, S.A., Cruz, E. and Delatorre, A.B. 2015. Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and its detergent compatibility. *Electronic J Biotechnol*. 18: 110–115.
- Loper, J.E. and Schroth, M.N. 1986. Influence of bacterial sources of indole-2-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopath*. 76: 386-389.
- Loper, J.E. and Schroth, M.N. 1986. Influence of bacterial sources on indole-3-acetic acid on root elongation of sugarbeet. *Phytopathology*. 76: 386-389.
- López, Y. y Pouza, Y. 2014. Efecto de la aplicación del bioestimulante Fitomas-E en tres etapas de desarrollo del cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista DELOS Desarrollo Local Sostenible*. 7 (20): 1-10.
- Lugtenberg, B. and Kamilova, F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol*. 63 (1): 541-556.
- Lynd, L.R., Laser, M.S. and Bransby, D. 2008. How biotech can transform biofuels. *Nat Biotechnol*. 26: 169–172.
- Marc, J.E., van der Maarel, C., Joost, B.V., Uitdehaag, C.M., Leemhuis, H. and Dijkhuizen, L. 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *J. Biotechnology*. 94 (2): 137-155.
- Marks, B.B., Megías, M., Ollero, F.J., Nogueira, M.A., Araujo, R.S. and Hungria, M. 2015. Maize growth promotion by inoculation with *Azospirillum brasilense* and metabolites of *Rhizobium tropici* enriched on lipo-chitooligosaccharides (LCOs). *AMB Express*. 5 (1): 71. <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0154-z>.
- Mathivanan, S., Chidambaram, A.L.A., Sundaramoorthy, P., Baskaran, L. and Kalaikandhan, R. 2014. The Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) Seed Germination and Biochemical constituents. *International Journal of Current Research and Academic Review*. 2 (9): 187-194.
- Mena-Violante HG, Olalde-Portugal V. 2007. Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. *Scientia Horticult*. 113: 103-106.
- Menendez, E., Garcia-Fraile, P. and Rivas, R. 2015. Biotechnological applications of bacterial cellulases. *Bioengineering*. 2 (3): 163-182.
- Milić, J., Beškoski, V., Ilić, M., Ali, S., Gojgić-Cvijović, G. and Vrić, M. 2009. Bioremediation of soil heavily contaminated with crude oil and its products: Composition of the microbial consortium. *J Serbian Chem Soc*. 74 (4): 455-460. <https://doi.org/10.2298/JSC0904455M>
- Mishra, J. and Arora, N.K. 2016. Bioformulations for plant growth promotion and combating phytopathogens: A sustainable approach. In: Bioformulations: for sustainable agriculture; Arora NK, Mehnaz S, Balestrini R (eds.). pp: 3-33. Springer, New Delhi. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2779-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2779-3_1).

- Mobini-Dehkordi, M. and Javan, F.A. 2012. Application of alpha-amylase in biotechnology. *J. Biol. Today's World*. 1(1): 15-20.
- Mohamed, H.I. and Gomaa, E.Z. 2012. Effect of plant growth promoting *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* on growth and pigment composition of radish plants (*Raphanus sativus*) under NaCl stress. *Photosynthetica*, USA, v. 50, p. 263-272. <http://dx.doi.org/10.1007/s11099-012-0032-8>
- Monenech, J. 2006. Combined application of the biological product LS213 with *Bacillus*, *Pseudomonas* or *Chryseobacterium* for growth promotion and biological control of soil-borne diseases in pepper and tomato. *Bio Control*. 51 (2): 245-258. buscar los otros autores)
- Moreno, X.A., Lobelle, L. y González, J. 2018. Efecto de los bioestimulantes Biobras 16 y Quitomax sobre el cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Variedad Delicias-364' en la agricultura suburbana de Aguada de Pasajeros. *Revista científica Agroecosistemas*. 6 (2): 151-160.
- Mrkovački, N., Jarak, M., Ivica, D. and Jocković, Đ. 2012. Importance of PGPR application and its effect on microbial activity in maize rhizosphere. *Ratar i Povrt*. 49 (3): 335-344. <https://doi.org/10.5937/ratpov49-1915>.
- Mumtaz, M.Z., Ahmad, M., Jamil, M. and Hussain, T. 2017. Zinc solubilizing *Bacillus* spp. potential candidates for biofortification in maize. *Microbiol Res*. 202: 51-60. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.06.001>
- Oficina Nacional de Estadísticas e Información (ONEI). Anuario Estadístico de Cuba 2016. Capítulo 9: Agricultura, ganadería, silvicultura y pesca. Edición 2017. 32.pp
- Oficina Nacional de Estadísticas e Información (ONEI). Cuba. Sector Agropecuario- Indicadores Seleccionados. Enero - Septiembre de 2017. Edición Diciembre de 2017. 13 pp Disponible en: [http://www.one.cu/publicaciones/05agropecuario/ppalesindsectoragrop/ppales\\_indsep17.pdf](http://www.one.cu/publicaciones/05agropecuario/ppalesindsectoragrop/ppales_indsep17.pdf)
- Oliveira, T.F., Fernandes, R.H., Costa, R.L. and Lopes, E.A. 2015. Formulation of bionematicides based on bacteria for the control of the lesion nematode in common bean. *IDESIA (Chile)*. 33 (1): 147-150.
- Ongena, M. and Jacques, P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol*. 16: 115–25.
- Ordookhani, K. 2010. Influence of PGPR and AMF on antioxidant activity, lycopene and potassium contents in tomato. *African Journal of Agricultural Research*. 5 (10): 1108-1116. buscar los otros autores)
- Owen, D., Williams, A.P., Griffith, G.W. and Withers, P.J.A. 2015. Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorous acquisition. *Appl Soil Ecol*. 86: 41-54. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.09.012>
- Pahari, A., Pradhan, A., Maity, S. and Mishra, B.B. 2017. Carrier based formulation of plant growth promoting bacillus species and their effect on different crop plants. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 6 (5): 379-385.

- Patibanda, A.K. and Ranganathswamy, M. 2018. Effect of Agrichemicals on Biocontrol Agents of Plant Disease Control. In: Panpatte DG, Yogeshvari K, Shelat JHN., Vyas RV, Eds. Microorganisms for Green Revolution. Volume 2: Microbes for Sustainable Agroecosystem. *Springer*. p. 1-22.
- Pedraza, R.O. 2008. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 125: 25-35.
- Peña, K., Rodríguez, J.C. y Meléndrez, J.F. 2016. El VIUSID agro® una alternativa en el incremento de la producción de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Revista Caribeña de Ciencias Sociales*. Disponible en: <http://www.eumed.net/rev/caribe/2016/05/viusid.html> (Consultado el 15 de diciembre de 2016).
- Peña, K., Rodríguez, J.C., León, N. y Lugones, Y. 2017. Efecto de un promotor del crecimiento en el comportamiento productivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Avances en Investigación Agropecuaria*. 21 (1): 35-45.
- Pikovskaya, R.E. 1948. Mobilization of phosphorous in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*. 17: 362-370.
- Pillai, C.K.S., Paul, W. and Sharma, C.P. 2009. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Prog Polym Sci*. 34: 641–678.
- Pirlak, L. and Köse, M. 2009. Effects of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on yield and some fruit properties of strawberry. *Journal of Plant Nutrition*. 32 (7): 1173-1184. DOI: 10.1080/01904160902943197.
- Raaijmakers, J.M., Vlami, M., de Souza, J.T., 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. Antonie Van Leeuwenhoek. *International Journal of General and Molecular Microbiology*. 81: 537-547.
- Rayavarapu, V.G.B. and Padmavathi, T. 2016. *Bacillus* sp. as potential plant growth promoting rhizobacteria. *International Journal of Advanced Life Sciences (IJALS)*. 9 (1): 29-36.
- Reetha, S., Bhuvanewari, G., Thamizhiniyan, P. and Ravi-Mycin, T. 2014. Isolation of Indole acetic acid (IAA) producing rhizobacteria of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* and enhance growth of onion (*Allium cepa* L.). *Int Curr Microbiol App Sci*. 3 (2): 268-574.
- Reetha, S., Selvakumar, G., Bhuvanewari, G., Thamizhiniyan, P. and Ravimycin, T. 2014. Screening of cellulase and pectinase by using *Pseudomonas fluorescence* and *Bacillus subtilis*. *International Letters of Natural Sciences*. 8 (2): 75-80.
- Richardson, A., Barea, J.M., McNeill, A., Prigent-Combaret, C. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil*. 321: 305-339.
- Rinaudo, M. 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci*. 31: 603–632.
- 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.

- Rodrigues, C., Porto, L., de Oliveira, J. and Soccol, C.R. 2011. New perspectives of gibberellic acid production: A review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1–11. DOI: 10.3109/07388551.2011.615297. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/51762099>. Consulta: mayo, 2011.
- Rodriguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T. and Bashan, Y. 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil*. 287: 15-21.
- Rojas-Tapias, D., Moreno-Galván, A., Pardo-Díaz, S., Obando, M., Rivera, D. and Bonilla, R. 2012. Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). *Appl Soil Ecol*. 61: 264-272. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.01.006>.
- Sadhu, S. and Maiti, T.K. 2013. Cellulase production by bacteria: a review. *British Microbiology Research Journal*. 3: 235–258.
- Samaniego-Gámez, B.Y., Garruña, R., Tun-Suárez, J.M., Kantun-Can, J., Reyes-Ramírez, A. and Cervantes-Díaz, L. 2016. *Bacillus* spp. inoculation improves photosystem II efficiency and enhances photosynthesis in pepper plants. *Chilean Journal of Agricultural Research*. 76 (4): 409-416.
- Samavat, S., Samavat, S., Mafakheri, S. and Shakouri, M.J. 2012. Promoting common bean growth and nitrogen fixation by the co-inoculation of *Rhizobium* and *Pseudomonas fluorescens* isolates. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 18 (3): 387-395.
- 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.
- Sarić-Krsmanović, M., Božić, D., Radivojević, L., Umiljendić, J.G., Šantrić, L. and Vrbničanin, S. 2017. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and cover crops on seed germination and early establishment of field dodder (*Cuscuta campestris* Yunk.). *Pestic. Phytomed.* (Belgrade). 32 (2): 105–111.
- Schulz, B.E., Boyle, C.C., Sieber, T., Kloepper, J., Ryu, C.M. 2006. Bacterial Endophytes as Elicitors of Induced Systemic Resistance, Microbial Root Endophytes. Springer Berlin Heidelberg, pp. 33-52.
- Shahzad, R., Khan, A.L., Bilal, S., Asaf, S. and In-Jung, L. 2017. Plant growth-promoting endophytic bacteria versus pathogenic infections: an example of *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. *PeerJ* 5:e3107; DOI 10.7717/peerj.3107.
- Shaikh, S.S. and Sayyed, R.Z. 2015. Role of plant growth-promoting rhizobacteria and their formulation in biocontrol of plant diseases. In: *Plant microbes symbiosis: Applied facets*; Arora NK (ed.). pp: 337-351. Springer, New Delhi. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2068-8\\_18](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2068-8_18).
- Sharma, A. and Satyanarayana, T. 2013. Microbial acidstable-amylases: Characteristics, genetic engineering and applications. *Process Biochemistry*. 48: 201–211.

- Sharma, P., Bhatt, A. and Jyoti, B. 2018. Effect of Seed Bio-priming with Microbial Inoculants on Plant Growth, Yield and Yield Contributing Characters in Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *International Journal of Economic Plants*. 5(2): 053-058.
- Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H. and Gobi, T.A. 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springerplus* 2: 587
- Siddiqui, Z., Antoun, H. and Prévost, D. 2006. Ecology of Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR: biocontrol and biofertilization. Springer Netherlands, pp. 1-38.
- Sigarroa, A. 1985. *Biometría y Diseño Experimental*. La Habana. Editorial Pueblo y Educación. 743 p.
- Singh, A., Singh, K.P., Singh, M., Bhareti, P. and Singh, U.P. 2017. Antifungal activity of some strains of plant growth promoting rhizobacteria. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 6 (6): 577-582.
- Singh, I. 2018. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and their various mechanisms for plant growth enhancement in stressful conditions: a review. *European Journal of Biological Research*. 8 (4): 191-213.
- Singh, K. 2015. Role of Enzymes in Fruit juices Clarification during Processing: A review. *Int J Biol Technology*. 6: 114–124.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A. and Mehta, P.K. 2016. Microbial enzymes: Industrial progress in 21st century. *3 Biotech*. 6:174. DOI 10.1007/s13205-016-0485-8.
- Singh, R., Mittal, A., Kumar, M. and Kumar, P. 2016. Amylases: a note on current applications. *International Research Journal of Biological Sciences*. 5 (11):27-32.
- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D. and Nampoothiri, K.M. 2006.  $\alpha$ -Amylases from microbial sources - an overview on recent developments. *Food Technol. Biotechnol*. 44 (2): 173–184.
- Sohail, M., Siddiqi, R., Ahmad, A. and Khan, S.A. 2009. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: Effect of temperature and pH, *N. Biotechnol*. 25 (6) 437. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2009.02.002>
- Soni, S.K., Singh, R., Singh, M., Awasthi, A., Wasnik, K. and Kalra, A. 2014. Pretreatment of Cr(VI)-amended soil with chromate reducing rhizobacteria decreases plant toxicity and increases the yield of *Pisum sativum*. *Arch Environ Contam Toxicol* 66 (4): 616-627. <https://doi.org/10.1007/s00244-014-0003-0>.
- Souza, P.M. and Magalhães, P.O. 2010. Application of Microbial  $\alpha$ -Amylase In Industry – A Review. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41: 850-861.
- Souza, R., de Ambrosini, A. and Passaglia, L.M.P. 2015. Plant growth promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genet Mol Biol*. 38 (4): 401-419. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>.

- Stamenković, S., Beškoski, V., Karabegović, I., Lazić, M. and Nikolić, N. 2018. Microbial fertilizers: A comprehensive review of current findings and future perspectives. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 16 (1): 1-18. <https://doi.org/10.5424/sjar/2018161-12117>.
- Sundarram, A. and Murthy, T.P.K. 2014.  $\alpha$ -Amylase Production and Applications: A Review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*. 2 (4): 166-175.
- Supratim, B., Rabara, R. and Negi, S. 2017. Towards a better greener future - an alternative strategy using biofertilizers. I: Plant growth promoting bacteria. *Plant Gene*. doi: 10.1016/j.plgene.2017.07.004.
- Szilagyi-Zecchin, V.J., Mógor, Á.F. and Figueiredo, G.G.O. 2016. Strategies for characterization of agriculturally important bacteria. In: Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity; Singh DP, Singh HB, Prabha R (eds.). pp: 1-21. Springer, New Delhi. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5_1).
- Szilagyi-Zecchin, V.J., Mógor, Á.F. and Figueiredo, G.G.O. 2016. Strategies for characterization of agriculturally important bacteria. In: Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity; Singh DP, Singh HB, Prabha R (eds.). pp: 1-21. Springer, New Delhi. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5_1).
- Tester, R.F. and Karkalas, J. 2002. Starch in: Biopolymers, Polysaccharides II: Polysaccharides from Eukaryotes. (A. Steinbüchel series ed.; E.J. Vandamme, S. De Baets and A. Steinbüchel volume eds), Weinheim: Wiley-VCH., 6: 381-438.
- Thakur, A. and Parikh, S.C. 2018. Screening of Groundnut Plant Associated Rhizobacteria for Multiple Plant Beneficial Plant Growth Promoting Traits. *J Plant Pathol Microbiol*. 9: 457. doi: 10.4172/2157-7471.1000457.
- Thakur, D., Kaur, M. and Mishra, A. 2017. Isolation and screening of plant growth promoting *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. and their effect on growth, rhizospheric population and phosphorous concentration of *Aloe vera*. *Journal of Medicinal Plants Studies*. 5 (1): 187-192.
- 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*. 10 (1): 1-10.
- Tiwari, S.P., Srivastava, R., Singh, C.S., Shukla, K., Singh, R.K., Singh, P., Singh, R., Singh, N.L. and Sharma, R. 2015. Amylases: An overview with special reference to alpha amylase. *Journal of Global Biosciences*. 4 (1): 1886-1901.
- Trivedi, M.K., Patil, S. and Tallapragada, R.M. 2013. Effect of bio field treatment on the physical and thermal characteristics of vanadium pentoxide powders. *J. Mater. Sci. Eng.*, S11: 001.
- Turan, M., Ekinci, M., Yildirim, E., Güneş, A., Karagöz, K., Kotan, R. and Dursun, A. 2014. Plant growth-promoting rhizobacteria improved growth, nutrient, and

- hormone content of cabbage (*Brassica oleracea*) seedlings. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 38: 327-333.
- Ullah, A., Heng, S., Munis, M.F.H., Fahad, S. and Yang, X. 2015. Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: A review. *Environ Exp Bot*. 117: 28-40. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.05.001>.
- Uneo, M. 2004. Indol acetic acid related compounds induce the resistance to rice blast fungus, *Magnaporthe grisea* in Barley. *Phytopathology*. 152: 606-661. Buscar los otros autores
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.L., Touraine, B., Moëgne-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dyé, F. and Prigent-Combaret, C. 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front Plant Sci*4:356. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2013.00356>.
- Vassilev, N., Vassileva, M., Lopez, A., Martos, V., Reyes, A., Maksimovic, I., Eichler-Löbermann, B. and Malusà, E. 2015. Unexploited potential of some biotechnological techniques for biofertilizer production and formulation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 99 (12): 4983-4996. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6656-4>
- Vessey, J.K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255, 571-586.
- Vijayabharathi, R., Sathya, A. and Gopalakrishnan, S. 2016. A renaissance in plant growth-promoting and biocontrol agents by endophytes. In: *Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity*; Singh DP, Singh HB, Prabha R (eds.). pp: 37-60. Springer, New Delhi. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5_3)
- Villalobos, A., Gonzáles, A., Santiago, F., Iglesias, A., Martínez, J. y Martínez, M.E. 2016. Comportamiento agroproductivo de diferentes variedades de frijol negro (*Phaseolus vulgaris*. L.) en la finca «Las María» del municipio Primero de Enero. Researchgate. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/316033436>. Consulta: mayo, 2019.
- Vrbničanin, S., Božić, D., Sarić, M., Pavlović, D. and Raičević, V. 2011. Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on *Ambrosia artemisiifolia* L. Seed Germination. *Pestic. Phytomed. (Belgrade)*. 26(2): 141–146.
- Vyas, P., Rahi, P., Chauhan, A. and Gulati, A. 2007. Phosphate solubilization potential and stress tolerance of *Eupenicillium parvum* from tea soil. *Mycological Research*. 111:931-938.
- Wani, S.A., Chand, S., Wani, M.A., Ramzan, M. and Hakeem, K.R. 2016. Azotobacter chroococcum- A potential biofertilizer in agriculture: An overview. In: *Soil Science: Agricultural and environmental perspectives*; Hakeem KR, Akhtar J, Sabir M (eds.) pp: 333-348. Springer Int Publ, Cham, Switzerland. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-34451-5\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-319-34451-5_15).
- Yadav, J., Verma, J.P. and Tiwari, K.N. 2010. Effect of plant growth promoting Rhizobacteria on seed germination and plant growth Chickpea (*Cicer*

*arietinum* L.) under *in vitro* conditions. *Biological Forum - An International Journal*. 2 (2): 15-18.

Yong-Soon, P., Park, K., Kloepper, J.W. and Choong-Min, R. 2015. Plant growth-promoting rhizobacteria stimulate vegetative growth and asexual reproduction of *Kalanchoe daigremontiana*. *The Plant Pathology Journal*. 31 (2): 1-6.

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.

Zou, Ch., Li, Z and Yu, D. 2010. *Bacillus megaterium* Strain XTBG34 Promotes Plant Growth by Producing 2-Pentylfuran. *The Journal of Microbiology*. 48 (4): 460-466.